



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Crr

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-117685-A-00000-0000

Fecha: 2012-12-14 11:48:04 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 94

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. 07-117685 A

54. TÍTULO _____

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE _____

DOMICILIO _____

74. APODERADO _____

22. BOGOTÁ, D. C., _____

PETITORIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

FORMULARIO ÚNICO DE S
PCT
ENTRADA EN FASE

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-117685-00000-0000

Fecha: 2007-11-07 16:22:27 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 196

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-117685-A-00000-0000

Fecha: 2012-12-14 11:48:04 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 94

1

SOLICIT

☒

Patente de Invención

☒

Capítulo I.

☐ Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: WYETH

Dirección: Five Giralda Farms, Madison, New Jersey 07940, Estados Unidos de América

Nacionalidad o Domicilio: Nueva Jersey, Estados Unidos de América

Lugar de Constitución: Delaware, Estados Unidos de América

Teléfono:

Fax:

E-Mail

IDENTIFICACION

C.C.

NIT

C.E.

Otro

Cual

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

Dirección: Avenida 82 No.10-62 Piso 6

Teléfono: 634 1500

Fax: 376 2211

E-Mail: office.bogota@bakernet.com

IDENTIFICACION

C.C.

NIT

C.E.

Otro

Cual

Número

79.143.366 de

Usaquén

TP 20.281

4

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: HAUSDORFF, William P. SIBER, George Rainer y PARADISO, Peter R.

Dirección: Avenue De La Chapelle, 19, B-1200 Woluwe Saint-lambert, Bélgica; 160 West 66th Street, New York, NY 10023, Estados Unidos de América y 445 Freedom View Lane, Valley Forge, PA 19481, Estados Unidos de América, respectivamente

Nacionalidad o Domicilio: Estadounidenses

5

PCT (85)

Solicitud Internacional No. PCT/US2006/012354

Fecha 31-MAR-06

Publicación Internacional No. WO/2006/110381

Fecha 19-OCT-06

6

Título (54)

COMPOSICIÓN CONJUGADA DE POLISACÁRIDO-PROTEÍNA NEUMOCÓCICA MULTIVALENTE

7

Clasificación Internacional (51)

A61K 39/395, A61K 39/02, A61K 39/09, A61K 39/295

8

Prioridad

SI

☒

NO

☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

08-ABR-05

(31) Número de Solicitud

60/669,605

9

Comprobante de pago No. 07-76786

Fecha 21-SEP-07

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES

1. Identificación del Trámite

- ☐ Conversión ☒ División ☐ Fusión
- ☒ Patente de Invención
☐ Patente de Modelo de Utilidad
☐ Registro de Diseño Industrial
☐ Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

2. Datos del solicitante

Persona Natural ☐

Persona Jurídica ☒

Wyeth

Nombre o denominación / Nombre o razón social

Nombre del representante legal

Tipo de empresa

Micro ☐

Pequeña ☐

Mediana ☐

Otra ☐

Documento de identificación:

☐ C.C.

☐ C.E.

☐ NIT

☐ Otro

Número _____

Nacionalidad/País de constitución	Dirección del titular	Ciudad
Estados Unidos de América	Five Girdas Farms, Madison, NJ 07940, Estados Unidos	Nueva Jersey
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
Alvaro.correa@bakermckenzie.com	3762211	6341500

☐ Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico

3. Datos del apoderado:

Correa Ordoñez Alvaro

79.143.366

20.281

Apellidos y Nombre

Documento de identificación

Tarjeta profesional

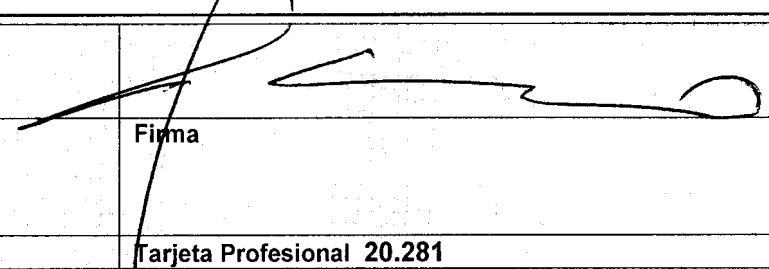
Dirección y domicilio		Ciudad
Av 82 No. 10 62 Piso 6		Bogotá
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
alvaro.correa@bakermckenzie.com	3762211	6341500

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general _____

4. Datos del trámite		
CONVERSION	DIVISION	FUSION
Expediente _____ _____ _____ De: _____ A: _____	Expediente <u>07.117.685</u> _____ _____ De: _____ A: _____	Expediente _____ _____ _____ De: _____ A: _____

5. Comprobante de Pago No <u>12-0085736</u>	Fecha <u>22 / 08 / 2012</u>
---	-----------------------------

6. Anexos										
<table border="1"><tr><td>☒</td><td>Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación</td></tr><tr><td>☐</td><td>Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación</td></tr><tr><td>☐</td><td>Número de documento que ordena la comisión o fusión o división</td></tr><tr><td>☒</td><td>Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud</td></tr><tr><td>☐</td><td>Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético</td></tr></table>	☒	Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación	☐	Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación	☐	Número de documento que ordena la comisión o fusión o división	☒	Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud	☐	Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético
☒	Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación									
☐	Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación									
☐	Número de documento que ordena la comisión o fusión o división									
☒	Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud									
☐	Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético									

7. Firma	
Nombre y apellidos	Firma
Alvaro Correa Ordoñez	
C.C. <u>79.143.366</u>	Tarjeta Profesional <u>20.281</u>

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

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0085736

Bogotá D.C., Agosto 22 de 2012 - 09:57:07

RECIBIDO DE : BAKER & MCKENZIE

MT 900.034.906

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	450027491	21/08/2012	73.321.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	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 CORRIENTE**

Responsable:

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-117685-A-00000-0000

Fecha: 2012-12-14 11:48:04 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 94

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

Agosto 22 de 2012 - 09:57:33

COMPOSICIÓN CONJUGADA DE POLISACÁRIDO-PROTEÍNA NEUMOCÓCICA
MULTIVALENTE

CAMPO DE LA INVENCION

5

La presente invención se relaciona de manera general con el campo de la medicina, y específicamente con microbiología, inmunología, vacunas y la prevención de infección por patógeno bacteriano mediante inmunización.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El *Streptococcus pneumoniae* es la causa principal de meningitis, neumonía, y enfermedad invasiva severa en niños y recién nacidos en todo el mundo. Las vacunas de polisacárido neumocócicas multivalentes se han licenciado durante muchos años y han probado ser valiosas para evitar la enfermedad neumocócica en adultos mayores y en pacientes de alto riesgo. Sin embargo, los recién nacidos y los niños jóvenes responden pobremente a la mayoría de los polisacáridos neumocócicos. La vacuna de conjugado neumocócica hepta-valente (7vPnC, Prevnar®) fue la primera de su clase que demostró ser altamente inmunogénica y efectiva contra la enfermedad invasiva y otitis media en niños y recién nacidos. Esta vacuna está ahora aprobada en muchos países alrededor del mundo. La Prevnar contiene los polisacáridos capsulares de los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F, cada una conjugada a una proteína portadora designada CRM₁₉₇. La

25

Pprevnar cubre aproximadamente 80-90%, 60-80%, y 40-80% de la enfermedad neumocócica invasiva (IPD) en los Estados Unidos, Europa, y otras regiones del mundo, respectivamente [1,2]. Los datos de vigilancia recogidos en los años siguientes a la introducción de la Pprevnar han demostrado claramente una reducción de la enfermedad neumocócica invasiva en recién nacidos en los Estados Unidos como se esperaba (FIG. 1) [3,4].

10 La vigilancia del IPD conducida en recién nacidos en los Estados Unidos antes de la introducción de la Pprevnar demostró que una porción significativa de la enfermedad debida a los serogrupos 6 y 19 se debió a los serotipos 6A (aproximadamente un tercio) y 19A (aproximadamente un cuarto)

15 [5,6]. La vigilancia de la enfermedad invasiva neumocócica conducida en los Estados Unidos después de la licencia de la Pprevnar sugiere que un gran grupo de enfermedades es aún atribuible a los serotipos 6A y 19A (FIG. 1) [3]. Más aún, estos dos serotipos cuentan con más casos de enfermedad

20 invasiva que los serotipos 1, 3, 5, y 7F combinados (8.2 vs. 3.3 casos/100,000 niños de dos años y menos). Además, los serotipos 6A y 19A están asociados con altas tasas de resistencia a antibiótico (FIG. 2) [7,8,9]. Aunque es posible que la protección cruzada del serogrupo dé como resultado una

25 declinación de la enfermedad por los serotipos 6A y 19A en razón a que más niños están inmunizados, existe evidencia que sugiere que habrá un límite en la declinación, y un grupo

significativo de enfermedad debido a estos serotipos subsistirá (ver adelante).

Dado el grupo y la importancia relativa de la enfermedad neumocócica invasiva debido a los serotipos 1, 3, 5, 6A, 7F, y 19A, agregar estos serotipos a la formulación Prevnar incrementaría el cubrimiento para la enfermedad invasiva a > 90% en los Estados Unidos y Europa, y tan alta como el 70%-80% en Asia y América Latina. Esta vacuna expandiría significativamente el cubrimiento más allá de la Prevnar, y suministraría cubrimiento para 6A y 19A que no es dependiente de las limitaciones de la protección cruzada del serogrupo.

RESUMEN DE LA INVENCION

15

De acuerdo con esto, la presente invención suministra de manera general una composición inmunogénica multivalente que comprende 13 diferentes conjugados de polisacárido-proteína, en donde cada uno de los conjugados contiene un polisacárido capsular proveniente de un serotipo diferente de *Streptococcus pneumoniae* conjugado a una proteína portadora, junto con un vehículo fisiológicamente aceptable. De manera opcional, un adyuvante, tal como un adyuvante a base de aluminio, está incluido en la formulación. Más específicamente, la presente invención suministra una composición de conjugado neumocócico 13-valente (13vPnC) que comprende los siete serotipos en la vacuna 7vPnC (4, 6B, 9V,

20

25

H
8

14, 18C, 19F y 23F) más seis serotipos adicionales (1, 3, 5, 6A, 7F y 19A).

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

10 La presente invención suministra además una composición inmunogénica multivalente, en donde los polisacáridos capsulares son de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F de *Streptococcus pneumoniae*, la proteína portadora es CRM₁₉₇, y el adyuvante es un adyuvante a
15 base de aluminio, tal como fosfato de aluminio, sulfato de aluminio e hidróxido de aluminio. En una modalidad particular de la invención, el adyuvante es fosfato de aluminio.

La presente invención también suministra una composición
20 inmunogénica multivalente, que comprende conjugados de polisacárido-proteína junto con un vehículo fisiológicamente aceptable, en donde cada uno de los conjugados comprende un polisacárido capsular proveniente de un serotipo diferente de *Streptococcus pneumoniae* conjugado a una proteína portadora,
25 y los polisacáridos capsulares se preparan del serotipo 3 y por lo menos un serotipo adicional.

H2
9

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

10

La presente invención también suministra una composición inmunogénica multivalente, que comprende conjugados de polisacárido-proteína junto con un vehículo fisiológicamente aceptable, en donde cada uno de los conjugados comprende un polisacárido capsular proveniente de un serotipo diferente de *Streptococcus pneumoniae* conjugado a una proteína portadora, y los polisacáridos capsulares se preparan de los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F y por lo menos un serotipo adicional.

20

En una modalidad de esta composición inmunogénica multivalente, el serotipo adicional se selecciona del grupo que consiste de los serotipos 1, 3, 5, 6A, 7F, y 19A. En otra modalidad, la proteína portadora es CRM₁₉₇. En aún otra modalidad, la composición comprende un adyuvante, tal como un adyuvante basado en aluminio seleccionado de fosfato de aluminio, sulfato de aluminio e hidróxido de aluminio. En una modalidad particular, el adyuvante es fosfato de aluminio.

25

La presente invención también suministra un método para inducir una respuesta inmune a un conjugado de polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae*, que comprende administrar a un humano una cantidad inmunológicamente efectiva de cualquiera de las composiciones inmunogénicas ya descritas.

La presente invención suministra además que cualquiera de las composiciones inmunogénicas administrada en una dosis simple formulada de 0.5 mL contenga: 2 µg de cada sacárido, excepto para 6B en 4 µg; aproximadamente 29 µg de proteína portadora CRM₁₉₇; 0.125 mg de adyuvante de aluminio elemental (0.5 mg de fosfato de aluminio); y amortiguador de cloruro de sodio y succinato de sodio como excipientes.

15

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1 describe los cambios en las tasas IPD del serotipo en los niños de los Estados Unidos < 2 años de edad de la línea base (1998/1999) a 2001.

20

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

25

La FIG. 3 describe las curvas de distribución acumulada inversas (RCDC) de los resultados de OPA post-tercera dosis provenientes del ensayo D118-P16 Pevnar.

11/11

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**Inclusión de los Serotipos Pevnar 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F**

5

Los datos provenientes de la vigilancia IPD entre 1995-1998 estimaron que los siete serotipos en Pevnar fueron responsables por alrededor del 82% del IPD en niños < 2 años de edad [5]. En el norte de California, el sitio del ensayo de eficacia, los serotipos Pevnar contaron con el 90% de todos los casos de IPD en recién nacidos y niños jóvenes [10]. Desde la introducción de la vacuna Pevnar en el 2000, ha habido un decrecimiento significativo en las tasas de IPD totales debido a la disminución de la enfermedad debido a los serotipos de vacuna [3,4]. Por lo tanto, no existe justificación en este momento para remover cualquiera de los serotipos Pevnar provenientes de la siguiente generación de las vacunas de conjugado neumocócica sino por el contrario agregar serotipos para obtener un cubrimiento más amplio.

20

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

En los Estados Unidos, la tasa de IPD causada por el serotipo 1 en niños menores de 5 años es < 2%, aproximadamente lo mismo que para cada uno de los tipos 3 y 7F [1,6]. Los serotipos 1 y 5 cuentan con tasas superiores de IPD en poblaciones de los Estados Unidos en alto riesgo de enfermedad neumocócica invasiva. Específicamente, el serotipo

25

445
12

1 origina 3.5% de IPD en niños nativos de Alaska < 2 años de
edad, y 18% en niños de 2-4 años de edad [11]. Tanto el
serotipo 1 como el serotipo 5 causan significativamente
enfermedad en otras partes del mundo y en poblaciones
5 indígenas en países en desarrollo [12,13,14].

El serotipo 1 también se puede asociar con enfermedad
más severa comparada con otros serotipos neumocócicos [15].
Esta observación se basa en la diferencia en las tasas de
10 identificación de caso entre los Estados Unidos y Europa, y
la diferencia asociada en la práctica médica. En total, la
incidencia del IPD es inferior en Europa que en los Estados
Unidos. Sin embargo, el porcentaje de IPD causado por el
serotipo 1 en Europa es desproporcionadamente mayor que en
15 los Estados Unidos (6-7%, vs. 1-2%, respectivamente). En
Europa, cultivos de sangre se obtienen predominantemente de
niños hospitalizados. En los Estados Unidos, es una práctica
médica de rutina obtener cultivos de sangre en un paciente
externo que se ajusta a niños que presentan fiebre $\geq 39^{\circ}\text{C}$ y
20 conteos de células sanguíneas blancas elevados. Dada la
diferencia en la práctica médica, se postula que el
porcentaje inferior de enfermedad causada por el serotipo 1
en los Estados Unidos se puede diluir por tasas superiores de
otros serotipos que causan la enfermedad media, mientras que
25 el alto porcentaje en Europa refleja enfermedad más seria.
Además, los estudios de seroepidemiología de los niños con
neumonía complicada demuestran que el serotipo 1 está
desproporcionadamente representado [16,17,18]. Esto sugiere

440
13

que la inclusión del serotipo 1 puede reducir la cantidad de enfermedad neumocócica severa, así como también, contribuir a al reducción total en enfermedad neumocócica invasiva.

