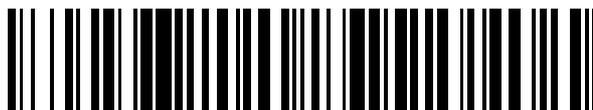


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 559 060**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

A61K 39/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.2007 E 07865465 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.11.2015 EP 2094304**

54 Título: **Composición de un conjugado multivalente de polisacárido neumocócico-proteína**

30 Prioridad:

22.12.2006 US 644207

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

10.02.2016

73 Titular/es:

**WYETH LLC (100.0%)
235 East 42nd Street
New York, NY 10017-5755, US**

72 Inventor/es:

**HAUSDORFF, WILLIAM P.;
SIBER, GEORGE RAINER;
PARADISO, PETER R. y
PRASAD, A. KRISHNA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 559 060 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 de un conjugado multivalente de polisacárido neumocócico-proteína

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere de forma general al campo de la medicina, y específicamente a la microbiología, a la inmunología, a vacunas y a la prevención de infecciones por patógenos bacterianos mediante inmunización.

Antecedentes de la invención

10 *Streptococcus pneumoniae* es la principal causa de meningitis, de neumonía y de graves enfermedades invasivas en bebés y en niños en todo el mundo. La vacuna neumocócica multivalente de polisacáridos ha estado autorizada durante muchos años y ha demostrado ser valiosa en la prevención de la enfermedad neumocócica en adultos ancianos y en pacientes de alto riesgo. Sin embargo, los bebés y los niños responden mal a la mayoría de los polisacáridos neumocócicos. La vacuna de conjugado neumocócico heptavalente (7vPnC, Pevnar®) fue la primera de su clase en demostrar que era altamente inmunógena y eficaz frente a enfermedades invasivas y la otitis media en bebés y en niños. Esta vacuna está ahora aprobada en muchos países en todo el mundo. Pevnar contiene los polisacáridos capsulares de los serotipos 4, 6 B, 9 V, 14, 18 C, 19 F y 23 F, cada uno conjugado con una proteína portadora denominada CRM₁₉₇. Pevnar cubre aproximadamente el 80 - 90 %, el 60 - 80 % y el 40 - 80 % de la enfermedad neumocócica invasiva (IPD) en los Estados Unidos, en Europa y en otras regiones del mundo, respectivamente [1, 2]. Los datos de vigilancia recogidos en los años siguientes a la introducción de Pevnar han mostrado claramente una reducción en la enfermedad neumocócica invasiva en los bebés de Estados Unidos, según se esperaba (FIG. 1) [3, 4].

20 La vigilancia de la IPD llevada a cabo en los bebés de los Estados Unidos antes de la introducción de Pevnar mostró que una porción significativa de la enfermedad debida a los serogrupos 6 y 19 era debida a los serotipos 6 A (aproximadamente un tercio) y 19 A (aproximadamente un cuarto) [5, 6]. La vigilancia de la enfermedad neumocócica invasiva llevada a cabo en los Estados Unidos después de la aprobación de Pevnar sugiere que una gran carga de la enfermedad todavía puede ser atribuida a los serotipos 6 A y 19 A (FIG. 1) [3]. Además, estos dos serotipos suponen más casos de enfermedad invasiva que los serotipos 1, 3, 5 y 7 F combinados (8,2 frente a 3,3 casos/100.000 niños de 2 años y menores). Además, los serotipos 6 A y 19 A están asociados con unas elevadas tasas de resistencia a antibióticos (FIG. 2) [7, 8, 9]. Aunque es posible que una protección cruzada de serogrupo dé como resultado una disminución en la enfermedad por el serotipo 6 A y 19 A según se vayan inmunizando más niños, existen pruebas que sugieren que habrá un límite en la disminución y permanecerá una carga significativa de enfermedad debida a estos serotipos (véase a continuación).

30 Dada la carga relativa y la importancia de la enfermedad neumocócica invasiva debida a los serotipos 1, 3, 5, 6 A, 7 F y 19 A, la adición de estos serotipos a la formulación de Pevnar aumentaría la cobertura para la enfermedad invasiva hasta > 90 % en los Estados Unidos y en Europa, y tanto como un 70 % - 80 % en Asia y en Latinoamérica. Esta vacuna expandiría significativamente la cobertura más allá de la de Pevnar y proporcionaría una cobertura para 6 A y 19 A que no sería dependiente de las limitaciones de la protección cruzada de serogrupo.

35 El documento W02006/110381 desvela composiciones conjugadas neumocócicas tridecavalentes.

Sumario de la invención

40 Consecuentemente, la presente invención proporciona de forma general una composición inmunógena multivalente que comprende 13 conjugados distintos de polisacárido-proteína, en la que cada uno de los conjugados contiene un polisacárido capsular de un serotipo diferente de *Streptococcus pneumoniae* conjugado con una proteína portadora, junto con un vehículo fisiológicamente aceptable. Opcionalmente, se incluye en la formulación un coadyuvante, tal como un coadyuvante basado en aluminio. Más específicamente, la presente invención proporciona una composición de un conjugado neumocócico tridecavalente (13vPnC) que comprende los siete serotipos de la vacuna 7vPnC (4, 6 B, 9 V, 14, 18 C, 19 F y 23 F) más seis serotipos adicionales (1,3, 5, 6 A, 7 F y 19 A).

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

50 La presente invención también proporciona una composición inmunógena multivalente, en la que los polisacáridos capsulares son de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6 A, 6 B, 7 F, 9 v, 14, 18 C, 19 A, 19 F y 23 F de *Streptococcus pneumoniae*, la proteína portadora es la CRM₁₉₇ y el coadyuvante es un coadyuvante basado en aluminio, tal como fosfato de aluminio, sulfato de aluminio e hidróxido de aluminio. En una forma de realización en particular de la invención, el coadyuvante es fosfato de aluminio.

55 La presente invención también proporciona una composición inmunógena multivalente, que comprende conjugados de polisacárido-proteína 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 portadora, y los polisacáridos capsulares se preparan a partir del serotipo 3 y al menos un serotipo adicional.

5 En una forma de realización de esta composición inmunógena multivalente, el serotipo adicional se selecciona de entre el grupo que consiste en serotipos 1, 4, 5, 6 A, 6 B, 7 F, 9 V, 14, 18 C, 19 A, 19 F y 23 F. En otra forma de realización, la proteína portadora es la CRM₁₉₇. En otra forma de realización más, la composición comprende un coadyuvante, tal como un coadyuvante basado en aluminio seleccionado de entre fosfato de aluminio, sulfato de aluminio e hidróxido de aluminio. En una forma de realización en particular, el coadyuvante es fosfato de aluminio.

10 La presente invención también proporciona una composición inmunógena multivalente, que comprende conjugados polisacárido-proteína 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 portadora y los polisacáridos capsulares se preparan a partir de los serotipos 4, 6 B, 9 V, 14, 18C, 19 F, 23 F y al menos un serotipo adicional.

15 En una forma de realización de esta composición inmunógena multivalente, el serotipo adicional se selecciona de entre el grupo que consiste en serotipos 1, 3, 5, 6 A, 7 F y 19 A. En otra forma de realización, la proteína portadora es la CRM₁₉₇. En otra forma de realización más, la composición comprende un coadyuvante, tal como un coadyuvante basado en aluminio, seleccionado de entre fosfato de aluminio, sulfato de aluminio e hidróxido de aluminio. En una forma de realización en particular, el coadyuvante es fosfato de aluminio.

20 La presente invención también proporciona un procedimiento para la inducción de una respuesta inmunitaria frente a un conjugado de polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae*, que comprende la administración a un ser humano de una cantidad inmunológicamente eficaz de cualquiera de las composiciones inmunógenas recién descritas.

25 La presente invención también proporciona que cualquiera de las composiciones inmunógenas administrada es una dosis única de 0,5 ml formulada para que contenga: 2 µg de cada sacárido, excepto para 6 B, a 4 µg; aproximadamente 29 µg de la proteína portadora CRM₁₉₇; 0,125 mg de coadyuvante de aluminio elemental (0,5 mg de fosfato de aluminio); y cloruro de sodio y tampón de succinato de sodio como excipientes.

30 También se proporcionan procedimientos para la elaboración de un conjugado inmunógeno que comprende el polisacárido del serotipo 1 (Pn 1) de *Streptococcus pneumoniae* unido covalentemente a una proteína portadora. En una forma de realización, el procedimiento comprende (i) hacer reaccionar el polisacárido Pn 1 purificado con un tampón a pH alcalino, dando como resultado un polisacárido Pn 1 parcialmente des-O-acetilado; (ii) hacer reaccionar el polisacárido Pn 1 parcialmente des-O-acetilado con un ácido débil, dando como resultado un polisacárido Pn 1 parcialmente des-O-acetilado neutralizado; (iii) hacer reaccionar el polisacárido Pn 1 parcialmente des-O-acetilado neutralizado con un agente oxidante, dando como resultado un polisacárido Pn 1 activado; (iv) combinar el polisacárido Pn 1 activado con una proteína portadora; (v) coliofilizar el polisacárido del serotipo 1 combinado activado y una proteína portadora; (vi) hacer reaccionar el polisacárido Pn 1 combinado activado y la proteína portadora con un agente reductor, dando como resultado un conjugado de polisacárido Pn 1:proteína portadora; y (vii) proteger los aldehídos sin reaccionar del conjugado de polisacárido Pn 1:proteína portadora, dando como resultado un conjugado inmunógeno que comprende el polisacárido Pn 1 de *Streptococcus pneumoniae* unido covalentemente a una proteína portadora.

40 En una forma de realización adicional, el procedimiento comprende (i) hacer reaccionar el polisacárido Pn 1 purificado con un tampón de bicarbonato / carbonato, dando como resultado un polisacárido Pn 1 parcialmente des-O-acetilado; (ii) hacer reaccionar el polisacárido Pn 1 parcialmente des-O-acetilado con ácido acético, dando como resultado un polisacárido Pn 1 parcialmente des-O-acetilado neutralizado; (iii) hacer reaccionar el polisacárido Pn 1 parcialmente des-O-acetilado neutralizado con peryodato de sodio, dando como resultado un polisacárido Pn 1 activado; (iv) purificar el polisacárido Pn 1 activado; (v) combinar el polisacárido Pn 1 activado con una proteína portadora; (vi) coliofilizar el polisacárido combinado activado Pn 1 y la proteína portadora; (vii) hacer reaccionar el polisacárido Pn 1 activado coliofilizado y la proteína portadora con cianoborhidruro de sodio, dando como resultado un conjugado de polisacárido Pn 1:proteína portadora; y (viii) proteger los aldehídos sin reaccionar del conjugado de polisacárido Pn 1:proteína portadora con borhidruro de sodio, dando como resultado un conjugado inmunógeno que comprende el polisacárido Pn 1 de *Streptococcus pneumoniae* unido covalentemente a una proteína portadora.

50 También se desvela un procedimiento para la elaboración de un polisacárido Pn 1 activado de *Streptococcus pneumoniae*. El procedimiento comprende (i) hacer reaccionar el polisacárido Pn 1 purificado con un tampón a pH alcalino, dando como resultado un polisacárido Pn 1 parcialmente des-O-acetilado; (ii) hacer reaccionar el polisacárido Pn 1 parcialmente des-O-acetilado con un ácido débil, dando como resultado un polisacárido Pn 1 parcialmente des-O-acetilado neutralizado; y (iii) hacer reaccionar el polisacárido Pn 1 parcialmente des-O-acetilado neutralizado con un agente oxidante, dando como resultado un polisacárido Pn 1 activado.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 representa los cambios en las tasas de IRD por el serotipo en niños de los Estados Unidos < 2 años de edad desde el momento inicial (1998 / 1999) hasta 2001.

La FIG. 2 representa la distribución de las cepas clínicas neumocócicas con resistencia a la penicilina (PCN) en niños < 5 años de edad (1998).

La FIG. 3 representa los resultados de las curvas de distribución acumulada inversa (RCDC) del OPA del ensayo D118-P16 de Prevnar.

5 **Descripción detallada de la invención**

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

Los datos de la vigilancia de IPD entre 1995 - 1998 estimaron que los siete serotipos de Prevnar 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 Prevnar suponían el 90 % de todos los casos de IPD en bebés y en niños [10]. Desde la introducción de la vacuna Prevnar en 2000, se ha producido una disminución significativa en las tasas globales de IPD debido a una disminución en la enfermedad debida a los serotipos de la vacuna [3, 4]. Por lo tanto, no existe ninguna justificación en este momento para eliminar cualquiera de los serotipos de Prevnar de la siguiente generación de vacunas neumocócicas conjugadas, sino más bien para añadir serotipos para obtener una cobertura más amplia.

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

En los Estados Unidos, la tasa de IPD causada por el serotipo 1 en niños menores de 5 años es < 2 %, aproximadamente la misma que para cada uno de los tipos 3 y 7 F [1, 6]. Los serotipos 1 y 5 suponen las mayores tasas de IPD en las poblaciones de los Estados Unidos en alto riesgo de enfermedad neumocócica invasiva. Específicamente, el serotipo 1 causa el 3,5 % de las IPD en niños nativos de Alaska < 2 años de edad y el 18 % en niños de 2 - 4 años de edad [11]. Tanto el serotipo 1 como el serotipo 5 provocan significativamente una enfermedad en otras partes del mundo y en poblaciones indígenas en países desarrollados [12, 13, 14].

El serotipo 1 también puede estar asociado con una enfermedad más grave en comparación con otros serotipos neumocócicos [15]. Esta observación se basa en la diferencia en las tasas de identificación de casos entre los Estados Unidos y Europa y la diferencia asociada en la práctica médica. Globalmente, la incidencia de la IPD es menor en Europa que en los Estados Unidos. Sin embargo, el porcentaje de IPD causada por el serotipo 1 en Europa es desproporcionadamente mayor que en los Estados Unidos (del 6 - 7 %, frente al 1 - 2 %, respectivamente). En Europa, los cultivos de sangre se obtienen predominantemente a partir de niños hospitalizados. En los Estados Unidos es una práctica médica rutinaria la obtención de cultivo de sangre fuera del hospital para los niños que presentan una fiebre > 39 °C y un elevado recuento de glóbulos blancos sanguíneos. Dada la diferencia en la práctica médica, se postula que el menor porcentaje enfermedad causada por el serotipo 1 en los Estados Unidos puede estar diluido por las mayores tasas de otro serotipos que causan una enfermedad más leve, mientras que el mayor porcentaje de Europa refleja una enfermedad más grave. Además, los estudios seroepidemiológicos en niños con una 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 en la enfermedad neumocócica invasiva.

La adición de los serotipos 3 y 7 F aumentará la cobertura frente a la IPD en la mayoría de las áreas del mundo en aproximadamente un 3 % - 7 %, y en Asia en aproximadamente un 9 %. Por lo tanto, una vacuna undecavalente cubriría el 50 % en Asia y aproximadamente el 80 % de la IPD en todas las regiones [1, 2]. Estos serotipos también son importantes con respecto a la cobertura frente a la otitis media [19]. En un estudio multinacional de los serotipos neumocócicos causantes de otitis media, Hausdorff y col. encontraron que el serotipo 3 era la 8ª cepa clínica más común en el líquido del oído medio [20]. El serotipo 3 suponía hasta el 8,7 % de los serotipos neumocócicos asociados con la otitis media. Por lo tanto, la importancia de los tipos 3 y 7 F en la otitis media, así como en la IPD, garantiza su inclusión en una vacuna neumocócica conjugada.

Sin embargo, los intentos de producir una vacuna neumocócica conjugada multivalente que muestre una inmunogenicidad significativa con respecto a los polisacáridos del serotipo 3 han sido infructuosos. Por ejemplo, en un estudio de la inmunogenicidad y la seguridad de una vacuna neumocócica undecavalente de conjugado de proteína D (11-Pn-PD), no se observó ningún efecto de sensibilización para el serotipo 3 en bebés que habían recibido tres dosis de la vacuna seguidas de una dosis de refuerzo de cualquiera de las mismas vacunas o de una vacuna neumocócica de polisacárido (Nurkka y col. (2004) Ped. Inf. Dis. J., 23: 1008 - 1014). En otro estudio, el ensayo opsonofagocítico (OPA) resultante de bebés que habían recibido dosis de 11-Pn-PD no consiguió demostrar respuestas de anticuerpos para el serotipo 3 a unos niveles comparables a las de los otros serotipos ensayados (Gatchalian y col., 17th Annual Meeting of the Eur. Soc. Paed. Inf. Dis. (ESPID), Cartel N° 4, P1A Presentación de carteles 1, Estambul, Turquía, 27 de marzo de 2001). En otro estudio más, que evaluaba la eficacia de una 11-Pn-PD en la prevención de la otitis media alguna, la vacuna no proporcionó protección frente a los episodios causados por el serotipo 3 (Prymula y col. (2006) Lancet, 367: 740 - 748). Consecuentemente, una vacuna neumocócica conjugada que comprende polisacáridos capsulares del serotipo 3 y capaz de desencadenar una respuesta inmunitaria frente a los polisacáridos del serotipo 3 proporciona una mejora significativa con respecto al estado de la técnica existente.

