

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 048**

51 Int. Cl.:
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 39/09 (2006.01)
A61K 39/295 (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06740419 .4**
96 Fecha de presentación: **31.03.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1868645**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.12.2007**

54 Título: **Composición conjugada de proteína-polisacárido neumocócico multivalente**

30 Prioridad:
08.04.2005 US 669605 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.06.2012

73 Titular/es:
**WYETH LLC
FIVE GIRALDA FARMS
MADISON, NJ 07940, US**

72 Inventor/es:
**HAUSDORFF, William, P.;
SIBER, George, Rainer y
PARADISO, Peter, R.**

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 382 048 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición conjugada de proteína-polisacárido neumocócico multivalente

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere, en general, al campo de la medicina y, específicamente a la microbiología, inmunología, vacunas y a la prevención de la infección por un patógeno bacteriano mediante inmunización.

Antecedentes de la invención

10 *Streptococcus pneumoniae* es una causa principal de meningitis, neumonía y enfermedad invasiva grave en lactantes y niños pequeños en todo el mundo. Las vacunas de polisacáridos neumocócicos multivalentes llevan aprobadas muchos años y se ha demostrado que son valiosas en la prevención de la enfermedad por neumococos en adultos ancianos y pacientes de alto riesgo. Sin embargo, los lactantes y niños pequeños responden mal a la mayoría de los polisacáridos neumocócicos. La vacuna conjugada neumocócica heptavalente (7vPnC, Pevnar®) fue la primera de este tipo que se demostró que era altamente inmunogénica y eficaz contra la enfermedad invasiva y la otitis media en lactantes y niños pequeños. Ahora, esta vacuna está aprobada en muchos países de todo el mundo. Pevnar contiene los polisacáridos capsulares de los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F and 23F, cada uno conjugado con una proteína transportadora denominada CRM₁₉₇. Pevnar cubre aproximadamente el 80-90%, 60-80%, and 40-80% de la enfermedad neumocócica invasiva (IPD) en EE.UU., Europa y otras regiones del mundo, respectivamente [1,2]. Los datos de investigación reunidos en los años posteriores a la introducción de Pevnar han demostrado claramente una reducción de la enfermedad neumocócica invasiva en lactantes de EE.UU. como estaba previsto (FIG. 1) [3,4].

20 La investigación de la IPD realizada en lactantes de EE.UU. antes de la introducción de Pevnar demostró que una parte significativa de la enfermedad producida por los serogrupos 6 y 19 se debía a los serotipos 6A (aproximadamente un tercio) y 19A (aproximadamente un cuarto) [5,6]. La investigación de la enfermedad neumocócica invasiva realizada en EE.UU. tras la aprobación de Pevnar sugiere que una gran carga de la enfermedad se sigue atribuyendo a los serotipos 6A y 19A (FIG. 1) [3]. Además, estos dos serotipos representan más casos de enfermedad invasiva que los serotipos 1, 3, 5, and 7F combinados (8,2 vs. 3,3 casos/100.000 niños de 2 años de edad y menores). Además, los serotipos 6A and 19A se asocian con índices elevados de resistencia a antibióticos (FIG. 2) [7,8,9]. Aunque es posible que la protección cruzada por serogrupo tenga como resultado una disminución de la enfermedad por los serotipos 6A and 19A porque más niños están inmunizados, existen pruebas que sugieren que habrá un límite de la disminución y permanecerá una carga significativa de la enfermedad debido a estos serotipos (véase más adelante).

30 Dada la relativa carga e importancia de la enfermedad neumocócica invasiva debida a los serotipos 1, 3, 5, 6A, 7F, y 19A, la adición de estos serotipos a la formulación de Pevnar aumentaría la cobertura de la enfermedad invasiva a > 90 % en EE.UU. y Europa y tan alta como del 70-80 % en Asia y Latinoamérica. Esta vacuna ampliaría significativamente la cobertura más allá de la de Pevnar y proporcionaría cobertura para 6A y 19A que no dependen de las limitaciones de la protección cruzada por serogrupo.

35 Mbelle y col., (1999, J Infect Dis.; 180(4):1171-6) divulgan una vacuna conjugada neumocócica nonavalente en la que los serotipos 1, 4, 5, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F están conjugados con CRM197.

40 Hausdorff W. y col., (2000, Clinical Infectious Diseases, 30:100-121) analizaron conjuntos de datos para comparar los serogrupos causantes de la enfermedad neumocócica invasiva (IPD) con los representados en las formulaciones de vacunas conjugadas.

El documento US-A-2001/0048929 divulga una molécula inmunogénica multivalente que comprende una molécula transportadora que contiene al menos un epítipo de células T funcionales y fragmentos oligosacáridos de *Streptococcus pneumoniae* derivados de al menos dos polisacáridos capsulares de los serotipos de *Streptococcus pneumoniae* 1, 4, 5, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F.

45 El documento EP-A-0497525 divulga una composición vacunal que comprende polisacárido capsular purificado parcialmente hidrolizado de *Streptococcus pneumoniae* unido a una proteína transportadora inmunogénica.

El documento WO-A-2004/011027 divulga una molécula para vacuna conjugada quimérica multivalente usada para prevenir o atenuar el estreptococos del grupo B, siendo los polisacáridos capsulares bacterianos del tipo Ia, tipo Ib, tipo II, tipo III, tipo V y tipo VIII de estreptococos del grupo B.

50 Fattom y col. (1999, Vaccine pg. 126-133, Vol.17) divulga una reducción de respuestas de anticuerpo a varios serotipos en ratones cuando se comparó la inmunogenicidad de las vacunas conjugadas multivalentes con la inmunogenicidad de cada vacuna monovalente evaluada por separado. Este fenómeno también fue observado Dagan y col., (1998, Infection and Immunity, p.2093-2098).

Nurkka y col. (2004, Ped. Inf. Dis. J., 23:1008-1014) divulgan un estudio de la inmunogenicidad y seguridad de una vacuna conjugada undecavalente de proteína D neumocócica en la que no se observó efecto de primado para el serotipo 3 en lactantes que habían recibido tres dosis de la vacuna, seguido de una dosis de refuerzo de la misma vacuna o de una vacuna con polisacárido neumocócico.

5 Gatchalian y col. (2001, 17th Annual Meeting of the Eur. Soc. Paed. Inf. Dis (ESPID), póster número 4, Sesión 1 Póster P1A, Estambul, Turquía) divulgan los resultados de OPA de lactantes que habían recibido dosis de la vacuna undecavalente no mostraron respuestas de anticuerpo para el serotipo 3 a niveles comparables con otros serotipos analizados.

10 Wuorimaa y col. (2001, The Paediatric Infectious Disease Journal, Volume 20(3), pp 272-277) divulgan un estudio para evaluar la tolerabilidad y la inmunogenicidad en niños menores de dos años de edad sanos de una vacuna conjugada neumocócica undecavalente que usa los toxoides del tétanos y la difteria como vehículos.

15 Anderson P et al, (2003, Vaccine; 21 (13-14):1554-9) divulgan un estudio comparativo de vacunas conjugadas tetravalentes con cada polisacárido tipos 6A, 14, 19F y 23F acoplados por separado al toxoide del tétanos o a la CRM₁₉₇ de difteria o una mezcla de la mitad de las dosis del polisacárido tipos 6A, 14, 19F, y 23F acoplados por separado al toxoide del tétanos o a la CRM₁₉₇ de difteria.

Sumario de la invención

20 De acuerdo con esto, la presente invención proporciona, en general, una composición inmunogénica que comprende 13 conjugados polisacárido-proteína distintos, en los que cada uno de los conjugados contiene un polisacárido capsular de un serotipo distinto de *Streptococcus pneumoniae* conjugado a una proteína transportadora, junto con un vehículo fisiológicamente aceptable, en la que la proteína transportadora es CRM₁₉₇. Opcionalmente en la formulación se induce un adyuvante, como un adyuvante basado en aluminio. Más específicamente, la presente invención proporciona una composición conjugada neumocócica tridecavalente (13vPnC), que comprende los siete serotipos en la vacuna 7vPnC (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F) más seis serotipos adicionales (1, 3, 5, 6A, 7F y 19A).

25 La presente invención también proporciona una composición inmunogénica multivalente, en la que los polisacáridos capsulares son de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F de *Streptococcus pneumoniae* y la proteína transportadora es CRM₁₉₇.

30 La presente invención además proporciona una composición inmunogénica multivalente, en la que los polisacáridos capsulares son de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F de *Streptococcus pneumoniae* y la proteína transportadora es CRM₁₉₇ y el adyuvante es un adyuvante basado en aluminio, tal como fosfato de aluminio, sulfato de aluminio e hidróxido de aluminio. En una realización concreta de la invención, el adyuvante es fosfato de aluminio.

35 La presente divulgación proporciona también una composición inmunogénica multivalente, que comprende conjugados proteicos polisacáridos junto con un vehículo fisiológicamente activo, en la que cada uno de los conjugados comprende un polisacárido capsular de un serotipo diferente de *Streptococcus pneumoniae* conjugado con una proteína transportadora y los polisacáridos capsulares se preparan con el serotipo 3 y al menos un serotipo adicional.

40 En una realización de esta composición inmunogénica multivalente, el serotipo adicional se selecciona del grupo que consiste en los serotipos 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F. En otra realización, la proteína transportadora es CRM₁₉₇. En otra realización más, la composición comprende un adyuvante, tal como un adyuvante a base de aluminio, seleccionado de fosfato de aluminio, sulfato de aluminio e hidróxido de aluminio. En una realización concreta, el adyuvante es fosfato de aluminio.

45 La presente divulgación proporciona también una composición inmunogénica multivalente, que comprende conjugados proteicos polisacáridos junto con un vehículo fisiológicamente activo, en la que cada uno de los conjugados comprende un polisacárido capsular de un serotipo diferente de *Streptococcus pneumoniae* conjugado con una proteína transportadora y los polisacáridos capsulares se preparan con los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F y al menos un serotipo adicional.

50 En una realización de esta composición inmunogénica multivalente, el serotipo adicional se selecciona del grupo que consiste en los serotipos 1, 3, 5, 6A, 7F y 19A. En otra realización, la proteína transportadora es CRM₁₉₇. En otra realización más, la composición comprende un adyuvante, tal como un adyuvante a base de aluminio, seleccionado de fosfato de aluminio, sulfato de aluminio e hidróxido de aluminio. En una realización concreta, el adyuvante es fosfato de aluminio.

55 La presente divulgación también proporciona un procedimiento de inducir una respuesta inmunitaria a un conjugado polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae*, que comprende administrar a un ser humano una cantidad inmunológicamente eficaz de cualquiera de las composiciones inmunogénicas que se acaban de describir.

La presente invención proporciona además que cualquiera de las composiciones inmunogénicas administradas es una dosis única de 0,5 ml formulada de modo que contenga: 2 µg de cada sacárido, a excepción de 6B a 4 µg; aproximadamente 29 µg de la proteína transportadora CRM₁₉₇; 0,125 mg de adyuvante de aluminio elemental (0,5 mg de fosfato de aluminio); y los tampones cloruro sódico y succinato sódico como excipientes.

5 **Breve descripción de las figuras**

La FIG. 1 representa los cambios en los índices de IPD por serotipo en niños < 2 años de edad en EEUU con respecto a la situación basal (1998/1999) hasta 2001.

La FIG. 2 representa la distribución de aislamientos neumocócicos con resistencia a penicilina (PCN) en niños < 5 años de edad (1998).

10 La FIG. 3 representa las curvas de distribución acumulada inversa (RCDC) de resultados posteriores a la tercera dosis de la OPA del ensayo D118 P16 Pevnar.

Descripción detallada de la invención

Inclusión de los serotipos Pevnar 4 6B, 9V, 14, 18C, 19F 23F

15 Los datos de la investigación de IPD entre 1995-1998 estimaron que los siete serotipos en Pevnar eran responsables de aproximadamente el 82 % de la IPD en niños < 2 años de edad [5]. En el norte de California, el lugar del ensayo de eficacia, los serotipos de Pevnar representaron el 90 % de todos los casos de IPS en lactantes y niños pequeños [10]. Dado que la introducción de la vacuna Pevnar en 2000, se ha producido una disminución significativa de los índices de IPD global debido a una disminución en la enfermedad debido a los serotipos de la vacuna [3,4]. Por tanto, en este momento no hay justificación para eliminar ninguno de los serotipos de Pevnar de la siguiente generación de vacunas conjugadas neumocócicas, sino para añadir serotipos para obtener una cobertura mayor.

Inclusión de los serotipos 1, 3, 5 y 7F

25 En EE.UU., el índice de IPD producido por el serotipo 1 en niños menores de 5 años de edad es < 2 %, aproximadamente lo mismo que para cada uno de los tipos 3 y 7F [1,6]. Los serotipos 1 y 5 representan índices mayores de IPS en las poblaciones de EE.UU. en riesgo alto de enfermedad neumocócica invasiva. Específicamente, el serotipo 1 produce 3,5 % de IPD en niños nativos de Alaska < 2 años de edad y 18 % en niños 2-4 años de edad [11]. El serotipo 1 y el serotipo 5 causan enfermedad significativa en otras partes del mundo y en poblaciones indígenas en países desarrollados [12,13,14].

30 El serotipo 1 puede también estar asociado con enfermedad más grave, en comparación con otros serotipos neumocócicos [15]. Esta observación se basa en la diferencia de tasas en el caso de identificación entre EE.UU. y Europa y la diferencia asociada en la práctica médica. En general, la incidencia de IPD es menor en Europa que en EE.UU. No obstante, el porcentaje de IPD causado por el serotipo 1 en Europa es desproporcionadamente mayor que en EE.UU. (6-7%, vs. 1-2%, respectivamente). En Europa, se obtienen hemocultivos principalmente de niños hospitalizados. En EE.UU., es práctica médica rutinaria obtener hemocultivos en un contexto ambulatorio de niños que acuden con fiebre $\geq 39^{\circ}\text{C}$ y recuentos de glóbulos blancos elevados. Dada la diferencia en la práctica médica, se ha postulado que el porcentaje menor de enfermedad causada por el serotipo 1 en EE.UU. puede diluirse por los índices más altos de otros serotipos que producen enfermedad más leve, mientras que el mayor porcentaje en Europa refleja enfermedad más grave. Además, los estudios seroepidemiológicos de niños con neumonía complicada demuestran que el serotipo 1 está representado desproporcionadamente [16,17,18]. Esto sugiere que la inclusión del serotipo 1 puede reducir la cantidad de enfermedad neumocócica grave, así como contribuir a una reducción total de la enfermedad neumocócica invasiva.

35 La adición de los serotipos 3 y 7F aumentará la cobertura contra la IPD en la mayor parte de las zonas del mundo en aproximadamente 3%-7%, y en Asia en aproximadamente 9%. Por tanto, una vacuna undecavalente cubriría el 50 % en Asia y aproximadamente el 80 % de IPD en las demás regiones [1,2]. Estos serotipos también son importantes con respecto a la cobertura por otitis media [19]. En un estudio multinacional de serotipos neumocócicos que producen otitis media, Hausdorff y col. encontraron que el aislamiento de fluido en el oído medio global [20]. El serotipo 3 representó hasta el 8,7 % de los serotipos neumocócicos asociados con la otitis media. Por tanto, la importancia de los tipos 3 y 7F en la otitis media, así como en la IPD, requiere su inclusión en una vacuna conjugada neumocócica.

40 No obstante, los intentos para producir una vacuna conjugada neumocócica multivalente que exhibe inmunogenicidad significativa con respecto a los polisacáridos de serotipo 3 no han tenido éxito. Por ejemplo, en un estudio de la inmunogenicidad y seguridad de una vacuna conjugada undecavalente de proteína D neumocócica (11-Pn-PD), no se observó efecto de primado para el serotipo 3 en lactantes que habían recibido tres dosis de la vacuna, seguido de una dosis de refuerzo de la misma vacuna o de una vacuna con polisacárido neumocócico (Nurkka y col., (2004) Ped. Inf. Dis. J., 23:1008-1014). En otro estudio, los resultados del ensayo de opsonofagocitosis (OPA) en lactantes que habían recibido dosis de la vacuna 11-Pn-PD no habían mostrado respuestas de anticuerpos al serotipo 3 a niveles comparables con otros serotipos analizados Gatchalian y col., 17th Annual Meeting of the Eur. Soc. Paed. Inf. Dis. (ESPID), Póster N° 4, Póster P1A, Sesión 1, Estambul, Turquía, Mar.

27, 2001).. En otro estudio más, en el que se evaluó la eficacia de un 11-Pn-PD en la prevención de otitis media aguda, la vacuna no proporcionó protección contra los episodios causados por el serotipo 3 (Prymula y col. www.thelancet.com, Vol. 367: 740-748 (March 4, 2006)). De acuerdo con esto, una vacuna conjugada neumocócica que comprende polisacáridos capsulares de serotipo 3 y capaces de producir una respuesta inmunológica a los polisacáridos del serotipo 3 proporciona una mejora significativa sobre el estado actual de la técnica.

