

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-135211- -00000-0000

Fecha: 2012-08-10 16:28:45 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION

TITULO: COMPOSICIÓN DE VACUNA CONJUGADA DE POLISACÁRIDO-
PROTEÍNA NEUMOCÓCICA 15-VALENTE REFERENCIA CRUZADA A
SOLICITUDES RELACIONADAS.

SOLICITANTE: MERCK SHARP & DOHME CORP.

DIRECCIÓN: 126 East Lincoln Avenue, Rahway, New Jersey 07065-0907
E.U.A.

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 10 de Agosto de 2012

P2012/000049

82



PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD
PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2012/000082

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: MERCK SHARP & DOHME CORP

Dirección: 126 East Lincoln Avenue, Rahway,
New Jersey 07065-0907, U.S.A.

Nacionalidad o Domicilio: Estadounidense

Lugar de Constitución: Estados Unidos

Teléfono: _____

Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual _____

Número _____

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARE

Dirección: Carrera 5 No. 34-03

Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799

E-mail: office@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual _____

Número 79.782.747 Btá
TP 74.295

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: VER PAGINA ADJUNATA

Dirección: VER PAGINA ADJUNATA

Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNATA

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2011/023526

Fecha

Febrero 03, 2011

Publicación Internacional No. WO 2011/100151

Fecha

Agosto 18, 2011

6

Título (54) COMPOSICIÓN DE VACUNA CONJUGADA DE POLISACÁRIDO-
PROTEÍNA NEUMOCÓCICA 15-VALENTE REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES
RELACIONADAS.

Clasificación Internacional (51) A61K 39/00.

Prioridad

SI

☒

NO

☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

Febrero 09, 2010

(31) Número de Solicitud

61/302.726

10

ANEXOS

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

☒

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☒

Poderes, si fuere el caso.

☐

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

☐

Declaraciones. Declaración bajo la Regla 4.17 (ii) del PCT.

☒

Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☐

Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).

☐

Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☐

Arte final 12 x 12.

☐

De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

☐

De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.

☒

Otros. Búsqueda Internacional

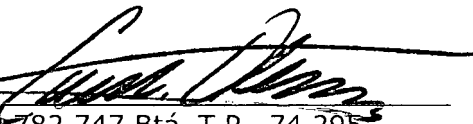
11

FIGURA CARACTERÍSTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA: 

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

3

LISTA DE INVENTORES

PCT/US2011/023526

MICHAEL J. CAULFIELD

711 Prospect Avenue, Ft. Washington,
Pennsylvania 19034
United State of America
Nationality: United State of America

PATRICK L. AHL

770 Sumneytown Pike, West Point,
Pennsylvania 19486
United State of America
Nationality: United State of America

JEFFREY T. BLUE

770 Sumneytown Pike, West Point,
Pennsylvania 19486
United State of America
Nationality: United State of America

JAYME L. CANNON

770 Sumneytown Pike, West Point,
Pennsylvania 19486
United State of America
Nationality: United State of America

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0070952

Bogotá D.C., Julio 12 de 2012 - 14:34:37

RECIBIDO DE : OLARTE MOURE & ASOCIADOS NI 830.122.870

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	455532582	11/07/2012	8.025.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr UNIDITARIO	Vr CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	590.000.00	590.000.00
				\$590.000.00

SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRI

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-135211- -00000-0000

Fecha: 2012-08-10 16:28:45 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Julio 12 de 2012 - 14:34:39



No. 12-135211-00000-0000

Fecha: 2012-08-10 16:28:45 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE L

☐
☐
☐
☐
☐

Indicación que se solicita una patente.

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

Descripción de la invención

Dibujos de ser estos pertinentes

Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒
☒
☒
☒

Indicación que se solicita una PCT

Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)

Dibujos de ser estos pertinentes

Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐
☐
☐
☐

Indicación que se solicita Diseño industrial

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐
☐
☐
☐

Indicación que se solicita un esquema de trazado

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

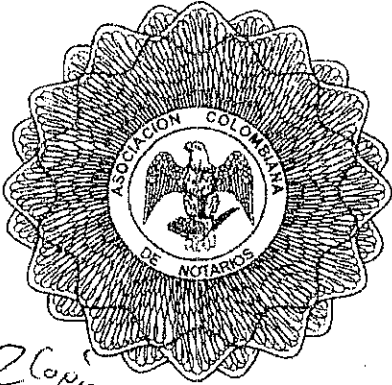
Representación gráfica de un esquema de trazado

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐

WK 11657662



2 (copia)

18 ENE 2010

.. ESCRITURA PUBLICA NUMERO: (0 0 2 6)

CERO CERO VEINTISEIS. /-----

En la ciudad de Bogotá, Distrito

Capital, República de Colombia, a los

Quince ----- (15) días del mes de

Enero ----- del año dos mil diez -----

(2010), ante mi MARIA EUGENIA ROJAS DE URUETA

-----NOTARIA(O) CUARENTA Y
SEIS (46) DEL CIRCULO DE BOGOTA, se otorgó la escritura
pública que se consigna en los siguientes términos:-----

CLASE(S) DE ACTO: PROTOCOLIZACION POR CARLOS
REINALDO OLARTE GARCIA, JAMES IAN RAISBECK
LLINAS, JUAN GUILLERMO MOURE PEREZ, Y NATALIA
CASTRO VELEZ -----

C.C. Nos. 79.782.747, 79.376.996, 80.412.281 Y 52.008.577.-----

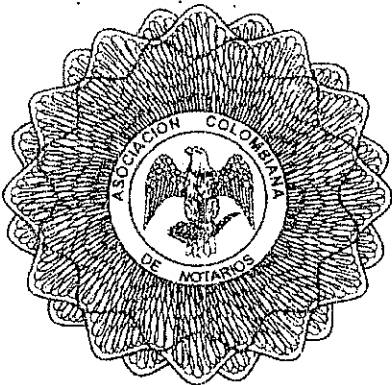
Compareció CARLOS REINALDO OLARTE GARCIA, mayor de
edad, vecino de Bogotá, identificado con la cédula de
ciudadanía número 79.782.747, de estado civil casado con
sociedad conyugal vigente, JAMES IAN RAISBECK LLINAS
mayor de edad, vecino de ésta ciudad, identificado con la
cédula de ciudadanía número 79.376.996, de estado civil casado
con sociedad conyugal vigente, JUAN GUILLERMO MOURE
PEREZ, mayor de edad, vecino de Bogotá, identificado con la
cédula de ciudadanía número 80.412.281, de estado civil casado
con sociedad conyugal vigente y NATALIA CASTRO VELEZ,
mayor de edad, vecina de Bogotá, identificada con la cédula de
ciudadanía número 52.008.577, de estado civil casada con
sociedad conyugal vigente, obrando en sus propios nombres y
dijeron:-----

ESTE PAPEL NO TIENE COSTO PARA EL USUARIO

PRIMERO.- Que presentan para su protocolización y custodia en los archivos de ésta notaría, bajo el número y lugar que a ésta escritura corresponda, en cuatro (4) folios autenticados, un poder, y sus traducciones el cual es del siguiente tenor: --

PODER GENERAL.-----

El suscrito, MERCK SHARP & DOHME, CORP domiciliado en 126 East Lincoln, Avenue Rahway, NJ 07065-0907 United States of America nombramos por el presente a Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro, nuestros representantes legales con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales en materia de patentes, los cuales quedan a su vez facultados para representarnos ante las autoridades de cualquier jerarquía de la República de Colombia, la república de Bolivia, La República del Ecuador, la Republica del Perú y la Republica Bolivariana de Venezuela ya sean administrativas, judiciales o de policía, para iniciar ante dichas autoridades todas las acciones necesarias para cumplir con el objeto indicado e intervenir en todas las instancias, grados o etapas procesales; elevar y tramitar solicitudes, declaraciones y reclamos, para demandar, reconvenir, contestar demandas y recon convenciones, formular descripciones, enmiendas, oposiciones y todo tipo de impugnaciones y escritos de cualquier naturaleza; instaurar cancelaciones y amparos administrativos; abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar cualquier otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores; intervenir como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo solicitar medidas cautelares de cualquier naturaleza, conciliar, transar, someter a árbitros, desistirse de la pretensión y/o el procedimiento, allanarse a la pretensión, percibir, ratificar los actos jurídicos procesales suscritos con anterioridad al



otorgamiento y/o presentación del presente poder, sustituir o delegar la representación procesal y los demás actos que expresa la ley, con todas las demás facultades que resulten necesarias; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin todas las

medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses- -----

Firma X (ilegible) Mark R. Daniel, Managing Counsel, Patents.-

Fecha November 19 2009 -----

Ciudad País: Rahway, NJ, USA.-----

Certificación Notarial- -----

En esta fecha, November 19 -----

El notario Público suscrito Certifica:-----

1. Que Mark R. Daniel mayor de edad y domiciliado 126 East Lincoln Avenue, Rahway, NJ 07065, USA suscribió el documento que antecede -----

2. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de Managing Counsel, Patents of MERCK SHARP & DOHME CORP, -----

3. Que MERCK SHARP & DOHME con sede principal en 126 East Lincoln Avenue Rahway, NJ 07065-0907, United States of America esta legalmente constituida, que tiene existencia legal vigente y que los propósitos para los cuales se otorga el poder se encuentra dentro de los que comprenden el objeto social. --

4. Que el otorgante tiene la representación para suscribir el poder, y que ésta es legítima.-----

5. El fundamento de mis certificaciones contenidas en los puntos 2,3 y 4 fue la exhibición de los siguientes documentos auténticos. (Sigue texto sin traducir)-----

Traducción oficial de un documento cuyo original está en

ESTE PAPEL NO TIENE COSTO PARA EL USUARIO

inglés.-----

APOSTILLA

(Convención de la Haya du 5 octobre 1961)

1. País: Distrito de Columbia Estados Unidos de América-----

El presente documento público-----

2. ha sido firmado Por: Violet Burgess-----

3. Actuando en calidad de: Notario Público de New Jersey. ---

4. Lleva el sello/ estampilla de: Violet Burgess, Notario.- ----

Certificado

5 En: ----- Trenton, New Jersey

6. El: ----- 25 de noviembre de 2009

7. Por: ----- R. David Rousseau, Tesorero de New Jersey

8. Bajo el No.: ----- A380889

9. Sello/ estampilla: "El Gran Sello del Estado de New Jersey"

10. Firma: ----- (Firmado)

Certificación: -----

Certifico que la presente es una traducción auténtica y completa del inglés al español del documento adjunto, la cual he elaborado según mi leal saber y entender.-----

Documento: "Apostilla"-----

Fecha: 11 de Diciembre de 2009.-----

Traductor: Jorge Enrique Sierra Reyes (Sello y firma digital debidamente registrados ante el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia).-----

Licencia # 376 de 1993, expedida por el Ministerio de Justicia.

Dirección Carrera 15 # 99-13 Of. 411, Bogotá D.C.-----

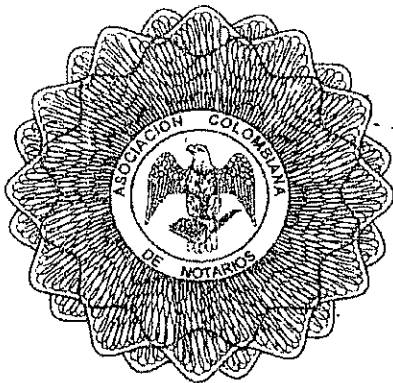
Teléfonos (571) 218 23 08 (571) 623 29 25.- -----

E-mail: treser1@yahoo.com-----

Traducción # 14-278.- -----

SEGUNDO.- Que solicita a la señora Notaria la incorporación de dichos documentos al protocolo de ésta notaría para que de

WK 11657664



su tenor se expidan las copias que más adelante se soliciten -----

La notaría advierte a los interesados que la protocolización de documentos no da mayor fuerza o autenticidad de la que tienen dichos documentos.-----

Esta escritura pública fue firmada fuera del Despacho Notarial, de conformidad con el artículo 12 del Decreto 2.148 de 1.983. -

Se advirtió a los otorgantes de esta escritura de la obligación que tienen de leer la totalidad de su texto, a fin de verificar la exactitud de todos los datos en ella consignados, con el fin de aclarar, modificar o corregir lo pertinente antes de firmarla, la firma de la misma demuestra su aprobación total del texto, en consecuencia, la notaria no asume ninguna responsabilidad por errores o inexactitudes establecidas con posterioridad a la firma de (el, los) otorgante(s) y de la notaría, en tal caso, este (os) debe(n) ser corregidos mediante el otorgamiento de una nueva escritura, suscrita por todos los que intervinieron en la inicial y sufragada por los mismos (artículo 35, decreto ley 960 de 1970).- -----

ADVERTENCIA, OTORGAMIENTO Y AUTORIZACION.- Leído el presente instrumento por el (los) compareciente (s) y advertido (s) sobre las formalidades legales, lo aprueban y firman conmigo y ante mí la(el) Notaria(o) quién lo autoriza. A los otorgantes se les advirtió finalmente que una vez firmado el presente instrumento, La(el) Notaria(o) no aceptará correcciones o modificaciones sino en la forma y casos

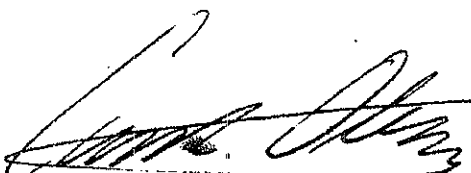
ESTE PAPEL NO TIENE COSTO PARA EL USUARIO

previstos por la Ley. ---Se utilizaron las hojas de papel
Notarial Nos .WK 11657662, WK 11657663, WK 11657664 Y WK 11657665. /-

DERECHOS LEGALES: \$ 42.860.00. - / - - - - -

RESOLUCIONES 9306 Y 9500 DE 2008 - - - - -

IVA \$ 11.682.00. - / - - - - -



CARLOS REINALDO OLARTE GARCIA

C.C.No. 79.782.747 Btd

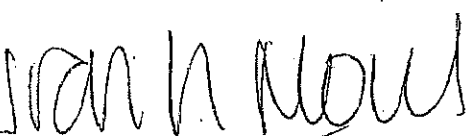
TEL: 6017700



JAMES IAN RAISBECK LLINAS

C.C.No. 79.376.996 Btd

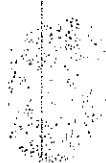
TEL: 6017700



JUAN GUILLERMO MOURE PEREZ

C.C.No. 80412281

TEL: 6017700



NATALIA CASTRO VELEZ,

C.C.No. 52008577

TEL: 6017700

Apostilla:

APOSTILLA:

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: Estados Unidos de América
El presente documento público
2. Ha sido firmado por: Violet Burgess
3. Actuando en calidad de: Notario Público de New Jersey
4. Lleva el sello/estampilla de: Violet Burgess, Notario

Certificado

5. En: Trenton, New Jersey
6. El: 25 de noviembre de 2009
7. Por: R. David Rousseau, Tesorero de New Jersey
8. Bajo el No.: A380889
9. Sello / estampilla: "El Gran Sello del Estado de New Jersey"
10. Firma: (Firmado)

Certificado No. 115832008

Verifique este certificado por internet en:

[https://www1.state.nj.us/TYTR-](https://www1.state.nj.us/TYTR-StandingCert/JSP/Verify_Cert.jsp)

[StandingCert/JSP/Verify_Cert.jsp](https://www1.state.nj.us/TYTR-StandingCert/JSP/Verify_Cert.jsp)

Certificación:

Certifico que la presente es una traducción auténtica y completa del inglés al español del documento adjunto, la cual he elaborado según mi leal saber y entender.

Documento: "Apostilla"

Fecha: 11 de diciembre de 2009.

Traductor: Jorge Enrique Sierra Reyes (Sello y firma digital debidamente registrados ante el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia)

Licencia # 376 de 1993, expedida por el Ministerio de Justicia.

Dirección: Carrera 15 # 99-13 Of. 411, Bogotá, D.C.

Teléfonos: (571) 218 2308, (571) 623 2925.

E-mail: jeseser1@yahoo.com

Traducción # 14-278

Traductor

JORGE E. SIERRA REYES

Licencia 376 - 1993 Minjusticia

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

2009 DIC 19 A 12:07

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

003841

Jorge Sierra
UNA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS

The undersigned, **General Power**

El suscrito, **Poder General**

MERCK SHARP & DOHME CORP.

domiciled in

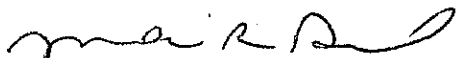
domiciliado en

126 East Lincoln, Avenue Rahway, NJ 07065-0907

United States of America

by means of these presents hereby grants to **Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro**, legal representatives with faculties to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents in patent matters, who at the same time have the faculty to represent us before the administrative, judicial or police authorities of any hierarchy of the Republic of Colombia, the Republic of Bolivia, the Republic of Ecuador, the Republic of Peru, and the Bolivarian Republic of Venezuela, to initiate before said authorities all the necessary actions to accomplish said purposes and to intervene in all instances, grades and procedural levels; to file and prosecute applications, declarations, complaints, to claim, counterclaim, answer claims and counterclaims; to draw up specifications; to make amendments; oppositions and all types of objections and writings of any nature; cancellations and administrative injunction proceedings; to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive documents and monies; act as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to request preliminary injunctions of any nature, settle, make arrangements, to submit to arbitrators, to desist from claims or procedures, to accept claims, to collect, to ratify legal proceedings subscribed before the appointment and/or presentation of this Power, substitute or delegate the legal representation and other acts prescribed by law, in short, with all such further powers as may be required; to comply with all other requirements and, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests.

nombramos por el presente a **Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro**, nuestros representantes legales con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales en materia de patentes, los cuales quedan a su vez facultados para representarnos ante las autoridades de cualquier jerarquía de la República de Colombia, la República de Bolivia, la República del Ecuador, la República del Perú y la República Bolivariana de Venezuela, ya sean administrativas, judiciales o de policía, para iniciar ante dichas autoridades todas las acciones necesarias para cumplir con el objeto indicado e intervenir en todas las instancias, grados o etapas procesales; elevar y tramitar solicitudes, declaraciones y reclamos, para demandar, reconvenir, contestar demandas y reconconvenciones; formular descripciones, enmiendas, oposiciones y todo tipo de impugnaciones y escritos de cualquier naturaleza; instaurar cancelaciones y amparos administrativos; abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar cualquier otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores; intervenir como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo solicitar medidas cautelares de cualquier naturaleza, conciliar, transar, someter a árbitros, desistirse de la pretensión y/o el procedimiento, allanarse a la pretensión, percibir, ratificar los actos jurídicos procesales suscritos con anterioridad al otorgamiento y/o presentación del presente poder, sustituir o delegar la representación procesal y los demás actos que exprese la ley, con todas las demás facultades que resulten necesarias; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeran conducentes al resguardo de nuestros intereses.



Signature/Firma: X

Mark R. Daniel, Managing Counsel, Patents

Date/Fecha: November 17,

2009

City/Country/Ciudad,País: Rahway, NJ, USA

Diagonal 34 N° 5 - 28, Bogotá D.C., Colombia

Tel + 57 1 601-7700, Fax + 57 1 601-7799, office@olarteraisbeck.com, www.olarteraisbeck.com

NOTARIA CUARENTA Y SEIS
HELENA ALFONSO LOZANO

MODEL OF NOTARIAL CERTIFICATION

Notarial Certification

On this date, November 17

2009

The undersigned Notary Public certifies:

1. That

of legal age and domiciled in

126 East Lincoln Avenue, Rahway, NJ 07065, USA.

signed the foregoing document.

2. That the grantor has executed the foregoing document as Managing Counsel, Patents of MERCK SHARP & DOHME CORP.

3. That MERCK SHARP & DOHME CORP,

having its principal place of business located in 126 East Lincoln, Avenue Rahway, NJ 07065-0907, United States of America

is duly incorporated, is currently in existence, and that the purposes for which the General Power is granted are within the scope of its corporate purposes.

4. That the grantor has the authority to execute the General Power and that his/her representation is legal.

5. The foundation for my certifications contained in points 2, 3 and 4 was the exhibition of the following authentic document(s):

Corporate Resolution No. 5 - Patent Matters adopted November 3, 2009

C. St. Ruyter
NOTARY PUBLIC (Signature):

VIOLET BURGESS
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
My Commission Expires May 30, 2012

Certificación Notarial

En esta fecha,

el Notario Público suscrito certifica:

1. Que

Mark R. Daniel

mayor de edad y domiciliado

suscribió el documento que antecede.

2. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de

4. Que

con sede principal ubicada en

está legalmente constituida, que tiene existencia legal vigente y que los propósitos para los cuales se otorga el poder se encuentra dentro de los que comprenden su objeto social.

4. Que el otorgante tiene la representación para suscribir el poder, y que ésta es legítima.

5. El fundamento de mis certificaciones contenidas en los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición de los (del) siguiente(s) documento(s) auténtico(s):

APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA
2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
VIOLET BURGESS
3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
VIOLET BURGESS, NOTARY

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 25TH DAY OF NOVEMBER 2009
7. BY: R. David Rousseau, NEW JERSEY TREASURER
8. NO: A380889
9. SEAL/STAMP:
10. SIGNATURE



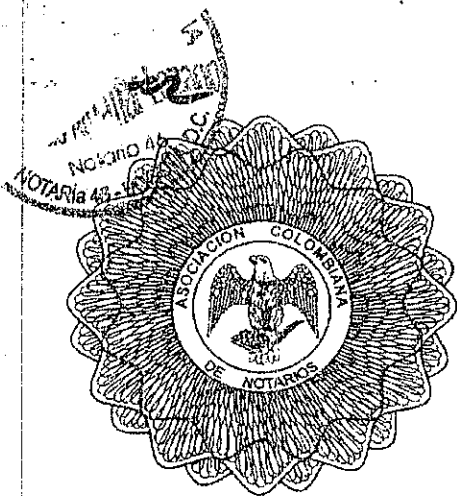
NOTARIA CUARENTA Y SEIS
Hella Luz Altamir Lozano

Certificate Number: 115832008

Verify this certificate at
https://www1.state.nj.us/TYTR_StandingCert/JSP/Verify_Cert.jsp



WK 11657665



ESTA HOJA HACE PARTE DE LA
 ESCRITURA PUBLICA NUMERO : (0 0 2 6)
 DE FECHA: 15 DE ENERO DE 2.010. - - - -
 NOTARIA CUARENTA Y SEIS (46) DE BOGOTA
 REFERENTE A LA
 PROTOCOLIZACION DE CARLOS
 REINALDO OLARTE GARCIA,

JAMES IAN RAISBECK LLINAS, JUAN GUILLERMO MOURE
 PEREZ, Y NATALIA CASTRO VELEZ. - - - - -

Maria Eugenia Rojas de Urqueta
 MARIA EUGENIA ROJAS DE URUETA

NOTARIA(O) CUARENTA Y SEIS (46) D

redb.



liber y Tercera 3^{ra}
 fotocopia de la Escritura Pública No. 26
 de fecha 15 de Enero de 2010
 Tomada de su original que expido en
Siete (7) hojas útiles de papel
 común autorizado (Decreto 1343 de 1970) con destino a

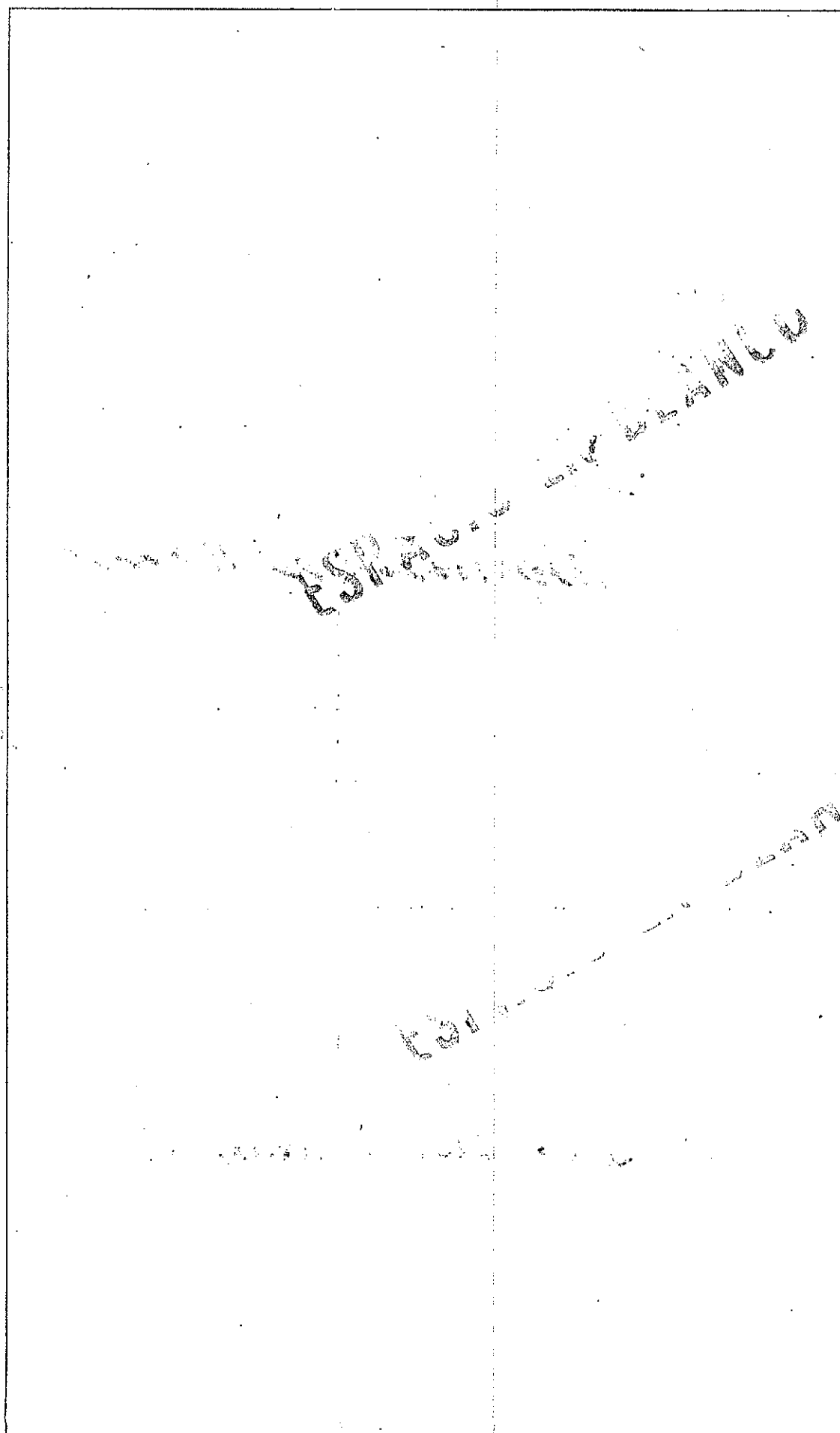
Interesado

Oído en Bogotá, D.C., a 10 MAR. 2010
 La Notaria Cuarenta y Seis de Bogotá, D.C.