5 La adición de los serotipos 3 y 7F incrementará el cubrimiento contra el IPD en la mayoría de las áreas del mundo en aproximadamente 3%-7%, y en Asia en alrededor del 9%. Así, una vacuna 11-valente cubriría el 50% en Asia y alrededor del 80% de IPD en todas las otras regiones [1,2].

10 Estos serotipos son también importantes con respecto al cubrimiento de otitis media [19]. En un estudio multinacional de los serotipos neumocócicos que originan otitis media, Hausdorff et al encontraron que el serotipo 3 era el octavo aislado de fluido de oído medio más común en total [20]. El

15 serotipo 3 contaba con hasta el 8.7% de los serotipos neumocócicos asociados con otitis media. Así, la importancia de los tipos 3 y 7F en otitis media, así como también en IPD, garantiza su inclusión en una vacuna de conjugado neumocócica.

20

Sin embargo, no han sido exitosos los intentos de producir una vacuna de conjugado neumocócica multivalente que exhiba inmunogenicidad significativa con respecto a los polisacáridos del serotipo 3. Por ejemplo, en un estudio de

25 inmunogenicidad y seguridad de una vacuna de conjugado de proteína D neumocócica 11-valente (11-Pn-PD), no se observó ningún efecto cebador para el serotipo 3 en recién nacidos que habían recibido tres dosis de la vacuna luego de una

H7
1A

dosis de refuerzo de la misma vacuna o una vacuna de polisacárido neumocócica (Nurkka et al. (2004) Ped. Inf. Dis. J., 23:1008-1014). En otro estudio, los resultados del ensayo opsonofagocítico (OPA) proveniente de niños recién nacidos que habían recibido dosis de 11-Pn-PD no mostró respuestas de anticuerpo para el serotipo 3 a niveles comparables con otros serotipos ensayados (Gatchalian et al., 17th Annual Meeting of the Eur. Soc. Paed. Inf. Dis. (ESPID), Poster No. 4, P1A Poster Session 1, Istanbul Turkey, Mar. 27, 2001). En aún otro estudio, que evaluó la eficacia de un 11-Pn-PD en la prevención de otitis media aguda, la vacuna no suministró protección contra episodios causados por el serotipo 3 (Prymula et al. www.thelancet.com, Vol. 367: 740-748 (marzo 4, 2006). De acuerdo con esto, una vacuna de conjugado neumocócica que comprende polisacáridos capsulares provenientes del serotipo 3 y capaz de elicitar una respuesta inmunogénica al los polisacáridos del serotipo 3 suministra una mejora significativa sobre el estado existente de la técnica.

20

Inclusión de los Serotipos 6A y 19A

a. Epidemiología de los Serotipos 6A y 19A

25 Los datos de vigilancia en la literatura sugieren que los serotipos 6A y 19A cuentan con más enfermedad neumocócica invasiva en niños de los Estados Unidos < 2 años de edad que los serotipos 1, 3, 5, y 7F combinados (FIG. 1)[1,5]. Además,

148
15

estos serotipos están comúnmente asociados con resistencia a antibiótico (FIG. 2) y juegan un papel importante en otitis media [6,19,20]. La capacidad de la vacuna Prevnar habitual a proteger contra la enfermedad debido a 6A y 19A no es clara.

5 Lo racional para la inclusión de los componentes 6A y 19A en una vacuna 13vPnC se discute adelante.

b. Respuestas a 6A y 19A Inducidas por los Polisacáridos 6B y 19F

10

Las vacunas de polisacárido neumocócica no conjugadas licenciadas (para uso en personas de por lo menos dos años de edad) ha contenido el polisacárido capsular 6A o 6B pero no ambos [21]. Los datos de inmunogenicidad generados en el momento de la formulación de la vacuna de polisacárido neumocócica 23-valente demostraron que la vacuna 6B monovalente indujo anticuerpo a ambas cápsulas 6A y 6B. Los datos provenientes de varios ensayos que evalúan las respuestas del ensayo IgG y opsonofagocíticas (OPA) en una variedad de poblaciones con polisacárido libre y con vacunas de conjugado neumocócicas sugieren que las respuestas IgG a 6A se inducen por antígenos 6B, pero las respuestas son generalmente inferiores, y la actividad OPA con organismos 6A es diferente que con organismos 6B [22,23,24,25]. Además, los sujetos que responden con el anticuerpo 6B alto pueden tener poca o ninguna actividad contra 6A.

15

20

25

En contraste a la composición química de los polisacáridos capsulares 6A y 6B donde subsiste un alto grado de similitud, las cápsulas 19A y 19F son muy diferentes debido a la presencia de dos cadenas laterales adicionales en el polisacárido 19A. De manera no sorprendente, las respuestas inmunes medidas en voluntarios humanos inmunizados con vacuna de polisacárido 19F mostraron que las respuestas a 19F fueron inducidas en el 80% de los sujetos, pero solamente el 20% de los sujetos tuvo una respuesta a 19A [26]. Los bajos niveles de las respuestas a IgG y OPA reactiva cruzada al serotipo 19A después de inmunización con el polisacárido 19F también han estado documentados en ensayos con vacunas de conjugado [24,26].

Los datos internos en las respuestas OPA reactivas cruzadas a 6A y 19A se han generado del ensayo de puente 7vPnC (D118-P16) conducidas en recién nacidos en los Estados Unidos (FIG. 3). Estos estudios son consistentes con los hallazgos de otros, y demuestran inducción de anticuerpo funcional reactivo cruzado a polisacárido 6A después de inmunización con polisacárido 6B, aunque a un nivel inferior, y muy poco anticuerpo funcional a 19A después de inmunización con 19F.

Impacto de Inmunización 6B y 19F sobre 6A y 19A en Modelos de Animal

Los modelos de animal se han utilizado para evaluar el potencial para la protección cruzada con inmunización de polisacárido. En un modelo de otitis media desarrollado por Giebink et al., se inmunizaron chinchillas con una vacuna de conjugado de proteína de membrana exterior de polisacárido tetravalente (OMP) (que contiene los sacáridos 6B, 14, 19F, 23F) o placebo [27]. En este ensayo apareció alguna reactividad cruzada para 6A; sin embargo este no alcanzó significado estadístico y el nivel de protección fue inferior de aquel con 6B contra otitis media. En este mismo modelo hubo 100% de protección contra otitis media 19F, pero solamente 17% de protección contra otitis media 19A.

Saeland et al. utilizaron suero proveniente de recién nacidos inmunizados con una vacuna de conjugado de tétano neumocócica 8-valente (que contiene 6B y 19F) para inmunizar pasivamente ratones antes de una exposición intranasal con organismos 6A, en un modelo de infección de pulmón [28]. De las 59 muestras de suero, 53% protegieron a los ratones contra bacteremia con 6B y 37% protegieron contra 6A. Los ratones inmunizados pasivamente con suero proveniente de recién nacidos inmunizados con cuatro dosis de una vacuna de conjugado neumocócica 11-valente (que contiene 19F conjugado a toxoide de tétano) les fue dada una exposición intranasal con organismos 19A en el mismo modelo [29]. De los 100 ratones inmunizados pasivamente y luego expuestos, a 60 ratones no se les detectaron organismos 19A en el tejido de pulmón, mientras que los organismos fueron identificados en

151
18

todos los ratones a los que se les dio placebo de solución salina. Sin embargo, la inmunización pasiva no protegió contra exposición con organismos 19F en este modelo; por lo tanto, la relevancia del modelo para el serogrupo 19 es cuestionable. En general estos modelos suministran evidencia de algún impacto biológico de inmunización 6B sobre organismos 6A aunque el efecto del serotipo heterólogo no fue tan grande como aquel observado con el serotipo homólogo. El impacto de la inmunización 19F sobre los organismos 19A no se entiende bien de estos modelos.

Impacto de Inmunización de Conjugado de Polisacárido 6B y 19F sobre Enfermedad 6A y 19A en Ensayos de Eficacia/Efectividad

El número de casos de enfermedad debido a los serotipos 6B, 6A, 19F y 19A en ensayos de eficacia 7vPnC y 9vPnC (7vPnC más los serotipos 1 y 5) se anota en la Tabla 1 [30,10,31]. Los números de los casos de enfermedad invasiva son demasiado pequeños para permitir que cualquier conclusión sea extraída para los serotipos 6A y 19A. Sin embargo, el ensayo terminado para otitis media generó un gran número de aislados neumocócicos [32]. En el análisis por protocolo 7vPnC fue el 84% (95% CI 62%, 93%) eficaz contra otitis media debido al serotipo 6B y 57% (95% CI 24%, 76%) eficaz contra otitis media debido al serotipo 6A (Tabla 1). En contraste, la eficacia específica del serotipo con 7vPnC no se demostró para otitis media debido a 19F o 19A.

152
M

Tabla 1. Casos de Enfermedad Neumocócica Debido a los Serotipos 6B, 6A, 19F y 19A en Ensayos de Eficacia con las Vacunas 7vPnC y 9vPnC

	6B		6A		19F		19A	
	PnC	Contr.	PnC	Contr.	PnC	Contr.	PnC	Contr.
Ensayo de Eficacia Kaiser - 7vPnC (ITT)	1	7	0	1	2*	13	0	1
Ensayo de Eficacia Navajo - 7vPnC (ITT)	0	5	1	0	1	1	1	0
Ensayo de Eficacia Surafricana - 9vPnC HIV (-) (ITT)	1	2	1	0	0	1	3	1
Ensayo de Eficacia Surafricana - 9vPnC HIV (+) (ITT)	1	7	3	10	2	3	2	3
Ensayo Terminado de Otitis Media 7vPnC (PP)	9*	56	19*	45	43	58	17	26

* Eficacia significativa estadísticamente demostrada

De las referencias 30, 10 y 33, y comunicaciones personales

Contr = control

ITT = Intención para tratar análisis

PP = análisis por protocolo

5

Los datos de vigilancia IPD post-comercialización también están disponibles de de un ensayo de control de caso conducido por los Centros de Control de Enfermedad para evaluar la efectividad de Prevnar [33]. Los casos de enfermedad invasiva neumocócica que ocurren en niños de 3 a 23 meses de edad se identificaron en laboratorios de vigilancia y coincidieron con tres casos de control por edad y código zip. Después de obtener consentimiento, la historia clínica y de inmunización (los sujetos se consideraron

153
20

inmunizados si ellos habían recibido por lo menos una dosis de Prevnar) se obtuvo de padres y proveedores médicos para casos y controles. Los resultados preliminares se presentaron en la reunión 2003 ICAAC y un resumen de los hallazgos de la enfermedad 6B, 19F, 19A y 6A está presente en la Tabla 2. Estos datos indican que Prevnar es capaz de evitar la enfermedad debido a 6A, aunque a un nivel que puede ser un poco inferior que la enfermedad para el serotipo 6B. Estos datos también indican que la protección cruzada para enfermedad invasiva debido a 19A es limitada.

Tabla 2. Resultados preliminares de un Ensayo de Control de Caso Desarrollado por CDC (presente en ICAAC, 2003)

Serotipo	Conjuntos Informativos, n	VE* (95% CI)
Tipo de Vacuna, AII=todas	115	94 (87, 97)
Vacuna Relacionad, AII	36	70 (38, 86)
Tipo sin vacuna, AII	43	-4 (-106, 48)
6B	27	94 (72, 99)
19F	19	73 (16, 92)
6A	15	87 (53, 97)
19A	16	40 (-87, 80)

* La efectividad de la vacuna que compara vacunado (≥1 dosis) vs. no vacunado, y ajustado para condiciones subyacentes Referencia 40 y comunicación personal/confidencial

Un análisis publicado [3] del uso de Prevnar también indicó que los serotipos 6B y 19F conferían una reducción moderada en IPD causada por los serotipos 6A y 19A entre niños menores de dos años de edad (Tabla 1 en [3]). Las tasas

154
2

de la enfermedad entre adultos inmunizados originada por los serotipos 6A, 9A, 9L, 9N, 18A, 18B, 18F, 19A, 19B, 19C, 23A y 23B ("todos los serotipos relacionados con vacuna") se redujeron un poco (Tabla 2 en [3]). Estos datos establecen

5 que la inmunidad grupal proveniente del uso de Prevnar en niños de menos de dos años de edad fue modesta para los serotipos 6A y 19A, y suministra una base para la inclusión de los serotipos 6A y 19A en la vacuna 13vPnC de esta invención.

10

Conclusión para la adición de 6A y 19A

Los datos de vigilancia post-comercialización y los resultados del estudio de control por caso anotados en la

15 FIG. 1 y la Tabla 2 con la vacuna 7vPnC sugieren que, consistente con la otra información sobre las respuestas inmunes y el desempeño en los modelos animales descritos anteriormente, puede haber alguna protección cruzada contra la enfermedad 6A, pero en una menor proporción que con la

20 enfermedad 6B. Adicionalmente, parece que la protección contra 19A es limitada. Por lo tanto, una vacuna 13vPnC que contiene los serotipos 6A y 19A suministra cubrimiento que no es dependiente de las limitaciones de la protección cruzada del serogrupo mediante los serotipos 6B y 19F.

25

De acuerdo con esto, la presente invención suministra una composición inmunogénica multivalente que comprende 13 diferentes conjugados de polisacárido-proteína, en donde cada

155
22

uno de los conjugados contiene un polisacárido capsular diferente conjugado a una proteína portadora, y en donde los polisacáridos capsulares se preparan de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F de *Streptococcus pneumoniae*, junto con un vehículo fisiológicamente aceptable. Una de tales proteínas portadora es el toxoide de difteria designado CRM₁₉₇. La composición inmunogénica puede comprender además un adyuvante, tal como un adyuvante basado en aluminio, tal como fosfato de aluminio, sulfato de aluminio e hidróxido de aluminio.

Los polisacáridos capsulares se preparan mediante técnicas estándar conocidas por aquellos expertos en el arte. En la presente invención, los polisacáridos capsulares se preparan de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F de *Streptococcus pneumoniae*. Estos conjugados neumocócicos se preparan mediante procesos separados y se formulan en una formulación de dosis simple. Por ejemplo, en una modalidad, cada serotipo de polisacárido neumocócico crece en un medio a base de soya. Los polisacáridos individuales son entonces purificados a través de centrifugación, precipitación, ultra-filtración, y cromatografía de columna. Los polisacáridos purificados son químicamente activados para hacer los sacáridos capaces de reaccionar con la proteína portadora.

Una vez activado, cada polisacárido capsular es separadamente conjugado a una proteína portadora para formar

un glicoconjugado. En una modalidad, cada polisacárido capsular se conjuga a la misma proteína portadora. En esta modalidad, la conjugación se efectúa mediante aminación reductiva.

5

La activación química de los polisacáridos y la subsecuente conjugación a la proteína portadora se logra por medios convencionales. Ver, por ejemplo, Patentes U.S. Nos. 4,673,574 y 4,902,506 [34,35].

10

Las proteínas portadoras son preferiblemente proteínas que son no tóxicas y no reactogénicas y obtenibles en cantidades y pureza suficientes. Las proteínas portadoras deben ser adecuadas a los procedimientos de conjugación estándar. En una modalidad particular de la presente invención, el CRM₁₉₇ se utiliza como la proteína portadora.