Inclusión de los serotipos 6 A y 19 A**a. Epidemiología de los serotipos 6 A y 19 A**

Los datos de vigilancia de la bibliografía sugieren que los serotipos 6 A y 19 A suponen más enfermedad neumocócica invasiva en niños de los Estados Unidos < 2 años de edad que los serotipos 1, 3, 5 y 7 F combinados (FIG. 1) [1, 5]. Además, estos serotipos están habitualmente asociados a una resistencia a antibióticos (FIG. 2) y juegan un importante papel en la otitis media [6, 19, 20]. La capacidad de la actual vacuna Prevnar para proteger frente a la enfermedad debida a 6 A y 19 A no está clara. El fundamento para la inclusión de los componentes 6 A y 19 A en una vacuna 13vPnC se analiza a continuación.

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

La vacuna de polisacáridos neumocócicos no conjugada autorizada (para su uso en personas de al menos dos años de edad) ha contenido el polisacárido capsular 6 A o el 6 B, pero no ambos [21]. Los datos de inmunogenicidad generados en el momento de la formulación de la vacuna de polisacárido neumocócico 23-valente demostraron que una vacuna monovalente 6 B inducía anticuerpos frente a ambas cápsulas 6 A y 6 B. Los datos de diferentes ensayos que evalúan las respuestas de la IgG y del ensayo opsonofagocítico (OPA) en diversas poblaciones con el polisacárido libre y con vacunas neumocócicas conjugadas sugieren que las respuestas de la IgG frente a 6 A son inducidas por los antígenos 6 B, pero las respuestas son generalmente menores, y la actividad del OPA con los organismos 6 A es diferente con respecto los organismos 6 B [22, 23, 24, 25]. Además, los sujetos que responden con un elevado anticuerpo 6 B pueden tener poca o ninguna actividad frente a 6 A.

En contraste con la composición química de los polisacáridos capsulares 6 A y 6 B en la que existe un alto grado de similitud, las cápsulas 19 A y 19 F son bastante diferentes debido a la presencia de dos cadenas laterales adicionales en el polisacárido 19 A. Para nada sorprendentemente, las respuestas inmunitarias medidas en voluntarios humanos inmunizados con la vacuna de polisacárido 19 F mostraron que se inducían respuestas al 19 F en el 80 % de los sujetos, pero únicamente el 20 % de los sujetos tenían una respuesta frente al 19 A [26]. Asimismo, también se han documentado unos bajos niveles respuestas de reactividad cruzada de IgG y OPA frente al serotipo 19 A después de la inmunización con el polisacárido 19 F en ensayos con vacunas conjugadas [24, 26].

Se han generado datos internos sobre las respuestas de reactividad cruzada de OPA frente a 6A y 19A partir del ensayo de extrapolación 7vPnC (D118-P16) llevado a cabo en bebés de los Estados Unidos (FIG. 3). Estos estudios son coherentes con los hallazgos de otros, y demuestran la inducción de un anticuerpo de reactividad cruzada funcional frente al polisacárido 6 A después de la inmunización con el polisacárido 6 B, aunque a un nivel menor y con muy poco anticuerpo funcional contra 19 A después de la inmunización con 19 F.

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

Se han usado modelos animales para la evaluación del potencial de la protección cruzada mediante la inmunización con polisacáridos. En un modelo de otitis media desarrollado por Giebink y col., se inmunizaron chinchillas con una vacuna conjugada tetravalente de polisacárido y proteína de la membrana externa (OMP) (que contiene los sacáridos 6 B, 14, 19 F, 23 F) o con placebo [27]. En este ensayo parecía haber una cierta protección cruzada para 6 A; sin embargo, ésta no alcanzó una significación estadística, y el nivel de protección era menor que con 6 B frente a la otitis media. En este mismo modelo había una protección del 100 % frente a la otitis media por 19 F, pero únicamente una protección del 17 % frente a la otitis media por 19 A.

Saeland y col. usaron sueros de bebés inmunizados con una vacuna neumocócica conjugada octavalente del tétanos (que contiene 6 B y 19 F) para inmunizar pasivamente ratones antes de una exposición intranasal a organismos 6 A, en un modelo de infección pulmonar [28]. De las 59 muestras de suero, el 53 % protegió a los ratones frente a una bacteremia por 6 B y el 37 % los protegió frente a 6 A. A los ratones inmunizados pasivamente con los sueros de los bebés inmunizados con cuatro dosis de una vacuna conjugada neumocócica undecavalente (que contiene 19 F conjugado con el toxoide del tétanos) se les administró una exposición intranasal con organismos 19 A en el mismo modelo [29]. De los 100 ratones inmunizados pasivamente, y posteriormente expuestos, 60 ratones no tenían organismos 19 A detectados en el tejido pulmonar, mientras que se identificaron los organismos en todos los ratones a los que se les administró un placebo de solución salina. Sin embargo, la inmunización pasiva no protegió frente a una exposición a la exposición a los organismos 19 F en este modelo; por lo tanto, la relevancia del modelo para el serogrupo 19 es cuestionable. En general, estos modelos proporcionan pruebas de un cierto impacto biológico de la inmunización con 6 B sobre los organismos 6 A, aunque el efecto en el serotipo heterólogo no era tan grande como el observado con el serotipo homólogo. El impacto de la inmunización con 19 F sobre los organismos 19 A no se comprende bien a partir de estos modelos.

Impacto de la inmunización con el conjugado de polisacáridos 6 B y 19 F sobre la enfermedad por 6 A y 19 A en ensayos de eficacia

El número de casos de enfermedad debida a los serotipos 6 B, 6 A, 19 F y 19 A en los ensayos de eficacia de la 7vPnC y de la 9vPnC (la 7vPnC más los serotipos 1 y 5) están recogidos en la Tabla 1 [30, 10, 31]. Las cifras de los casos de enfermedad invasiva son demasiado pequeñas como para permitir la extracción de cualquier conclusión

para los serotipos 6 A y 19 A. Sin embargo, el ensayo finlandés de otitis media generó un gran número de cepas clínicas neumocócicas [32]. En los análisis por protocolo, 7vPnC era eficaz en un 84 % (IC al 95 % del 62 %, del 93 %) frente a la otitis media debida al serotipo 6 B y eficaz en un 57 % (IC al 95 % del 24 %, del 76 %) frente a la otitis media debida al serotipo 6 A (Tabla 1). Por el contrario, no se demostró una eficacia específica del serotipo con la 7vPnC para la otitis media por 19 F ni por 19 A.

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

	6 B		6 A		19 F		19 A	
	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 surafricano - 9vPnC VIH (-) (ITT)	1	2	1	0	0	1	3	1
Ensayo de eficacia surafricano - 9vPnC VIH (+) (ITT)	1	7	3	10	2	3	2	3
Ensayo de eficacia finlandés de otitis media - 7vPnC (PP)	9 *	56	19 *	45	43	58	17	26

" Demostró una eficacia demostrada estadísticamente significativa
A partir de las referencias 30, 10 y 33 y comunicaciones personales
Contr = control
ITT = análisis por intención de tratar
PP = análisis por protocolo

También están disponibles los datos sobre la vigilancia de la IPD posterior a la comercialización, a partir de un ensayo de casos y controles llevado a cabo por los Centers for Disease Control para la evaluación de la eficacia de Prevnar [33]. Se identificaron los casos de enfermedad neumocócica invasiva producidos en niños de entre 3 y 23 meses de edad en los laboratorios de vigilancia, y se emparejaron con tres casos de control por edades y por código postal. Después de obtener el consentimiento, se obtuvo el historial médico y de inmunización (los sujetos se consideraban inmunizados si habían recibido al menos una dosis de Prevnar) de los padres y de los proveedores de asistencia médica para los casos y los controles. Los resultados preliminares fueron presentados en la reunión de 2003 de la ICAAC y en la Tabla 2 se presenta un resumen de los hallazgos para la enfermedad por 6 B, 19 F, 19 A y 6 A. Estos datos indican que Prevnar es capaz de prevenir la enfermedad debida a 6 A, aunque a un nivel que puede ser un poco menor que la enfermedad por el serotipo 6 B. Estos datos también indican que la protección cruzada para la enfermedad invasiva debida a 19 A es limitada.

Tabla 2. Resultados preliminares de un ensayo de casos y controles llevado a cabo por el CDC (presentado en la ICAAC, 2003)

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

* Eficacia de la vacuna que compara los vacunados (> 1 dosis) frente a los no vacunados y ajustada según las condiciones subyacentes
Referencia 40 y comunicación personal / confidencial

Un análisis publicado [3] del uso de Prevnar también indicó que los serotipos 6 B y 19 F confieren una reducción moderada en la IPD causada por los serotipos 6 A y 19 A entre niños menores de dos años de edad (Tabla 1 en [3]). Las tasas de enfermedad entre los adultos no inmunizados causada por los serotipos 6 A, 9 A, 9 L, 9 N, 18 A, 18 B, 18 F, 19 A, 19 B, 19 C, 23 A y 23 B ("todos los serotipos relacionados con la vacuna") se redujeron en cierta medida (Tabla 2 en [3]). Estos datos establecen que la inmunidad colectiva a partir del uso de Prevnar en niños menores de dos años de edad era modesta para los serotipos 6 A y 19 A, y proporciona una base para la inclusión de los serotipos 6 A y 19 A en la vacuna 13vPnC de esta invención.

Conclusión para la adición de 6 A y de 19 A

Los datos de la vigilancia posterior a la comercialización y los resultados del estudio de casos y controles indicados en la FIG. 1 y en la Tabla 2 con la vacuna 7vPnC sugieren que, coherentemente con el resto de la información sobre las respuestas y el comportamiento inmunitario en los modelos animales descritos anteriormente, puede haber una cierta protección cruzada frente a la enfermedad por 6 A, pero en menor grado que frente a la enfermedad por 6 B.

Adicionalmente, parece que la protección frente a 19 A es limitada. Por lo tanto, una vacuna 13vPnC que contiene los serotipos 6 A y 19 A proporciona una cobertura que no depende de las limitaciones de la protección cruzada de serogrupo por parte de los serotipos 6 B y 19 F.

5 Consecuentemente, la presente invención proporciona una composición inmunógena multivalente que comprende 13 conjugados distintos de polisacárido-proteína, en la que cada uno de los conjugados contiene un polisacárido capsular diferente conjugado con una proteína portadora y en la que los polisacáridos capsulares se preparan a partir de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6 A, 6 B, 7 F, 9 V, 14, 18 C, 19 A, 19 F y 23 F de *Streptococcus pneumoniae*, junto con un vehículo fisiológicamente aceptable. Una de dichas proteínas portadoras es el toxoide diftérico denominado CRM₁₉₇. La composición inmunógena puede comprender adicionalmente un coadyuvante, tal como un coadyuvante basado en aluminio, tal como fosfato de aluminio, sulfato de aluminio e hidróxido de aluminio.

10 Los polisacáridos capsulares se preparan mediante las técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia. En la presente invención, los polisacáridos capsulares se preparan a partir de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6 A, 6 B, 7 F, 9 V, 14, 18 C, 19 A, 19 F y 23 F de *Streptococcus pneumoniae*. Estos conjugados neumocócicos se preparan mediante procesos individuales y se formulan en una única formulación de dosificación. Por ejemplo, en una forma de realización, se hace crecer cada serotipo de polisacárido neumocócico en un medio basado en soja. Los polisacáridos individuales se purifican después a través de una centrifugación, una precipitación, una ultrafiltración y una cromatografía en columna. Los polisacáridos purificados son activados químicamente para hacer que los sacáridos sean capaces de reaccionar con la proteína portadora.

15 Una vez activado, cada polisacárido capsular es conjugado por separado con una proteína portadora para formar un glucoconjugado. En una forma de realización, cada polisacárido capsular es conjugado con la misma proteína portadora. En esta forma de realización, la conjugación se lleva a cabo mediante una aminación reductora.

La activación química de los polisacáridos y la posterior conjugación con la proteína portadora se consiguen mediante los medios convencionales. Véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos nº 4.673.574 y 4.902.506 [34, 35].

20 Las proteínas portadoras son preferiblemente proteínas que no son tóxicas ni reactógenas, y que pueden obtenerse en una cantidad y con una pureza suficientes. Las proteínas portadoras deberían ser susceptibles a los procedimientos de conjugación estándar. En una forma de realización en particular de la presente invención, se usa la CRM₁₉₇ como la proteína portadora.

25 La CRM₁₉₇ (Wyeth, Sanford, NC) es una variante no tóxica (es decir, un toxoide) de la toxina diftérica aislada a partir de cultivos de la cepa G7 de *Corynebacterium diphtheria* (β197) cultivada en un medio basado en casaminoácidos y extracto de levadura. La CRM₁₉₇ se purifica a través de una ultrafiltración, una precipitación con sulfato de amonio y una cromatografía de intercambio iónico. Alternativamente, la CRM₁₉₇ se prepara recombinantemente de acuerdo con la Patente de los Estados Unidos nº 5.614.382, que se incorpora al presente documento como referencia. También son adecuados otros toxoides diftéricos para su uso como proteínas portadoras.

30 Otras proteínas portadoras adecuadas incluyen toxinas bacterianas inactivadas, tales como el toxoide del tétanos, el toxoide de la tosferina, el toxoide del cólera (por ejemplo, según se describe en la Solicitud de Patente Internacional WO2004/08S251 [S8]), la LT de *E. coli*, la ST de *E. coli* y la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*. También pueden usarse proteínas de la membrana externa bacteriana, tales como el complejo c de la membrana externa (OMRC), las porinas, las proteínas de unión a la transferrina, la neumolisina, la proteína superficial neumocócica A (RspA), la proteína adhesina neumocócica (RsaA), la peptidasa G5a de estreptococos del Grupo A o del Grupo B, o la proteína D de *Haemophilus influenzae*. También pueden usarse como proteínas portadoras otras proteínas, tales como ovoalbúmina, hemocianina de lapa californiana (KLM), albúmina sérica bovina (BSA) o un derivado de la proteína purificada de la tuberculina (RRD).

35 Después de la conjugación del polisacárido capsular con la proteína portadora, los conjugados de polisacárido-proteína son purificados (enriquecidos con respecto a la cantidad de conjugado de polisacárido-proteína) mediante diversas técnicas. Estas técnicas incluyen operaciones de concentración / diafiltración, de precipitación / elución, de cromatografía en columna y de filtración profunda. Véanse los ejemplos, a continuación.

40 Después de la purificación de los glucoconjugados individuales, se combinan para formular la composición inmunógena de la presente invención, que puede usarse como una vacuna. La formulación de la composición inmunógena de la presente invención puede llevarse a cabo mediante el uso de procedimientos reconocidos en la técnica. Por ejemplo, los 13 conjugados neumocócicos individuales pueden formularse con un vehículo fisiológicamente aceptable para la preparación de la composición. Algunos ejemplos de dichos vehículos incluyen, pero no se limitan a, agua, solución salina tamponada, polioles (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido) y soluciones de dextrosa.

45 En ciertas formas de realización, la composición inmunógena comprenderá uno o más coadyuvantes. Según se define en el presente documento, un "coadyuvante" es una sustancia que sirve para mejorar la inmunogenicidad de una composición inmunógena de esta invención. Por lo tanto, a menudo se proporcionan coadyuvantes para potenciar la respuesta inmunitaria, y son bien conocidos por el artesano experto. Algunos coadyuvantes adecuados

para mejorar la eficacia de la composición incluyen, pero no se limitan a:

- (1) sales de aluminio (alum), tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio, etc.;
- (2) formulaciones en emulsión de aceite en agua (con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos, tales como péptidos de muramilo (definidos a continuación) o componentes de la pared celular bacteriana), tales como, por ejemplo.

(a) MF59 (Publ. PCT N° WO 90/14837), que contiene un 5 % de escualeno, un 0,5 % de Tween SG y un 0,5 % de Span 85 (que opcionalmente contiene diversas cantidades de MTP-PE (véase a continuación, aunque no es necesario)) formulado en partículas submicrométricas mediante el uso de un microfluidificador tal como el microfluidificador Modelo 110Y (Microfluidics, Newton, MA).