Felicia Luz Altamira



ESTE PAPEL NO TIENE COSTO PARA EL USUARIO



VIII-2-1	Declaration: Entitlement to apply for and be granted a patent Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate: Name (LAST, First)	In relation to this international application MERCK SHARP & DOHME CORP. is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:
VIII-2-1(i v)		an assignment from CAULFIELD, Michael, J. to MERCK SHARP & DOHME CORP., dated 28 January 2011 (28.01.2011)
VIII-2-1(i v)		an assignment from AHL, Patrick, L. to MERCK SHARP & DOHME CORP., dated 25 January 2011 (25.01.2011)
VIII-2-1(i v)		an assignment from BLUE, Jeffrey, T. to MERCK SHARP & DOHME CORP., dated 25 January 2011 (25.01.2011)
VIII-2-1(i v)		an assignment from CANNON, Jayme, L. to MERCK SHARP & DOHME CORP., dated 25 January 2011 (25.01.2011)

VIII-3-1	Declaration: Entitlement to claim priority Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application specified below, where the applicant is not the applicant who filed the earlier application or where the applicant's name has changed since the filing of the earlier application (Rules 4.17(iii) and 51bis.1(a)(iii)) Name	In relation to this international application MERCK SHARP & DOHME CORP. is entitled to claim priority of earlier application No. 61/302,726 by virtue of the following:
VIII-3-1(i v)		an assignment from CAULFIELD, Michael, J. to MERCK SHARP & DOHME CORP., dated 28 January 2011 (28.01.2011)
VIII-3-1(i v)		an assignment from AHL, Patrick, L. to MERCK SHARP & DOHME CORP., dated 25 January 2011 (25.01.2011)
VIII-3-1(i v)		an assignment from BLUE, Jeffrey, T. to MERCK SHARP & DOHME CORP., dated 25 January 2011 (25.01.2011)
VIII-3-1(i v)		an assignment from CANNON, Jayme, L. to MERCK SHARP & DOHME CORP., dated 25 January 2011 (25.01.2011)

(51) International Patent Classification:
A61K 39/00 (2006.01)**CANNON, Jayme, L.** [US/US]; 770 Sumneytown Pike,
West Point, Pennsylvania 19486 (US).(21) International Application Number:
PCT/US2011/023526(74) Common Representative: **MERCK SHARP &
DOHME CORP.**; 126 East Lincoln Avenue, Rahway,
New Jersey 07065-0907 (US).(22) International Filing Date:
3 February 2011 (03.02.2011)(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/302,726 9 February 2010 (09.02.2010) US(71) Applicant (for all designated States except US): **MER-
CK SHARP & DOHME CORP.** [US/US]; 126 East
Lincoln Avenue, Rahway, New Jersey 07065-0907 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **CAULFIELD,
Michael, J.** [US/US]; 711 Prospect Avenue, Ft. Washing-
ton, Pennsylvania 19034 (US). **AHL, Patrick, L.**
[US/US]; 770 Sumneytown Pike, West Point, Pennsylva-
nia 19486 (US). **BLUE, Jeffrey, T.** [US/US]; 770 Sum-
neytown Pike, West Point, Pennsylvania 19486 (US).(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,

[Continued on next page]

(54) Title: 15-VALENT PNEUMOCOCCAL POLYSACCHARIDE-PROTEIN CONJUGATE VACCINE COMPOSITION

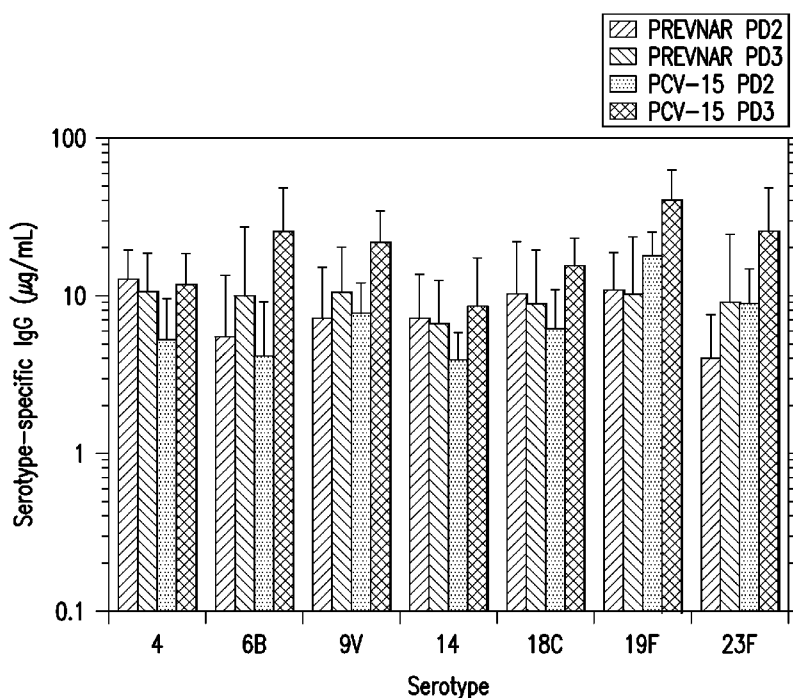


FIG. 1

(57) Abstract: The present invention provides a multivalent immunogenic composition having 15 distinct polysaccharide-protein conjugates. Each conjugate consists of a capsular polysaccharide prepared from a different serotype of *Streptococcus pneumoniae* (1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F or 33F) conjugated to a carrier protein, preferably CRM197. The immunogenic composition, preferably formulated as a vaccine on an aluminum-based adjuvant, provides broad coverage against pneumococcal disease, particularly in infants and young children.



LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— *as to the applicant's entitlement to claim the priority of
the earlier application (Rule 4.17(iii))*

Declarations under Rule 4.17:

— *as to applicant's entitlement to apply for and be granted
a patent (Rule 4.17(ii))*

Published:

— *with international search report (Art. 21(3))*

TITLE OF THE INVENTION

15-VALENT PNEUMOCOCCAL POLYSACCHARIDE-PROTEIN CONJUGATE VACCINE
COMPOSITION

CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

5 None

FIELD OF INVENTION

 The present invention provides a multivalent immunogenic composition having
15 distinct polysaccharide-protein conjugates. Each conjugate consists of a capsular
polysaccharide prepared from a different serotype of *Streptococcus pneumoniae* (1, 3, 4, 5, 6A,
10 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F or 33F) conjugated to a carrier protein, preferably
CRM₁₉₇. The immunogenic composition, preferably formulated as a vaccine on an aluminum-
based adjuvant, provides broad coverage against pneumococcal disease, particularly in infants
and young children.

BACKGROUND OF THE INVENTION

15 *Streptococcus pneumoniae* is a significant cause of serious disease world-wide. In
1997, the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) estimated there were 3,000 cases of
pneumococcal meningitis, 50,000 cases of pneumococcal bacteremia, 7,000,000 cases of
pneumococcal otitis media and 500,000 cases of pneumococcal pneumonia annually in the
United States. See Centers for Disease Control and Prevention, MMWR Morb Mortal Wkly Rep
20 1997, 46(RR-8):1-13. Furthermore, the complications of these diseases can be significant with
some studies reporting up to 8% mortality and 25% neurologic sequelae with pneumococcal
meningitis. See Arditi *et al.*, 1998, Pediatrics 102:1087-97.

 The multivalent pneumococcal polysaccharide vaccines that have been licensed
for many years have proved valuable in preventing pneumococcal disease in adults, particularly,
25 the elderly and those at high-risk. However, infants and young children respond poorly to
unconjugated pneumococcal polysaccharides. The pneumococcal conjugate vaccine, Prevnar[®],
containing the 7 most frequently isolated serotypes (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F and 23F) causing
invasive pneumococcal disease in young children and infants at the time, was first licensed in the
United States in February 2000. Following universal use of Prevnar[®] in the United States, there
30 has been a significant reduction in invasive pneumococcal disease in children due to the

serotypes present in Prevnar®. See Centers for Disease Control and Prevention, MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2005, 54(36):893-7. However, there are limitations in serotype coverage with Prevnar® in certain regions of the world and some evidence of certain emerging serotypes in the United States (for example, 19A and others). See O'Brien *et al.*, 2004, Am J Epidemiol 159:634-44; Whitney *et al.*, 2003, N Engl J Med 348:1737-46; Kyaw *et al.*, 2006, N Engl J Med 354:1455-63; Hicks *et al.*, 2007, J Infect Dis 196:1346-54; Traore *et al.*, 2009, Clin Infect Dis 48:S181-S189.

U.S. Patent Application Publication No. US 2006/0228380 A1 describes a 13-valent pneumococcal polysaccharide-protein conjugate vaccine including serotypes 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F and 23F. Chinese Patent Application Publication No. CN 101590224 A describes a 14-valent pneumococcal polysaccharide-protein conjugate vaccine including serotypes 1, 2, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9N, 9V, 14, 18C, 19A, 19F and 23F.

Other PCVs have covered 7, 10, 11, or 13 of the serotypes contained in PCV-15, but immune interference has been observed for some serotypes (e.g. lower protection for serotype 3 in GSK's PCV-11) and lower response rates to serotype 6B in Pfizer's PCV-13. See Prymula *et al.*, 2006, Lancet 367:740-48 and Kieninger *et al.*, Safety and Immunologic Non-inferiority of 13-valent Pneumococcal Conjugate Vaccine Compared to 7-valent Pneumococcal Conjugate Vaccine Given as a 4-Dose Series in Healthy Infants and Toddlers, presented at the 48th Annual ICAAC/ISDA 46th Annual Meeting, Washington DC, October 25-28, 2008.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides an immunogenic composition comprising (1) a multivalent polysaccharide-protein conjugate mixture consisting of capsular polysaccharides from 15 different serotypes of *S. pneumoniae* conjugated to a carrier protein, and (2) a pharmaceutically acceptable carrier. More specifically, the present invention provides a 15-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV-15) composition comprising a multivalent polysaccharide-protein conjugate mixture consisting of capsular polysaccharides from serotypes 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, and 33F of *S. pneumoniae* conjugated to a carrier protein; and a pharmaceutically acceptable carrier. In one specific embodiment, the immunogenic composition contains capsular polysaccharides from serotypes 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F and 33F and the carrier protein is CRM₁₉₇.

In certain embodiments, the composition further comprises an adjuvant. In certain embodiments, the adjuvant is an aluminum-based adjuvant, such as aluminum phosphate,

aluminum sulfate or aluminum hydroxide. In a particular embodiment of the invention, the adjuvant is aluminum phosphate.

The present invention also provides a method of inducing an immune response to a *S. pneumoniae* capsular polysaccharide, comprising administering to a human an immunologically effective amount of the above immunogenic composition.

The present invention further provides an immunogenic composition administered as a single 0.5 mL dose formulated to contain: 2 µg of each polysaccharide, except for 6B at 4 µg; about 32 µg CRM₁₉₇ carrier protein; 0.125 mg of elemental aluminum (0.5 mg aluminum phosphate) adjuvant; 150 mM sodium chloride and 20 mM L-histidine buffer.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1: Comparison of GMCs for PCV-15 relative to Prevnar® in Infant Rhesus Monkeys (Prevnar serotypes, PD-2 and PD-3). Error bars denote 2 standard errors.

Figure 2: Serotype-specific GMCs to non- Prevnar® serotypes in infant rhesus monkeys immunized with PCV-15. Error bars denote 2 standard errors.

Figure 3: NZWR-1: Comparison of geometric mean titers in rabbits immunized with PCV-15 without (0xA) or with APA (B1) (Post-dose 2). Error bars denote 95% CI on the geometric mean fold-difference (PCV-15 without APA / PCV-15 with APA).

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention provides a multivalent immunogenic composition comprising, consisting essentially of, or alternatively, consisting of 15 distinct polysaccharide-protein conjugates, wherein each of the conjugates contains a different capsular polysaccharide conjugated to a carrier protein, and wherein the capsular polysaccharides are prepared from serotypes 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F and 33F of *S. pneumoniae*, together with a pharmaceutically acceptable carrier. In certain embodiments, the carrier protein is CRM₁₉₇. The immunogenic composition may further comprise an adjuvant, such as an aluminum-based adjuvant, such as aluminum phosphate, aluminum sulfate and aluminum hydroxide. The present invention also provides a method of inducing an immune response to a *S. pneumoniae* capsular polysaccharide conjugate, comprising administering to a human an immunologically effective amount of the above multivalent immunogenic composition.

As illustrated in the Examples, *infra.*, preclinical studies in infant rhesus monkeys demonstrated robust antibody responses to all 15 serotypes in PCV-15 which are comparable to the responses for the 7 common serotypes in Prevnar®. Applicants' finding that a 15 valent

pneumococcal conjugate vaccine including the addition of new polysaccharide-protein conjugates containing serotypes 22F and 33F provides robust antibody responses demonstrates the feasibility of expanding coverage of pneumococcal serotypes not covered by existing pneumococcal vaccines.

5 The term "comprises" when used with the immunogenic composition of the invention refers to the inclusion of any other components (subject to limitations of "consisting of" language for the antigen mixture), such as adjuvants and excipients. The term "consisting of" when used with the multivalent polysaccharide-protein conjugate mixture refers to a mixture having those 15 particular *S. pneumoniae* polysaccharide protein conjugates and no other *S.*
10 *pneumoniae* polysaccharide protein conjugates from a different serotype.

Streptococcus pneumoniae capsular polysaccharide – protein conjugates

Capsular polysaccharides from *Streptococcus pneumoniae* can be prepared by standard techniques known to those skilled in the art. For example, polysaccharides can be isolated from bacteria and may be sized to some degree by known methods (see, e.g., European
15 Patent Nos. EP497524 and EP497525) and preferably by microfluidisation. Polysaccharides can be sized in order to reduce viscosity in polysaccharide samples and/or to improve filterability for conjugated products. In the present invention, capsular polysaccharides are prepared from serotypes 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F and 33F of *S. pneumoniae*.

In one embodiment, each pneumococcal polysaccharide serotype is grown in a
20 soy-based medium. The individual polysaccharides are then purified through standard steps including centrifugation, precipitation, and ultra-filtration. See, e.g., U.S. Patent Application Publication No. 2008/0286838 and U.S. Pat. No. 5,847,112.

Carrier proteins are preferably proteins that are non-toxic and non-reactogenic and obtainable in sufficient amount and purity. A carrier protein can be conjugated or joined with a
25 *S. pneumoniae* polysaccharide to enhance immunogenicity of the polysaccharide. Carrier proteins should be amenable to standard conjugation procedures. In a particular embodiment of the present invention, CRM₁₉₇ is used as the carrier protein. In one embodiment, each capsular polysaccharide is conjugated to the same carrier protein (each capsular polysaccharide molecule being conjugated to a single carrier protein). In another embodiment, the capsular
30 polysaccharides are conjugated to two or more carrier proteins (each capsular polysaccharide molecule being conjugated to a single carrier protein). In such an embodiment, each capsular polysaccharide of the same serotype is typically conjugated to the same carrier protein.

CRM₁₉₇ is a non-toxic variant (i.e., toxoid) of diphtheria toxin. In one embodiment, it is isolated from cultures of *Corynebacterium diphtheria* strain C7 (β197) grown in casamino acids and yeast extract-based medium. In another embodiment, CRM₁₉₇ is prepared recombinantly in accordance with the methods described in U.S. Pat. No. 5,614,382. Typically, CRM₁₉₇ is purified through a combination of ultra-filtration, ammonium sulfate precipitation, and ion-exchange chromatography. In some embodiments, CRM₁₉₇ is prepared in *Pseudomonas fluorescens* using Pfenex Expression Technology™ (Pfenex Inc., San Diego, CA).

Other suitable carrier proteins include additional inactivated bacterial toxins such as DT (Diphtheria toxoid), TT (tetanus toxoid) or fragment C of TT, pertussis toxoid, cholera toxoid (e.g., as described in International Patent Application Publication No. WO 2004/083251), *E. coli* LT, *E. coli* ST, and exotoxin A from *Pseudomonas aeruginosa*. Bacterial outer membrane proteins such as outer membrane complex c (OMPC), porins, transferrin binding proteins, pneumococcal surface protein A (PspA; See International Application Patent Publication No. WO 02/091998), pneumococcal adhesin protein (PsaA), C5a peptidase from Group A or Group B streptococcus, or *Haemophilus influenzae* protein D, pneumococcal pneumolysin (Kuo *et al.*, 1995, Infect Immun 63; 2706-13) including ply detoxified in some fashion for example dPLY-GMBS (See International Patent Application Publication No. WO 04/081515) or dPLY-formol, PhtX, including PhtA, PhtB, PhtD, PhtE and fusions of Pht proteins for example PhtDE fusions, PhtBE fusions (See International Patent Application Publication Nos. WO 01/98334 and WO 03/54007), can also be used. Other proteins, such as ovalbumin, keyhole limpet hemocyanin (KLH), bovine serum albumin (BSA) or purified protein derivative of tuberculin (PPD), PorB (from *N. meningitidis*), PD (*Haemophilus influenzae* protein D; see, e.g., European Patent No. EP 0 594 610 B), or immunologically functional equivalents thereof, synthetic peptides (See European Patent Nos. EP0378881 and EP0427347), heat shock proteins (See International Patent Application Publication Nos. WO 93/17712 and WO 94/03208), pertussis proteins (See International Patent Application Publication No. WO 98/58668 and European Patent No. EP0471177), cytokines, lymphokines, growth factors or hormones (See International Patent Application Publication No. WO 91/01146), artificial proteins comprising multiple human CD4⁺ T cell epitopes from various pathogen derived antigens (See Falugi *et al.*, 2001, Eur J Immunol 31:3816-3824) such as N19 protein (See Baraldoi *et al.*, 2004, Infect Immun 72:4884-7), iron uptake proteins (See International Patent Application Publication No. WO 01/72337), toxin A or B of *C. difficile* (See International Patent Publication No. WO

00/61761), and flagellin (See Ben-Yedidia et al., 1998, Immunol Lett 64:9) can also be used as carrier proteins.

Other DT mutants can be used, such as CRM176, CRM228, CRM 45 (Uchida *et al.*, 1973, J Biol Chem 218:3838-3844); CRM 9, CRM 45, CRM102, CRM 103 and CRM107 and other mutations described by Nicholls and Youle in Genetically Engineered Toxins, Ed: Frankel, Maecel Dekker Inc, 1992; deletion or mutation of Glu-148 to Asp, Gln or Ser and/or Ala 158 to Gly and other mutations disclosed in U.S. Pat. No. 4,709,017 or U.S. Pat. No. 4,950,740; mutation of at least one or more residues Lys 516, Lys 526, Phe 530 and/or Lys 534 and other mutations disclosed in U.S. Pat. No. 5,917,017 or U.S. Pat. No. 6,455,673; or fragment disclosed in U.S. Pat. No. 5,843,711.

The purified polysaccharides are chemically activated to make the saccharides capable of reacting with the carrier protein. Once activated, each capsular polysaccharide is separately conjugated to a carrier protein to form a glycoconjugate. The polysaccharide conjugates may be prepared by known coupling techniques.

In one embodiment, the chemical activation of the polysaccharides and subsequent conjugation to the carrier protein are achieved by means described in U.S. Pat. Nos. 4,365,170, 4,673,574 and 4,902,506. Briefly, that chemistry entails the activation of pneumococcal polysaccharide by reaction with any oxidizing agent which oxidizes a terminal hydroxyl group to an aldehyde, such as periodate (including sodium periodate, potassium periodate, or periodic acid). The reaction leads to a random oxidative cleavage of vicinal hydroxyl groups of the carbohydrates with the formation of reactive aldehyde groups.

Coupling to the protein carrier (e.g., CRM₁₉₇) can be by reductive amination via direct amination to the lysyl groups of the protein. For example, conjugation is carried out by reacting a mixture of the activated polysaccharide and carrier protein with a reducing agent such as sodium cyanoborohydride. Unreacted aldehydes are then capped with the addition of a strong reducing agent, such as sodium borohydride.

In another embodiment, the conjugation method may rely on activation of the saccharide with 1-cyano-4-dimethylamino pyridinium tetrafluoroborate (CDAP) to form a cyanate ester. The activated saccharide may thus be coupled directly or via a spacer (linker) group to an amino group on the carrier protein. For example, the spacer could be cystamine or cysteamine to give a thiolated polysaccharide which could be coupled to the carrier via a thioether linkage obtained after reaction with a maleimide-activated carrier protein (for example using GMBS) or a haloacetylated carrier protein (for example using iodoacetamide [e.g. ethyl

iodoacetimide HCl] or N-succinimidyl bromoacetate or SIAB, or SIA, or SBAP). Preferably, the cyanate ester (optionally made by CDAP chemistry) is coupled with hexane diamine or adipic acid dihydrazide (ADH) and the amino-derivatised saccharide is conjugated to the carrier protein using carbodiimide (e.g. EDAC or EDC) chemistry via a carboxyl group on the protein carrier.

Such conjugates are described in International Patent Application Publication Nos. WO 93/15760, WO 95/08348 and WO 96/29094; and Chu *et al.*, 1983, Infect. Immunity 40:245-256.

Other suitable techniques use carbodiimides, hydrazides, active esters, norborane, p-nitrobenzoic acid, N-hydroxysuccinimide, S--NHS, EDC, TSTU. Many are described in International Patent Application Publication No. WO 98/42721. Conjugation may involve a carbonyl linker which may be formed by reaction of a free hydroxyl group of the saccharide with CDI (See Bethell *et al.*, 1979, J. Biol. Chem. 254:2572-4; Hearn *et al.*, 1981, J. Chromatogr. 218:509-18) followed by reaction of with a protein to form a carbamate linkage. This may involve reduction of the anomeric terminus to a primary hydroxyl group, optional protection/deprotection of the primary hydroxyl group, reaction of the primary hydroxyl group with CDI to form a CDI carbamate intermediate and coupling the CDI carbamate intermediate with an amino group on a protein.

In one embodiment, prior to formulation, each pneumococcal capsular polysaccharide antigen is individually purified from *S. pneumoniae*, activated to form reactive aldehydes, and then covalently conjugated using reductive amination to the carrier protein

CRM₁₉₇.

After conjugation of the capsular polysaccharide to the carrier protein, the polysaccharide-protein conjugates are purified (enriched with respect to the amount of polysaccharide-protein conjugate) by one or more of a variety of techniques. Examples of these techniques are well known to the skilled artisan and include concentration/diafiltration operations, ultrafiltration, precipitation/elution, column chromatography, and depth filtration. See, e.g., U.S. Pat. No. 6,146,902.

