

Industria y Comercio

Organización CSA Ltda

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

DVN
NOV

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

07-117685

54. TÍTULO "COMPOSICIÓN CONJUGADA DE POLISACÁRIDO -
PROTEÍNA NEUMOCÓICA MULTIVALENTE"

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE WYETH

DOMICILIO NUEVA JERSEY, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA.

74. APODERADO ALVARO CORREA - ORDÓÑEZ
T.P. 20281

22. BOGOTÁ, D. C., NOVIEMBRE 7, 2007

(FORMA P-10)

PETITORIO

00001

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

FORMULARIO ÚNICO DE S PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-117685- -00000-0000

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

8 Nov. 2007

① SOLICITUD DE :

☒ Patente de Invención	☐ Patente de Modelo de Utilidad
☒ Capítulo I.	☐ Capítulo II.

② SOLICITANTE (71)

Nombre: WYETH	IDENTIFICACION
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:	
C.C. ☐ NIT ☐	
C.E. ☐ Otro ☐	
Cual	
Número	

③ REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: ALVARO CORREA ORDOÑEZ	IDENTIFICACION
Dirección: Avenida 82 No.10-62 Piso 6	
Teléfono: 634 1500 Fax: 376 2211	
E-Mail: office.bogota@bakernet.com	
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

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US	08-ABR-05	60/669,605
SI ☒ NO ☐		

⑨ Comprobante de pago No. 07-76786 Fecha 21-SEP-07

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

10

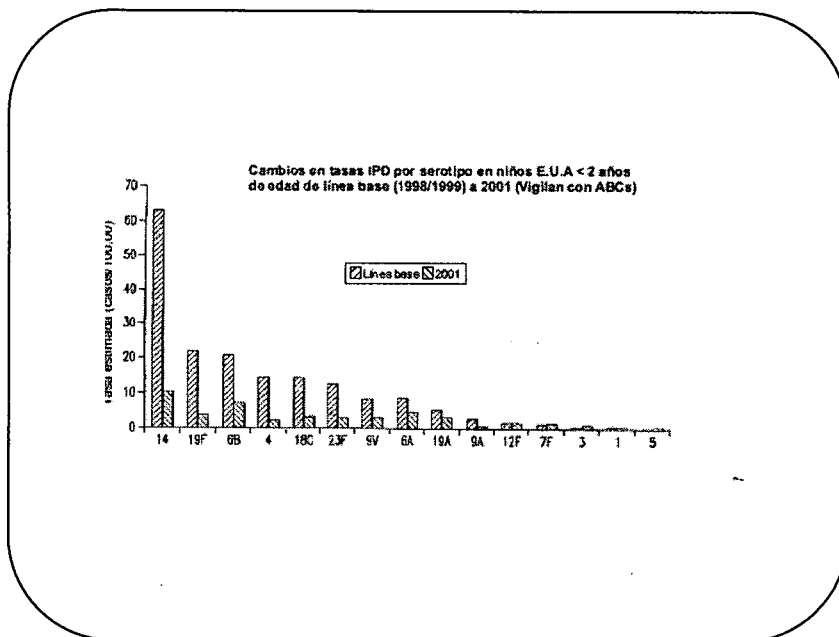
ANEXOS

00092

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes, si fuere el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 x 12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Extractos, Reporte de Búsqueda Internacional y Opinión escrita y Notificación de presentación de documento de prioridad.

11

FIGURA CARACTERISTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALVARO CORREA ORDÓÑEZ

FIRMA:

C/G. 7911431366 de Usaquén

R.P. 20/281

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página

00000019

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-117685-00000-0000

Fecha: 2007-11-07 16:22:27

Dep. 2020 NUECREACIONE

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 196

003

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 76,786
FECHA : SEPTIEMBRE 21 DE 2007

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
RAISBECK LARA RODRIGUEZ	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	69421918	21/09/2007	46,018,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	482,000.00
TOTAL :			\$ 482,000.00