(b) SAF, que contiene un 10 % de escualeno, un 0,4 % de Tween 80, un 5 % de polímero plurónico en bloque L121 y thr-MDP (véase a continuación) tanto microfluidificado en una emulsión submicrométrica como agitado vorticialmente para la generación de una emulsión con un tamaño de partícula mayor, y

(c) sistema coadyuvante Ribi™ (RAS), (Corixa, Hamilton, MT) que contiene un 2 % de escualeno, un 0,2 % de Tween 80 y uno o más componentes de la pared celular bacteriana de entre el grupo que consiste en monofosforil lípido A 3-O-desalado (MPL™) descrito en la Patente de los Estados Unidos n° 4.912.094 (Corixa), dimicolato de trehalosa (TDM) y esqueleto de la pared celular (CWS), preferiblemente MPL + CWS (Detox™);

(3) pueden usarse coadyuvantes de saponina, tales como Quil A o STIMULON™ OS-21 (Antigenics, Framingham, MA) (Patente de los Estados Unidos n° 5.057.540) o las partículas generadas a partir de los mismos, tales como los ISCOMs (complejos inmunoestimulantes);

(4) lipopolisacáridos bacterianos, análogos sintéticos del lípido A tales como compuestos de fosfato de aminoalquil glucosamina (AGP), o derivados o análogos de los mismos, que están disponibles en Corixa y que se describen en la Patente de los Estados Unidos n° 6.113.918; uno de dichos AGP es 2-desoxi-4-O-fosfono-3-O-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoilamino]-b-D-glucopiranosido de 2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoilamino] etilo, que también se conoce como 529 (anteriormente conocido como RC529), que se formula en una forma acuosa o en forma de una emulsión estable, polinucleótidos sintéticos tales como oligonucleótidos que contienen motivo(s) CpG (Patente de los Estados Unidos n° 6.207.646);

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

(6) mutantes destoxificados de una toxina bacteriana de ribosilación del ADP tal como una toxina del cólera (CT) tanto en una forma natural como mutante, por ejemplo, en la que el ácido glutámico en la posición del aminoácido 29 está sustituido por otro aminoácido, preferiblemente una histidina, de acuerdo con la solicitud de patente internacional publicada número WO 00/18434 (véase también el documento WO 02/098368 y el documento WO 02/098369), una toxina tosferínica (PT) o una toxina termolábil de *E. coli* (LT), particularmente la LT-K63, la LT-R72, la CT-S109, la PT-K9/G129 (véase, por ejemplo, el documento WO 93/13302 y el documento WO 92/19265); y

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

Algunos péptidos de muramilo incluyen, pero no se limitan a, N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanina-2-(1'-2' dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), etc.

Las formulaciones de vacuna de la presente invención pueden usarse para la protección o el tratamiento de un ser humano susceptible a una infección neumocócica, mediante la administración de la vacuna a través de una vía sistémica o mucosal. Estas administraciones pueden incluir la inyección a través de la vía intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea; o a través de una administración mucosal en el tracto oral / alimentario, respiratorio o genitourinario. En una forma de realización, se usa la administración intranasal para el tratamiento de la neumonía o de la otitis media (ya que puede prevenirse más eficazmente la introducción nasofaríngea de neumococos, atenuando por lo tanto la infección en su etapa más temprana).

La cantidad de conjugado en cada dosis de la vacuna se selecciona como una cantidad que induzca una respuesta inmunoprotectora sin unos efectos adversos significativos. Dicha cantidad puede variar dependiendo del serotipo neumocócico. Generalmente, cada dosis comprenderá entre 0,1 y 100 µg de polisacárido, particularmente entre 0,1 y 10 µg, y más particularmente entre 1 y 5 µg.

Las cantidades óptimas de los componentes de una vacuna en particular pueden ser averiguadas mediante los estudios habituales, que implican la observación de las respuestas inmunitarias apropiadas en los sujetos. Después de una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo separadas adecuadamente.

En una forma de realización en particular de la presente invención, la vacuna 13vPnC es una formulación líquida estéril de los polisacáridos neumocócicos capsulares de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6 A, 6 B, 7 F, 9 V, 14, 18 C, 19 A, 19 F y 23 F conjugados individualmente con la CRM₁₉₇. Cada dosis de 0,5 ml está formulada para que contenga: 2 µg

de cada sacárido, excepto para 6 B a 4 µg; aproximadamente 29 µg de la proteína portadora CRM₁₉₇; 0,125 mg de coadyuvante de aluminio elemental (0,5 mg de fosfato de aluminio); y cloruro de sodio y tampón de succinato de sodio tampón como excipientes. El líquido se introduce en jeringas de dosis individuales sin ningún conservante. Después de agitar, la vacuna es una suspensión homogénea de color blanco lista para su administración intramuscular.

5 La elección del nivel de dosis para la vacuna 13vPnC es similar al de la vacuna comercializada 7vPnC (Prevnar). Se seleccionó el nivel de dosis de sacárido de 2 µg para todos los serotipos, excepto para 6 B, que es de 4 µg por dosis. La vacuna 7vPnC ha mostrado una deseable seguridad, inmunogenicidad y eficacia frente a la IPD en el nivel de dosis de sacárido de 2 µg para los serotipos 4, 9 V, 14, 18 C, 19 F y 23 F y a la dosis de 4 µg para 6 B.

10 El programa de inmunización puede seguir el diseñado para la vacuna 7vPnC. Por ejemplo, el programa rutinario para bebés y niños pequeños frente a la enfermedad invasiva causada por *S. pneumoniae* debida a los serotipos incluidos en la vacuna 13vPnC es de 2, 4, 6 y 12 - 15 meses de edad. Las composiciones de esta invención también son adecuadas para su uso en niños más mayores, en adolescentes y en adultos.

15 Las composiciones de esta invención pueden incluir adicionalmente uno o más antígenos adicionales para su uso frente a la otitis media causada por una infección por otras bacterias. Dichas bacterias incluyen *Haemophilus influenzae* no tipificable, *Moraxella catarrhalis* (anteriormente conocida como *Branhamella catarrhalis*) y *Alloicoccus otitidis*.

20 Algunos ejemplos de antígenos no tipificables de *Haemophilus influenzae* adecuados para su inclusión incluyen la proteína R4, también conocida como proteína "e" (Patente de los Estados Unidos nº 5.601.831; Solicitud de Patente Internacional WO03/078453), la proteína R6, también conocida como RAL o proteína RBOMR-1 (Patente de los Estados Unidos nº 5.110.908; Solicitud de Patente Internacional W00100790), la proteína R5 (Patente Reemitida de los Estados Unidos nº 37.741), la proteína de adhesión y de penetración de *Haemophilus* (Patentes de los Estados Unidos nº 6.245.337 y 6.676.948), la proteína adhesina de punta LKR (Patente de los Estados Unidos nº 5.643.725) y la proteína NucA (Patente de los Estados Unidos nº 6.221.365).

25 Algunos ejemplos de antígenos de *Moraxella catarrhalis* adecuados para su inclusión incluyen la proteína UspA2 (Patentes de los Estados Unidos nº 5.552.146, 6.310.190), la proteína GD (Patente de los Estados Unidos nº 5.725.862), la proteína E (Patente de los Estados Unidos nº 5.948.412) y la proteína de la membrana externa de 74 kilodalton (Patente de los Estados Unidos nº 6.899.885).

30 Algunos ejemplos de antígenos de *Alloicoccus otitidis* adecuados para su inclusión incluyen aquellos identificados en la Solicitud de Patente Internacional W003/048304.

Las composiciones de esta invención también pueden incluir una o más proteínas de *Streptococcus pneumoniae*. Algunos ejemplos de proteínas de *Streptococcus pneumoniae* adecuadas para su inclusión incluyen aquellas identificadas en las Solicitudes de Patente Internacional W002/083855, así como las descritas en la Solicitud de Patente Internacional W002/053761.

35 Las composiciones de esta invención pueden incluir adicionalmente una o más proteínas de *Neisseria meningitidis* de tipo B. Algunos ejemplos de proteínas de *Neisseria meningitidis* de tipo B adecuadas para su inclusión incluyen aquellas identificadas en las Solicitudes de Patente Internacional W003/063766, W02004/094596, W001/85772, W002/16612 y W001/87939.

Activación del polisacárido de *S. pneumoniae* del serotipo 1 para su conjugación

40 Se ha utilizado eficazmente la oxidación parcial de los carbohidratos de los polisacáridos para la generación de los grupos aldehído, que a continuación son acoplados a los residuos de lisina de las proteínas portadoras para generar conjugados inmunógenos (es decir, composiciones, tales como vacunas, útiles para estimular o desencadenar una respuesta inmunitaria específica en un vertebrado). Un requisito previo general para la generación de los grupos aldehído es la presencia de grupos hidroxilo vecinales (adyacentes). En algunos polisacáridos, algunos de los grupos hidroxilo no están disponibles debido que están bloqueados por otras funcionalidades. En el caso de Pn 1, los grupos O-acetilo son un impedimento para una oxidación eficiente, y la eliminación selectiva de algunos de estos grupos (es decir, la introducción de una suave des-O-acetilación del polisacárido antes de la oxidación) facilita la oxidación y mejora la eficacia de la conjugación.

50 Con objeto de mantener la consistencia de la reacción de oxidación hasta el grado deseado, el polisacárido Pn 1 es en primer lugar parcialmente des-O-acetilado mediante una hidrólisis suave con un tampón de pH alcalino. Algunos ejemplos de tampones de pH alcalino incluyen, pero no se limitan a, un tampón de bicarbonato / carbonato (tal como bicarbonato / carbonato de sodio), glicina, imidazol y TRIS-EDTA. La des-O-acetilación está seguida por una neutralización mediante el uso de un ácido débil, tal como ácido acético, ácido cítrico, ácido carbónico, o de un ácido mineral de baja fuerza iónica (por ejemplo, ácido clorhídrico). La oxidación parcial para producir el polisacárido Pn 1 "activado" se lleva a cabo después de la neutralización mediante el uso de cantidades controladas de un agente oxidante. Puede usarse cualquier agente oxidante selectivo que oxide un grupo hidroxilo terminal a un aldehído, incluyendo oxidasas de azúcar específicas (por ejemplo, peryodato de sodio o de potasio). El polisacárido Pn 1

activado es opcionalmente purificado a continuación (por ejemplo, mediante una diafiltración frente a una solución salina tamponada).

- 5 El polisacárido Pn 1 activado puede ser combinado con una proteína portadora. Las proteínas portadoras se eligen para aumentar la inmunogenicidad el polisacárido Pn 1 unido y/o para desencadenar anticuerpos contra la proteína portadora que son diagnósticamente, analíticamente y/o terapéuticamente beneficiosos. La unión covalente de una molécula antigénica (por ejemplo, de un polisacárido) a un portador confiere una inmunogenicidad aumentada y una dependencia de los linfocitos T (Rozsgay y col. (1999) ARNS, 96: 5194 - 97; Lee y col. (1976) J. Immunol., 116: 1711 - 18; Dintzis y col. (1976) ARNS, 73: 3671 - 75). Según se describe en el presente documento, algunas proteínas portadoras útiles incluyen toxinas bacterianas inactivadas tales como el toxoide del tétanos, el toxoide de la tosferina, el toxoide del cólera (por ejemplo, según se describe en la Solicitud de Patente Internacional W02004/083251), la LT de *E. coli*, la ST de *E. coli* y la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*. También pueden usarse proteínas de la membrana externa bacteriana tales como el complejo c de la membrana externa, las porinas, las proteínas de unión a la transferrina, la neumolisina, la proteína superficial neumocócica A, la proteína adhesiva neumocócica, la peptidasa G5a de estreptococos del Grupo A o del Grupo B o la proteína D de *Haemophilus influenzae*. También pueden usarse como proteínas portadoras otras proteínas tales como ovoalbúmina, hemocianina de lapa californiana, albúmina sérica bovina o un derivado proteico purificado de la tuberculina. Una proteína portadora preferida es la toxina diftérica mutada CRM₁₉₇. Después de la combinación con la proteína portadora, la mezcla de polisacárido Pn 1 activado / proteína portadora se congela opcionalmente (por ejemplo, en congelación shell) y se coliofiliza.
- 10 La conjugación se lleva a cabo haciendo reaccionar la mezcla de polisacárido Pn 1 activado / proteína portadora con un agente reductor, tal como cianoborhidruro de sodio. Después, los aldehídos sin reaccionar son protegidos mediante una reducción con borhidruro de sodio. El conjugado se purifica (por ejemplo, mediante una diafiltración frente a un tampón de fosfato seguido de solución salina tamponada), proporcionando un lote final de concentrado del glucoconjugado en solución salina tamponada.
- 20 La divulgación anterior describe de forma general la presente invención. Puede obtenerse una comprensión más completa mediante referencia a los siguientes ejemplos específicos. Estos ejemplos se describen únicamente con fines ilustrativos y no pretenden limitar el ámbito de la invención.
- 25

Ejemplos

Ejemplo de referencia 1

30 Preparación del polisacárido capsular de *S. Pneumoniae* del serotipo 1

Preparación de los bancos de células maestras y de trabajo

- El serotipo 1 de *S. pneumoniae* se obtuvo en la American Type Culture Collection, ATCC, cepa 6301. Se crearon varias generaciones de cepas madre con objeto de expandir la cepa y eliminar los componentes de origen animal (generaciones F1, F2 y F3). Se produjeron dos generaciones adicionales de cepas madre. La primera generación adicional se elaboró a partir de un vial F3 y la generación posterior se elaboró a partir de un vial de la primera generación adicional. Los viales de las cepas madre se almacenaron congelados (< -70 °C) con glicerol sintético como crioprotector. Además de los viales congelados, se prepararon viales liofilizados para la generación F4. Para la preparación del banco de células, todos los cultivos se cultivaron en un medio basado en soja. Antes de la congelación, las células se concentraron mediante una centrifugación, el medio gastado se eliminó y los sedimentos celulares se resuspendieron en medio reciente que contiene un crioprotector, tal como glicerol sintético.
- 35
- 40

Fermentación y recogida

- Los cultivos del banco de células de trabajo se usaron para inocular frascos de siembra que contienen un medio basado en soja. Los frascos se incubaron a 36 °C ± 2 °C sin agitación hasta que se cumplieron los requisitos de crecimiento. Se usó un frasco de siembra para inocular un fermentador de siembra que contiene medio basado en soja. Se mantuvo un pH de aproximadamente 7,0 con una solución estéril de carbonato de sodio. Después de alcanzar la densidad óptica objetivo, se usó el fermentador de siembra para inocular el fermentador de producción que contenía un medio basado en soja. El pH se mantuvo con una solución estéril de carbonato de sodio. La fermentación finalizó después de cesar el crecimiento o cuando se hubo alcanzado el volumen de trabajo del fermentador. Se añadió una cantidad apropiada de desoxicolato de sodio al 12 % estéril al cultivo para lisar las células bacterianas y liberar el polisacárido asociado a las células. Después del lisado, se enfrió el contenido del fermentador. El pH del caldo de cultivo lisado se ajustó hasta aproximadamente pH 6,6 con ácido acético. El lisado se clarificó mediante una centrifugación en flujo continuo seguido de una filtración profunda y una microfiltración a 0,45 µm.
- 45
- 50

- En un proceso alternativo, el pH de fermentación de aproximadamente 7,0 se mantuvo con NaOH 3 N. Después de alcanzar la densidad óptica objetivo, se usó el fermentador de siembra para inocular el fermentador de producción que contenía un medio basado en soja. El pH se mantuvo con NaOH 3 N. La fermentación finalizó después de cesar el crecimiento o cuando se hubo alcanzado el volumen de trabajo del fermentador. Se añadió una cantidad
- 55

apropiada de desoxicolato de sodio al 12 % estéril al cultivo para obtener una concentración del 0,12 % en el caldo, para lisar las células bacterianas y liberar el polisacárido asociado a las células. Después del lisado, el contenido del fermentador se mantuvo con agitación durante un intervalo de tiempo de entre 8 y 24 horas a una temperatura de entre 7 °C y 13 °C, para asegurar que se había producido una lisis celular completa y la liberación del polisacárido.

5 La agitación durante este periodo de mantenimiento impedía que el sedimento de lisado se depositara en las paredes del fermentador y en la sonda de pH. Después, el pH del caldo de cultivo lisado se ajustó hasta aproximadamente un pH de 5,0 con ácido acético al 50 %. Después de un periodo de mantenimiento sin agitación, durante un intervalo de tiempo de entre 12 y 24 horas a una temperatura de entre 15 °C y 25 °C, una porción significativa de las proteínas previamente solubles goteó fuera de la solución en forma de un precipitado sólido con poca pérdida o degradación del polisacárido, que permanecía en la solución. La solución con el precipitado se clarificó después mediante una centrifugación de flujo continuo seguido de una filtración profunda y una microfiltración a 0,45 µm.

Purificación

15 La purificación del polisacárido neumocócico consistió en varias operaciones de concentración / diafiltración, de precipitación / elución, de cromatografías en columna y etapas de filtración profunda. Todos los procedimientos se llevaron a cabo a la temperatura ambiente, salvo que se especifique de otro modo.

20 Los caldos clarificados de los cultivos de *S. pneumoniae* del serotipo 1 del fermentador se concentraron y se diafiltraron mediante el uso de un filtro de 100 kDa de MWCO (peso molecular de corte en kilodalton). La diafiltración se llevó a cabo mediante el uso de un tampón de fosfato de sodio a pH neutro. La diafiltración eliminó los componentes del medio de peso molecular bajo de los biopolímeros de mayor peso molecular, tales como ácidos nucleicos, proteínas y polisacáridos.