Pharmaceutical/Vaccine Compositions

The present invention further provides compositions, including pharmaceutical, immunogenic and vaccine compositions, comprising, consisting essentially of, or alternatively, consisting of 15 distinct polysaccharide-protein conjugates, wherein each of the conjugates contains a different capsular polysaccharide conjugated to a carrier protein, and wherein the capsular polysaccharides are prepared from serotypes 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F and 33F of *S. pneumoniae*, together with a pharmaceutically acceptable carrier and

an adjuvant. These pneumococcal conjugates are prepared by separate processes and bulk formulated into a single dosage formulation.

As defined herein, an "adjuvant" is a substance that serves to enhance the immunogenicity of an immunogenic composition of the invention. An immune adjuvant may enhance an immune response to an antigen that is weakly immunogenic when administered alone, e.g., inducing no or weak antibody titers or cell-mediated immune response, increase antibody titers to the antigen, and/or lowers the dose of the antigen effective to achieve an immune response in the individual. Thus, adjuvants are often given to boost the immune response and are well known to the skilled artisan. Suitable adjuvants to enhance effectiveness of the composition include, but are not limited to:

(1) aluminum salts (alum), such as aluminum hydroxide, aluminum phosphate, aluminum sulfate, etc.;

(2) oil-in-water emulsion formulations (with or without other specific immunostimulating agents such as muramyl peptides (defined below) or bacterial cell wall components), such as, for example, (a) MF59 (International Patent Application Publication No. WO 90/14837), containing 5% Squalene, 0.5% Tween 80, and 0.5% Span 85 (optionally containing various amounts of MTP-PE) formulated into submicron particles using a microfluidizer such as Model 110Y microfluidizer (Microfluidics, Newton, MA), (b) SAF, containing 10% Squalene, 0.4% Tween 80, 5% pluronic-blocked polymer L121, and thr-MDP either microfluidized into a submicron emulsion or vortexed to generate a larger particle size emulsion, (c) Ribi™ adjuvant system (RAS), (Corixa, Hamilton, MT) containing 2% Squalene, 0.2% Tween 80, and one or more bacterial cell wall components from the group consisting of 3-O-deacylated monophosphorylipid A (MPL™) described in U.S. Pat. No. 4,912,094, trehalose dimycolate (TDM), and cell wall skeleton (CWS), preferably MPL+CWS (Detox™); and (d) Montanide ISA;

(3) saponin adjuvants, such as Quil A or STIMULON™ QS-21 (Antigenics, Framingham, MA) (see, e.g., U.S. Pat. No. 5,057,540) may be used or particles generated therefrom such as ISCOM (immunostimulating complexes formed by the combination of cholesterol, saponin, phospholipid, and amphipathic proteins) and Iscomatrix® (having essentially the same structure as an ISCOM but without the protein);

(4) bacterial lipopolysaccharides, synthetic lipid A analogs such as aminoalkyl glucosamine phosphate compounds (AGP), or derivatives or analogs thereof, which are available from Corixa, and which are described in U.S. Pat. No. 6,113,918; one such AGP is 2-[(R)-3-

tetradecanoyloxytetradecanoylamino]ethyl 2-Deoxy-4-O-phosphono-3-O-[(R)-3-tetradecanoyloxytetradecanoyl]-2-[(R)-3-- tetradecanoyloxytetradecanoylamino]- β -D-glucopyranoside, which is also known as 529 (formerly known as RC529), which is formulated as an aqueous form or as a stable emulsion

5 (5) synthetic polynucleotides such as oligonucleotides containing CpG motif(s) (U.S. Pat. No. 6,207,646); and

(6) cytokines, such as interleukins (e.g., IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, etc.), interferons (e.g., gamma interferon), granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), macrophage colony stimulating factor (M-CSF), tumor necrosis

10 factor (TNF), costimulatory molecules B7-1 and B7-2, etc; and

(7) complement, such as a trimer of complement component C3d.

In another embodiment, the adjuvant is a mixture of 2, 3, or more of the above adjuvants, e.g., SBAS2 (an oil-in-water emulsion also containing 3-deacylated monophosphoryl lipid A and QS21).

15 Muramyl peptides include, but are not limited to, N-acetyl-muramyl-L-threonyl-D-isoglutamine (thr-MDP), N-acetyl-normuramyl-L-alanine-2-(1'-2' dipalmitoyl-sn-glycero-3-hydroxyphosphoryloxy)-ethylamine (MTP-PE), etc.

In certain embodiments, the adjuvant is an aluminum salt. The aluminum salt adjuvant may be an alum-precipitated vaccine or an alum-adsorbed vaccine. Aluminum-salt

20 adjuvants are well known in the art and are described, for example, in Harlow, E. and D. Lane (1988; Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory) and Nicklas, W. (1992; Aluminum salts. Research in Immunology 143:489-493). The aluminum salt includes, but is not limited to, hydrated alumina, alumina hydrate, alumina trihydrate (ATH), aluminum hydrate, aluminum trihydrate, alhydrogel, Superfos, Amphogel, aluminum (III) hydroxide,

25 aluminum hydroxyphosphate sulfate (Aluminum Phosphate Adjuvant (APA)), amorphous alumina, trihydrated alumina, or trihydroxyaluminum.

APA is an aqueous suspension of aluminum hydroxyphosphate. APA is manufactured by blending aluminum chloride and sodium phosphate in a 1:1 volumetric ratio to precipitate aluminum hydroxyphosphate. After the blending process, the material is size-reduced

30 with a high-shear mixer to achieve a target aggregate particle size in the range of 2-8 μ m. The product is then diafiltered against physiological saline and steam sterilized.

In certain embodiments, a commercially available $\text{Al}(\text{OH})_3$ (e.g. Alhydrogel or Superfos of Denmark/Accurate Chemical and Scientific Co., Westbury, NY) is used to adsorb

proteins in a ratio of 50 - 200 g protein/mg aluminum hydroxide. Adsorption of protein is dependent, in another embodiment, on the pI (Isoelectric pH) of the protein and the pH of the medium. A protein with a lower pI adsorbs to the positively charged aluminum ion more strongly than a protein with a higher pI. Aluminum salts may establish a depot of Ag that is released slowly over a period of 2-3 weeks, be involved in nonspecific activation of macrophages and complement activation, and/or stimulate innate immune mechanism (possibly through stimulation of uric acid). See, e.g., Lambrecht *et al.*, 2009, *Curr Opin Immunol* 21:23.

Monovalent bulk aqueous conjugates are typically blended together and diluted to target 8 µg/mL for all serotypes except 6B, which will be diluted to target 16 µg/mL. Once diluted, the batch will be filter sterilized, and an equal volume of aluminum phosphate adjuvant added aseptically to target a final aluminum concentration of 250 µg/mL. The adjuvanted, formulated batch will be filled into single-use, 0.5 mL/dose vials.

In certain embodiments, the adjuvant is a CpG-containing nucleotide sequence, for example, a CpG-containing oligonucleotide, in particular, a CpG-containing oligodeoxynucleotide (CpG ODN). In another embodiment, the adjuvant is ODN 1826, which may be acquired from Coley Pharmaceutical Group.

"CpG-containing nucleotide," "CpG-containing oligonucleotide," "CpG oligonucleotide," and similar terms refer to a nucleotide molecule of 6-50 nucleotides in length that contains an unmethylated CpG moiety. See, e.g., Wang *et al.*, 2003, *Vaccine* 21:4297. In another embodiment, any other art-accepted definition of the terms is intended. CpG-containing oligonucleotides include modified oligonucleotides using any synthetic internucleoside linkages, modified base and/or modified sugar.

Methods for use of CpG oligonucleotides are well known in the art and are described, for example, in Sur *et al.*, 1999, *J Immunol.* 162:6284-93; Verthelyi, 2006, *Methods Mol Med.* 127:139-58; and Yasuda *et al.*, 2006, *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 23:89-110.

Administration/Dosage

The compositions and formulations of the present invention can be used to protect or treat a human susceptible to pneumococcal infection, by means of administering the vaccine via a systemic or mucosal route. In one embodiment, the present invention provides a method of inducing an immune response to a *S. pneumoniae* capsular polysaccharide conjugate, comprising administering to a human an immunologically effective amount of an immunogenic composition of the present invention. In another embodiment, the present invention provides a method of

vaccinating a human against a pneumococcal infection, comprising the step of administering to the human an immunologically effective amount of a immunogenic composition of the present invention.

"Effective amount" of a composition of the invention refers to a dose required to elicit antibodies that significantly reduce the likelihood or severity of infectivity of *S. pneumoniae* during a subsequent challenge.

The methods of the invention can be used for the prevention and/or reduction of primary clinical syndromes caused by *S. pneumoniae* including both invasive infections (meningitis, pneumonia, and bacteremia), and noninvasive infections (acute otitis media, and sinusitis).

Administration of the compositions of the invention can include one or more of: injection via the intramuscular, intraperitoneal, intradermal or subcutaneous routes; or via mucosal administration to the oral/alimentary, respiratory or genitourinary tracts. In one embodiment, intranasal administration is used for the treatment of pneumonia or otitis media (as nasopharyngeal carriage of pneumococci can be more effectively prevented, thus attenuating infection at its earliest stage).

The amount of conjugate in each vaccine dose is selected as an amount that induces an immunoprotective response without significant, adverse effects. Such amount can vary depending upon the pneumococcal serotype. Generally, each dose will comprise 0.1 to 100 µg of each polysaccharide, particularly 0.1 to 10 µg, and more particularly 1 to 5 µg. For example, each dose can comprise 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, or 750 ng or 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7.5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 20, 22, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, or 100 µg.

Optimal amounts of components for a particular vaccine can be ascertained by standard studies involving observation of appropriate immune responses in subjects. For example, in another embodiment, the dosage for human vaccination is determined by extrapolation from animal studies to human data. In another embodiment, the dosage is determined empirically.

In one embodiment, the dose of the aluminum salt is 10, 15, 20, 25, 30, 50, 70, 100, 125, 150, 200, 300, 500, or 700 µg, or 1, 1.2, 1.5, 2, 3, 5 mg or more. In yet another embodiment, the dose of alum salt described above is per µg of recombinant protein.

In a particular embodiment of the present invention, the PCV-15 vaccine is a sterile liquid formulation of pneumococcal capsular polysaccharides of serotypes 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F and 33F individually conjugated to CRM₁₉₇. Each 0.5

mL dose is formulated to contain: 2 µg of each saccharide, except for 6B at 4 µg; about 32 µg CRM₁₉₇ carrier protein (e.g., 32 µg ± 5 µg, ± 3 µg, ± 2 µg, or ± 1 µg); 0.125 mg of elemental aluminum (0.5 mg aluminum phosphate) adjuvant; and sodium chloride and L-histidine buffer. The sodium chloride concentration is about 150 mM (e.g., 150 mM ± 25 mM, ± 20 mM, ± 15 mM, ± 10 mM, or ± 5 mM) and about 20 mM (e.g., 20 mM ± 5 mM, ± 2.5 mM, ± 2 mM, ± 1 mM, or ± 0.5 mM) L-histidine buffer.

According to any of the methods of the present invention and in one embodiment, the subject is human. In certain embodiments, the human patient is an infant (less than 1 year of age), toddler (approximately 12 to 24 months), or young child (approximately 2 to 5 years). In other embodiments, the human patient is an elderly patient (> 65 years). The compositions of this invention are also suitable for use with older children, adolescents and adults (e.g., aged 18 to 45 years or 18 to 65 years).

In one embodiment of the methods of the present invention, a composition of the present invention is administered as a single inoculation. In another embodiment, the vaccine is administered twice, three times or four times or more, adequately spaced apart. For example, the composition may be administered at 1, 2, 3, 4, 5, or 6 month intervals or any combination thereof. The immunization schedule can follow that designated for pneumococcal vaccines. For example, the routine schedule for infants and toddlers against invasive disease caused by *S. pneumoniae* is 2, 4, 6 and 12-15 months of age. Thus, in a preferred embodiment, the composition is administered as a 4-dose series at 2, 4, 6, and 12-15 months of age.

The compositions of this invention may also include one or more proteins from *S. pneumoniae*. Examples of *S. pneumoniae* proteins suitable for inclusion include those identified in International Patent Application Publication Nos. WO 02/083855 and WO 02/053761.

Formulations

The compositions of the invention can be administered to a subject by one or more method known to a person skilled in the art, such as parenterally, transmucosally, transdermally, intramuscularly, intravenously, intra-dermally, intra-nasally, subcutaneously, intra-peritoneally, and formulated accordingly.

In one embodiment, compositions of the present invention are administered via epidermal injection, intramuscular injection, intravenous, intra-arterial, subcutaneous injection, or intra-respiratory mucosal injection of a liquid preparation. Liquid formulations for injection include solutions and the like.

The composition of the invention can be formulated as single dose vials, multi-dose vials or as pre-filled syringes.

In another embodiment, compositions of the present invention are administered orally, and are thus formulated in a form suitable for oral administration, i.e., as a solid or a liquid preparation. Solid oral formulations include tablets, capsules, pills, granules, pellets and the like. Liquid oral formulations include solutions, suspensions, dispersions, emulsions, oils and the like.

Pharmaceutically acceptable carriers for liquid formulations are aqueous or non-aqueous solutions, suspensions, emulsions or oils. Examples of nonaqueous solvents are propylene glycol, polyethylene glycol, and injectable organic esters such as ethyl oleate. Aqueous carriers include water, alcoholic/aqueous solutions, emulsions or suspensions, including saline and buffered media. Examples of oils are those of animal, vegetable, or synthetic origin, for example, peanut oil, soybean oil, olive oil, sunflower oil, fish-liver oil, another marine oil, or a lipid from milk or eggs.

The pharmaceutical composition may be isotonic, hypotonic or hypertonic. However it is often preferred that a pharmaceutical composition for infusion or injection is essentially isotonic, when it is administered. Hence, for storage the pharmaceutical composition may preferably be isotonic or hypertonic. If the pharmaceutical composition is hypertonic for storage, it may be diluted to become an isotonic solution prior to administration.

The isotonic agent may be an ionic isotonic agent such as a salt or a non-ionic isotonic agent such as a carbohydrate. Examples of ionic isotonic agents include but are not limited to NaCl, CaCl₂, KCl and MgCl₂. Examples of non-ionic isotonic agents include but are not limited to mannitol, sorbitol and glycerol.

It is also preferred that at least one pharmaceutically acceptable additive is a buffer. For some purposes, for example, when the pharmaceutical composition is meant for infusion or injection, it is often desirable that the composition comprises a buffer, which is capable of buffering a solution to a pH in the range of 4 to 10, such as 5 to 9, for example 6 to 8.

The buffer may for example be selected from the group consisting of TRIS, acetate, glutamate, lactate, maleate, tartrate, phosphate, citrate, carbonate, glycinate, histidine, glycine, succinate and triethanolamine buffer.

The buffer may furthermore for example be selected from USP compatible buffers for parenteral use, in particular, when the pharmaceutical formulation is for parenteral use. For example the buffer may be selected from the group consisting of monobasic acids such as acetic,

benzoic, gluconic, glyceric and lactic; dibasic acids such as aconitic, adipic, ascorbic, carbonic, glutamic, malic, succinic and tartaric, polybasic acids such as citric and phosphoric; and bases such as ammonia, diethanolamine, glycine, triethanolamine, and TRIS.

Parenteral vehicles (for subcutaneous, intravenous, intraarterial, or intramuscular injection) include sodium chloride solution, Ringer's dextrose, dextrose and sodium chloride, lactated Ringer's and fixed oils. Intravenous vehicles include fluid and nutrient replenishers, electrolyte replenishers such as those based on Ringer's dextrose, and the like. Examples are sterile liquids such as water and oils, with or without the addition of a surfactant and other pharmaceutically acceptable adjuvants. In general, water, saline, aqueous dextrose and related sugar solutions, glycols such as propylene glycols or polyethylene glycol, and Polysorbate-80 are preferred liquid carriers, particularly for injectable solutions. Examples of oils are those of animal, vegetable, or synthetic origin, for example, peanut oil, soybean oil, olive oil, sunflower oil, fish-liver oil, another marine oil, or a lipid from milk or eggs.

The formulations of the invention may also contain a surfactant. Preferred surfactants include, but are not limited to: the polyoxyethylene sorbitan esters surfactants (commonly referred to as the Tweens), especially polysorbate 20 and polysorbate 80; copolymers of ethylene oxide (EO), propylene oxide (PO), and/or butylene oxide (BO), sold under the DOWFAX™ tradename, such as linear EO/PO block copolymers; octoxynols, which can vary in the number of repeating ethoxy (oxy-1,2-ethanediyl) groups, with octoxynol-9 (Triton X-100, or t-octylphenoxypolyethoxyethanol) being of particular interest; (octylphenoxy)polyethoxyethanol (IGEPAL CA-630/NP-40); phospholipids such as phosphatidylcholine (lecithin); nonylphenol ethoxylates, such as the Tergitol™ NP series; polyoxyethylene fatty ethers derived from lauryl, cetyl, stearyl and oleyl alcohols (known as Brij surfactants), such as triethyleneglycol monolauryl ether (Brij 30); and sorbitan esters (commonly known as the SPANs), such as sorbitan trioleate (Span 85) and sorbitan monolaurate. A preferred surfactant for including in the emulsion is Tween 80 (polyoxyethylene sorbitan monooleate).

Mixtures of surfactants can be used, e.g. Tween 80/Span 85 mixtures. A combination of a polyoxyethylene sorbitan ester such as polyoxyethylene sorbitan monooleate (Tween 80) and an octoxynol such as t-octylphenoxypolyethoxyethanol (Triton X-100) is also suitable. Another useful combination comprises laureth 9 plus a polyoxyethylene sorbitan ester and/or an octoxynol.

Preferred amounts of surfactants (% by weight) are: polyoxyethylene sorbitan esters (such as Tween 80) 0.01 to 1%, in particular about 0.1 %; octyl- or nonylphenoxy

polyoxyethanols (such as Triton X-100, or other detergents in the Triton series) 0.001 to 0.1 %, in particular 0.005 to 0.02%; polyoxyethylene ethers (such as laureth 9) 0.1 to 20 %, preferably 0.1 to 10 % and in particular 0.1 to 1 % or about 0.5%.

In another embodiment, the pharmaceutical composition is delivered in a controlled release system. For example, the agent can be administered using intravenous infusion, a transdermal patch, liposomes, or other modes of administration. In another embodiment, polymeric materials are used; e.g. in microspheres in or an implant.

Also comprehended by the invention are compounds modified by the covalent attachment of water-soluble polymers such as polyethylene glycol, copolymers of polyethylene glycol and polypropylene glycol, carboxymethyl cellulose, dextran, polyvinyl alcohol, polyvinylpyrrolidone or polyproline. Such modifications may increase the compound's solubility in aqueous solution, eliminate aggregation, enhance the physical and chemical stability of the compound, and greatly reduce the reactogenicity of the compound. In another embodiment, the desired *in vivo* biological activity is achieved by the administration of such polymer-compound adducts less frequently or in lower doses than with the unmodified compound.

In a preferred embodiment, the vaccine composition is formulated in L-histidine buffer with sodium chloride.

Having described various embodiments of the invention with reference to the accompanying description and drawings, it is to be understood that the invention is not limited to those precise embodiments, and that various changes and modifications may be effected therein by one skilled in the art without departing from the scope or spirit of the invention as defined in the appended claims.

The following examples illustrate, but do not limit the invention.

EXAMPLES

EXAMPLE 1: Preparation of *S. Pneumoniae* Capsular Polysaccharides

Methods of culturing pneumococci are well known in the art. See, e.g., Chase, 1967, *Methods of Immunology and Immunochemistry* 1:52. Methods of preparing pneumococcal capsular polysaccharides are also well known in the art. See, e.g., European Patent No. EP0497524. Isolates of pneumococcal subtypes are available from the ATCC.

The bacteria are identified as encapsulated, non-motile, Gram-positive, lancet-shaped diplococci that are alpha-hemolytic on blood-agar. Subtypes are differentiated on the basis of Quelling reaction using specific antisera. See, e.g., U.S. Pat. No. 5,847,112.

Cell Banks

5 Cell banks representing each of the *S. pneumococcus* serotypes present in PCV-15 were obtained from the Merck Culture Collection (Rahway, NJ) in a frozen vial.

Inoculation

A thawed seed culture was transferred to the seed fermentor containing an appropriate pre-sterilized growth media.

10 Seed Fermentation

The culture was grown in the seed fermentor with temperature and pH control. The entire volume of the seed fermentor was transferred to the production fermentor containing pre-sterilized growth media.

Production Fermentation

15 The production fermentation was the final cell growth stage of the process. Temperature, pH and the agitation rate was controlled.

Inactivation

The fermentation process was terminated via the addition of an inactivating agent. After inactivation, the batch was transferred to the inactivation tank where it was held at
20 controlled temperature and agitation.

Purification

Cell debris was removed using a combination of centrifugation and filtration. The batch was ultrafiltered and diafiltered. The batch was then subjected to solvent-based fractionations that remove impurities and recover polysaccharide.

25 EXAMPLE 2: Preparation of Pneumococcal Polysaccharide-CRM₁₉₇ Conjugates

Activation Process

The different serotype saccharides are individually conjugated to the purified CRM₁₉₇ carrier protein using a common process flow. In this process the saccharide is dissolved, sized to a target molecular mass, chemically activated and buffer-exchanged by ultrafiltration.

30 The purified CRM₁₉₇ is then conjugated with the activated saccharide and the resulting conjugate is purified by ultrafiltration prior to a final 0.2 µm membrane filtration. Several process

parameters within each step, such as pH, temperature, concentration, and time are serotype-specific as described in this example.

Step 1: Dissolution

Purified polysaccharide was dissolved in water to a concentration of 2 – 3 mg/mL.

5 The dissolved polysaccharide was passed through a mechanical homogenizer with pressure preset from 0-1000 bar. Following size reduction, the saccharide was concentrated and diafiltered with sterile water on a 10 kDa MWCO ultrafilter. The permeate was discarded and the retentate was adjusted to a pH of 4.1 with a sodium acetate buffer, 50 mM final concentration. For serotypes 4 and 5, 100 mM sodium acetate at pH 5.0 was used. For serotype 10 4, the solution was incubated at $50^{\circ} \pm 2^{\circ}$ C. Hydrolysis was stopped by cooling to 20 - 24° C.

Step 2: Periodate Reaction

The required sodium periodate molar equivalents for pneumococcal saccharide activation was determined using total saccharide content. With thorough mixing, the oxidation was allowed to proceed between 3 – 20 hours at 20 - 24° C for all serotypes except 5, 7F, and 15 19F for which the temperature was 2 - 6° C.

Step 3: Ultrafiltration

The oxidized saccharide was concentrated and diafiltered with 10 mM potassium phosphate, pH 6.4 (10 mM sodium acetate, pH 4.3 for serotype 5) on a 10 kDa MWCO ultrafilter. The permeate was discarded and the retentate was adjusted to a pH of 6.3 – 8.4 by 20 addition of 3 M potassium phosphate buffer.

Conjugation Process

Step 1: Conjugation Reaction

25 The concentrated saccharide was mixed with CRM₁₉₇ carrier protein in a 0.2 – 2 to 1 charge ratio. The blended saccharide-CRM₁₉₇ mixture was filtered through a 0.2 µm filter.

The conjugation reaction was initiated by adding a sodium cyanoborohydride solution to achieve 1.8 – 2.0 moles of sodium cyanoborohydride per mole of saccharide. The reaction mixture was incubated for 48 – 120 hours at 20 - 24° C (8 - 12° C for serotypes 3, 5, 6A, 7F, 19A, and 19F).

30

Step 2: Borohydride Reaction

At the end of the conjugation incubation the reaction mixture was adjusted to 4 - 8° C, and a pH of 8 – 10 with either 1.2 M sodium bicarbonate buffer or 3 M potassium phosphate buffer (except serotype 5). The conjugation reaction was stopped by adding the sodium borohydride solution to achieve 0.6 – 1.0 moles of sodium borohydride per mole of saccharide (0 moles of borohydride added for serotype 5). The reaction mixture was incubated for 45 – 60 minutes.

Step 3: Ultrafiltration Steps

The reaction mixture was diafiltered on a 100 kDa MWCO ultrafilter with a minimum of 20 volumes of 100 mM potassium phosphate, pH 8.4 buffer. The retentate from the 100 kDa ultrafilter was diafiltered on a 300 kDa MWCO ultrafilter with a minimum of 20 diavolumes of 150 mM sodium chloride at 20 - 24° C. The permeate was discarded.