Inclusión de los serotipos 6A y 19A

a. Epidemiología de los serotipos 6A y 19A

Los datos de investigación bibliográfica sugieren que los serotipos 6A and 19A representan más enfermedad neumocócica invasiva en niños de EE.UU. < 2 años de edad que los serotipos 1, 3, 5 y 7F combinados ((FIG. 1) [1,5]. Además, estos serotipos habitualmente se asocian con resistencia antibiótica (FIG. 2) y desempeñan un papel importante en la otitis media [6,19,20]. La capacidad de la vacuna actual Prevnar para proteger contra la enfermedad por 6A y 19A no está clara. Los fundamentos para la inclusión de los componentes 6A and 19A en una vacuna 13vPnC se tratan más adelante,

b. Respuestas a 6A y 19A inducidas por los polisacáridos 6B y 19F

Las vacunas polisacáridas neumocócicas sin conjugar autorizadas (para usar en personas de al menos dos años de edad) han contenido el polisacárido capsular 6A o 6B pero no ambos [21]. Los datos de inmunogenicidad generados en el momento de la formulación de la vacuna polisacárida neumocócica 23valente demostraron que una vacuna monovalente 6B inducía anticuerpos frente a las cápsulas 6A y 6B. Los datos de varios ensayos que evalúan las respuestas de IgG y del ensayo opsonofagocítico (OPA) en diversas poblaciones con polisacárido libre y con vacunas conjugadas neumocócicas sugirieron que las respuestas de IgG a 6A son inducidas por los antígenos 6B, pero, en general, las respuestas son menores, y la actividad OPA con organismos 6A es diferente que con organismos 6B [22,23,24,25]. Además, los sujetos que responden con anticuerpos 6B altos pueden tener poca o ninguna actividad contra 6A.

En contraste con la composición química de los polisacáridos capsulares 6A y 6B en los que existe un alto grado de similitud, las cápsulas 19A y 19F son bastante diferentes debido a la presencia de dos cadenas laterales adicionales en el polisacárido 19A. No es sorprendente que las respuestas inmunitarias medidas en voluntarios humanos inmunizados con la vacuna polisacárida 19F mostraron que las respuestas a 19F se inducían en el 80 % de los sujetos, pero solo el 20 % de los sujetos habían respondido a 19A [26]. Niveles bajos de respuestas IgG y OPA de reacción cruzada al serotipo 19A tras la inmunización con el polisacárido 19F también se han documentado en ensayos con vacunas conjugadas también [24,26].

Los datos internos sobre respuestas OPA cruzadas a 6A y 19A se han generado a partir del ensayo de transición con 7vPnC (D118-P16) realizado en lactantes de EE.UU. (FIG. 3). Estos estudios son consistentes con los hallazgos de otros y demuestran inducción de anticuerpos funcionales de reacción cruzada al polisacárido 6A tras inmunización con el polisacárido 6B, aunque a un nivel menor, y muy poco anticuerpo funcional a 19A tras inmunización con 19F.

Impacto de la inmunización con 6B y 19F sobre 6A y 19A en modelos animales

Se han usado modelos animales para evaluar el potencial de protección cruzada con inmunización con polisacáridos. En un modelo de otitis media desarrollado por Giebink et al., se inmunizó a chinchillas con una vacuna conjugada con la preteína de membrana externa (PME) polisacárido tetravalente (que contiene los sacáridos 6B, 14, 19F, 23F) o con placebo [27]. En este ensayo parecía haber alguna protección cruzada para 6A; No obstante, esto no alcanzó significación estadística y el nivel de protección fue menor que con 6B contra la otitis media. En este mismo modelo se produjo una protección del 100 % contra la otitis media por 19F, pero sólo protección del 17 % contra la otitis media por 19A.

Saeland y col. usaron sueros de lactantes inmunizados con una vacuna conjugada contra el tétanos neumocócica octavalente (que contiene 6B y 19F) para inmunizar de forma pasiva a los ratones antes de una exposición intranasal a organismos 6A en un modelo de infección pulmonar [28]. De las 59 muestras de suero, el 53 % protegía a los ratones contra la bacteriemia con 6B y el 37 % los protegía frente a 6A. A ratones inmunizados de forma pasiva con sueros de lactantes inmunizados con cuatro dosis de una vacuna conjugada neumocócica undecavalente (que contiene 19F conjugado con el toroide del tétanos) se les administró una exposición intranasal a organismos 19A en el mismo modelo [29]. De 100 ratones inmunizados de forma pasiva y después expuestos, en 60 no se detectaron organismos 19A en tejido pulmonar, mientras que se identificaron organismos en todos los ratones a los que se les administró solución salina como placebo. No obstante, la inmunización pasiva no protegió contra la exposición a organismos 19F en este modelo; no obstante, la importancia del modelo para el serogrupo 19 es cuestionable. En general, estos modelos proporcionan evidencias de algún impacto biológico de la inmunización con 6B en organismos 6A, aunque el efecto sobre el serotipo heterólogo no era tan grande como el observado con el serotipo homólogo. El impacto de la inmunización 19F sobre organismos 19A no se entiende bien con estos modelos.

Impacto de la inmunización con el conjugado polisacárido 6B y 19F sobre la enfermedad 6A y 19A en ensayos de eficacia/efectividad

5 El número de casos de enfermedad debidos a los serotipos 6B, 6A, 19F y 19A en ensayos de eficacia de 7vPnC y 9vPnC (7vPnC más los serotipos 1 y 5) se indica en la Tabla 1 [30,10,31]. Las cifras de casos de enfermedad invasiva son demasiado pequeñas como para sacar conclusiones para los serotipos 6A y 19A. No obstante, el ensayo finlandés de otitis media generó un gran número de aislamientos neumocócicos [32]. En el análisis por protocolo, la 7vPnC tuvo un 84 % (IC del 95 % 62 %, 93 %) de eficacia contra la otitis media debida al serotipo 6B y un 57 % (IC del 95 % 24 %, 76 %) de eficacia contra la otitis media por el serotipo 6A (Tabla 1). En contraste con ello, no se demostró eficacia específica de serotipo con 7vPnC para la otitis media debida a 19F o a 19A.

10 **Tabla 1. Casos de enfermedad neumocócica debido a los serotipos 6B, 6A, 19F, and 19A en ensayos de eficacia con las vacunas 7vPnC and 9vPnC**

	6B		6A		19F		19A	
	Pnc	Contr.	Pnc	Contr.	Pnc	Contr.	Pnc	Contr.
Ensayo de eficacia Kaiser 7vPnC (ITT)	1	7	0	1	2*	13	0	1
Ensayo de eficacia Navajo 7vPnC (ITT)	0	5	1	0	1	1	1	0
Ensayo de eficacia de sudáfrica 9vPnC HIV (-) (ITT)	1	2	1	0	0	1	3	1
Ensayo de eficacia de sudáfrica 9vPnC HIV (+) (ITT)	1	7	3	10	2	3	2	3
Ensayo finlandés de otitis media-7vPnC (PP)	9*	56	19*	45	43	58	17	26

*Eficacia estadísticamente significativa demostrada
 De las referencias 30, 10 y 33, y comunicaciones personales
 Contr = control
 ITT = Análisis por intención de tratar
 PP = Análisis por protocolo

También se dispone de datos de IPD de investigación poscomercialización de un ensayo de casos y controles realizado por los Centros para el control de Enfermedades para evaluar la eficacia de Prevnar [33]. Los casos de enfermedad invasiva neumocócica que se producen en niños de 3 a 23 meses de edad se identificaron en los laboratorios de investigación y coincidieron con tres casos de controles por edad y por código postal. Tras obtener el consentimiento, se obtuvo el historial médico y de inmunización (se consideró a los sujetos inmunizados si habían recibido al menos una dosis de Prevnar) de padres y profesionales médicos para casos y controles. Los resultados preliminares se presentaron en la reunión de la ICAAC de 2003 y en la Tabla 2 se presenta un resumen de los hallazgos para la enfermedad por 6B, 19F, 19A y 6A. Estos datos indican que Prevnar es capaz de prevenir la enfermedad por 6A, aunque a un nivel que puede ser algo menor que la enfermedad por el serotipo 6B. Estos datos también indican que la protección cruzada para la enfermedad invasiva por 19A es limitada.

Tabla 2. Resultados preliminares de un ensayo control de casos realizado por los CDC (presentado en la ICAAC, 2003)

Serotipo	Conjuntos de información, n	VE* (IC del 95 %)
Tipo de vacuna, Todos	115	94 (87, 97)
Relacionado con la vacuna, Todos	36	70 (38, 86)
Tipo no vacuna, todos	43	-4 (-106, 48)
6B	27	94 (72, 99)
19F	19	73 (16, 92)
6A	15	87 (53, 97)
19A	16	40 (-87, 80)

*Efectividad de la vacuna que compra vacunados (≥ 1 dosis) frente a no vacunados y ajustados para afecciones subyacentes. Referencia 40 y comunicación personal/confidencial

Un análisis publicado [3] del uso de Prevnar también indicó que los serotipos 6B y 19F conferían una reducción moderada en la IPD causada por los serotipos 6A y 19A entre niños menores de dos años de edad (Tabla 1 en [3]). Los índices de enfermedad entre adultos no inmunizados causados por los serotipos 6A, 9A, 9L, 9N, 18A, 18B, 18F, 19A, 19B, 19C, 23A y 23B ("todos los serotipos relacionados con la vacuna") estaba algo reducidos (Tabla 2 en [3]). Estos datos establecen que la inmunidad HERD por el uso de Prevnar en niños menores de dos años de edad era modesta para los serotipos 6A y 19A proporcionan una base para la inclusión de los serotipos 6A y 19A en la vacuna 13vPnC de la presente invención.

Conclusión para la adición de 6A y 19A

Los datos de investigaciones poscomercialización y los resultados del estudio de casos y controles indicados en la FIG. 1 y la Tabla 2 con la vacuna 7vPnC sugiere que, consistente con la otra información sobre respuestas inmunitarias y funcionamiento en los modelos animales descritos anteriormente, se puede producir alguna protección cruzada contra la enfermedad por 6A, pero en menor medida que contra la enfermedad por 6B. Además, parece que la protección contra 19A es limitada. Por tanto, una vacuna 13vPnC que contiene los serotipos 6A y 19A proporciona cobertura que no depende de las limitaciones de la protección cruzada por seogrupos por los serotipos 6B y 19F.

De acuerdo con esto, la presente invención proporciona, en general, una composición inmunogénica que comprende 13 conjugados polisacárido-proteína distintos, en los que cada uno de los conjugados contiene un polisacárido capsular diferente conjugado a una proteína transportadora, y en la que los polisacáridos capsulares se preparan a partir de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F de *Streptococcus pneumoniae*, junto con un vehículo fisiológicamente aceptable en el que la proteína transportadora es el toxoide diftérico denominado CRM₁₉₇. La composición inmunogénica puede además comprender un adyuvante, tal como un adyuvante a base de aluminio, tal como fosfato de aluminio, sulfato de aluminio e hidróxido de aluminio.

Los polisacáridos capsulares se preparan mediante técnicas estándar conocidas por los expertos en la técnica. En la presente invención, los polisacáridos capsulares se preparan a partir de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F de *Streptococcus pneumoniae*. Estos conjugados neumocócicos se preparan mediante procesos separados y se formulan en una única formulación de dosificación. Por ejemplo, en una realización, cada serotipo de polisacárido neumocócico se cultiva en un medio a base de soja. Después, los polisacáridos individuales se purifican mediante centrifugación, precipitación, ultrafiltración y cromatografía en columna. Los polisacáridos purificados se activan químicamente para hacer los sacáridos capaces de reaccionar con la proteína transportadora.

Una vez activado, el polisacárido capsular se conjuga por separado con una proteína transportadora para formar un glucoconjugado. En una realización, cada polisacárido capsular está conjugado con la misma proteína transportadora. En esta realización, la conjugación se efectúa mediante afinación reductora.

5 La activación química de los polisacáridos y la posterior conjugación con la proteína transportadora se consiguen por medios convencionales. Véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 4.673.574. y 4.902.506 [34,35].

Preferentemente, las proteínas transportadoras son proteínas que son no tóxicas y no reactogénicas y que se pueden obtener en cantidad y pureza suficiente. Las proteínas transportadoras deberán ser susceptibles sufrir procedimientos de conjugación estándar. En la presente invención, la CRM₁₉₇ se usa como proteína transportadoras.

10 CRM₁₉₇ (Wyeth, Sanford, NC) es una variante no tóxica (es decir, toxoide) de la toxina diftérica aislada de cultivos de la cepa C7 (β197) de *Corynebacterium diphtheria* cultivada en medio a base de ácidos de casamino y extracto de levadura. La CRM₁₉₇ se purifica mediante ultrafiltración, precipitación en sulfato amónico y cromatografía de intercambio iónico. Como alternativa, la CRM₁₉₇ se prepara de forma recombinante de acuerdo con la patente de EE.UU. n.º 5.614.382. Otros toxoides diftéricos también son adecuados para usar como proteínas transportadoras.

15 Otra proteína transportadora incluye toxinas bacterianas inactivadas, tales como el toroide del tétanos, el toroide pertussis, el toroide del cólera (p. ej., como se describe en la solicitud de patente internacional WO2004/083251 [38]). *E. coli* LT, *E. coli* ST, "y exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*. También se pueden usar proteínas de la membrana externa bacteriana, tales como el complejo c de la membrana externa (OMPC), porinas, proteínas de unión a transferrina, neumolisina, proteína A de la superficie neumocócica (PspA), proteína de adhesina neumocócica (PsaA), peptidasa C5a de estreptococos del Grupo A o el Grupo B, o proteína D de *Haemophilus influenzae*. Otras proteínas, tales como ovoalbúmina, hemocianina de lapa californiana, (KLH), seroalbúmina bovina (BSA) o proteína purificada derivada de la tuberculina (PPD) también se pueden usar como proteínas transportadoras.

25 Tras la conjugación del polisacárido capsular a la proteína transportadora, los conjugados polisacárido-proteína se purifican (enriquecen con respecto a la cantidad de conjugado polisacárido-proteína) mediante diversas técnicas. Estas técnicas incluyen operación concentración/diafiltración, precipitación/elución, cromatografía en columna y filtración profunda. Véanse los Ejemplos siguientes.

30 Una vez que los glucoconjugados individuales se han purificado, se forman compuestos para formular la composición inmunogénica de la presente invención, que se puede usar como vacuna. La formulación de la composición inmunogénica de la presente invención se puede conseguir usando procedimientos reconocidos en la técnica. Por ejemplo, los 13 conjugados neumocócicos individuales se pueden formular con un vehículo fisiológicamente aceptable para preparar la composición. Ejemplos de tales vehículos incluyen, entre otros, agua, solución salina tamponada, polioles (p. ej., glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido) y soluciones de dextrosa.