25 El polisacárido se precipitó en la solución concentrada y diafiltrada mediante la adición de bromuro de hexadeciltrimetil amonio (MB) a partir de una solución madre, para dar una concentración final del 1 % de MB (p/v). El precipitado de polisacárido / HB se capturó en un filtro profundo y el filtrado se desechó. El precipitado de polisacárido se solubilizó de nuevo y se eluyó mediante la recirculación de una solución de cloruro de sodio a través del filtro profundo que contenía el precipitado. Después los filtros se aclararon con solución adicional de cloruro de sodio.

30 Se añadió yoduro de sodio (NaI) a la solución de polisacárido desde una solución madre de NaI para conseguir una concentración final del 0,5 % para precipitar el MB. El precipitado se eliminó mediante una filtración profunda. El filtrado contiene el polisacárido objetivo. El recipiente de precipitación y el filtro se aclararon con una solución de NaCl / NaI y el aclarado se combinó con la solución parcialmente purificada de polisacárido. El filtro se desechó. El polisacárido se filtró después a través de un filtro de 0,2 µm.

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

35 La solución de polisacárido parcialmente purificada se purificó adicionalmente mediante una filtración a través de un filtro profundo impregnado con carbón activo. Después de la filtración, el filtro de carbón se aclaró con una solución de cloruro de sodio. El aclarado se combinó con la solución de polisacárido, que después se filtró a través de un filtro de 0,2 µm.

40 La solución de polisacárido se concentró con un ultrafiltro de 30 kDa de MWCO y se ajustó con un tampón de fosfato de sodio 1 M para conseguir una concentración final de fosfato de sodio de 0,025 M. Se comprobó el pH y se ajustó a $7,0 \pm 0,2$.

45 La columna de hidroxiapatito cerámico (HA) se equilibró con tampón de fosfato de sodio que contiene cloruro de sodio para obtener la conductividad apropiada ($< 15 \mu\text{S}$). Después se cargó la solución de polisacárido en la columna. En estas condiciones, las impurezas unidas a la resina y el polisacárido se recuperaron a partir del flujo a través de la columna. La solución de polisacárido se filtró a través de filtros en línea de 0,2 µm ubicados antes y después de la columna.

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

50 La solución de polisacárido diafiltrada se filtró a través de un filtro de membrana de 0,2 µm en frascos de polipropileno. Se tomaron muestras para las pruebas finales y el polisacárido purificado se almacenó congelado a $-25 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$.

Caracterización

55 Los datos de la RMN 1 H eran coherentes con la estructura química mediante la asignación de las señales asignadas a los protones de la molécula del polisacárido. El espectro de RMN 1 H mostraba una serie de señales bien resueltas (los protones del grupo metilo) para la cuantificación del grupo funcional O-acetilo del polisacárido.

La identidad del polisacárido monovalente se confirmó mediante una inmunolectroforesis a contracorriente mediante el uso de antisueros específicos.

5 Se usó una cromatografía de filtración en gel de alta resolución acoplada con detectores del índice de refracción y de la dispersión de la luz láser multiángulo (MALLS) junto con la concentración de la muestra para calcular el peso molecular.

Se usó medio de cromatografía de exclusión por tamaños (CL-4B) para el perfilado de la distribución relativa de pesos moleculares del polisacárido.

Ejemplo de referencia 2

Preparación del conjugado de sacárido neumocócico del serotipo 1 - CRM₁₉₇

10 Activación y conjugación

Los recipientes con el polisacárido purificado se descongelaron y se combinaron en un recipiente de reacción. Al recipiente se añadió carbonato de sodio 0,2 M, a pH 9,0 para una desacetilación parcial (hidrolisis) durante 3 horas a 50 °C. La reacción se enfrió hasta 20 °C y se llevó a cabo una neutralización mediante ácido acético 0,2 M. Se llevó a cabo una oxidación en presencia de peryodato de sodio mediante una incubación a 2 - 8 °C, y la mezcla se agitó durante 15 - 21 horas.

15 La mezcla de la reacción de activación se concentró y diafiltró 10x con NaCl al 0,9 % mediante el uso de una membrana de 30 K de MWCO. El retenido se filtró a 0,2 µm. El sacárido activado se introdujo en frascos de liofilización de vidrio de 100 ml y se congeló Shell a -75 °C y se liofilizó.

20 La "congelación Shell" es un procedimiento para la preparación de muestras para su liofilización. Los matraces se rotan automáticamente mediante rodillos motorizados en un baño refrigerado que contiene alcohol o cualquier otro líquido apropiado. Se congela uniformemente un delgado recubrimiento de producto alrededor de la "cáscara" interior de un matraz, lo que permite procesar de forma segura un mayor volumen del material durante cada ciclo de liofilización. Estas unidades refrigeradas automáticas proporcionan un medio simple y eficaz de precongela muchos matraces al mismo tiempo, produciendo los recubrimientos internos deseados y proporcionando un área superficial suficiente para una liofilización eficaz.

25 Los frascos del material liofilizado se llevaron hasta la 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 de sodio 1 M a una fuerza iónica final de 0,2 M y a un pH de 7,5, después se añadió cianoborhidruro de sodio. La reacción se incubó a 23 °C durante 18 horas, seguido de una segunda incubación a 37 °C durante 72 horas. Después de las incubaciones con cianoborhidruro, la mezcla de reacción se diluyó con solución salina fría seguido de la adición de carbonato de sodio 1 M para ajustar la mezcla de reacción a pH 9,0. Los aldehídos sin reaccionar se inactivaron mediante la adición de borhidruro de sodio mediante una incubación a 23 °C durante 3 - 6 horas.

35 La mezcla de reacción se diluyó 2 veces con solución salina y se transfirió a través de un prefiltro 0,45 - 5 µm a un recipiente de retenido. La mezcla de reacción se diafiltró 30x con tampón de fosfato 0,15 M, a pH 6, y 20x con solución salina. El retenido se filtró a través de un filtro de 0,2 µm.

La solución de conjugado se diluyó hasta un objetivo de 0,5 mg/ml con solución salina al 0,9 % y después se filtró estéril en recipientes de concentrado final a granel (FSC) en una campana de clase 100. El conjugado se almacenó a 2 - 8 °C.

40 Caracterización

Se usó medio de cromatografía de exclusión por tamaños (CL-4B) para el perfilado de la distribución relativa de pesos moleculares del conjugado.

La identidad del conjugado se confirmó mediante el ensayo de transferencia en ranura mediante el uso de antisueros específicos.

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

$$\text{proporción} = \frac{\text{µg/ml de sacárido}}{\text{µg/ml de proteína}}$$

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

Ejemplo de referencia 3

5 Preparación del polisacárido capsular de *S. Pneumoniae* del serotipo 3

Preparación de los bancos de células maestras y de trabajo

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

Fermentación y recogida

10 Los cultivos del banco de células de trabajo se usaron para inocular frascos de siembra que contienen un medio basado en soja. Los frascos se incubaron a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ sin agitación hasta que se cumplieron los requisitos de crecimiento. Se usó un frasco de siembra para inocular un fermentador de siembra que contiene medio basado en soja. Se mantuvo un pH de aproximadamente 7,0 con una solución estéril de carbonato de sodio. Después de alcanzar la densidad óptica objetivo, se usó el fermentador de siembra para inocular un fermentador de siembra intermedio. Después de alcanzar la densidad óptica objetivo, se usó el fermentador de siembra intermedio para inocular el fermentador de producción. El pH se mantuvo con una solución estéril de carbonato de sodio. La fermentación finalizó después de alcanzar el volumen de trabajo del fermentador. Se añadió una cantidad apropiada de desoxicolato de sodio al 12 % estéril al cultivo para lisar las células bacterianas y liberar el polisacárido asociado a las células. Después del lisado, se enfrió el contenido del fermentador. El pH del caldo de cultivo lisado se ajustó hasta aproximadamente un pH de 6,6 con ácido acético. El lisado se clarificó mediante una centrifugación en flujo continuo seguido de una filtración profunda y una microfiltración a $0,45\text{ }\mu\text{m}$.

Purificación

25 La purificación del polisacárido neumocócico consistió en varias operaciones de concentración / diafiltración, de precipitación / elución, de cromatografía en columna y etapas de filtración profunda. Todos los procedimientos se llevaron a cabo a la temperatura ambiente, salvo que se especifique de otro modo.

Los caldos clarificados de los cultivos de *S. pneumoniae* del serotipo 1 del fermentador se concentraron y se diafiltraron mediante el uso de un filtro de 100 kDa de MWCO. La diafiltración se llevó a cabo mediante el uso de un tampón de fosfato de sodio a pH neutro. La diafiltración eliminó los componentes del medio de peso molecular bajo de los biopolímeros de mayor peso molecular, tales como ácidos nucleicos, proteínas y polisacáridos.

30 Antes de la adición del bromuro de hexadeciltrimetil amonio (MB), se añadió un volumen calculado de una solución madre de NaCl a la solución concentrada y diafiltrada de polisacárido para dar una concentración final de NaCl de 0,25 M. El polisacárido se precipitó después mediante la adición de MB a partir de una solución madre, para dar una concentración final del 1 % de MB (p/v). El precipitado de polisacárido / HB se capturó en un filtro profundo y el filtrado se desechó. El precipitado de polisacárido se solubilizó de nuevo y se eluyó mediante la recirculación de una solución de cloruro de sodio a través del filtro profundo que contenía el precipitado. Después los filtros se aclararon con solución adicional de cloruro de sodio.

40 Se añadió yoduro de sodio (NaI) a la solución de polisacárido desde una solución madre de NaI para conseguir una concentración final del 0,5 % para precipitar el MB. El precipitado se eliminó mediante una filtración profunda. El filtrado contenía el polisacárido objetivo. El recipiente de precipitación y el filtro se aclararon con una solución de NaCl / NaI, y el aclarado se combinó con la solución parcialmente purificada de polisacárido. El filtro se desechó. El polisacárido se filtró después a través de un filtro de $0,2\text{ }\mu\text{m}$.

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

45 La solución de polisacárido parcialmente purificada se purificó adicionalmente mediante una filtración a través de un filtro profundo impregnado con carbón activo. Después de la filtración, el filtro de carbón se aclaró con una solución de cloruro de sodio. El aclarado se combinó con la solución de polisacárido, que después se filtró a través de un filtro de $0,2\text{ }\mu\text{m}$.

50 La solución de polisacárido se concentró con un ultrafiltro de 30 kDa de MWCO y se ajustó con un tampón de fosfato de sodio 1 M para conseguir una concentración final de fosfato de sodio de 0,025 M. Se comprobó el pH y se ajustó a $7,0 \pm 0,2$.

La columna de hidroxiapatito cerámico (HA) se equilibró con tampón de fosfato de sodio que contiene cloruro de sodio para obtener la conductividad apropiada ($15\text{ }\mu\text{S}$). Después se cargó la solución de polisacárido en la columna. En estas condiciones, las impurezas unidas a la resina y al polisacárido se recuperaron a partir del flujo a través de la columna. El polisacárido se lavó abundantemente a través de la columna con tampón y se filtró a través de un

filtro de 0,2 µm.

La solución de polisacárido se concentró mediante el uso de un filtro de 30 kDa de MWCO. Después el concentrado se diafiltró con WFI.

- 5 La solución de polisacárido diafiltrada se filtró a través de un filtro de membrana de 0,2 µm en recipientes de acero inoxidable. Se tomaron muestras para las pruebas finales y el polisacárido purificado se almacenó congelado a -25 ± 5 °C.

Caracterización

Los datos de la RMN 1 H eran coherentes con la estructura química mediante la asignación de las señales asignadas a los protones de la molécula del polisacárido.

- 10 La identidad del polisacárido monovalente se confirmó mediante una inmunolectroforesis a contracorriente mediante el uso de antisueros específicos.

Se usó una cromatografía de filtración en gel de alta resolución acoplada con detectores del índice de refracción y de la dispersión de la luz láser multiángulo (MALLS) junto con la concentración de la muestra para calcular el peso molecular.

- 15 Se usó medio de cromatografía de exclusión por tamaños (CL-4B) para el perfilado de la distribución relativa de pesos moleculares del polisacárido.

Ejemplo de referencia 4

Preparación del conjugado de sacárido neumocócico del serotipo 3 - CRM₁₉₇

Activación y conjugación

- 20 Los recipientes con el polisacárido purificado del serotipo 3 se descongelaron y se combinaron en un recipiente de reacción. Al recipiente se añadieron WFI y ácido acético 2 M hasta una concentración final de 0,2 M y de 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 1 M hasta una concentración final de 0,1 M. Se llevó a cabo una oxidación en presencia de peryodato de sodio mediante una incubación durante 16 - 24 horas a 23 °C.

La mezcla de la reacción de activación se concentró y se diafiltró 10x con WFI mediante el uso de una membrana de 100 K de MWCO. El retenido se filtró a través de un filtro de 0,2 µm.

- 30 Para la combinación, al sacárido activado se añadió fosfato de sodio 0,2 M, a pH 7,0, hasta una concentración final de 10 mM y un pH de 6,0 - 6,5. Se mezcló la proteína portadora CRM₁₉₇ con la solución de sacárido en una proporción de 2 g de sacárido por 1 g de CRM₁₉₇. La solución combinada de sacárido / proteína se introdujo en frascos de liofilización de vidrio de 100 ml con un llenado objetivo de 50 ml, se congelaron Shell a -75 °C y se liofilizaron.

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

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

La solución de conjugado se diluyó hasta un objetivo de sacárido de 0,5 mg/ml y después se filtró estéril en recipientes de FBC en una campana de clase 100. El conjugado se almacenó a 2 - 8 °C.

Caracterización

- 45 Se usó medio de cromatografía de exclusión por tamaños (CL-4B) para el perfilado de la distribución relativa de pesos moleculares del conjugado.

La identidad del conjugado se confirmó mediante el ensayo de transferencia en ranura mediante el uso de antisueros específicos.

- 50 Las concentraciones del sacárido y de la proteína se determinaron mediante los ensayos de Anthrone y de Lowry, respectivamente. La proporción entre el sacárido y la proteína en el complejo conjugado unido covalentemente se

obtuvo mediante el cálculo:

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

5 **Ejemplo de referencia 5**

Preparación del polisacárido capsular de *S. Pneumoniae* del serotipo 5

El *S. pneumoniae* del serotipo 5 se obtuvo del Dr. Gerald Schiffman de la State University de Nueva York, Brooklyn, Nueva York. Para la preparación del sistema de banco de células, véase el Ejemplo 1. Para la fermentación, la recogida, la purificación y la caracterización del polisacárido, véase el Ejemplo 1.

10 Procedimiento de fermentación alternativo

Se usaron los cultivos del banco de células de trabajo para inocular frascos de siembra 10 que contienen un medio basado en soja y una solución estéril de NaHCO₃ 10 mM. Los frascos se incubaron a 36 °C ± 2 °C sin agitación hasta que se cumplieron los requisitos de crecimiento. Se usó un frasco de siembra para inocular un fermentador de siembra que contenía un medio basado en soja y una solución estéril de NaHCO₃ 10 mM. Se mantuvo un pH de aproximadamente 7,0 con NaOH 3 N. Después de alcanzar la densidad óptica objetivo, se usó el fermentador de siembra para inocular el fermentador de producción que contenía un medio basado en soja con una concentración de NaHCO₃ de 10 mM. El pH se mantuvo con NaOH 3 N. La fermentación finalizó después de cesar el crecimiento o cuando se hubo alcanzado el volumen de trabajo del fermentador. Se añadió una cantidad apropiada de desoxicolato de sodio al 12 % estéril al cultivo para obtener una concentración del 0,12 % en el caldo, para lisar las células bacterianas y liberar el polisacárido asociado a las células. Después del lisado, el contenido del fermentador se mantuvo, con agitación, durante un intervalo de tiempo de entre 8 y 24 horas a una temperatura de entre 7 °C y 13 °C para asegurar que se había producido una lisis celular completa y la liberación del polisacárido. La agitación durante este periodo de mantenimiento impedía que el sedimento de lisado se depositara en las paredes del fermentador y en la sonda de pH, permitiendo así el mantenimiento de la integridad de la sonda de pH. Después, el pH del caldo de cultivo lisado se ajustó hasta aproximadamente un pH de 4,5 con ácido acético al 50 %. Después de un periodo de mantenimiento sin agitación, durante un intervalo de tiempo de entre 12 y 24 horas a una temperatura de entre 15 °C y 25 °C, una porción significativa de las proteínas previamente solubles goteó fuera de la solución en forma de un precipitado sólido con poca pérdida o degradación del polisacárido, 30 que permanecía en la solución. La solución con el precipitado se clarificó después mediante una centrifugación de flujo continuo seguido de una filtración profunda y una microfiltración a 0,45 µm.