Step 4: Sterile Filtration

The retentate from the 300 kDa MWCO diafiltration was filtered through a 0.2 µm filter and filled into borosilicate glass containers at appropriate volumes for release testing, in-process controls, and formulation (except serotype 19F). The serotype 19F conjugate was passed through a 0.2 µm filter into a holding tank and incubated at 20 - 24°C. Following incubation, the conjugate was diafiltered on a 300 kDa MWCO ultrafilter with a minimum of 20 diavolumes of 150 mM sodium chloride at 20 - 24° C. The permeate was discarded, and the retentate was filtered through a 0.2 µm filter and filled into borosilicate glass containers at appropriate volumes for release testing, in-process controls, and formulation. The final bulk concentrates were stored at 2 - 8° C.

EXAMPLE 3: Formulation of a 15-valent Pneumococcal Conjugate Vaccine

The required volumes of bulk concentrates were calculated based on the batch volume and the bulk saccharide concentrations. The combined 15 conjugates were further diluted to a target adsorption concentration by the addition of a sodium chloride and L-histidine, pH 5.8, containing buffer. After sufficient mixing, the blend was sterile filtered through a 0.2 µm membrane. The sterile formulated bulk was mixed gently during and following its blending with bulk aluminum phosphate. The formulated vaccine was stored at 2 – 8° C.

In an alternate process, the combined 15 conjugates were further diluted to a target concentration by the addition of a sodium chloride and L-histidine, pH 5.8, containing buffer. Polysorbate 80 was added to a final concentration of 0.005%, to the diluted buffered conjugate

mixture prior to sterile filtration. Following sterile filtration, the formulated vaccine was stored at 2 – 8° C.

Table 1 shows the final composition of the adjuvanted and non-adjuvanted form of PCV-15.

Table 1: Composition of Adjuvanted and Non-Adjuvanted 15—valent Pneumococcal Conjugate Vaccine Formulations

Description of Ingredients		Clinical Formulations, unit/0.5 mL dose	
		Adjuvanted PCV-15	Non-adjuvanted PCV-15
Active Ingredients	Pneumococcal polysaccharide antigens	32 µg of total polysaccharide (2 µg of each of the following polysaccharide serotypes 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F; 4 µg of serotype 6B polysaccharide)	32 µg of total polysaccharide (2 µg of each of the following polysaccharide serotypes 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F; 4 µg of serotype 6B polysaccharide))
	Carrier protein CRM ₁₉₇	~ 32 µg	~32µg
Other Ingredients	Aluminum (µg) ^a	125	0
	Polysorbate-80 (µg)	0	2.5
	L-histidine (mM)	20	20
	Sodium Chloride (mM)	150	150
	Water for Injection	Q.S. ^b	Q.S. ^b
^a Quantity of elemental aluminum in APA. ^b Quantify sufficient to 0.5 mL.			

EXAMPLE 4: Immunogenicity Studies

Experiments were designed to evaluate the immunogenicity of multiple formulations of pneumococcal conjugate vaccines in the infant rhesus monkeys (IRM) and New Zealand White Rabbits (NZWR) animal models. Experiments in infant rhesus monkeys were designed to closely match the recommended schedule for pneumococcal conjugate vaccine in United States, with the infant series given at 2, 4, and 6 months of age. Thus, infant rhesus

monkeys were immunized starting at 2-3 months of age and administered vaccine at 2-month intervals. The 4th dose, which is also part of the recommended schedule for U.S. children was not administered. Adult rabbits (NZWR) were used to evaluate multiple vaccine formulations. NZWR studies were performed using two vaccine doses given in an accelerated (2-week
5 interval) immunization regimen. For the preclinical evaluation of immune responses, a full human dose was delivered to rabbits whereas infant monkeys received a half-human dose. The rationale for selecting a half-human dose for infant monkeys was due to limitations in the volume that can be administered to infant rhesus monkeys in a single intramuscular site.

Assessment of Serotype-specific IgG Responses

10 A multiplexed electrochemiluminescence (ECL) assay was developed for use with rabbit and rhesus monkey serum based on a human assay using Meso Scale Discovery (MSD) technology which utilizes a SULFO-TAG™ label that emits light upon electrochemical stimulation. See Marchese *et al.*, 2009, Clin Vaccine Immunol 16:387-96. Using a dedicated ECL plate reader, an electrical current is placed across the plate-associated electrodes resulting in
15 a series of electrically induced reactions leading to luminescent signal. The multi-spot configuration used in development and validation was 10 spots/well in a 96-well plate – format, and each well was coated with 5 ng pneumococcal (Pn) polysaccharide (Ps) per spot. Two plate formats were used to ensure that crossreacting polysaccharides (i.e., 6A and 6B, and 19A and 19F) were tested in separate plates. Plate format 1 contained serotypes 3, 4, 6B, 9V, 14, 18C,
20 19F, and 23F whereas plate format 2 contained serotypes 1, 5, 6A, 7F, 19A, 22F and 33F. Each well also contained two bovine serum albumin (BSA) spots which were used to assess the background reactivity of the assay (i.e., the response associated with serum and labeled secondary antibody in the absence of PnPs). Assay standard (89SF-2), controls, and test sera were diluted to appropriate levels in phosphate buffered saline (PBS) containing 0.05% Tween
25 20, 1% BSA, 5 µg/ml C-polysaccharide (CPs), 10 µg/ml serotype 25 polysaccharide (PnPs25) and 10 µg/ml serotype 72 polysaccharide (PnPs72) and incubated overnight at 4°C (2 to 8°C) or at ambient temperature for 45 minutes. Human antibody reagents and standards were used when testing the infant monkey samples whereas SULFO-TAG™-labeled anti-rabbit IgG was used as the secondary antibody when testing rabbit serum samples. Each antigen coated plate was
30 incubated at ambient temperature for 1 hour on a shaker platform with blocking agent. Plates were washed with 0.05% PBS-T and 25 µL per well of the pre-adsorbed and diluted test sera was added and incubated for 45 min at ambient temperature on a shaker platform. Plates were washed with 0.05% PBS-T and then MSD SULFO-TAG™ labeled-goat anti-human IgG

secondary antibody (for rhesus monkey serum) and labeled goat anti-rabbit IgG secondary antibody (for rabbit serum) was added to each well and incubated 1 hour at ambient temperature on a shaker platform. Plates were washed with 0.05% PBS-T and 150 μ L of MSD Read Buffer-T 4X (with surfactant) diluted 1:4 in water added to each well. The plates were read using a MSD Sector Imager Model No. 2400 or 6000. For rabbit studies, the results are presented as geometric mean titers (GMTs) or ratios of GMTs. For infant rhesus monkey studies, the results were expressed as geometric mean concentrations read from a standard curve using the serotype-specific IgG concentrations assigned to the human reference standard (89 SF-2).

Assessment of Functional (Opsonophagocytic) Responses

Samples from infant rhesus monkey study 2 were tested in a 4-plexed MOPA assay (MOPA-4). See Burton *et al.*, 2006, Clin Vaccine Immunol 13:1004-9. The assay uses bacterial strains selected to be resistant to one of 4 antibiotics so that the first part of the assay (opsonization and uptake into differentiated HL-60 cells) can be performed with up to 4 serotypes at a time. The read-out for bacterial killing is done in parallel in the presence of each of the 4 antibiotics to which the corresponding strains are resistant in order to determine killing titers for each specific serotype. Results are expressed as the reciprocal dilution at which 50% killing is observed (after interpolation).

Statistical Methodology for Preclinical Studies

Both animal models have limitations related to sample size. In general, 8 infant monkeys or 8 rabbits were used per study arm. With 8 animals per arm a critical fold difference in geometric mean titer between treatment arms of 2.5 fold was regarded as a meaningful response threshold. The 2.5-fold difference was determined based on the assumption that for each serotype, the standard deviation of the natural log transformed titers within a treatment arm is $\ln(2)$. Letting $\bar{Y}_i$ denote the mean of the $\ln$ transformed titers in the i^{th} treatment arm, n_i the number of animals within the i^{th} treatment arm, σ_i^2 the known variance of the $\ln$ transformed titers among animals within the i^{th} treatment arm, and setting $n_i = 8$ and $\sigma_i^2 = (\ln(2))^2$ for all i ,

then the value of 2.5 is obtained by solving for $e^{\bar{Y}_j - \bar{Y}_k}$ where $\frac{\bar{Y}_j - \bar{Y}_k}{\sqrt{\frac{\sigma_j^2}{n_j} + \frac{\sigma_k^2}{n_k}}} = Z_{0.995}$, and $Z_{0.995}$

denotes the inverse of the standard normal cumulative distribution, with a probability of 0.995 (i.e., $Z_{0.995} = 2.576$). Note that the calculated value of 2.44 is rounded to 2.5 as 2.5 also provides for a convenient reciprocal in 0.4.

Serotype-specific IgG Response of Infant Rhesus Monkeys (IRMs) to PCV-15

A pilot immunogenicity study (IRM-1) was conducted to determine whether infant rhesus monkeys (IRMs) would be a good model in which to evaluate Pn polysaccharide CRM₁₉₇ conjugate vaccines. The primary goal of the experiment was to determine whether IRMs (like human infants) would be unresponsive to free Pn polysaccharides but respond well to conjugate vaccines. Groups of 5 IRMs were injected starting at 2-3 months of age with either Pn polysaccharide, Prevnar[®] or PCV-15. Three doses of vaccine were administered intramuscularly (IM) at 2 month intervals, and serotype-specific IgG responses were measured prior to the first dose and at 1 month postdose 2 and at 1 month postdose 3 using a multiarray electrochemiluminescence (ECL) assay (data not shown).

The results indicated that IRMs responded poorly, if at all, to free Pn polysaccharide but very well to the conjugate vaccines. The results indicated that induction of an IgG response to Pn polysaccharides in infant rhesus monkeys was dependent upon conjugation of the polysaccharides to a carrier protein and therefore was a classic T-cell dependent response. Thus, the IRM model was determined to be suitable for evaluating PCV-15 formulations.

A second study (IRM-2) was conducted to evaluate a formulation of PCV-15 using a bulk conjugation process that minimized free (unconjugated) polysaccharide and unconjugated CRM₁₉₇. Figure 1 shows the postdose 2 (PD-2) and postdose 3 (PD-3) IgG responses to PCV-15 versus Prevnar[®] for the 7 serotypes contained in Prevnar[®] (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F). PD-2 responses to PCV-15 were equivalent or slightly lower than the corresponding responses to Prevnar[®] whereas PD-3 responses to PCV-15 were somewhat higher than those elicited by Prevnar[®] for nearly all serotypes.

IRM responses to the non-Prevnar serotypes in PCV-15 are shown in Figure 2. PD-2 responses to the non-Prevnar serotypes in PCV-15 were all at least 10-fold higher than baseline (pre-vaccination) IgG concentrations, and titers continued to rise at PD-3.

The results indicate that antibody responses to PCV-15 and Prevnar[®] were comparable for the 7 common serotypes and that post-vaccination responses to PCV-15 were > 10-fold higher than baseline for the 8 added serotypes.

Functional (Opsonophagocytic) Immune Response of IRMs to PCV-15

In order to determine whether PCV-15 induced functional antibody responses in infant monkeys, an opsonophagocytic killing (OPA) assay was performed on sera from IRM-2. Pre-vaccination, PD-2, and PD-3 responses to PCV-15 and Prevnar[®] are shown in Table 2. The results shown are the GMTs from serum samples from 7-8 monkeys per time point assayed in

duplicate. Also shown are the percent responders (i.e., those with OPA titers ≥ 8) at the PD-3 time point. PCV-15 induced a high PD-2 GMT for all serotypes except types 1 and 33F. After 3 vaccine doses, PCV-15 induced high OPA GMTs to each serotype and a 100% OPA response rate for all 15 serotypes contained in the vaccine. Of note, PCV-15 also induced a good crossreactive OPA response to serotype 6C, which is not in the vaccine. Prevnar[®] induced high OPA titers and a 100% response rate for all serotypes contained in that vaccine, but it induced only a weak crossreactive response to serotypes 6A and 6C in a fraction of monkeys.

Table 2: Serotype-Specific OPA GMTs in Infant Rhesus Monkeys after Vaccination with PCV-15 or Prevnar[®]
(Pre-vaccination, PD-2, and PD-3 geometric mean titers and PD-3 percent responders with a titer ≥ 8)

Serotype	Prevnar				PCV-15			
	Pre	PD-2	PD-3	PD-3 Responders (titers ≥ 8)	Pre	PD-2	PD-3	PD-3 Responders (titers ≥ 8)
1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4	65	340	100%
3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5	1442	1548	100%
4	4	11459	5004	100%	4	5280	3453	100%
5	4	4	4	0%	4	1879	1719	100%
6A	4	21	113	57%	4	1188	7807	100%
6B	8	8294	6043	100%	4	2477	9601	100%
<i>6C</i>	4	<i>11</i>	<i>16</i>	<i>29%</i>	4	<i>1038</i>	<i>5134</i>	<i>100%</i>
7F	4	4	71	43%	4	7541	10092	100%
9V	4	1779	748	100%	4	625	1297	100%
14	8	12395	7782	100%	4	11366	9891	100%
18C	4	5571	1718	100%	4	1934	1701	100%
19A	4	15	4	0%	4	2210	1895	100%
19F	4	1365	432	100%	4	2555	4021	100%
22F	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4	2489	7298	100%
23F	4	1789	2126	100%	4	3093	2465	100%
33F	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4	14	11548	100%
Note: Serotypes contained in Prevnar are bolded. Results for serotype 6C are shown in italics since that serotype is not contained in PCV-15. n.d. not determined								

Evaluation of PCV-15 Formulations in New Zealand White Rabbits

PCV-15 formulations were evaluated in 4 studies in adult New Zealand White Rabbits (NZWRs) using a compressed immunization regimen in which rabbits received a full human dose of vaccine at day 0 and day 14, and serum was collected at day 0, 14 and 28 for

analysis. All studies were benchmarked with Prevnar[®], and as summarized in Table 3 (NZWR Experiments 1-4).

Results are shown in Table 3 for Post-dose 2 responses of New Zealand white rabbits expressed as a ratio of the geometric mean IgG responses to Merck PCV-15 over Prevnar[®] for serotypes in common between the vaccines.

Table 3

Post-dose 2 IgG Response Ratios (PCV-15:Prevnar[™]) of Lead PCV-15 Formulations Tested in NZWR

Serotype	NZWR-1	NZWR-2	NZWR-3	NZWR-4
4	0.70	0.59	0.63	1.06
6B	1.35	0.49	1.53	0.45
9V	2.07	1.79	1.70	1.31
14	2.37	0.58	2.32	2.55
18C	0.87	0.6	0.52	0.27
19F	0.66	0.76	2.70	1.25
23F	0.36	0.30	1.22	0.41

Serotype-specific IgG responses were generally within 2.5-fold of the corresponding responses to Prevnar[®]. An exception was serotype (23F), which was > 2.5-fold lower than that to Prevnar[®] in 2 of 4 experiments. The fold-rise in antibody levels to the non-Prevnar[®] serotypes from Day 0 to Day 28 (Post-dose 2, PD-2) are summarized in Table 4.

Table 4

Fold-rise (Post-dose 2:Pre-dose 1) in IgG Responses to Non-Prevnar[™] Serotypes of PCV-15 Lead Formulations Tested in NZWR

Serotype	NZWR-1	NZWR-2	NZWR-3	NZWR-4
1	14.9	30.5	55.1	59.9
3	33.6	16.2	61.5	28.5
5	12.8	70.2	112.0	134.0
6A	21.3	77.8	143.0	123.0
7F	42.0	83.8	194.0	108.0
19A	40.5	79.1	450.0	314.0
22F	45.7	87.8	243.0	135.0

33F	21.7	47.9	98.8	69.4
-----	------	------	------	------

Effect of Polysaccharide Conjugate Vaccine Dose on Immunogenicity in NZWRs

The immunogenicity of an increased dose (double dose, 2x) of polysaccharide conjugates was also evaluated for all serotypes contained in PCV-15 compared with the planned human dose (1x) of the vaccine. For the 2x polysaccharide conjugate formulation, the APA concentration was increased to 1.5x in order to assure that most of the conjugate would be bound to the aluminum adjuvant. As shown in Table 5, there did not appear to be a significant benefit in increasing the amount of polysaccharide-conjugate in the vaccine. Differences across all serotypes were within 2-fold., and the geometric mean fold-ratio (1x PCV-15/2X PCV-15 +1.5X APA) was 1.1.

Table 5

Post-dose 2 Geometric Mean IgG titers (95% confidence intervals) with Prevnar[®], 1x Human dose of PCV-15* or 2x Human Dose of PCV-15[†] in NZWR

Serotype	Treatment Arm			Fold-Difference
	Prevnar TM (n=8)	1x PCV-15 (n=8)	2x PCV-15 (n=8)	Ratio of 2x PCV- 15/1x PCV- 15
4	736,400 (483200, 1122400)	436,000 (199700, 951700)	472,100 (246800, 902900)	1.1
6B	363,600 (205000, 644800)	176,500 (72800, 427800)	196,900 (85900, 451400)	1.1
9V	298,200 (173800, 511700)	534,700 (362800, 788100)	580,600 (366300, 920200)	1.1
14	345,200 (200200, 595000)	198,900 (94500, 418700)	273,600 (229500, 326100)	1.4
18C	954,500 (815700, 1116800)	573,000 (396900, 827400)	455,900 (245100, 848000)	0.8
19F	720,100 (475700, 1090200)	548,000 (367700, 816800)	544,300 (269000, 1101400)	1.0
23F	816,300 (565100, 1179100)	246,200 (117200, 517100)	188,500 (78100, 454800)	0.8
1	5,300	91,500	72,200	0.8

	(3100, 9200)	(62600, 133600)	(46700, 111600)	
3	12,000	32,300	23,600	0.7
	(8600, 16800)	(19600, 53000)	(14100, 39400)	
5	5,700	245,600	224,600	0.9
	(4100, 7900)	(114200, 528200)	(136700, 369100)	
6A	525,900	186,700	251,800	1.3
	(275000, 1005600)	(71300, 488600)	(102300, 620100)	
7F	4,600	326,900	212,200	0.6
	(4000, 5200)	(238000, 449000)	(134200, 335500)	
19A	432,800	260,900	276,100	1.1
	(237800, 787800)	(145500, 468000)	(153200, 497600)	
22F	6,000	359,800	345,300	1.0
	(4400, 8100)	(239000, 541700)	(221200, 539000)	
33F	6,600	177,400	138,500	0.8
	(4700, 9300)	(118300, 266200)	(68300, 280900)	

*Formulated with 1x aluminum adjuvant (APA)

† Formulated with 1.5x APA

Effect of Aluminum Adjuvant on Immunogenicity of PCV-15 in NZWRs

5 The impact of aluminum adjuvant (APA) on antibody responses was evaluated in one rabbit study. PCV-15 formulated with the planned human dose of APA (PCV-15 1x APA), with double the planned human dose of APA (PCV-15 2x APA), and without any aluminum adjuvant (PCV-15 0x APA), were tested. A Prevnar[®] group was also included in the study.

10 The PD-2 results indicated that doubling the concentration of APA had little impact on the serotype-specific IgG response to PCV-15. The fold-difference in titer (1x APA/2x APA) ranged from 0.6 (serotype 6B) to 2.3 (serotype 22F) and geometric mean fold-ratio across the 15 serotypes was 1.1. In the absence of aluminum adjuvant antibody titers appeared lower for many of the serotypes relative to PCV-15 with 1x APA. The fold-difference in titer (1x/0x) ranged from 0.5 (serotype 5) to 2.9 (serotype 23F) and the geometric mean fold-ratio across the 15 serotypes was 1.4. Overall, there does not appear to be a genuine advantage to doubling the level of aluminum adjuvant and there appears to be a disadvantage to eliminating the adjuvant (Table 6) in this animal model.

15 The PD-2 results indicated that there was a decrease in antibody titers for many of the serotypes in the arm that did not contain Aluminum Phosphate Adjuvant (APA) when compared to PCV-15 containing APA (Figure 3) indicating a requirement for the inclusion of an

20

aluminum adjuvant for optimal PCV-15 immunogenicity in rabbits. In addition, no benefit was found when double the amount of APA was included in the vaccine (data not shown).

Table 6

Post-dose 2 Geometric Mean IgG Titers (95% confidence intervals) of PCV-15 Formulated with 1x, 2x or 0x Aluminum Adjuvant (APA) in NZWR

	Treatment Arm				Fold Difference Relative to PCV- 15 (1x APA)	
	Prevnar™ (n=8)	PCV-15 1x APA (n=8)	PCV-15 2x APA (n=8)	PCV-15 0x APA (n=6)	1x/2x APA	1x/0x APA
Sero						
4	380,700 (226100, 641000)	268,400 (205100, 351200)	196,200 (84000, 458800)	404,600 (105500, 1550700)	1.4	0.7
6B	105,900 (59800, 187400)	143,300 (90700, 226300)	236,200 (102000, 547100)	93,800 (46300, 189700)	0.6	1.5
9V	271,600 (177400, 415700)	562,000 (382700, 825400)	595,600 (390200, 908900)	569,200 (239900, 1350500)	0.9	1.0
14	142,500 (75200, 269700)	337,600 (174000, 654900)	453,000 (237400, 864400)	167,600 (65100, 431700)	0.7	2.0
18C	323,000 (250400, 416500)	282,200 (210400, 378500)	248,700 (193900, 319000)	175,200 (91800, 334000)	1.1	1.6
19F	302,500 (232700, 393200)	199,800 (132200, 302100)	243,400 (87600, 676600)	127,700 (35100, 463700)	0.8	1.6
23F	328,200 (178200, 604300)	117,200 (60300, 227700)	77,600 (31300, 192300)	40,200 (10100, 160900)	1.5	2.9

1	5,600 (4400, 7200)	91,700 (46800, 179800)	67,800 (38900, 118100)	53,300 (14800, 191600)	1.4	1.7
3	6,300 (4800, 8100)	156,100 (104800, 232500)	155,700 (75300, 322200)	104,000 (45000, 240000)	1.0	1.5
5	4,800 (4000, 5700)	81,700 (50800, 131300)	60,700 (29100, 126400)	176,100 (72100, 430300)	1.3	0.5
6A	84,500 (50300, 141900)	163,600 (114000, 234900)	226,800 (92500, 556200)	99,300 (48800, 202000)	0.7	1.6
7F	5,200 (3300, 8400)	216,800 (141500, 332000)	282,100 (158200, 503200)	212,200 (64200, 701900)	0.8	1.0
19A	95,100 (54300, 166700)	238,300 (161000, 352700)	207,400 (69800, 615900)	125,700 (34000, 465100)	1.1	1.9
22F	6,500 (4900, 8500)	348,900 (267200, 455500)	149,400 (90100, 247600)	336,800 (184200, 615700)	2.3	1.0
33F	7,100 (5000, 10100)	235,600 (106500, 521300)	163,600 (92700, 288800)	222,000 (125100, 393800)	1.4	1.1

Discussion and Conclusions

The preclinical data demonstrate that a formulation of PCV-15 (formulated on APA) is highly immunogenic in two species (infant rhesus monkeys and rabbits). Serotype-specific responses to PCV-15 were comparable to those elicited by Prevnar[®] for the 7 serotypes in common between the vaccines. For the 8 new serotypes in PCV-15, there was a robust response elicited in both infant rhesus monkeys and in rabbits, with ≥ 10 -fold rise in IgG responses for all serotypes after 2 vaccine doses in both species. Limited dose-ranging experiments indicated that a 2-fold increase in the amount of polysaccharide conjugates did not result in an increased antibody response. Similarly, a 2-fold increase in aluminum adjuvant concentration did not appear to significantly improve the immunogenicity profile of PCV-15. Elimination of the adjuvant did, however, result in lower responses to some serotypes suggesting the potential need for an adjuvant in humans. Functional (OPA) antibody responses were elicited by PCV-15 to all 15 serotypes in the vaccine as well as to Serotype 6C, which is not a component of PCV-15.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An immunogenic composition comprising:

(1) a multivalent polysaccharide-protein conjugate mixture consisting of capsular polysaccharides from serotypes 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, and 33F of *Streptococcus pneumoniae* conjugated to a carrier protein; and

(2) a pharmaceutically acceptable carrier.

2. The immunogenic composition of claim 1, wherein the carrier protein is CRM₁₉₇.

3. The immunogenic composition of claim 1, further comprising an adjuvant.

4. The immunogenic composition claim 3, wherein the adjuvant is an aluminum-based adjuvant.

5. The immunogenic composition of claim 4, wherein the adjuvant is selected from the group consisting of aluminum phosphate, aluminum sulfate and aluminum hydroxide.

6. The immunogenic composition of claim 5, wherein the adjuvant is aluminum phosphate.

7. A method of inducing an immune response to a *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide, comprising administering to a human an immunologically effective amount of the immunogenic composition of claim 1.