35 En ciertas realizaciones, la composición inmunogénica comprenderá uno o más adyuvantes. Como se define en el presente documento, un "adyuvante" es una sustancia que sirve para potenciar la inmunogenicidad de una composición inmunogénica de la presente invención. Por tanto, los adyuvantes a menudo se administran para reforzar la respuesta inmunitaria son bien conocidos para los expertos en la técnica. Adyuvantes adecuados para potenciar la eficacia de la composición incluyen, entre otros:

40 (1) Sales de aluminio (alumbre), tal como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sales de aluminio etc.
(2) Formulaciones de emulsión de aceite en agua (con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos, tales como péptidos de muramilo (definidos más adelante) o componentes de la pared celular bacteriana), tales como, por ejemplo

45 (a) MF59 (N.º de publicación PCT WO 90/14837), que contiene escualeno al 5 %, Tween 80 al 0,5% y Span 85 al 0,5% (opcionalmente con varias cantidades de MTP-PE (véase más adelante, aunque no es necesario)) formulado en partículas de tamaño en submicrones usando un microfluidificador tal como el microfluidificador Modelo 110Y (Microfluidics, Newton, MA),

(b) SAF, que contiene escualeno al 10%, Tween 80 al 0,4%, polímero bloqueado con pluronic L121 al 5% y thr-MDP (véase más adelante) bien microfluidificado en una emulsión de submicrones o agitado en vórtex para generar una emulsión de mayor tamaño de partícula, y

50 (c) Sistema adyuvante RibiTM (RAS), (Corixa, Hamilton, MT) que contiene escualeno al 2 %, Tween 80 al 0,2 % y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo constituido por monofosforilo lípido A 3-O-desacilado (MPLTM) descrito en la patente de EE.UU. n.º 4.912.094 (Corixa), dimicolato de trehalosa (TDM) y esqueleto de la pared celular (CWS), preferentemente MPL + CWS (DetoxTM);

55 (3) se pueden usar adyuvantes de saponina, tal como Quil A o STIMULONTM QS-21 (Antigenics, Framingham, MA) (patente de EE.UU. n.º 5.057.540) o partículas generadas a partir de ellos, tales como ISCOM (complejos inmunoestimulantes);

(4) lipopolisacáridos bacterianos, análogos sintéticos del lípido a tales como compuestos de aminoalquilglucosaminofosfato (AGP) o derivados o análogos de los mismos, que están disponible en Corixa, y que se describen en la patente de EE.UU. n.º 6.113.918; uno de estos AGP es 2-[(R)-3-

Tetradecanoiloxitetradecanoilamino]etil 2-Desoxi-4-0-fosfono-3-0-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoilamino]-b-D-glucopiranosido, que también se conoce como 529 (anteriormente conocido como RC529), que se formula como una forma acuosa o como una emulsión estable, polinnucleótidos sintéticos que contienen motivo(s) CpG (patente de EE.UU. nº 6.207.646);

5 (5) citocinas, tales como interleucinas (p. ej., IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, etc.), interferones (p. ej., interferón gamma), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF), moléculas coestimuladoras B7-1 y B7-2, etc.;

10 (6) mutantes destoxificadas de una toxina bacteriana ribosilante de ADP, tal como la toxina del cólera (CT) bien en forma silvestre o mutante, por ejemplo cuando el ácido glutámico en la posición de aminoácido 29 está sustituido por otro aminoácido, preferentemente una histidina, de acuerdo con la solicitud de patente internacional publicada número WO 00/18434 (véase también los documentos WO 02/098368 y WO 02/098369), una toxina de pertussis (PT), o una toxina termolábil de *E. coli* (LT), particularmente LT-K63, LT-R72, CT-S109, PT-K9/G129 (véase, por ejemplo, los documentos WO 93/13302 y WO 92/19265); y

15 (7) otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimulantes para potenciar la eficacia de la composición.

Los péptidos de muramilo incluyen, entre otros, N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxi-fosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), etc.

Las formulaciones de vacunas de la presente invención se pueden usar para proteger o tratar a un ser humano susceptible a la infección por neumococos, administrando la vacuna por medio de una vía sistémica o mucosa. Estas administraciones pueden incluir inyección por vía intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea; o mediante administración mucosa en los tractos oral/alimentario, respiratorio o genitourinario. En una realización, la administración intranasal se usa para el tratamiento de la neumonía o la otitis media (de modo que el transporte nasofaríngeo de los neumococos se pueda prevenir con más eficacia y se atenúa la infección en su estadio más temprano).

25 La cantidad de conjugado en cada dosis de vacuna se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin efectos secundarios adversos significativos. Dicha cantidad puede variar en función del serotipo del neumococo. En general, cada dosis comprenderá de 0,1 a 100 µg de polisacárido, particularmente de 0,1 a 10 µg y, más particularmente, de 1 a 5 µg.

30 Cantidades óptimas de componentes para una vacuna concreta se pueden determinar mediante estudios convencionales que implican observación de respuestas inmunitarias adecuadas en los sujetos. Tras una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo espaciadas adecuadamente.

35 En una realización concreta de la presente invención, la vacuna 13vPnC es una formulación líquida estéril de polisacáridos capsulares neumocócicos de los serotipos 11, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, and 23F conjugados individualmente a CRM₁₉₇. Cada dosis de 0,5 ml se formula para que contenga: 2 µg de cada sacárido, a excepción de 6B a 4 µg; aproximadamente 29 µg de la proteína transportadora CRM₁₉₇; 0,125 mg de adyuvante de aluminio elemental (0,5 mg de fosfato de aluminio); y los tampones cloruro sódico y succinato sódico como excipientes. El líquido se carga en jeringuillas de una sola dosis sin un conservante. Después de agitar, la vacuna es una suspensión blanca homogénea lista para administración intramuscular.

40 La elección del nivel de dosis para la vacuna 137vPnC es similar a la vacuna 7vPnC comercializada (Prenvar). El nivel de dosis de 2 µg del sacárido se seleccionó para todos los serotipos, a excepción de 6B, que está a 4 µg por dosis. La vacuna 7vPnC ha mostrado una seguridad, inmunogeneicidad y eficacia deseables contra la IPD en el nivel de dosis de 2 µg del sacárido para los serotipos 4, 9V, 14, 18C, 19F and 23F, y a la dosis de 4 µg para 6B.

45 El calendario de inmunización puede seguir el designado para la vacuna 7vPnC. Por ejemplo, el calendario de rutina para lactantes y niños menores de 2 años de edad contra la enfermedad invasiva producida por *S. pneumoniae* debido a los serotipos incluidos en la vacuna 13vPnC es a los 2, 4, 6 y 12-15 meses de edad. Las composiciones de la presente invención son también adecuadas para usar con niños mayores, adolescentes y adultos.

Las composiciones de la presente invención pueden además incluir uno o más antígenos adicionales para usar contra la otitis media producida por infección con otra bacteria. Dichas bacterias incluyen *Haemophilus influenza* no tipificable, *Moraxella catarrhalis* (antes denominada *Branhamella catarrhalis*) y *Alloicoccus otitidis*.

50 Ejemplos de antígenos de *Haemophilus influenza* no tipificable adecuados para la inclusión incluyen la proteína P4, también conocida como proteína "e" (patente de EE.UU. nº 5.601.831; la solicitud de patente internacional WO03/078453), la proteína P6, también conocida como la proteína PAL o la PBOMP-1 (patente de EE.UU. nº 5.110.908; la solicitud de patente internacional WO0100790), la proteína P5 (patente de EE.UU. reemitida nº 37.741), la proteína de penetración y adhesión de *Haemophilus* (patentes de EE.UU. nº 6.245.337 y 6.676.948), la proteína de adhesión de la punta LKP (patente de EE.UU. nº 5.643.725) y la proteína NucA (patente de EE.UU. nº 6.221.365).

Ejemplos de antígenos de *Moraxella catarrhalis* adecuados para la inclusión incluyen la proteína UspA2 (patentes de EE.UU. nº 5.552.146, 6.310.190), la proteína CD (patente de EE.UU. nº 5.725.862), la proteína E (patente de EE.UU. nº 5.948.412) y la proteína de la membrana exterior de 74 kilodalton (patente de EE.UU. nº 6.899.885).

5 Ejemplos de antígenos de *Alloiococcus otitidis* adecuados para inclusión incluyen los identificados en la solicitud de patente internacional WO03/048304.

Las composiciones de la presente invención pueden incluir también una o más proteínas de *Streptococcus pneumoniae*. Ejemplos de proteínas de *Streptococcus pneumoniae* adecuadas para la inclusión incluyen las identificadas en la solicitud de patente internacional WO02/083855, así como las descritas en la solicitud de patente internacional WO02/053761.

10 Las composiciones de la presente invención pueden incluir además una o más proteínas de *Neisseria meningitidis* de tipo B. Ejemplos de proteínas de *Neisseria meningitidis* de tipo B adecuadas para inclusión incluyen las identificadas en las solicitudes de patente internacional WO03/063766, WO2004/094596, WO01/85772, WO02/1661 y WO01/87939.

15 Generalmente, la divulgación anterior describe la presente invención. Se puede obtener una comprensión más completa por referencia a los siguientes ejemplos específicos. Estos ejemplos se describen únicamente con fines ilustrativos y no deben interpretarse como limitantes del ámbito de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Preparación del polisacárido capsular de *S. Pneumoniae* Serotipo 1

20 Preparación del banco de células maestras y de trabajo

El serotipo 1 de *S. pneumoniae* se obtuvo de la Colección Americana de cultivos Tipo, ATCC, cepa 6301. Se crearon varias generaciones de reservas de semillas con el fin de expandir la cepa y eliminar los componentes de origen animal (generación F1, F2, y F3). Se produjeron dos generaciones adicionales de reservas de semillas. La primera generación adicional se realizó a partir de un vial de F3 y la generación posterior se realizó a partir de un vial de la primera generación adicional. Los viales de semillas se almacenaron congelados (<-70°C) con glicerol sintético como crioconservante. Además de los viales congelados, se prepararon viales liofilizados para la generación F4. Para la preparación del banco celular se cultivaron todos los cultivos en medio basado en soja. Antes de congelar se concentraron las células mediante centrifugación, se retiró el medio gastado y los sedimentos celulares se resuspendieron en medio fresco que contenía un crioconservante, tal como glicerol sintético.

30 Fermentación y recolección

Los cultivos del banco de células de trabajo se usaron para inocular frascos de semillas que contienen un medio basado en soja. Los frascos se incubaron a 36 °C ± 2 °C sin agitación hasta cumplir los requisitos de crecimiento. Se usó un frasco de semillas para inocular un fermentador de semillas que contenía medio basado en soja. Se mantuvo un pH de aproximadamente 7,0 con solución de carbonato sódico estéril. Después de alcanzar la densidad óptica diana, el fermentador de semillas se usó para inocular el fermentador de producción que contiene medio basado en soja. El pH se mantuvo en con solución de carbonato sódico estéril. La fermentación se detuvo tras el cese del crecimiento o cuando se alcanzó el volumen de trabajo del fermentador. Al cultivo para lisar las células bacterianas y liberar el polisacárido asociado con las células se añadió una cantidad adecuada de desoxicolato sódico al 12 % estéril. Después de lisar, se enfriaron los contenidos del fermentador. El pH del caldo de cultivo lisado se ajustó a un pH de aproximadamente 6,6 con ácido acético. El lisado se aclaró mediante centrifugación de flujo continuo, seguido por filtración profunda y microfiltración en 0,45 µm.

En un procedimiento alternativo, el pH de la fermentación de aproximadamente 7,0 se mantuvo con NaOH 3N. Después de alcanzar la densidad óptica diana, el fermentador de semillas se usó para inocular el fermentador de producción que contiene medio basado en soja. El pH se mantuvo con NaOH 3N. La fermentación se detuvo tras el cese del crecimiento o cuando se alcanzó el volumen de trabajo del fermentador. Al cultivo para lisar las células bacterianas y liberar el polisacárido asociado con las células se añadió una cantidad adecuada de desoxicolato sódico al 12 % estéril para obtener una concentración del 0,12 % en el caldo. Después de lisar, se conservaron los contenidos del fermentador, con agitación, durante un intervalo de tiempo entre 8 y 24 horas a una temperatura entre 7 °C y 13 °C para garantizar que se produce la lisis celular completa y la liberación del polisacárido. La agitación durante este periodo de retención evitó que el sedimento lisado se acumulara sobre las paredes del fermentador y la sonda de pH, de modo que se puede mantener la integridad de la sonda de pH. Después, el pH del caldo de cultivo lisado se ajustó a un pH de aproximadamente 5,0 con ácido acético al 50 %. Después de un tiempo de retención sin agitación, durante un intervalo de tiempo entre 12 y 24 horas a una temperatura entre 15 °C y 25 °C, una porción significativa de las proteínas previamente solubles salió de la solución como un precipitado sólido con poca pérdida o degradación del polisacárido, que permaneció en solución. La solución con el precipitado se aclaró después mediante centrifugación de flujo continuo, seguido por filtración profunda y microfiltración en 0,45 µm.

Purificación

La purificación del polisacárido neumocócico consistió en varias operaciones de concentración/diafiltración, precipitación/elución, cromatografía en columna y etapas de filtración profunda. Todos los procedimientos se realizaron a temperatura ambiente, a menos que se especificara lo contrario.

5 El caldo aclarado de los cultivos del fermentador de *S. pneumoniae*, serotipo 1, se concentraron y diafiltraron usando un filtro de 100 kDa MWCO (corte del peso molecular en kilodalton). La diafiltración se realizó usando tampón de fosfato sódico a pH neutro. La diafiltración eliminó los componentes del medio de peso molecular bajo de los biopolímeros de alto peso molecular, tales como ácido nucleico, proteína y polisacárido.

10 El polisacárido se precipitó en la solución concentrada y diafiltrada añadiendo bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HB) de una solución madre para dar una concentración final de HB al 1 % (p/v). El polisacárido/precipitado HB se capturó en un filtro profundo y se descartó el filtrado. El precipitado de polisacárido se resolubilizó y eluyó mediante recirculación de una solución de cloruro sódico mediante el filtro de profundidad que contiene el precipitado. Después, los filtros se aclararon con solución de cloruro sódico adicional.

15 A la solución del polisacárido se añadió yoduro sódico (NaI) procedente de una solución madre de NaI para alcanzar una concentración final del 0,5 % para precipitar HB. El precipitado se eliminó mediante filtración profunda. El filtrado contiene el polisacárido diana. El vaso de precipitados y el filtro se aclararon con una solución de NaCl/NaI y el aclarado se combinó con la solución de polisacárido parcialmente purificada. El filtro se descartó. Después, el polisacárido se filtró a través de un filtro de 0,2 μm .

20 La solución de polisacárido se concentró en un ultrafiltro MWCO de 30 kDa y se diafiltró con una solución de cloruro sódico.

La solución de polisacárido parcialmente purificada se purificó adicionalmente mediante filtración a través de un filtro profundo impregnado con carbón activado. Después de la filtración, el filtro de carbono se lavó con una solución de cloruro sódico. El aclarado se combina con la solución de polisacárido, que después se filtra a través de un filtro de 0,2 μm .

25 La solución de polisacárido se concentró en un ultrafiltro MWCO de 30 kDa y se ajustó con un tampón de fosfato sódico 1M para alcanzar una concentración final de fosfato sódico 0,025M. El pH se comprobó y ajustó hasta 7,0 \pm 0,2.

30 La columna de hidroxiapatita (HA) cerámica se equilibró con tampón de fosfato sódico que contiene cloruro sódico para obtener la conductividad adecuada (<15 μS). La solución de polisacárido se cargó después en la columna. En estas condiciones, las impurezas unidas a la resina y el polisacárido se recuperaron en el flujo constante de la columna. La solución de polisacárido se filtró a través de filtros integrados de 0,2 μm localizados antes y después de la columna.

La solución de polisacárido se concentró usando un filtro MWCO de 30 kDa. Después se diafiltró el concentrado con agua para inyectables (WFI).

35 Se filtró la solución de polisacárido diafiltrado a través de un filtro de membrana de 0,2 μm en frascos de polipropileno. Las muestras se retiraron para ensayo de liberación y el polisacárido purificado se almacenó congelado a -25 ± 5 °C.

Caracterización

40 Los datos de RMN de ^1H fueron consistentes con la estructura química mediante la asignación de señales asignadas a los protones de la molécula de polisacárido. El espectro de RMN de ^1H mostró una serie de señales bien resueltas (protones del grupo metilo) para la cuantificación del grupo funcional de O-acetilo en el polisacárido.

La identidad del polisacárido monovalente se confirmó mediante inmunoelectroforesis de contracorriente usando antisuero específico.

45 Se usó cromatografía de filtración en gel de alto rendimiento acoplada con detectores de dispersión de luz láser multiángulo e índice de refracción (MALLS) junto con la concentración de la muestra para calcular el peso molecular.

Se usó medio para cromatografía de exclusión por tamaño (CL-4B) para perfilar la distribución del tamaño molecular relativo del polisacárido.

Ejemplo 2

Preparación de conjugado de sacárido neumocócico-CRM₁₉₇ de serotipo 1

50

Activación y conjugación

5 Se descongelaron contenedores de polisacárido purificado y se combinaron en un vaso de reacción. En el vaso, se añadió carbonato sódico 0,2 M, pH 9,0, para desacetilación parcial (hidrólisis) durante 3 horas a 50 °C. La reacción se enfrió hasta 20 °C y se realizó neutralización mediante ácido acético 0,2M. Se realizó oxidación en presencia de peróxido sódico mediante incubación a 2-8 °C y la mezcla se agitó durante 15-21 horas.

La mezcla de reacción de activación se concentró y diafiltró 10x con NaCl al 0,9 % usando una membrana de MWCO 30K. La sustancia que se retuvo se filtró con 0,2 µm. El sacárido activado se cargó en frascos de liofilización de vidrio de 100 ml y se congeló superficialmente a -75 °C y se liofilizó

10 La "Congelación superficial o en concha" es un procedimiento para preparar las muestras para liofilización (deseccación por congelación). Los matraces se rotan automáticamente mediante rodillos a motor en un baño refrigerado que contiene alcohol o cualquier otro fluido adecuado. Una capa fina de producto se congela uniformemente alrededor del interior de la "cubierta" de un matraz, lo que permite procesar un volumen mayor de material durante cada ciclo de liofilización. Estas unidades refrigeradas automáticas proporcionan un medio simple y eficaz de pre-congelar muchos matraces al mismo tiempo, lo que produce los recubrimientos deseados en el interior y proporciona suficiente área de superficie para una liofilización eficiente.