Ejemplo de referencia 6

Preparación del conjugado de sacárido neumocócico del serotipo 5 - CRM₁₉₇

Activación y conjugación

35 Los recipientes de sacárido del serotipo 5 se descongelaron y se combinaron en un recipiente de reacción. Al recipiente se añadió acetato de sodio 0,1 M, a pH 4,7, seguido de una oxidación en presencia de peryodato de sodio mediante una incubación durante 16 - 22 horas a 23 °C.

La mezcla de la reacción de activación se concentró y se diafiltró 10x con WFI mediante el uso de una membrana de 100 K de MWCO. El retenido se filtró a través de un filtro de 0,2 µm.

40 El sacárido activado del serotipo 5 se combinó con la CRM₁₉₇ en una proporción de 0,8:1. La solución combinada de sacárido / proteína se introdujo en frascos de liofilización de vidrio de 100 ml (llenado objetivo de 50 ml), se congelaron Shell a -75 °C y se coliofilizaron.

Los frascos del material coliofilizado se llevaron hasta la temperatura ambiente y se resuspendieron en tampón de fosfato de sodio 0,1 M, a pH 7,5, y se añadió cianoborhidruro de sodio. La reacción se incubó a 30 °C durante 72 horas, seguido de una segunda adición de cianoborhidruro y se incubó a 30 °C durante 20 - 28 horas.

45 Después de las incubaciones con cianoborhidruro, la mezcla de reacción se diluyó 2 veces con solución salina y se transfirió a través de un prefiltro de 0,45 - 5 µm a un recipiente de retenido. La mezcla de reacción se diafiltró 30x con tampón de fosfato 0,01 M, a pH 8, 20x con tampón de fosfato 0,15 M a pH 6, y 20x con solución salina. El retenido se filtró a través de un filtro de 0,2 µm.

50 La solución de conjugado se diluyó hasta un objetivo de sacárido de 0,5 mg/ml y después se filtró estéril en recipientes de 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 de referencia 7**Preparación del polisacárido capsular de *S. Pneumoniae* del serotipo 6 A**

El *S. pneumoniae* del serotipo 6 A se obtuvo del Dr. Gerald Schiffman de la State University de Nueva York, Brooklyn, Nueva York. Para la preparación del sistema de banco de células, véase el Ejemplo 1. Para la fermentación, la recogida y la purificación del polisacárido, véase el Ejemplo 1, excepto porque durante la purificación, se omite la etapa de concentración de 30 kDa de MWCO, antes de la etapa de cromatografía.

Ejemplo de referencia 8**Preparación del conjugado de sacárido neumocócico del serotipo 6 A - CRM₁₉₇**Activación y conjugación

El polisacárido del serotipo 6 A es un polímero de alto peso molecular cuyo tamaño tuvo que ser reducido antes de la oxidación. Los recipientes de sacárido del serotipo 6 A se descongelaron y se combinaron en un recipiente de reacción. Al recipiente se añadió ácido acético 2 M hasta una concentración final de 0,1 M para una hidrólisis durante 1,5 horas a 60 °C. La reacción se enfrió hasta 23 °C y la neutralización se llevó a cabo mediante el ajuste de la mezcla de reacción con NaOH 1 M hasta un pH de 6. La oxidación en presencia de peryodato de sodio se llevó a cabo mediante una incubación a 23 °C durante 14 - 22 horas.

La mezcla de la reacción de activación se concentró y se diafiltró 10x con WFI mediante el uso de una membrana de 100 K de MWCO. El retenido se filtró a través de un filtro de 0,2 µm.

El serotipo 6 A se combinó con sacarosa y se introdujo en frascos de liofilización de vidrio de 100 ml (llenado objetivo de 50 ml) y se congelaron Shell a -75 °C y se liofilizaron.

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

La mezcla de reacción diluida se transfirió a través de un prefiltro de 5 µm a un recipiente de retenido. La mezcla de reacción se diafiltró 10x con NaCl al 0,9 % y 30x con NaCl tamponado con succinato. El retenido se filtró a través de un filtro de 0,2 µm.

La solución de conjugado se diluyó hasta un objetivo de sacárido de 0,5 mg/ml y después se filtró estéril en recipientes de 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 de referencia 9**Preparación del polisacárido capsular de *S. Pneumoniae* del serotipo 7 F**

El *S. pneumoniae* del serotipo 7 F se obtuvo del Dr. Gerald Schiffman de la State University de Nueva York, Brooklyn, Nueva York. Para la preparación del sistema de banco de células y para la fermentación y la recogida del polisacárido, véase el Ejemplo 3. Para un procedimiento de fermentación y de recogida alternativo, véase el procedimiento alternativo descrito en el Ejemplo 1.

Purificación

La purificación del polisacárido neumocócico consistió en varias operaciones de concentración / diafiltración, de precipitación / elución, de cromatografía en columna y etapas de filtración profunda. Todos los procedimientos se llevaron a cabo a la temperatura ambiente salvo que se especifique de otro modo.

Los caldos clarificados de los cultivos de *S. pneumoniae* del serotipo 7 F del fermentador se concentraron y se diafiltraron mediante el uso de un filtro de 100 kDa de MWCO. La diafiltración se llevó a cabo mediante el uso de un tampón de fosfato de sodio a pH neutro. La diafiltración eliminó los componentes del medio de peso molecular bajo de los biopolímeros de mayor peso molecular, tales como ácidos nucleicos, proteínas y polisacáridos.

El serotipo 7 F no forma un precipitado con el HB. En su lugar, se precipitaron las impurezas a partir del concentrado y la solución diafiltrada mediante la adición del HB a partir de una solución madre hasta una concentración final del 1 % se HB. El precipitado se capturó en un filtro profundo y el filtrado se desechó. El polisacárido estaba contenido en el filtrado.

Se añadió yoduro de sodio (NaI) a la solución de polisacárido desde una solución madre de NaI para conseguir una concentración final del 0,5 % para precipitar el MB. El precipitado se eliminó mediante una filtración profunda. El

filtrado contenía el polisacárido objetivo. El recipiente de precipitación y el filtro se aclararon con una solución de NaCl / NaI y los aclarados se combinaron con la solución parcialmente purificada de polisacárido. El filtro se desechó. El polisacárido se filtró después a través de un filtro de 0,2 µm.

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

La solución de polisacárido parcialmente purificada se purificó adicionalmente mediante una filtración a través de un filtro profundo impregnado con carbón activo. Después de la filtración, el filtro de carbón se aclaró con una solución de cloruro de sodio. El aclarado se combinó con la solución de polisacárido, que después se filtró a través de un filtro de 0,2 µm.

10 La solución de polisacárido se concentró con un ultrafiltro de 30 kDa de MWCO y se ajustó con un tampón de fosfato de sodio 1 M para conseguir una concentración final de fosfato de sodio de 0,025 M. Se comprobó el pH y se ajustó a $7,0 \pm 0,2$.

15 La columna de hidroxiapatito cerámico (HA) se equilibró con tampón de fosfato de sodio que contiene cloruro de sodio para obtener la conductividad apropiada (15 µS). Después se cargó la solución de polisacárido en la columna. En estas condiciones, las impurezas unidas a la resina y el polisacárido se recuperaron a partir del flujo a través de la columna. El polisacárido se lavó abundantemente a través de la columna con tampón y se filtró a través de un filtro de 0,2 µm.

La solución de polisacárido se concentró mediante el uso de un filtro de 30 kDa de MWCO. Después el concentrado se diafiltró con WFI.

20 La solución de polisacárido diafiltrada se filtró a través de un filtro de membrana de 0,2 µm en recipientes de acero inoxidable. Se tomaron muestras para las pruebas finales y el polisacárido purificado se almacenó a 2 - 8 °C.

Para la caracterización del polisacárido, véase el Ejemplo 3.

Ejemplo de referencia 10

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

25 Activación y conjugación

La oxidación en presencia de peryodato de sodio se llevó a cabo mediante una incubación durante 16 - 24 h a 23 °C.

La mezcla de la reacción de activación se concentró y se diafiltró 10x con NaOAc 10 mM, a pH 4,5, mediante el uso de una membrana de 100K de MWCO. El retenido se filtró a través de un filtro de 0,2 µm.

30 El serotipo 7 F se introdujo en frascos de liofilización de vidrio de 100 ml (llenado objetivo de 50 ml) y se congelaron Shell a -75 °C y se liofilizaron.

Los frascos del serotipo 7 F y la CRM₁₉₇ liofilizados se llevaron hasta la temperatura ambiente y se resuspendieron en DMSO en una proporción de sacárido / proteína de 1,5:1. Después de la adición de cianoborhidruro de sodio, la reacción se incubó a 23 °C durante 8 - 10 horas. Los aldehídos sin reaccionar se inactivaron mediante la adición de borhidruro de sodio mediante una incubación a 23 °C durante 16 horas.

35 La mezcla de reacción se diluyó 10 veces con solución salina fría y se transfirió a través de un prefiltro de 5 µm a un recipiente de retenido. La mezcla de reacción se diafiltró 10x con solución salina al 0,9 % y 30x con solución salina tamponada con succinato. El retenido se filtró a través de un filtro de 0,2 µm.

La solución del conjugado se diluyó hasta un objetivo de sacárido de 0,5 mg/ml con solución salina al 0,9 % y después se filtró estéril en recipientes de FBC en una campana de clase 100. El conjugado se almacenó a 2 - 8 °C.

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

Ejemplo de referencia 11

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

45 El *S. pneumoniae* del serotipo 19 A se obtuvo del Dr. Gerald Schiffman de la State University de Nueva York, Brooklyn, Nueva York. Para la preparación del sistema de banco de células, véase el Ejemplo 1. Para la fermentación, la recogida y la purificación del polisacárido, véase el Ejemplo 7. Para la caracterización, véase el Ejemplo 3,

Ejemplo de referencia 12**Preparación del conjugado de sacárido neumocócico del serotipo 19 A - CRM₁₉₇**Activación y conjugación

5 Los recipientes del sacárido del serotipo 19 A se descongelaron y se combinaron en un recipiente de reacción. Se añadió acetato de sodio a 10 mM (pH 5,0) y se llevó a cabo la oxidación en presencia de peryodato de sodio mediante una incubación durante 16 - 24 h a 23 °C,

La mezcla de la reacción de activación se concentró y se diafiltró 10x con acetato 10 mM, a pH 5,0, mediante el uso de una membrana de 100 K de MWCO. El retenido se filtró a través de un filtro de 0,2 µm,

10 El sacárido activado se combinó con sacarosa seguido de la adición de la CRM₁₉₇. La mezcla del sacárido activador del serotipo 19 A y la CRM₁₉₇ (proporción de 0,8:1) se introdujo en frascos de liofilización de vidrio de 100 ml (llenado objetivo de 50 ml) y se congelaron Shell a -75 °C y se liofilizaron,

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

La mezcla de reacción se diluyó 10 veces con solución salina fría y se transfirió a través de un prefiltro de 5 µm a un recipiente de retenido La mezcla de reacción se diafiltró 10x con NaCl al 0,9 %, se filtró a 0,45 µm y 30x con diafiltración mediante el uso de tampón de succinato 5 mM / NaCl al 0,9 %, a pH 6. El retenido se filtró a través de un filtro de 0,2 µm,

20 La solución del conjugado se diluyó hasta un objetivo de 0,5 mg/ml mediante el uso de succinato 5 mM / solución salina al 0,9 % y después se filtró estéril en recipientes de 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 de referencia 13**25 Preparación del polisacárido capsular de *S. Pneumoniae* del serotipos 4, 6 B, 9 V, 14, 18 C, 19 F y 23F**Preparación del cultivo de siembra de *S. pneumoniae*

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

30 Por separado, se usó un vial de cada uno de los serotipos deseados de *Streptococcus pneumoniae* para iniciar un lote de fermentación. Se ajustaron dos frascos que contienen medio basado en soja y rojo de fenol a un intervalo de pH de 7,4 ± 0,2 mediante el uso de carbonato de sodio, y después se añadió a los frascos el volumen requerido de la solución de dextrosa al 50 % / sulfato de magnesio al 1 %. Los dos frascos fueron inoculados con diferentes cantidades de siembra. Los frascos se incubaron a 36 ± 2 °C hasta que el medio se volvió de color amarillo.

35 Después de la incubación, se retiraron muestras de cada frasco y se ensayó su densidad óptica (DO) (entre 0,3 y 0,9) y su pH (entre 4,6 y 5,5). Se seleccionó uno de los dos frascos para la inoculación del fermentador de siembra.

40 El medio basado en soja se transfirió al fermentador de siembra y se esterilizó. Después se añadió al fermentador un volumen de solución de dextrosa al 50 % / sulfato de magnesio al 1 %. Se monitorizaron y se controlaron el pH y la agitación del fermentador de siembra (a un pH de entre 6,7 y 7,4). La temperatura se mantuvo a 36 ± 2 °C. El inóculo de siembra (frasco) se conectó asépticamente al fermentador de siembra y se transfirió el inóculo. El fermentador se mantuvo en control de pH y periódicamente se extrajeron muestras y se ensayaron para comprobar la DO y el pH. Cuando se alcanzó la DO deseada de entre 0,5 y 600 nm, el fermentador intermedio se inoculó con el caldo de fermentación del fermentador de siembra.

45 El medio basado en soja se transfirió al fermentador intermedio y se esterilizó. Entonces se añadió al fermentador un volumen de una solución de dextrosa al 50 % / sulfato de magnesio al 1 %. Se monitorizaron y se controlaron el pH y la agitación del fermentador intermedio (a un pH de entre 6,7 y 7,4). La temperatura se mantuvo a 36 ± 2 °C. El contenido del fermentador de siembra se transfirió al fermentador intermedio. El fermentador se mantuvo en control de pH y periódicamente se extrajeron muestras y se ensayaron para comprobar la DO y el pH. Cuando se alcanzó la DO deseada de entre 0,5 y 600 nm, el fermentador de producción se inoculó con el caldo de fermentación del fermentador intermedio.

50

El medio basado en soja se transfirió al fermentador de producción y se esterilizó. Después se añadió al fermentador un volumen de una solución de dextrosa al 50 % / sulfato de magnesio al 1 %. Se monitorizaron y se controlaron el

pH y la agitación del fermentador de producción (a un pH de entre 6,7 y 7,4). La temperatura se mantuvo a 36 ± 2 °C. El fermentador se mantuvo en control de pH y periódicamente se extrajeron muestras y se ensayaron para comprobar la DO y el pH, hasta que se completó la fermentación.

5 Se añadió desoxicolato de sodio al fermentador hasta una concentración final de aproximadamente el 0,12 % p/v. El cultivo se mezcló durante un mínimo de 30 minutos y el punto de ajuste de la temperatura se redujo hasta 10 °C. El cultivo se incubó durante una noche y, después de confirmar la inactivación, el pH del cultivo se ajustó a entre 6,4 y 6,8, según fuera necesario, con ácido acético al 50 %. La temperatura del fermentador se aumentó hasta 20 ± 5 °C y el contenido se transfirió al tanque de mantenimiento de clarificación.

10 El contenido del tanque de mantenimiento de clarificación (incluyendo los desechos celulares) se procesó a través de una centrifuga a un caudal de entre 25 y 600 litros por hora (excepto para el serotipo 4, en el que los desechos celulares fueron desechados y el caudal se ajustó a entre 25 y 250 litros por hora). Se retiraron muestras del sobrenadante y se ensayaron para comprobar la DO. La DO deseada durante la centrifugación era $< 0,15$,

15 Inicialmente se recirculó el sobrenadante a través de un conjunto de filtro profundo hasta que se consiguió una DO de $0,05 \pm 0,03$. Después el sobrenadante se hizo pasar a través de un conjunto de filtro profundo y a través de un filtro de membrana de $0,45 \mu\text{m}$ hacia el tanque de mantenimiento del filtrado.

Posteriormente, el producto se transfirió a través de tuberías cerradas al área de purificación para su procesado,

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

Para un procedimiento alternativo de fermentación y de recogida para los serotipos 4 y 6 B, véase el procedimiento alternativo descrito en el Ejemplo 1.

20 Purificación

La purificación de cada polisacárido neumocócico consistió en varias operaciones de concentración / diafiltración, de precipitación / elución, de cromatografía en columna y etapas de filtración profunda. Todos los procedimientos se llevaron a cabo a la temperatura ambiente salvo que se especifique de otro modo

25 El caldo clarificado procedente de los cultivos del fermentador del serotipo deseado de *S. pneumoniae* se concentró y se diafiltró mediante el uso de un filtro 100 kDa de MWCO.

La diafiltración se llevó a cabo mediante el uso de tampón de fosfato de sodio a $\text{pH} < 9,0$. La diafiltración eliminó los componentes del medio de peso molecular bajo de los biopolímeros de mayor peso molecular, tales como ácidos nucleicos, proteínas y polisacáridos.