8. The method of claim 7, wherein the immunogenic composition administered is a single 0.5 mL dose formulated to contain: 2 µg of each saccharide, except for 6B at 4 µg; about 32 µg CRM₁₉₇ carrier protein; 0.125 mg of elemental aluminum (0.5 mg aluminum phosphate) adjuvant; 150 mM sodium chloride and 20 mM L-histidine buffer.

1/3

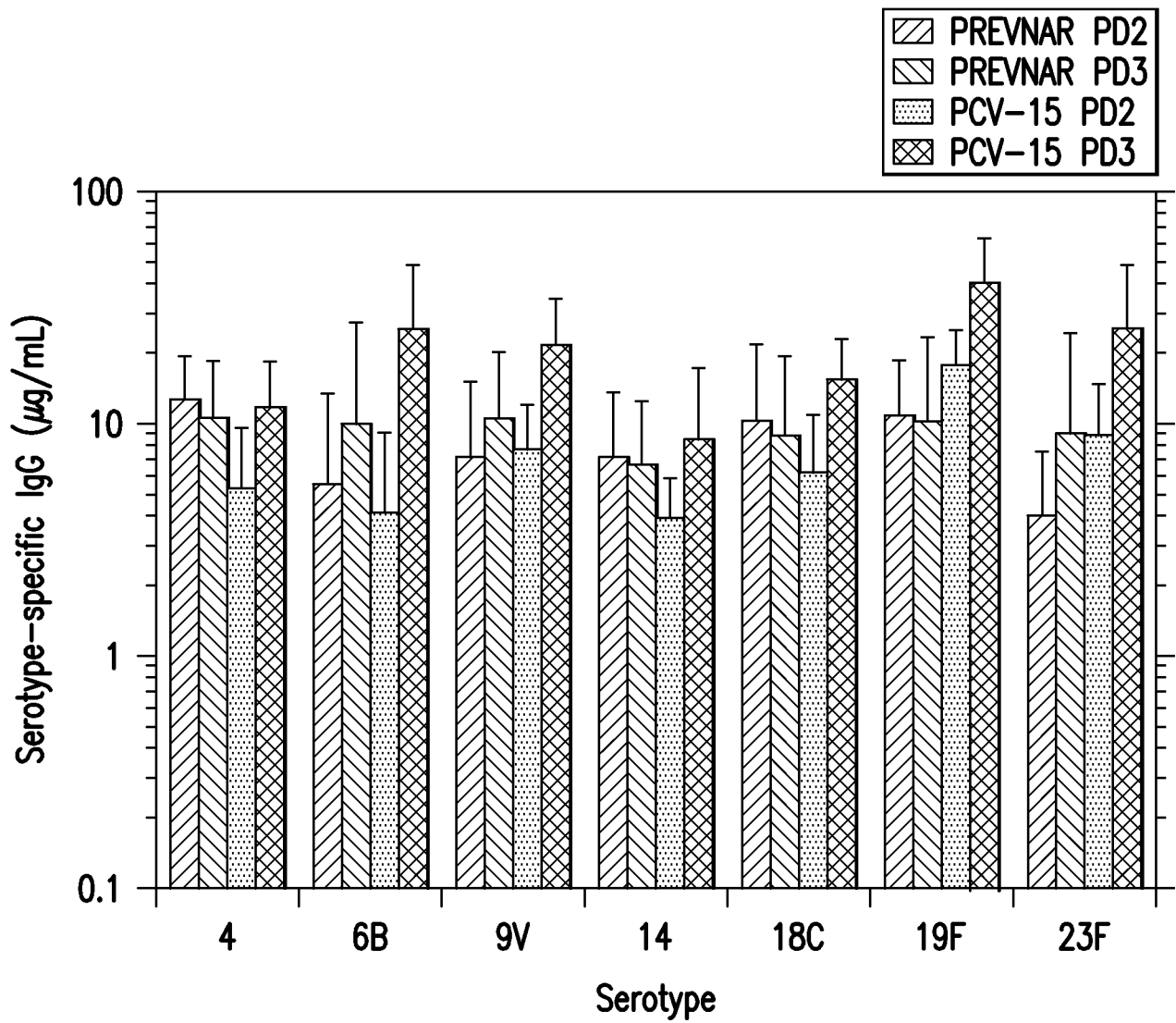


FIG. 1

2/3

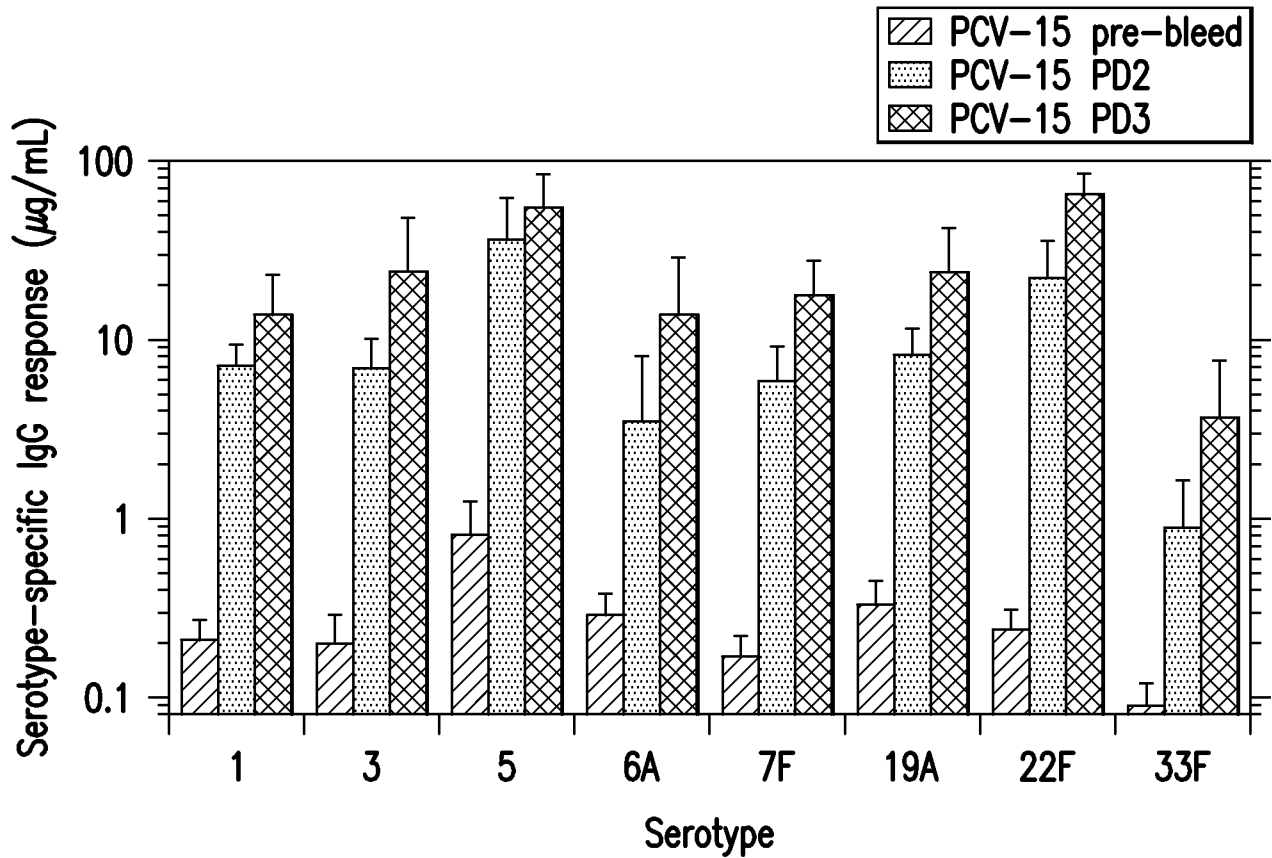


FIG.2

3/3

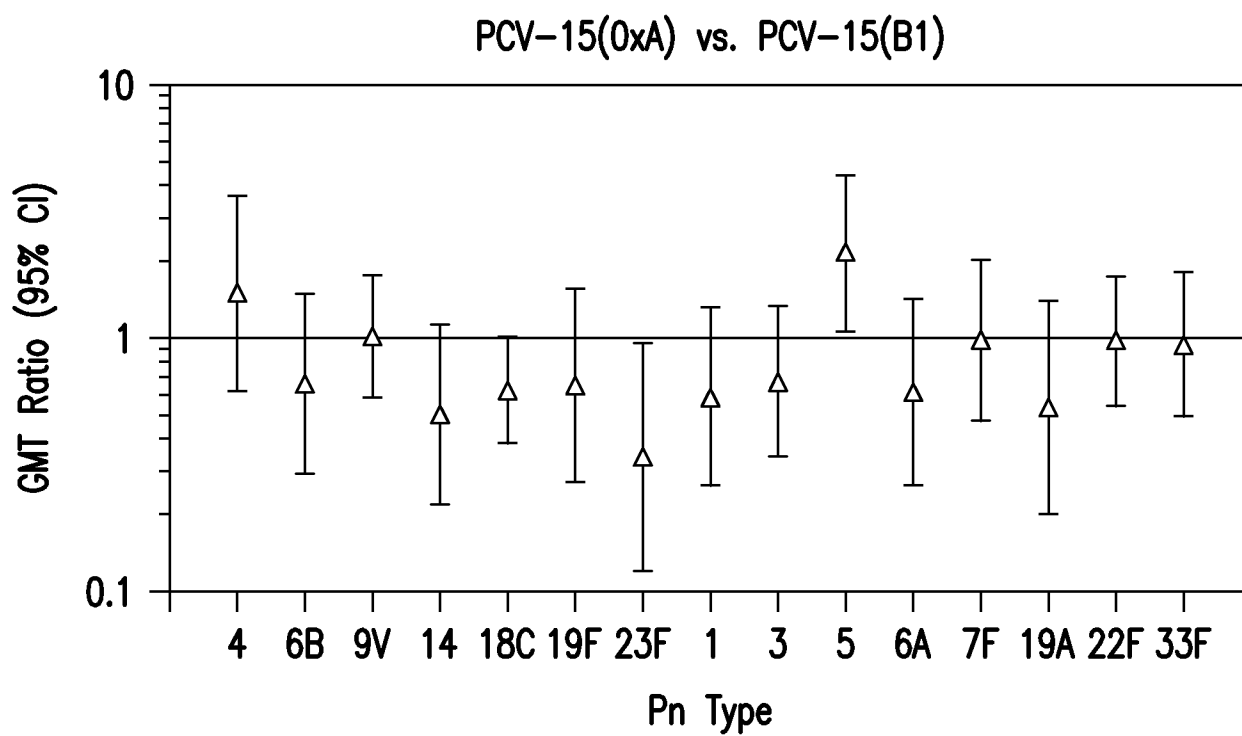


FIG.3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/23526

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - A61K 39/00 (2011.01)

USPC - 424/184.1

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC (8) - A61K 39/00 (2011.01)

USPC - 424/184.1

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC - 424/184.1,244,1,203,1,197.11 (see search terms below)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

PubWEST (PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB); Google

Search Terms Used: multivalent, capsular, polysaccharide, conjugate, serotype, Streptococcus pneumoniae, CRM197, aluminum phosphate, histidine, buffer, 33F, 6B

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	US 2009/0010959 A1 (Biemans et al.) 08 January 2009 (08.01.2009), para [0023]-[0028], [0063], [0084], [0129], [0143], [0212]	1-7 ----- 8
Y	US 2009/0035326 A1 (Contorni et al.) 05 February 2009 (05.02.2009), para [0078]-[0089]	8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 March 2011 (21.03.2011)

Date of mailing of the international search report

04 APR 2011

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

TÍTULO DE LA INVENCION
COMPOSICIÓN DE VACUNA CONJUGADA DE POLISACÁRIDO–
PROTEÍNA NEUMOCÓCICA 15–VALENTE
REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

5 Ninguna

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona una composición inmunógena multivalente que tiene 15 conjugados de polisacárido– proteína distintos. Cada conjugado consiste en un polisacárido capsular preparado a partir de un serotipo
10 diferente de *Streptococcus pneumoniae* (1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F o 33F) conjugado a una proteína portadora, preferentemente CRM₁₉₇. La composición inmunógena, preferentemente formulada como una vacuna sobre un adyuvante a base de aluminio, proporciona una amplia cobertura contra la enfermedad neumocócica, particularmente en infantes y niños
15 pequeños.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El Streptococcus pneumoniae es una causa significativa de enfermedades serias en el mundo entero. En 1997, los Centros de Control y Prevención de Enfermedades ("Centers for Disease Control and Prevention (CDC)) estimaron
20 que habían 3000 casos de meningitis neumocócica, 50.000 casos de bacteremia neumocócica, 7.000.000 casos de otitis media neumocócica y 500.000 casos de neumonía neumocócica anualmente en los Estados Unidos. Véase Centers for Disease Control and Prevention, MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1997, 46(RR–8):1–13. Por añadidura, las complicaciones de estas enfermedades pueden ser
25 significativas con algunos estudios que informan de hasta un 8% de mortalidad y un 25% de secuelas neurológicas con meningitis neumocócica. Véase Arditi *et al.*, 1998, Pediatrics 102:1087–97.

Las vacunas de polisacáridos neumocócicas multivalentes que han sido permitidas durante muchos años han probado ser valiosas para prevenir la enfermedad neumocócica en adultos, particularmente, en personas ancianas y aquellos con alto riesgo. Sin embargo, los infantes y niños pequeños responden

5 pobremente a los polisacáridos neumocócicos no conjugados. La vacuna conjugada neumocócica, Prevnar[®], que contiene los 7 serotipos más frecuentemente aislados (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F) que causan enfermedad neumocócica invasiva en niños pequeños y en infantes en el momento, fue aprobada en primer lugar en los Estados Unidos en Febrero del 2000. Luego del

10 uso universal de Prevnar[®] en los Estados Unidos, hubo una reducción significativa en la enfermedad neumocócica invasiva en niños debido a los serotipos presentes en Prevnar[®]. Véase Centers for Disease Control and Prevention, MMWR Morb Mortal Wkly Rep (Informe Semanal) 2005, 54(36):893–7. Sin embargo, existen limitaciones en la cobertura de los serotipos con Prevnar[®] en ciertas regiones del

15 mundo y cierta evidencia de algunos serotipos emergentes en los Estados Unidos (por ejemplo, 19A y otros). Véase O'Brien *et al.*, 2004, Am J Epidemiol 159:634–44; Whitney *et al.*, 2003, N Engl J Med 348:1737–46; Kyaw *et al.*, 2006, N Engl J Med 354:1455–63; Hicks *et al.*, 2007, J Infect Dis 196:1346–54; Traore *et al.*, 2009, Clin Infect Dis 48:S181–S189.

20 La Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos No. US 2006/0228380 A1 describe una vacuna conjugada de polisacárido– proteína contra el Neumococo 13 valente que incluye los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F. La Publicación de Solicitud de Patente China No. CN 101590224 A describe una vacuna conjugada de polisacárido– proteína

25 contra el Neumococo 14 valente que incluye los serotipos 1, 2, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9N, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F.

Otras PCVs (siglas en inglés correspondientes a Vacunas Conjugadas contra el Neumococo) han cubierto 7, 10, 11, o 13 de los serotipos contenidos en PCV-15, pero se ha observado interferencia inmunológica para algunos serotipos (por ej., protección inferior para el serotipo 3 en PCV-11 de GSK) e índices de respuesta más bajos a serotipo 6B en PCV-13 de Pfizer. Véase Prymula *et al.*, 2006, Lancet 367:740-48 y Kieninger *et al.*, Safety and Immunologic Non-inferiority of 13-valent Pneumococcal Conjugate Vaccine Compared to 7-valent Pneumococcal Conjugate Vaccine Given as a 4-Dose Series in Healthy Infants and Toddlers (Seguridad y No Inferioridad Inmunológica de la Vacuna Conjugada contra el Neumococo 13 valente En Comparación con la Vacuna Conjugada contra el Neumococo 7 valente Administrada como una Serie de 4 Dosis en Infantes y Niños Pequeños sanos), presentados en la Reunión Anual No. 48 ICAAC/ISDA 46th Annual Meeting, Washington DC, 25-28 de Octubre, 2008.

SÍNTESIS DE LA INVENCION

La presente invención proporciona una composición inmunógena que comprende (1) una mezcla de conjugado de polisacárido- proteína multivalente que consiste en polisacáridos capsulares de 15 serotipos diferentes de *S. pneumoniae* conjugados a una proteína portadora, y (2) un portador farmacéuticamente aceptable. Más específicamente, la presente invención provee una composición de vacuna conjugada contra el Neumococo 15 valente (PCV-15) que comprende una mezcla de conjugado de polisacárido- proteína multivalente que consiste en polisacáridos capsulares de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, y 33F de *S. pneumoniae* conjugados a una proteína portadora; y un portador farmacéuticamente aceptable. En una realización específica, la composición inmunógena contiene polisacáridos capsulares de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F y la proteína portadora es CRM₁₉₇.

En ciertas realizaciones, la composición comprende además un adyuvante. En ciertas realizaciones, el adyuvante es un adyuvante a base de aluminio, tal como fosfato de aluminio, sulfato de aluminio o hidróxido de aluminio. En una realización en particular de la invención, el adyuvante es fosfato de aluminio.

La presente invención provee además un método para inducir una respuesta inmune a un polisacárido capsular de *S. pneumoniae*, que comprende administrar a un ser humano una cantidad inmunológicamente eficaz de la composición inmunógena antes mencionada.

La presente invención proporciona adicionalmente una composición inmunógena administrada como una dosis de 0,5 mL única formulada para contener: 2 µg de cada polisacárido, excepto por 6B a 4 µg; aproximadamente 32 4µg de proteína portadora CRM₁₉₇; 0,125 mg de adyuvante de aluminio elemental (0,5 mg de fosfato de aluminio); buffer de cloruro sódico 150 mM y L-histidina 20 mM.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1: Comparación de GMCs para PCV-15 con relación a Prevnar® en Monos Rhesus Infantes (serotipos de Prevnar, PD-2 y PD-3). Las barras de error denotan 2 errores estándares.

Figura 2: GMC serotipo específicos a serotipos no Prevnar® en monos Rhesus infantes inmunizados con PCV-15. Las barras de error denotan 2 errores estándares.

Figura 3: NZWR-1: Comparación de títulos medios geométricos en conejos inmunizados con PCV-15 sin (0xA) o con APA (B1) (Post-dosis 2). Las barras de error denotan 95% de CI sobre la diferencia en veces media geométrica (PCV-15 sin APA / PCV-15 con APA).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención provee una composición inmunógena multivalente que comprende, consiste esencialmente en, o alternativamente, consiste en 15 conjugados de polisacárido– proteína distintos, donde cada uno de los conjugados contiene un polisacárido capsular diferente conjugado a una proteína portadora, y donde los polisacáridos capsulares son preparados a partir de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F de *S. pneumoniae*, junto con un portador farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, la proteína portadora es CRM₁₉₇. La composición inmunógena puede comprender además un adyuvante, tal como un adyuvante con base de aluminio, tal como fosfato de aluminio, sulfato de aluminio e hidróxido de aluminio. La presente invención también proporciona un método para inducir una respuesta inmune a un conjugado de polisacáridos capsulares de *S. pneumoniae*, que comprende administrar a un ser humano, una cantidad inmunológicamente eficaz de la composición inmunógena multivalente antes mencionada.

Como se ilustra en los Ejemplos, más adelante, estudios preclínicos en monos Rhesus infantes demostraron respuestas fuertes de anticuerpos a todos los 15 serotipos en PCV–15 que son comparables con las respuestas para los 7 serotipos comunes en Prevnar[®]. El hallazgo por parte de los solicitantes de que una vacuna conjugada contra el Neumococo 15 valente que incluye la adición de nuevos conjugados de polisacárido– proteína que contienen serotipos 22F y 33F proporciona respuestas de anticuerpos fuertes demuestra la posibilidad de expandir la cobertura de los serotipos neumocócicos no cubiertos por las vacunas neumocócicas existentes.

El término “comprende” cuando se emplea con la composición inmunógena de la invención, se refiere a la inclusión de cualquier otro componente (sujeto a las limitaciones del lenguaje de “que consiste en” para la

mezcla antigénica), tales como adyuvantes y excipientes. El término “que consiste en” cuando se emplea con la mezcla de conjugados de polisacárido– proteína multivalente se refiere a una mezcla que tiene aquellos 15 conjugados de polisacárido – proteína de *S. pneumoniae* en particular y ningún otro conjugado de polisacárido – proteína de *S. pneumoniae* de un serotipo diferente.

Conjugados de polisacárido – proteína capsulares de *Streptococcus pneumoniae*

Los polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* pueden ser preparados mediante técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los polisacáridos pueden ser aislados de bacterias y pueden ser clasificados según el tamaño hasta cierto grado por métodos conocidos (véase, por ej., Patentes Europeas Nos. EP497524 y EP497525) y preferentemente por microfluidización. Los polisacáridos pueden ser clasificados según el tamaño a fin de reducir la viscosidad en muestras de polisacáridos y/o para mejorar la filtrabilidad para productos conjugados. En la presente invención, los polisacáridos capsulares son preparados de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F de *S. pneumoniae*.

En una realización, cada serotipo de polisacárido neumocócico es cultivado en un medio a base de soja. Luego, los polisacáridos individuales son purificados a través de pasos convencionales que incluyen centrifugación, precipitación y ultrafiltración. Véase, por ej., la Publicación de Solicitud de Patente Estadounidense No. 2008/0286838 y Pat. Estadounidense No. 5.847.112.

Las proteínas portadoras son preferentemente proteínas que son no tóxicas y no reactogénicas y obtenibles en cantidad y pureza suficientes. Una proteína portadora puede ser conjugada o unida con un polisacárido de *S. pneumoniae* para aumentar la inmunogenicidad del polisacárido. Las proteínas portadoras pueden adaptarse a procedimientos de conjugación convencionales.

En una realización en particular de la presente invención, CRM₁₉₇ se emplea como la proteína portadora. En una realización, cada polisacárido capsular es conjugado a la misma proteína portadora (siendo cada molécula de polisacárido capsular conjugada a una única proteína portadora). En otra realización, los
5 polisacáridos capsulares son conjugados a dos o más proteínas portadoras (siendo cada molécula de polisacárido capsular conjugada a una única proteína portadora). En ese tipo de realización, cada polisacárido capsular del mismo serotipo es típicamente conjugado a la misma proteína portadora.

CRM₁₉₇ es una variante no tóxica (es decir, toxoide) de la toxina de la
10 difteria. En una realización, se aísla de cultivos de la cepa C7 de *Corynebacterium diphtheria* (β197) cultivada en casaminoácidos y medio basado en extracto de levadura. En otra realización, CRM₁₉₇ es preparada recombinantemente de conformidad con los métodos descritos en la Pat. Estadounidense No. 5.614.382. Típicamente, CRM₁₉₇ es purificada a través de
15 una combinación de ultrafiltración, precipitación con sulfato de amonio, y cromatografía de intercambio iónico. En algunas realizaciones, CRM₁₉₇ es preparada en *Pseudomonas fluorescens* utilizando Pfenex Expression Technology™ (Pfenex Inc., San Diego, CA).

Otras proteínas portadoras adecuadas incluyen toxinas bacterianas
20 inactivadas adicionales tales como DT (toxoides de Difteria), TT (toxoides del tétano) o fragmento C de TT, toxoide de pertussis, toxoide del cólera (por ej., según lo descrito en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional No. WO 2004/083251), LT de *E. coli*, ST de *E. coli*, y exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*. Las proteínas de membrana externa bacterianas tales como el
25 complejo c de membrana externa (OMPC, por sus siglas en inglés), porinas, proteínas de unión a transferrina, proteína A de superficie neumocócica (PspA; Ver la Publicación de Patente de Solicitud Internacional No. WO 02/091998),

proteína adhesina neumocócica (PsaA), C5a peptidasa del Grupo A o Grupo B streptococcus, o proteína D de *Haemophilus influenzae*, neumolisina neumocócica (Kuo *et al.*, 1995, Infect Immun 63; 2706–13) que incluye ply destoxificada en cierto modo, por ejemplo dPLY–GMBS (Ver Publicación de Solicitud de Patente Internacional No. WO 04/081515) o dPLY–formol, PhtX, incluyendo PhtA, PhtB, PhtD, PhtE y fusiones de proteínas Pht por ejemplo fusiones de PhtDE, fusiones de PhtBE (Ver las Publicaciones de Solicitud de Patente Internacional Nos. WO 01/98334 y WO 03/54007), también pueden emplearse.