15

El CRM₁₉₇ (Wyeth, Sanford, NC) es una variante no tóxica (es decir, toxoide) de toxina de difteria aislada de cultivos de la cepa de *Corynebacterium diphtheria* C7 (β197) crecida en ácidos casamino y medio a base de extracto de levadura. El CRM₁₉₇ se purifica a través de ultra-filtración, precipitación de sulfato de amonio, y cromatografía de intercambio de ión. Alternativamente, el CRM₁₉₇ se prepara recombinantemente de acuerdo con la Patente U.S. No. 5,614,382, que se incorpora aquí como referencia. Otros toxoides de difteria son también adecuados para uso como proteínas portadoras.

20

25

157
2A

Otras proteínas portadoras adecuadas incluyen toxinas bacterianas inactivadas tales como el toxoide de tétano, el toxoide de pertussis, el toxoide de cólera (por ejemplo, como se describe en la Solicitud de Patente Internacional WO2004/083251 [38]), *E. coli* LT. *E. coli* ST, y exotoxina A proveniente de *Pseudomonas aeruginosa*. Las proteínas de la membrana exterior bacteriana tal como el complejo c de membrana exterior (OMPC), porinas, proteínas que se unen a transferrina, pneumolisina, proteína A de superficie neumocócica (PspA), proteína de adhesina neumocócica (PsaA), peptidaza C5a proveniente del Grupo A o el Grupo B de *Streptococcus*, o proteína D de *Haemophilus influenzae*, también se puede utilizar. Otras proteínas, tales como ovalbúmina, hemocianina de lapa ojo de cerradura (KLH), seroalbúmina bovina (BSA) o derivado de proteína purificado de tuberculina (PPD) también se puede utilizar como proteínas portadoras.

Después de la conjugación del polisacárido capsular a la proteína portadora, los conjugados de polisacárido-proteína se purifican (enriquecidos con respecto a la cantidad de conjugado de polisacárido-proteína) por una variedad de técnicas. Esas técnicas incluyen operaciones de concentración/diafiltración, precipitación/elusión, cromatografía de columna, y filtración profunda. Ver los ejemplos adelante.

150
15

Después de que los glicoconjugados individuales se purifican, ellos son compuestos para formular la composición inmunogénica de la presente invención, lo cual se puede utilizar como una vacuna. La formulación de la composición

5 inmunogénica de la presente invención se puede lograr utilizando métodos reconocidos en la técnica. Por ejemplo, los 13 conjugados neumocócicos individuales se pueden formular con un vehículo fisiológicamente aceptable para preparar la composición. Ejemplos de tales vehículos

10 incluyen, pero no están limitados a, agua, solución salina amortiguada, polioles (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido) y soluciones de dextrosa.

En ciertas modalidades, la composición inmunogénica

15 comprenderá uno o más adyuvantes. Como se define aquí, un "adyuvante" es una sustancia que sirve para mejorar la inmunogenicidad de una composición inmunogénica de esta invención. Así, los adyuvantes son dados a menudo para reforzar la respuesta inmune y son bien conocidos para el

20 experto. Los adyuvantes adecuados para mejorar la efectividad de la composición incluyen, pero no están limitados a:

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

25

(2) formulaciones de emulsión de aceite en agua (con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos tales como

159
26

péptidos de muramilo (definidos adelante) o componentes de pared celular bacteriana), tales como, por ejemplo,

(a) MF59 (Publicación PCT No. WO 90/14837), que
5 contiene 5% de Squaleno, 0.5% de Tween 80, y 0.5% de Span 85
(que contiene opcionalmente varias cantidades de MTP-PE (ver
adelante, aunque no se requiere) formulada en partículas
submicrónicas que utilizan un microfluidizador tal como el
microfluidizador Modelo 110Y (Microfluidics, Newton, MA),

10

(b) SAF, que contiene 10% de Squaleno, 0.4% de
Tween 80, 5% de polímero bloqueado plurónico L121, y thr-MDP
(ver adelante) microfluidizado en una emulsión submicrónica o
centrifugado para generar una emulsión de tamaño de partícula
15 mayor, y

(c) Sistema de adyuvante Ribⁱ™ (RAS), (Corixa,
Hamilton, MT) que contiene 2% de Squaleno, 0.2% de Tween 80,
y uno o más componentes de pared celular bacteriana
20 proveniente del grupo que consiste de monofosforilípido A 3-
O-desailado (MPL™) descrito en la Patente U.S. No. 4,912,094
(Corixa), dimicolato de trehalosa (TDM), y esqueleto de pared
celular (CWS), preferiblemente MPL + CWS (Detox™);

25 (3) Adyuvantes de saponina, tales como Quil A o
ESTIMULON™ QS-21 (Antigenics, Framingham, MA) (Patente U.S.
No. 5,057,540) se puede utilizar o partículas generadas de
éstos tales como ISCOM (complejos inmunoestimulantes);

160
27

(4) Lipopolisacáridos bacterianos, análogos de lípido A sintético tales como los compuestos de fosfato de aminoalquilo glucosalina (AGP), o derivados o análogos de éstos, que están disponibles de Corixa, y que se describen en la Patente U.S. No. 6,113,918; uno de tales AGP es 2-[(R)-3-Tetradecanoiloxitetradecanoilamino]etil 2-Deoxi-4-O-fosfono-3-O-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoilamino]-b-D-glucopiranosido, que también es conocido como 529 (anteriormente conocido como RC529), que se formula como una forma acuosa o como una emulsión estable, polinucleótidos sintéticos tales como oligonucleótidos que contienen motivo(s) CpG (Patente U.S. No. 6,207,646);

(5) citoquinas, tales como interleuquinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, etc.), interferones (por ejemplo, interferón gama), factor estimulante de colonia de macrófago de granuloso (GM-CSF), factor estimulante de colonia de macrófago (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF), moléculas coestimuladoras B7-1 y B7-2, etc;

(6) mutantes destoxificados de una toxina ribosilante de ADP bacteriano tal como una toxina de cólera (CT) en forma de tipo silvestre o mutante, por ejemplo, donde el ácido glutámico en la posición 29 del amino ácido se reemplaza por otro amino ácido, preferiblemente una histidina, de acuerdo con el número de la solicitud de patente internacional

101
28

publicada WO 00/18434 (ver también WO 02/098368 y WO 02/098369), una toxina pertussis (PT), o una toxina lábil al calor de *E. coli* (LT), particularmente LT-K63, LT-R72, CT-S109, PT-K9/G129 (ver, por ejemplo, WO 93/13302 y WO 5 92/19265); y

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

10

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

15

Las formulaciones de vacuna de la presente invención se pueden utilizar para proteger o tratar un humano susceptible a infección neumocócica, por medio de administrar la vacuna por vía de una ruta sistémica o de mucosa. Estas 20 administraciones pueden incluir inyección por vía de las rutas intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea; o por vía de administración de mucosa a los tractos orales/alimentario, respiratorio o genitourinario. En una modalidad, la administración intranasal se utiliza para 25 el tratamiento de neumonía u otitis media (como vehículo nasofaríngeo de neumococo puede ser más efectivamente evitado, atenuando así la infección en su etapa más temprana).

102
29

La cantidad de conjugado en cada dosis de vacuna se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmune sin efectos significativos adversos. Tal cantidad puede variar dependiendo del serotipo neumocócico. En general, cada
5 dosis comprenderá 0.1 a 100 µg de polisacárido, particularmente 0.1 a 10 µg, y más particularmente 1 a 5 µg.

Las cantidades óptimas de los componentes para una vacuna particular se pueden establecer mediante estudios
10 estándar que involucran la observación de las respuestas inmunes apropiadas en sujetos. Luego de una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo adecuadamente espaciadas.

15 En una modalidad particular de la presente invención, la vacuna 13vPnC es una formulación líquida estéril de polisacáridos capsulares neumocócicos de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, y 23F conjugada individualmente a CRM₁₉₇. Cada dosis de 0.5 mL se formula para
20 contener: 2 µg de cada sacárido, excepto para 6B a 4 µg; aproximadamente 29 µg de proteína portadora CRM₁₉₇; 0.125 mg de adyuvante de aluminio elemental (0.5 mg de fosfato de aluminio); y amortiguador de cloruro de sodio y succinato de sodio como excipientes. El líquido se llena en jeringas de
25 dosis simple sin un preservativo. Después de agitar, la vacuna es una suspensión homogénea, blanca lista para administración intramuscular.

163
30

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

10 El programa de inmunización puede seguir aquel diseñado para la vacuna 7vPnC. Por ejemplo, el programa de rutina para recién nacidos y niños que están aprendiendo a caminar contra la enfermedad invasiva causada por *S. pneumoniae* debido a que los serotipos incluidos en la vacuna 13vPnC es 2, 4, 6 y 12-
15 15 meses de edad. Las composiciones de esta invención también son adecuadas para uso con otros niños, adolescentes y adultos.

Las composiciones de esta invención pueden además
20 incluir uno o más antígenos adicionales para uso contra otitis media causada por infección con otras bacterias. Tales bacterias incluyen *Haemophilus influenza*, *Moraxella catarrhalis* (anteriormente conocida como *Branhamella catarrhalis*) y *Alloiococcus otitidis*.

25

Ejemplos de antígenos de *Haemophilus influenza* sin tipo adecuados para la inclusión incluye la proteína P4, también conocida como proteína "e" (Patente U.S. No. 5,601,831;

164
31

Solicitud de Patente Internacional WO03/078453), la proteína P6, también conocida como el PAL o la proteína PBOMP-1 (Patente U.S. No. 5,110,908; Solicitud de Patente Internacional WO0100790), la proteína P5 (Patente Republicada U.S. No. 37,741), la proteína de adhesión y penetración de *Haemophilus* (Patentes U.S. Nos. 6,245,337 y 6,676,948), la proteína de adhesina de punta LKP (Patente U.S. No. 5,643,725) y la proteína NucA (Patente U.S. No. 6,221,365).

10 Ejemplos de antígenos de *Moraxella catarrhalis* adecuados para la inclusión incluyen la proteína UspA2 (Patentes U.S. Nos. 5,552,146, 6,310,190), la proteína CD (Patente U.S. No. 5,725,862), la proteína E (Patente U.S. No. 5,948,412) y la proteína de membrana exterior de 74 kilodalton (Patente U.S. 15 No. 6,899,885).

Ejemplos de antígenos de *Alloiococcus otitidis* adecuados para la inclusión incluyen aquellos identificados en la Solicitud de Patente Internacional WO03/048304.

20

Las composiciones de esta invención también pueden incluir una o más proteínas de *Streptococcus pneumoniae*. Ejemplos de proteínas de *Streptococcus pneumoniae* adecuadas para la inclusión incluyen aquellas identificadas en la 25 Solicitud de Patente Internacional WO02/083855, así como también aquella descrita en la Solicitud de Patente Internacional WO02/053761.

H5
32

Las composiciones de esta invención pueden además incluir una o más proteínas provenientes de *Neisseria meningitidis* tipo B. Ejemplos de proteínas de *Neisseria meningitidis* tipo B adecuadas para la inclusión incluyen 5 aquellas identificadas en las Solicitudes de Patente Internacional WO03/063766, WO2004/094596, WO01/85772, WO02/16612 y WO01/87939.

La descripción anterior describe de manera general la 10 presente invención. Un entendimiento completo se puede obtener mediante referencia a los siguientes ejemplos específicos. Estos ejemplos se describen solamente con el propósito de ilustración y no pretenden limitar el alcance de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Preparación de Serotipo 1 de Polisacárido Capsular de *S.*

Pneumoniae

Preparación de Bancos de Célula Maestra y de Trabajo

El serotipo 1 de *S. pneumoniae* se obtuvo del American 25 Type Culture Collection, ATCC, cepa 6301. Varias generaciones de reservas de semilla se crearon con el fin de expandir la cepa y remover los componentes de origen animal (generaciones F1, F2, y F3). Dos generaciones adicionales de reservas de

semilla se produjeron. La primera generación adicional se hizo de un frasco F3, y la generación posterior se hizo de un frasco de la primera generación adicional. Los frascos de semilla se almacenaron congelados ($<-70^{\circ}\text{C}$) con glicerol sintético como criopreservativo. Además de los frascos congelados, los frascos liofilizados se prepararon para la generación F4. Para la preparación del banco de célula, todos los cultivos crecieron en un medio a base de soya. Antes de congelamiento, las células se concentraron mediante centrifugación, el medio de gasto fue removido, y las plaquetas de célula fueron resuspendidas en un medio fresco que contiene un criopreservativo, tal como glicerol sintético.

Fermentación y Cosecha

Los cultivos del banco de célula de trabajo utilizado para inocular las botellas de semilla contenían un medio a base de soya. Las botellas se incubaron a $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ sin agitación hasta que se cumplieron los requisitos de crecimiento. Una botella de semilla se utilizó para inocular un fermentador de semilla que contiene un medio a base de soya. Un pH de aproximadamente 7.0 se mantuvo con una solución de carbonato de sodio estéril. Después de que se alcanzó la densidad óptica objetivo, el fermentador de semilla se utilizó para inocular el fermentador de producción que contiene medio a base de soya. El pH se mantuvo con solución de carbonato de sodio estéril. La fermentación se

107
3X

terminó después de cesar el crecimiento o cuando el volumen de trabajo del fermentador se alcanzó. Una cantidad apropiada de desoxicolato de sodio al 12% estéril se agregó al cultivo para lisar las células bacterianas y liberar el polisacárido asociado a la célula. Después de lisar, se enfriaron los contenidos del fermentador. El pH del caldo de cultivo lisado se ajustó a aproximadamente pH 6.6 con ácido acético. El lisado se clarificó mediante centrifugación de flujo continuo seguido por filtración profunda y microfiltración a 0.45µm.

10

En un proceso alternativo, el pH de fermentación de aproximadamente 7.0 se mantuvo con NaOH 3N. Después de que se alcanzó la densidad óptica objetivo, el fermentador de semilla se utilizó para inocular el fermentador de producción que contiene medio a base de soya. El pH se mantuvo con NaOH 3N. La fermentación se termino después de cesar el crecimiento o cuando se alcanzó el volumen de trabajo del fermentador. Una cantidad apropiada de deoxicolato sodio al 12% estéril se agregó al cultivo para obtener una concentración de 0.12% en el caldo, para lisar las células bacterianas y liberar el polisacárido asociado a la célula. Después de lisado, los contenidos del fermentador se mantuvieron, con agitación, durante un intervalo de tiempo entre 8 y 24 horas a una temperatura entre 7°C y °3°C, para asegurar que la lisis celular completa y la liberación del polisacárido hubiera ocurrido. La agitación durante este período de mantenimiento evitó que el sedimento del lisado se asentara en las paredes del fermentador y la sonda de pH,

25

100
35

permitiendo de esta manera que se mantuviera la integridad de la sonda de pH. Luego, el pH del caldo de cultivo lisado se ajustó a aproximadamente pH 5.0 con ácido acético al 50%. Después de mantener un tiempo sin agitación, durante un

5 intervalo de tiempo entre 12 y 24 horas a una temperatura entre 15°C y 25°C, una porción significativa de las proteínas previamente solubles desapareció de la solución como un precipitado sólido con poca pérdida o degradación del polisacárido, que permaneció en la solución. La solución con

10 el precipitado se clarificó entonces mediante centrifugación de flujo continua seguida por filtración profunda y microfiltración de 0.45 µm.

Purificación

15 La purificación del polisacárido neumocócico consistió de varias operaciones de concentración/diafiltración, precipitación/elusión, cromatografía de columna, y etapas de filtración profunda. Todos los procedimientos se

20 desarrollaron a temperatura ambiente a menos que se especifique otra cosa.