15 Los frascos de material liofilizado se llevaron a temperatura ambiente y se resuspendieron en una solución de CRM₁₉₇ a una proporción de sacárido/proteína de 2:1. A la mezcla de sacárido/proteína se añadió tampón de fosfato sódico 1M a una fuerza iónica final de 0,2M y a un pH de 7,5, después se añadió cianoborohidruro sódico. La reacción se incubó a 23 °C durante 18 horas, seguido de una segunda incubación a 37 °C durante 72 horas. Tras las incubaciones con cianoborohidruro, la mezcla de reacción se diluyó con solución salina fría, seguido de la adición de carbonato sódico 1M para ajustar la mezcla de reacción hasta pH 9,0. Los aldehídos sin reaccionar se inactivaron mediante la adición de borohidruro sódico mediante incubación a 23 °C durante 3-6 horas.

20 La mezcla de reacción se diluyó 2 veces con solución salina y se transfirió a través de un prefiltro de 0,45-5 µm en un vaso de retención. La mezcla de reacción se diafiltró 30 veces con tampón fosfato 0,15M, pH 6 y 20 veces con solución salina. La sustancia retenida se filtró a través de un filtro de 0,2 µm.

25 La solución conjugada se diluyó hasta un objetivo de 0,5 mg/ml en solución salina al 0,9 % y, después, se esterilizó mediante filtración en contenedores con concentrado en masa final (FBC) en una campana de Clase 100. El conjugado se almacenó a 2-8°C.

Caracterización

30 Se usó medio para cromatografía de exclusión por tamaño (CL-4B) para perfilar la distribución del tamaño molecular relativo del conjugado.

La identidad del conjugado se confirmó mediante ensayo de transferencia en muesca usando antisuero específico.

35 Las concentraciones del sacárido y la proteína se determinaron mediante ensayos con ácido urónico y de Lowry, respectivamente. La proporción entre el sacárido y la proteína en el complejo de conjugado unido covalentemente se obtuvo mediante el cálculo:

$$\text{Proporción} = \frac{\mu\text{g/ml de sacárido}}{\mu\text{g/ml de proteína}}$$

El contenido en O-acetilo se midió mediante el método de Hestrin (Hestrin y col., J. Biol. Chem. 1949, 180, p. 249). La proporción entre la concentración de O-acetilo y la concentración de sacárido total dio µmol de O-acetilo por mg de sacárido.

40 **Ejemplo 3**

Preparación del polisacárido capsular de *S. Pneumoniae* Serotipo 3

Preparación del banco de células maestras y de trabajo

El *S. pneumoniae* serotipo 3 se obtuvo del Dr. Robert Austrian, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania. Para la preparación del sistema de banco celular, véase el Ejemplo 1.

45 Fermentación y recolección

Los cultivos del banco de células de trabajo se usaron para inocular frascos de semillas que contienen un medio basado en soja. Los frascos se incubaron a 36 °C ± 2 °C sin agitación hasta cumplir los requisitos de crecimiento. Se

usó un frasco de semillas para inocular un fermentador de semillas que contenía medio basado en soja. Se mantuvo un pH de aproximadamente 7,0 con solución de carbonato sódico estéril. Después de alcanzar la densidad óptica diana, el fermentador de semillas se usó para inocular un fermentador de de semillas intermedio. Después de alcanzar la densidad óptica diana, el fermentador de semillas intermedio se usó para inocular un fermentador de producción. El pH se mantuvo en con solución de carbonato sódico estéril. La fermentación se detuvo tras alcanzar el volumen de trabajo del fermentador. Al cultivo para lisar las células bacterianas y liberar el polisacárido asociado con las células se añadió una cantidad adecuada de desoxicolato sódico al 12 % estéril. Después de lisar, se enfriaron los contenidos del fermentador. El pH del caldo de cultivo lisado se ajustó a un pH de aproximadamente 6,6 con ácido acético. El lisado se aclaró mediante centrifugación de flujo continuo, seguido por filtración profunda y microfiltración en 0,45 μm .

Purificación

La purificación del polisacárido neumocócico consistió en varias operaciones de concentración/diafiltración, precipitación/elución, cromatografía en columna y etapas de filtración profunda. Todos los procedimientos se realizaron a temperatura ambiente, a menos que se especificara lo contrario.

El caldo aclarado de los cultivos del fermentador de *S. pneumoniae*, serotipo 3, se concentraron y diafiltraron usando un filtro de 100 kDa MWCO. La diafiltración se realizó usando tampón de fosfato sódico a pH neutro. La diafiltración eliminó los componentes del medio de peso molecular bajo de los biopolímeros de alto pesos molecular, tales como ácido nucleico, proteína y polisacárido.

Antes de la adición de bromuro de hexadeciltrimetil amónico (HB), se añadió un volumen calculado de una solución madre de NaCl a la solución de polisacárido concentrado y diafiltrado, para dar una concentración final de NaCl 0,25M. Después, el polisacárido se precipitó añadiendo HB de una solución madre para dar una concentración final de HB al 1 % (p/v). El polisacárido/precipitado HB se capturó en un filtro profundo y se descartó el filtrado. El precipitado de polisacárido se resolubilizó y eluyó mediante recirculación de una solución de cloruro sódico mediante el filtro de profundidad que contiene el precipitado. Después, los filtros se aclararon con solución de cloruro sódico adiona.

A la solución del polisacárido Se añadió yoduro sódico (NaI) procedente de una solución madre de NaI para alcanzar una concentración final del 0,5 % para precipitar HB. El precipitado se eliminó mediante filtración profunda. El filtrado contenía el polisacárido diana. El vaso de precipitados y el filtro se aclararon con una solución de NaCl/NaI y el aclarado se combinó con la solución de polisacárido parcialmente purificada. El filtro se descartó. Después, el polisacárido se filtró a través de un filtro de 0,2 μm .

La solución de polisacárido se concentró en un ultrafiltro MWCO de 30 kDa y se diafiltró con una solución de cloruro sódico.

La solución de polisacárido parcialmente purificada se purificó adicionalmente mediante filtración a través de un filtro profundo impregnado con carbón activado. Después de la filtración, el filtro de carbono se lavó con una solución de cloruro sódico. El aclarado se combinó con la solución de polisacárido, que después se filtra a través de un filtro de 0,2 μm .

La solución de polisacárido se concentró en un ultrafiltro MWCO de 30 kDa y se ajustó con un tampón de fosfato sódico 1M para alcanzar una concentración final de fosfato sódico 0,025M. El pH se comprobó y ajustó hasta $7,0 \pm 0,2$.

La columna de hidroxiapatita (HA) cerámica se equilibró con tampón de fosfato sódico que contiene cloruro sódico para obtener la conductividad adecuada (15 μS). La solución de polisacárido se cargó después en la columna. En estas condiciones, las impurezas unidas a la resina y el polisacárido se recuperaron en el flujo constante de la columna. El polisacárido se pasó por la columna con tampón y se filtró a través de un filtro de 0,2 μm .

La solución de polisacárido se concentró usando un filtro MWCO de 30 kDa. El concentrado se diafiltró después con WFI.

Se filtró la solución de polisacárido diafiltrado a través de un filtro de membrana de 0,2 μm en contenedores de acero inoxidable. Las muestras se retiraron para ensayo de liberación y el polisacárido purificado se almacenó congelado a -25 ± 5 °C.

Caracterización

Los datos de RMN de ^1H fueron consistentes con la estructura química mediante la asignación de señales asignadas a los protones de la molécula de polisacárido.

La identidad del polisacárido monovalente se confirmó mediante inmunolectroforesis de contracorriente usando antisuero específico.

Se usó cromatografía de filtración en gel de alto rendimiento acoplada con detectores de dispersión de luz láser multiángulo e índice de refracción (MALLS) junto con la concentración de la muestra para calcular el peso molecular.

Se usó medio para cromatografía de exclusión por tamaño para perfilar la distribución del tamaño molecular relativo del polisacárido.

5 **Ejemplo 4**

Preparación de conjugado de sacárido neumocócico-CRM₁₉₇ de serotipo 3

Activación y conjugación

10 Se descongelaron contenedores de acárido de serotipo 3 purificado y se combinaron en un vaso de reacción. En el vaso se añadieron WFI y ácido acético 2M hasta una concentración final de 0,2M y 2 mg/ml de sacárido. La temperatura de la solución se elevó hasta 85 °C durante una hora para hidrolizar el polisacárido. La reacción se enfrió hasta < 25°C y se añadió cloruro de magnesio 1M hasta una concentración final de 0,1M. Se realizó oxidación en presencia de peryodato sódico mediante incubación a 23 °C y durante 16-24 horas.

La mezcla de reacción de activación se concentró y diafiltró 10x con WFI usando una membrana de MWCO 100K. La sustancia retenida se filtró a través de un filtro de 0,2 µm.

15 Para mezclar se añadió al sacárido activado fosfato sódico 0,2M, pH 7,0, hasta una concentración final de 10 Mm y un pH de 6,0-6,5, La proteína transportadora CRM₁₉₇ se mezcló con la solución de sacárido hasta una proporción de 2 g de sacárido por 1 g de CRM₁₉₇. La solución combinada de sacárido/proteína se cargó en frascos de liofilización de vidrio de 100 ml con un objetivo de cargar 50 ml y se congeló superficialmente a -75 °C y se liofilizó.

20 Los frascos con material sacárido/proteína co-liofilizado se llevaron hasta temperatura ambiente y se resuspendieron en tampón fosfato sódico 0,1M, pH 7,0, hasta una concentración final del sacárido de 20 mg/ml. El pH se ajustó hasta 6,5 y después se añadió 0,5 equivalentes molares de cianoborohidruro sódico. Las reacción se incubó a 37°C durante 48 horas. Después de la incubación de cianoborohidruro, la mezcla de reacción se diluyó con succinato 5mM frío/tampón de solución salina al 0,9 %. Los aldehídos sin reaccionar se inactivaron mediante la adición de borohidruro sódico mediante incubación a 23 °C durante 3-6 horas. La mezcla de reacción se transfirió a través de un prefiltrado de 0,45-5 µm en un vaso de retención.

25 La mezcla de reacción se diafiltró 30 veces con tampón fosfato 0,1M (pH 9), 20 veces con tampón fosfato 0,15M (pH 6) y 20 veces con succinato 5M/solución salina al 0,9 %. La sustancia retenida se filtró a través de un filtro de 0,2 - µm.

30 La solución conjugada se diluyó hasta un objetivo del sacárido 0,5 mg/ml y, después, se esterilizó mediante filtración en contenedores FBC en una campana de Clase 100. El conjugado se almacenó a 2-8°C.

Caracterización

Se usó medio para cromatografía de exclusión por tamaño (CL-4B) para perfilar la distribución del tamaño molecular relativo del conjugado.

La identidad del conjugado se confirmó mediante ensayo de transferencia en muesca usando antisuero específico.

35 Las concentraciones del sacárido y la proteína se determinaron mediante ensayos de Anthrone y de Lowry, respectivamente. La proporción entre el sacárido y la proteína en el complejo de conjugado unido covalentemente se obtuvo mediante el cálculo:

$$\text{Proporción} = \frac{\mu\text{g/ml de sacárido}}{\mu\text{g/ml de proteína}}$$

Ejemplo 5

40 **Preparación del polisacárido capsular de *S. Pneumoniae* Serotipo 5**

El *S. pneumoniae* se serotipo 5 se obtuvo del Dr. Gerald Schiffman of the State University of New York, Brooklyn, New York. Para la preparación del sistema del banco celular véase el Ejemplo 1. Para fermentación, recolección, purificación y caracterización del polisacárido, véase el Ejemplo 1.

Procedimiento de fermentación alternativo

45 Los cultivos del banco de células de trabajo se usaron para inocular frascos de semillas que contienen un medio

basado en soja y solución de NaHCO_3 10 mM estéril. Los frascos se incubaron a $36 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ sin agitación hasta cumplir los requisitos de crecimiento. Se usó un frasco de semillas para inocular un fermentador de semillas que contenía medio basado en soja y solución de NaHCO_3 10 mM estéril. Se mantuvo un pH de aproximadamente 7,0 con NaOH 3N. Después de alcanzar la densidad óptica diana, el fermentador de semillas se usó para inocular el fermentador de producción que contiene medio basado en soja con una concentración de NaHCO_3 10 mM. El pH se mantuvo con NaOH 3N. La fermentación se detuvo tras el cese del crecimiento o cuando se alcanzó el volumen de trabajo del fermentador. Al cultivo para lisar las células bacterianas y liberar el polisacárido asociado con las células se añadió una cantidad adecuada de desoxicolato sódico al 12 % estéril para obtener una concentración del 0,12 % en el caldo. Después de lisar, se conservaron los contenidos del fermentador, con agitación, durante un intervalo de tiempo entre 8 y 24 horas a una temperatura entre $7 \text{ }^\circ\text{C}$ y $13 \text{ }^\circ\text{C}$ para garantizar que se produce la lisis celular completa y la liberación del polisacárido. La agitación durante este periodo de retención evitó que el sedimento lisado se acumulara sobre las paredes del fermentador y la sonda de pH, de modo que se puede mantener la integridad de la sonda de pH. Después, el pH del caldo de cultivo lisado se ajustó a un pH de aproximadamente 4,5 con ácido acético al 50 %. Después de un tiempo de retención sin agitación, durante un intervalo de tiempo entre 12 y 24 horas a una temperatura entre $15 \text{ }^\circ\text{C}$ y $25 \text{ }^\circ\text{C}$, una porción significativa de las proteínas previamente solubles salió de la solución como un precipitado sólido con poca pérdida o degradación del polisacárido, que permaneció en solución. La solución con el precipitado se aclaró después mediante centrifugación de flujo continuo, seguido por filtración profunda y microfiltración en $0,45 \text{ } \mu\text{m}$.

Ejemplo 6

20 Preparación de conjugado de sacárido neumocócico-CRM₁₉₇ de serotipo 5

Activación y conjugación

Se descongelaron contenedores de sacárido de serotipo 5 purificado y se combinaron en un vaso de reacción. En el vaso de reacción se añadió acetato sódico 0,1M a pH 4,7, seguido de oxidación en presencia de peryodato sódico mediante incubación a $23 \text{ }^\circ\text{C}$ y durante 16-22 horas.

25 La mezcla de reacción de activación se concentró y diafiltró 10x con WFI usando una membrana de MWCO 100K. La sustancia retenida se filtró a través de un filtro de $0,2 \text{ } \mu\text{m}$.

El sacárido activado de serotipo 5 se combinó con CRM₁₉₇ en una proporción de 0,8:1. La solución combinada de sacárido/proteína se cargó en frascos de liofilización de vidrio de 100 ml (con un objetivo de cargar 50 ml). se congeló superficialmente a $-75 \text{ }^\circ\text{C}$ y se coliofilizó.

30 Los frascos con material co-liofilizado se llevaron hasta temperatura ambiente y se resuspendieron en tampón fosfato sódico 0,1M, pH 7,5 y se añadió cianoborohidruro sódico. La reacción se incubó a 30°C durante 72 horas, seguido de una segunda adición de cianoborohidruro y se incubó a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 20-28 horas.

35 Tras las incubaciones con cianoborohidruro, la mezcla de reacción se diluyó 2 veces con solución salina y se transfirió a través de un prefiltro de $0,45\text{-}5 \text{ } \mu\text{m}$ en un vaso de retención. La mezcla de reacción se diafiltró 30 veces con tampón fosfato 0,01M, pH 8 y 20 veces con tampón fosfato 0,15M, pH 6 y 20 veces con solución salina. La sustancia retenida se filtró a través de un filtro de $0,2 \text{ } \mu\text{m}$.

La solución conjugada se diluyó hasta un objetivo del sacárido 0,5 mg/ml y, después, se esterilizó mediante filtración en contenedores FBC en una campana de Clase 100. El conjugado se almacenó a $2\text{-}8^\circ\text{C}$.

Para la caracterización del conjugado, véase el Ejemplo 2.

40 Ejemplo 7

Preparación del polisacárido capsular de *S. Pneumoniae* Serotipo 6A

45 El *S. pneumoniae* serotipo 6A se obtuvo del Dr. Gerald Schiffman of the State University of New York, Brooklyn, New York. Para la preparación del sistema del banco celular véase el Ejemplo 1. Para fermentación, recolección, purificación y caracterización del polisacárido, véase el Ejemplo 1, a excepción de que durante la purificación se omite la etapa de concentración en MWCO 30 kDa, antes de la etapa de la cromatografía.