También pueden emplearse como proteínas portadoras otras proteínas tales como ovalbúmina, hemocianina de lapa californiana (KLH (por sus siglas en inglés)), seroalbúmina bovina (BSA (por sus siglas en inglés)) o derivado proteico purificado de tuberculina (PPD (por sus siglas en inglés)), PorB (de *N. meningitidis*), PD (proteína D de *Haemophilus influenzae*; ver, por ej., Patente Europea No. EP 0 594 610 B), o sus equivalentes inmunológicamente funcionales, péptidos sintéticos (Ver Patentes Europeas Nos. EP0378881 y EP0427347), proteínas de choque térmico (Ver Publicaciones de Solicitudes de Patentes Internacionales Nos. WO 93/17712 y WO 94/03208), proteína de pertussis (Véase la Publicación de Solicitud de Patente Internacional No. WO 98/58668 y Patente Europea No. EP0471177), citoquinas, linfoquinas, factores de crecimiento u hormonas (Véase la Publicación de Solicitud de Patente Internacional No. WO 91/01146), proteínas artificiales que comprenden múltiples epítomos de células T CD4+ humanos de diversos antígenos derivados de patógenos (Ver Falugi *et al.*, 2001, Eur J Immunol 31:3816–3824) tal como la proteína N19 (Ver Baraldoi *et al.*, 2004, Infect Immun 72:4884–7), proteínas de captación de hierro (Véase la Publicación de Solicitud de Patente Internacional No. WO 01/72337), toxina A o B de *C. difficile* (Ver la Publicación de Patente

Internacional No. WO 00/61761), y flagelina (Ver Ben-Yedidia et al., 1998, Immunol Lett 64:9).

Pueden emplearse otros mutantes de DT, tales como CRM176, CRM228, CRM 45 (Uchida *et al.*, 1973, J Biol Chem 218:3838–3844); CRM 9, CRM 45, 5 CRM102, CRM 103 y CRM107 y otras mutaciones descritas por Nicholls y Youle en Genetically Engineered Toxins (Toxinas Genéticamente Modificadas), Ed: Frankel, Marcel Dekker Inc, 1992; supresión o mutación de Glu–148 a Asp, Gln o Ser y/o Ala 158 a Gly y otras mutaciones descritas en la Patente Estadounidense No. 4.709.017 o en la Patente Estadounidense No. 4.950.740; mutación de por lo 10 menos uno o más residuos Lys 516, Lys 526, Phe 530 y/o Lys 534 y otras mutaciones descritas en la Patente Estadounidense No. 5.917.017 o en la Patente Estadounidense No. 6.455.673; o fragmento descrito en la Patente Estadounidense No. 5.843.711.

Los polisacáridos purificados son químicamente activados para preparar 15 los sacáridos capaces de reaccionar con la proteína portadora. Una vez activado, cada polisacárido capsular es conjugado por separado a una proteína portadora para formar un glicoconjugado. Los conjugados de polisacáridos pueden ser preparados mediante técnicas de acoplamiento conocidas.

En una realización, la activación química de los polisacáridos y 20 subsiguiente conjugación a la proteína portadora son logradas por medios descritos en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4.365.170, 4.673.574 y 4.902.506. Brevemente, esa química abarca la activación de polisacárido neumocócico mediante reacción con cualquier agente oxidante el cual oxida un grupo hidroxilo terminal a un aldehído, tal como peryodato (incluyendo peryodato 25 sódico, peryodato potásico o ácido peryódico). La reacción conduce a una disociación oxidativa al azar de grupos hidroxilo próximos de los carbohidratos con la formación de grupos aldehído reactivos.

El acoplamiento a la proteína portadora (por ej., CRM₁₉₇) puede ser por medio de aminación reductiva por aminación directa a los grupos lisilo de la proteína. Por ejemplo, la conjugación se lleva a cabo haciendo reaccionar una mezcla del polisacárido activado y la proteína portadora con un agente reductor tal como cianoborohidruro sódico. Luego, los aldehídos sin reaccionar son sometidos a la adición de un capuchón (“capping”) con la adición de un agente reductor fuerte, tal como borohidruro sódico.

En otra realización, el método de conjugación puede basarse en la activación del sacárido con tetrafluorborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridinio (CDAP, (por sus siglas en inglés)) para formar un éster de cianato. Así, el sacárido activado puede ser acoplado directamente o por medio de un grupo espaciador (ligante) a un grupo amino en la proteína portadora. Por ejemplo, el espaciador podría ser cistamina o cisteamina para dar un polisacárido tiolado el cual podría ser acoplado al portador por medio de una ligación tioéter obtenida luego de la reacción con una proteína portadora activada con maleimida (por ejemplo utilizando GMBS) o una proteína portadora haloacetilada (por ejemplo utilizando yodoacetimida [por ej. yodoacetimida de etilo HCl] o bromoacetato de N-succinimidilo o SIAB, o SIA, o SBAP). Preferentemente, el éster de cianato (opcionalmente preparado mediante química de CDAP) es acoplado con hexano diamina o dihidrazida de ácido adípico (ADH) y el sacárido amino-derivado es conjugado a la proteína portadora utilizando química de carbodiimida (por ej. EDAC o EDC) por medio de un grupo carboxilo en la proteína portadora. Dichos conjugados son descritos en las Publicaciones de Solicitudes de Patentes Internacionales Nos. WO 93/15760, WO 95/08348 y WO 96/29094; y Chu *et al.*, 1983, *Infect. Immunity* 40:245–256.

Otras técnicas adecuadas utilizan carbodiimidas, hidrazidas, ésteres activos, norborano, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S—NHS, EDC,

TSTU. Muchas son descritas en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional No. WO 98/42721. La conjugación puede involucrar un ligante carbonilo el cual puede ser formado mediante reacción de un grupo hidroxilo libre del sacárido con CDI (Ver Bethell *et al.*, 1979, J. Biol. Chem. 254:2572–4; Hearn
 5 *et al.*, 1981, J. Chromatogr. 218:509–18) seguido por reacción con una proteína para formar una ligación de carbamato. Esto puede involucrar la reducción del término anomérico a un grupo hidroxilo primario, protección / desprotección opcional del grupo hidroxilo primario, reacción del grupo hidroxilo primario con CDI para formar un compuesto intermedio de carbamato CDI y acoplando el
 10 compuesto intermedio de carbamato CDI con un grupo amino en una proteína.

En una realización, con anterioridad a la formulación, cada antígeno de polisacárido capsular neumocócico es individualmente purificado a partir de *S. pneumoniae*, activado para formar aldehídos reactivos, y luego covalentemente conjugado utilizando aminación reductiva a la proteína portadora CRM₁₉₇.

15 Luego de la conjugación del polisacárido capsular a la proteína portadora, los conjugados de polisacárido – proteína son purificados (enriquecidos con respecto a la cantidad de conjugado de polisacárido – proteína) por una o más de una variedad de técnicas. Los ejemplos de estas técnicas son bien conocidos por el experto en la materia e incluyen operaciones de concentración / diafiltración,
 20 ultrafiltración, precipitación/ elución, cromatografía en columna y filtración en profundidad. Véase, por ej., la Patente de los Estados Unidos No. 6.146.902.

Composiciones Farmacéuticas/ de Vacuna

La presente invención proporciona además composiciones, que incluyen composiciones farmacéuticas, inmunógenas, y de vacunas, que comprenden,
 25 consisten esencialmente en, o alternatively, consisten en 15 conjugados de polisacárido– proteína distintos, donde cada uno de los conjugados contiene un polisacárido capsular diferente conjugado a una proteína portadora, y donde los

polisacáridos capsulares son preparados a partir de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F de *S. pneumoniae*, junto con un portador farmacéuticamente aceptable y un adyuvante. Estos conjugados neumocócicos son preparados mediante procesos separados y en masa
5 formulados en una sola formulación de dosificación.

Según lo definido en esta invención, un “adyuvante” es una sustancia que sirve para aumentar la inmunogenicidad de una composición inmunógena de la invención. Un adyuvante inmune puede aumentar una respuesta inmune a un antígeno que es débilmente inmunógeno cuando es administrado por sí solo, por
10 ej., no induciendo títulos de anticuerpos o títulos de anticuerpos débiles o sin inducir respuesta inmune mediada por células, no induciendo aumento de los títulos de anticuerpos al antígeno, y/o reduce la dosis del antígeno eficaz para lograr una respuesta inmune en el individuo. Por lo tanto, a menudo se administran adyuvantes para reforzar la respuesta inmune y son bien conocidos
15 por el experto en la técnica. Los adyuvantes adecuados para aumentar la eficacia de la composición incluyen, aunque no se limitan a:

(1) sales de aluminio (alumbre), tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio, etc.;

(2) formulaciones de emulsiones aceite en agua (con o sin otros agentes
20 inmunoestimuladores específicos tales como péptidos de muramilo (definidos más adelante) o componentes bacterianos de las paredes celulares), tales como, por ejemplo, (a) MF59 (Publicación de Solicitud de Patente Internacional No. WO 90/14837), que contienen 5% de Esqualeno, 0,5% Tween 80, y 0,5% Span 85 (opcionalmente que contienen diversas cantidades de MTP-PE) formulados en
25 partículas de submicrones utilizando un microfluidizador tal como el microfluidizador Modelo 110Y (Microfluidics, Newton, MA), (b) SAF, que contiene 10% de Esqualeno, 0,4% Tween 80, 5% polímero plurónico-bloqueado L121, y

thr-MDP ya sea microfluidizado en una emulsión de submicrones o sometido a
 vórtice para generar una emulsión de tamaño de partícula más grande, (c)
 sistema adyuvante Ribi™ (RAS), (Corixa, Hamilton, MT) que contiene 2% de
 Esqualeno, 0,2% de Tween 80, y uno o más componentes bacterianos de
 5 paredes celulares del grupo formado por monofosforil-lípido A 3-O-desacilado
 (MPL™) descrito en la Pat. Estadounidense No. 4.912.094, dimicolato de
 trehalosa (TDM), y esqueleto de pared celular (CWS, por sus siglas en inglés),
 preferentemente MPL+CWS (Detox™); y (d) una Montanida ISA;

(3) adyuvantes de saponina, tales como Quil A o STIMULON™ QS-21
 10 (Antigenics, Framingham, MA) (ver, por ej., Pat. Estadounidense No. 5.057.540)
 pueden emplearse o partículas generadas de los mismos tales como ISCOM
 (complejos inmunoestimuladores formados por la combinación de colesterol,
 saponina, fosfolípido, y proteínas anfipáticas) y Iscomatrix® (que tiene
 esencialmente la misma estructura que un ISCOM pero sin la proteína);

15 (4) lipopolisacáridos bacterianos, análogos sintéticos de lípido A tales
 como compuestos de aminoalquil glucosamina fosfato (AGP, por sus siglas en
 inglés), o derivados o análogos del mismo, los cuales están disponibles de Corixa,
 y los cuales son descritos en la Pat. Estadounidense No. 6.113.918; un AGP de
 ese tipo es 2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoilamino]etil 2-Desoxi-4-O-
 20 fosfono-3-O-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-2-[(R)-3-
 tetradecanoiloxitetradecanoilamino]-β-D-glucopiranosido, el cual es también
 conocido como 529 (anteriormente conocido como RC529), el cual es formulado
 como una forma acuosa o como una emulsión estable

(5) polinucleótidos sintéticos tales como oligonucleótidos que contienen
 25 motivo(s) CpG motif(s) (Pat. Estadounidense No. 6.207.646); y

(6) citoquinas, tales como interleuquinas (por ej., IL-1, IL-2, IL-4, IL-5,
 IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, etc.), interferones (por ej., gamma interferón),

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

(7) complemento, tal como trímero de componente de complemento C3d.

5 En otra realización, el adyuvante es una mezcla de 2, 3, o más de los adyuvantes anteriores, por ej., SBAS2 (una emulsión aceite en agua que contiene además monofosforil- lípido A 3-desacilado y QS21).

Los péptidos de muramilo incluyen, aunque sin limitarse a, N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanina-2-
10 (1'-2' dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), etc.

En ciertas realizaciones, el adyuvante es una sal de aluminio. El adyuvante de sal de aluminio puede ser una vacuna precipitada en alumbre o una vacuna adsorbida en alumbre. Los adyuvantes de aluminio- sal son bien conocidos en la técnica y son descritos, por ejemplo, en Harlow, E. y D. Lane
15 (1988; Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory) y Nicklas, W. (1992; Aluminum salts. Research in Immunology 143:489-493). La sal de aluminio incluye, aunque sin limitarse a, alúmina hidratada, hidrato de alúmina, trihidrato de alúmina (ATH), hidrato de aluminio, trihidrato de aluminio, alhidrogel, Superfos, Amphogel, hidróxido de aluminio (III), hidroxifosfato sulfato de aluminio
20 (Adyuvante de Fosfato de Aluminio (APA, por sus siglas en inglés)), alúmina amorfa, alúmina trihidratada o trihidroxialuminio.

APA es una suspensión acuosa de hidroxifosfato de aluminio. APA es fabricado mezclando cloruro de aluminio y fosfato sódico en una relación volumétrica 1:1 para precipitar hidroxifosfato de aluminio. Después del proceso de
25 mezclado, el material es reducido en tamaño con un mezclador de alto corte para lograr un tamaño de partícula agregado objetivo en el rango de 2-8 µm. Luego, el producto es diafiltrado contra solución salina fisiológica y esterilizado con vapor.

En ciertas realizaciones, se emplea un $\text{Al}(\text{OH})_3$ disponible en el mercado (por ej. Alhydrogel o Superfos de Denmark/Accurate Chemical and Scientific Co., Westbury, NY) para adsorber proteínas en una relación de 50 – 200 g de proteína/mg de hidróxido de aluminio. La adsorción de proteína depende, en otra
5 realización, del pI (pH isoelectrico) de la proteína y el pH del medio. Una proteína con un pI inferior se adsorbe al ion de aluminio positivamente cargado más fuertemente que una proteína con un pI superior. Las sales de aluminio pueden establecer un depósito de Ag que es liberado lentamente durante un período de 2-3 semanas, pueden estar involucradas en la activación no específica de
10 macrófagos y activación del complemento, y/o pueden estimular el mecanismo inmune innato (posiblemente a través de la estimulación de ácido úrico). Ver, por ej., Lambrecht *et al.*, 2009, Curr Opin Immunol 21:23.

Los conjugados acuosos a granel monovalentes son típicamente mezclados y diluidos para obtener 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para todos los serotipos excepto 6B, el
15 cual será diluido para obtener 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Una vez diluido, la tanda será esterilizada por filtración, y se agregará un volumen igual de adyuvante de fosfato de aluminio asépticamente para obtener una concentración de aluminio final de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La tanda formulada, con adyuvante, será cargada en frascos de 0,5 mL/dosis de un solo uso.

20 En ciertas realizaciones, el adyuvante es una secuencia nucleotídica que contiene CpG, por ejemplo, un oligonucleótido que contiene CpG, en particular, un oligodesoxinucleótido que contiene CpG (CpG ODN). En otra realización, el adyuvante es ODN 1826, el cual puede ser adquirido de Coley Pharmaceutical Group.

25 “Nucleótido que contiene CpG”, “oligonucleótido que contiene CpG”, “oligonucleótido CpG”, y términos similares se refieren a una molécula nucleotídica de 6–50 nucleótidos de largo que contiene una porción de CpG no

metilada. Ver, por ej., Wang *et al.*, 2003, Vaccine 21:4297. En otra realización, el propósito es cualquier otra definición de los términos aceptada en la técnica. Los oligonucleótidos que contienen CpG incluyen oligonucleótidos modificados que utilizan cualquier ligación de internucleósido sintética, base modificada y/o azúcar modificado.

Los métodos de uso de los oligonucleótidos que contienen CpG son bien conocidos en la técnica y son descritos, por ejemplo, en Sur *et al.*, 1999, J Immunol. 162:6284–93; Verthelyi, 2006, Methods Mol Med. 127:139–58; y Yasuda *et al.*, 2006, Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 23:89–110.

Administración/ Dosificación

Las composiciones y formulaciones de la presente invención pueden ser empleadas para proteger o tratar a un ser humano susceptible a la infección neumocócica, por medio de la administración de la vacuna por medio de una ruta sistémica o de mucosa. En una realización, la presente invención provee un método para inducir una respuesta inmune a un conjugado de polisacárido capsular de *S. pneumoniae*, que comprende administrar a un ser humano una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunógena de la presente invención. En otra realización, la presente invención provee un método de vacunación de un ser humano contra una infección por Neumococo, que comprende el paso de administrar al ser humano una cantidad inmunógenamente eficaz de una composición inmunógena de la presente invención.

“Cantidad eficaz” de una composición de la invención se refiere a una dosis requerida para activar anticuerpos que reducen significativamente la probabilidad o severidad de infectividad de *S. pneumoniae* durante un desafío subsiguiente.

Los métodos de la invención pueden ser empleados para la prevención y/o reducción de síndromes clínicos primarios causados por *S. pneumoniae*

incluyendo tanto infecciones invasivas (meningitis, neumonía, y bacteremia), como infecciones no invasivas (otitis media aguda y sinusitis).

La administración de las composiciones de la invención puede incluir uno o más de: inyección por las rutas intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea; o por medio de la administración a través de mucosa a los tractos oral/alimentario, respiratorio o genitourinario. En una realización, se emplea la administración intranasal para el tratamiento de la neumonía o la otitis media (ya que la colonización nasofaríngea de neumococos puede ser más eficazmente prevenida, atenuando de ese modo la infección en su etapa más temprana).

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 neumocócico. En general, cada dosis comprenderá de 0,1 a 100 µg de cada polisacárido, particularmente de 0,1 a 10 µg, y más particularmente de 1 a 5 µg. Por ejemplo, cada dosis puede comprender 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, o 750 ng o 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7.5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 20, 22, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, o 100 µg.

Las cantidades óptimas de componentes para una vacuna en particular pueden ser determinadas por estudios convencionales que involucran la observación de respuestas inmunes apropiadas en los sujetos. Por ejemplo, en otra realización, la dosificación para la vacunación a seres humanos se determina por extrapolación a partir de estudios en animales a datos humanos. En otra realización, la dosificación se determina empíricamente.

En una realización, la dosis de la sal de aluminio es 10, 15, 20, 25, 30, 50, 70, 100, 125, 150, 200, 300, 500, o 700 µg, o 1, 1,2, 1,5, 2, 3, 5 mg o más. En aun otra realización, la dosis de sal de alumbre descrita anteriormente es por cada g de proteína recombinante.

En una realización en particular de la presente invención, la vacuna PCV-15 es una formulación líquida estéril de polisacáridos capsulares neumocócicos de serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F individualmente conjugados a CRM₁₉₇. Cada dosis de 0,5 mL es formulada para
5 contener: 2 4 µg de cada sacárido, excepto por 6B a 4 4µg; aproximadamente 32 µg de proteína portadora CRM₁₉₇ (por ej., 32 µg ± 5 4µg, ± 3 4µg, ± 2 4µg, o ± 1 4µg); 0,125 mg de adyuvante de aluminio elemental (0,5 mg de fosfato de aluminio); y cloruro de sodio y buffer de L-histidina. La concentración de cloruro
10 sódico es aproximadamente 150 mM (por ej., 150 mM ± 25 mM, ± 20 mM, ± 15 mM, ± 10 mM, o ± 5 mM) y aproximadamente 20 mM (por ej., 20 mM ± 5 mM, ± 2,5 mM, ± 2 mM, ± 1 mM, o ± 0,5 mM) de tampón de L-histidina.

De acuerdo con cualquiera de los métodos de la presente invención y en una realización, el sujeto es un ser humano. En ciertas realizaciones, el paciente humano es un infante (menos de 1 año de edad), niño pequeño
15 (aproximadamente de 12 a 24 meses de edad) o menor (aproximadamente de 2 a 5 años). En otras realizaciones, el paciente humano es un paciente anciano (> 65 años). Las composiciones de esta invención son también adecuadas para utilizar con niños más grandes, adolescentes y adultos (por ej., con edades de 18 a 45 años o de 18 a 65 años).

20 En una realización de los métodos de la presente invención, una composición de la presente invención es administrada como una inoculación única. En otra realización, la vacuna es administrada dos veces, tres veces o cuatro veces o más veces, con intervalos adecuados. Por ejemplo, la composición puede ser administrada en intervalos de 1, 2, 3, 4, 5, o 6 meses o cualquier
25 combinación de los mismos. El programa de inmunización puede seguir aquel designado para las vacunas neumocócicas. Por ejemplo, el programa de rutina para infantes y niños pequeños contra la enfermedad invasiva causada por *S.*

pneumoniae es 2, 4, 6 y 12–15 meses de edad. Por consiguiente, en una realización preferida, la composición es administrada como una serie de 4 dosis a los 2, 4, 6, y 12–15 meses de edad.

Las composiciones de esta invención también pueden incluir una o más proteínas de *S. pneumoniae*. Los ejemplos de proteínas de *S. pneumoniae* adecuadas para inclusión incluyen aquellas identificadas en las Publicaciones de Solicitudes de Patentes Internacionales Nos. WO 02/083855 y WO 02/053761.

Formulaciones

Las composiciones de la invención pueden ser administradas a un sujeto mediante uno o más métodos conocidos por una persona con conocimiento en la técnica, tal como parenteralmente, por vía de transmucosa, transdérmicamente, intramuscularmente, intravenosamente, intradérmicamente, intranasalmente, subcutáneamente, intraperitonealmente y formuladas concordantemente.

En una realización, las composiciones de la presente invención son administradas por medio de inyección epidérmica, inyección intramuscular, inyección intravenosa, intra–arterial, subcutánea, o inyección a la mucosa intra-respiratoria de una preparación líquida. Las formulaciones líquidas para inyección incluyen soluciones y similares.

La composición de la invención puede ser formulada como frascos de dosis única, frascos de múltiples dosis o como jeringas precargadas.

En otra realización, las composiciones de la presente invención son administradas oralmente, y son por ende formuladas en una forma adecuada para la administración oral, es decir, como una preparación sólida o una preparación líquida. Las formulaciones orales sólidas incluyen tabletas, cápsulas, píldoras, gránulos, pellets, y similares. Las formulaciones orales líquidas incluyen soluciones, suspensiones, dispersiones, emulsiones, aceites y similares.

Los portadores farmacéuticamente aceptables para formulaciones líquidas son soluciones, suspensiones, emulsiones o aceites acuosos o no acuosos. Los ejemplos de solventes no acuosos en propilenglicol, polietilenglicol, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los portadores
5 acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/ acuosas, emulsiones o suspensiones, incluyendo solución salina y medios tamponados. Los ejemplos de aceites son aquellos de origen animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de maní, aceite de soja, aceite de oliva, aceite de girasol, aceite de hígado de pescado, otro aceite marino o un lípido de leche o huevos.

10 La composición farmacéutica puede ser isotónica, hipotónica o hipertónica. Sin embargo, a menudo se prefiere que una composición farmacéutica para infusión o inyección sea esencialmente isotónica, cuando es administrada. Por ende, para el almacenamiento, la composición farmacéutica puede ser preferentemente isotónica o hipertónica. Si la composición
15 farmacéutica es hipertónica para el almacenamiento, puede ser diluida para volverse una solución isotónica con anterioridad a la administración.

El agente isotónico puede ser un agente isotónico iónico tal como una sal o un agente isotónico no iónico tal como un carbohidrato. Los ejemplos de agentes isotónicos iónicos incluyen, aunque sin limitarse a NaCl, CaCl₂, KCl y
20 MgCl₂. Los ejemplos de agentes isotónicos no iónicos incluyen, aunque no se limitan a manitol, sorbitol y glicerol.

Se prefiere además que por lo menos un aditivo farmacéuticamente aceptable sea un tampón. Para algunos propósitos, por ejemplo, cuando la composición farmacéutica es destinada a ser empleada para infusión o inyección,
25 es conveniente, a menudo, que la composición comprenda un tampón, el cual es capaz de tamponar una solución hasta un pH en el rango entre 4 y 10, tal como entre 5 y 9, por ejemplo entre 6 y 8.

El tampón puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo formado por tampón de TRIS, acetato, glutamato, lactato, maleato, tartrato, fosfato, citrato, carbonato, glicinato, histidina, glicina, succinato y trietanolamina.

El tampón puede seleccionarse, adicionalmente, por ejemplo entre los
5 tampones compatibles USP para uso parenteral, en particular, cuando la formulación farmacéutica es para uso parenteral. Por ejemplo, el tampón puede seleccionarse del grupo formado por ácidos monobásicos tales como ácido acético, benzoico, glucónico, glicérico y láctico; ácidos dibásicos tales como ácidos aconíticos, adípicos, ascórbico, carbónico, glutámico, málico, succínico y
10 tartárico, ácidos polibásicos tales como ácido cítrico y fosfórico; y bases tales como amoníaco, dietanolamina, glicina, trietanolamina, y TRIS.

