

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 720**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 31/70 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.06.2013 PCT/KR2013/005392**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2013 WO2013191459**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.06.2013 E 13806263 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2016 EP 2865392**

54 Título: **Composición de conjugado polivalente de polisacárido de neumococos-proteína**

30 Prioridad:

20.06.2012 KR 20120065893

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

25.05.2017

73 Titular/es:

**SK CHEMICALS CO., LTD. (100.0%)
Sampyeong-dong, 310 Pangyo-ro Bundang-gu
Seongnam-si, Gyeonggi-do 463-400, KR**

72 Inventor/es:

**SHIN, JIN-HWAN;
YANG, JI-HYE;
HAM, DONG-SOO;
PARK, MAHN-HOON;
KIM, HUN;
NOH, MYEONG-JU;
PARK, SU-JIN y
YANG, SEON-YOUNG**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 613 720 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 conjugado polivalente de polisacárido de neumococos-proteína

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a una composición inmunogénica multivalente que comprende: 15 conjugados distintos de polisacárido-proteína preparados conjugando polisacárido capsular derivado de *Streptococcus pneumoniae* serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9N, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F a una proteína vehículo tal como CRM₁₉₇. La presente invención se refiere, en líneas generales, al campo de la medicina y, especialmente, a la microbiología, inmunología, vacunas y la prevención de enfermedades por neumococos en lactantes, niños y adultos por inmunización.

15 Técnica anterior

Streptococcus pneumoniae es una causa principal de neumonía. De acuerdo con 2010 Mortality Trend by Cause publicado por The National Statistical Office, la neumonía fue una de las 10 causas principales de muerte, con 14,9 muertes por cada 100.000 personas, que es un aumento del 82,9% desde 2000. La Organización Mundial de la Salud (OMS) también estimó en 2012 que, globalmente, 476.000 niños VIH negativos menores de 5 años de edad murieron de infección por *Streptococcus pneumoniae*, que supone el 5% de la mortalidad infantil general para niños por debajo de cinco años.

En 1977, el Dr. Robert Austrian desarrolló una vacuna 14-valente de polisacárido de neumococos para prevenir la enfermedad por neumococos y después la vacuna evolucionó a una vacuna 23-valente de polisacárido. Las vacunas multivalentes de polisacárido de neumococos han demostrado ser valiosas en la prevención de enfermedad por neumococos en adultos ancianos y pacientes de alto riesgo. Sin embargo, los lactantes y niños pequeños responden peor a la mayoría de polisacáridos de neumococos debido a una respuesta inmunitaria independiente de células T. La vacuna 7-valente de conjugado de neumococos (7vPnC, Prevnar®) contiene los polisacáridos capsulares de los siete serotipos más prevalentes 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F. Desde que se aprobó en Estados Unidos en 2000, Prevnar ha demostrado ser muy inmunogénica y eficaz contra enfermedad invasiva y otitis media en lactantes y niños pequeños. Esta vacuna está ahora aprobada en aproximadamente 80 países en todo el mundo. Prevnar cubre aproximadamente el 80-90%, 60-80% y 40-80% de las enfermedades invasivas por neumococos (IPD) en Estados Unidos, Europa y otras regiones del mundo, respectivamente. Como se esperaba, los datos de control recogidos en los años posteriores a la introducción de Prevnar han demostrado claramente una reducción de las enfermedades invasivas por neumococos causadas por los serotipos cubiertos por Prevnar en Estados Unidos. Sin embargo, la cobertura de los serotipos estaba limitada en algunas regiones y las enfermedades invasivas por neumococos causadas por los serotipos que no están cubiertos por Prevnar, en particular 19A, han aumentado.

El Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) presentó en febrero de 2010 su recomendación de una vacuna 13-valente de conjugado de neumococos (PCV-13) recién aprobada para la vacunación. PCV-13 es una vacuna de conjugado de neumococos que comprende seis serotipos adicionales (1, 3, 5, 6A, 7F, 19A) además de los siete serotipos (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F) comprendidos en Prevnar. De acuerdo con la US Active Bacterial Core surveillance (ABCs), un total del 64% en los casos de IPD conocidos como los serotipos patogénicos entre niños menores de 5 años de edad está cubierto por PCV-13. En 2007, solamente 70 casos entre 4600 IPD en niños menores de 5 años de edad estaban cubiertos por PCV7, mientras que 2900 casos estaban cubiertos por PCV-13, que representa la mayoría. Ahora, están en desarrollo una vacuna 15-valente de conjugado de neumococos que cubre serotipos adicionales cuya incidencia aumenta con el remplazo de serotipos.

50 Descripción detallada de la invención

Por consiguiente, la presente invención proporciona una composición inmunogénica multivalente para la prevención de enfermedades por neumococos en lactantes, niños y adultos, que comprende polisacáridos capsulares derivados de 15 serotipos de neumococos, incluyendo los serotipos 2 y 9N. Específicamente, la presente invención proporciona una composición 15-valente de conjugado de neumococos (PCV-15) que comprende los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9N, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F.

Solución técnica

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona una composición inmunogénica multivalente, que comprende 15 conjuntados distintivos de polisacárido-proteína junto con un vehículo fisiológicamente aceptable, donde cada uno de los conjugados comprende un polisacárido capsular derivado de un serotipo diferente de *Streptococcus pneumoniae* conjugado a una proteína vehículo, y los polisacáridos capsulares se preparan a partir de los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9N, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F.

En la composición inmunogénica multivalente de acuerdo con la presente invención, la proteína vehículo puede ser CRM₁₉₇. La composición inmunogénica multivalente de acuerdo con la presente invención puede comprender

adicionalmente un adyuvante, por ejemplo, el adyuvante que comprende un adyuvante basado en aluminio. El adyuvante puede seleccionarse del grupo que consiste en fosfato de aluminio, sulfato de aluminio e hidróxido de aluminio y, preferiblemente, fosfato de aluminio.

- 5 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición farmacéutica para inducir una respuesta inmunitaria contra un conjugado de polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae*, que comprende una cantidad inmunológicamente eficaz de dicha composición inmunogénica.

10 En una realización, la composición farmacéutica puede ser una composición inmunogénica formulada para que contenga: 2 µg de cada sacárido, excepto por 6B a 4 µg; aproximadamente 34 µg de proteína vehículo CRM₁₉₇; 0,125 mg de adyuvante de aluminio elemental (0,5 mg de fosfato de aluminio); y tampón cloruro sódico y succinato sódico como excipientes.

Efecto técnico

15 La composición inmunogénica multivalente comprende polisacáridos capsulares derivados de 15 serotipos distintivos de neumococos, incluyendo los serotipos 2 y 9N, conduciendo de ese modo a un título elevado de IgG en suero y actividad de anticuerpos funcionales. Por lo tanto, la composición inmunogénica multivalente puede usarse ventajosamente para la prevención de enfermedades por neumococos en lactantes, niños y adultos.

20 Descripción de los dibujos

Las FIG. 1 a 15 muestran el nivel de IgG específica de serotipo medido 3 semanas después de la inyección secundaria (es decir, un total de 6 semanas) de la composición de vacuna de la presente invención y el ejemplo comparativo (Prevnam 7 y Prevnam 13).

Modo de la invención

30 El remplazo de serotipos se ha hecho por algunos serotipos con resistencia a antibióticos y resistencia a múltiples fármacos. La diferencia regional en la distribución de serotipos ha conducido a una diferencia en la cobertura de Prevnam por región (Harboe ZB, Benfield TL, Valentiner-Branth P, et al. Temporal Trends in Invasive Pneumococcal Disease and Pneumococcal Serotypes over 7 Decades. Clin Infect Dis 2010; 50:329-37). Por tanto, no hay razones para retirar ninguno de los serotipos en las vacunas existentes de conjugado de neumococos. En su lugar, existe la necesidad de expandir adicionalmente la cobertura mediante la adición de serotipos.

35 En 2008, el Pneumococcal Global Serotype Project (GSP) presentó un informe basado en los datos de IPD seleccionados desde 1980 hasta 2007, que muestran que, después del serotipo 18C, el serotipo 2 era el 11º serotipo de mayor incidencia entre los 20 serotipos globales principales. Además, Samir K. Saha et al. Informaron de que el serotipo 2 puede llegar a ser una amenaza porque el serotipo 2 tiene una alta probabilidad de causar meningitis neumocócica en Bangladesh, pero no está incluido en ninguna vacuna de conjugado de neumococos (Saha SK, Al Emran HM, Hossain B, Darmstadt GL, Saha S, et al. (2012) Streptococcus pneumoniae Serotype-2 Childhood Meningitis in Bangladesh: A Newly Recognized Pneumococcal Infection Threat. PLoS ONE 2012; 7(3): e32134). Por tanto, si se incluye el serotipo 2, puede reducirse la cantidad de enfermedades por neumococos y puede prepararse adicionalmente para el remplazo de serotipos, que puede suceder con la vacunación por PCV-13.