30 El polisacárido se precipitó en la solución concentrada y diafiltrada mediante la adición de HB a partir de una solución madre para dar una concentración final del 1 % de HB (p/v) (excepto para el serotipo 23 F, que tenía una concentración final del 2,5 %). El precipitado de polisacárido / HB se capturó en un filtro profundo y el filtrado se desechó (nota: el serotipo 14 no precipita; por lo tanto el filtrado se conserva). El precipitado de polisacárido se solubilizó de nuevo y se eluyó mediante la recirculación de una solución de cloruro de sodio a través del filtro profundo que contenía el precipitado. Después los filtros se aclararon con solución adicional de cloruro de sodio.

35 Se añadió yoduro de sodio (NaI) a la solución de polisacárido desde una solución madre de NaI para conseguir una concentración final del 0,5 % para precipitar el MB (excepto para el serotipo 6 B, que tenía una concentración final del 0,25 %). El precipitado se eliminó mediante una filtración profunda. El filtrado contenía el polisacárido objetivo. El filtro se desechó. El polisacárido se filtró después a través de un filtro de $0,2 \mu\text{m}$.

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

La solución de polisacárido parcialmente purificada se purificó adicionalmente mediante una filtración a través de un filtro profundo impregnado con carbón activo. Después de la filtración, el filtro de carbón se aclaró con una solución de cloruro de sodio. El aclarado se combinó con la solución de polisacárido, que después se filtró a través de un filtro de $0,2 \mu\text{m}$.

45 La solución de polisacárido diafiltrada se filtró a través de un filtro de membrana de $0,2 \mu\text{m}$ en recipientes de acero inoxidable. Se tomaron muestras para las pruebas finales y el polisacárido purificado se almacenó

La solución de polisacárido se concentró con un ultrafiltro de 30 kDa de MWCO y el filtro se aclaró con una solución de cloruro de sodio. Se comprobó el pH y se ajustó a $7,0 \pm 0,3$,

50 La columna de hidroxiapatito cerámico (HA) se equilibró con tampón de fosfato de sodio que contiene cloruro de sodio hasta que el pH fue de $7,0 \pm 0,3$ y la conductividad fue de $26 \pm 4 \mu\text{S}$. Después se cargó la solución de polisacárido en la columna. En estas condiciones, las impurezas unidas a la resina y el polisacárido se recuperaron a partir del flujo a través de la columna. La solución de polisacárido se filtró a través de un filtro de $0,2 \mu\text{m}$.

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

La solución de polisacárido diafiltrada se filtró a través de un filtro de membrana de $0,2 \mu\text{m}$ en contenedores a granel y se almacenó a $2 - 8 \text{ }^\circ\text{C}$.

5 **Ejemplo de referencia 14**

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

Procedimiento de activación

10 Los sacáridos de serotipos diferentes siguen diferentes rutas para su activación (con hidrólisis o sin hidrólisis antes de la activación) y para su conjugación (reacciones acuosas o con DMSO), según se describe en este ejemplo.

El polisacárido se transfirió desde los contenedores a granel al recipiente de reacción. Después el polisacárido se diluyó con WFI y fosfato de sodio hasta un intervalo de concentración final de entre $1,6 - 2,4 \text{ mg/ml}$.

Etapas 1.

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

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

20 Para el serotipo 18 C se añadió ácido acético glacial (concentración final de ácido de $0,2 \text{ M}$) y la solución se incubó durante $205 - 215$ minutos a $94 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Después, la temperatura se redujo hasta $21 - 25 \text{ }^\circ\text{C}$ y se añadió fosfato de sodio $1 - 2 \text{ M}$ hasta un pH objetivo de $6,8 \pm 0,2$.

Etapas 2: reacción con peryodato

25 Los equivalentes molares de peryodato de sodio para la activación del sacárido neumocócico se determinaron mediante el uso del contenido total de sacárido (excepto para el 4). Para el serotipo 4, se usó una proporción de $0,8 - 1,2$ moles de peryodato de sodio por mol de sacárido. Con una intensa mezcla, se dejó proceder la reacción de oxidación entre 16 y 20 horas a $21 - 25 \text{ }^\circ\text{C}$ para todos los serotipos excepto para el 19 F, para el que la temperatura era $< 15 \text{ }^\circ\text{C}$.

Etapas 3: ultrafiltración

30 El sacárido oxidado se concentró y se diafiltró con WFI (tampón de fosfato de sodio $0,01 \text{ M}$ a pH $6,0$ para el serotipo 19 F) con un ultrafiltro de 100 kDa de MWCO (un ultrafiltro de 5 kDa para el 18 C). El permeado se desechó y el retenido se filtró a través de un filtro de $0,22 \mu\text{m}$.

Etapas 4: liofilización

35 Para los serotipos 4, 9 V y 14 el sacárido concentrado se mezcló con la proteína portadora CRM₁₉₇, se introdujo en frascos de vidrio, se congeló Shell y se almacenó a $< -65 \text{ }^\circ\text{C}$. El sacárido concentrado-CRM₁₉₇ congelado se liofilizó y después se almacenó a $-25 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$.

Para los serotipos 6 B, 19 F y 23 F se añadió una cantidad específica de sacarosa, que se calculó para conseguir una concentración de sacarosa del $5\% \pm 3\%$ en la mezcla de reacción de conjugación. El serotipo 18 C no requirió la adición de sacarosa. Después, el sacárido concentrado se introdujo en frascos de vidrio, se congeló Shell y se almacenó a $< -65 \text{ }^\circ\text{C}$. El sacárido concentrado congelado se liofilizó y después se almacenó a $-25 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$.

40 Procedimiento de conjugación

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

Conjugación acuosa

Etapas 1: disolución

45 Para los serotipos 4, 9 V y 14, se descongeló la mezcla liofilizada de sacárido activado-CRM₁₉₇ y se equilibró a la temperatura ambiente. Después, el sacárido activado-CRM₁₉₇ liofilizado se reconstituyó en tampón de fosfato de sodio $0,1 \text{ M}$ a una proporción típica de:

- 1 l de tampón por 16 - 24 g de sacárido para el serotipo 4 y 9 V
- 1 l de tampón por 6 - 10 g de sacárido para el serotipo 14

La mezcla de reacción se incubó a 37 ± 2 °C hasta su total disolución para el serotipo 9 V, y a 23 ± 2 °C para los serotipos 4 y 14.

- 5 Para el serotipo 18 C, el sacárido liofilizado se reconstituyó en una solución de CRM₁₉₇ en fosfato de sodio dibásico 1 M a una proporción típica de 0,11 l de fosfato de sodio por 1 l de solución de CRM₁₉₇. La mezcla de reacción (concentración de sacárido de 8 - 12 g/l) se incubó a 23 ± 2 °C hasta su total disolución.

En esta etapa se ensayó el pH como control durante el proceso.

Etapa 2: reacción de conjugación

- 10 Para los serotipos 4 y 9 V, la reacción de conjugación se inició mediante la adición de una solución de cianoborhidruro de sodio (100 mg/ml) para conseguir 1,0 - 1,4 moles cianoborhidruro de sodio por mol de sacárido. La mezcla de reacción se incubó durante 44 - 52 horas a 37 ± 2 °C. Después, la temperatura se redujo hasta 23 ± 2 °C y se añadió cloruro de sodio al 0,9 % al reactor. Se añadió una solución de borhidruro de sodio (100 mg/ml) para conseguir 1,8 - 2,2 equivalentes molares de borhidruro de sodio por mol sacárido. La mezcla se incubó durante
- 15 3 - 6 horas a 23 ± 2 °C. La mezcla se diluyó con cloruro de sodio al 0,9 % y se aclaró el reactor. La mezcla de conjugación diluida se filtró mediante el uso de un prefiltro de 1,2 µm en un recipiente de mantenimiento.

- 20 Para los serotipos 14 y 18 C, la reacción de conjugación se inició mediante la adición de la solución de cianoborhidruro (100 mg/ml) para conseguir 1,0 - 1,4 moles de cianoborhidruro de sodio por mol de sacárido. La mezcla de reacción se incubó durante 12 - 24 horas a 23 ± 2 °C. La temperatura se aumentó hasta 37 ± 2 °C y la reacción se incubó durante 72 - 96 horas. Después, la temperatura se redujo hasta 23 ± 2 °C y el reactor se añadió cloruro de sodio al 0,9 %. Se añadió una solución de borhidruro de sodio (100 mg/ml) para conseguir 1,8 - 2,2 equivalentes molares de borhidruro de sodio por mol de sacárido. La mezcla se incubó durante 3 - 6 horas a 23 ± 2 °C. La mezcla se diluyó con cloruro de sodio al 0,9 % y se aclaró el reactor. La mezcla de conjugación diluida se filtró mediante el uso de un prefiltro de 1,2 µm en un recipiente de mantenimiento.

25 *Etapa 3: ultrafiltración a 100 kDa*

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

El permeado se desechó.

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

- 30 En esta etapa se llevó a cabo un control durante el proceso (contenido en sacárido).

Etapa 4: purificación en columna de HA

Esta etapa se llevó a cabo únicamente para el serotipo 4 conjugado.

- 35 La columna de HA se neutralizó en primer lugar mediante el uso de tampón de fosfato de sodio 0,5 M (a pH 7,0 ± 0,3) y después se equilibró con cloruro de sodio al 0,9 %. El retenido filtrado (serotipo 4) se cargó en la columna a un caudal de 1,0 l/min. La columna se lavó con cloruro de sodio al 0,9 % a un caudal de < 2,0 l/min. El producto se eluyó después con tampón de fosfato de sodio 0,5 M a un caudal de < 2,0 l/min.

Después la fracción de HA se concentró y se diafiltró con una membrana de 100 kDa de MWCO con un mínimo de 20 volúmenes de cloruro de sodio al 0,9 %. El permeado se desechó.

Etapa 5: filtración estéril

- 40 El retenido después de la diafiltración de 100 kDa de MWCO se filtró a través de un filtro de 0,22 µm. Se llevaron a cabo controles durante el proceso en el producto filtrado (contenido en sacárido, en proteína libre, en sacárido libre y en cianuro). Los controles durante el proceso del retenido filtrado se llevaron a cabo para determinar si eran necesarias una concentración, una diafiltración y/o una dilución adicionales para cumplir los objetivos de FBC. Estos y otros ensayos adicionales se repitieron en las muestras de FBC.

- 45 Según fue necesario, el conjugado filtrado se diluyó con cloruro de sodio al 0,9 % con objeto de conseguir una concentración final de menos de 0,55 g/l. En esta etapa se llevaron a cabo los ensayos finales del contenido en sacárido, del contenido proteína y de la proporción de sacárido:proteína.

- 50 Finalmente, el conjugado se filtró (0,22 µm) y se introdujo en botes de acero inoxidable de 10 l en una cantidad típica de 2,64 g/bote. En esta etapa se llevaron a cabo controles durante el proceso del rendimiento, del contenido en sacárido, del contenido en proteína, del pH, de la proporción de sacárido:proteína y del contenido en lisina. En esta

etapa se llevaron a cabo los ensayos finales (aspecto, proteína libre, sacárido libre, endotoxina, determinación del tamaño molecular, cianuro residual, identidad del sacárido, identidad de la CRM₁₉₇).

Conjugación con DMSO

Etapa I: disolución

- 5 Los sacáridos activados liofilizados de los serotipos 6 B, 19 F, 23 F y la proteína portadora CRM₁₉₇ liofilizada se equilibraron a la temperatura ambiente y se reconstituyeron en DMSO. La concentración de la disolución variaba normalmente entre 2 - 3 gramos de sacárido (2 - 2,5 g proteína) por litro de DMSO.

Etapa II: reacción de conjugación

- 10 El sacárido activado y la proteína portadora CRM₁₉₇ se mezclaron durante 60 - 75 minutos a 23 ± 2 °C en un intervalo de proporciones de 0,6 g - 1,0 g de sacárido / g de CRM₁₉₇ para los serotipos 6 B y 19 F, o de entre 1,2 y 1,8 g de sacárido / g de CRM₁₉₇ para el serotipo 23 F.

- 15 La reacción de conjugación se inició mediante la adición de una solución de cianoborhidruro de sodio (100 mg/ml) a una proporción de 0,8 - 1,2 equivalentes molares de cianoborhidruro de sodio por un mol de sacárido activado. Se añadió WFI a la mezcla de reacción hasta un objetivo del 1 % (v/v) y la mezcla se incubó durante más de 40 horas a 23 ± 2 °C.

A la reacción se añadieron una solución de borhidruro de sodio, 100 mg/ml (típicos 1,8 - 2,2 equivalentes molares de borhidruro de sodio por mol sacárido activado) y WFI (objetivo del 5 % v/v) y la mezcla se incubó durante 3 - 6 horas a 23 ± 2 °C. Este procedimiento redujo cualquier aldehído sin reaccionar presente en los sacáridos. A continuación, la mezcla de reacción se transfirió a un tanque de dilución que contenía cloruro de sodio al 0,9 % a < 15 °C.

20 *Etapa III: ultrafiltración a 100 kDa*

La mezcla de conjugado diluido se filtró a través de un filtro de 1,2 µm y se concentró y se diafiltró con una membrana de 100 kDa de MWCO con un mínimo de 15 volúmenes de cloruro de sodio al 0,9 % (se usó un tampón fosfato de sodio 0,01 M / NaCl 0,05 M para el serotipo 23 F). El permeado se desechó. El retenido se filtró a través de un filtro de 0,45 µm. En esta etapa se tomó una muestra del contenido en sacárido durante el proceso.

25 *Etapa IV: purificación en columna de DEAE*

Esta etapa se llevó a cabo únicamente para el serotipo 23 F.

- 30 La columna de DEAE se equilibró con tampón de fosfato de sodio 0,01 M / cloruro de sodio 0,05 M. El retenido filtrado (serotipo 23 F) se cargó en la columna y se lavó con tampón fosfato de sodio 0,01 M / cloruro de sodio 0,05 M. Después, la columna se lavó con tampón de fosfato de sodio 0,01 M / NaCl al 0,9 %. El producto se eluyó después con un tampón de fosfato de sodio 0,01 M / cloruro de sodio 0,5 M.

Etapa V: ultrafiltración a 100 kDa

El retenido de 6 B y 19 F se concentró y se diafiltró con al menos 30 volúmenes de cloruro de sodio al 0,9 %. El permeado se desechó.

- 35 El eluido del serotipo 23 F se concentró y se diafiltró con un mínimo de 20 volúmenes de cloruro de sodio al 0,9 %. El permeado se desechó.

Etapa VI: filtración estéril

- 40 El retenido después de la diafiltración de 100 kDa de MWCO se filtró a través de un filtro de 0,22 µm. Se llevaron a cabo controles durante el proceso (contenido en sacárido, en proteína libre, en sacárido libre, en DMSO residual y en cianuro residual) sobre el producto filtrado. Se llevaron a cabo controles durante el proceso sobre el retenido filtrado para determinar si eran necesarias una concentración, una diafiltración y/o una dilución adicionales para cumplir los objetivos de FBC. Estos y otros ensayos adicionales se repitieron en las muestras de FBC.

Según fue necesario, el conjugado filtrado se diluyó con cloruro de sodio al 0,9 % para conseguir una concentración final de menos de 0,55 g/l. En esta etapa se llevaron a cabo los ensayos finales del contenido en sacárido, del contenido en proteína y de la proporción de sacárido:proteína.

- 45 Finalmente, el conjugado se filtró (0,22 µm) y se introdujo en botes de acero inoxidable de 10 l en una cantidad típica de 2,64 g/bote. En esta etapa se llevaron a cabo controles durante el proceso del rendimiento, del contenido en sacárido, del contenido en proteína, del pH, de la proporción de sacárido:proteína y del contenido en lisina. En esta etapa se llevaron a cabo los ensayos finales (aspecto, proteína libre, sacárido libre, endotoxina, determinación del tamaño molecular, cianuro residual, DMSO residual, identidad del sacárido e identidad de la CRM₁₉₇)

50

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

Los concentrados a granel finales de los 13 conjugados contienen cloruro de sodio al 0,85 %. Los concentrados a granel de los tipos 3, 6 A, 7 F y 19 A también contienen tampón de succinato de sodio 5 mM a pH 5,8. Los volúmenes requeridos de los concentrados a granel se calcularon basándose en el volumen del lote y en las concentraciones del sacárido a granel. Después de añadir un 80 % del cloruro de sodio al 0,85 % (solución salina fisiológica) y la cantidad necesaria de tampón de succinato al recipiente de la formulación premarcado, se añadieron los concentrados a granel. Después la preparación se filtró estéril a través de una membrana de 0,22 µm en un segundo contenedor mediante el uso de una unidad de filtro de membrana Millipore Durapore. El primer contenedor se lavó con el 20 % restante del cloruro de sodio al 0,85 % y la solución se hizo pasar a través del mismo filtro y se recogió en el segundo contenedor. El formulado a granel se mezcló suavemente durante y después de la adición del volumen de fosfato de aluminio a granel. Se comprobó el pH y se ajustó si fue necesario. El producto a granel formulado se almacenó a 2 - 8 °C.