El caldo clarificado proveniente de los cultivos del fermentador del serotipo 1 *S. pneumoniae* se concentró y se

25 diafiltró utilizando un filtro MWCO de 100 kDa (valor de corte del peso molecular en kilodalton). La diafiltración se logró utilizando amortiguador de fosfato de sodio a pH neutro. La diafiltración removi6 los componentes de medio de

169
36

peso molecular bajo provenientes de biopolímeros de peso molecular más alto tal como ácido nucleico, proteína y polisacárido.

5 El polisacárido se precipitó de la solución concentrada y diafiltrada al agregar bromuro de hexadeciltrimetil amonio (HB) proveniente de una solución madre para dar una concentración final de 1% HB (p/v). El precipitado de polisacárido/HB se capturó sobre un filtro profundo y el
10 filtrado se descartó. El precipitado de polisacárido se resolubilizó y se eluyó al recircular una solución de cloruro de sodio a través del filtro profundo que contiene precipitado. Los filtros fueron entonces enjuagados con una solución adicional de cloruro de sodio.

15

Se agregó yoduro de sodio (NaI) a la solución de polisacárido proveniente de una solución madre de NaI para lograr una concentración final de 0.5% para precipitar HB. El precipitado se removi6 mediante filtraci6n profunda. El
20 filtrado contiene el polisacárido objetivo. El recipiente de precipitaci6n y el filtro se enjuagaron con una soluci6n de NaCl/NaI y el enjuague se combin6 con una la soluci6n de polisacárido parcialmente purificada. El filtro se descart6. El polisacárido fue entonces filtrado a trav6s de un filtro
25 de 0.2 μm .

110
37

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

5 La solución de polisacárido parcialmente purificado se purificó adicionalmente mediante filtración a través de un filtro profundo impregnado con carbono activado. Después de la filtración, el filtro de carbono se enjuagó con una solución de cloruro de sodio. El enjuague se combinó con la
10 solución de polisacárido, que es luego filtrada a través de un filtro de 0.2 μ m.

La solución de polisacárido se concentró sobre un ultrafiltro MWCO de 30 kDa y se ajustó con un amortiguador de
15 fosfato de sodio 1M para lograr una concentración final de fosfato de sodio 0.025 M. El pH se revisó y se ajustó a 7.0 ± 0.2 .

La columna de hidroxapatita cerámica (HA) se equilibró
20 con amortiguador de fosfato de sodio que contiene cloruro de sodio para obtener la conductividad apropiada ($<15 \mu$ S). La solución de polisacárido fue entonces cargada sobre la columna. Bajo estas condiciones, las impurezas unidas a la resina y al polisacárido se recuperaron en el flujo a través
25 de la columna. La solución de polisacárido se filtró a través de filtros de línea dentada de 0.2 μ m localizados antes y después de la columna.

171
98

La solución de polisacárido se concentró utilizando un filtro MWCO de 30 kDa. El concentrado fue entonces diafiltrado con Agua para inyección (WFI).

5 La solución de polisacárido diafiltrado se filtró a través de un filtro de membrana de 0.2 μ m en botellas de polipropileno. Las muestras se removieron para liberar las pruebas y el polisacárido purificado se almacenó congelado a $-25^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$.

10

Caracterización

Los datos $^1\text{H-NMR}$ fueron consistentes con la estructura química mediante la asignación de las señales asignadas a los protones de la molécula de polisacárido. El espectro $^1\text{H-NMR}$ 15 mostró una serie de señales bien resueltas (protones provenientes del grupo metilo) para la cuantificación del grupo funcional O-acetilo en el polisacárido.

20 La identidad del polisacárido monovalente se confirmó mediante inmunolectroforesis de contra corriente utilizando antisuero específico.

La cromatografía de filtración de gel de alto desempeño 25 acoplada con el índice de refracción y detectores de dispersión de luz láser multi-ángulo (MALLS) se utilizó en conjunto con la concentración de la muestra para calcular el peso molecular.

42
39

El medio de cromatografía de exclusión de tamaño (CL-4B) se utilizó para perfilar la distribución de tamaño molecular relativa del polisacárido.

5

Ejemplo 2

Preparación de Conjugado de Sacárido de Pneumococo - CRM₁₉₇

Serotipo 1

Activación y Conjugación

10

Los recipientes del polisacárido purificados se descongelaron y se combinaron en un recipiente de reacción. Al recipiente, carbonato de sodio 0.2 M, pH 9.0 se agregó para desacetilación parcial (hidrólisis) durante 3 horas a 15 50°C. La reacción se enfrió a 20°C y la neutralización se desarrolló mediante ácido acético 0.2 M. La oxidación en la presencia de periodato de sodio se desarrolló mediante incubación a 2-8°C, y la mezcla se agitó durante 15-21 horas.

20

La mezcla de reacción de activación se concentró y se diafiltró 10x con NaCl al 0.9% utilizando una membrana MWCO de 30 K. El retenido fue filtrado a 0.2 µm. El sacárido activado se llenó en botellas de liofilización de vidrio de 100 mL y se congeló en cubierta a -75°C y se liofilizó.

25

"Congelado en cubierta" es un método para preparar muestras para liofilización (secado por congelado). Los recipientes son rotados automáticamente por rodillos

173
40

impulsados por motor en un baño refrigerado que contiene alcohol o cualquier otro fluido apropiado. Un recubrimiento delgado del producto es congelado homogéneamente alrededor del interior de la "cubierta" del recipiente, que permite que un mayor volumen de material sea procesado de manera segura durante cada corrida de secado por congelamiento. Estas unidades automáticas, refrigeradas suministran unos medios simples y eficientes de pre-congelar muchos recipientes a la vez, produciendo los recubrimientos deseados al interior, y suministrando un área de superficie suficiente para un secado por congelado eficiente.

Las botellas de material liofilizado se llevaron a temperatura ambiente y fueron resuspendidas en solución CRM₁₉₇ a una proporción de sacárido/proteína de 2:1. A la mezcla de sacárido/proteína se agregó un amortiguador de fosfato de sodio 1M a una concentración iónica final de 0.2M y un pH de 7.5, luego se agregó cianoborohidruro de sodio. La reacción se incubó a 23°C durante 18 horas, seguido por una segunda incubación a 37°C durante 72 horas. Luego de las incubaciones de cianoborohidruro, la mezcla de reacción se diluyó con solución salina fría seguida por adición de carbonato de sodio 1M para ajustar la mezcla de reacción a pH 9.0. Los aldehídos no reaccionados fueron apagados por la adición de borohidruro de sodio mediante incubación a 23°C durante 3-6 horas.

La mezcla de reacción se diluyó dos veces con solución salina y se transfirió a través de un prefiltro de 0.45 - 5 µm en un recipiente de retenido. La mezcla de reacción se diafiltró 30x con amortiguador de fosfato 0.15 M, pH 6, y 20x con solución salina. El retenido fue filtrado a través de un filtro de 0.2 µm.

La solución de conjugado se diluyó a un objetivo de 0.5 mg/mL en solución salina 0.9%, y luego se filtró estéril en recipientes de concentración de masa final (FBC) en una caperuza Clase 100. El conjugado se almacenó a 2-8°C.

Caracterización

El medio de cromatografía de exclusión de tamaño (CL-4B) se utilizó para perfilar la distribución de tamaño molecular relativa del conjugado.

La identidad del conjugado se confirmó por el ensayo "slot-blot" utilizando antisuero específico.

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

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

El contenido de O-acetilo se midió por medio del método Hestrin (Hestrin et al., J. Biol. Chem. 1949, 180, p. 249). La proporción de la concentración de O-acetilo a la concentración de sacárido total dio μ moles de O-acetilo por 5 mg de sacárido.

Ejemplo 3

Preparación del Serotipo 3 de Polisacárido Capsular de *S. Pneumoniae*

10

Preparación de los Bancos de Célula Maestro y de Trabajo

El serotipo 3 de *S. pneumoniae* se obtuvo del Dr. Robert Austrian, Universidad de Pennsylvania, Filadelfia, 15 Pennsylvania. Para la preparación del sistema de banco de células, ver el Ejemplo 1.

Fermentación y Cosecha

20 Los cultivos provenientes del banco de célula de trabajo se utilizaron para inocular botellas de semilla que contienen un medio basado en soya. Las botellas se incubaron a $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ sin agitación hasta que se cumplieron los requisitos de crecimiento. Una botella de semilla se utilizó para inocular 25 un fermentador de semilla que contiene un medio a base de soya. Un pH de aproximadamente 7.0 se mantuvo con una solución de carbonato de sodio estéril. Después de que se alcanzó la densidad óptica objetivo, el fermentador de

176
43

semilla se utilizó para inocular un fermentador de semilla intermedio. Después de que se alcanzó la densidad óptica objetivo, el fermentador de semilla intermedio se utilizó para inocular el fermentador de producción. El pH se mantuvo con una solución de carbonato de sodio estéril. La fermentación se terminó después de que se alcanzó el volumen de trabajo del fermentador. Una cantidad apropiada de desoxicolato de sodio al 12% estéril se agregó al cultivo para lisar las células bacterianas y liberar el polisacárido asociado a la célula. Después de lisar, los contenidos del fermentador se enfriaron. El pH del caldo de cultivo lisado se ajustó a aproximadamente pH 6.6 con ácido acético. El lisado se clarificó mediante centrifugación de flujo continuo seguido por filtración profunda y microfiltración de 0.45µm.

Purificación

La purificación del polisacárido neumocócico consistió de varias operaciones de concentración/diafiltración, precipitación/elusión, cromatografía de columna, y etapas de filtración profunda. Todos los procedimientos se desarrollaron a temperatura ambiente a menos que se especifique otra cosa.

El caldo clarificado proveniente de los cultivos del fermentador del serotipo 3 de *S. pneumoniae* se concentró y se diafiltró utilizando un filtro MWCO de 100 kDa. La diafiltración se logró utilizando un amortiguador de fosfato

~~177~~
11

de sodio a pH neutro. La diafiltración removi6 los componentes de medio de peso molecular bajo provenientes de los biopol6meros de peso molecular mayor tal como 6cido nucleico, prote6na y polisac6rido.

5

Antes de la adici6n de bromuro de hexadeciltrimetil amonio (HB), un volumen calculado de una soluci6n madre de NaCl se agreg6 a la soluci6n de polisac6rido concentrada y diafiltrada para dar una concentraci6n final de NaCl 0.25 M.

10 El polisac6rido fue luego precipitado al agregar HB proveniente de una soluci6n madre para dar una concentraci6n final de HB al 1% (p/v). El polisac6rido/precipitado HB se captur6 sobre un filtro profundo y el filtrado se descart6. El precipitado de polisac6rido se resolubiliz6 y se eluy6 al
15 recircular una soluci6n de cloruro de sodio a trav6s del filtro profundo que contiene precipitado. Los filtros fueron entonces enjuagados con una soluci6n de cloruro de sodio adicional.

20 Se agreg6 yoduro de sodio (NaI) a la soluci6n de polisac6rido proveniente de una soluci6n madre de NaI para lograr la concentraci6n final de 0.5% para precipitar HB. El precipitado se removi6 mediante filtraci6n profunda. El filtrado conten6a el polisac6rido objetivo. El recipiente de
25 precipitaci6n y el filtro se enjuagaron con una soluci6n de NaCl/NaI y el enjuagado se combin6 con la soluci6n de polisac6rido parcialmente purificada. El filtro se descart6.

H8
AS

El polisacárido fue entonces filtrado a través de un filtro de 0.2 μm .

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

La solución de polisacárido parcialmente purificada fue purificada además mediante filtración a través de un filtro
10 profundo impregnado con carbono activado. Después de la filtración, el filtro de carbono se enjuagó con una solución de cloruro de sodio. El enjuague se combinó con la solución de polisacárido, que fue entonces filtrada a través de un filtro de 0.2 μm .

15

La solución de polisacárido se concentró sobre un ultrafiltro MWCO de 30 kDa y se ajustó con un amortiguador de
fosfato de sodio 1M para lograr una concentración final de fosfato de sodio 0.025M. El pH se revisó y se ajustó a $7.0 \pm$
20 0.2.

La columna de hidroxapatita cerámica (HA) se equilibró con un amortiguador de fosfato de sodio que contiene cloruro de sodio para obtener la conductividad apropiada ($<15 \mu\text{S}$). La
25 solución de polisacárido fue entonces cargada sobre la columna. Bajo estas condiciones, las impurezas unidas a la resina y al polisacárido se recuperaron en el flujo pasante desde la columna. El polisacárido fue fluido a través de la

129
46

columna con amortiguador y luego filtrado a través de un filtro de 0.2µm.

La solución de polisacárido se concentró utilizando un
5 filtro MWCO de 30 kDa. El concentrado fue entonces diafiltrado con WFI.

La solución de polisacárido diafiltrado se filtró a
través de un filtro de membrana de 0.2 µm en recipientes de
10 acero inoxidable. Las muestras se removieron para liberar la prueba y el polisacárido purificado se almacenó congelado a -
25° ± 5°C.

Caracterización

15

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

20 La identidad del polisacárido monovalente se confirmó mediante inmunolectrofóresis de contra corriente utilizando antisuero específico.

La cromatografía de filtración de gel de alto desempeño
25 acoplada con el índice de refracción y detectores de dispersión de luz láser multi-ángulo (MALLS) se utilizó en conjunto con la concentración de muestra para calcular el peso molecular.

180
47

El medio de cromatografía de exclusión de tamaño (CL-4B) se utilizó para perfilar la distribución de tamaño molecular relativa del polisacárido.

5

Ejemplo 4

Preparación del Conjugado de Sacárido Neumocócico - CRM₁₉₇

Serotipo 3

Activación y Conjugación

10

Los recipientes del sacárido serotipo 3 purificados se descongelaron y se combinaron en un recipiente de reacción. Al recipiente, se agregó WFI y ácido acético 2M a una concentración final de 0.2M y 2mg/mL de sacárido. La temperatura de la solución se elevó a 85°C durante 1 hora para hidrolizar el polisacárido. La reacción se enfrió a ≤25°C y se agregó cloruro de magnesio 1M a una concentración final de 0.1M. La oxidación en la presencia de periodato de sodio se desarrolló mediante incubación durante 16-24 horas a 23°C.

20

La mezcla de reacción de activación se concentró y se diafiltró 10x con WFI utilizando una membrana MWCO de 100 K. El retenido fue filtrado a través de un filtro de 0.2 µm.

25

Para componerlo, se agregó fosfato de sodio 0.2M, pH 7.0, al sacárido activado a una concentración final de 10mM y un pH de 6.0-6.5. La proteína portadora CRM₁₉₇ se mezcló con

181
48

la solución de sacárido a una proporción de 2g de sacárido por 1g de CRM₁₉₇. La solución de sacárido/proteína combinada se llenó en botellas de liofilización de vidrio de 100 mL con un llenado objetivo de 50mL, congelada en recipiente a -75°C, y liofilizada.

Las botellas de material de sacárido/proteína co-liofilizadas se llevaron a temperatura ambiente y se resuspendieron en un amortiguador de fosfato de sodio 0.1M, pH 7.0, a una concentración de sacárido final de 20 mg/mL. El pH se ajustó a 6.5 y luego 0.5 de equivalente molar de cianoborohidruro de sodio se agregaron. La reacción se incubó a 37°C durante 48 horas. Luego de la incubación de cianoborohidruro, la mezcla de reacción se diluyó con succinato 5mM/amortiguador de solución salina 0.9%. Los aldehídos no reaccionados fueron apagados mediante la adición de borohidruro de sodio y la incubación a 23°C durante 3-6 horas. La mezcla de reacción se transfirió a través de un pre-filtro de 0.45-5 µm en un recipiente de retenido.