45 Los serotipos de neumococos muestran diferentes patrones de distribución por edad. En particular, se ha descubierto que el serotipo 9N es relativamente importante en lactantes con edades de 0 a 23 meses, en comparación con niños con edades de 24 a 59 meses. El serotipo 9N era el 14º más común después de los 13 serotipos incluidos en PCV-13. Esto indica que la inclusión del serotipo 9N contribuirá a reducción en las enfermedades por neumococos, en particular entre lactantes.

50 La presente invención proporciona una composición inmunogénica multivalente que comprende polisacáridos capsulares derivados de 15 serotipos de neumococos, incluyendo los serotipos 2 y 9N. Específicamente, la presente invención proporciona una composición inmunogénica multivalente, que comprende: 15 conjugados distintos de polisacárido-proteína, junto con un vehículo fisiológicamente aceptable, donde cada uno de los conjugados comprende un polisacárido capsular de un serotipo diferente de *Streptococcus pneumoniae* conjugado a una proteína vehículo, y los polisacáridos capsulares se preparan a partir de los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9N, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F.

60 Los polisacáridos capsulares pueden prepararse por técnicas convencionales conocidas para los expertos en la materia. Los polisacáridos capsulares pueden reducirse en tamaño para disminuir la viscosidad o aumentar la solubilidad de los polisacáridos capsulares activados. En la presente invención, los polisacáridos capsulares se preparan a partir de los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9N, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F de *Streptococcus pneumoniae*. Estos conjugados de neumococos se preparan por procesos diferentes y se formulan en una única formulación de dosificación. Por ejemplo, cada serotipo de polisacárido neumocócico se cultiva en un medio basado en soja y después se purifica a través de centrifugación, precipitación y ultrafiltración.

Las proteínas vehículo son preferiblemente proteínas que son no tóxicas y no reactogénicas y que se pueden obtener en suficiente cantidad y pureza. Las proteínas vehículo deben ser susceptibles a procedimientos convencionales de conjugación. En la composición inmunogénica multivalente de la presente invención, la proteína vehículo puede ser CRM₁₉₇. CRM₁₉₇ es una variante no tóxica (es decir, toxoide) de toxina diftérica aislada de cultivos de *Corynebacterium diphtheria* cepa C7 (β 197) cultivada en medio basado en casaminoácidos y extracto de levadura. CRM₁₉₇ se purifica a través de ultrafiltración, precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de intercambio iónico. Como alternativa, CRM₁₉₇ se prepara de forma recombinante de acuerdo con la patente de Estados Unidos n.º 5.614.382.

Otros toxoides diftéricos también son adecuados para su uso como proteínas vehículo. Otras proteínas vehículo adecuadas incluyen toxinas bacterianas inactivadas tales como toxoide tetánico, toxoide pertussis; toxoide colérico (documento WO2004/083251), LT de *E. coli*, ST de *E. coli* y exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*. También pueden usarse proteínas de membrana externa bacteriana tales como complejo C de membrana externa (OMPC), porinas, proteínas de unión a transferrina, neumolisina, proteína A de superficie de neumococos (PspA), proteína adhesina de neumococos (PsaA), peptidasa C5a de estreptococos del grupo A o grupo B o proteína D de *Haemophilus influenzae*. También pueden usarse otras proteínas, tales como ovalbúmina, hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina sérica bovina (BSA) o derivado proteico purificado de tuberculina (PPD) como proteínas vehículo. Pueden usarse variantes de toxina diftérica tales como CRM₁₇₃, CRM₂₂₈ y CRM₄₅ como proteína vehículo.

Para preparar polisacáridos para su reacción con una proteína vehículo, se activan químicamente polisacáridos purificados. Una vez activados, cada polisacárido capsular se conjuga por separado a una proteína vehículo para formar un glucoconjugado. En una realización, cada polisacárido capsular se conjuga a la misma proteína vehículo. La activación química de los polisacáridos y la posterior conjugación a la proteína vehículo se consiguen por medios convencionales (por ejemplo, patentes de Estados Unidos n.º 4.673.574 y 4.902.506). Los grupos hidroxilo en los polisacáridos se oxidan en grupos aldehído por agentes oxidantes tales como peryodatos (incluyendo peryodato sódico, peryodato potásico, peryodato cálcico o ácido peryódico). La activación química conduce a una degradación oxidativa irregular de los grupos hidroxilo adyacentes. La conjugación se consigue por aminación reductora. Por ejemplo, los polisacáridos capsulares activados y la proteína vehículo se hacen reaccionar con un agente reductor tal como cianoborohidruro sódico. Los grupos aldehído sin reaccionar pueden retirarse por la adición de un agente oxidante fuerte.

Después de la conjugación del polisacárido capsular a la proteína vehículo, se purifican los conjugados de polisacárido-proteína (enriquecidos con respecto a la cantidad de conjugado de polisacárido-proteína) por una diversidad de técnicas. Estas técnicas incluyen concentración/diafiltración, cromatografía en columna y filtración profunda. Los conjugados purificados de polisacárido-proteína se componen para formular la composición inmunogénica de la presente invención, que puede usarse como vacuna. La formulación de la composición inmunogénica de la presente invención puede realizarse usando métodos reconocidos en la técnica. Por ejemplo, los 15 conjugados de neumococos individuales pueden formularse con un vehículo fisiológicamente aceptable para preparar la composición. Ejemplos de dichos vehículos incluyen, aunque sin limitación, agua, solución salina tamponada, polioles (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido) y soluciones de dextrosa.

En una realización, la composición inmunogénica de la presente invención puede comprender uno o más adyuvantes. Como se define en este documento, un "adyuvante" es una sustancia que sirve para potenciar la inmunogenicidad de una composición inmunogénica de esta invención. Por tanto, a menudo se dan adyuvantes para reforzar la respuesta inmunitaria y son bien conocidos para los expertos en la materia. Los adyuvantes adecuados para potenciar la eficacia de la composición incluyen, aunque sin limitación:

- (1) sales de aluminio (alumbre), tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio, etc.;
- (2) formulaciones de emulsión de aceite en agua (con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos tales como muramyl péptidos (definidos a continuación) o componentes de la pared celular bacteriana) tales como, por ejemplo, (a) MF59 (documento WO 90/14837), que contiene escualeno al 5%, Tween 80 al 0,5% y Span 85 al 0,5% (que contiene opcionalmente diversas cantidades de MTP-PE (véase a continuación), aunque no es necesario) formulado en partículas submicrométricas usando un microfluidizer tal como microfluidizer modelo 110Y (Microfluidics, Newton, MA), (b) SAF, que contiene escualeno al 10%, Tween 80 al 0,4%, polímero L121 bloqueado con pluronic al 5% y thr-MDP (véase a continuación) microfluidizado en una emulsión submicrométrica o agitado con vórtice para generar una emulsión de un tamaño de partícula más grande, y (c) sistema adyuvante RibiTM (RAS), (Corixa, Hamilton, MT) que contiene escualeno al 2%, Tween 80 al 0,2% y uno o más componentes de pared celular bacteriana del grupo que consiste en monofosforil lípido A 3-O-desacilado (MPLTM) descrito en la patente de Estados Unidos n.º 4.912.094 (Corixa), dimicolato de trehalosa (TDM) y esqueleto de pared celular (CWS), preferiblemente MPL + CWS (DetoxTM);
- (3) adyuvantes de saponina, tales como Quil A o STIMULONTM QS-21 (Antigenics, Framingham, MA) (patente de Estados Unidos n.º 5.057.540) o partículas generadas a partir de los mismos tales como ISCOM (complejos inmunoestimulantes);
- (4) lipopolisacáridos bacterianos, análogos sintéticos de 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 Estados Unidos n.º 6.113.918; uno de dichos AGP es 2-desoxi-4-0-fosfono-3-0-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoilamino]-b-D-glucopiranosido de 2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoilamino]etilo, que también se conoce como 529 (antiguamente conocido como RC529), que se formula como una forma acuosa o como una emulsión estable,

(5) polinucleótidos sintéticos tales como oligonucleótidos que contienen uno o más motivos CpG (patente de Estados Unidos n.º 6.207.646);

(6) citoquinas, tales como interleuquinas (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), factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF), moléculas coestimuladoras B7-1 y B7-2, etc.;

(7) mutantes destoxificados de una toxina ADP-ribosilante bacteriana tal como toxina colérica (CT) en una forma de tipo silvestre o mutante, por ejemplo, donde el ácido glutámico en la posición del aminoácido 29 está remplazado por otro aminoácido, preferiblemente una histidina, de acuerdo con el documento WO 00/18434 (véase también el documento WO 02/098368 y el documento WO 02/098369), una toxina pertussis (PT) o una toxina termoinestable de (LT) *E. coli*, particularmente LT-K63, LT-R72, CT-S109, PT-K9/G129 (véase, por ejemplo, el documento WO 93/13302 y el documento WO 92/19265); y

(8) componentes del complemento tal como el trómero del componente C3d del complemento.