Ejemplo 8

Preparación de conjugado de sacárido neumocócico-CRM₁₉₇ de serotipo 6A

Activación y conjugación

50 El polisacárido de serotipo 6A es un polímero de alto peso molecular cuyo tamaño que se tuvo que reducir antes de la oxidación. Se descongelaron contenedores de sacárido de serotipo 6A purificado y se combinaron en un vaso de reacción. En el vaso se añadió ácido acético 2M hasta una concentración final de 0,1M antes de la hidrólisis durante 1,5 horas a $60 \text{ }^\circ\text{C}$. La reacción se enfrió hasta $23 \text{ }^\circ\text{C}$ y se realizó la neutralización ajustando la mezcla de reacción

con NaOH 1M hasta un pH de 6. La oxidación en presencia de peryodato sódico se realizó mediante incubación a 23 °C durante 14-22 horas.

La mezcla de reacción de activación se concentró y diafiltró 10x con WFI usando una membrana de MWCO 100K. La sustancia retenida se filtró a través de un filtro de 0,2 µm.

- 5 El serotipo 6A se mezcló con sacarosa y se cargó en frascos de liofilización de vidrio de 100 ml con un objetivo de cargar 50 ml y se congeló superficialmente a -75 °C y se liofilizó.

- Los frascos de material liofilizado se llevaron hasta temperatura ambiente y se resuspendieron en dimetilsulfóxido (DMSO) en una proporción de sacárido/proteína de 1:1. Tras la adición de cianoborohidruro sódico, la mezcla de reacción se incubó a 23 °C durante 18 horas. Después de la incubación de cianoborohidruro, la mezcla de reacción se diluyó con solución salina fría. Los aldehídos sin reaccionar se inactivaron mediante la adición de borohidruro sódico mediante incubación a 23 °C durante 3-20 horas.
- 10

La mezcla de reacción diluida se transfirió a través de un prefiltro de 5 µm en un vaso de retención. La mezcla de reacción se diafiltró 10 veces con NaCl al 0,9 % y 30 veces con NaCl tamponado con succinato. La sustancia retenida se filtró a través de un filtro de 0,2 µm.

- 15 La solución conjugada se diluyó hasta un objetivo del sacárido 0,5 mg/ml y, después, se esterilizó mediante filtración en contenedores FBC en una campana de Clase 100. El conjugado se almacenó a 2-8°C.

Para la caracterización del conjugado, véase el Ejemplo 2.

Ejemplo 9

Preparación del polisacárido capsular de *S. Pneumoniae* Serotipo 7F

- 20 El *S. pneumoniae* serotipo 7F se obtuvo del Dr. Gerald Schiffman of the State University of New York, Brooklyn, New York. Para la preparación del sistema del banco celular y para la fermentación, recolección del polisacárido, véase el Ejemplo 3. Para un procedimiento alternativo de fermentación y recolección, véase el procedimiento alternativo descrito en el Ejemplo 1.

Purificación

- 25 La purificación del polisacárido neumocócico consistió en varias operaciones de concentración/diafiltración, precipitación/elución, cromatografía en columna y etapas de filtración profunda. Todos los procedimientos se realizaron a temperatura ambiente, a menos que se especificara lo contrario.

- El caldo aclarado de los cultivos del fermentador de *S. pneumoniae*, serotipo 7F, se concentraron y diafiltraron usando un filtro de 100 kDa MWCO. La diafiltración se realizó usando tampón de fosfato sódico a pH neutro. La diafiltración eliminó los componentes del medio de peso molecular bajo de los biopolímeros de alto peso molecular, tales como ácido nucleico, proteína y polisacárido.
- 30

El serotipo 7F no forma un precipitado con HB. En su lugar, las impurezas se precipitaron en la solución concentrada y diafiltrada añadiendo HB de una solución madre para dar una concentración final de HB al 1 %. El precipitado se capturó en un filtro profundo y se descartó el filtro. El polisacárido estaba contenido en el filtrado.

- 35 A la solución del polisacárido se añadió yoduro sódico (NaI) procedente de una solución madre de NaI para alcanzar una concentración final del 0,5 % para precipitar HB. El precipitado se eliminó mediante filtración profunda. El filtrado contenía el polisacárido diana. El vaso de precipitados y el filtro se aclararon con una solución de NaCl/NaI y los aclarados se combinaron con la solución de polisacárido parcialmente purificada. El filtro se descartó. Después, el polisacárido se filtró a través de un filtro de 0,2 µm.

- 40 La solución de polisacárido se concentró en un ultrafiltro MWCO de 30 kDa y se diafiltró con una solución de cloruro sódico.

- La solución de polisacárido parcialmente purificada se purificó adicionalmente mediante filtración a través de un filtro profundo impregnado con carbón activado. Después de la filtración, el filtro de carbono se lavó con una solución de cloruro sódico. El aclarado se combinó con la solución de polisacárido, que después se filtra a través de un filtro de 0,2 µm.
- 45

La solución de polisacárido se concentró en un ultrafiltro MWCO de 30 kDa y se ajustó con un tampón de fosfato sódico 1M para alcanzar una concentración final de fosfato sódico 0,025M. El pH se comprobó y ajustó hasta 7,0 ± 0,2.

- 50 La columna de hidroxiapatita (HA) cerámica se equilibró con tampón de fosfato sódico que contiene cloruro sódico para obtener la conductividad adecuada (15 µS). La solución de polisacárido se cargó después en la columna. En estas condiciones, las impurezas unidas a la resina y el polisacárido se recuperaron en el flujo constante de la

columna. El polisacárido se pasó por la columna con tampón y se filtró a través de un filtro de 0,2 µm.

La solución de polisacárido se concentró usando un filtro MWCO de 30 kDa. El concentrado se diafiltró después con WFI.

5 Se filtró la solución de polisacárido diafiltrado a través de un filtro de membrana de 0,2 µm en contenedores de acero inoxidable. Las muestras se retiraron para ensayo de liberación y el polisacárido purificado se almacenó a 2-8 °C

Para la caracterización del polisacárido, véase el Ejemplo 3.

Ejemplo 10

Preparación de conjugado de sacárido neumocócico-CRM₁₉₇ de serotipo 7F

Activación y conjugación

10 Se realizó oxidación en presencia de peryodato sódico mediante incubación a 23 °C y durante 16-24 horas.

La mezcla de reacción de activación se concentró y diafiltró 10x con NaOAc 10 Mm a Ph 4,5 usando una membrana de MWCO 100K. La sustancia retenida se filtró a través de un filtro de 0,2 µm.

El serotipo 7F se cargó en frascos de liofilización de vidrio de 100 ml (con un objetivo de cargar 50 ml) y se congeló superficialmente a -75 °C y se liofilizó.

15 Los frascos del serotipo 7Fy CRM₁₉₇ liofilizados se llevaron hasta temperatura ambiente y se resuspendieron en DMSO) en una proporción de sacárido/proteína de 1,5:1. Tras la adición de cianborohidruro sódico, la mezcla de reacción se incubó a 23 °C durante 8-10 horas, Los aldehídos sin reaccionar se inactivaron mediante la adición de borohidruro sódico mediante incubación a 23 °C durante 16 horas.

20 La mezcla de reacción se diluyó 10 veces con solución salina y se transfirió a través de un prefiltro de 5 µm en un vaso de retención. La mezcla de reacción se diafiltró 10 veces con solución salina al 0,9 % y 30 veces con solución salina tamponada con succinato. La sustancia retenida se filtró a través de un filtro de 0,2 µm.

La solución conjugada se diluyó hasta un objetivo del sacárido 0,5 mg/ml y solución salina al 0,9 % y, después, se esterilizó mediante filtración en contenedores FBC en una campana de Clase 100. El conjugado se almacenó a 2-8°C.

25 Para la caracterización del conjugado, véase el Ejemplo 4.

Ejemplo 11

Preparación del polisacárido capsular de *S. Pneumoniae* Serotipo 19A

30 El *S. pneumoniae* serotipo 19A se obtuvo del Dr. Gerald Schiffman of the State University of New York, Brooklyn, New York. Para la preparación del sistema del banco celular véase el Ejemplo 1. Para fermentación, recolección y purificación del polisacárido, véase el Ejemplo 7. Para la caracterización, véase el Ejemplo 3.

Ejemplo 12

Preparación de conjugado de sacárido neumocócico-CRM₁₉₇ de serotipo 19A

Activación y conjugación

35 Se descongelaron contenedores de sacárido de serotipo 19A purificado y se combinaron en un vaso de reacción. Se añadió acetato sódico hasta 10 Mm (pH 5,0) y se realizó oxidación en presencia de peryodato sódico mediante incubación a 23 °C y durante 16-24 horas.

La mezcla de reacción de activación se concentró y diafiltró 10x con acetato 10 Mm a pH 5,0 usando una membrana de MWCO 100K. La sustancia retenida se filtró a través de un filtro de 0,2 µm.

40 El sacárido activado se mezcló con sacarosa, seguido de la adición de CRM₁₉₇. La mezcla de sacárido activado del serotipo 19A y CRM₁₉₇ (proporción 0,8:1) se cargó en frascos de liofilización de vidrio de 100 ml (con un objetivo de cargar 50 ml) y se congeló superficialmente a -75 °C y se liofilizó.

45 Los frascos de material liofilizado se llevaron hasta la temperatura ambiente y se resuspendieron en DMSO. A la mezcla sacárido/proteína se añadió cianborohidruro (100 mg/ml). La reacción se incubó a 23°C durante 15 horas. Tras la incubación con cianborohidruro, los aldehídos sin reaccionar se inactivaron mediante la adición de borohidruro sódico mediante incubación a 23 °C durante 3-20 horas.

La mezcla de reacción se diluyó 10 veces con solución salina y se transfirió a través de un prefiltro de 5 µm en un

vaso de retención. La mezcla de reacción se diafiltró 10 veces con NaCl al 0,9 %, se filtró con 0,45 μm y 30 veces con diafiltración usando tampón de NaCl al 0,9%/succinato 5 mM a pH 6. La sustancia retenida se filtró con un filtro de 0,2 μm .

5 La solución conjugada se diluyó hasta un objetivo de 0,5 mg/ml usando solución salina al 0,9 %/succinato 5 mM y, después, se esterilizó mediante filtración en contenedores FBC en una campana de Clase 100. El conjugado se almacenó a 2-8°C.

Para la caracterización del conjugado, véase el Ejemplo 4.

Ejemplo 13

Preparación del polisacárido capsular de *S. Pneumoniae* de los serotipos 4,6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F

10 Preparación del cultivo de semillas de *S. pneumoniae*

El *S. pneumoniae* de serotipos 4, 6B, 9V, 18C, 19F y 23F se obtuvo del Dr. Gerald Schiffman of the State University of New York, Brooklyn, New York. *S. pneumoniae* de serotipo 14 se obtuvo de la ATCC, cepa 6314.

15 Por separado, se usó un vial de cada uno de los serotipos deseados de *Streptococcus pneumoniae* para iniciar un lote de fermentación. Dos frascos que contenían medio basado en soja y rojo fenol se ajustaron hasta un pH en el intervalo de $7,4 \pm 0,2$ usando carbonato sódico y, después, a los frascos se añadió el volumen requerido de la solución de dextrosa al 50 %/sulfato de magnesio al 1 %. En los dos frascos se inoculó diferentes cantidades de semillas. Los frascos se incubaron a $36^\circ \pm 2^\circ\text{C}$ hasta que el medio pasó a ser amarillo. Tras la incubación, se extrajeron las muestras de cada frasco y se analizó la densidad óptica (DO) (0,3 a 0,9) y pH (4,6 a 5,5). Uno de los dos frascos se seleccionó para inocular en el fermentador de semillas.

20 El medio basado en soja se transfirió al fermentador de semillas y se esterilizó.. Después, al fermentador se añadió un volumen de solución de dextrosa al 50 %/sulfato de magnesio al 1%. El pH y la agitación del fermentador de semillas se monitorizaron y controlaron (pH 6,7 a 7,4). La temperatura se mantuvo a $36^\circ \pm 2^\circ\text{C}$. El inóculo de semillas (frasco) se conectó en asepsia al fermentador de semillas y se transfirió el inóculo. El fermentador se mantuvo en control de pH y se extrajeron muestras periódicamente y se analizó la DO y el pH. Cuando se alcanzó la DO de 0,5 a 600 nm deseada, se inoculó en el fermentador intermedio el caldo de fermentación procedente del fermentador de semillas.

30 El medio basado en soja se transfirió al fermentador intermedio y se esterilizó.. Después, al fermentador se añadió un volumen de solución de dextrosa al 50 %/sulfato de magnesio al 1%. El pH y la agitación del fermentador intermedio se monitorizaron y controlaron (pH 6,7 a 7,4). La temperatura se mantuvo a $36^\circ \pm 2^\circ\text{C}$. El contenido del fermentador de semillas se transfirió al fermentador intermedio. El fermentador se mantuvo en control de pH y se extrajeron muestras periódicamente y se analizó la DO y el pH. Cuando se alcanzó la DO de 0,5 a 600 nm deseada, se inoculó en el fermentador de producción el caldo de fermentación procedente del fermentador intermedio.

35 El medio basado en soja se transfirió al fermentador de producción y se esterilizó.. Después, al fermentador se añadió un volumen de solución de dextrosa al 50 %/sulfato de magnesio al 1%. El pH y la agitación del fermentador de producción se monitorizaron y controlaron (pH 6,7 a 7,4). El fermentador se mantuvo a $36 \pm 2^\circ\text{C}$. El fermentador se mantuvo en control de pH y se extrajeron muestras periódicamente y se analizó la DO y el pH hasta completar la fermentación.

40 Al fermentador se añadió desoxicolato sódico hasta una concentración final de aproximadamente 0,12 % p/v. El cultivo se mezcló durante un mínimo de treinta minutos y la temperatura se redujo a 10°C . El cultivo se incubó durante la noche y tras la confirmación de la inactivación, el pH del cultivo se ajustó a entre 6,4 y 6,8, según lo necesario, con ácido acético al 50 %. La temperatura del fermentador se aumentó hasta $20^\circ \pm 5^\circ\text{C}$ y el contenido se transfirió al tanque de retención de aclaración.

45 El contenido del tanque de retención de aclaración (incluidos los residuos celulares) se procesaron a través de una centrífuga a un caudal entre 25 y 600 litros por hora (excepto el serotipo 4, en el que el residuo celular se descarró y el caudal se ajustó a entre 25 y 250 litros por hora. Se extrajeron muestras del sobrenadante y se analizó la DO. La DO deseada durante la centrifugación fue $\leq 0,15$.

Inicialmente, el sobrenadante se recirculó a través de un ensamblaje de filtro profundo hasta una DO de $0,05 \pm 0,03$. Después, el sobrenadante se pasó a través de un ensamblaje de filtro profundo y a través de un filtro de membrana de 0,45 μm al tanque de retención del filtrado.

50 Después, se transfirió el producto a través de conductos cerrados al área de purificación para procesamiento.

Todas las operaciones anteriores (centrifugación, filtración y transferencia) se realizaron entre 10°C a 30°C .

Para una fermentación alternativa y el procedimiento de recolección de los serotipos 4 y 6B, véase el procedimiento

alternativo descrito en el Ejemplo 1.

Purificación

5 La purificación de cada polisacárido neumocócico consistió en varias operaciones de concentración/diafiltración, precipitación/elución, cromatografía en columna y etapas de filtración profunda. Todos los procedimientos se realizaron a temperatura ambiente, a menos que se especificara lo contrario.

El caldo aclarado de los cultivos del fermentador de *S. pneumoniae* del serotipo deseado, se concentraron y diafiltraron usando un filtro de 100 kDa MWCO. La diafiltración se realizó usando tampón de fosfato sódico a pH < 9,0. La diafiltración eliminó los componentes del medio de peso molecular bajo de los biopolímeros de alto peso molecular, tales como ácido nucleico, proteína y polisacárido.

10 El polisacárido se precipitó en la solución concentrada y diafiltrada añadiendo bromuro de HB de una solución madre para dar una concentración final de HB al 1 % (p/v) (excepto el serotipo 23F, que tenía una concentración final de 2,5 %). El polisacárido/precipitado HB se capturó en un filtro profundo y se descartó el filtrado. (Nota: El serotipo 14 no precipita, por tanto se conservó el filtrado). El precipitado de polisacárido se resolubilizó y eluyó mediante recirculación de una solución de cloruro sódico mediante el filtro de profundidad que contiene el precipitado.
15 Después, los filtros se aclararon con solución de cloruro sódico adicional.

A la solución del polisacárido se añadió yoduro sódico (NaI) procedente de una solución madre de NaI para alcanzar una concentración final del 0,5 % para precipitar HB (excepto el serotipo 6B que tenía una concentración final de 0,25 %). El precipitado se eliminó mediante filtración profunda. El filtrado contenía el polisacárido diana. El filtro se descartó. Después, el polisacárido se filtró a través de un filtro de 0,2 µm.