CON: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

00004

TRADUCCIÓN OFICIAL N° 1110075 al español de un documento escrito en inglés, efectuada por Jaime Armando Garavito Burgos, c.c. N° 19.130.702 de Bogotá, Traductor e Intérprete Oficial inglés-español-inglés según Resolución N° 034 de enero 11 de 1983 expedida por el Ministerio de Justicia de la República de Colombia

Traducción del inglés al español de Cesión de Invención a WYETH

COMPOSICIONES DE CONJUGADO DE POLISACÁRIDO-PROTEÍNA
NEUMOCÓCCICAS MULTIVALENTES

APOSTILLA

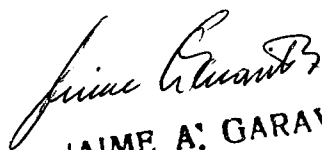
1. PAÍS: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. ESTE DOCUMENTO PÚBLICO HA SIDO FIRMADO POR:
BARBARA A. KIELY
3. QUIEN ACTÚA EN CALIDAD DE:
NOTARIO PÚBLICO DE NUEVA JERSEY
4. LLEVA EL SELLO DE:
BARBARA A. KIELY, NOTARIO

CERTIFICADO

5. EN TRENTON, NUEVA JERSEY
6. EL 04 DE SEPTIEMBRE DE 2007
7. POR: Bradley Abelow, TESORERO DE NUEVA JERSEY
8. N° A301929
9. SELLO (APARECE ADHERIDO SELLO DORADO)
10. FIRMA (FIRMADO) BRADLEY ABELOW

AM101883

DECLARACIÓN JURAMENTADA


JAIME A. GARAVITO B.
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
Res 034 de Enero 11 de 1983
MINISTERIO DE JUSTICIA

00005

JAIME A. GARAVITO B.

TRADUCCIÓN OFICIAL N° 1110075 al español de un documento escrito en inglés, efectuada por Jaime Armando Garavito Burgos, c.c. N° 19.130.702 de Bogotá, Traductor e Intérprete Oficial inglés-español-inglés según Resolución N° 034 de enero 11 de 1983 expedida por el Ministerio de Justicia de la República de Colombia

[Firmado] Barbara A. Kiely, Notario Público

[Sello en tinta que dice: "Barbara A. Kiely ID. 33893, Notario Público de Nueva Jersey. Mi comisión vence el 20 de junio de 2009"]

(Sello notarial realzado)

(Aparece en el encabezado de las páginas referentes a las cesiones: "Archivo No. AM101883 Patente")

(Aparece en el pie de página de las páginas referentes a las cesiones: "Cesión de Invención; Solicitud Provisional")

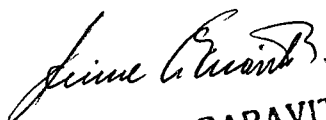
Cesión de Invención

En consideración del pago por la CESIONARIA a la CEDENTE de una contraprestación válida y suficiente cuyo recibo se acusa por medio del presente, los CEDENTES:

- (1) Nombre Completo del Inventor: William P. Hausdorff
Residencia: Avenue de la Chapelle, 19
1200 Woluwe Saint-Lambert, Bélgica
Ciudadanía: Estados Unidos de América
- (2) Nombre Completo del Inventor: George Rainer Siber
Residencia: 160 West 66th Street, New York, N.Y. 10023
Ciudadanía: Estados Unidos de América
- (3) Nombre Completo del Inventor: Peter R. Paradiso
Residencia: 445 Freedom View Lane, Valley Forge, PA 19481
Ciudadanía: Estados Unidos de América

por medio del presente vende, cede y transfiere a la CESIONARIA:

Wyeth
Five Giralda Farms
Madison, New Jersey 07940


JAIME A. GARAVITO B.
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
Res 034 de Enero 11 de 1983
MINISTERIO DE JUSTICIA 3

TRADUCCIÓN OFICIAL N° 1110075 al español de un documento escrito en inglés, efectuada por Jaime Armando Garavito Burgos, c.c. N° 19.130.702 de Bogotá, Traductor e Intérprete Oficial inglés-español-inglés según Resolución N° 034 de enero 11 de 1983 expedida por el Ministerio de Justicia de la República de Colombia

y los sucesores, CESIONARIOS y representantes legales de la CESIONARIA, la totalidad del derecho, título e intereses para los Estados Unidos y sus posesiones territoriales y en todos los países extranjeros, incluyendo todos los derechos a reivindicar prioridad con respecto a la invención titulada:

**COMPOSICIONES DE CONJUGADO DE POLISACÁRIDO-PROTEÍNA
NEUMOCÓCCICAS MULTIVALENTES**

e inventada por los CEDENTES y los siguientes inventores adicionales, si los hubiere:

y que se encuentra en la Solicitud Provisional de los EE.UU. No. 60/669.605 presentada el 08 de abril de 2005

[] Yo/nosotros los CEDENTES abajo firmantes por medio del presente autorizamos y solicitamos insertar arriba del número de solicitud y de la fecha de presentación, cuando se conozcan,

[También verifique si se están cediendo solicitud(es) extranjera(s)]

[x] y cualquier equivalente legal de las mismas en un país extranjero.

incluyendo el derecho a invocar prioridad, incluyendo todas y cada una de las mejoras divulgadas en la misma y en todas las patentes obtenidas para dicha invención a través de la anterior solicitud y cualquier solicitud provisional, no provisional, continuación, divisional, renovación o sustitución de la misma presentada posteriormente y en cuanto a la patente, cualquier re-expedición o nuevo examen de la misma.


JAIME A. GARAVITO B.
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
Res 034 de Enero 11 de 1983
MINISTERIO DE JUSTICIA

TRADUCCIÓN OFICIAL N° 1110075 al español de un documento escrito en inglés, efectuada por Jaime Armando Garavito Burgos, c.c. N° 19.130.702 de Bogotá, Traductor e Intérprete Oficial inglés-español-inglés según Resolución N° 034 de enero 11 de 1983 expedida por el Ministerio de Justicia de la República de Colombia

Los CEDENTES por medio del presente acuerdan que no se ha hecho ni se hará o suscribirá ninguna cesión, venta, acuerdo o gravamen que pueda estar en conflicto con esta cesión.

Los CEDENTES autorizan a la CESIONARIA para que haga solicitudes y para que reciban patentes para dicha invención en cualquiera de los mencionados países en su propio nombre, o en el nombre de la CEDENTE o a su elección.

Los CEDENTES acuerdan suscribir u obtener cualquier seguridad adicional necesaria del título a dicha invención y cualquier patente que pueda ser expedida para la misma y a entregar en cualquier momento y a solicitud y expensas de la CESIONARIA cualquier testimonio en cualquier derecho preexistente que impida el patentamiento de la invención, litigio o procedimiento relacionado y a suscribir todos los documentos que puedan ser necesarios o convenientes para perfeccionar el título a dicho invento o cualquier patente que pueda ser otorgada para el mismo a la CESIONARIA, sus sucesores, CESIONARIOS u otros representantes legales y a suscribir, en cualquier momento, a solicitud y expensas de la CESIONARIA, cualquier continuación, continuación parcial, divisional, renovación o sustitución de la misma y en cuanto a patentes a re-expedir o re-examinar las mismas, o cualesquier otras solicitudes adicionales de patentes para dicho invento o cualquier parte del mismo, todas las cuales y cualquier patente que se expida se ceden por medio del presente a la CESIONARIA y prestará todos los juramentos legales o declaraciones y hará todos los actos legales requeridos para adquirirlos, sin compensación adicional,


JAIME A. GARAVITO B.
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
Res 034 de Enero 11 de 1983
MINISTERIO DE JUSTICIA

TRADUCCIÓN OFICIAL N° 1110075 al español de un documento escrito en inglés, efectuada por Jaime Armando Garavito Burgos, c.c. N° 19.130.702 de Bogotá, Traductor e Intérprete Oficial inglés-español-inglés según Resolución N° 034 de enero 11 de 1983 expedida por el Ministerio de Justicia de la República de Colombia

pero a expensas de la CESIONARIA, sus sucesores, cesionarios u otros representantes legales.

Los CEDENTES autorizan y solicitan al Comisionado de Patentes expedir todas y cada una de las patentes de los Estados Unidos para dicho invento, que resulte de cualquiera de las solicitudes a su CESIONARIA.