Los muramil péptidos incluyen, aunque sin limitación, N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicerol-3-hidroxi-fosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), etc.

En una realización específica, se usa una sal de aluminio como adyuvante. El adyuvante de sal de aluminio puede ser una vacuna precipitada con alumbre o vacuna adsorbida en alumbre. Las sales de aluminio incluyen, aunque sin limitación, alúmina hidratada, alúmina trihidrato (ATH), aluminio hidrato, aluminio trihidrato, Alhydrogel, Superfos, Amphojel, hidróxido de aluminio (III), hidroxifosfato sulfato de aluminio (adyuvante de fosfato de aluminio (APA)), y alúmina amorfa. APA es una suspensión de hidroxifosfato de aluminio. Si se mezclan cloruro de aluminio y fosfato sódico en una relación de 1:1, se precipita hidroxifosfato sulfato de aluminio. Los precipitados se modifican en tamaño hasta 2-8 µm usando una mezcladora de alto corte y se dializan con solución salina fisiológica, seguido de esterilización. En una realización, se usa Al(OH)₃ disponible en el mercado (por ejemplo, Alhydrogel o Superfos) para adsorber proteínas. Pueden adsorberse 50-200 g de proteína por 1 mg de hidróxido de aluminio, y esta relación es dependiente del punto isoeléctrico (pI) de las proteínas y el pH de los disolventes. Las proteínas de bajo pI se adsorben fuertemente en comparación con proteínas de alto pI. Las sales de aluminio forman un depósito de antígeno que libera lentamente antígenos durante 2 a 3 semanas, activando de forma no específica los fagocitos, los complementos y el mecanismo inmunitario congénito.

La presente invención proporciona una composición farmacéutica (por ejemplo, una formulación de vacuna) para inducir una respuesta inmunitaria contra un conjugado de polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae*, que comprende una cantidad inmunológicamente eficaz de la composición inmunogénica.

Las formulaciones de vacuna de la presente invención pueden usarse para proteger o tratar a un ser humano susceptible a infección por neumococos, administrando la vacuna mediante una vía sistémica o a la mucosa. Como se define en este documento, la expresión "dosis eficaz" se refiere a la cantidad necesaria para inducir anticuerpos hasta un nivel suficiente para reducir significativamente la probabilidad de infección por *Streptococcus pneumoniae* o la gravedad de la misma. Estas administraciones pueden incluir inyección mediante las vías intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea; o mediante administración a la mucosa a los tractos oral/alimentario, respiratorio o genitourinario.

En una realización, se usa administración intranasal para el tratamiento de neumonía u otitis media ya que el transporte nasofaríngeo de neumococos puede prevenirse de forma más eficaz, atenuando, por tanto, la infección en su fase más prematura. La cantidad de conjugado en cada dosis de vacuna se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin efectos adversos significativos. Dicha cantidad puede variar dependiendo del serotipo de neumococos. Generalmente, cada dosis comprenderá de 0,1 a 100 µg de polisacárido, particularmente de 0,1 a 10 µg, y más particularmente de 1 a 5 µg. Las cantidades óptimas de componentes para una vacuna particular pueden averiguarse por estudios convencionales que implican la observación de respuestas inmunitarias apropiadas en los sujetos. Por ejemplo, la cantidad para la vacunación de un sujeto humano puede determinarse extrapolando el resultado de ensayo en animales. Además, la dosificación puede determinarse de forma empírica.

En una realización particular de la presente invención, la composición de vacuna es una formulación líquida estéril de polisacáridos capsulares de neumococos de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F individualmente conjugados a CRM197. Cada dosis de 0,5 ml se formula para que contenga: 2 µg de cada sacárido, excepto para 6B a 4 µg; aproximadamente 34 µg de proteína vehículo CRM197; 0,125 mg de adyuvante de aluminio elemental (0,5 mg de fosfato de aluminio); y tampón cloruro sódico y succinato sódico como excipientes. El líquido se carga en jeringas de dosis individuales son un conservante. Después de agitar, la vacuna es una suspensión blanca, homogénea lista para administración intramuscular.

En una realización adicional, la composición de la presente invención puede administrarse en una única inyección. Por ejemplo, la composición de vacuna de la presente invención puede administrarse 2, 3, 4 o más veces a intervalos espaciados apropiadamente, tal como con un intervalo de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses o combinación de los mismos. El calendario de inmunización puede seguir el diseñado para la vacuna Prevnar. Por ejemplo, el calendario rutinario para lactantes y párvulos contra enfermedad invasiva causada por *S. pneumoniae* debido a los serotipos incluidos en la vacuna Prevnar es a los 2, 4, 6 y 12-15 meses de edad. Por tanto, en este aspecto, la composición se administra 4 veces, es decir, a los 2, 4, 6 y 12-15 meses de edad.

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

La composición de la presente invención puede administrarse a un sujeto mediante una o más vías de administración conocidas para los expertos en la materia, tal como vía parenteral, transdérmica o transmucosa, intranasal, intramuscular, intraperitoneal, intracutánea, intravenosa o subcutánea y puede formularse en consecuencia. En una realización, la composición de la presente invención puede administrarse como una formulación líquida por inyección intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, intravenosa, intraarterial o transdérmica o inyección a la mucosa respiratoria. La formulación líquida para inyección incluye una solución o similar.

La composición de la presente invención puede formularse en una forma de vial monodosis, vial de múltiples dosis o jeringa precargada. Un vehículo farmacéuticamente aceptable para una formulación líquida incluye disolvente acuoso o no acuoso, suspensión, emulsión o aceite. Ejemplos de un disolvente no acuoso incluyen propilenglicol, polietilenglicol y oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, alcohol/disolvente acuoso, emulsión o suspensión, solución salina fisiológica, solución tamponante. Ejemplos de aceite incluyen aceite vegetal o animal, aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite de oliva, aceite de girasol, aceite de hígado, aceite sintético tal como aceite marino y lípidos obtenidos de la leche o los huevos. La composición farmacéutica puede ser isotónica, hipertónica o hipotónica. Sin embargo, es deseable que la composición farmacéutica para infusión o inyección sea básicamente isotónica. Por tanto, la isotonicidad o hipertonicidad puede ser ventajosa para el almacenamiento de la composición. Cuando la composición farmacéutica es hipertónica, la composición puede diluirse hasta isotonicidad antes de la administración. El agente de tonicidad puede ser un agente iónico de tonicidad tal como sal o un agente no iónico de tonicidad tal como carbohidrato. El agente iónico de tonicidad incluye cloruro sódico, cloruro cálcico, cloruro potásico y cloruro de magnesio, pero no se limita a los mismos. El agente no iónico de tonicidad incluye sorbitol y glicerol, pero no se limita a los mismos. Preferiblemente, se incluye al menos un tampón farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, cuando la composición farmacéutica es una infusión o inyección, es preferible formularla en un tampón con capacidad tamponante a pH 4 a 10, tal como pH 5-9 o 6-8. El tampón puede seleccionarse del grupo que consiste en solución tamponante TRIS, acetato, glutamato, lactato, maleato, tartrato, fosfato, citrato, carbonato, glicinato, histidina, glicina, succinato y trietanolamina.

En particular, si la composición farmacéutica es para administración parenteral, puede seleccionarse un tampón de los adecuados para la Farmacopea de Estados Unidos (USP). Por ejemplo, el tampón puede seleccionarse del grupo que consiste en ácido monobásico tal como ácido acético, ácido benzoico, ácido glucónico, ácido glicérico y ácido láctico; ácido polibásico tal como ácido aconítico, ácido adípico, ácido ascórbico, ácido carbónico, ácido glutámico, ácido málico, ácido succínico y ácido tartárico; y base tal como amoniaco, dietanolamina, glicina, trietanolamina y TRIS. Para administración parenteral, los vehículos (para inyección subcutánea, intravenosa, intraarticular e intramuscular) incluyen solución de cloruro sódico, solución de dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, solución de Ringer lactada y aceites fijos. Los vehículos para administración intravenosa incluyen solución de dextrosa de Ringer o una solución de infusión basada en dextrosa similar, suplementos nutricionales y suplementos de electrolito. El ejemplo incluye un líquido estéril tal como agua y aceite, con o sin un agente tensioactivo y adyuvante farmacéuticamente aceptable. Generalmente, el agua, solución salina fisiológica, solución de dextrosa, solución de azúcar relacionada y glicoles tales como propilenglicol o polietilenglicol, en particular, polisorbato 80, son adecuados para una inyección. Ejemplos de aceite incluyen aceite animal y vegetal, aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite de oliva, aceite de girasol, aceite de hígado, aceite sintético tal como aceite marino y lípidos de la leche o los huevos.