20 La solución de polisacárido se concentró en un ultrafiltro MWCO de 30 kDa y se diafiltró con una solución de cloruro sódico.

25 La solución de polisacárido parcialmente purificada se purificó adicionalmente mediante filtración a través de un filtro profundo impregnado con carbón activado. Después de la filtración, el filtro de carbono se lavó con una solución de cloruro sódico. El aclarado se combinó con la solución de polisacárido, que después se filtra a través de un filtro de 0,2 µm.

La solución de polisacárido se concentró en un ultrafiltro MWCO de 30 kDa y el filtrado se aclaró con una solución de cloruro sódico. El pH se comprobó y ajustó hasta $7,0 \pm 0,3$.

30 La columna de hidroxiapatita (HA) cerámica se equilibró con tampón de fosfato sódico que contiene cloruro sódico hasta que un pH de $7,0 \pm 0,3$ y la conductividad fue de $26 \pm 4 \mu\text{S}$. La solución de polisacárido se cargó después en la columna. En estas condiciones, las impurezas unidas a la resina y el polisacárido se recuperaron en el flujo constante de la columna. El polisacárido se filtró a través de un filtro de 0,2 µm.

La solución de polisacárido se concentró usando un filtro MWCO de 30 kDa. Después se diafiltró el concentrado con WFI hasta que la conductividad fue < $15 \mu\text{S}$.

35 Se filtró la solución de polisacárido diafiltrado a través de un filtro de membrana de 0,2 µm en contenedores y se almacenó a 2-8°C.

Ejemplo 14

Preparación de conjugados sacárido neumocócico-CRM₁₉₇ para los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F

Procedimiento de activación

40 Los sacáridos de diferentes serotipos siguen las diferentes vías de activación (hidrólisis o no hidrólisis antes de la activación) y conjugación (reacciones acuosas o DMSO) como se describe en este ejemplo.

El polisacárido se transfirió desde los contenedores al vaso reactor. Después, el polisacárido se diluyó en WFI y fosfato sódico hasta un intervalo de concentración final de $1,6 \pm 2,7 \text{ mg/ml}$.

Etapas 1.

Para los serotipos 6B, 9V, 14, 19F y 23F, el pH se ajustó a $\text{pH } 6,0 \pm 0,3$.

45 Para el serotipo 4, se añadió ácido clorhídrico (concentración de ácido final 0,01M) y la solución se incubó durante 25-35 minutos a $45 \pm 2^\circ\text{C}$. La hidrólisis se detuvo enfriando hasta $21 \pm 25^\circ\text{C}$ y añadiendo fosfato sódico 1M hasta un objetivo de $\text{pH } 6,7 \pm 0,2$. Se realizó un ensayo durante el procedimiento para confirmar un nivel adecuado de despiruvilación.

Para el serotipo 18C, se añadió ácido acético glacial (concentración de ácido final 0,2M) y la solución se incubó

durante 205-215 minutos a $94^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Después, se redujo la temperatura hasta $21 - 25^{\circ}\text{C}$ y se añadió fosfato sódico 1-2M hasta un objetivo de pH $6,8 \pm 0,2$.

Etapa 2: Reacción con peryodato

5 Los equivalentes molares requeridos de peryodato sódico para la activación del sacárido neumocócico se determinaron usando en contenido de sacárido total (excepto por el serotipo 4). Para el serotipo 4 se usó una proporción de 0,8-1,2 moles de peryodato sódico por mol de sacárido. Con mezclado exhaustivo, se dejó proceder la reacción de activación entre 16 a 20 horas a $21 \pm 25^{\circ}\text{C}$ para todos los serotipos excepto el 19F para el que la temperatura fue $\leq 15^{\circ}\text{C}$.

Etapa 3: Ultrafiltración

10 El sacárido oxidado se concentró y diafiltró con WFO (solución 0,01M de tampón fosfato sódico, pH 6,0 para el serotipo 19F) en un ultrafiltro MWCO 100 kDa (ultrafiltro de 5kDa para 18C). El permeado se desechó y la sustancia retenida se filtró a través de un filtro de $0,22 \pm \mu\text{m}$.

Etapa 4: Liofilización

15 Para los serotipos 4, 9V, y 14, el sacárido concentrado se mezcló con la proteína transportadora CRM₁₉₇, se cargo en frascos de vidrio, se congeló superficialmente y se almacenó a $\leq -65^{\circ}\text{C}$. El sacárido-CRM₁₉₇, concentrado se liofilizó y se almacenó a $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$.

20 Para los serotipos 46B, 19F, y 23F, se añadió una cantidad especificada de sacarosa que se calculó para alcanzar una concentración de sacarosa del 5%- 3% en la mezcla de reacción de conjugación. El serotipo 18C no requirió adición de sacarosa. E sacárido concentrado se cargó en frascos de vidrio, se congeló superficialmente y se almacenó a $\leq -65^{\circ}\text{C}$. El sacárido concentrado se liofilizó y se almacenó a $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$.

Procedimiento de conjugación

Se usaron dos procedimientos de conjugación: Conjugación acuosa para los serotipos 4, 9V, 14 y 18C y conjugación con DMSO para los serotipos Pevnar 6B, 19F y 23F.

Conjugación acuosa

25 *Etapa 1: Disolución*

Para los serotipos 4, 9V y 14, la mezcla sacárido activado-CRM₁₉₇ liofilizada se descongeló y equilibró a temperatura ambiente. El sacárido activado-CRM₁₉₇ liofilizado se reconstituyó después en tampón de fosfato sódico 0,1M a una proporción típica de:

- 1 L de tampón por 16 - 24 g de sacárido para el serotipo 4 y 9V

30 • 1 L de tampón por 6 - 10 g de sacárido para el serotipo 14

La mezcla de reacción se incubó a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ hasta la disolución total para el serotipo 9V y a $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ para los serotipos 4 y 14.

35 Para el serotipo 18C se reconstituyó el sacárido liofilizado en una solución de CRM₁₉₇ en fosfato sódico dibásico 1M a una proporción típica de 0,11 l de fosfato sódico por 1 l de solución con CRM₁₉₇. La mezcla de reacción (concentración de sacárido 8-12 g/l) se incubó a $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ hasta la disolución total.

EL pH se analizó como control durante el procedimiento en esta etapa.

Etapa 2: Reacción de conjugación

40 Para los serotipos 4 y 9V, la reacción de conjugación se inició añadiendo la solución de cianoborohidruro sódico (100 mg/ml) para conseguir 1,0-1,4 moles de cianoborohidruro sódico por mol de sacárido. La mezcla de reacción se incubó durante 44-52 horas a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$. La temperatura se redujo después hasta $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y se añadió al reactor cloruro sódico al 0,9 %. Se añadió solución de borohidruro (100 mg/ml) para alcanzar 1,8-2,2 equivalentes molares de borohidruro sódico por mol de sacárido. La mezcla se incubó durante 3-6 horas a $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$. La mezcla se diluyó con cloruro sódico al 0,9 % y se aclaró el reactor. La mezcla de conjugación diluida se filtró usando un prefiltro de $1,2 \mu\text{m}$ en un vaso de retención.

45 Para los serotipos 14 y 18C, la reacción de conjugación se inició añadiendo la solución de cianoborohidruro (100 mg/ml) para conseguir 1,0-1,4 moles de cianoborohidruro sódico por mol de sacárido. La mezcla de reacción se incubó durante 12-24 horas a $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$. La temperatura se redujo después hasta $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y la reacción se incubó durante 72-96 horas. Después se redujo la temperatura hasta $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y se añadió cloruro sódico al 0,9 % en el reactor. Se añadió solución de borohidruro (100mg/ml) para alcanzar 1,8-2,2 equivalentes molares de borohidruro

sódico por mol de sacárido. La mezcla se incubó durante 3-6 horas a 23 ± 2 °C. La mezcla se diluyó con cloruro sódico al 0,9 % y se aclaró el reactor. La mezcla de conjugación diluida se filtró usando un prefiltro de 1,2 μm en un vaso de retención.

Etapa 3: Ultrafiltración 100 kDa

- 5 La mezcla de conjugación diluida se concentró y diafiltró en un ultrafiltro de MWCO de 100 kDa con un mínimo de 15 volúmenes (serotipo 4) o 40 volúmenes (serotipos 9V, 14, y 18C) de cloruro sódico al 0,9 %.

El permeado se descartó.

Para el serotipo 4, la sustancia retenida se filtró a través de un filtro de 0,45 μm .

En esta etapa se realizó un control durante el procedimiento (contenido de sacárido).

- 10 *Etapa 4: Purificación en columna HA*

Esta etapa solo se realizó para el conjugado del serotipo 4.

- 15 Primero se neutralizó la columna de HA usando tampón fosfato sódico 0,5M (pH $7,0 \pm 0,3$) y después se equilibró con cloruro sódico al 0,9 %. La sustancia retenida filtrada (serotipo 4) se cargó en la columna a un caudal de 1,0 U/min. La columna se lavó con cloruro sódico al 0,9 % a un caudal de $\leq 2,0$ U/min. Después, el producto se eluyó con fosfato sódico 0,5M a un caudal de $\leq 2,0$ U/min.

La fracción de HA se concentró y diafiltró en una membrana de MWCO de 100 kDa con un mínimo de 20 volúmenes de cloruro sódico al 0,9 %. El permeado se descartó.

Etapa 5: Esterilización por filtración

- 20 La sustancia retenida tras la diafiltración con MWCO de 100 kDa se filtró a través de un filtro de 0,22 μm . Se realizaron controles durante el procedimiento (contenido de sacárido, proteína libre, sacárido libre y cianuro) sobre el producto filtrado. Se realizaron controles durante el procedimiento con la sustancia retenida filtrada para determinar si se necesitaba concentración, diafiltración y/o dilución adicional para cumplir los objetivos de FBC. Estas y otras pruebas adicionales se repitieron en las muestras de FBC.

- 25 Según era necesario, el conjugado filtrado se diluyó con cloruro sódico al 0,9 % con el fin de alcanzar una concentración final inferior a 0,55 g/l. Las pruebas con la sustancia retenida del contenido de sacárido, proteína y la proporción de sacárido:proteína se realizaron en esta etapa.

- 30 Por último, se filtró el conjugado (0,22 μm) y se cargó en recipientes de acero inoxidable de 10 l a una cantidad típica de 2,64 g/recipiente. En esta etapa, el rendimiento, del contenido de sacárido, contenido de proteína, pH, proporción de sacárido:proteína y el contenido de lisina se realizaron como controles durante el procedimiento. Las pruebas de liberación (aspecto, proteína libre, sacárido libre, endotoxina, determinación del tamaño molecular, cianuro residuo, identidad del sacárido, identidad de la CRM₁₉₇) se realizaron en esta etapa.

Conjugación con DMSO

Etapa I: Disolución

- 35 El sacárido activado liofilizado, serotipos 6B, 19F, 23F y la proteína transportadora CRM₁₉₇ liofilizada se equilibraron a temperatura ambiente y se reconstituyeron en DMSO. La concentración de disolución normalmente varió de 2-3 gramos de sacárido (2-2,5 g de proteína) por litro de DMSO.

Etapa II: Reacción de conjugación

- 40 El sacárido activado y la proteína transportadora CRM₁₉₇ se mezclaron durante 60-75 minutos a 23 ± 2 °C a una proporción variable de 0,6 g-1,0 g de sacárido/g de CRM₁₉₇ para los serotipos 6B y 19F o de 1,2 a 1,8 g de sacárido/g de CRM₁₉₇ para los serotipo 23F.

Para la reacción de conjugación se inició añadiendo la solución de cianoborohidruro sódico (100 mg/ml) para conseguir 0,8-1,4 moles de cianoborohidruro sódico por mol de sacárido activado. A la mezcla de reacción se añadió WFI hasta una diana de 1 % (v/v) y la mezcla se incubó durante más de 40 horas a $23 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$.

- 45 La solución de borohidruro sódico, 100 mg/ml (típica 1,8-2,2 equivalentes molares de borohidruro sódico por mol de sacárido activado) y WFI (diana 5 % de v/v) se añadieron a la reacción y la mezcla se incubó durante 3-6 horas a $23 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$. Este procedimiento redujo todos los aldehídos sin reaccionar presentes en los sacáridos. Después, la mezcla de reacción se transfirió a un tanque de dilución con cloruro sódico al 0,9 % a $< 15 \text{ °C}$.

Etapa III): Ultrafiltración 100 kDa

La mezcla conjugado diluido se filtró a través de un filtro de 1,2 μm y se concentró y diafiltró en una membrana de MWCO de 100 kDa con un mínimo de 15 volúmenes de cloruro sódico al 0,9 % (para el serotipo 23F se usó tampón de fosfato sódico 0,01M/NaCl 0,05M). The permeate was discarded. The retentate was filtered through a 0.45 Pm filter. An in-process saccharide content sample was taken at this stage.

Etapa IV: Purificación en columna DEAE

Esta etapa solo se realizó para el conjugado del serotipo 23F.

La columna de DEAE se equilibró con tampón fosfato sódico 0,01M/cloruro sódico 0,05M. La sustancia retenida filtrada (23F) se cargó en la columna y se lavó con tampón fosfato sódico 0,01M/cloruro sódico 0,05M. La columna se lavó después con tampón fosfato sódico 0,01M/NaCl al 0,9 % Después, el producto se eluyó con tampón fosfato sódico 0,01M/cloruro sódico 0,05M.

Etapa V: Ultrafiltración 100 kDa

La sustancia retenida para 6B y 19F se concentró y diafiltró con al menos 30 volúmenes de cloruro sódico al 0,9 %. El permeado se descartó.

El eluato para el serotipo 23F se concentró y diafiltró con al menos 20 volúmenes de cloruro sódico al 0,9 %. El permeado se descartó.

Etapa VI: Esterilización por filtración

La sustancia retenida tras la diafiltración con MWCO de 100 kDa se filtró a través de un filtro de 0,22 μm . Se realizaron controles durante el procedimiento (contenido de sacárido, proteína libre, sacárido libre, DMSO residual y cianuro residual) sobre el producto filtrado. Se realizaron controles durante el procedimiento con la sustancia retenida filtrada para determinar si se necesitaba concentración, diafiltración y/o dilución adicional para cumplir los objetivos de FBC. Estas y otras pruebas adicionales se repitieron en las muestras de FBC.

Según era necesario, el conjugado filtrado se diluyó con cloruro sódico al 0,9 % con el fin de alcanzar una concentración final inferior a 0,55 g/l. Las pruebas con la sustancia retenida del contenido de sacárido, proteína y la proporción de sacárido:proteína se realizaron en esta etapa.

Por último, se filtró el conjugado (0,22 μm) y se cargó en recipientes de acero inoxidable de 10 l a una cantidad de 2,64 g/recipientes. En esta etapa, el rendimiento, del contenido de sacárido, contenido de proteína, pH, proporción de sacárido:proteína y el contenido de lisina se realizaron como controles durante el procedimiento. Las pruebas de liberación (aspecto, proteína libre, sacárido libre, endotoxina, determinación del tamaño molecular, cianuro residual, DMSO residual, identidad del sacárido, identidad de la CRM₁₉₇) se realizaron en esta etapa.

Ejemplo 15**Formulación de una vacuna conjugada neumocócica multivalente**

Los concentrados finales de los 13 conjugados contienen cloruro sódico al 0,85 %. Los concentrados en masa de tipo 3, 6A, 7F y 19A también contienen tampón succinato sódico 5 mM a pH 5,8. Los volúmenes requeridos de los concentrados en masa se calcularon en base al volumen del lote y las concentraciones en masa del sacárido. Tras el 80 % del cloruro sódico al 0,85 % (solución salina fisiológica) y la cantidad requerida de tampón succinado al vaso de formulación premarcado, se añadieron los concentrados en masa. Después, la preparación se esterilizó mediante filtración a través de una membrana de 0,22 μm en un segundo contenedor usando una unidad de filtro de membrana Millipore Durapore. El primer contenedor se lavó con el 20 % restante de cloruro sódico al 0,85 % y la solución se pasó por el mismo filtro y se recogió en el segundo contenedor. La masa formulada se mezcló suavemente durante y después de la adición del fosfato de aluminio en masa. El pH se comprobó y ajustó en caso necesario. El producto en masa formulado se almacenó a 2-8°C.

El producto en masa formulado se cargó en jeringuillas de vidrio de borosilicato de tipo 1 obtenidas de Becton Dickinson. La vacuna se controló a intervalos regulares para detectar turbidez y asegurar la uniformidad de la operación de carga. La vacuna cargada (producto final) se almacenó a 2-8°C.