(Firmado)
William P. Hausdorff

Abril 07, 2006
Fecha

RECONOCIMIENTO

Condado de Nueva York)
Ciudad de Nueva York) Declaración juramentada

El día 07 de noviembre de 2006, William P. Hausdorff, compareció personalmente ante mí, a quien conozco como la persona describa en el anterior instrumento y quien suscribió el mismo y reconoció haberlo suscrito en forma libre y espontánea para los fines consignados en él.

[Firmado] Carl Pascocello, Notario Público

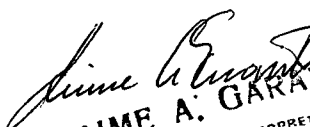
[Aparece sello que dice: "Sello oficial. Carl Pascocello. Notario Público. Estado de Nueva York. Calificado en el Condado de Nueva York. Registro No. 01PA6122635. Mi comisión vence el 22 de febrero de 2009"]

(Firmado)
George Rainer Siber

Febrero 13, 2006
Fecha

RECONOCIMIENTO

Estado de Nueva York)


JAIME A. GARAVITO B.
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
Res 034 de Enero 11 de 1983
MINISTERIO DE JUSTICIA
6

TRADUCCIÓN OFICIAL N° 1110075 al español de un documento escrito en inglés, efectuada por Jaime Armando Garavito Burgos, c.c. N° 19.130.702 de Bogotá, Traductor e Intérprete Oficial inglés-español-inglés según Resolución N° 034 de enero 11 de 1983 expedida por el Ministerio de Justicia de la República de Colombia

Declaración juramentada

Condado de Rockland)

El día 13 de enero de 2006, George Rainer Siber, compareció personalmente ante mí, a quien conozco como la persona describa en el anterior instrumento y quien suscribió el mismo y reconoció haberlo suscrito en forma libre y espontánea para los fines consignados en él.

[Firmado] Rosalba Portanova, Notario Público

[Sello en tinta que dice: "Rosalba Portanova, Notario Público, Estado de Nueva York. No. 01-PO6053534. Calificado en el Condado de Rockland. Mi comisión vence el 16 de enero de 2007"]

(Firmado)
Peter R. Paradiso

Febrero 15, 2006
Fecha

RECONOCIMIENTO

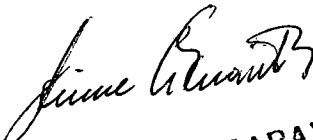
Estado de Pensilvania)

Declaración juramentada

Condado de Montgomery)

El día 15 de febrero de 2006, Peter R. Paradiso, compareció personalmente ante mí, a quien conozco como la persona describa en el anterior instrumento y quien suscribió el mismo y reconoció haberlo suscrito en forma libre y espontánea para los fines consignados en él.

[Firmado] Patricia A. Schaffer, Notario Público


JAIME A. GARAVITO B.
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
Res 034 de Enero 11 de 1983
MINISTERIO DE JUSTICIA

TRADUCCIÓN OFICIAL N° 1110075 al español de un documento escrito en inglés, efectuada por Jaime Armando Garavito Burgos, c.c. N° 19.130.702 de Bogotá, Traductor e Intérprete Oficial inglés-español-inglés según Resolución N° 034 de enero 11 de 1983 expedida por el Ministerio de Justicia de la República de Colombia

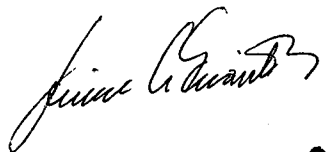
[Sello en tinta que dice: "Sello notarial. Patricia A. Schaffer, Notario Público. Upper Providence Twp., Condado de Montgomery. Mi comisión vence el 11 de abril de 2008"]

La anterior es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.