20

La mezcla de reacción se diafiltró 30x con amortiguador de fosfato 0.1M (pH 9), 20x con amortiguador de fosfato 0.15M (pH 6), y 20x con succinato 5mM/solución salina 0.9%. El retenido se filtró a través de un filtro de 0.2 µm.

25

La solución de conjugado se diluyó a un objetivo de sacárido de 0.5 mg/mL, y luego se esterilizó filtrada en

182
49

recipientes FBC en una caperuza Clase 100. El conjugado se almacenó a 2-8°C.

Caracterización

5

El medio de cromatografía de exclusión de tamaño (CL-4B) se utilizó para perfilar la distribución de tamaño molecular relativa del conjugado.

10 La identidad del conjugado se confirmó mediante un ensayo "slot-blot" utilizando antisuero específico.

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

20
$$\text{Proporción} = \frac{\mu\text{g/mL sacárido}}{\mu\text{g/mL proteína}}$$

Ejemplo 5

Preparación del Serotipo 5 de Polisacárido Capsular de *S.*

Pneumoniae

25

El serotipo 5 de *S. pneumoniae* se obtuvo del Dr. Gerald Schiffman de la Universidad Estatal de New York, Brooklyn, New York. Para la preparación del sistema de banco celular,

ver el Ejemplo 1. Para la fermentación, cosecha, purificación y caracterización del polisacárido, ver el Ejemplo 1.

Proceso de Fermentación Alternativo

5

Los cultivos provenientes del banco de célula de trabajo utilizados para inocular las botellas de semilla que contienen un medio basado de soya y una solución de NaHCO_3 estéril de 10mM. Las botellas se incubaron a $36^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ sin

10 agitación hasta que se cumplieron los requisitos de crecimiento. Una botella de semilla se utilizó para inocular un fermentador de semilla que contiene un medio a base de soya y una solución de NaHCO_3 estéril de 10mM. Un pH de

15 aproximadamente 7.0 se mantuvo con NaOH 3N. Después de que se alcanzó la densidad óptica objetivo, el fermentador de semilla se utilizó para inocular el fermentador de producción que contiene un medio a base de soya con una concentración de

20 NaHCO_3 de 10mM. El pH se mantuvo con NaOH 3N. La fermentación se terminó luego de cesar el crecimiento y cuando el volumen de trabajo del fermentador se alcanzó. Una cantidad apropiada de desoxicolato de sodio al 12% estéril se agregó al cultivo para obtener una concentración de 0.12% en el caldo, para

25 lisar las células bacterianas y liberar el polisacárido asociado a la célula. Después de lisar, los contenidos del fermentador se mantuvieron, con agitación, durante un intervalo de tiempo entre 8 y 24 horas a una temperatura de entre 7°C y 13°C para asegurar que hubiera ocurrido la lisis celular completa y la liberación del polisacárido. La

184
51

agitación durante este período de mantenimiento evitó que el sedimento del lisado se asentara en las paredes del fermentador y la sonda de pH, permitiendo de esta manera que se mantuviera la integridad de la sonda de pH. Luego, el pH del caldo de cultivo lisado se ajustó a aproximadamente un pH de 4.5 con 50% de ácido acético. Después de un tiempo de mantenimiento sin agitación, durante un intervalo de tiempo entre 12 y 24 horas a una temperatura entre 15°C y 25°C, una porción significativa de las proteínas previamente solubles desaparecieron de la solución como un precipitado sólido con poca pérdida o degradación del polisacárido, que permaneció en la solución. La solución con el precipitado fue entonces clarificada mediante centrifugación de flujo continuo seguido por filtración profunda y microfiltración a 0.45 µm.

Ejemplo 6

Preparación del Conjugado de Sacárido Neumocócico Serotipo 5

- CRM₁₉₇

Activación y Conjugación

Los recipientes del sacárido del serotipo 5 fueron descongelados y combinados en un recipiente de reacción. Al recipiente, se agregaron acetato de sodio 0.1M, pH 4.7, seguido por oxidación en la presencia de periodato de sodio mediante incubación durante 16-22 horas a 23°C.

185
52

La mezcla de reacción de activación se concentró y se diafiltró 10x con WFI utilizando una membrana MWCO 100K. El retenido se filtró a través de un filtro de 0.2 µm.

5 El sacárido activado serotipo 5 se combinó con CRM₁₉₇ a una proporción de 0.8:1. La solución de sacárido/proteína combinada se llenó en botellas de liofilización de vidrio de 100 mL (50 mL llenado de objetivo), congelado en cubierta a -75°C, y co-liofilizado.

10

Las botellas de material co-liofilizado fueron llevadas a temperatura ambiente y resuspendidas en fosfato de sodio 0.1M, pH 7.5, y se agregó cianoborohidruro de sodio. La reacción se incubó a 30°C durante 72 horas, seguido por una
15 segunda adición de cianoborohidruro e incubada a 30°C durante 20-28 horas.

Luego de las incubaciones de cianoborohidruro, la mezcla de reacción se diluyó dos veces con solución salina y se
20 transfirió a través de un pre-filtro de 0.45-5 µm en un recipiente de retenido. La mezcla de reacción se diafiltró 30x con amortiguador de fosfato 0.01M, pH 8, 20x con amortiguador de fosfato 0.15M, pH 6, y 20x con solución salina. El retenido se filtró a través de un filtro de 0.2
25 µm.

La solución de conjugado se diluyó a un objetivo de sacárido de 0.5 mg/mL, y luego estéril se filtró en

186
53

recipientes FBC en una caperuza Clase 100. El conjugado se almacenó a 2-8°C.

Para la caracterización del conjugado, ver el Ejemplo 2.

5

Ejemplo 7

Preparación del Serotipo 6A de Polisacárido Capsular de *S.*

Pneumoniae

10 El serotipo 6A de *S. pneumoniae* se obtuvo del Dr. Gerald Schiffman de la Universidad Estatal de New York, Brooklyn, New York. Para la preparación del sistema de banco celular, ver el Ejemplo 1. Para la fermentación, cosecha y purificación del polisacárido, ver el Ejemplo 1, excepto que
15 durante la purificación, la etapa de concentración de MWCO 30 kDa, se omitió antes de la etapa de cromatografía.

Ejemplo 8

Preparación del Conjugado de Sacárido Neumocócico Serotipo 6A

20

- CRM₁₉₇

Activación y Conjugación

El polisacárido del serotipo 6A es un polímero de alto
25 peso molecular que se había reducido en tamaño antes de la oxidación. Los recipientes del sacárido del serotipo 6A se descongelaron y se combinaron en un recipiente de reacción. Al recipiente, se agregó ácido acético 2 M a una

187
SA

concentración final de 0.1 M para hidrólisis durante 1.5 horas a 60°C. La reacción se enfrió a 23°C y la neutralización se desarrolló al ajustar la mezcla de reacción con NaOH 1 M a pH 6. La oxidación en la presencia de periodato de sodio se desarrolló mediante incubación a 23°C durante 14-22 horas.

La mezcla de reacción de activación se concentró y se diafiltró 10x con WFI utilizando una membrana MWCO 100K. El retenido se filtró a través de un filtro de 0.2 µm.

El serotipo 6A se compuso con sucrosa y se llenó en botellas de liofilización de vidrio de 100 mL (50mL llenado objetivo) y congeladas en cubierta a -75°C y liofilizadas.

Las botellas de material liofilizado se llevaron a temperatura ambiente y resuspendidas en dimetilsulfóxido (DMSO) a una proporción de sacárido/proteína de 1:1. Después de la adición de cianoborohidruro de sodio, la mezcla de reacción se incubó a 23°C durante 18 horas. Luego de la incubación de cianoborohidruro, la mezcla de reacción se diluyó con solución salina fría. Los aldehídos no reaccionados fueron apagados mediante adición de borohidruro de sodio mediante incubación a 23°C durante 3-20 horas.

La mezcla de reacción diluida se transfirió a través de un pre-filtro de 5 µm en un recipiente de retenido. La mezcla de reacción se diafiltró 10x con NaCl 0.9% y 30x con NaCl

188
S

amortiguado con succinato. El retenido se filtró a través de un filtro de 0.2 µm.

La solución de conjugado se diluyó a un objetivo de 5 sacárido de 0.5 mg/mL, y luego estéril se filtró en recipientes FBC en una caperuza Clase 100. El conjugado se almacenó a 2-8°C.

Para la caracterización del conjugado, ver el Ejemplo 2.

10

Ejemplo 9

Preparación del Serotipo 7F de Polisacárido Capsular de *S.*

Pneumoniae

15 El serotipo 7F de *S. pneumoniae* se obtuvo del Dr. Gerald Schiffman de la Universidad Estatal de New York, Brooklyn, New York. Para la preparación del sistema de banco celular, y para la fermentación y cosecha del polisacárido, ver el Ejemplo 3. Para un proceso de fermentación y de cosecha 20 alternativos, ver el proceso alternativo descrito en el Ejemplo 1.

Purificación

25 La purificación del polisacárido neumocócico consistió de varias operaciones de concentración/diafiltración, precipitación/elusión, cromatografía de columna, y etapas de filtración profunda. Todos los procedimientos se

189
56

desarrollaron a temperatura ambiente a menos que se especifique otra cosa.

El caldo clarificado proveniente de cultivos del fermentador del serotipo 7F de *S. pneumoniae* se concentró y se filtró utilizando un filtro MWCO de 100 kDa. La diafiltración se logró utilizando un amortiguador de fosfato de sodio a pH neutro. La diafiltración removi6 los componentes medios de bajo peso molecular provenientes de los biopol6meros de peso molecular mayor tal como 6cido nucleico, prote6na y polisac6rido.

El serotipo 7F no forma un precipitado con HB. En su lugar, las impurezas se precipitaron de la soluci6n concentrada y diafiltrada al agregar el HB proveniente de una soluci6n madre a una concentraci6n final de 1% de HB. El precipitado se captur6 sobre un filtro profundo y el filtro se descarto. El polisac6rido estaba contenido en el filtrado.

Se agreg6 yoduro de sodio (NaI) a la soluci6n de polisac6rido proveniente de la soluci6n de NaI madre para lograr una concentraci6n final de 0.5% para precipitar HB. El precipitado se removi6 mediante filtraci6n profunda. El filtrado conten6a el polisac6rido objetivo. El recipiente de precipitaci6n y el filtro se enjuagaron con una soluci6n de NaCl/Nal y los enjuagues se combinaron con la soluci6n de polisac6rido parcialmente purificada. El filtro se descart6.

190
57

El polisacárido fue entonces filtrado a través de un filtro de 0.2 μm .

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

La solución de polisacárido parcialmente purificada se purificó adicionalmente mediante filtración a través de un filtro profundo impregnado con carbono activado. Después de la filtración, el filtro de carbono se enjuagó con una solución de cloruro de sodio. El enjuague se combinó con la solución de polisacárido, que luego se filtró a través de un filtro de 0.2 μm .

15

La solución de polisacárido se concentró sobre un ultrafiltro MWCO de 30 kDa y se ajustó con un amortiguador de fosfato de sodio 1M para lograr una concentración final de fosfato de sodio 0.025M. El pH se revisó y se ajustó a 7.0 ± 0.2 .

20

La columna de hidroxapatita cerámica (HA) se equilibró con un amortiguador de fosfato de sodio que contiene cloruro de sodio para obtener la conductividad apropiada (15 μS). La solución de polisacárido fue entonces cargada sobre la columna. Bajo estas condiciones, las impurezas unidas a la resina y el polisacárido se recuperaron en el flujo pasante desde la columna. El polisacárido fluyó a través de la

25

44
58

columna con amortiguador y se filtró a través de un filtro de 0.2 μ m.

La solución de polisacárido se concentró utilizando un filtro MWCO de 30 kDa. El concentrado fue entonces diafiltrado con WFI.

La solución de polisacárido diafiltrada se filtro a través de un filtro de membrana de 0.2 μ m en recipientes de acero inoxidable. Las muestras se removieron para liberar el ensayo y el polisacárido purificado se almacenó a 2° - 8°C.

Para la caracterización del polisacárido, ver el Ejemplo 3.

15

Ejemplo 10

Preparación del Conjugado de Sacárido Neumocócico Serotipo 7F

- CRM₁₉₇

20

Activación y Conjugación

La oxidación en la presencia de periodato de sodio se desarrolló mediante la incubación durante 16-24 horas a 23°C.

La mezcla de reacción de activación se concentró y se diafiltró 10x con NaOAc 10mM, pH 4.5, utilizando una membrana MWCO 100K. El retenido se filtró a través de un filtro de 0.2 μ m.

192
59

El serotipo 7F se lleno en botellas de liofilización de vidrio de 100 mL (50 mL de llenado objetivo) y congeladas en cubierta a -75°C y liofilizadas.

5 Las botellas del serotipo liofilizado 7F y CRM₁₉₇ se llevaron a temperatura ambiente y fueron resuspendidas en DMSO a una proporción de sacárido/proteína de 1.5:1. Después de la adición de cianoborohidruro de sodio, la reacción se incubó a 23°C durante 8-10 horas. Los aldehídos no
10 reaccionados fueron apagados mediante la adición de borohidruro de sodio mediante incubación a 23°C durante 16 horas.

La mezcla de reacción se diluyó 10 veces con solución
15 salina fría y se transfirió a través de un pre-filtro de 5 µm en un recipiente de retenido. La mezcla de reacción se diafiltró 10x con solución salina 0.9% y 30x con solución salina amortiguada con succinato. El retenido se filtró a
través de un filtro de 0.2 µm.

20

La solución conjugada se diluyó con un objetivo de sacárido de 0.5 mg/mL solución salina 0.9%, y luego estéril se filtró en recipientes FBC en una caperuza Clase 100. El conjugado se almacenó a -8°C.

25

Para caracterización del conjugado, ver el Ejemplo 4.

193
60**Ejemplo 11****Preparación del Serotipo 19A de Polisacárido Capsular de *S. Pneumoniae***

5 El serotipo 19A de *S. pneumoniae* se obtuvo del Dr. Gerald Schiffman de la Universidad Estatal de New York, Brooklyn, New York. Para la preparación del sistema de banco celular, ver el Ejemplo 1. Para la fermentación, cosecha y purificación del polisacárido, ver el Ejemplo 7. Para la
10 caracterización, ver el Ejemplo 3.

Ejemplo 12**Preparación del Conjugado de Sacárido Neumocócico Serotipo 19A - CRM₁₉₇**

15

Activación y Conjugación

Los recipientes del sacárido serotipo 19A fueron descongelados y combinados en un recipiente de reacción. Se
20 agregó acetato de sodio a 10 mM (pH 5.0) y la oxidación se llevó a cabo en la presencia de periodato de sodio mediante incubación durante 16-24 horas a 23°C.

La mezcla de reacción de activación se concentró y se
25 diafiltró 10x con acetato 10mM, pH 5.0, utilizando una membrana MWCO 100K. El retenido se filtró a través de un filtro de 0.2 µm.

104
61

El sacárido activado se compuso con sucrosa seguido por la adición de CRM₁₉₇. El sacárido activado con serotipo 19A y la mezcla CRM₁₉₇ (proporción 0.8:1) se llenó en botellas de liofilización de vidrio 100 mL (50 mL llenado de objetivo),
5 congeladas en cubierta a -75°C, y liofilizadas.

Las botellas de material liofilizado fueron llevadas a temperatura ambiente y resuspendidas en DMSO. A la mezcla de sacárido/proteína, se agregó cianoborohidruro de sodio (100
10 mg/ml). La reacción se incubó a 23°C durante 15 horas. Luego de la incubación de cianoborohidruro, los aldehídos no reaccionados fueron apagados mediante la adición de borohidruro de sodio mediante incubación a 23°C durante 3-20 horas.