La formulación de la presente invención puede comprender agentes tensioactivos. Preferiblemente, éster de polioxietilén sorbitán (generalmente mencionado como Tween), en particular, polisorbato 20 y polisorbato 80; copolímeros (tal como DOWFAX™) de óxido de etileno (EO), óxido de propileno (PO), óxido de butileno (BO); oxtocinolos con diferentes repeticiones del grupo etoxi(oxi-1,2-etanodiilo), en particular, octoxinol-9 (Triton-100); etilfenoxipolietoxietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfolípido tal como lecitina; etoxilato de nonilfenol tal como Tergitol™ serie NP; éter graso de polioxietileno derivado de alcohol laurílico, cetílico, estearílico, oleílico (tensioactivo Brij), en particular, monolauril éter de trietilenglicol (Brij 30); éter de sorbitán conocido como SPAN, en particular, trioleato de sorbitán (Span 85) y monolaurato de sorbitán aunque sin limitación a los mismos. Tween 80 está preferiblemente comprendido en una emulsión.

Pueden usarse mezclas de agentes tensioactivos tales como Tween 80/Span 85. También es adecuada una

combinación de éster de polioxietilen sorbitán tal como Tween 80 y octocinol tal como Triton X-100. También es ventajosa una combinación de Laureth 9 y Tween y/u octocinol. Preferiblemente, la cantidad de éster de polioxietilen sorbitán (tal como Tween 80) incluida es del 0,01% al 1% (p/v), en particular el 0,1%; la cantidad de octilfenoxi polioxietanol o nonilfenoxi polioxietanol (tal como Triton X-100) incluida es del 0,001% al 0,1% (p/v), en particular del 0,005% al 0,02%; y la cantidad de éter de polioxietileno (tal como laureth 9) incluida es del 0,1% al 20% (p/v), posiblemente del 0,1% al 10%, en particular del 0,1% al 1% o de aproximadamente el 0,5%. En una realización, la composición farmacéutica se suministra mediante un sistema de control de la liberación. Por ejemplo, puede usarse infusión intravenosa, parche transdérmico, liposoma u otras vías para la administración. En un aspecto, pueden usarse macromoléculas tales como microesfera o implante.

La descripción anterior describe en líneas generales la presente invención. Puede obtenerse una compresión más completa por referencia a los siguientes ejemplos específicos. Estos ejemplos se describen únicamente con fines de ilustración y no pretenden limitar el alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1. Preparación de polisacárido capsular de *S. pneumoniae*

El cultivo de *S. pneumoniae* y la purificación de polisacáridos capsulares se realizaron como saben los expertos en la materia. Los serotipos de *S. pneumoniae* se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC). Los *S. pneumoniae* se caracterizaron por las cápsulas y la inmovilidad, diplococo con forma de lanceta Gram-positivo y alfa hemólisis en un medio de agar con sangre. Los serotipos se identificaron por ensayo Quelling usando anticuerpos específicos (patente de Estados Unidos n.º 5.847.112).

Preparación de bancos celulares

Se crearon varias generaciones de reservas de siembra para expandir la cepa y retirar los componentes de origen animal (generaciones F1, F2 y F3). Se produjeron dos generaciones adicionales de reservas de siembra. La primera generación adicional se preparó a partir de un vial F3, y la posterior generación se preparó a partir de un vial de la primera generación adicional. Los viales de siembra se almacenaron congelados ($\leq -70^{\circ}\text{C}$) con glicerol sintético como crioprotector. Para la preparación del banco celular, todos los cultivos se cultivaron en un medio basado en soja. Antes de la congelación, las células se concentraron por centrifugación, el medio usado se retiró y los sedimentos celulares se resuspendieron en un medio fresco que contenía un crioprotector (tal como glicerol sintético).

Inoculación

Se usaron cultivos del banco celular de trabajo para inocular frascos de siembra que contenían un medio basado en soja. El frasco de siembra se usó para inocular un fermentador de siembra que contenía un medio basado en soja.

Fermentación de siembra

La fermentación de la siembra se realizó en un fermentador de siembra con la temperatura y el pH controlados. Después de que se alcanzara la densidad óptica diana, el fermentador de siembra se usó para inocular el fermentador de producción que contenía el medio basado en soja.

Fermentación de producción

La fermentación de producción es la última etapa en la fermentación. La temperatura, el pH y la velocidad de agitación estaban controlados.

Inactivación

La fermentación se terminó después de que cesara el crecimiento por la adición de un inactivador. Después de la inactivación, se enfriaron los contenidos en el fermentador y se ajustó el pH del caldo de cultivo lisado.

Purificación

El caldo del fermentador se centrifugó y se filtró para retirar los desechos de las células bacterianas. Se usaron varias operaciones de concentración/diafiltración, etapas de precipitación/elución y filtración profunda para retirar los contaminantes y purificar los polisacáridos capsulares.

Ejemplo 2. Preparación de conjugado de polisacárido capsular de *S. pneumoniae*-CRM₁₉₇

Se activaron los polisacáridos de diferentes serotipos siguiendo diferentes rutas y después se conjugaron a CRM₁₉₇. El proceso de activación comprende la reducción del tamaño de los polisacáridos capsulares hasta los pesos

moleculares diana, activación química e intercambio de tampón mediante ultrafiltración. Se conjuga CRM₁₉₇ purificado a polisacáridos capsulares activados, y los conjugados se purifican usando ultrafiltración y finalmente se filtran a través de un filtro de 0,22 µm. Los parámetros del proceso, tales como pH, temperatura, concentración y tiempo son los siguientes.

- 5
- (1) Activación
- Etapas
- 10 Cada polisacárido de serotipo se diluyó con agua para inyección, acetato sódico y fosfato sódico hasta una concentración final en un intervalo de 1,0 a 2,0 mg/ml. Para el serotipo 1, se añadió hidróxido sódico (0,05 M de concentración de base final) y la solución se incubó a 50°C ± 2°C. Después, la solución se enfrió hasta 21 a 25°C y se detuvo la hidrólisis añadiendo HCl 1 M hasta que se alcanzó un pH diana de 6,0 ± 0,1. Para el serotipo 3, se
- 15 añadió HCl (0,01 M de concentración de ácido final) y la solución se incubó a 50°C ± 2°C. Después, la solución se enfrió hasta 21 a 25°C y se detuvo la hidrólisis añadiendo fosfato sódico 1 M hasta que se alcanzó un pH diana de 6,0 ± 0,1. Para el serotipo 4, se añadió HCl (0,1 M de concentración de ácido final) y la solución se incubó a 45°C ± 2°C. Después, la solución se enfrió hasta 21 a 25°C y se detuvo la hidrólisis añadiendo fosfato sódico 1 M hasta que se alcanzó un pH diana de 6,0 ± 0,1. Para el serotipo 6A, se añadió ácido acético glacial (0,2 M de concentración de ácido final) y la solución se incubó a 60°C ± 2°C. Después, la solución se enfrió hasta 21 a 25°C y se detuvo la
- 20 hidrólisis añadiendo hidróxido sódico 1 M hasta que se alcanzó un pH diana de 6,0 ± 0,1. Para el serotipo 14 y 18C, se añadió ácido acético glacial (0,2 M de concentración de ácido final) y la solución se incubó a 94°C ± 2°C. Después, la solución se enfrió hasta 21 a 25°C y se detuvo la hidrólisis añadiendo fosfato sódico 1 M hasta que se alcanzó un pH diana de 6,0 ± 0,1.
- 25 Etapa 2: Reacción con peryodato
- Los equivalentes molares de peryodato sódico necesarios para la activación de sacáridos de neumococos se determinaron usando el contenido total de sacárido. Con mezcla minuciosa, se permitió que la reacción de oxidación continuara entre 16 a 20 horas a 21 - 25°C para todos los serotipos excepto 1, 7F y 19F, para los que la temperatura
- 30 fue ≤ 10°C.
- Etapas
- 35 El sacárido oxidado se concentró y se diafiltró con agua para inyección (WFI) en un ultrafiltro de 100 kDa de MWCO (ultrafiltro de 30 kDa para el serotipo 1 y ultrafiltro de 5 kDa para el serotipo 18C). La diafiltración se consiguió usando solución de cloruro sódico al 0,9% para el serotipo 1, tampón acetato sódico 0,01 M (pH 4,5) para el serotipo 7F y tampón fosfato sódico 0,01 M (pH 6,0) para el serotipo 19F. El permeado se descartó y el retenido se filtró a través de un filtro de 0,22 µm.
- 40 Etapa 4: Liofilización
- Para los serotipos 3, 4, 5, 9N, 9V y 14, el sacárido concentrado se mezcló con la proteína vehículo CRM₁₉₇, se cargó en frascos de vidrio, se liofilizó y después se almacenó a -25°C ± 5°C.
- 45 Para los serotipos 2, 6A, 6B, 7F, 19A, 19F y 23F, se añadió una cantidad especificada de sacarosa que se calculó para conseguir una concentración de sacarosa del 5% ± 3% en la mezcla de reacción de conjugación. Los serotipos 1 y 18C no requirieron adición de sacarosa. El sacárido concentrado después se cargó en frascos de vidrio, se liofilizó y después se almacenó a -25°C ± 5°C.
- 50 (2) Proceso de conjugación
- Se realizó conjugación acuosa para los serotipos 1, 3, 4, 5, 9N, 9V, 14 y 18C, y se realizó conjugación con DMSO para los serotipos 2, 6A, 6B, 7F, 19A, 19F y 23F.
- 55 Etapa 1: Disolución
- Conjugación acuosa
- Para los serotipos 3, 4, 5, 9N, 9V y 14, la mezcla liofilizada de sacárido activado-CRM₁₉₇ se descongeló y se
- 60 equilibró a temperatura ambiente. El sacárido activado-CRM₁₉₇ liofilizado después se reconstituyó en un tampón fosfato sódico 0,1 M a una relación típica por serotipo. Para los serotipos 1 y 18C, el sacárido liofilizado se reconstituyó en una solución de CRM₁₉₇ en fosfato sódico dibásico 1 M a una relación típica de 0,11 l de fosfato sódico por 1 l de solución de CRM₁₉₇.
- 65 Conjugación con dimetil sulfóxido (DMSO)