El producto a granel formulado se introdujo en jeringas de borosilicato de vidrio de tipo 1 obtenidas en Becton Dickinson. A intervalos regulares se monitorizó la turbidez de la vacuna para asegurar la uniformidad en la operación de llenado. La vacuna completa (Producto Final) se almacenó a 2 - 8 °C.

Ejemplo 16**Inmunogenicidad de la vacuna conjugada undecavalente**

Hasta la fecha, los estudios preclínicos llevados a cabo con la vacuna 13vPnC se han realizado con conejos. Los estudios #HT01-0021 y #HT01-0036 fueron diseñados para examinar independientemente del efecto de la conjugación química de los polisacáridos capsulares (PSs) de *S. pneumoniae* con la CRM₁₉₇ y el efecto del coadyuvante de fosfato de aluminio (AIPO₄) sobre la respuesta inmunitaria a la vacuna 13vPnC en conejos. Estos efectos se caracterizaron mediante un ELISA específico de antígeno para las concentraciones séricas de IgG, y para la función de anticuerpo mediante un ensayo opsonofagocítico (OPA).

Estudio #HT01-0021

El estudio #HT01-0021 examinó la capacidad de la vacuna 13vPnC con coadyuvante de AIPO₄ de desencadenar respuestas inmunitarias específicas de serotipo frente a la vacuna. Los serotipos neumocócicos representados en la 13vPnC incluyen los tipos 1, 3, 4, 5, 6 A, 6 B, 7 F, 9 V, 14, 18 C, 19 A, 19 F y 23 F. Los objetivos secundarios incluían una evaluación de la cinética y de la duración de la respuesta del anticuerpo. Se inmunizaron por vía intramuscular conejos blancos de Nueva Zelanda en la semana 0 y en la semana 2 con la dosis clínica planificada para seres humanos de cada polisacárido (2 µg de cada PS, excepto 4 µg de 6 B) formulada con o sin AIPO₄ (100 µg/dosis). Se recogieron sueros en diversos puntos temporales. La IgG específica de serotipo se midió mediante un ELISA y la actividad funcional fue evaluada mediante un OPA.

La Tabla 3 muestra el título medio geométrico (GMT) conseguido en muestras séricas agrupadas, después de dos dosis de la vacuna 13vPnC. Se usó una proporción de los GMT de la IgG para comparar las respuestas desde la semana 4 hasta la semana 0. Estos datos demuestran que la inclusión de AIPO₄ en la formulación de la 13vPnC desencadenaba unos mayores niveles de anticuerpo de IgG en comparación con la misma vacuna sin coadyuvante. Aunque las respuestas del anticuerpo eran mayores que cuando se incluía el AIPO₄ en la formulación, estos aumentos no eran estadísticamente significativos.

También se evaluaron las respuestas funcionales del anticuerpo en conejos después de una inmunización con dos formulaciones de la 13vPnC (Tabla 4). Cuando se comparaban las formulaciones de vacuna con o sin coadyuvante, se observaron unos mayores GMT en el OPA en el grupo de tratamiento con la vacuna 13vPnC + AIPO₄. Los títulos del OPA fueron detectados en los sueros agrupados de la semana 4 para todos los serotipos de la vacuna en ambos grupos. Para la mayoría de los serotipos, los títulos del OPA medidos en la semana 4 eran al menos 4 veces mayores que los de la semana 0 (momento inicial).

Se evaluaron las respuestas cinéticas de cada uno de los serotipos de la vacuna 13vPnC en los sueros agrupados de ambos grupos de tratamiento. Se midieron los títulos de IgG contra cada serotipo en las muestras sanguíneas de la semana 0 y de las semanas 1, 2, 3, 4, 8, 12, 26 y 39, y después se compararon. Con la excepción del serotipo 1, las repuestas del anticuerpo en los animales que recibían la vacuna coadyuvada eran superiores a las de aquellos que recibían la vacuna no coadyuvada, y presentaban un pico en la semana 2 del programa de inmunización (datos no mostrados).

Globalmente, los datos indican que la vacuna 13vPnC formulada con fosfato de aluminio es inmunógena en conejos, desencadenando unas sustanciales respuestas de anticuerpos contra los polisacáridos capsulares neumocócicos contenidos en la vacuna, y estas respuestas están asociadas con una actividad funcional. Las respuestas observadas contra los siete serotipos del núcleo después de la inmunización con 13vPnC + AIPO₄ son coherentes con las respuestas históricas de los conejos a la formulación heptavalente.

Tabla 3. Respuestas inmunitarias de la IgG de conejo (GMT) después de la inmunización con dos dosis del glucoconjugado neumocócico tridecavalente

Serotipo	Diluyente con ALPO ₄ ^a				13vPnC ^b				13vPnC + ALPO ₄ ³			
	Semana 0		Semana 4		Semana 0		Semana 4 (IC al 95 %)		Semana 0		Semana 4 (IC al 95 %)	
	Proporción Sem 4:Sem 0	Semana 4	Proporción Sem 4:Sem 0	Semana 0	Proporción Sem 4:Sem 0	Semana 4 (IC al 95 %)	Proporción Sem 4:Sem 0	Semana 0	Proporción Sem 4:Sem 0	Semana 4 (IC al 95 %)		
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			
5	134	< 100	0,4	50	5,859 (2.450 - 14.009)	117	50	16,714 (6.959 - 40.140)	334			
6 A	141	< 100	0,4	74	22,415 (11.987 - 41.914)	303	83	63,734 (21.141 - 192.146)	768			
6 B	< 100	< 100	1,0	57	8,108 (3.564 - 18.444)	142	54	23,505 (11.286 - 48.955)	435			
7 F	3,859	579	0,2	171	43,591 (26.931 - 70.557)	444	143	84,888 (46.445 - 155.151)	496			
9 V	289	995	3,4	205	15,780 (7.193 - 34.616)	125	208	43,331 ^b (23.256 - 71.510)	217			
14	437	177	0,4	61	6,906 (3.416 - 13.962)	113	70	16,076 (9.649 - 26.785)	322			
18 C	< 100	< 100	1,0	50	21,283 (15.770 - 28.725)	426	50	35,040 (24.708 - 49.692)	701			
19 A	< 100	< 100	1,0	121	113,599 (54.518 - 236.707)	939	144	280,976 (119.587 - 660.167)	1,951			
19 F	< 100	< 100	1,0	50	14,365 (7.346 - 28.090)	287	50	24,912 (9.243 - 67.141)	498			
23 F	< 100	< 100	1,0	50	5,323 (1.894 - 14.962)	106	50	15,041 (4.711 - 48.018)	301			

a: los GMT de los sueros agrupados consistían en volúmenes iguales de suero de cada conejo individual dentro de un grupo

b: estadísticamente diferente (p = 0,022) con respecto al grupo de tratamiento sin ALPO₄

Tabla 4. GMT para el OPA de *S. pneumoniae* de sueros agrupados de conejos NZW después de la inmunización con dos dosis del glucoconjugado neumocócico tridecavalente

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

A: los agrupados consistían en volúmenes iguales de suero de conejos individuales dentro de un grupo de tratamiento (n = 12)

Estudio #HT01-0036

5 El estudio #HT01-0036 comparaba las respuestas inmunitarias de los conejos hacia los polisacáridos (PS) contenidos en la vacuna, después de la inmunización con la vacuna 13vPnC con o sin conjugación con la proteína CRM₁₉₇. Se inmunizaron por vía intramuscular conejos blancos de Nueva Zelanda en la semana 0 y en la semana 2 con una dosis de 2,2 µg de cada PS (excepto 4,4 µg de 6 B). Los animales recibieron una de las tres preparaciones de vacuna: (a) 13vPnC (PS conjugado directamente con la CRM₁₉₇), (b) 13vPnPS, (PS libre) o (c) 13vPnPS + CRM₁₉₇ (PS libre mezclado con la CRM₁₉₇). Todas las preparaciones de vacuna contenían AlPO₄ como coadyuvante a 125 µg/dosis.

Se evaluaron las respuestas inmunitarias específicas del serotipo para todas las preparaciones de vacuna en un ELISA de la IgG y un OPA mediado por complemento que mide el anticuerpo funcional. Se compararon las respuestas inmunitarias entre los grupos de tratamiento.

15 La Tabla 5 presenta los datos del GMT obtenido a partir de las muestras de sangre de la semana 4 analizadas mediante ELISA específicos de la IgG. Unos análisis adicionales muestran la proporción entre los valores del GMT en la semana 4 y en la semana 0. Los datos indican que la preparación de la vacuna conjugada desencadenó unos mayores títulos séricos de IgG que la vacuna con el PS libre o con el PS libre + CRM₁₉₇. Con la excepción de *S. pneumoniae* del tipo 14, la vacuna 13vPnC era capaz de inducir anticuerpos funcionales contra las cepas representativas de *S. pneumoniae* en un OPA (Tabla 6). Después de dos inmunizaciones, bien con la vacuna 13vPnPS o bien con la 13vPnPS + CRM₁₉₇, ninguna pudo inducir unos títulos en el OPA > 8 veces en la semana 4 con respecto a la semana 0 para 10 de los 13 serotipos medidos (Tabla 6).

25 En conclusión, estos resultados indican que la conjugación de los polisacáridos de la vacuna neumocócica tridecavalente produce unos mayores títulos séricos de IgG y una mayor actividad global de anticuerpos funcionales que la observada con el polisacárido libre, solo o mezclado con la CRM₁₉₇ no conjugado.

Tabla 5. Respuestas de la IgG de conejo (GMT) a la PnPS mediante un ELISA después de la inmunización con dos dosis del glucoconjugado neumocócico tridecaivalente

Serotipo	13vPnPS (PS libre)				13vPnPS = CRM 197 (PS mezclado con la CRM ₁₉₇)				13vPnC			
	Semana 0	Semana 4 (IC al 95 %)	Proporción Sem 4:Sem 0	Semana 0	Semana 4 (IC al 95 %)	Proporción Sem 4:Sem 0	Semana 0	Semana 4 (IC al 95 %)	Proporción Sem 4:Sem 0	Semana 0	Semana 4 (IC al 95 %)	Proporción Sem 4:Sem 0
	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	472	35.970 (29.130 - 44.417)
3	57	240 (64 - 908)	4,2	89	163 (74 - 358)	1,8	50	10.414 (10.414 - 16.676)	208,3	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	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	50	35.264 (24.467 - 50.824)	705,3
6 A	154	466 (316 - 688)	3,0	98	210 (95 - 464)	2,1	163	234.245 (167.152 - 328.283)	1.437,1	163	234.245 (167.152 - 328.283)	1.437,1
6 B	63	727 (384 - 1.375)	11,6	62	745 (384 - 1.440)	12,0	131	33.599 (22.934 - 49.222)	256,5	131	33.599 (22.934 - 49.222)	256,5
7 F	50	61 (39 - 95)	1,2	50	72 (47 - 111)	1,4	50	35.702 (24.350 - 52.347)	714,0	50	35.702 (24.350 - 52.347)	714,0
9 V	50	104 (48 - 195)	2,1	55	169 (74 - 390)	3,0	50	50.033 (34.765 - 72.007)	1.000,7	50	50.033 (34.765 - 72.007)	1.000,7
14	66	298 (117 - 757)	4,5	50	195 (71 - 535)	3,9	50	20.121 (12.087 - 32.138)	402,4	50	20.121 (12.087 - 32.138)	402,4
18 C	89	1.555 (655 - 3.688)	17,5	66	761 (300 - 1.935)	11,5	101	71.451 (32.745 - 124.641)	707,4	101	71.451 (32.745 - 124.641)	707,4
19 A	50	89 (44 - 179)	1,8	50	80 (39 - 163)	1,6	50	23.485 (12.857 - 42.723)	469,7	50	23.485 (12.857 - 42.723)	469,7
19 F	61	1.362 (559 - 3.317)	22,3	61	991 (370 - 2.654)	16,3	67	19.358 (12.553 - 33.173)	288,9	67	19.358 (12.553 - 33.173)	288,9
23 F	73	1.085 (487 - 2.420)	14,9	121	638 (311 - 1.311)	5,3	68	45.972 (25.134 - 84.089)	676,1	68	45.972 (25.134 - 84.089)	676,1

Tabla 6. Títulos del OPA de *S. pneumoniae* para los sueros de conejo agrupados después de la inmunización con dos dosis de las vacunas neumocócicas tridecavalentes

Serotipo	Títulos del OPA						
	Sin tratamiento	13vPnPS (PS libre)		13vPnPS + CRM ₁₉₇ (PS libre mezclado con la CRM ₁₉₇)		13vPnC	
	Semana 0 ^a	Semana 4	Proporción Sem 4:Sem 0	Semana 4	Proporción Sem 4:Sem 0	Semana 4	Proporción Sem 4:Sem 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
6 A	8	64	8	32	4	32	664
6 B	8	64	8	32	4	32	32
7 F	16	32	2	16	1	16	16
9 V	16	16	1	32	2	32	8
14	16	16	1	16	1	16	2
18 C	4	16	4	16	4	8	64
19 A	8	8	1	8	1	16	64
19 F	4	4	1	4	1	8	64
23 F	16	32	2	16	1	32	32

a: usados como los valores en la semana 0 para todos los grupos

Ejemplo 17

5 Procedimiento alternativo para la conjugación del sacárido neumocócico del serotipo 1 - CRM₁₉₇

Los contenedores del polisacárido purificado se descongelaron y se combinaron en un recipiente de reacción. Al recipiente se añadió tampón de bicarbonato / carbonato de sodio 30 mM, a pH 9,0 para una des-O-acetilación parcial (hidrólisis) durante 3 horas a 50 °C. Se llevó a cabo una des-O-acetilación hasta aproximadamente 40 moles por ciento. La reacción se enfrió hasta 20 °C y se llevó a cabo una neutralización con ácido acético 0,2 M hasta un pH de 5,0 - 7,0. Se llevó a cabo una oxidación parcial en presencia de peryodato de sodio mediante una incubación a 2 - 8 °C, y la mezcla se agitó durante 15 - 21 horas.

La mezcla de reacción se purificó mediante una diafiltración frente a 10x volúmenes de solución salina al 0,9 % mediante el uso de una membrana de celulosa regenerada de 30 K de MWCO. El polisacárido activado purificado se combinó con la CRM₁₉₇ en una proporción de polisacárido / proteína de 2:1, se congeló Shell a -75 °C y se coliofilizó. Después de la coliofilización, la mezcla de polisacárido / CRM₁₉₇ se almacenó a -25 ± 5 °C hasta su conjugación. A la mezcla de polisacárido / CRM₁₉₇ coliofilizada se añadió tampón de fosfato de sodio 1 M a una fuerza iónica final de 0,2 M y a un pH de 7,5, después se añadió cianoborhidruro de sodio. La reacción se incubó a 23 °C durante 15 - 21 horas, seguido de una segunda incubación a 37 °C durante 66 - 78 horas. Después de las incubaciones con cianoborhidruro, la mezcla de reacción se diluyó con solución salina fría, seguido de la adición de carbonato de sodio 1 M para ajustar la mezcla de reacción a pH 9,0. Los aldehídos sin reaccionar se inactivaron mediante la adición de borhidruro de sodio mediante una incubación a 23 °C durante 3 - 6 horas.

La mezcla de reacción se diluyó 2 veces con solución salina y se transfirió a través de un prefiltro de 0,45 - 5 µm a un recipiente de retenido, después se diafiltró 30x con tampón de fosfato 0,15 M, a pH 6,0 y 20x con solución salina. El retenido se filtró a través de un filtro de 0,2 µm. La solución conjugada se diluyó hasta un objetivo de 0,5 mg/ml en solución salina al 0,9 % y después se filtró estéril en unos contenedores de concentrado a granel final en una campana de clase 100. El conjugado se almacenó a 2 - 8 °C.

Para la caracterización del conjugado, véase el Ejemplo 2.

Debería entenderse que el análisis y los ejemplos anteriores presentan una mera descripción detallada de ciertas formas de realización. Debería ser evidente por lo tanto para los expertos habituales en la materia que pueden realizarse diversas modificaciones y equivalentes sin desviarse del espíritu y el ámbito de la invención.

Todos los artículos de revistas, otras referencias, patentes y solicitudes de patentes que están identificados en esta solicitud de patente se incorporan como referencia en su totalidad.

Referencias

1. Mausdriff WP, Bryant J, Paradise PR, Siber GP. Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease; implications for conjugated vaccine formulation and use, parte I. Clin Infect Dis 2000; 30: 100 - 21.