15

La mezcla de reacción se diluyó 10 veces con solución salina fría y se transfirió a través de un prefiltro de 5 µm en un recipiente de retenido. La mezcla de reacción se diafiltró 10x con 0.9% de NaCl, se filtró 0.45 µm, y 30x con
20 diafiltración utilizando un amortiguador de succinato 5mM/NaCl 0.9%, pH 6. El retenido se filtró a través de un filtro de 0.2 µm.

La solución de conjugado se diluyó a un objetivo de 0.5
25 mg/mL utilizando succinato 5mM/solución salina 0.9%, y luego filtrada estéril en recipientes FBC en una caperuza Clase 100. El conjugado se almacenó a 2 - 8°C.

Para la caracterización del conjugado, ver el Ejemplo 4.

Ejemplo 13

Preparación de los Serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F de Polisacárido Capsular de *S. Pneumoniae*

Preparación del Cultivo de Semilla de *S. pneumoniae*

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

Separadamente, un frasco de cada uno de los serotipos deseados de *Streptococcus pneumoniae* se utilizó para iniciar una tanda de fermentación. Dos botellas que contienen un medio a base de soya y rojo fenol se ajustaron a un rango de pH de 7.4 ± 0.2 utilizando carbonato de sodio, y el volumen requerido de la solución de dextrosa al 50%/sulfato de magnesio al 1% se agregaron luego a las botellas. Las dos botellas se inocularon con diferentes cantidades de semilla. Las botellas se incubaron a $36^\circ \pm 2^\circ\text{C}$ hasta que el medio se volvió amarillo. Luego de la incubación, las muestras se removieron de cada botella y se ensayaron para densidad óptica (OD) (0.3 a 0.9) y pH (4.6 a 5.5). Una de las dos botellas se seleccionó para la inoculación del fermentador de semilla.

El medio a base de soya se transfirió al fermentador de semilla y se esterilizó. Luego se agregó un volumen de solución 50% de dextrosa/1% de sulfato de magnesio al fermentador. El pH y la agitación del fermentador de semilla se monitorearon y se controlaron (pH 6.7 a 7.4). La temperatura se mantuvo a $36^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. La inoculación de semilla (botella) fue conectada asépticamente al fermentador de semilla y el inóculo fue transferido. El fermentador se mantuvo en un control de pH y las muestras fueron periódicamente removidas y probadas para OD y pH. Cuando el OD deseado de 0.5 a 600 nm se alcanzó, el fermentador intermedio se inoculó con el caldo de fermentación proveniente del fermentador de semilla.

El medio a base de soya se transfirió al fermentador intermedio y se esterilizó. Luego una solución de dextrosa al 50%/sulfato de magnesio 1% volumen se agregó al fermentador. El pH y la agitación del fermentador intermedio se monitorearon y controlaron (pH 6.7 a 7.4). La temperatura se mantuvo a $36^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Los contenidos del fermentador de semilla se transfirieron al fermentador intermedio. El fermentador se mantuvo en control de pH y las muestras se removieron periódicamente y se probaron para OD y pH. Cuando el OD deseado de 0.5 a 600 nm se alcanzó, el fermentador de producción se inoculó con un caldo de fermentación proveniente del fermentador intermedio.

197
6A

El medio a base de soya se transfirió al fermentador de producción y se esterilizó. Luego se agregó un volumen de 50% de dextrosa/1% de solución de sulfato de magnesio. El pH y la agitación del fermentador de producción se monitorearon y controlaron (pH 6.7 a 7.4). La temperatura se mantuvo a $36^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. El fermentador se mantuvo en control de pH y las muestras se removieron periódicamente y se probaron para OD y pH, hasta que se completó la fermentación.

10 Se agregó desoxicolato de sodio al fermentador a una concentración final de aproximadamente 0.12% p/v. El cultivo se mezcló durante un mínimo de treinta minutos y el punto de ajuste de la temperatura se redujo a 10°C . El cultivo se incubó durante toda la noche y luego de confirmación de inactivación, el pH del cultivo se ajustó a entre 6.4 y 6.8, según fuera necesario, con 50% de ácido acético. La temperatura del fermentador se incrementó a $20^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$ y los contenidos se transfirieron al tanque de mantenimiento de clarificación.

20

Los contenidos del tanque de mantenimiento de clarificación (incluyendo los desechos celulares) se procesaron a través de una centrifuga a una tasa de flujo entre 25 y 600 litros por hora (excepto el Serotipo 4, en donde los desechos de célula fueron descartados y la tasa de flujo ajustada a entre 25 y 250 litros por hora). Las muestras del sobrenadante se removieron y se ensayaron para OD. El OD deseado durante la centrifugación fue ≤ 0.15 .

Inicialmente, el sobrenadante fue recirculado a través de un montaje de filtro profundo hasta que se logró un OD de 0.05 ± 0.03 . Luego el sobrenadante pasó a través del montaje de filtro profundo y a través de un filtro de membrana de 0.45 μm al tanque de mantenimiento de filtrado.

Posteriormente, el producto se transfirió a través de tubos cerrados al área de purificación para procesamiento.

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

15 Para una fermentación alternativa y un proceso de cosecha para los serotipos 4 y 6B, ver el proceso alternativo descrito en el Ejemplo 1.

Purificación

20 La purificación de cada polisacárido neumocócico consistió de varias operaciones de concentración/diafiltración, precipitación/elusión, cromatografía de columna, y etapas de filtración profunda. Todos los procedimientos se desarrollaron a temperatura ambiente a menos que se especifique otra cosa.

El caldo clarificado proveniente de los cultivos del fermentador del serotipo de *S. pneumoniae* deseado se

199
60

concentró y se diafiltró utilizando un filtro MWCO de 100 kDa. La diafiltración se logró utilizando amortiguador de fosfato de sodio a pH < 9.0. La diafiltración removi6 los componentes medios de peso molecular bajo provenientes de biopol6meros de peso molecular mayor tales como 6cido nucleico, prote6na y polisac6rido.

El polisac6rido se precipit6 de la soluci6n concentrada y diafiltrada al agregar HB proveniente de una soluci6n madre para dar una concentraci6n final de 1% de HB (p/v) (excepto el Serotipo 23F, que tuvo una concentraci6n final de 2.5%). El polisac6rido/precipitado HB se captur6 sobre un filtro profundo y el filtrado se descart6. (Nota: el Serotipo 14 no se precipit6; por lo tanto el filtrado se retuvo). El precipitado del polisac6rido se resolubiliz6 y se eluy6 al recircular una soluci6n de cloruro de sodio a trav6s de un filtro profundo que contiene precipitado. Los filtros fueron entonces enjuagados con una soluci6n de cloruro de sodio adicional.

20

Se agreg6 yoduro de sodio (NaI) a la soluci6n de polisac6rido proveniente de una soluci6n de NaI madre para lograr una concentraci6n final de 0.5% para precipitar HB (excepto para el Serotipo 6B, que tuvo una concentraci6n final de 0.25%). El precipitado se removi6 mediante filtraci6n profunda. El filtrado conten6a el polisac6rido objetivo. El filtro se descart6. El polisac6rido fue luego filtrado a trav6s de un filtro de 0.2 μ m.

400
67

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

5 La solución de polisacárido parcialmente purificada se purificó adicionalmente mediante filtración a través de un filtro profundo impregnado con carbono activado. Después de la filtración, el filtro de carbono se enjuagó con una solución de cloruro de sodio. El enjuague se combinó con la
10 solución de polisacárido, la cual fue entonces filtrada a través de un filtro de 0.2 μm .

La solución de polisacárido se concentró sobre un ultrafiltro MWCO de 30 kDa y el filtro se enjuagó con una
15 solución de cloruro de sodio. El pH se revisó y se ajustó a 7.0 ± 0.3 .

La columna de hidroxapatita cerámica (HA) se equilibró con amortiguador de fosfato de sodio que contiene cloruro de
20 sodio hasta que el pH es 7.0 ± 0.3 y la conductividad era $26 \pm 4\mu\text{S}$. La solución de polisacárido fue entonces cargada sobre la columna. Bajo estas condiciones, las impurezas unidas a la resina y al polisacárido se recuperaron en el flujo pasante desde la columna. La solución de polisacárido se filtró a
25 través de un filtro 0.2 μm .

La solución de polisacárido se concentró utilizando un filtro MWCO de 30 kDa. El concentrado fue entonces diafiltrado con WFI hasta que la conductividad era $< 15\mu\text{S}$.

5 La solución de polisacárido diafiltrada fue filtrada a través de un filtro de membrana de $0.2\mu\text{m}$ en recipientes en masa y almacenados a $2-8^{\circ}\text{C}$.

Ejemplo 14

10 **Preparación de Conjugados de Sacárido Neumocócicos - CRM₁₉₇**
para los Serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F

Proceso de Activación

15 Los sacáridos de serotipo diferente luego de diferentes sendas para activación (hidrólisis o no hidrólisis antes de activación) y conjugación (reacciones acuosas o DMSO) como se describió en este ejemplo.

20 El polisacárido se transfirió desde los recipientes de masa al recipiente de reactor. El polisacárido fue entonces diluido en WFI y fosfato de sodio a un rango de concentración final de $1.6 - 2.4 \text{ mg/mL}$.

25 **Etapas 1**

Para los serotipos 6B, 9V, 14, 19F y 23F, el pH se ajustó a $\text{pH } 6.0 \pm 0.3$.

Para el serotipo 4, se agregó ácido clorhídrico (concentración de ácido final 0.01 M) y la solución se incubó durante 25 - 35 minutos a $45^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. La hidrólisis se detuvo y se enfrió a $21 - 25^{\circ}\text{C}$ y se agregó fosfato de sodio 1M a un
5 objetivo de $\text{pH } 6.7 \pm 0.2$. Un ensayo en proceso fue hecho para confirmar el nivel apropiado de la despiruvilación.

Para el serotipo 18C, se agregó ácido acético glacial (concentración de ácido final 0.2M) y la solución se incubó
10 durante 205 - 215 minutos a $94^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. La temperatura fue entonces disminuyendo a $21 - 25^{\circ}\text{C}$ y se agregó 1 - 2M de fosfato de sodio a un objetivo de $\text{pH } 6.8 \pm 0.2$.

Etapas 2: Reacción de Periodato

15

Los equivalentes molares de periodato de sodio requeridos para la activación de sacárido neumocócico se determinaron utilizando el contenido de sacárido total (excepto para el serotipo 4). Para el serotipo 4, se utilizó
20 una proporción de 0.8-1.2 moles de periodato de sodio por mol de sacárido. Con una mezcla completa, a la reacción de oxidación se le permitió proceder entre 16 a 20 a $21 - 25^{\circ}\text{C}$ para todos los serotipos excepto 19F para el cual la temperatura fue $\leq 15^{\circ}\text{C}$.

25

Etapas 3: Ultrafiltración

403
R

El sacárido oxidado se concentró y se diafiltró con WFI (0.01 M amortiguador de fosfato de sodio pH 6.0 para el serotipo 19F) sobre un ultrafiltro MWCO de 100 kDa (ultrafiltro 5 kDa para 18C). El permeado se descartó y el
5 retenido se filtró a través de un filtro de 0.22 μ m.

Etapa 4: Liofilización

Para los serotipos 4, 9V, y 14 el sacárido concentrado
10 se mezcló con una proteína portadora CRM₁₉₇, se llenó en botellas de vidrio, se congeló en cubierta y se almacenó a $\leq -65^{\circ}\text{C}$. El sacárido concentrado congelado - CRM₁₉₇ se liofilizó y luego se almacenó a $-25^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$.

15 Para los serotipos 6B, 19F, y 23F una cantidad específica de sucrosa se agregó la cual se calculó para lograr una concentración de sucrosa de $5\% \pm 3\%$ en la mezcla de reacción de conjugación. El Serotipo 18C no requiere
adición de sucrosa. El sacárido concentrado fue entonces
20 llenado en botellas de vidrio, congelado en cubierta y almacenado a $\leq -65^{\circ}\text{C}$. El sacárido concentrado congelado se liofilizó y luego se almacenó a $-25^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$.

Proceso de Conjugación

25

Se utilizaron dos procesos de conjugación: conjugación acuosa para los serotipos 4, 9V, 14 y 18C, y la conjugación DMSO para los serotipos 6B, 19F y 23F.

204
21Conjugación Acuosa**Etapas 1: Disolución**

5 Para los serotipos 4, 9V y 14, la mezcla de sacárido activado liofilizado - CRM₁₉₇ se descongeló y se equilibró a temperatura ambiente. El sacárido activado liofilizado - CRM₁₉₇ fue entonces reconstituido en un amortiguador de fosfato de sodio 0.1M a una proporción típica de:

10

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

15

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

20

Para el serotipo 18C, el sacárido liofilizado se reconstituyó en una solución de CRM₁₉₇ en fosfato de sodio dibásico 1M a una proporción típica de 0.11 L de fosfato de sodio por 1 L de solución CRM₁₉₇. La mezcla de reacción (8-12 g/L concentración de sacárido) se incubó a $23^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ hasta

25

disolución total.

El pH se probó como un control en proceso en esta etapa.

405
72**Etapla 2: Reacción de Conjugación**

Para los serotipos 4 y 9V, la reacción de conjugación se inició al agregar la solución de cianoborohidruro de sodio (100 mg/mL) para lograr 1.0 - 1.4 moles de cianoborohidruro de sodio por mol de sacárido. La mezcla de reacción se incubó durante 44 - 52 horas a $37^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. La temperatura se redujo entonces a $23^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y se agregó cloruro de sodio 0.9% al reactor. La solución de borohidruro de sodio (100 mg/mL) se agregó para lograr 1.8 - 2.2 equivalentes molares de borohidruro de sodio por mol de sacárido. La mezcla se incubó durante 3 - 6 horas a $23^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. La mezcla se diluyó con cloruro de sodio 0.9% y el reactor se enjuagó. La mezcla de conjugación diluida se filtró utilizando un pre-filtro de 1.2 μm en un recipiente de soporte.

Para los serotipos 14 y 18C, la reacción de conjugación se inició al agregar la solución de cianoborohidruro (100 mg/mL) para lograr 1.0 - 1.4 moles de cianoborohidruro de sodio por mol de sacárido. La mezcla de reacción se incubó durante 12 - 24 horas a $23^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. La temperatura se incrementó a $37^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y la reacción se incubó durante 72 - 96 horas. La temperatura se redujo entonces a $23^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y se agregó cloruro de sodio 0.9% al reactor. Se agregó una solución de borohidruro de sodio (100mg/mL) para lograr 1.8 - 2.2 de equivalentes molares de borohidruro de sodio por mol de sacárido. La mezcla se incubó durante 3 - 6 horas a $23^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. La mezcla se diluyó con 0.9% de cloruro de sodio y el

~~706~~
73

reactor se enjuagó. La mezcla de conjugación diluida fue entonces filtrada utilizando 1.2 µm de pre-filtro en un recipiente de soporte.

5 **Etapla 3: Ultrafiltración 100 kDa**

La mezcla de conjugación diluida se concentró y se diafiltró sobre un ultrafiltro MWCO de 100 kDa con un mínimo de 15 volúmenes (serotipo 4) o 40 volúmenes (serotipos 9V, 10 14, y 18C) de cloruro de sodio 0.9%.

El perneado se descartó.

Para el serotipo 4, el retenido se filtró a través de 0.45 µm de filtro.