Ejemplo 16

Inmunogeneicidad de la vacuna conjugada tridecaivalente

Hasta la fecha, los estudios preclínicos realizados con la vacuna 3vPnC se han realizado en conejos. Los estudios HT01-0021 y HT01-0036 se diseñaron para analizar de forma independiente el efecto de la conjugación química de los polisacáridos capsulares (PS) de *S. pneumoniae* con CRM₁₉₇ y el efecto del adyuvante fosfato de aluminio (AlPO₄) sobre la respuesta inmunitaria a la vacuna 13vPnC en conejos, Estos efectos se caracterizaron mediante

ELISA específico de antígeno para las concentraciones de IgG en suero y la función de los anticuerpos mediante ensayo opsonofagocítico (OPA)

Estudio HT01-0021

5 El estudio HT01-0021 investigó la capacidad de la vacuna 13vPnC con AIPO₄ para producir respuestas inmunitarias específicas de serotipo de la vacuna. Los serotipos neumocócicos representados en la vacuna 13vPnC incluyen los tipos 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F. Los objetivos secundarios incluyeron una evaluación de la cinética y la duración de la respuesta de anticuerpos. Se inmunizó a conejos New Zealand White por vía intramuscular la semana 0 y la semana 2 con la dosis clínica humana programada de cada polisacárido (2 µg para cada PS, excepto 4 µg para 6B) formulado con o sin AIPO₄ (100 µg /dosis). Los sueros se recogieron a varios puntos de tiempo. Mediante ELISA se midió la IgG específica de serotipo y se evaluó la actividad funcional mediante OPA.

15 La Tabla 3 muestra el título medio geométrico (GMT) alcanzado en muestras combinadas de suero tras dos dosis de la vacuna 13vPnC. Se usó una proporción de GMT de IgG para comparar las respuestas desde la semana 4 a la semana 0. Estos datos demuestran que la inclusión de AIPO₄ en la formulación de 13vPnC producían niveles altos de anticuerpo IgG en comparación con la misma vacuna sin adyuvante. Aunque las respuestas de anticuerpo fueron mayores cuando se incluyó AIPO₄ en la formulación, estos incrementos no fueron estadísticamente significativos.

20 Las respuestas de anticuerpos funcionales también se evaluaron en conejos tras la inmunización con las dos formulaciones de 13vPnC (Tabla 4). Al comparar las formulaciones de vacunas con o sin adyuvante se observaron mayores GMT en OPA en el grupo de tratamiento con la vacuna 13vPnC + AIPO₄. Los títulos en OPA se detectaron en grupos de suero a la semana 4 de todos los serotipos en ambos grupos. Para la mayoría de los serotipos los títulos en OPA medidos la semana 4 eran al menos 4 veces mayores que los de la semana 0 ("línea base").

25 Las respuestas cinéticas a cada uno de los serotipos de la vacuna 13vPnC se evaluaron en los grupos de suero de ambos grupos de tratamiento. Los títulos de IgG de cada serotipo se midieron de extracciones de sangre la semana 0 y las semanas 1, 2, 3, 4, 8, 12, 26, y 39, y después se compararon. Con la excepción del serotipo 1, las respuestas de anticuerpos en los animales que recibieron la vacuna con adyuvante fueron superiores a los que recibieron la vacuna sin adyuvante y fueron máximas la semana 2 del programa de inmunización (datos no mostrados).

30 EN general, los datos indican que la vacuna 13vPnC formulada con fosfato de aluminio es inmunogénica en conejo, ya que producir una respuesta de anticuerpos sustancial a los polisacáridos capsulares neumocócicos contenidos en la vacuna y estas respuestas se asocian con una actividad funcional. Las respuestas observadas a los siete serotipos centrales tras la inmunización con 13vPnC + AIPO₄ son consistentes con respuestas tradicionales de los conejos a la formulación heptavalente.

Tabla 3. Respuestas inmunitarias de IgG en conejos (GMT) tras inmunización con dos dosis de glucoconjugado neumocócico 13-valente

Serotipo	Diluyente con AIPO ₄ ^a			13vPnC ^a			13vPnC + AIPO ₄		
	0	4	Proporción semana 4:Semana0	SEMANA 0	Semana 4 (IC 95%)	Proporción semana 4:Semana0	SEMANA 0	Semana 4 (IC 95%)	Proporción semana 4:Semana0
1	<100	<100	1,0	50	5.926 (2.758-12.733)	119	50	11.091 (5.327-23.093)	222
3	<100	<100	1,0	50	6.647 (2.773-15.932)	133	58	16.443 (7.096-38.106)	284
4	<100	<100	1,0	50	13.554 (8.031-22.875)	271	50	29.183 (15.342-55.508)	584

ES 2 382 048 T3

(continuación)

Serotipo	Diluyente con AlPO ₄ ^a			13vPnC ^a			13vPnC + AlPO ₄		
	0	4	Proporción semana 4:Semana0	SEMANA 0	Semana 4 (IC 95%)	Proporción semana 4:Semana0	SEMANA 0	Semana 4 (IC 95%)	Proporción semana 4:Semana0
5	134	<100	0,4	50	5.859 (2.450-14.009)	117	50	16.714 (6.959-40.140)	334
6A	141	<100	0,4	74	22.415 (11.987-41.914)	303	83	63.734 (21.141-192.146)	768
6B	<100	<100	1,0	57	8.108 (3.564-18.444)	142	54	23.505 (11.286-48.955)	435
7F	3.859	579	0,2	171	43.591 (26.931-70.557)	444	143	84.888 (46.445-155.151)	496
9V	289	995	3,4	205	15.780 (7.193-34.616)	125	208	43.331b (23.256-71.510)	217
14	437	177	0,4	61	6.906 (3.416-13.962)	133	70	16.076 (9.649-26.785)	322
18C	<100	<100	1,0	50	21.283 (15.770-28.725)	426	50	35.040 (24.708-49.692)	701
19A	<100	<100	1,0	121	113.599 (54.518-236.707)	939	144	280.976 (119.587-660.167) 9.587-660.167)	1.951
19F	<100	<100	1,0	50	14.365 (7.346-28.090)	287	50	24.912 (9.243-67.141)	498
+23F	<100	<100	1,0	50	5.323 (1.894-14.96)	106	50	15.041 (4.711-48.018)	301

a: GMT de sueros combinados compuestos por volúmenes iguales de suero de cada conejo individual dentro de un grupo
b: Estadísticamente diferente (p= 0,022) para el grupo de tratamiento sin ALPO₄

Tabla 4. GMT de OPA de *S. pneumonia* para grupos de suero de conejos NZW tras inmunización con dos dosis de glucoconjugado neumocócico 13-valente

Serotipo	13vPnC ^a			13vPnC + AIPO ₄ ^a		
	Semana 0	Semana 4	Proporción Semana 4:Semana0	Semana 0	Semana 4	Proporción Semana 4:Semana0
1	<8	64	16	<8	64	16
3	<8	8	2	<8	16	4
4	<8	16	4	<8	32	8
5	<8	128	32	<8	512	128
6A	8	128	16	8	512	64
6B	<8	256	64	8	1.024	128
7F	8	64	8	8	128	16
9V	8	64	8	8	128	16
14	16	32	2	16	32	2
18C	8	256	32	<8	256	64
19A	<8	256	64	<8	1.024	256
19F	<8	128	32	<8	512	128
+23F	8	64	8	<8	256	64

A: Los grupos estaban compuestos por volúmenes iguales de suero de conejos individuales dentro de un grupo de tratamiento (n= 12).

Estudio HT01-0036

5 En el estudio HT01-0036 se compararon respuestas inmunitarias de los conejos (PS) contenidos en la vacuna, tras inmunización con la vacuna 13vPnC con o sin conjugación a la proteína CRM₁₉₇. Conejos New Zealand White se inmunizaron por vía intramuscular la semana 0 y la semana 2 con una dosis de 2,2 µg de cada PS (excepto 4,4 µg de 6B). Los animales recibieron una de tres preparaciones de vacunas: (a) 13vPnC (PS directamente conjugado con CRM₁₉₇), (b) 13vPnPS, (PS libre) o (c) 13vPnPS + CRM₁₉₇ (PS mezclado con CRM₁₉₇). Todas las preparaciones de vacunas contenían AIPO₄ como adyuvante a 125 µg/dosis.

Las respuestas específicas de serotipo para todas las preparaciones de vacuna se evaluaron en un ELISA de IgG y OPA mediada por complemento para medir los anticuerpos funcionales. Las respuestas inmunitarias se compararon entre los grupos de tratamiento.

15 La Tabla 5 presenta los datos de GMT obtenidos de extracciones a 4 semanas en ELISA de IgG específica de antígeno. Análisis adicionales muestran la proporción de los valores de GMT la semana 4 a la semana 0. Los datos indican que la preparación de vacuna conjugada provocaba títulos de IgG en suero mayores que la vacuna con PS libre o PS + CRM₁₉₇. Con la excepción del tipo 14 de *S. pneumoniae*, la vacuna 13vPnC pudo inducir anticuerpos funcionales frente a cepas representativas de *S. pneumoniae* en un OPA (Tabla 6). Tras dos inmunizaciones con la vacuna 13vPnPS or 13vPnPS + CRM₁₉₇, ninguna pudo inducir títulos de OPA ≥ 8 la semana 4 con respecto a la semana 0 para 10 de los 13 serotipos medidos (Tabla 6).

20 En conclusión, estos resultados indican que la conjugación de los polisacáridos de la vacuna neumocócica 13-valente produce títulos de IgG en suero más elevados y actividad de anticuerpos funcionales mayor que lo observado con el polisacárido libre solo o mezclado con CRM₁₉₇ sin conjugar.

Tabla 5. Respuestas IgG (GMT) en conejo a PnPS mediante ELISA tras inmunización con dos dosis de glucococnjugado neumocócico 13-valente

Serotipo	13vPnPS (PS libre)			13vPnPS = CRM ₁₉₇ (PS mezclado con CRM ₁₉₇)			13vPnC		
	Semana 0	Semana 4 (IC del 95%)	Proporción semana 4:Semana0	Semana 0	Semana 4 (IC 95%)	Proporción semana 4:Semana0	Semana 0	Semana 4 (IC 95%)	Proporción semana 4:Semana0
1	378	2,290(843-5,790)	5,8	395	1.959 (809-4.739)	5,0	472	35.970 (29.130-44.417)	76,2
3	57	240 (64-908)	4,2	89	163 (74-358)	1,8	50	10.414 (10.414-16.676)	208,3
4	50	379 (150-959)	7,6	50	607 (313-1.178)	12,1	50	12.890 (9.117-18.224)	257,8
5	343	226 (113-450)	4,5	50	321 (147-701)	6,4	50	35.264 (24.467-50.824)	705,3
6A	154	466 (316-688)	3,0	98	210 (95-464)	2,1	163	234.245 (167.152-328.283)	1,437,1
6B	63	727 (384-1,375)	11,6	62	745 (384-1.440)	12,0	131	33.599 (22.934-49.222)	256,5
7F	50	61 (39-95)	1,2	50	72 (47-111)	1,4	50	35.702 (24.350-52.347)	714,0
9V	50	104 (48-195)	2,1	55	169 (74-390)	3,0	50	50.033 (34.765-72.007)	11000,7
14	66	298 (117-757)	4,5	50	195 (71-535)	3,9	50	20.121 (12.087-32.138)	402,4
18C	89	1,555 (655-3,688)	17,5	66	761 (300-1.935)	11,5	101	71.451 (32.745-124.641)	707,4
19A	50	(44-179) 89	1,8	50	80 (39-163)	1,6	50	23.485 (12.857-42.723)	469,7
19F	61	1.362 (559-3,317)	22,3	61	991 (370-2.654)	16,3	67	19.358 (12.553-33.173)	288,9
+23F	73	1.085 (487-2,420)	14,	121	638 (311-1.311)	2,3	68	45.972 (25.134-84.089)	676,1

Tabla 6. Títulos en OPA para grupos de suero de conejos tras inmunización con dos dosis de vacunas neumocócicas 13-valente

Serotipo	Sin tratamiento	13vPnPS (PS libre)		13vPnPS + CRM197 (PS libre mezclado con CRM197)		13vPnPS	
	Semana 0 ^a	Semana 4	Proporción Semana4:Semana 0	Semana 4	Proporción Semana4:Semana 0	Semana 4	Proporción Semana4:Semana 0
1	4	16	4	16	4	8	32
3	4	4	1	4	1	4	8
4	4	4	1	4	1	4	64
5	4	32	8	16	4	16	64
6A	8	32	8	18	4	16	664
6B	8	64	8	32	4	32	32
7F	16	32	2	16	1	16	16
9V	16	16	1	32	2	32	8
14	16	16	1	16	1	16	2
18C	4	16	4	16	4	8	64
19A	8	8	1	8	1	16	64
19F	4	4	1	4	1	8	64
+23F	16	32	2	16	1	32	32

A: Usado como valores de la semana 0 para todos los grupos

REFERENCIAS

- 5 1. Hausdorff WP, Bryant J, Paradiso PR, Siber GR. Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. *Clin Infect Dis* 2000; 30:100-21.
2. Hausdorff WP, Bryant J, Kloek C, Paradiso PR, Siber GR. The contribution of specific pneumococcal serogroups to different disease manifestations: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. *Clin Infect Dis* 2000; 30:122-40.
- 10 3. Whitney CG, Farley MM, Hadler J, et al. Decline in invasive pneumococcal disease after the introduction of protein-polysaccharide conjugate vaccine. *New Engl J Med* 2003; 348(18):1737-46.
4. Black S, Shinefield H, Hansen J, et al. Postlicensure evaluation of the effectiveness of seven valent pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J* 2001; 20:1105-7.
- 15 5. Robinson KA, Baughman W, Rothrock G, et al. Epidemiology of invasive *Streptococcus pneumoniae* infections in the United States, 1995-1998: Opportunities for prevention in the conjugate vaccine era. *JAMA* 2001; 285:1729-35.
6. Butler J, Breiman R, Lipman H, et al. Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* infections among preschool children in the United States, 1978-1994. *J Infect Dis* 1995; 171:885-9.
7. Whitney CG, Farley MM, Hadler J, et al. Increasing prevalence of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States. *N Engl J Med* 2000; 343:1917-24.
- 20 8. Hofmann J, Cetron MS, Farley MM, et al. The prevalence of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Atlanta. *N Engl J Med* 1995; 333:481-6.
9. Joloba ML, Windau A, Bajaksouzian S, Appelbaum PC, Hausdorff WP, Jacobs MR. Pneumococcal conjugate vaccine serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates and the antimicrobial susceptibility of such isolates in children with otitis media. *Clin Infect Dis* 2001; 33:1489-94.
- 25 10. Black S, Shinefield H, Fireman B, et al. Efficacy, safety, and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. *Pediatr Infect Dis J* 2000; 19:187-95.