2. Mausdorff WP, Bryant J, Kloek C, Paradiso PR, Siber GR. The contribution of specific pneumococcal serogroups to different disease manifestations: implications for conjugated vaccine formulation and use, part I. *Clin Infect Dis* 2000; 30: 122 - 40.
- 5 3. Whitney CG, Farley MM, Madler 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 M, Mansen J, et al. Postlicensure evaluation of the effectiveness of seven valent pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J* 2001; 20: 1105 - 7.
- 10 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 M, 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, Madler J, et al. Increasing prevalence of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States. *N Engl J Med* 2000; 343: 1917 - 24.
- 15 8. Mofmann 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, Maudsdorff 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.
- 20 10. Black S, Shinefield M, 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.
- 25 12. Sniadack DM, Schwartz B, Lipman M, 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, Manna 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.
- 30 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. Maudsdorff W, Siber G, Paradiso P. Geographical differences in invasive pneumococcal disease rates and serotype frequency in young children. *Lancet* 2001; 357: 950 - 52.
- 35 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.
- 40 18. Tan T, Mason B, Wald B, et al. Clinical characteristics with complicated pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Pediatrics* 2002; 110: 1 - 6.
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.
- 45 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, Magyarlaci M. Identification of cross-reactive antibodies with low opsonophagocytic activity for *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 1997; 176: 698 - 703.

23. Yu X, Gray B, Chang S, Ward JI, Bdwads 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, Bklund C, Bskola 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.
25. Bkstrom 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, 19-23 de noviembre de 2003.
26. Penn RL, Lewin BB, 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.
27. Giebink GS, Meier JD, Quartey MK, Liebler 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 B, 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.
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 RB, Kohberger R, Mbelle N, Pierce N. A trial of a 9-valent pneumococcal conjugate vaccine in children with and those without HIV infection. *N Bngl J Med* 2003; 349: 1341 - 8.
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. Bskola J, Kilpi T, Palmu A, et al. Efficacy of a pneumococcal conjugate vaccine against acute otitis media. *N Bngl J Med* 2001; 344: 403 - 9.
33. Pilishvili T, Farley M, Vazquez M, Reingold A, Nyquist A, et al. Effectiveness of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. Resumen G-1079, ICAAC, Chicago, IL, 2003.
34. Patente de los Estados Unidos nº 4.673.574.
- 30 35. Patente de los Estados Unidos nº 4.902.506.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la elaboración de un conjugado inmunógeno que comprende un polisacárido de *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 1 unido covalentemente a una proteína portadora, procedimiento que comprende:
 - 5 (a) hacer reaccionar un polisacárido del serotipo 1 purificado con un tampón de pH alcalino, dando como resultado un polisacárido del serotipo 1 parcialmente des-O-acetilado;
 - (b) hacer reaccionar el polisacárido del serotipo 1 parcialmente des-O-acetilado con un ácido débil o con un ácido mineral de baja fuerza iónica, dando como resultado un polisacárido del serotipo 1 parcialmente des-O-acetilado neutralizado;
 - 10 (c) hacer reaccionar el polisacárido del serotipo 1 parcialmente des-O-acetilado neutralizado con un agente oxidante, dando como resultado un polisacárido del serotipo 1 activado;
 - (d) combinar el polisacárido del serotipo 1 activado con una proteína portadora;
 - (e) coliofilizar el combinado de polisacárido del serotipo 1 activado y la proteína portadora;
 - 15 (f) hacer reaccionar combinado de polisacárido del serotipo 1 activado y la proteína portadora con un agente reductor, dando como resultado un conjugado de polisacárido del serotipo 1:proteína portadora; y
 - (g) proteger los aldehídos sin reaccionar del conjugado de polisacárido del serotipo 1:proteína portadora, dando como resultado un conjugado inmunógeno que comprende el polisacárido del serotipo 1 de *Streptococcus pneumoniae* unido covalentemente a una proteína portadora.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente la purificación del polisacárido del serotipo 1 activado antes de su combinación con la proteína portadora.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente la purificación del conjugado inmunógeno.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el tampón de pH alcalino es un tampón de bicarbonato/carbonato.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el ácido débil es ácido acético.
- 25 6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el ácido mineral de baja fuerza iónica es ácido clorhídrico.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el agente oxidante es peryodato de sodio.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la proteína portadora es la CRM₁₉₇.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el agente reductor es cianoborohidruro de sodio.
- 30 10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la protección de los aldehídos sin reaccionar comprende hacer reaccionar el conjugado de polisacárido de serotipo 1:proteína portadora con borohidruro de sodio.
11. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, procedimiento que comprende:
 - 35 (a) hacer reaccionar el polisacárido del serotipo 1 purificado con un tampón de bicarbonato/carbonato, dando como resultado un polisacárido del serotipo 1 parcialmente des-O-acetilado;
 - (b) hacer reaccionar el polisacárido del serotipo 1 parcialmente des-O-acetilado con acético ácido, dando como resultado un polisacárido del serotipo 1 parcialmente des-O-acetilado neutralizado;
 - 40 (c) hacer reaccionar el polisacárido del serotipo 1 parcialmente des-O-acetilado neutralizado con peryodato de sodio, dando como resultado un polisacárido del serotipo 1 activado;
 - (d) purificar el polisacárido del serotipo 1 activado;
 - (e) combinar el polisacárido del serotipo 1 activado con una proteína portadora;
 - (f) coliofilizar el combinado de polisacárido del serotipo 1 activado y la proteína portadora;
 - 45 (g) hacer reaccionar el coliofilizado de polisacárido del serotipo 1 activado y la proteína portadora con cianoborohidruro de sodio, dando como resultado un conjugado de polisacárido del serotipo 1:proteína portadora;
 - y
 - (h) proteger los aldehídos sin reaccionar del conjugado de polisacárido del serotipo 1:proteína portadora con borohidruro de sodio, dando como resultado un conjugado inmunógeno que comprende el polisacárido del serotipo 1 de *Streptococcus pneumoniae* unido covalentemente a una proteína portadora.
- 50 12. El procedimiento de la reivindicación 11, que comprende adicionalmente la purificación del conjugado inmunógeno.
13. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que la proteína portadora es la CRM₁₉₇.

- 5 14. Un procedimiento para la preparación de una composición inmunógena multivalente que comprende 13 conjugados de polisacárido-proteína distintos junto con un vehículo fisiológicamente aceptable, en el que cada uno de los conjugados contiene un polisacárido capsular diferente conjugado con una proteína portadora y en el 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*, en el que dicho conjugado de polisacárido de serotipo 1-proteína se elabora de acuerdo con uno cualquiera de los procedimientos de las reivindicaciones 1 a 13 y en el que después de la purificación de los glucoconjugados individuales, se combinan para formular la composición inmunógena.
15. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14, en el que como proteína portadora se usa la CRM₁₉₇.
- 10 16. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 15, en el que dicha composición inmunógena multivalente comprende adicionalmente un coadyuvante.
17. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 16, en el que el coadyuvante es un coadyuvante basado en aluminio.
18. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17, en el que el coadyuvante es seleccionado de entre el grupo que consiste en fosfato de aluminio, sulfato de aluminio e hidróxido de aluminio.

15

Cambios en las tasas de IPD por serotipo en niños de los Estados Unidos < 2 años de edad desde el momento inicial (1998/1999) hasta 2001 (vigilancia ABCs)

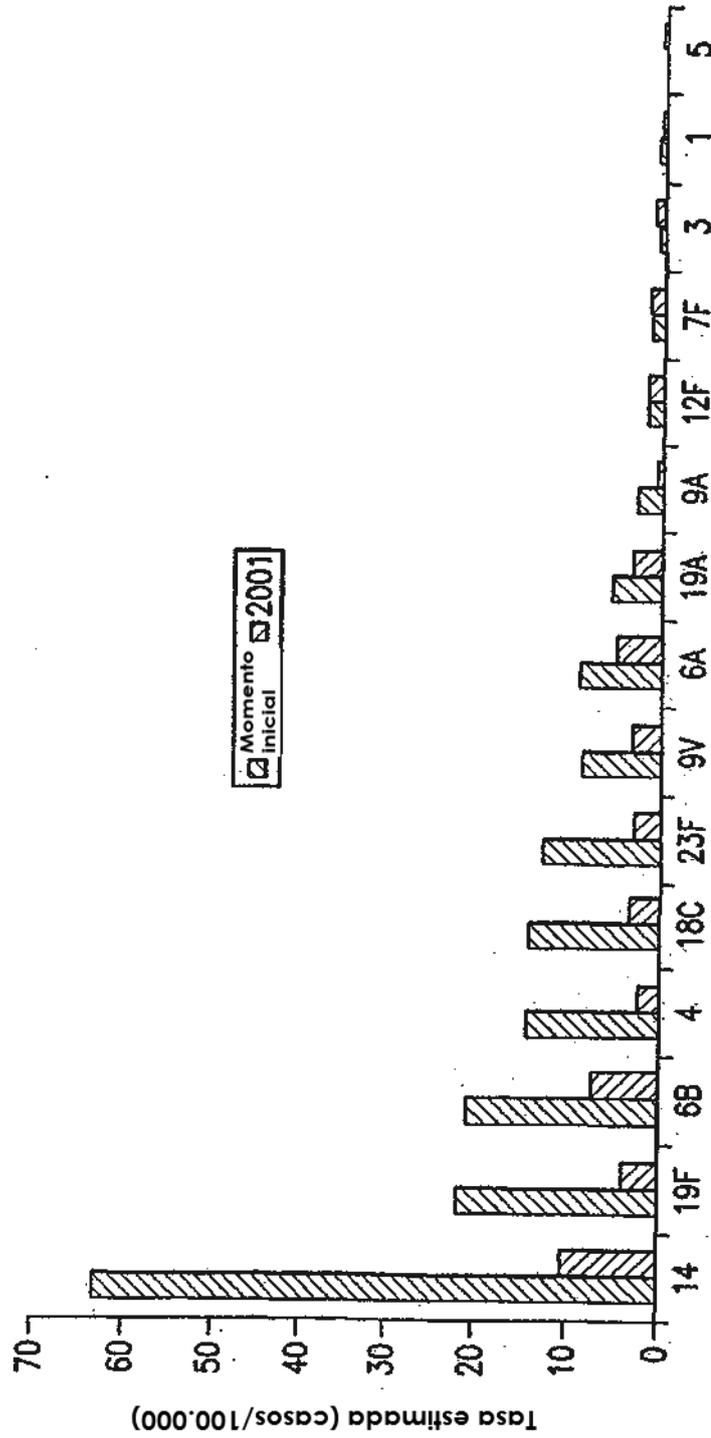


FIG.1

Distribución de las cepas clínicas neumocócicas con resistencia a la penicilina en niños < 5 años (1998)

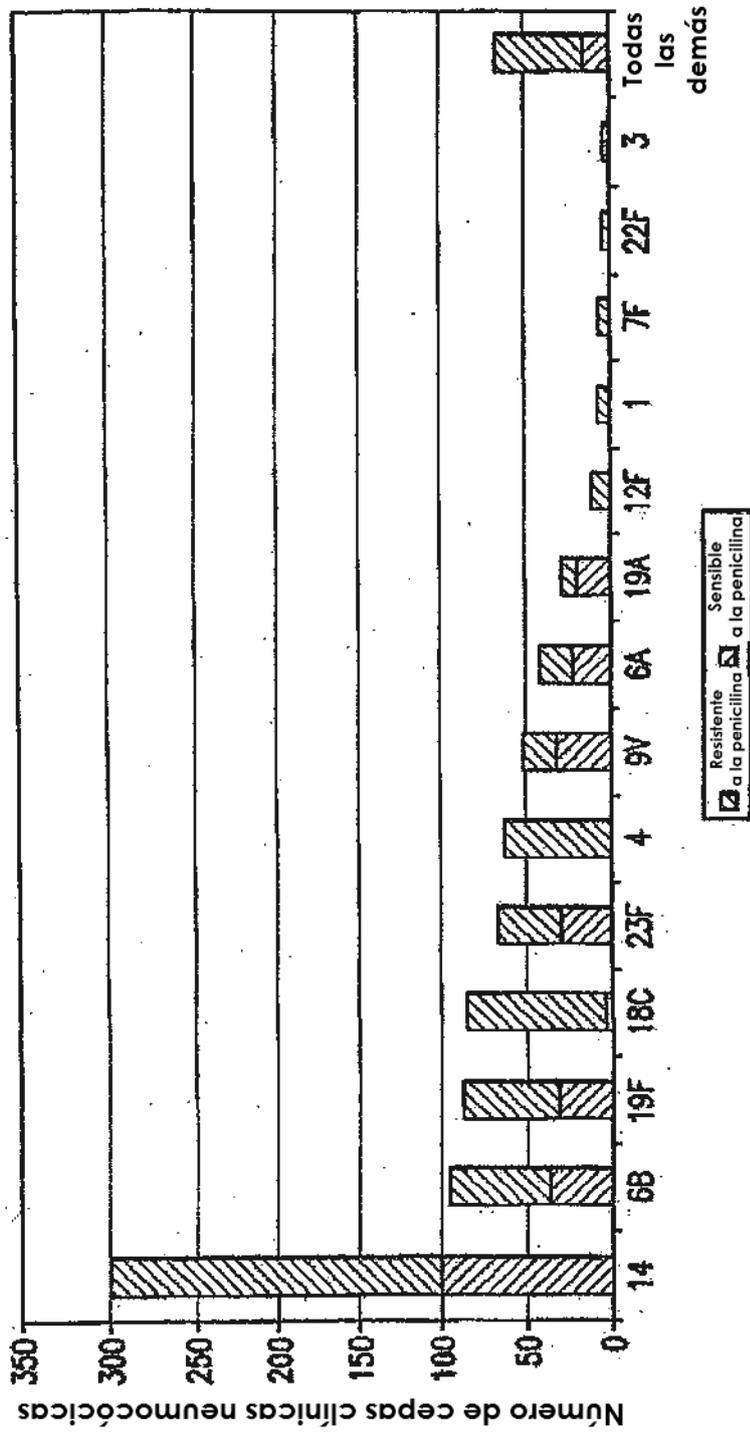


FIG.2

Resultados de las RCDC del OPA posterior a la tercera dosis del ensayo de cohortes D118-P16 de Prev(e)nar que reciben un lote a escala de elaboración de Prev(e)nar® (n = 98)

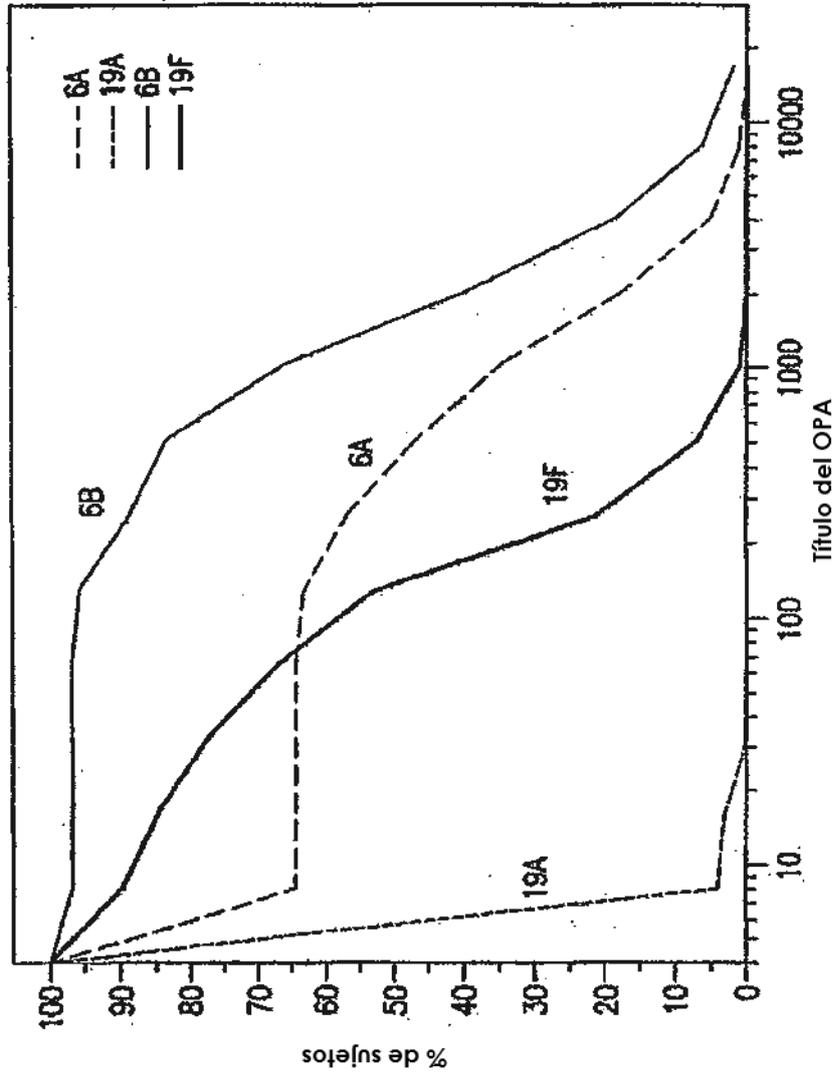


FIG.3