15 Un control en proceso (contenido de sacárido) se desarrolló en esta etapa.

● **Etapla 4: Purificación de Columna HA**

20 Esta etapa fue solamente desarrollada para el conjugado serotipo 4.

La columna HA fue neutralizada primero utilizando amortiguador de fosfato de sodio 0.5M (pH 7.0 ± 0.3) y luego 25 equilibrada con cloruro de sodio 0.9%. El retenido filtrado (serotipo 4) se cargó sobre la columna a una proporción de flujo de 1.0 L/min. La columna se lavó con 0.9% de cloruro de sodio a una tasa de flujo de ≤ 2.0 L/min. El producto fue

207
74

luego eluído con amortiguador de fosfato de sodio 0.5M a una tasa de flujo de ≤ 2.0 L/min.

La fracción de HA fue entonces concentrada y diafiltrada sobre una membrana MWCO de 100 kDa con un mínimo de 20 volúmenes de cloruro de sodio 0.9%. El permeado se descartó.

Etapas 5: Filtración de Estéril

10 El retenido después de diafiltración MWCO de 100 kDa se filtró a través de un filtro de 0.22 μ m. Los controles en procesos (contenido de sacárido, proteína libre, sacárido libre y cianuro) se desarrollaron sobre el producto filtrado. Los controles en proceso sobre el retenido filtrado se desarrollaron para determinar si la concentración adicional, 15 diafiltración, y/o dilución eran necesarias para cumplir los objetivos FBC. Estas y pruebas adicionales se repitieron en muestras FBC.

20 Según fuera necesario, el conjugado filtrado se diluyó con cloruro de sodio 0.9% con el fin de lograr una concentración final de menos de 0.55 g/L. Las pruebas de liberación para el contenido de sacárido, contenido de proteína y proporción de sacárido:proteína se desarrolló en 25 esta etapa.

Finalmente, el conjugado se filtró (0.22 μ m) y se llenó en tarros de acero inoxidable de 10 L a una cantidad típica

108
XS

de 2.64 g/tarro. En esta etapa, el rendimiento, contenido de
sacárido, contenido de proteína, pH, proporción
sacárido:proteína y contenido de lisina se desarrollaron como
controles en proceso. La prueba de liberación (apariciencia,
5 proteína libre, sacárido libre, endotoxina, determinación de
tamaño molecular, cianuro residual, identidad de sacárido,
identidad CRM₁₉₇) se desarrolló en esta etapa.

Conjugación DMSO

10

Etapas I: Disolución

Los serotipos de sacárido activado liofilizado 6B, 19F,
23F y la proteína portadora CRM₁₉₇ liofilizada se equilibraron
15 a temperatura ambiente y se reconstituyeron en DMSO. La
concentración de disolución típicamente varió desde 2-3
gramos de sacárido (2-2.5 g de proteína) por litro de DMSO.

Etapas II: Reacción de Conjugación

20

El sacárido activado y la proteína portadora CRM₁₉₇ se
mezclaron durante 60 - 75 minutos a 23° ± 2°C a un rango de
proporción de 0.6 g - 1.0 g de sacárido/g CRM₁₉₇ para los
serotipos 6B y 19F o 1.2 a 1.8 g sacárido/g CRM₁₉₇ para el
25 serotipo 23F.

La reacción de conjugación se inició al agregar la
solución de cianoborohidruro de sodio (100mg/mL) a una

209
76

proporción de 0.8 - 1.2 equivalentes molares de cianoborohidruro de sodio a un mol de sacárido activado. El WFI se agregó a la mezcla de reacción a un objetivo de 1% (v/v) y la mezcla se incubó durante 40 horas a $23^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

5

La solución de borohidruro de sodio, 100 mg/mL (típica 1.8 - 2.2 equivalentes molares de borohidruro de sodio por mol de sacárido activado) y WFI (objetivo 5% v/v) se agregaron a la reacción y la mezcla se incubó durante 3 - 6 horas a $23^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Este procedimiento redujo cualquiera de los aldehídos no reaccionados presentes sobre los sacáridos. Luego la mezcla de reacción se transfirió a un tanque de disolución que contiene 0.9% de cloruro de sodio a $< 15^{\circ}\text{C}$.

15 **Etapla III: Ultrafiltración 100 kDa**

La mezcla de conjugado diluida se filtró a través de un filtro de 1.2 μm y se concentró y diafiltró en una membrana MWCO de 100 kDa con un mínimo de 15 volúmenes de cloruro de sodio 0.9% (fosfato de sodio 0.01M/amortiguador de NaCl 0.05M se utilizó para el serotipo 23F). El permeado se descartó. El retenido se filtró a través de un filtro de 0.45 μm . Una muestra de contenido de sacárido en proceso se tomó en esta etapa.

25

Etapla IV: Purificación de Columna DEAE

Esta etapa se desarrolló solamente para el serotipo 23F.

410
77

La columna DEAE se equilibró con fosfato de sodio 0.01M/amortiguador de cloruro de sodio 0.05M. El retenido filtrado (serotipo 23F) se cargó sobre la columna y se lavó con fosfato de sodio 0.01M/amortiguador de cloruro de sodio 0.05M. La columna fue luego lavada con fosfato de sodio 0.01M/amortiguador de NaCl 0.9%. El producto fue entonces eluido con fosfato de sodio 0.01M/amortiguador de cloruro de sodio 0.5M.

10

Etapas V: Ultrafiltración 100 kDa

El retenido de 6B y 19F se concentró y se diafiltró con por lo menos 30 volúmenes de cloruro de sodio 0.9%. El permeado se descartó.

15

El eluido del serotipo 23F se concentró y se diafiltró con un mínimo de 20 volúmenes de cloruro de sodio 0.9%. El permeado se descartó.

20

Etapas VI: Filtración Estéril

El retenido después de diafiltración MWCO de 100 kDa se filtró a través de un filtro de 0.22 µm. Los controles en proceso (contenido de sacárido, proteína libre, sacárido libre, DMSO residual y cianuro residual) se desarrollaron sobre el producto filtrado. Los controles en proceso sobre el retenido filtrado se desarrollaron para determinar si la

25

ET
78

concentración adicional, diafiltración, y/o dilución eran necesarias para cumplir con los objetivos FBC. Estas y pruebas adicionales se repitieron en muestras FBC.

5 Según fuera necesario, el conjugado filtrado se diluyó con cloruro de sodio 0.9% para lograr una concentración final de menos de 0.55 g/L. Las pruebas de liberación para el contenido de sacárido, contenido de proteína y proporción de sacárido:proteína se desarrollaron en esta etapa.

10

Finalmente, el conjugado se filtró (0.22 µm) y se llenó en tarros de acero inoxidable de 10 L a una cantidad de 2.64 g/tarro. En esta etapa, el rendimiento, contenido de sacárido, contenido de proteína, pH, proporción

15 sacárido:proteína y contenido de lisina se desarrollaron como controles en proceso. La prueba de liberación (apariciencia, proteína libre, sacárido libre, endotoxina, determinación de tamaño molecular, cianuro residual, DMSO residual, identidad de sacárido e identidad CRM₁₉₇) se desarrolló en esta etapa.

20

Ejemplo 15

Formulación de una Vacuna de Conjugado Neumocócica

Multivalente

25 Los concentrados de masa finales de los 13 conjugados contienen 0.85% de cloruro de sodio. Los concentrados en masa del tipo 3, 6A, 7F y 19A también contienen amortiguador de succinato de sodio 5 mM a pH de 5.8. Los volúmenes requeridos

LH
29

de los concentrados en masa se calcularon con base en el volumen de tanda y las concentraciones de sacárido en masa. Después del 80% del cloruro de sodio 0.85% (solución salina fisiológica) y la cantidad requerida de amortiguador de succinato se agregaron al recipiente de formulación pre-
5 marcado, se agregaron concentrados de masa. La preparación fue entonces filtrada estéril a través de una membrana de 0.22 µm en un segundo recipiente al utilizar una unidad de filtro de membrana Millipore Durapore. El primer recipiente
10 se lavó con el restante 20% del cloruro de sodio 0.85% y la solución se pasó a través del mismo filtro y se recolectó en el segundo recipiente. La masa formulada se mezcló suavemente durante y luego de la adición del fosfato de aluminio en masa. El pH se revisó y se ajustó si era necesario. El
15 producto de masa formulado se almacenó a 2-8°C.

El producto de masa formulado se llenó en jeringas de vidrio de borosilicato Tipo 1 obtenidas de Becton Dickinson. La vacuna se monitoreó a intervalos regulares para turbidez
20 para asegurar la uniformidad de la operación de llenado. La vacuna llenada (Producto Final) se almacenó a 2-8°C.

Ejemplo 16

Inmunogenicidad de la Vacuna de Conjugado 13-Valente

25

A la fecha, los estudios preclínicos desarrollados sobre una vacuna 13vPnC han sido en conejos. Los estudios #HT01-0021 y #HT01-0036 se diseñaron para examinar

UB
go

independientemente el efecto de la conjugación química de los polisacáridos capsulares (PS) de *S. pneumoniae* a CRM₁₉₇ y el efecto del adyuvante de fosfato de aluminio (AlPO₄) sobre la respuesta inmune a la vacuna 13vPnC en conejos. Estos efectos se caracterizaron por el ELISA específico de antígeno para las concentraciones IgG de suero y para la función de anticuerpo por ensayo opsonofagocítico (OPA).

Estudio #HT01-0021

10

El estudio #HT01-0021 examinó la capacidad de la vacuna 13vPnC con el adyuvante AlPO₄ para elicitar las respuestas inmunes específicas del serotipo de la vacuna. Los serotipos neumocócicos representados en la vacuna 13vPnC incluyen los tipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F. Los objetivos secundarios incluyeron una evaluación de las cinéticas y la duración de la respuesta del anticuerpo. Conejos Blancos de Nueva Zelanda se inmunizaron intramuscularmente en la semana 0 y en la semana 2 con la dosis clínica humana planeada de cada polisacárido (2 µg de cada PS, excepto 4 µg de 6B) formulada con o sin AlPO₄ (100 µg/dosis). Se recolectó suero en varios puntos de tiempo. El IgG específico de serotipo se midió mediante ELISA y se evaluó la actividad funcional mediante OPA.

25

La Tabla 3 muestra el título medio geométrico (GMT) logrado en muestras de suero agrupadas, luego de dos dosis de la vacuna 13vPnC. Una proporción del IgG GMT se utilizó para

214
81

comparar las respuestas durante la semana 4 a la semana 0. Estos datos demuestran que la inclusión del AlPO_4 en la formulación 13vPnC elicito mayores niveles del anticuerpo IgG en comparación con la misma vacuna sin adyuvante. Aunque las respuestas de anticuerpo fueron mayores cuando AlPO_4 se incluyó en la formulación, estos incrementos no fueron estadísticamente significativos.

Las respuestas de anticuerpo funcional también se evaluaron en conejo luego de la inmunización con las dos formulaciones 13vPnC (Tabla 4). Cuando se compara las formulaciones de vacuna con o sin adyuvante, los GMT de OPA mayores se observaron en el grupo de tratamiento de vacuna 13vPnC + AlPO_4 . Los títulos OPA se detectaron en grupos de suero en la semana 4 a todos los serotipos de vacuna en ambos grupos. Para la mayoría de los serotipos, los títulos de OPA medidos en la semana 4 fueron por lo menos 4 veces mayores que aquellos en la semana cero (línea base).

Las respuestas cinéticas de cada uno de los serotipos de vacuna 13vPnC se evaluaron de los grupos de suero de ambos grupos de tratamiento. Los títulos IgG de cada serotipo se midieron de muestras de sangre en la semana 0 y en las semanas 1, 2, 3, 4, 8, 12, 26, y 39 y luego comparadas. Con la excepción del serotipo 1, las respuestas de anticuerpo en animales que recibieron vacuna adyuvada fueron superiores a aquellas que recibieron vacuna no adyuvada y el pico en la semana 2 del programa de inmunización (datos no mostrados).

415
82

En total, los datos indicaron que la vacuna 13vPnC formulada con fosfato de aluminio es inmunogénica en conejos, elicitando respuestas de anticuerpo sustanciales a los
5 polisacáridos capsulares neumocócicos contenidos en la vacuna y estas respuestas están asociadas con actividad funcional. Las respuestas observadas a los siete serotipos núcleo luego de inmunización con 13vPnC + AlPO_4 son consistentes con las respuestas históricas de los conejos a la formulación
10 heptavalente.

Tabla 3. Respuestas Inmunes IgG en Conejo (GMT) Luego de Inmunización con Dos Dosis de Glicoconjugado Neumocócico 13-Valente

Serotipo	Diluyente con ALPO ₄ ^a			13vPnC ^a			13vPnC + ALPO ₄ ^a		
	Semana 0	Semana 4	Proporción Wk4:Wk0	Semana 0	Semana 4 (95%CI)	Proporción Wk4:Wk0	Semana 0	Semana 4 (95% CI)	Proporción Wk4:Wk0
1	< 100	< 100	1.0	50	5,926 (2,758-12,733)	119	50	11,091 (5,327-23,093)	222
3	< 100	< 100	1.0	50	6,647 (2,773-15,932)	133	58	16,443 (7,096-38,106)	284
4	< 100	< 100	1.0	50	13,554 (8,031-22,875)	271	50	29,183 (15,342-55,508)	584
5	134	< 100	0.4	50	5,859 (2,450-14,009)	117	50	16,714 (6,959-40,140)	334
6A	141	< 100	0.4	74	22,415 (11,987-41,914)	303	83	63,734 (21,141-192,146)	768
6B	< 100	< 100	1.0	57	8,108 (3,564-18,444)	142	54	23,505 (11,286-48,955)	435
7F	3,859	579	0.2	171	43,591 (26,931-70,557)	444	143	84,888 (46,445-155,151)	496
9V	289	995	3.4	205	15,780 (7,193-34,616)	125	208	43,331 ^b (23,256-71,510)	217
14	437	177	0.4	61	6,906 (3,416-13,962)	113	70	16,076 (9,649-26,785)	322
18C	< 100	< 100	1.0	50	21,283 (15,770-28,725)	426	50	35,040 (24,708-49,692)	701
19A	< 100	< 100	1.0	121	113,599 (54,518-236,707)	939	144	280,976 (119,587-660,167)	1,951
19F	< 100	< 100	1.0	50	14,365 (7,346-28,090)	287	50	24,912 (9,243-67,141)	498
23F	< 100	< 100	1.0	50	5,323 (1,894-14,962)	106	50	15,041 (4,711-48,018)	301

a: Los GMT de suero agrupados consistieron de volúmenes iguales de suero de cada conejo individual con un grupo
b: Estadísticamente diferente (p=0.022) del grupo de tratamiento sin ALPO₄

27/07

27
28

Tabla 4. GMT OPA de *S. pneumoniae* para Grupos de Suero de Conejo NZW luego de Inmunización con Dos Dosis de Glicoconjugado Neumocócico 13-Valente

Serotipo	13vPnC ^a			13vPnC + ALPO ₄ ^a		
	Semana 0	Semana 4	Proporción Wk4:Wk0	Semana 0	Semana 4	Proporción Wk4:Wk0
1	<8	64	16	<8	64	16
3	<8	8	2	<8	16	4
4	<8	16	4	<8	32	8
5	<8	128	32	<8	512	128
6A	8	128	16	8	512	64
6B	<8	256	64	8	1,024	128
7F	8	64	8	8	128	16
169V	8	64	8	8	128	16
14	16	32	2	16	32	2
18C	8	256	32	<8	256	64
19A	<8	256	64	<8	1,024	256
19F	<8	128	32	<8	512	128
23F	8	64	8	<8	256	64

a: Los grupos consistieron de volúmenes iguales de suero provenientes de conejos individuales dentro de un grupo de tratamiento (n=12)

Estudio #HT01-0036

El estudio #HT01-0036 comparó las respuestas inmunes de conejo con los polisacáridos (PS) contenidos en la vacuna, después de inmunización con la vacuna 13vPnC con o sin conjugación a la proteína CRM₁₉₇. Los conejos Blancos de Nueva Zelanda se inmunizaron intramuscularmente en la semana 0 y la semana 2 con una dosis de 2.2 µg de cada PS (excepto 4.4 µg de 6B). Los animales recibieron una de tres preparaciones de vacuna: (a) 13vPnC (PS directamente conjugado a CRM₁₉₇), (b) 13vPnC, (PS libre) o (c) 13vPnC + CRM₁₉₇ (PS libre mezclado con CRM₁₉₇). Todas las preparaciones de vacuna contenían AlPO₄ como el adyuvante en 125 µg/dosis.