Los serotipos 2, 6A, 6B, 7F, 19A, 19F, 23F de sacárido activado liofilizado y la proteína vehículo CRM₁₉₇ liofilizada se equilibraron a temperatura ambiente y se reconstituyeron en DMSO.

Etapa 2: Reacción de conjugación

Conjugación acuosa

Para los serotipos 1, 3, 4, 5, 9N, 9V, 14 y 18C, la reacción de conjugación se inició añadiendo la solución de cianoborohidruro sódico (100 mg/ml) para conseguir 1,0 - 1,2 moles de cianoborohidruro sódico por mol de sacárido. La mezcla de reacción se incubó durante 44 - 96 horas a 23°C hasta 37°C. La temperatura y el tiempo de reacción se ajustaron por serotipo. La temperatura después se redujo hasta 23°C ± 2°C y se añadió cloruro sódico al 0,9% al reactor. Se añadió solución de borohidruro sódico (100 mg/ml) para conseguir 1,8 - 2,2 equivalentes molares de borohidruro sódico por mol de sacárido. La mezcla se incubó durante 3 - 6 horas a 23°C ± 2°C. Este procedimiento redujo cualquier aldehído sin reaccionar presente en los sacáridos. La mezcla se diluyó con cloruro sódico al 0,9% y la mezcla de conjugación diluida se filtró usando un prefiltro de 1,2 µm en un recipiente de mantenimiento.

Conjugación con DMSO

Para los serotipos 2, 6A, 6B, 7F, 19A, 19F y 23F, se mezclaron sacárido activado y proteína vehículo CRM₁₉₇ a un intervalo de relación de 0,8 g - 1,25 g de sacárido/g de CRM₁₉₇. La reacción de conjugación se inició añadiendo la solución de cianoborohidruro sódico (100 mg/ml) a una relación de 0,8 - 1,2 equivalentes molares de cianoborohidruro sódico a un mol de sacárido activado. Se añadió WFI a la mezcla de reacción hasta una diana del 1% (v/v), y la mezcla se incubó durante 11 - 27 horas a 23°C ± 2°C. Se añadieron solución de borohidruro sódico, 100 mg/ml (1,8 - 2,2 equivalentes molares típicos de borohidruro sódico por mol de sacárido activado) y WFI (diana del 5% v/v) a la reacción y la mezcla se incubó durante 3 - 6 horas a 23°C ± 2°C. Este procedimiento redujo cualquier aldehído sin reaccionar presente en los sacáridos. Después, la mezcla de reacción se diluyó con cloruro sódico al 0,9%, y la mezcla de conjugación diluida se filtró usando un prefiltro de 1,2 µm en un recipiente de mantenimiento.

Etapa 3: Ultrafiltración

La mezcla de conjugado diluida se concentró y se diafiltró en un filtro de ultrafiltración de 100 kDa de MWCO con un mínimo de 20 volúmenes de cloruro sódico al 0,9% o tampón. El permeado se descartó.

Etapa 4: Filtración estéril

El retenido después de la diafiltración de 100 kDa de MWCO se filtró a través de un filtro de 0,22 µm. Los controles en el proceso (contenido de sacárido, proteína libre, sacárido libre, DMSO residual y cianuro residual; para conjugación con DMSO, DMSO residual además de los mismos) se realizaron sobre el producto filtrado. Los controles en el proceso sobre el retenido filtrado se realizaron para determinar si era necesario concentración, diafiltración y/o dilución adicional. Según lo necesario, el conjugado filtrado se diluyó con cloruro sódico al 0,9% para conseguir una concentración final de menos de 0,55 g/l. Se realizaron ensayos de liberación para el contenido de sacárido, contenido de proteína y relación de sacárido:proteína en esta fase. Finalmente, el conjugado se filtró (0,22 µm) y se realizó el ensayo de liberación (aspecto, proteína libre, sacárido libre, endotoxina, determinación de tamaño molecular, cianuro residual, DMSO residual, identidad de sacárido e identidad de CRM₁₉₇). La solución concentrada en bruto final se almacenó a 2 - 8°C.

Ejemplo 3. Formulación de una vacuna multivalente de conjugado de neumococos

Los volúmenes requeridos de concentrados en bruto finales se calcularon basándose en el volumen del lote y las concentraciones de sacárido en bruto. Después de que se añadieran las cantidades requeridas del cloruro sódico (solución salina fisiológica) al 0,85%, polisorbato 80 y tampón succinato al recipiente de formulación premarcado, se añadieron los concentrados en bruto. La preparación después se mezcló minuciosamente y se filtró a esterilidad a través de una membrana de 0,22 µm. La masa formulada se mezcló suavemente durante y después de la adición de fosfato de aluminio en bruto. El pH se comprobó y se ajustó si era necesario. El producto en bruto formulado se almacenó a 2 - 8°C. El producto contenía, en un volumen de 0,5 ml, 2 µg de cada sacárido, excepto para 6B a 4 µg; aproximadamente 34 µg de proteína vehículo CRM₁₉₇; 0,125 mg de adyuvante de aluminio elemental (0,5 mg de fosfato de aluminio); 4,25 mg de cloruro sódico; 295 µg de tampón succinato sódico; y 100 µg de polisorbato 80.

Ejemplo 4. Inmunogenicidad de la vacuna multivalente de conjugado de neumococos

La vacuna multivalente de neumococos, es decir, la composición de vacuna (SK-15) preparada en el ejemplo 3 se ensayó para su capacidad de inducir una respuesta inmunogénica en conejos. Estos efectos inmunogénicos se caracterizaron por ELISA específico de antígeno para las concentraciones de IgG en suero y por ensayo opsonofagocítico (OPA) para la función de los anticuerpos. Se inmunizaron conejos blancos de Nueva Zelanda por vía intramuscular en la semana 0 y la semana 3 con la dosis clínica humana programada de cada polisacárido (2 µg

de cada PS, excepto para 6B a 4 µg). Los sueros se muestrearon cada 3 semanas después de la inmunización.

Medición de la concentración de IgG específica de serotipo

- 5 Se recubrieron polisacáridos capsulares (PnPs) para cada serotipo sobre una placa de 96 pocillos a 500 ng/pocillo. Se muestreó una cantidad equivalente de suero de cada sujeto y se combinó por grupo. La combinación de suero se diluyó en serie en factor 10 con un tampón de dilución de anticuerpos que comprendía Tween 20, C-PS 4 µg/ml y polisacárido capsular de serotipo 22F (PnPs 22F) 4 µg/ml y después se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 30 minutos. La placa se lavó 5 veces con un tampón de lavado y después la placa de pocillos se recubrió con 50 µl de suero preadsorbido y diluido y se incubó a temperatura ambiente durante 18 horas. La placa de pocillos se lavó del mismo modo y después se añadieron conjugados de anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo-fosfatasa alcalina (1:50000) a cada pocillo, seguido de incubación a temperatura ambiente durante 2 horas. Las placas se lavaron como se ha descrito anteriormente y se añadió 1 mg/ml de tampón p-nitrofenilamina como sustrato a cada pocillo y después se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas. La reacción se interrumpió añadiendo 50 µl de NaOH 3 M y se midieron las absorbancias a 405 nm y 690 nm. Como ejemplos comparativos, la vacuna 7-valente (Prevnam 7, Pfizer) y la vacuna 13-valente (Prevnam 13, Pfizer) se sometieron al mismo procedimiento. Los resultados se muestran en las figuras 1-15.