Los vehículos parenterales (para inyección subcutánea, intravenosa, intraarterial, o intramuscular) incluyen solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, Ringer's lactado y aceites fijos. Los vehículos
15 intravenosos incluyen regeneradores de fluido y nutrientes, regeneradores de electrolitos tales como aquellos basados en dextrosa de Ringer, y similares. Los ejemplos son líquidos estériles tales como agua y aceites, con o sin la adición de un surfactante y otros adyuvantes farmacéuticamente aceptables. En general, agua, solución salina, soluciones de dextrosa y azúcar acuosas relacionadas,
20 glicoles tales como propilenglicoles o polietilenglicol, y Polisorbato-80 son portadores líquidos preferidos, particularmente para soluciones inyectables. Los ejemplos de aceites son aquellos de origen animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de maní, aceite de soja, aceite de oliva, aceite de girasol, aceite de hígado de pescado, otro aceite marino o un lípido de huevo o leche.

25 Las formulaciones de la invención también pueden contener un surfactante. Los surfactantes preferidos incluyen, aunque no se limitan a: los surfactantes de ésteres de polioxietilen-sorbitán (comúnmente denominados los

Tweens), especialmente polisorbato 20 y polisorbato 80; copolímeros de óxido de etileno (EO), óxido de propileno (PO), y/u óxido de butileno (BO), vendidos bajo la denominación comercial DOWFAX™, tales como los copolímeros de bloques de EO/PO lineales; octoxinolos, los cuales pueden variar en la cantidad de grupos etoxi(oxi-1,2-etanodiilo) de repetición siendo de particular interés el octoxinol-9 (Triton X-100, o t-octilfenoxipolietoxietanol); (octilfenoxi)polietoxietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfolípidos tales como fosfatidilcolina (lecitina); etoxilatos de nonilfenol, tales como la serie Tergitol™ NP; éteres grasos de polioxietileno derivados de alcoholes de laurilo, cetilo, estearilo y oleílo (conocidos como surfactantes Brij), tales como trietilenglicol monolauril éter (Brij 30); y ésteres de sorbitán (comúnmente conocidos como los SPANs), tal como el trioleato de sorbitán (Span 85) y el monolaurato de sorbitán. Un surfactante preferido para incluir en la emulsión es Tween 80 (monooleato de polioxietilensorbitán).

Pueden emplearse mezclas de surfactantes, por ej. mezclas de Tween 80/Span 85. Una combinación de un éster de polioxietilen-sorbitán tal como monooleato de polioxietilen-sorbitán (Tween 80) y un octoxinol tal como t-octilfenoxipolietoxietanol (Triton X-100) es también adecuada. Otra combinación útil comprende lauret 9 más un éster de polioxietilen-sorbitán y/o un octoxinol.

Las cantidades preferidas de surfactantes (% en peso) son: ésteres de polioxietilensorbitán (tal como Tween 80) de 0,01 a 1%, en particular alrededor de 0,1%; octil- o nonilfenoxi polioxietanoles (tal como Triton X-100, u otros detergentes en la serie Triton) de 0,001 a 0,1 %, en particular de 0,005 a 0,02%; polioxietilen-éteres (tal como lauret 9) de 0,1 a 20 %, preferentemente de 0,1 a 10 % y en particular de 0,1 a 1 % o alrededor de 0,5%.

En otra realización, la composición farmacéutica es administrada en un sistema de liberación controlada. Por ejemplo, el agente puede ser administrado utilizando infusión intravenosa, un parche transdérmico, liposomas u otros modos

de administración. En otra realización, se emplean materiales poliméricos; por ej. en microesferas en o un implante.

También son abarcados por la invención los compuestos modificados por la unión covalente de polímeros solubles en agua tales como polietilenglicol, 5 copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol de polivinilo, polivinilpirrolidona o poliprolina. Dichas modificaciones pueden aumentar la solubilidad del compuesto en solución acuosa, pueden eliminar la agregación, aumentar la estabilidad física y química del compuesto, y pueden reducir en gran medida la reactogenicidad del compuesto. En otra 10 realización, la actividad biológica in vivo deseada se logra mediante la administración de dichos aductos de polímero- compuesto menos frecuentemente o en dosis inferiores que con el compuesto sin modificar.

En una realización preferida, la composición de vacuna es formulada en tampón de L-histidina con cloruro sódico.

15 Habiendo descrito diversas realizaciones de la invención con referencia a la descripción y dibujos acompañantes, debe entenderse que la invención no se encuentra limitada a aquellas realizaciones precisas, y que pueden efectuarse diversos cambios y modificaciones a las mismas por un experto en la técnica sin apartarse del alcance o espíritu de la invención según lo definido en las 20 reivindicaciones adjuntas.

Los siguientes ejemplos ilustran, aunque no limitan la invención.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: Preparación de Polisacáridos Capsulares de *S. Pneumoniae*

Los métodos para cultivar neumococos son bien conocidos en la técnica.

25 Ver, por ej., Chase, 1967, Methods of Immunology and Immunochemistry 1:52. Los métodos para preparar polisacáridos capsulares neumocócicos son también

bien conocidos en la técnica. Ver, por ej., Patente Europea No. EP0497524. Los aislados de subtipos neumocócicos están disponibles de la ATCC.

Las bacterias son identificadas como encapsuladas, no móviles, Gram-positivas, diplococos en forma de lanceta que son alfa-hemolíticos en sangre agar. Los subtipos son diferenciados sobre la base de reacción Quelling utilizando
5 antisueros específicos. Ver, por ej., Pat. Estadounidense No. 5.847.112.

Bancos Celulares

Los bancos celulares que representan cada uno de los serotipos de *S. pneumoniae* presentes en PCV-15 fueron obtenidos de la Recolección de Cultivos de Merck (Rahway, NJ) en un frasco congelado.
10

Inoculación

Un cultivo de semillas descongelado fue transferido al fermentador de semillas que contiene un medio de crecimiento previamente esterilizado apropiado.

15 Fermentación de Semillas

El cultivo fue cultivado en el fermentador de semillas con control de la temperatura y el pH. El volumen entero del fermentador de semillas fue transferido al fermentador de la producción que contenía medio de crecimiento previamente esterilizado.

20 Fermentación de la Producción

La fermentación de la producción fue la etapa de crecimiento celular final del proceso. Se controló la temperatura, el pH y la velocidad de agitación.

Inactivación

El proceso de fermentación fue terminado por medio de la adición de un agente inactivador. Luego de la inactivación, la tanda fue transferida al tanque de
25 inactivación donde se mantuvo a temperatura y agitación controladas.

Purificación

Los restos celulares fueron eliminados empleando una combinación de centrifugación y filtración. La tanda fue ultrafiltrada y diafiltrada. La tanda fue luego sometida a fraccionamientos a base de solvente que eliminan las impurezas y recuperan polisacárido.

EJEMPLO 2: Preparación de Conjugados de Polisacáridos Neumocócicos–CRM₁₉₇

Proceso de Activación

Los diferentes sacáridos de serotipos son individualmente conjugados a la proteína portadora CRM₁₉₇ purificada empleando un flujo del proceso común. En este proceso, el sacárido es disuelto, clasificado por tamaño a una masa molecular objetivo, químicamente activado y se intercambió tampón por ultrafiltración. Luego, la CRM₁₉₇ purificada es conjugada con el sacárido activado y el conjugado resultante es purificado por ultrafiltración con anterioridad a una filtración de membrana de 0,2 µm final. Diversos parámetros del proceso dentro de cada paso, tales como el pH, la temperatura, y la concentración, y tiempo son serotipo–específicos según lo descrito en este ejemplo.

Paso 1: Disolución

El polisacárido purificado se disolvió en agua hasta una concentración de 2 – 3 mg/mL. El polisacárido disuelto se hizo pasar a través de un homogenizador mecánico con presión previamente fijada de 0 – 100000 kPa (0–1000 bar). Luego de la reducción de tamaño, el sacárido se concentró y diafiltró con agua estéril en un ultrafiltro MWCO de 10 kDa. El permeado fue descartado y el retenido fue ajustado hasta un pH de 4,1 con un tampón de acetato sódico, concentración final 50 mM. Para los serotipos 4 y 5, se empleó acetato sódico 100 mM a pH 5,0. Para el serotipo 4, la solución se incubó a 50° ± 2° C. La hidrólisis se detuvo por enfriamiento hasta 20 – 24° C.

Paso 2: Reacción con Peryodato

Se determinaron los equivalentes molares de peryodato sódico requeridos para la activación de sacáridos neumocócicos utilizando el contenido total de sacáridos. Con mezclado vigoroso, se dejó proceder la oxidación entre 3 y 20
5 horas a 20 – 24°C para todos los serotipos excepto 5, 7F, y 19F para el cual la temperatura fue de 2 – 6°C.

Paso 3: Ultrafiltración

El sacárido oxidado se concentró y diafiltró con fosfato potásico 10 mM, pH 6,4 (acetato sódico 10 mM, pH 4,3 para el serotipo 5) en un ultrafiltro MWCO
10 de 10 kDa. El permeado se descartó y el retenido se ajustó hasta un pH de 6,3 – 8,4 mediante la adición de tampón de fosfato potásico 3 M.

Proceso de Conjugación

Paso 1: Reacción de Conjugación

15 El sacárido conjugado se mezcló con proteína portadora CRM₁₉₇ en una relación de carga de 0,2 – 2 a 1. La mezcla de sacárido y CRM₁₉₇ combinada se filtró a través de un filtro de 0,2 µm.

La reacción de conjugación fue iniciada agregando una solución de cianoborohidruro sódico para lograr 1,8 – 2,0 moles de cianoborohidruro sódico
20 por cada mol de sacárido. La mezcla de reacción se incubó durante 48 – 120 horas a 20 – 24°C (8 – 12°C para los serotipos 3, 5, 6A, 7F, 19A, y 19F).

Paso 2: Reacción con Borohidruro

Al final de la incubación de la conjugación, la mezcla de reacción fue ajustada hasta 4 – 8°C, y un pH de 8 – 10 con ya sea tampón de bicarbonato de
25 sodio 1,2 M o tampón de fosfato de potasio 3 M (excepto el serotipo 5). La reacción de conjugación se detuvo agregando la solución de borohidruro sódico para lograr 0,6 – 1,0 moles de borohidruro sódico por cada mol de sacárido (0

moles de borohidruro agregado para el serotipo 5). La mezcla de reacción se incubó durante 45 – 60 minutos.

Paso 3: Pasos de Ultrafiltración

La mezcla de reacción se diafiltró en un ultrafiltro MWCO de 100 kDa con un mínimo de 20 volúmenes de fosfato potásico 100 mM, tampón pH 8,4. El retenido del ultrafiltro de 100 kDa se diafiltró en un ultrafiltro MWCO de 300 kDa con un mínimo de 20 diavolúmenes de cloruro sódico 150 mM a 20 – 24°C. El permeado fue descartado.

Paso 4: filtración Estéril

El retenido de la diafiltración MWCO de 300 kDa se filtró a través de un filtro de 0,2 µm y se cargó en contenedores de vidrio de borosilicato en volúmenes apropiados para ensayo de liberación, controles en proceso, y formulación (salvo el serotipo 19F). El conjugado de serotipo 19F se hizo pasar a través de un filtro de 0,2 µm en un tanque de retención y se incubó a 20 – 24°C. Después de la incubación, el conjugado se diafiltró en un ultrafiltro MWCO de 300 kDa con un mínimo de 20 diavolúmenes de cloruro sódico 150 mM a 20 – 24°C. El permeado se descartó, y el retenido se filtró a través de un filtro de 0,2 µm y se cargó en contenedores de vidrio de borosilicato en volúmenes apropiados para ensayos de liberación, controles en proceso y formulación. Los concentrados en masa finales fueron almacenados a 2 – 8°C.

EJEMPLO 3: Formulación de una Vacuna de Conjugados Neumocócica 15 valente

Los volúmenes requeridos de concentrados en masa se calcularon en base al volumen de la tanda y las concentraciones de sacáridos en masa. Los conjugados combinados fueron adicionalmente diluidos hasta una concentración de adsorción objetivo mediante la adición de un tampón que contiene cloruro de sodio y L-histidina, pH 5,8. Después de mezclado suficiente, la mezcla se

esterilizó por filtración a través de una membrana de 0,2 μm . La masa formulada estéril se mezcló suavemente durante y después de su mezclado con fosfato de aluminio en masa. La vacuna formulada se almacenó a 2 – 8°C.

En un proceso alternativo, los 15 conjugados combinados se diluyeron
5 adicionalmente hasta una concentración objetivo mediante la adición de un
tampón que contiene cloruro sódico y L-histidina, pH 5,8. Se agregó Polisorbato
80 hasta una concentración final de 0,005%, a la mezcla de conjugados
tamponada diluida con anterioridad a la esterilización por filtración. Luego de la
esterilización por filtración, la vacuna formulada se almacenó a 2 – 8°C.

10 La Tabla 1 muestra la composición final de la forma con adyuvante y sin
adyuvante de PCV-15.

Tabla 1: Composición de Formulaciones de Vacunas de Conjugados Neumocócicos 15 valentes con Adyuvante y Sin Adyuvante

Descripción de Ingredientes		Formulaciones Clínicas, unidad/dosis de 0,5 mL	
		PCV-15 con Adyuvante	PCV-15 sin adyuvante
Ingredien- tes Activos	Antígenos de polisacáridos neumocócicos	32 4 µg de polisacárido total (2 4 µg de cada uno de los siguientes serotipos de polisacáridos 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F; 4 4 µg de serotipo 6B de polisacárido)	32 4 µg de polisacárido total (2 4 µg de cada uno de los siguientes serotipos de polisacáridos 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F; 4 4 µg de polisacárido serotipo 6B))
	Proteína Portadora CRM ₁₉₇	~ 32 µg	~32 µg
Otros Ingredien- tes	Aluminio (µg) ^a	125	0
	Polisorbato-80 (µg)	0	2.5
	L-histidina (mM)	20	20
	Cloruro Sódico (mM)	150	150
	Agua para Inyección	C.S. ^b	C.S. ^b
^a Cantidad de aluminio elemental en APA. ^b Cantidad suficiente hasta 0,5 mL.			

EJEMPLO 4: Estudios de Inmunogenicidad

Los experimentos fueron diseñados para evaluar la inmunogenicidad de múltiples formulaciones de vacunas de conjugados neumocócicas en los modelos animales de monos Rhesus infantes (IRM, según las siglas en inglés) y Conejos Blancos de Nueva Zelanda (NZWR, según siglas en inglés). Los experimentos en monos Rhesus infantes fueron diseñados para coincidir estrechamente con la programación recomendada para la vacuna de conjugados neumocócicos en los Estados Unidos, con la serie para infantes administrada a los 2, 4 y 6 meses de edad. Por lo tanto, los monos Rhesus infantes fueron inmunizados comenzando a 2-3 meses de edad y se les administró la vacuna en intervalos de 2 meses. La cuarta dosis, la cual es también parte de la programación recomendada para niños en Estados Unidos no fue administrada. Se emplearon conejos adultos (NZWR) para evaluar múltiples formulaciones de vacunas. Los estudios en NZWR se llevaron a cabo utilizando dos dosis de vacuna proporcionadas en un régimen de inmunización acelerado (intervalo de 2 semanas). Para la evaluación preclínica de las respuestas inmunes, se administró una dosis para humano completa a conejos mientras que los monos infantes recibieron una mitad de dosis para humanos. El razonamiento para la selección de una mitad de la dosis para humanos para los monos infantes fue debido a limitaciones en el volumen que se puede administrar a los monos Rhesus infantes en un único sitio intramuscular.

Evaluación de Respuestas de IgG Serotipo-específicas

Se desarrolló un ensayo de electroquimiluminiscencia multiplexado (ECL, siglas en inglés) para el uso con suero de conejo y de mono Rhesus basado en un ensayo en humanos utilizando tecnología de Descubrimiento de Meso escala (MSD, siglas en inglés) la cual utiliza una etiqueta SULFO-TAG™ que emite luz luego de estimulación electroquímica. Ver Marchese *et al.*, 2009, Clin Vaccine

Immunol 16:387–96. Utilizando un lector de placas ECL dedicado, se coloca una corriente eléctrica a través de los electrodos asociados a las placas dando como resultado una serie de reacciones eléctricamente inducidas que conducen a una señal luminiscente. La configuración de múltiples puntos empleada en el desarrollo y validación fue 10 puntos/ pocillo en un formato de placa de 96 pocillos, y cada pocillo fue recubierto con 5 ng de polisacárido (Ps) neumocócico (Pn) por punto. Se emplearon formatos de dos placas para asegurar que los polisacáridos de entrecruzamiento (es decir, 6A y 6B, y 19A y 19F) eran analizados en placas separadas. El formato de placa 1 contenía los serotipos 3, 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, y 23F mientras que el formato de placa 2 contenía los serotipos 1, 5, 6A, 7F, 19A, 22F y 33F. Cada pocillo también contenía dos puntos de albúmina sérica bovina (BSA, por sus siglas en inglés) que se emplearon para evaluar la reactividad de fondo del ensayo (es decir, la respuesta asociada con suero y anticuerpo secundario rotulado en ausencia de PnPs). El patrón del ensayo (89SF–2), los controles, y sueros del ensayo se diluyeron hasta niveles apropiados en solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía 0,05% de Tween 20, 1% de BSA, 5 µg/ml de C-polisacárido (CPs), 10 µg/ml de polisacárido serotipo 25 (PnPs25) y 10 µg/ml de polisacárido serotipo 72 (PnPs72) y se incubó durante la noche a 4°C (2 hasta 8°C) o a temperatura ambiente durante 45 minutos. Los reactivos de anticuerpos humanos y patrones se emplearon cuando se analizaron las muestras de monos infantiles mientras que IgG anti-conejo etiquetada con SULFO–TAG™ se empleó como el anticuerpo secundario cuando se analizaron muestras de suero de conejo. Cada placa recubierta con antígeno se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora en una plataforma agitadora con agente de bloqueo. Las placas se lavaron con 0,05% PBS–T y 25 µL por pocillo de los sueros de ensayo preadsorbidos y diluidos se agregaron e incubaron durante 45 min. a temperatura ambiente en una plataforma

de agitación. Las placas se lavaron con 0,05% de PBS–T y luego se agregó a cada pocillo anticuerpo secundario de IgG anti-humana de cabra etiquetado con SULFO–TAG™ MSD (para suero de mono Rhesus) y anticuerpo secundario de IgG anti-conejo de carba etiquetado (para suero de conejo) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en una plataforma de agitación. Las placas se lavaron con 0,05% PBS–T y 150µL de Tampón de Lectura MSD–T 4X (con surfactante) diluido 1:4 en agua agregado a cada pocillo. Las placas se leyeron utilizando un MSD Sector Imager Modelo No. 2400 o 6000. Para estudios en conejos, los resultados son presentados como títulos medios geométricos (GMTs (por sus siglas en inglés)) o relaciones de GMTs. Para estudios en monos Rhesus infantes, los resultados fueron expresados como concentraciones medias geométricas leídas de una curva estándar empleando las concentraciones de IgG específica para el serotipo asignadas al patrón de referencia humano (89 SF–2).

Evaluación de Respuestas Funcionales (Opsonofagocíticas)

Se analizaron muestras del estudio 2 de monos Rhesus infantes en un ensayo MOPA 4-plexado (MOPA–4). Ver Burton *et al.*, 2006, Clin Vaccine Immunol 13:1004–9. El ensayo emplea cepas bacterianas seleccionadas para ser resistentes a uno de 4 antibióticos de modo que la primera parte del ensayo (opsonización y captación en células HL-60 diferenciadas) puede realizarse con hasta 4 serotipos a la vez. La lectura para la matanza bacteriana se realiza en paralelo en presencia de cada uno de los 4 antibióticos a los cuales las cepas correspondientes son resistentes a fin de determinar títulos de matanza para cada serotipo específico. Los resultados son expresados como la dilución recíproca a la cual se observa 50% de matanza (luego de la interpolación).

Metodología Estadística para Estudios Preclínicos

Ambos modelos animales tienen limitaciones relacionadas con el tamaño de la muestra. En general, 8 monos infantes u 8 conejos se emplearon por cada

brazo del estudio. Con 8 animales por brazo, una diferencia en veces crítica en título medio geométrico entre los brazos del tratamiento de 2,5 veces era considerada como un umbral de respuesta significativo. La diferencia de 2,5 veces se determinó en base a la presunción de que para cada serotipo, la desviación estándar de los títulos log transformados naturales dentro de un brazo de tratamiento es $\ln(2)$. Dejando $\bar{Y}_i$ denotar la media de los títulos transformados $\ln$ en el brazo del tratamiento i^{th} , n_i la cantidad de animales dentro del brazo de tratamiento i^{th} , σ_i^2 la varianza conocida de los títulos transformados $\ln$ entre animales dentro del brazo de tratamiento i^{th} , y estableciendo $n_i = 8$ y $\sigma_i^2 = (\ln(2))^2$ para todos i , luego el valor de 2,5 se obtiene resolviendo para $e^{\bar{Y}_j - \bar{Y}_k}$ donde

$$\frac{\bar{Y}_j - \bar{Y}_k}{\sqrt{\frac{\sigma_j^2}{n_j} + \frac{\sigma_k^2}{n_k}}} = Z_{0.995}, \text{ y } Z_{0.995} \text{ denota la inversa de la distribución}$$

acumulativa normal estándar, con una probabilidad de 0,995 (es decir, $Z_{0.995} = 2,576$). Nótese que el valor calculado de 2,44 es redondeado a 2,5 ya que 2,5 también proporciona un recíproco conveniente en 0,4.

Respuesta de IgG específica del Serotipo de Monos Rhesus Infantes (IRMs) a PCV-15

Se llevó a cabo un estudio de inmunogenicidad piloto (IRM-1) para determinar si los monos rhesus infantes (IRMs (por sus siglas en inglés)) serían un buen modelo en el cual evaluar vacunas de conjugados de Pn polisacárido CRM₁₉₇. La meta principal del experimento consistió en determinar si IRMs (como los infantes humanos) serían no respondedores a Pn polisacáridos libres pero responderían bien a las vacunas de conjugados. Se inyectaron grupos de 5 IRMs comenzando a los 2-3 meses de edad con Pn polisacárido, , Prevnar[®] o PCV-15. Se administraron tres dosis de vacuna intramuscularmente (IM) en intervalos de 2 meses, y se midieron las respuestas de IgG específica del serotipo con

anterioridad a la primera dosis y a una post-dosis 2 a 1 mes y a una post-dosis 3 a 1 mes utilizando un ensayo de electroquimioluminiscencia (ECL) de multiarreglos (datos no mostrados).

Los resultados indicaron que IRMs respondieron pobremente, si respondieron de alguna manera, a Pn polisacárido libre pero respondieron muy bien a las vacunas de conjugados. Los resultados indicaron que la inducción de una respuesta de IgG a Pn polisacáridos en monos Rhesus infantiles dependía de la conjugación de los polisacáridos a una proteína portadora y, por lo tanto, era una respuesta dependiente de células T clásica. Por consiguiente, el modelo de IRM se determinó que era adecuado para evaluar formulaciones de PCV-15.

Se llevó a cabo un segundo estudio (IRM-2) para evaluar una formulación de PCV-15 utilizando un proceso de conjugación en masa que minimizó polisacárido libre (no conjugado) y CRM₁₉₇ no conjugado. La Figura 1 muestra las respuestas de IgG postdosis 2 (PD-2) y postdosis 3 (PD-3) a PCV-15 versus Prevnar[®] para los 7 serotipos contenidos en Prevnar[®] (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F). Las respuestas de PD-2 a PCV-15 eran equivalentes o ligeramente inferiores a las respuestas correspondientes a Prevnar[®] mientras que las respuestas de PD-3 a PCV-15 eran de algún modo superiores a aquellas activadas por Prevnar[®] para casi todos los serotipos.

Las respuestas de IRM a los serotipos no Prevnar en PCV-15 se muestran en la Figura 2. Las respuestas PD-2 a los serotipos no Prevnar en PCV-15 eran todas al menos 10 veces superiores que las concentraciones de IgG de punto de partida (pre-vacunación), y los títulos continuaron elevándose a PD-3.

Los resultados indican que las respuestas de anticuerpos a PCV-15 y Prevnar[®] eran comparables para los 7 serotipos comunes y que las respuestas

post-vacunación a PCV-15 eran > 10 veces superiores al punto de partida para los 8 serotipos agregados.