Jaime Armando Garavito Burgos
c.c. N° 19.130.702 de Bogotá
Traductor e Intérprete Oficial según Resolución N° 034 de enero 11 de 1983 expedida por el Ministerio de Justicia

BOGDM5 # 92102



JAIME A. GARAVITO B.
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
Res 034 de Enero 11 de 1983
MINISTERIO DE JUSTICIA

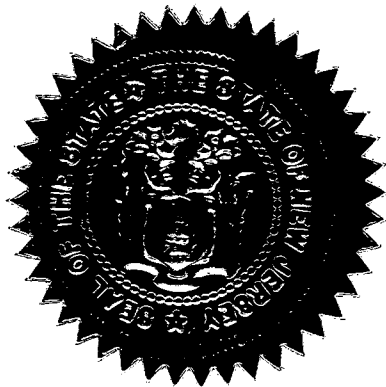
APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

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

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 4TH DAY OF SEPTEMBER 2007
7. BY: Bradley Abelow, NEW JERSEY TREASURER
8. NO. A301929
9. SEAL/STAMP:
10. SIGNATURE



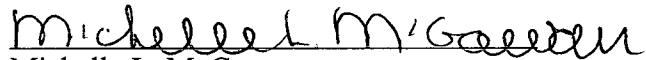
Bradley Abelow

AFFIDAVIT

I, Michelle L. McGowan, Legalization Associate, Wyeth, do hereby certify that the attached copy has been compared with the original Assignment (for U.S.S.N. 60/669,605, and any legal equivalent thereof in a foreign country, for the invention entitled: "MULTIVALENT PNEUMOCOCCAL POLYCACCHARIDE-PROTEIN CONJUGATE COMPOSITIONS") dated February 13, 2006 from George Rainer Siber; and dated February 15, 2006 from Peter R. Paradiso; and dated April 7, 2006 from William P. Hausdorff to Wyeth and that the said copy is a true copy of the original.

Dated this 30th day of August, 2006, at Madison, New Jersey, United States of America.

Wyeth

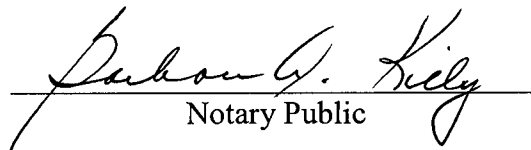

Michelle L. McGowan
Legalization Associate

TO BE USED IN COLOMBIA

ACKNOWLEDGMENT

State of New Jersey)
)
County of Morris)

On this 30th day of August, 2007, before me personally appeared Michelle L. McGowan, Legalization Associate of Wyeth, to me known and known to me to be the individual described in and who executed the foregoing instrument, and she acknowledged to me that she executed the same.


Notary Public

Barbara A. Kiely ID. 33893
Notary Public of New Jersey
My Commission Expires June 20, 2009

00014

Assignment of Invention

In consideration of the payment by ASSIGNEE to ASSIGNOR of good and valuable consideration, the receipt of which is hereby acknowledged,
ASSIGNOR:

- (1) Full Name of Inventor: William P. Hausdorff
Residence: Avenue de la Chapelle, 19
1200 Woluwe Saint-Lambert, Belgium
Citizenship: United States of America

- (2) Full Name of Inventor: George Rainer Siber
Residence: 160 West 66th Street, New York, NY 10023
Citizenship: United States of America

- (3) Full Name of Inventor: Peter R. Paradiso
Residence: 445 Freedom View Lane, Valley Forge, PA 19481
Citizenship: United States of America

hereby sells, assigns and transfers to ASSIGNEE:

Wyeth
Five Giralda Farms
Madison, New Jersey 07940

and the successors, assigns and legal representatives of the ASSIGNEE the entire right, title and interest for the United States and its territorial possessions and in all foreign countries, including all rights to claim priority, in and to the invention entitled:

MULTIVALENT PNEUMOCOCCAL POLYSACCHARIDE-PROTEIN CONJUGATE COMPOSITION

and invented by ASSIGNOR and the following additional inventors, if any:

and which is found in U.S. Provisional Application No. 60/669,605 filed on: April 8, 2005

☐ I/we the ASSIGNOR signing below, hereby authorize and request insertion above of the application number and filing date, when they become known,

[also check if foreign application(s) is(are) also being assigned]

☒ and any legal equivalent thereof in a foreign country,

including the right to claim priority, including any and all improvements disclosed therein, and in and to all Letters Patent to be obtained for said invention by the above application or any subsequently filed provisional, nonprovisional, continuation, divisional, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patent any reissue or re-examination thereof.