Ensayo de inmunogenicidad funcional (OPA)

- 20 Se evaluaron las funciones de los anticuerpos ensayando suero en ensayo OPA. Se muestreó una cantidad equivalente de suero de cada sujeto, se combinó por grupo y se diluyó en factor 10. Se cultivó *S. pneumoniae* en un medio THY por serotipo y se diluyó hasta 1000 CFU/10 µl. Se mezclaron 200 µl de tampón de opsonización, 10 µl de suero diluido y 10 µl de *S. pneumoniae* diluido y se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió una mezcla de células HL-60 prediferenciadas y complementos y se hizo reaccionar en una incubadora de CO₂ (37°C) durante una hora. La temperatura se redujo para detener la fagocitosis y los 5 µl de reacción se extendieron en una placa de agar presecada durante 30 - 60 minutos. La placa se incubó en una incubadora de CO₂ (37°C) durante 12 - 18 horas y después se contaron las colonias. El título OPA se expresó como una tasa de dilución a la que se observó eliminación del 50%. Como ejemplo comparativo, la vacuna 13-valente (Prevnam 13, Pfizer) se sometió al mismo procedimiento. Los resultados se muestran en las Tablas 1-3.

[Tabla 1]

Título OPA de 15 serotipos de polisacárido 3 semanas después de la inmunización primaria

Serotipo	Prevnam 13	SK-15	Serotipo	Prevnam 13	SK-15
1	1:16	1:4	9V	1:256	1:256
2	-	1:128	9N	-	1:512
3	Sin dilución	Sin dilución	14	1:256	1:256
4	1:128	1:128	18C	1:1024	1:1024
5	1:64	1:32	19A	1:512	1:256
6A	1:512	1:256	19F	1:256	1:128
6B	1:256	1:128	23F	1:256	1:256
7F	1:1024	1:1024	-	-	-

35 [Tabla 2]

Títulos OPA de 15 serotipos de polisacárido 3 semanas después de la inmunización secundaria

Serotipo	Prevnam 13	SK-15	Serotipo	Prevnam 13	SK-15
1	1:64	1:64	9V	1:512	1:512
2	-	1:512	9N	-	1:2048
3	1:2	1:4	14	1:1024	1:1024
4	1:1024	1:1024	18C	1:1024	1:512
5	1:256	1:256	19A	1:1024	1:1024
6A	1:2048	1:2048	19F	1:1024	1:512
6B	1:2048	1:2048	23F	1:2048	1:2048
7F	1:2048	1:2048	-	-	-

[Tabla 3]

Títulos OPA de 15 serotipos de polisacárido 6 semanas después de la inmunización secundaria

Serotipo	Prevnam 13	SK-15	Serotipo	Prevnam 13	SK-15
1	1:64	1:64	9V	1:512	1:512
2	-	1:512	9N	-	1:2048
3	1:4	1:4	14	1:1024	1:1024
4	1:1024	1:1024	18C	1:2048	1:2048
5	1:512	1:512	19A	1:2048	1:1024
6A	1:2048	1:2048	19F	1:1024	1:512

6B	1:2048	1:1024	23F	1:2048	1:2048
7F	1:2048	1:2048	-	-	-

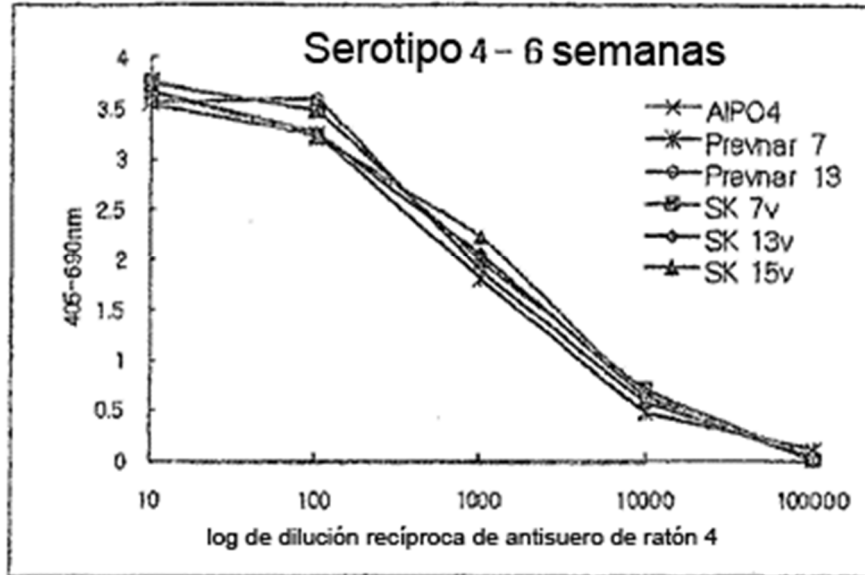
5 La respuesta inmunitaria específica de serotipo por la formulación de vacuna de la presente invención y la del ejemplo comparativo se evaluaron mediante ELISA de IgG y OPA mediada por el complemento para anticuerpos funcionales. Las Fig. 1 a 15 muestran los resultados de ELISA de IgG y las tablas 1 a 3 muestran los resultados de mediciones de inmunogenicidad funcional obtenidas por OPA, que comparan las respuestas inmunitarias entre los grupos de tratamiento. Estos resultados indican que la vacuna 15-valente de conjugado de polisacárido de neumococos induciría un título de IgG y una actividad de anticuerpos funcionales equivalentes a o mejores que Prevnar-13.

10

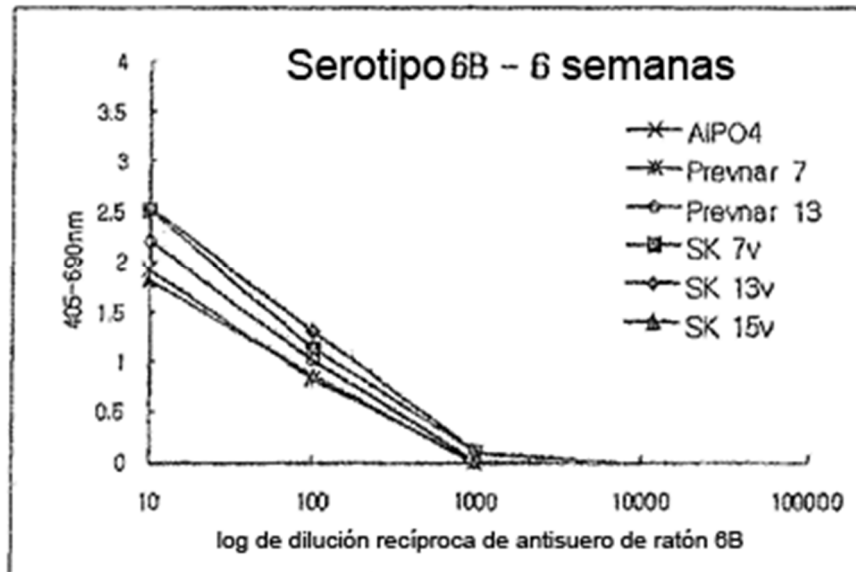
REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica multivalente, que comprende: 15 conjugados distintos de polisacárido-proteína, junto con un vehículo fisiológicamente aceptable, en la que cada uno de los conjugados de polisacárido-proteína comprende un polisacárido capsular de un serotipo diferente de *Streptococcus pneumoniae* conjugado a una proteína vehículo, y los polisacáridos capsulares se preparan a partir de los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9N, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F.
2. La composición inmunogénica multivalente de la reivindicación 1, en la que la proteína vehículo es CRM₁₉₇.
3. La composición inmunogénica multivalente de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente un adyuvante.
4. La composición inmunogénica multivalente de la reivindicación 3, en la que el adyuvante es un adyuvante basado en aluminio.
5. La composición inmunogénica multivalente de la reivindicación 4, en la que el adyuvante se selecciona del grupo que consiste en fosfato de aluminio, sulfato de aluminio e hidróxido de aluminio.
6. La composición inmunogénica multivalente de la reivindicación 5, en la que el adyuvante es fosfato de aluminio.
7. Una composición farmacéutica para su uso en la inducción de una respuesta inmunitaria contra un conjugado de polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae*, que comprende una cantidad inmunológicamente eficaz de la composición inmunogénica multivalente de una cualquiera de las realizaciones 1 a 6.
8. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que la composición inmunogénica multivalente es una única dosis de 0,5 ml formulada para que contenga:
 - 2 µg de cada sacárido, excepto para 6B a 4 µg;
 - aproximadamente 34 µg de la proteína vehículo CRM₁₉₇;
 - 0,125 mg de adyuvante de aluminio elemental (0,5 mg de fosfato de aluminio); y
 - tampón cloruro sódico y succinato sódico como excipientes.