11. Rudolph KM, Parkinson AJ, Reasonover AL, Bulkow LR, Parks DJ, Butler JC. Serotype distribution and antimicrobial resistance patterns of invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae*: Alaska, 1991-1998. *J Infect Dis* 2000; 182:490-6.
- 5 12. Sniadack DH, Schwartz B, Lipman H, et al. Potential interventions for the prevention of childhood pneumonia: geographic and temporal differences in serotype and serogroup distribution of sterile site pneumococcal isolates from children: implications for vaccine strategies. *Pediatr Infect Dis J* 1995; 14:503-10.
13. Fagan RL, Hanna JN, Messer RD, Brookes DL, Murphy DM. The epidemiology of invasive pneumococcal disease in children in Far North Queensland. *J. Paediatr Child Health* 2001; 37:571-5.
- 10 14. Kertesz DA, Di Fabio JL, de Cunto Brandileone MC, et al. Invasive *Streptococcus pneumoniae* infection in Latin American children: results of the Pan American Health Organization Surveillance Study. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 1355-61.
- 15 15. Hausdorff W, Siber G, Paradiso P. Geographical differences in invasive pneumococcal disease rates and serotype frequency in young children. *Lancet* 2001; 357:950-52.
16. Buckingham SC, King MD, Miller ML. Incidence and etiologies of complicated parapneumonic effusions in children, 1996 to 2001. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22:499-504.
17. Byington C, Spencer L, Johnson T, et al. An epidemiological investigation of a sustained high rate of pediatric parapneumonic empyema: risk factors and microbiological associations. *Clin Infect Dis* 2002; 34:434-40.
18. Tan T, Mason E, Wald E, et al. Clinical characteristics with complicated pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Pediatrics* 2002; 110:1-6.
- 20 19. Block SL, Hedrick J, Harrison CJ, et al. Pneumococcal serotypes from acute otitis media in rural Kentucky. *Pediatr Infect Dis J* 2002; 21:859-65.
20. Hausdorff WP, Yothers G, Dagan R, et al. Multinational study of pneumococcal serotypes causing acute otitis media in children. *Pediatr Infect Dis J* 2002; 21:1008-16.
- 25 21. Robbins JB, Austrian R, Lee CJ, et al. Considerations for formulating the second-generation pneumococcal capsular polysaccharide vaccine with emphasis on the cross-reactive types within groups. *J Infect Dis* 1983; 148: 1136-59.
22. Nahm MH, Olander JV, Magyarlaki M. Identification of cross-reactive antibodies with low opsonophagocytic activity for *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 1997; 176:698-703.
- 30 23. Yu X, Gray B, Chang S, Ward JI, Edwards KM, Nahm MH. Immunity to cross-reactive serotypes induced by pneumococcal conjugate vaccines in infants. *J Infect Dis* 1999; 180:1569-76.
24. Vakevainen M, Eklund C, Eskola J, Kayhty H. Cross-reactivity of antibodies to type 6B and 6A polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae*, evoked by pneumococcal conjugate vaccines, in infants. *J Infect Dis* 2001; 184: 789-93.
- 35 25. Ekstrom N, Kilpi T, Lahdenkari M, Lehtonen H, Ahman H, Kayhty, H. Immune response to cross-reacting pneumococcal serotypes 6A/6B and 19A/19F in the FinOM vaccine trial, Third World of Congress of Pediatric Infectious Diseases, Santiago, Chile, November 19-23, 2003.
26. Penn RL, Lewin EB, Douglas RG, Jr., Schiffman G, Lee CJ, Robbins JB. Antibody responses in adult volunteers to pneumococcal polysaccharide types 19F and 19A administered singly and in combination. *Infect Immun* 1982; 36:1261-2.
- 40 27. Giebink GS, Meier JD, Quartey MK, Liebeler CL, Le CT. Immunogenicity and efficacy of *Streptococcus pneumoniae* polysaccharide-protein conjugate vaccines against homologous and heterologous serotypes in the chinchilla otitis media model. *J Infect Dis* 1996; 173:119-27.
28. Saeland E, Jakobsen H, Ingolfsdottir G, Sigurdardottir ST, Jonsdottir I. Serum samples from infants vaccinated with a pneumococcal conjugate vaccine, PncT, protect mice against invasive infection caused by *Streptococcus pneumoniae* serotypes 6A and 6B. *J Infect Dis* 2001; 183:253-60.
- 45 29. Jakobsen H, Sigurdsson VD, Sigurdardottir S, Schulz D, Jonsdottir I. Pneumococcal serotype 19F conjugate vaccine induces cross-protective immunity in serotype 19A in a murine pneumococcal pneumonia model. *Infect Immun* 2003; 71:2956-9.
30. Klugman KP, Madhi SA, Huebner RE, Kohberger R, Mbelle N, Pierce N. A trial of a 9-valent pneumococcal conjugate vaccine in children with and those without HIV infection. *N Engl J Med* 2003; 349:1341-8.
- 50 31. O'Brien KL, Moulton LH, Reid R, et al. Efficacy and safety of seven-valent conjugate pneumococcal vaccine in

American Indian children: group randomised trial. *Lancet* 2003; 362:355-61.

32. Eskola J, Kilpi T, Palmu A, et al. Efficacy of a pneumococcal conjugate vaccine against acute otitis media. *N Engl J Med* 2001; 344:403-9.

5 33. Plishvili T, Farley M, Vazquez M, Reingold A, Nyquist A, et al. Effectiveness of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. Abst G-1079, ICAAC, Chicago, IL, 2003.

34. Patente de EE.UU. nº 4.673.574.

35. Patente de EE.UU. nº 4.902.506.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición inmunogénica multivalente, que comprende: 13 conjugados proteicos polisacáridos distintos junto con un vehículo fisiológicamente aceptable, en la que cada uno de los conjugados comprende un polisacárido capsular de un serotipo diferente de *Streptococcus pneumoniae* conjugado con una proteína transportadora y los polisacáridos capsulares se preparan a partir de serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F, en el que la proteína transportadora es CRM₁₉₇.
2. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, que además comprende un adyuvante.
3. La composición inmunogénica de la reivindicación 2, en la que el adyuvante es un adyuvante basado en aluminio.
- 10 4. La composición inmunogénica de la reivindicación 3, en la que el adyuvante se selecciona del grupo que consiste en fosfato de aluminio, sulfato de aluminio e hidróxido de aluminio.
5. La composición inmunogénica de la reivindicación 4, en la que el adyuvante es fosfato de aluminio.
6. La composición inmunogénica multivalente de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso como vacuna.
- 15 7. Una formulación líquida estéril de polisacáridos capsulares neumocócicos de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, y 23F conjugados individualmente a CRM₁₉₇ para su uso como vacuna.
8. La formulación líquida estéril de la reivindicación 7, en la que cada dosis de 0,5 ml está formulada para contener: 2 µg de cada sacárido, a excepción de 6B a 4 µg; aproximadamente 29 µg de la proteína transportadora CRM₁₉₇; 0,125 mg de adyuvante de aluminio elemental (0,5 mg de fosfato de aluminio); y los tampones cloruro sódico y succinato sódico como excipientes.

Cambios en los índices por serotipo en niños de EE.UU. < 2 años de edad con respecto al valor basal (1998/1999) a 2001 (Vigilancia ABC)

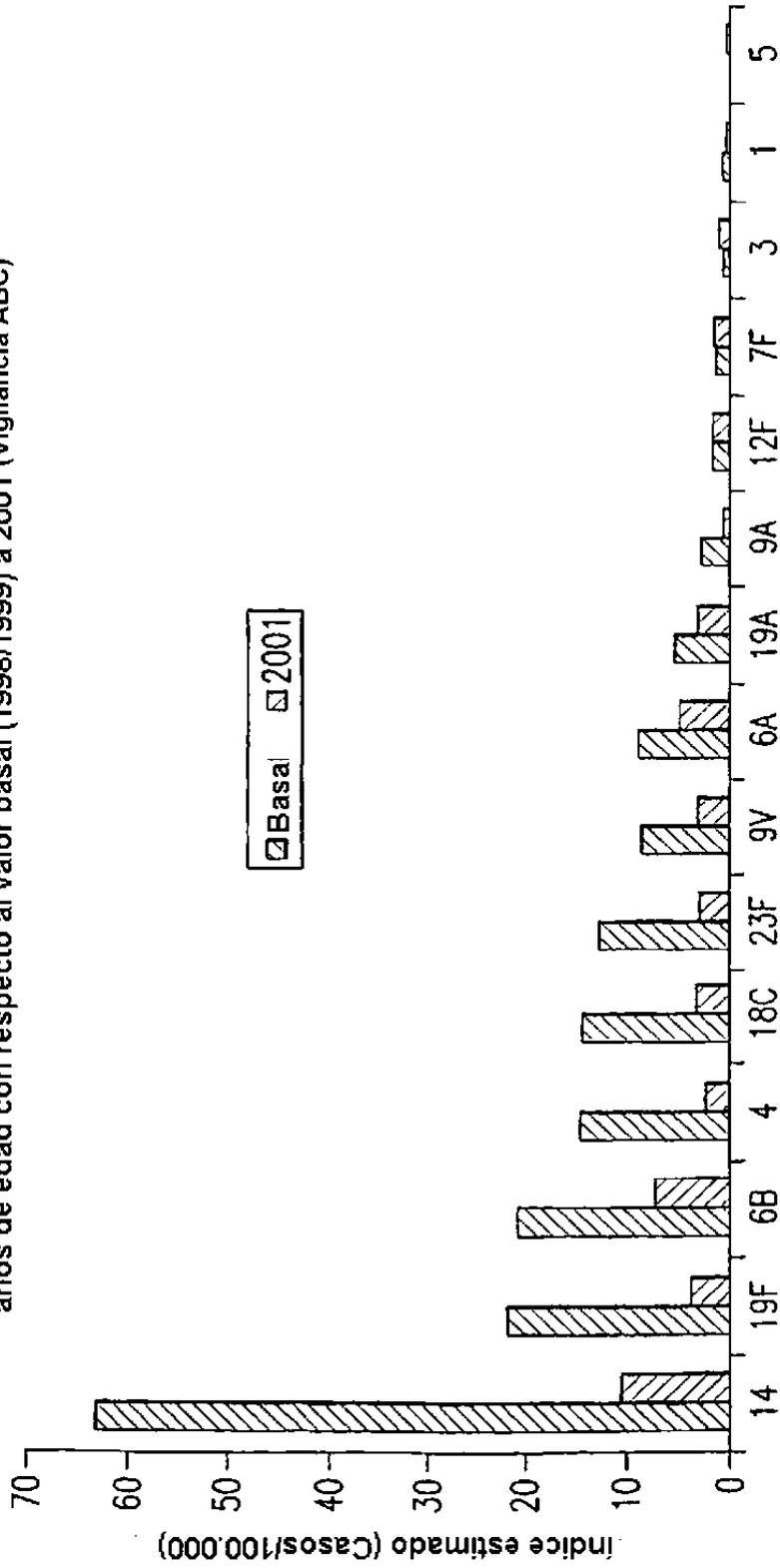


FIG 1

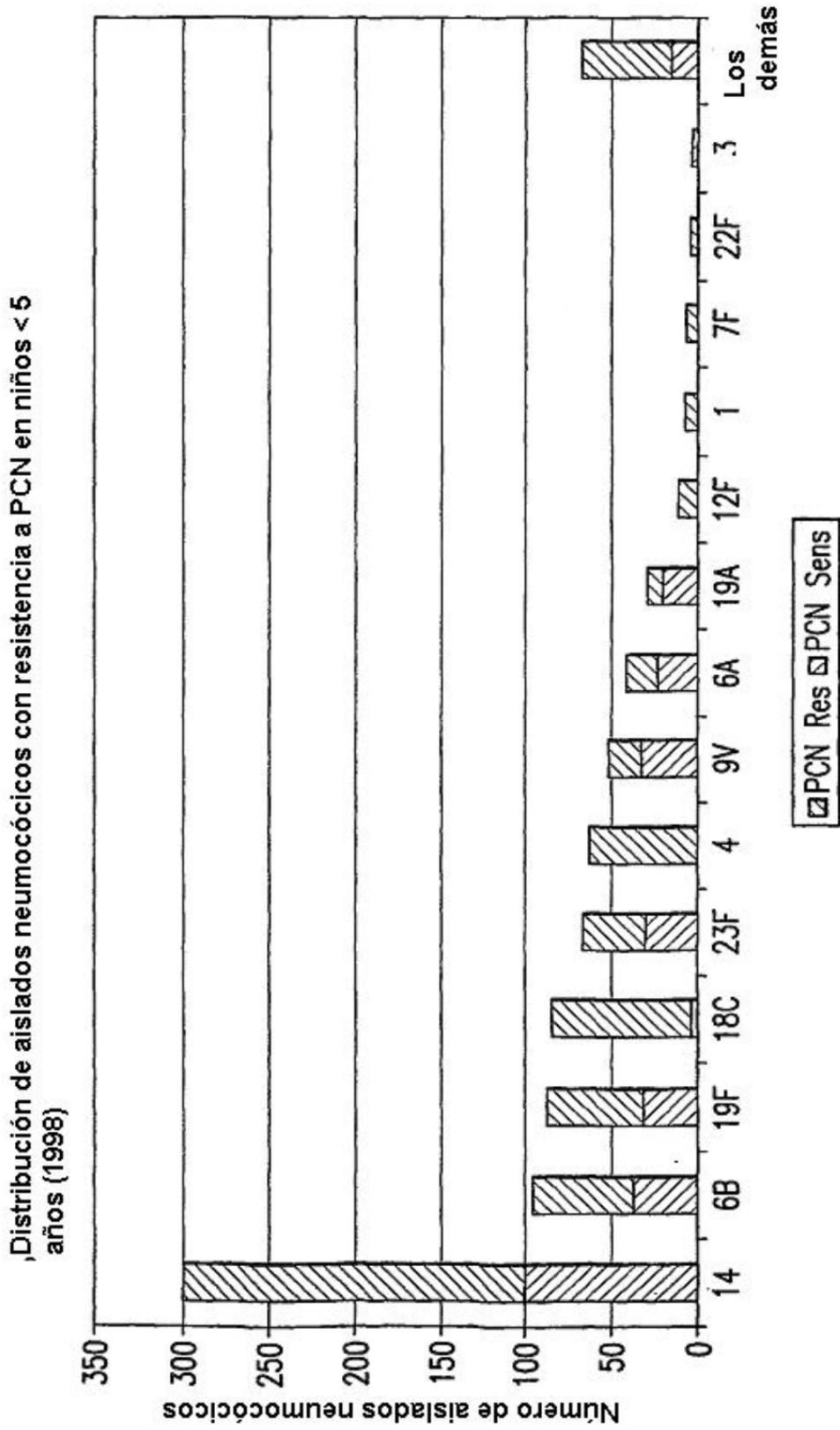


FIG.2

RCDC de los resultados de OPA tras la tercera dosis del ensayo D-118-P16 Prev(en)ar Ensayo de cohortes que reciben un lote a escala de fabricación de Prev(en)ar® (n= 98)

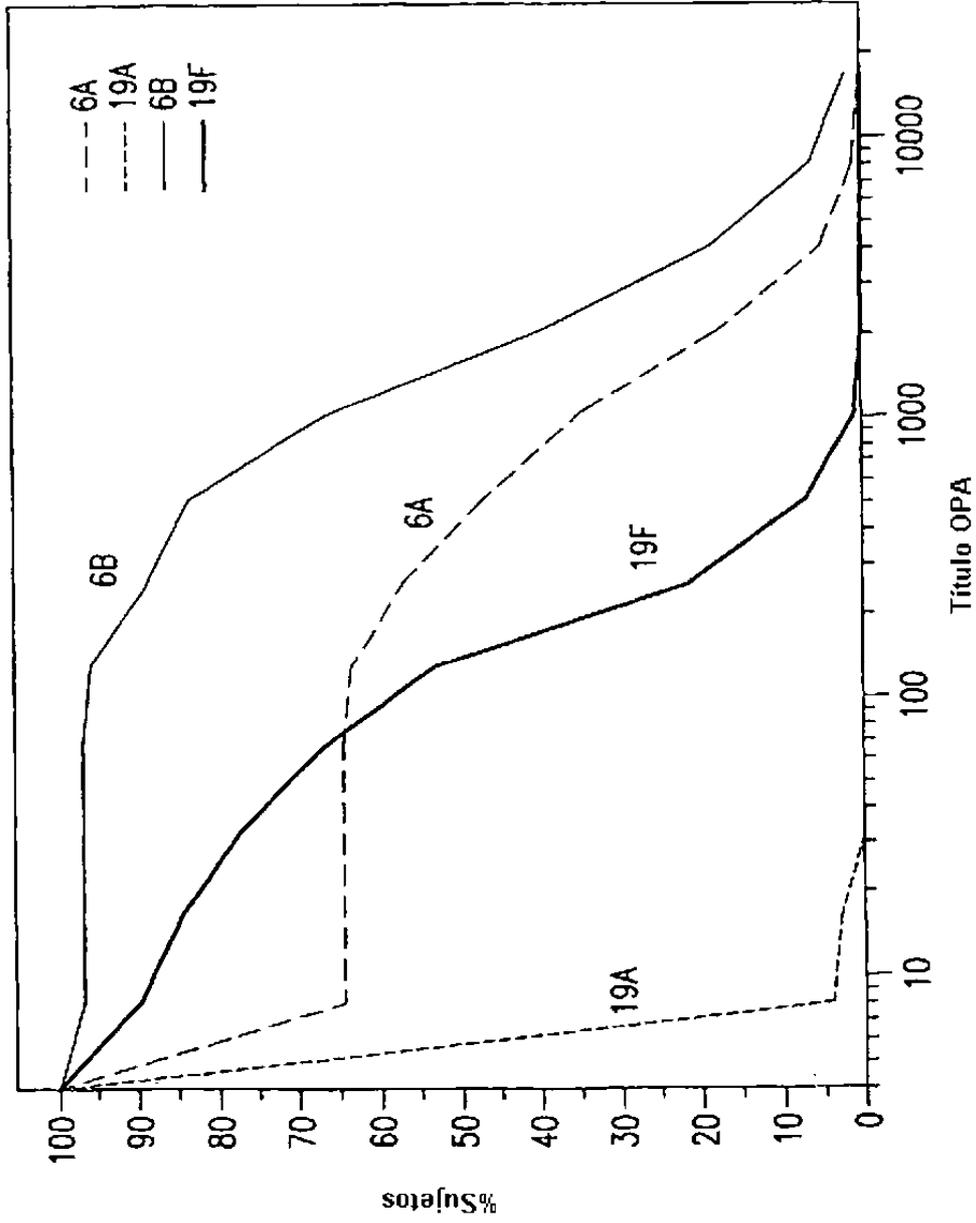


FIG.3