ASSIGNOR hereby covenants that no assignment, sale, agreement or encumbrance has been or will be made or entered into which would conflict with this assignment.

ASSIGNOR authorizes ASSIGNEE to make applications for and to receive Letters patent for said invention in any of said countries in its own name, or in ASSIGNOR's name, at its election.

ASSIGNOR covenants and agrees to execute or procure any further necessary assurance of the title to said invention and any Letters Patent which may issue therefore and to, at any time, upon the request and at the expense of ASSIGNEE deliver any testimony in any interference, litigation or proceeding related thereto and execute all papers that may be necessary or desirable to perfect the title to said invention or any Letters Patent which may be granted therefore in ASSIGNEE, its successors, assigns or other legal representatives, and that to, at any time, upon the request and at the expense of ASSIGNEE execute any continuation, continuation-in-part, divisional, renewal or substitute thereof, and as to Letters Patent and reissue or re-examination thereof, or any other additional applications of Letters Patent for said invention or any part thereof, all of which applications and any Letters Patent issuing thereon are hereby assigned to ASSIGNEE, and will make all rightful oaths or declarations, and do all lawful acts requisite for procuring the same therein, without further compensation, but at the expense of ASSIGNEE, its successors, assigns or other legal representatives.

ASSIGNOR authorizes and requests the Commissioner of Patents to issue any and all Letters Patent of the United States for said invention, resulting from any of the aforesaid applications to its ASSIGNEE.

00016



William P. Hausdorff

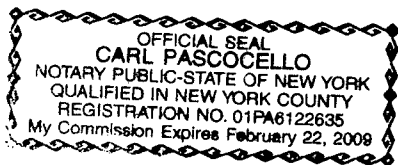
4/7/06

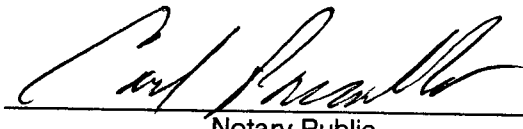
Date

ACKNOWLEDGMENT

Country of New York }
City of New York } ss:

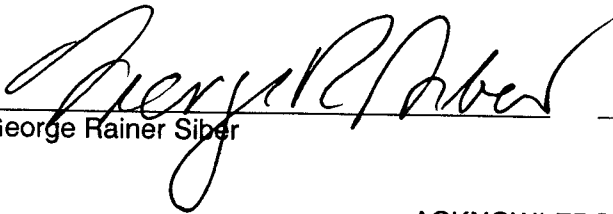
On the 07 day of Apr 2006, William P. Hausdorff personally appeared before me, known by me to be the same person described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged that he/she executed the same, of his/her own free will and for the purposes set forth.





Notary Public

00017


George Rainer Siber

Date

Feb 13, 2006

ACKNOWLEDGMENTState of New York }County of Rockland } ss:

On the 13th day of JANUARY 2006, George Rainer Siber personally appeared before me, known by me to be the same person described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged that he/she executed the same, of his/her own free will and for the purposes set forth.


Notary Public

ROSALBA PORTANOVA
NOTARY PUBLIC - STATE OF NEW YORK
NO. 01-PO6053534
QUALIFIED IN ROCKLAND COUNTY
MY COMMISSION EXPIRES 01-16-2007

Peter R. Paradiso

Peter R. Paradiso

2/15/06

Date

000018

ACKNOWLEDGMENT

State of Pennsylvania }

ss:

County of Montgomery }

On the *15th* day of *February* 2006, Peter R. Paradiso personally appeared before me, known by me to be the same person described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged that he/she executed the same, of his/her own free will and for the purposes set forth.