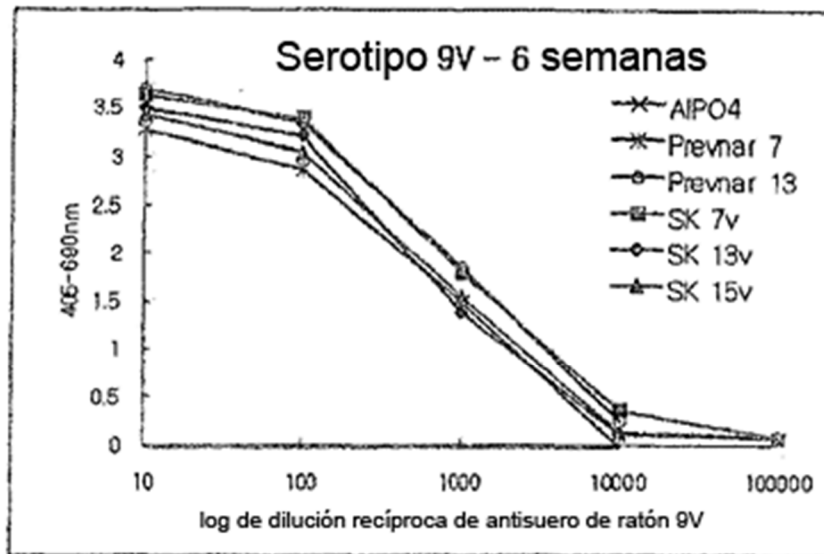
[Fig. 1]



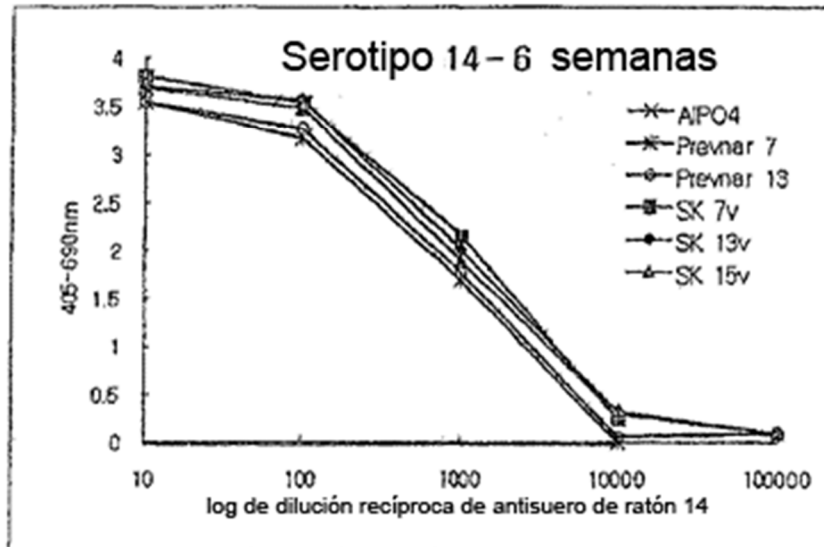
[Fig. 2]



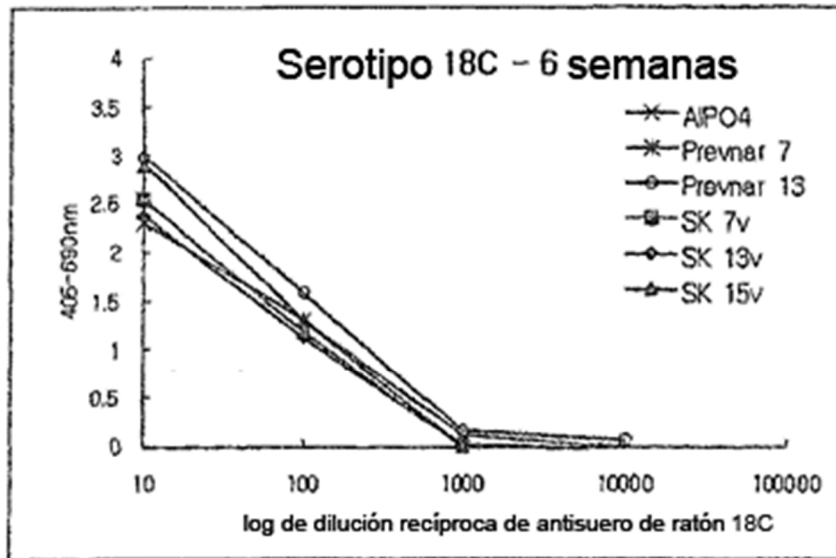
[Fig. 3]



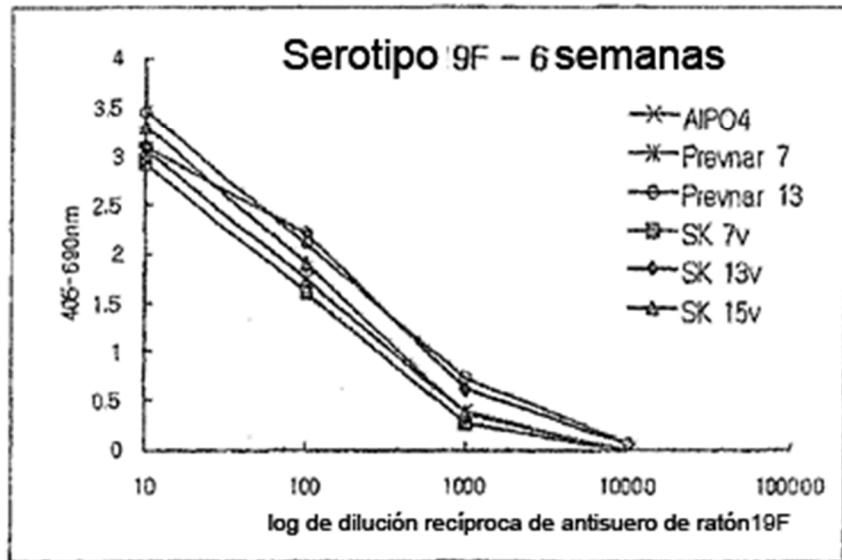
[Fig. 4]



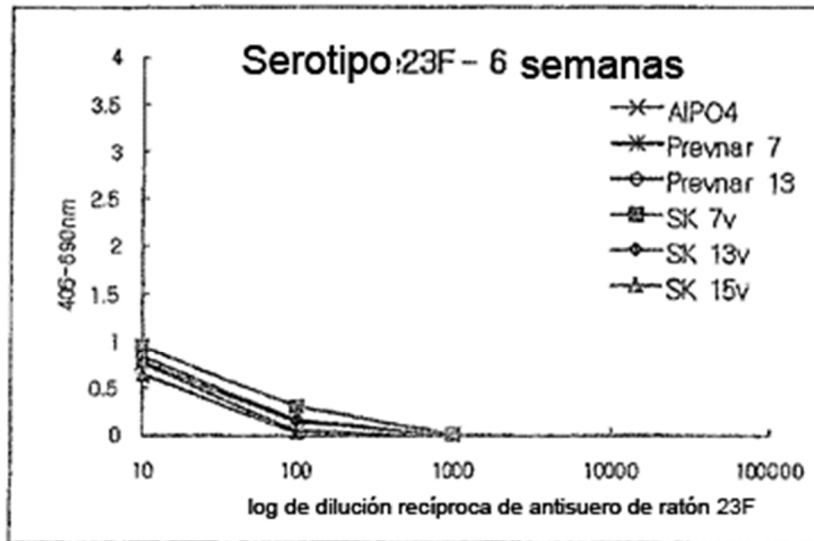
[Fig. 5]



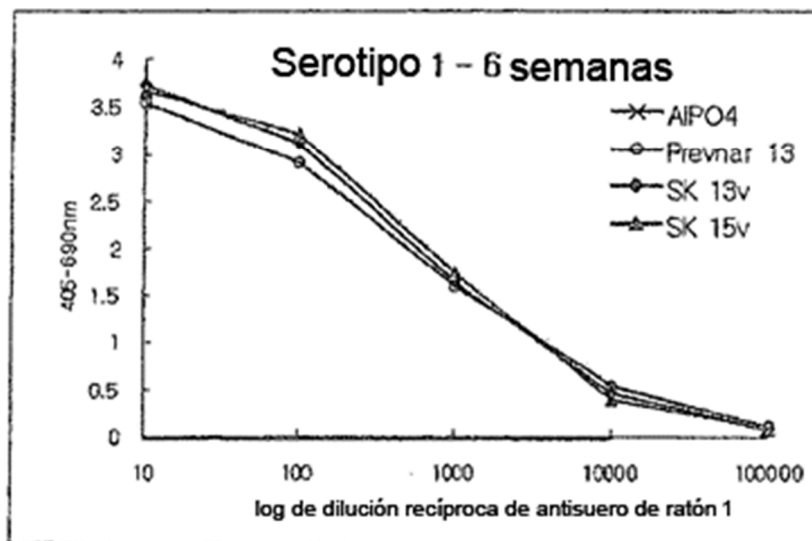
[Fig. 6]