Respuesta Inmune Funcional (Opsonofagocítica) de IRMs a PCV-15

A fin de determinar si PCV-15 inducía respuestas de anticuerpos funcionales en monos infantiles, se llevó a cabo un ensayo de matanza opsonofagocítica (OPA) en sueros de IRM-2. Las respuestas pre-vacunación, PD-2, y PD-3 a PCV-15 y Prevnar[®] se muestran en la Tabla 2. Los resultados mostrados son los GMTs de muestras séricas de 7-8 monos por cada punto en el tiempo ensayado por duplicado. También se muestra el porcentaje de respondedores (es decir, aquellos con títulos OPA ≥ 8) en el punto en el tiempo PD-3. PCV-15 indujo un GMT de PD-2 elevado para todos los serotipos excepto para los tipos 1 y 33F. Después de 3 dosis de vacuna, PCV-15 indujo GMTs de OPA elevados a cada serotipo y un índice de respuesta OPA del 100% para todos los 15 serotipos contenidos en la vacuna. Nótese que, PCV-15 también indujo una buena respuesta de OPA reactiva en forma cruzada al serotipo 6C, que no está en la vacuna. Prevnar[®] indujo títulos de OPA elevados y un índice de respuesta del 100% para todos los serotipos contenidos en esa vacuna, pero indujo solamente una respuesta débil reactiva en forma cruzada a los serotipos 6A y 6C en una fracción de monos.

5 Tabla 2: GTMs de OPA Específicos del Serotipo en Monos Rhesus Infantes después de Vacunación con PCV-15 o Prevnar®
(Título medios geométricos Pre-vacunación, PD-2, y PD-3 y porcentaje de respondedores PD-3 con un título ≥ 8)

Sero-tipo	Prenar				PCV-15			
	Pre	PD-2	PD-3	Respon- dedores PD- 3 (títulos ≥ 8)	Pre	PD-2	PD-3	Respon- dedores PD- 3 (títulos ≥ 8)
1	n.d. .	n.d.	n.d.	n.d.	4	65	340	100%
3	n.d. .	n.d.	n.d.	n.d.	5	1442	1548	100%
4	4	11459	5004	100%	4	5280	3453	100%
5	4	4	4	0%	4	1879	1719	100%
6A	4	21	113	57%	4	1188	7807	100%
6B	8	8294	6043	100%	4	2477	9601	100%
<i>6C</i>	4	<i>11</i>	<i>16</i>	<i>29%</i>	4	<i>1038</i>	<i>5134</i>	<i>100%</i>
7F	4	4	71	43%	4	7541	10092	100%
9V	4	1779	748	100%	4	625	1297	100%
14	8	12395	7782	100%	4	11366	9891	100%
18C	4	5571	1718	100%	4	1934	1701	100%
19A	4	15	4	0%	4	2210	1895	100%
19F	4	1365	432	100%	4	2555	4021	100%
22F	n.d. .	n.d.	n.d.	n.d.	4	2489	7298	100%
23F	4	1789	2126	100%	4	3093	2465	100%
33F	n.d. .	n.d.	n.d.	n.d.	4	14	11548	100%
Nota: Los serotipos contenidos en Prenar están en negrita. Los resultados para el serotipo 6C se muestran en cursiva puesto que ese serotipo no está contenido en PCV-15. n.d. no determinado								

Evaluación de Formulaciones de PCV-15 en Conejos Blancos de Nueva

10 Zelanda

Las formulaciones de PCV-15 se evaluaron en 4 estudios en Conejos Blancos de Nueva Zelanda (NZWRs) adultos utilizando un régimen de inmunización comprimido en el cual los conejos recibieron una dosis para

humanos completa de vacuna en el día 0 y en el día 14, y se recolectó suero en el día 0, 14 y 28 para análisis. Todos los estudios se compararon con la referencia Prevnar[®], y se resumieron en la Tabla 3 (Experimentos con NZWR 1–4).

Los resultados se muestran en la Tabla 3 para respuestas post-dosis 2 de conejos blancos de Nueva Zelanda expresados como una relación de las respuestas de IgG medias geométricas a PCV–15 de Merck con respecto a Prevnar[®] para los serotipos en común entre las vacunas.

Tabla 3

Relaciones de Respuestas de IgG Post-dosis 2 (PCV–15:PrevnaTMr) de Formulaciones de PCV–15 y Plomo Analizadas en NZWR

Serotipo	NZWR–1	NZWR–2	NZWR–3	NZWR–4
4	0,70	0,59	0,63	1,06
6B	1,35	0,49	1,53	0,45
9V	2,07	1,79	1,70	1,31
14	2,37	0,58	2,32	2,55
18C	0,87	0,6	0,52	0,27
19F	0,66	0,76	2,70	1,25
23F	0,36	0,30	1,22	0,41

Las respuestas de IgG específicas del serotipo estaban generalmente dentro de 2,5 veces de las respuestas correspondientes a Prevnar[®]. Una excepción era el serotipo (23F), el cual era > 2,5 veces inferior a aquella a Prevnar[®] en 2 de 4 experimentos. La elevación en veces en los niveles de anticuerpos a los serotipos no Prevnar[®] desde Día 0 hasta Día 28 (Post–dosis 2, PD–2) se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4

5 Elevación en cantidad de veces (Post-dosis 2:Pre-dosis 1) en Respuestas de IgG a Serotipos No Prevnar™ de Formulaciones PCV-15 y Plomo Analizadas en NZWR

Serotipo	NZWR-1	NZWR-2	NZWR-3	NZWR-4
1	14,9	30,5	55,1	59,9
3	33,6	16,2	61,5	28,5
5	12,8	70,2	112,0	134,0
6A	21,3	77,8	143,0	123,0
7F	42,0	83,8	194,0	108,0
19A	40,5	79,1	450,0	314,0
22F	45,7	87,8	243,0	135,0
33F	21,7	47,9	98,8	69,4

10 Efecto de Dosis de Vacuna de Conjugados de Polisacáridos sobre la Inmunogenicidad en NZWRs

La inmunogenicidad de una dosis aumentada (dosis doble, 2x) de conjugados de polisacáridos fue también evaluada para todos los serotipos contenidos en PCV-15 en comparación con la dosis planeada para un ser humano (1x) de la vacuna. Para la formulación de conjugados de polisacáridos 2x, la concentración de APA fue aumentada hasta 1,5x a fin de asegurar que la mayoría del conjugado estar unido al adyuvante de aluminio. Como se muestra en la Tabla 5, no parecía haber un beneficio significativo en el aumento de la cantidad de conjugado – polisacárido en la vacuna. Las diferencias a través de todos los serotipos estaban dentro de 2 veces, y la relación en cantidad de veces media geométrica (1x PCV-15/2X PCV-15 +1.5X APA) era 1,1.

Tabla 5

5 Títulos de IgG Medios Geométricos Post-dosis (95% intervalos de confianza) con Prevnar[®], 1x dosis para humanos de PCV-15* o 2x Dosis para Humanos de PCV-15[†] en NZWR

	Brazo de Tratamiento			Diferencia en Cantidad de Veces
Serotipo	Prevnam[™] (n=8)	1x PCV-15 (n=8)	2x PCV-15 (n=8)	Relación de 2x PCV-15/1x PCV-15
4	736,400	436,000	472,100	1.1
	(483200, 1122400)	(199700, 951700)	(246800, 902900)	
6B	363,600	176,500	196,900	1.1
	(205000, 644800)	(72800, 427800)	(85900, 451400)	
9V	298,200	534,700	580,600	1.1
	(173800, 511700)	(362800, 788100)	(366300, 920200)	
14	345,200	198,900	273,600	1.4
	(200200, 595000)	(94500, 418700)	(229500, 326100)	
18C	954,500	573,000	455,900	0.8
	(815700, 1116800)	(396900, 827400)	(245100, 848000)	
19F	720,100	548,000	544,300	1.0
	(475700, 1090200)	(367700, 816800)	(269000, 1101400)	
23F	816,300	246,200	188,500	0.8
	(565100, 1179100)	(117200, 517100)	(78100, 454800)	
1	5,300	91,500	72,200	0.8

	(3100, 9200)	(62600, 133600)	(46700, 111600)		
3	12,000	32,300	23,600		0.7
	(8600, 16800)	(19600, 53000)	(14100, 39400)		
5	5,700	245,600	224,600		0.9
	(4100, 7900)	(114200, 528200)	(136700, 369100)		
6A	525,900	186,700	251,800		1.3
	(275000, 1005600)	(71300, 488600)	(102300, 620100)		
7F	4,600	326,900	212,200		0.6
	(4000, 5200)	(238000, 449000)	(134200, 335500)		
19A	432,800	260,900	276,100		1.1
	(237800, 787800)	(145500, 468000)	(153200, 497600)		
22F	6,000	359,800	345,300		1.0
	(4400, 8100)	(239000, 541700)	(221200, 539000)		
33F	6,600	177,400	138,500		0.8
	(4700, 9300)	(118300, 266200)	(68300, 280900)		

*Formulado con 1x adyuvante de aluminio (APA)

† Formulado con 1,5x de APA

Efecto de Adyuvante de Aluminio sobre la Inmunogenicidad de PCV-15

5 en NZWRs

El impacto del adyuvante de aluminio (APA) sobre las respuestas de anticuerpos se evaluó en un estudio en conejos. PCV-15 formulada con la dosis para humanos planeada de APA (PCV-15 1x APA), con el doble de la dosis para humano planeada de APA (PCV-15 2x APA), y sin adyuvante de aluminio alguno
10 (PCV-15 0x APA), se analizaron. Un grupo de Pevnar[®] también fue incluido en el estudio.

Los resultados PD-2 indicaron que el duplicar la concentración de APA tuvo poco impacto sobre la respuesta de IgG específica para el serotipo a PCV-15. La diferencia en cantidad de veces en título (1x APA/2x APA) osciló entre 0,6 (serotipo 6B) y 2,3 (serotipo 22F) y la relación de cantidad de veces media geométrica a través de los 15 serotipos fue 1,1. En ausencia del adyuvante de aluminio, los títulos de anticuerpos parecían ser inferiores para muchos de los serotipos relacionados con PCV-15 con 1x APA. La diferencia en cantidad de veces en la titulación (1x/0x) osciló entre 0,5 (serotipo 5) y 2,9 (serotipo 23F) y la relación en cantidades de veces de la media geométrica a través de los 15 serotipos fue 1,4. En general, parece no haber una ventaja genuina en el aumento al doble del nivel de adyuvante de aluminio y parece haber una desventaja en la eliminación del adyuvante (Tabla 6) en este modelo animal.

Los resultados PD-2 indicaron que había una disminución en los títulos de anticuerpos para muchos de los serotipos en el brazo que no contenía Adyuvante de fosfato de Aluminio (APA, por sus siglas en inglés) cuando se comparó con PCV-15 que contenía APA (Figura 3) lo cual indica un requerimiento de la inclusión de un adyuvante de aluminio para una óptima inmunogenicidad de PCV-15 en conejos. Por añadidura, no se encontró beneficio alguno cuando se incluyó el doble de la cantidad de APA en la vacuna (datos no mostrados).

Tabla 6

Títulos de IgG Medios Geométricos Post-Dosis 2 (95% intervalos de confianza) de PCV-15 Formulada con 1x, 2x o 0x Adyuvante de Aluminio (APA) en NZWR

5

Brazo del Tratamiento					Diferencia en Cantidad de Veces Con Relación a PCV-15 (1x APA)	
Sero	Prevnam TM (n=8)	PCV-15 1x APA (n=8)	PCV-15 2x APA (n=8)	PCV-15 0x APA (n=6)	1x/2x APA	1x/0x APA
4	380,700	268,400	196,200	404,600	1.4	0.7
	(226100, 641000)	(205100, 351200)	(84000, 458800)	(105500, 1550700)		
6B	105,900	143,300	236,200	93,800	0.6	1.5
	(59800, 187400)	(90700, 226300)	(102000, 547100)	(46300, 189700)		
9V	271,600	562,000	595,600	569,200	0.9	1.0
	(177400, 415700)	(382700, 825400)	(390200, 908900)	(239900,1350 500)		
14	142,500	337,600	453,000	167,600	0.7	2.0

	(75200, 269700)	(174000, 654900)	(237400, 864400)	(65100, 431700)			
18C	323,000	282,200	248,700	175,200		1.1	1.6
	(250400, 416500)	(210400, 378500)	(193900, 319000)	(91800, 334000)			
19F	302,500	199,800	243,400	127,700		0.8	1.6
	(232700, 393200)	(132200, 302100)	(87600, 676600)	(35100, 463700)			
23F	328,200	117,200	77,600	40,200		1.5	2.9
	(178200, 604300)	(60300, 227700)	(31300, 192300)	(10100, 160900)			
1	5,600	91,700	67,800	53,300		1.4	1.7
	(4400, 7200)	(46800, 179800)	(38900, 118100)	(14800, 191600)			
3	6,300	156,100	155,700	104,000		1.0	1.5
	(4800, 8100)	(104800, 232500)	(75300, 322200)	(45000, 240000)			
5	4,800	81,700	60,700	176,100		1.3	0.5
	(4000, 5700)	(50800, 131300)	(29100, 126400)	(72100, 430300)			
6A	84,500	163,600	226,800	99,300		0.7	1.6
	(50300,	(114000,	(92500,	(48800,			

	141900)	234900)	556200)	202000)			
7F	5,200	216,800	282,100	212,200		0.8	1.0
	(3300, 8400)	(141500, 332000)	(158200, 503200)	(64200, 701900)			
19A	95,100	238,300	207,400	125,700		1.1	1.9
	(54300, 166700)	(161000, 352700)	(69800, 615900)	(34000, 465100)			
22F	6,500	348,900	149,400	336,800		2.3	1.0
	(4900, 8500)	(267200, 455500)	(90100, 247600)	(184200, 615700)			
33F	7,100	235,600	163,600	222,000		1.4	1.1
	(5000, 10100)	(106500, 521300)	(92700, 288800)	(125100, 393800)			

Discusión y Conclusiones

Los datos preclínicos demuestran que una formulación de PCV-15 (formulada en APA) es altamente inmunógena en dos especies (monos Rhesus
5 infantes y conejos). Las respuestas específicas para el serotipo a PCV-15 eran comparables con aquellas producidas por Prevnar[®] para los 7 serotipos en común entre las vacunas. Para los 8 serotipos nuevos en PCV-15, había una fuerte respuesta producida en monos Rhesus infantes así como también en conejos, con una elevación de ≥ 10 veces en respuestas de IgG para todos los serotipos
10 después de 2 dosis de vacuna en ambas especies. Los experimentos con rangos de dosis limitados indicaron que un aumento de 2 veces en la cantidad de conjugados de polisacáridos no dio como resultado una respuesta de anticuerpos aumentada. Similarmente, un aumento del doble en la concentración de adyuvante de aluminio no pareció mejorar significativamente el perfil de
15 inmunogenicidad de PCV-15. Sin embargo, la eliminación del adyuvante dio como resultado respuestas inferiores a algunos serotipos lo cual sugiere la potencial necesidad de un adyuvante en seres humanos. Las respuestas de anticuerpos funcionales (OPA) fueron producidas por PCV-15 a todos los 15 serotipos en la vacuna así como también al Serotipo 6C, el cual no es un
20 componente de PCV-15.

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunógena que comprende:

(1) una mezcla de conjugados de polisacáridos – proteína multivalente que consiste en polisacáridos capsulares de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, y 33F de *Streptococcus pneumoniae* conjugados a una proteína portadora; y

(2) un portador farmacéuticamente aceptable.

2. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 1, donde la proteína portadora es CRM₁₉₇.

3. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 1, la cual comprende además un adyuvante.

4. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 3, donde el adyuvante es un adyuvante a base de aluminio.

5. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 4, donde el adyuvante se selecciona del grupo formado por fosfato de aluminio, sulfato de aluminio e hidróxido de aluminio.

6. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 5, donde el adyuvante es fosfato de aluminio.

7. Un método para inducir una respuesta inmune a un polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae*, que comprende administrar a un humano una cantidad inmunológicamente eficaz de la composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 1.

8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, donde la composición inmunógena administrada es una dosis única de 0,5 mL formulada para contener: 2 µg de cada sacárido, excepto por 6B a 4 µg; alrededor de 32 µg de proteína portadora CRM₁₉₇; 0,125 mg de adyuvante de aluminio elemental (0,5 mg de fosfato de aluminio); cloruro sódico 150 mM y tampón de L-histidina 20 mM.

RESUMEN DE LA DESCRIPCIÓN

La presente invención provee una composición inmunógena multivalente que tiene 15 conjugados de polisacáridos- proteína distintos. Cada conjugado consiste en un polisacárido capsular preparado a partir de un serotipo diferente de

5 *Streptococcus pneumoniae* (1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F o 33F) conjugado a una proteína portadora, preferentemente CRM₁₉₇. La composición inmunógena, preferentemente formulada como una vacuna sobre un adyuvante a base de aluminio, proporciona una amplia cobertura contra la enfermedad neumocócica, particularmente en infantes y niños pequeños.

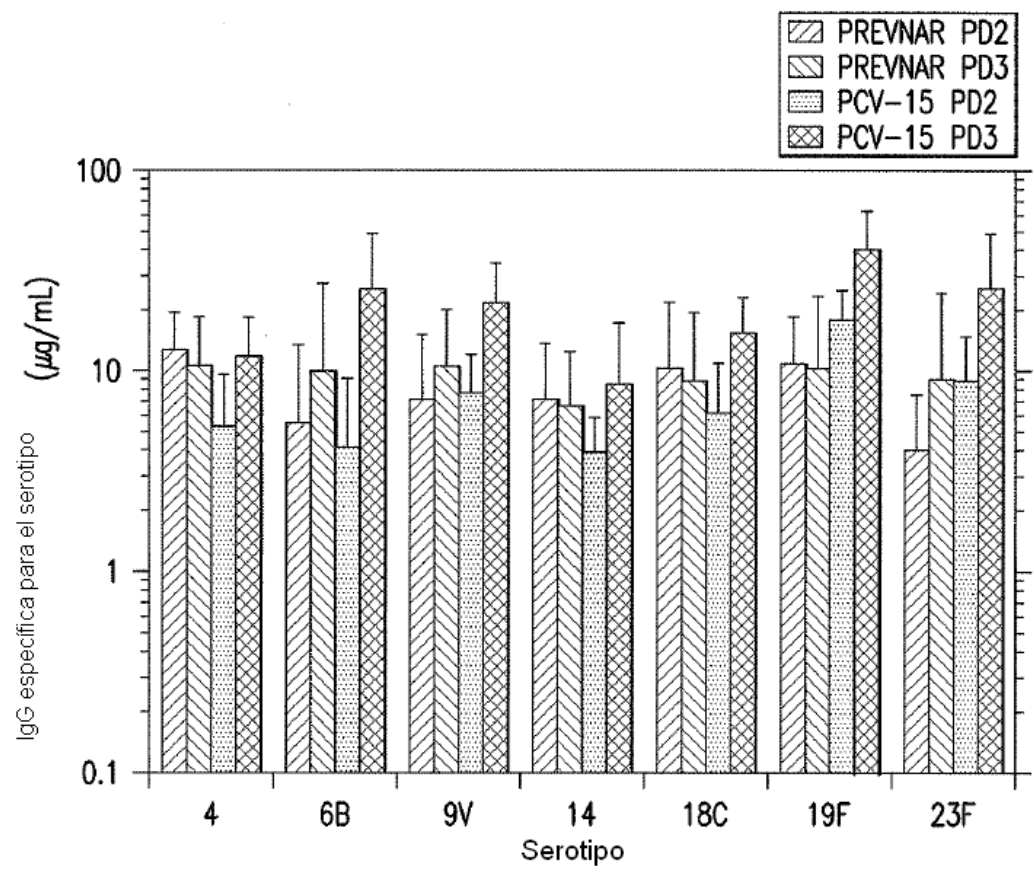


FIG.1

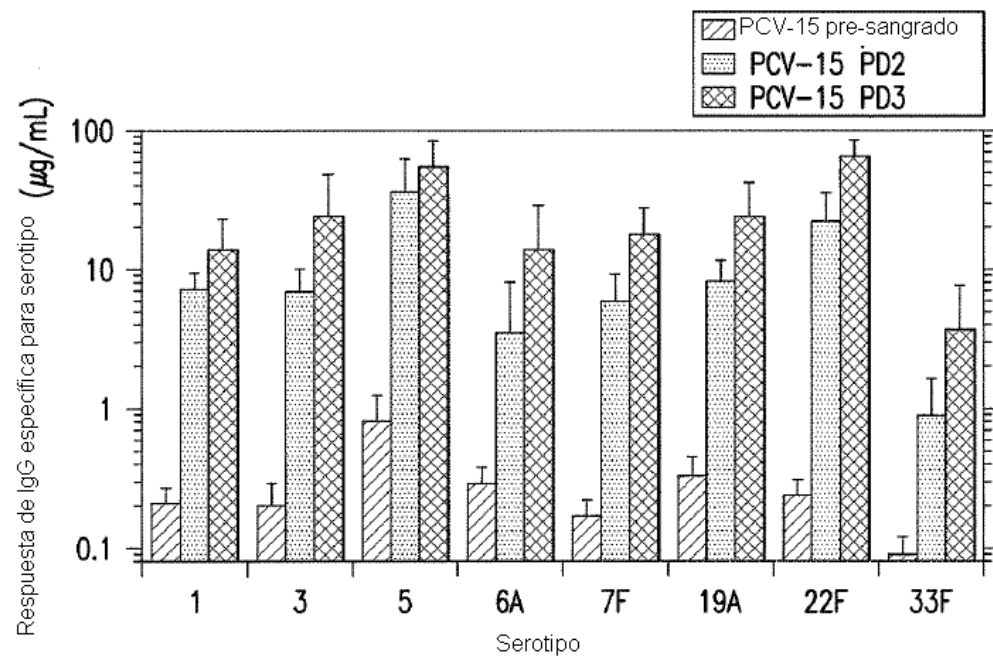


FIG.2

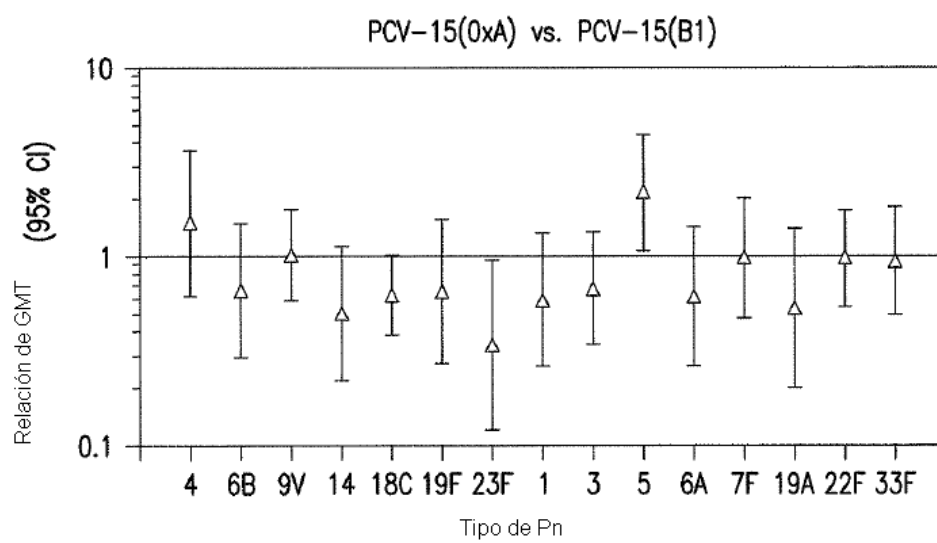


FIG.3

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference MRLIFD00042	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US 11/23526	International filing date (<i>day/month/year</i>) 03 February 2011 (03.02.2011)	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 09 February 2010 (09.02.2010)
Applicant MERCK SHARP & DOHME CORP.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 2 sheets.

☐ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of:

☒ the international application in the language in which it was filed.

☐ a translation of the international application into _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).

b. ☐ This international search report has been established taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (see Box No. II).

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box No. III).

4. With regard to the title,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the drawings,

a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. 1

☒ as suggested by the applicant.

☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.

☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.

b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/23526

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - A61K 39/00 (2011.01)

USPC - 424/184.1

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC (8) - A61K 39/00 (2011.01)

USPC - 424/184.1

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC - 424/184.1, 244, 1, 203, 1, 197.11 (see search terms below)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

PubWEST (PGPB, USPT, USOC, EPAB, JPAB); Google

Search Terms Used: multivalent, capsular, polysaccharide, conjugate, serotype, Streptococcus pneumoniae, CRM197, aluminum phosphate, histidine, buffer, 33F, 6B

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	US 2009/0010959 A1 (Biemans et al.) 08 January 2009 (08.01.2009), para [0023]-[0028], [0063], [0084], [0129], [0143], [0212]	1-7 ----- 8
Y	US 2009/0035326 A1 (Contorni et al.) 05 February 2009 (05.02.2009), para [0078]-[0089]	8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 March 2011 (21.03.2011)

Date of mailing of the international search report

04 APR 2011

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300

PCT OSP: 571-272-7774