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

La Tabla 5 presenta los datos GMT obtenidos desde los sangrados en semana 4 analizados en los ELISA de IgG específico de antígeno. Análisis adicionales muestran la proporción de los valores GMT en la semana 4 a la semana 0. Los datos indican que la preparación de vacuna de conjugado elicito mayores títulos IgG de suero que el PS libre o la vacuna PS + CRM₁₉₇ libre. Con la excepción del *S. pneumoniae* tipo 14, la vacuna 13vPnC fue capaz de inducir los anticuerpos funcionales para las cepas representativas de *S. pneumoniae* en un OPA (Tabla 6). Después de dos inmunizaciones con cualquiera de las vacunas 13vPnPS o 13vPnPS + CRM₁₉₇, ninguno podría inducir títulos OPA ≥ 8 veces en la semana 4 con relación a la semana 0 para 10 fuera de los 13 serotipos medidos (Tabla 6).

En conclusión, estos resultados indican que la conjugación de los polisacáridos de vacuna neumocócica 13-valente produce títulos IgG de suero mayor y una actividad de anticuerpo funcional mayor total que la vista con el polisacárido libre solo o mezclado con el CRM₁₉₇ no conjugado.

Tabla 5. Respuestas IgG de Conejo (GMT) al PnPs por ELISA Luego de Inmunización con Dos Dosis de Glicoconjugado Neumocócico 13-Valente

Serotipo	3vPnPS (PS libre)			13vPnPS = CRM ₁₉₇ (PS mezclado con CRM ₁₉₇)			13vPnC		
	Semana 0	Semana 4	Proporción Wk4:Wk0	Semana 0	Semana 4	Proporción Wk4:Wk0	Semana 0	Semana 4	Proporción Wk4:Wk0
		(95%CI)			(95%CI)			(95%CI)	
1	378	2,290 (843-5,790)	5.8	395	1,959 (809-4,739)	5.0	472	35,970 (29,130-44,417)	76.2
3	57	240 (64-908)	4.2	89	163 (74-358)	1.8	50	10,414 (10,414-16,676)	208.3
4	50	379 (150-959)	7.6	50	607 (313-1,178)	12.1	50	12,890 (9,117-18,224)	257.8
5	343	226 (113-450)	4.5	50	321 (147-701)	6.4	50	35,264 (24,467-50,824)	705.3
6A	154	466 (316-688)	3.0	98	210 (95-464)	2.1	163	234,245 (167,152-328,283)	1,437.1
6B	63	727 (384-1,375)	11.6	62	745 (384-1,440)	12.0	131	33,599 (22,934-49,222)	256.5
7F	50	61 (39-95)	1.2	50	72 (47-111)	1.4	50	35,702 (24,350-52,347)	714.0
9V	50	104 (48-195)	2.1	55	169 (74-390)	3.0	50	50,033 ^b (34,765-72,007)	1,000.7
14	66	298 (117-757)	4.5	50	195 (71-535)	3.9	50	20,121 (12,087-32,138)	402.4
18C	89	1,555 (655-3,688)	17.5	66	761 (300-1,935)	11.5	101	71,451 (32,745-124,641)	707.4
19A	50	89 (44-179)	1.8	50	80 (39-163)	1.6	50	23,485 (12,857-42,723)	469.7
19F	61	1,362 (559-3,317)	22.3	61	991 (370-2,654)	16.3	67	19,358 (12,553-33,173)	288.9
23F	73	1,085 (487-2,420)	14.9	121	638 (311-1,311)	5.3	68	45,972 (25,134-84,089)	676.1

82 48

220
27

Tabla 6. OPA de *S. pneumoniae* para Grupos de Suero de Conejo
luego de Inmunización con Dos Dosis de Vacunas Neumocócicas
13-Valentes

Serotipo	Títulos OPA						
	Sin tratamiento	13vPnPS (PS libre)		13vPnPS + CRM ₁₉₇ (PS libre mezclado con CRM ₁₉₇)		13vPnC	
	Semana 0 ^a	Semana 4	Proporción Wk4:Wk0	Semana 4	Proporción Wk4:Wk0	Semana 4	Proporción Wk4:Wk0
1	4	16	4	16	4	8	32
3	4	4	1	4	1	4	8
4	4	4	1	4	1	4	64
5	4	32	8	16	4	16	64
6A	8	64	8	32	4	32	664
6B	8	64	8	32	4	32	32
7F	16	32	2	16	1	16	16
9V	16	16	1	32	2	32	8
14	16	16	1	16	1	16	2
18C	4	16	4	16	4	8	64
19A	8	8	1	8	1	16	64
19F	4	4	1	4	1	8	64
23F	16	32	2	16	1	32	32

a: Utilizado como valores de semana 0 para todos los grupos

Se debe entender que la discusión anterior y los ejemplos simplemente presentan una descripción detallada de ciertas modalidades. Por lo tanto debe ser evidente para aquellos expertos en la técnica que varias modificaciones equivalentes se pueden hacer sin apartarse del espíritu y alcance de la invención.

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

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

HLL
89

9. Joloba ML, Windau A, Bajaksouzian S, Appelbaum PC, Hausdorff WP, Jacobs MR. Pneumococcal conjugate vaccine serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates and the antimicrobial susceptibility of such isolates in children with otitis media. *Clin Infect Dis* 2001; 33:1489-94.
10. Black S, Shinefield H, Fireman B, et al. Efficacy, safety, and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. *Pediatr Infect Dis J* 2000; 19:187-95.
11. Rudolph KM, Parkinson AJ, Reasonover AL, Bulkow LR, Parks DJ, Butler JC. Serotype distribution and antimicrobial resistance patterns of invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae*: Alaska, 1991-1998. *J Infect Dis* 2000; 182:490-6.
12. Sniadack DH, Schwartz B, Lipman H, et al. Potential interventions for the prevention of childhood pneumonia: geographic and temporal differences in serotype and serogroup distribution of sterile site pneumococcal isolates from children: implications for vaccine strategies. *Pediatr Infect Dis J* 1995; 14:503-10.
13. Fagan RL, Hanna JN, Messer RD, Brookes DL, Murphy DM. The epidemiology of invasive pneumococcal disease in children in Far North Queensland. *J Paediatr Child Health* 2001; 37:571-5.
14. Kertesz DA, Di Fabio JL, de Cunto Brandileone MC, et al. Invasive *Streptococcus pneumoniae* infection in Latin American children: results of the Pan American Health Organization Surveillance Study. *Clin Infect Dis* 1998; 26:1355-61.
15. Hausdorff W, Siber G, Paradiso P. Geographical differences in invasive pneumococcal disease rates and serotype frequency in young children. *Lancet* 2001; 357:950-52.
16. Buckingham SC, King MD, Miller ML. Incidence and etiologies of complicated parapneumonic effusions in children, 1996 to 2001. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22:499-504.

223
90

17. Byington C, Spencer L, Johnson T, et al. An epidemiological investigation of a sustained high rate of pediatric parapneumonic empyema: risk factors and microbiological associations. *Clin Infect Dis* 2002; 34:434-40.
18. Tan T, Mason E, Wald E, et al. Clinical characteristics with complicated pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Pediatrics* 2002; 110:1-6.
19. Block SL, Hedrick J, Harrison CJ, et al. Pneumococcal serotypes from acute otitis media in rural Kentucky. *Pediatr Infect Dis J* 2002; 21:859-65.
20. Hausdorff WP, Yothers G, Dagan R, et al. Multinational study of pneumococcal serotypes causing acute otitis media in children. *Pediatr Infect Dis J* 2002; 21:1008-16.
21. Robbins JB, Austrian R, Lee CJ, et al. Considerations for formulating the second-generation pneumococcal capsular polysaccharide vaccine with emphasis on the cross-reactive types within groups. *J Infect Dis* 1983; 148:1136-59.
22. Nahm MH, Olander JV, Magyarlaki M. Identification of cross-reactive antibodies with low opsonophagocytic activity for *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 1997; 176:698-703.
23. Yu X, Gray B, Chang S, Ward JI, Edwards KM, Nahm MH. Immunity to cross-reactive serotypes induced by pneumococcal conjugate vaccines in infants. *J Infect Dis* 1999; 180:1569-76.
24. Vakevainen M, Eklund C, Eskola J, Kayhty H. Cross-reactivity of antibodies to type 6B and 6A polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae*, evoked by pneumococcal conjugate vaccines, in infants. *J Infect Dis* 2001; 184:789-93.
25. Ekstrom N, Kilpi T, Lahdenkari M, Lehtonen H, Ahman H, Kayhty H. Immune response to cross-reacting pneumococcal serotypes 6A/6B and 19A/19F in the FinOM vaccine trial, Third World of Congress of Pediatric Infectious Diseases, Santiago, Chile, November 19-23, 2003.

26. Penn RL, Lewin EB, Douglas RG, Jr., Schiffman G, Lee CJ, Robbins JB. Antibody responses in adult volunteers to pneumococcal polysaccharide types 19F and 19A administered singly and in combination. *Infect Immun* 1982; 36:1261-2.
27. Giebink GS, Meier JD, Quartey MK, Liebler CL, Le CT. Immunogenicity and efficacy of *Streptococcus pneumoniae* polysaccharide-protein conjugate vaccines against homologous and heterologous serotypes in the chinchilla otitis media model. *J Infect Dis* 1996; 173:119-27.
28. Saeland E, Jakobsen H, Ingolfssdottir G, Sigurdardottir ST, Jonsdottir I. Serum samples from infants vaccinated with a pneumococcal conjugate vaccine, PncT, protect mice against invasive infection caused by *Streptococcus pneumoniae* serotypes 6A and 6B. *J Infect Dis* 2001; 183:253-60.
29. Jakobsen H, Sigurdsson VD, Sigurdardottir S, Schulz D, Jonsdottir I. Pneumococcal serotype 19F conjugate vaccine induces cross-protective immunity in serotype 19A in a murine pneumococcal pneumonia model. *Infect Immun* 2003; 71:2956-9.
30. Klugman KP, Madhi SA, Huebner RE, Kohberger R, Mbelle N, Pierce N. A trial of a 9-valent pneumococcal conjugate vaccine in children with and those without HIV infection. *N Engl J Med* 2003; 349:1341-8.
31. O'Brien KL, Moulton LH, Reid R, et al. Efficacy and safety of seven-valent conjugate pneumococcal vaccine in American Indian children: group randomised trial. *Lancet* 2003; 362:355-61.
32. Eskola J, Kilpi T, Palmu A, et al. Efficacy of a pneumococcal conjugate vaccine against acute otitis media. *N Engl J Med* 2001; 344:403-9.
33. Pilishvili T, Farley M, Vazquez M, Reingold A, Nyquist A, et al. Effectiveness of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. Abst G-1079, ICAAC, Chicago, IL, 2003.
34. U.S. Patent No. 4,673,574.
35. U.S. Patent No. 4,902,506.

225
92

REIVINDICACIONES

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica multivalente que comprende 13 diferentes de conjugados de polisacárido-proteína junto con un vehículo fisiológicamente aceptable, en donde cada uno de los conjugados comprende un polisacárido capsular de un serotipo diferente de *Streptococcus pneumoniae* conjugado a una proteína portadora y los polisacáridos capsulares se preparan de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F, en donde la proteína portadora es CRM₁₉₇ ly donde la conjugación se afecta por aminación reductiva ^{logica}
2. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, comprende, además un adyuvante.
3. La composición inmunogénica de la reivindicación 2, en donde el adyuvante es fosfato de aluminio.
4. La composición inmunogénica multivalente que comprende 13 diferentes conjugados de polisacárido-proteína, junto con un vehículo fisiológicamente aceptable, en donde cada uno de los conjugados comprende un polisacárido capsular de un serotipo diferente de *Streptococcus pneumoniae* conjugado a una proteína portadora y los polisacáridos capsulares se preparan de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F, en donde la proteína portadora es CRM₁₉₇ y en donde cada dosis de 0,5 mL se formula para contener: 2,2 µg de cada sacárido, excepto para 6B a 4,4 µg; aproximadamente 29 µg de la proteína portadora CRM₁₉₇; 0,125 mg de adyuvante de aluminio elemental (0,5 mg de fosfato de aluminio), y cloruro de sodio y amortiguador de succinato de sodio como excipientes.
5. Una jeringa de dosis única llenada con una formulación líquida esteril de polisacáridos capsulares neumocócicos de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F, individualmente conjugada a CRM₁₉₇, en donde cada dosis de 0,5 mL se formula para contener: 2,2 µg de cada sacárido, excepto para 6B a 4,4 µg; aproximadamente 29 µg de la proteína portadora CRM₁₉₇; 0,125 mg de adyuvante de aluminio elemental (0,5 mg de fosfato de aluminio), y cloruro de sodio y amortiguador de succinato de sodio como excipientes.

6. Una jeringa de dosis única llenada con una formulación líquida esteril de polisacáridos capsulares neumocócicos de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F, individualmente conjugada a CRM₁₉₇, en donde cada dosis de 0,5 mL se formula para contener: 2 µg de cada sacárido, excepto para 6B a 4 µg; aproximadamente 29 µg de la proteína portadora CRM₁₉₇; 0,125 mg de adyuvante de aluminio elemental (0,5 mg de fosfato de aluminio), y cloruro de sodio y amortiguador de succinato de sodio como excipientes.

7. La jeringa de dosis única de la reivindicación 5 u 6 para administración intramuscular.

8. Un proceso para preparar una composición inmunogénica que comprende 13 diferentes conjugados de polisacárido-proteína junto con un vehículo fisiológicamente aceptable, en donde cada uno de los conjugados contiene un polisacárido capsular diferente conjugado a la proteína portadora CRM₁₉₇, en donde:

los polisacáridos capsulares se preparan de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F de *Streptococcus pneumoniae*;

los polisacáridos individuales se purifican a través de centrifugación, precipitación, ultrafiltración y cromatografía de columna;

los polisacáridos purificados se activan químicamente para hacer los sacáridos capaces de reaccionar con la proteína portadora CRM₁₉₇;

una vez activado, cada polisacárido capsular se conjuga separadamente a la proteína portadora CRM₁₉₇ para formar un glicoconjugado;

los glicoconjugados individuales se purifican y son compuestos para formular la composición inmunogénica.

9. El proceso de la reivindicación 8 en donde la conjugación se afecta por aminación reductiva.

227.
94

10. Un proceso para preparar una composición inmunogénica multivalente que comprende 13 diferentes conjugados de polisacárido-proteína junto con un vehículo fisiológicamente aceptable, en donde cada uno de los conjugados comprende un polisacárido capsular de un serotipo diferente de *Streptococcus pneumoniae* conjugado a una proteína portadora y los polisacáridos capsulares se preparan de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F, en donde la proteína portadora es CRM₁₉₇, en donde después de que son purificados los glicoconjugados individuales ellos son compuestos para formular la composición inmunogénica. ?