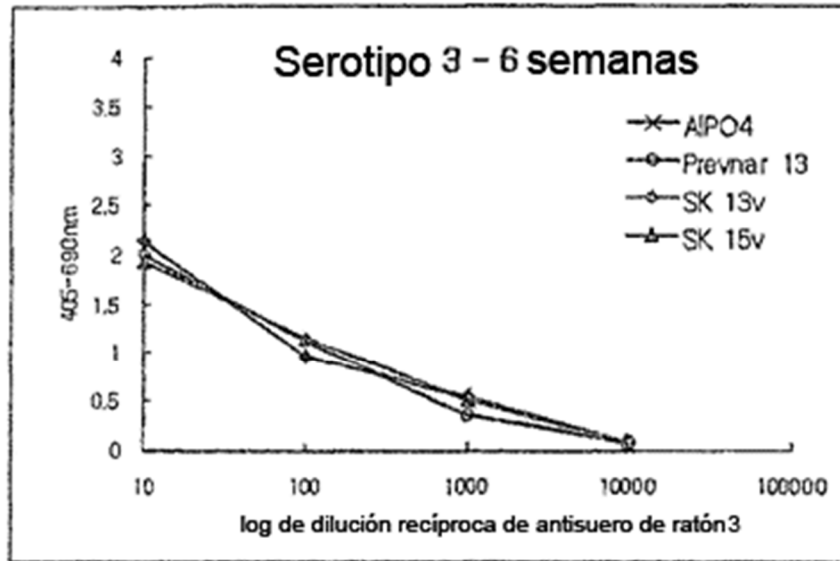
[Fig. 7]



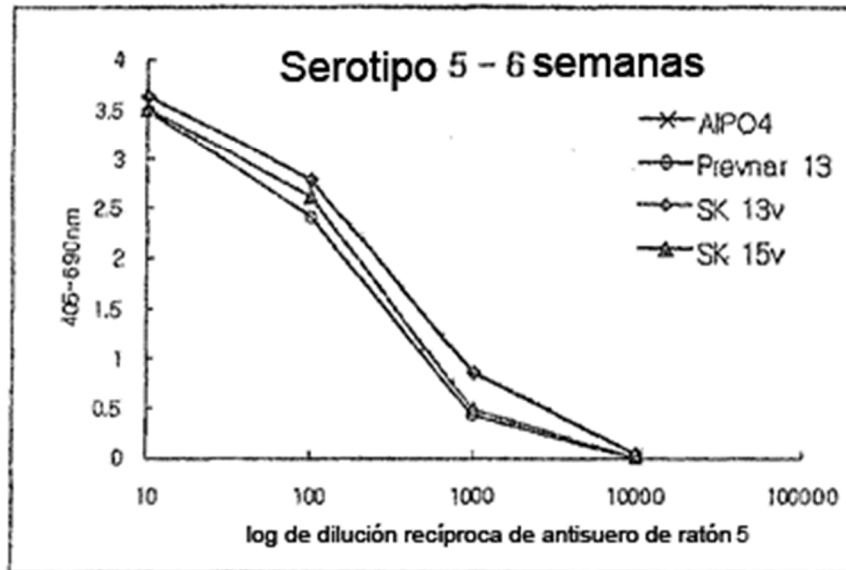
[Fig. 8]



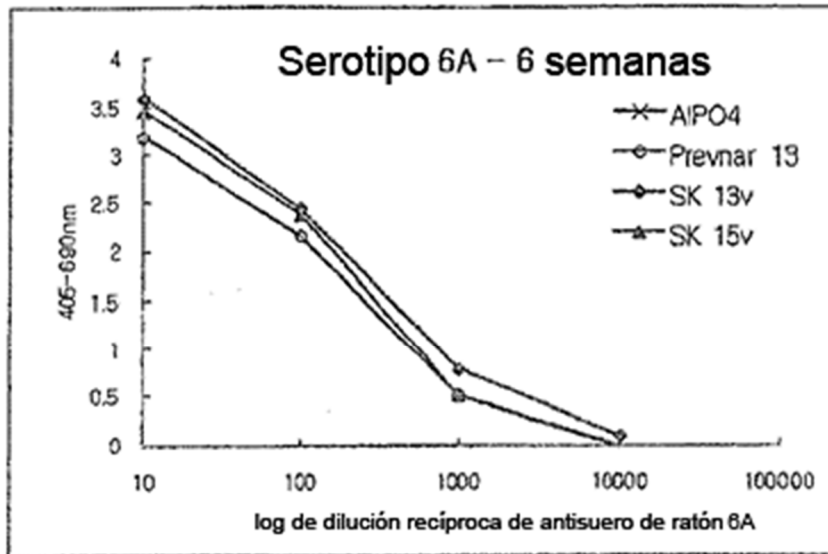
[Fig. 9]



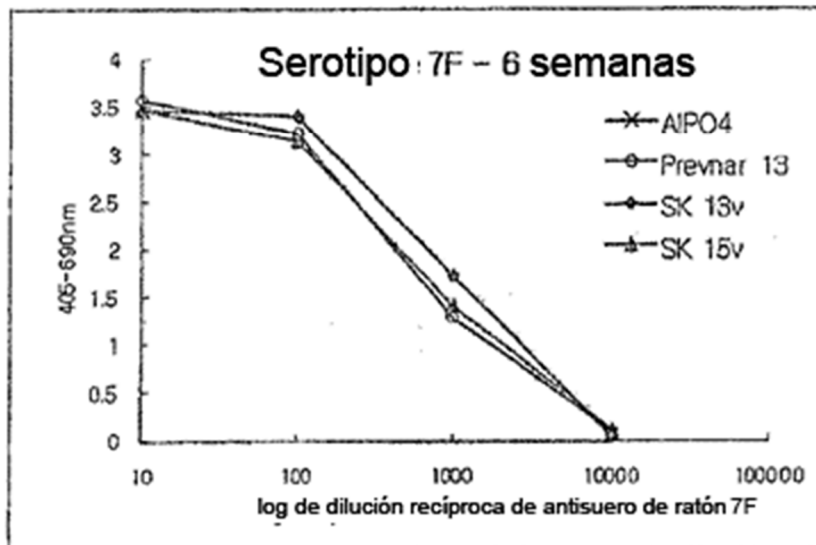
[Fig. 10]



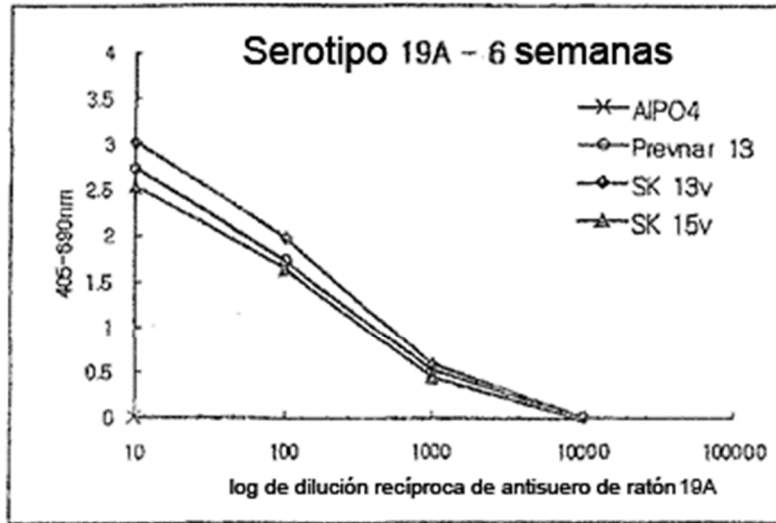
[Fig. 11]



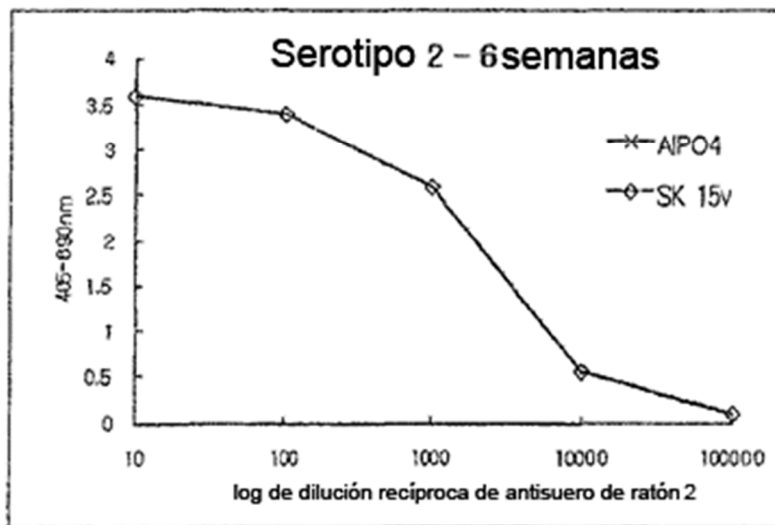
[Fig. 12]



[Fig. 13]



[Fig. 14]



[Fig. 15]