COMMONWEALTH OF PENNSYLVANIA

NOTARIAL SEAL

PATRICIA A. SCHAFFER, Notary Public
Upper Providence Twp., Montgomery County
My Commission Expires April 11, 2008

Patricia A. Schaffer

Notary Public

PATENT COOPERATION TREATY

WO 2006/110381
PCT/US2006/012354

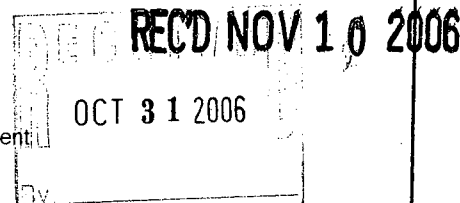
From the INTERNATIONAL BUREAU

CC: PEARL RIVER

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
AVAILABILITY OF THE PUBLICATION
OF THE INTERNATIONAL APPLICATION

To:

ROZEK, Carol, E.
Wyeth
Patent Law Department
Five Giralda Farms
Madison, NJ 07940
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 19 October 2006 (19.10.2006)		
Applicant's or agent's file reference AM101883		
IMPORTANT NOTICE		
International application No. PCT/US2006/012354	International filing date (day/month/year) 31 March 2006 (31.03.2006)	Priority date (day/month/year) 08 April 2005 (08.04.2005)
Applicant WYETH et al		

The applicant is hereby **notified** that the International Bureau:

- ☒ has **published** the above-indicated international application on 19 October 2006 (19.10.2006) under No. WO 2006/110381
- ☐ has **republished** the above-indicated international application on under No. WO
For an explanation as to the reason for this republication of the international application, reference is made to INID codes (15), (48) or (88) (as the case may be) on the front page of the published international application.

A copy of the international application is available for viewing and downloading on WIPO's website at the following address:
<http://www.wipo.int/pctdb> (under "Query" enter the PCT or WO number).The applicant may also request a paper copy of the published international application from the International Bureau in writing from pct.eproducts@wipo.int or the contact details provided below.RECEIVED
NOV 10 2006CAROL E. ROZEK
PATENT LAW DEPARTMENT
PEARL RIVER, NEW YORK

CC: PEARL RIVER

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Masashi Honda
Facsimile No. +41 22 338 82 70	e-mail: pt08@wipo.int

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
19 October 2006 (19.10.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/110381 A1

(51) International Patent Classification:

A61K 39/395 (2006.01) A61K 39/295 (2006.01)
A61K 39/09 (2006.01) A61K 39/02 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2006/012354

(22) International Filing Date: 31 March 2006 (31.03.2006)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

60/669,605 8 April 2005 (08.04.2005) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **WYETH**
[US/US]; Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **HAUSDORFF, William, P.** [US/BE]; Avenue De La Chapelle, 19, B-1200 Woluwe Saint-Jambert (BE). **SIBER, George, Rainer** [US/US]; 160 West 66th Street, New York, NY 10023 (US). **PARADISO, Peter, R.** [US/US]; 445 Freedom View Lane, Valley Forge, PA 19481 (US).

(74) Agent: **ROZEK, Carol, E.**; Wyeth, Patent Law Department, Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

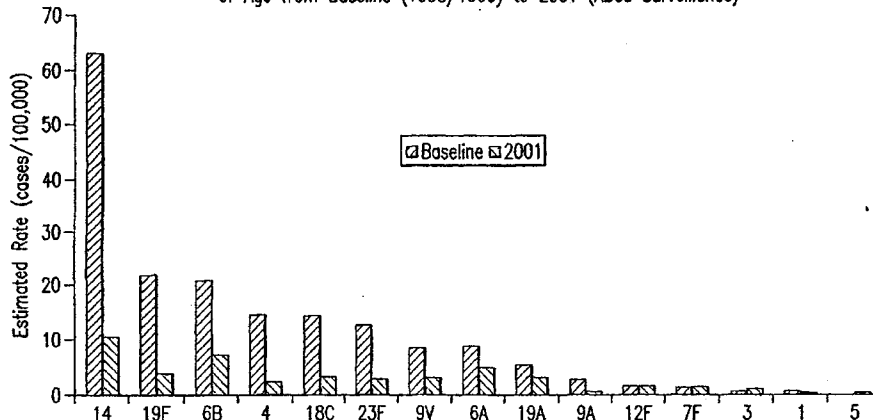
Published:

— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: MULTIVALENT PNEUMOCOCCAL POLYSACCHARIDE-PROTEIN CONJUGATE COMPOSITION

Changes in IPD Rates by Serotype in US Children <2 years of Age from Baseline (1998/1999) to 2001 (ABCs Surveillance)



(57) Abstract: An immunogenic composition having 13 distinct polysaccharide-protein conjugates and optionally, an aluminum-based adjuvant, is described. Each conjugate contains a capsular polysaccharide prepared from a different serotype of *Streptococcus pneumoniae* (1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F and 23F) conjugated to a carrier protein. The immunogenic composition, formulated as a vaccine, increases coverage against pneumococcal disease in infants and young children globally, and provides coverage for serotypes 6A and 19A that is not dependent on the limitations of serogroup cross-protection.

WO 2006/110381 A1

MULTIVALENT PNEUMOCOCCAL POLYSACCHARIDE-PROTEIN CONJUGATE COMPOSITION

FIELD OF THE INVENTION

5 The present invention relates generally to the field of medicine, and specifically to microbiology, immunology, vaccines and the prevention of infection by a bacterial pathogen by immunization.

BACKGROUND OF THE INVENTION

10 *Streptococcus pneumoniae* is a leading cause of meningitis, pneumonia, and severe invasive disease in infants and young children throughout the world. The multivalent pneumococcal polysaccharide vaccines have been licensed for many years and have proved valuable in preventing pneumococcal disease in elderly adults and high-risk patients. However, infants and young children respond poorly to
15 most pneumococcal polysaccharides. The 7-valent pneumococcal conjugate vaccine (7vPnC, Prevnar®) was the first of its kind demonstrated to be highly immunogenic and effective against invasive disease and otitis media in infants and young children. This vaccine is now approved in many countries around the world. Prevnar contains the capsular polysaccharides from serotypes 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F and 23F, each
20 conjugated to a carrier protein designated CRM₁₉₇. Prevnar covers approximately 80-90%, 60-80%, and 40-80% of invasive pneumococcal disease (IPD) in the US, Europe, and other regions of the world, respectively [1,2]. Surveillance data gathered in the years following Prevnar's introduction has clearly demonstrated a reduction of invasive pneumococcal disease in US infants as expected (FIG. 1) [3,4].

25 Surveillance of IPD conducted in US infants prior to the introduction of Prevnar demonstrated that a significant portion of disease due to serogroups 6 and 19 was due to the 6A (approximately one-third) and 19A (approximately one-fourth) serotypes [5,6]. Pneumococcal invasive disease surveillance conducted in the US after licensure of Prevnar suggests that a large burden of disease is still attributable
30 to serotypes 6A and 19A (FIG. 1) [3]. Moreover, these two serotypes account for more cases of invasive disease than serotypes 1, 3, 5, and 7F combined (8.2 vs. 3.3 cases/100,000 children 2 years and under). In addition, serotypes 6A and 19A are

associated with high rates of antibiotic resistance (FIG. 2) [7,8,9]. While it is possible that serogroup cross-protection will result in a decline of serotype 6A and 19A disease as more children are immunized, there is evidence to suggest that there will be a limit to the decline, and a significant burden of disease due to these serotypes will remain (see below).

Given the relative burden and importance of invasive pneumococcal disease due to serotypes 1, 3, 5, 6A, 7F, and 19A, adding these serotypes to the Prevnar formulation would increase coverage for invasive disease to >90% in the US and Europe, and as high as 70%-80% in Asia and Latin America. This vaccine would significantly expand coverage beyond that of Prevnar, and provide coverage for 6A and 19A that is not dependent on the limitations of serogroup cross-protection.

SUMMARY OF THE INVENTION

Accordingly, the present invention provides generally a multivalent immunogenic composition comprising 13 distinct polysaccharide-protein conjugates, wherein each of the conjugates contains a capsular polysaccharide from a different serotype of *Streptococcus pneumoniae* conjugated to a carrier protein, together with a physiologically acceptable vehicle. Optionally, an adjuvant, such as an aluminum-based adjuvant, is included in the formulation. More specifically, the present invention provides a 13-valent pneumococcal conjugate (13vPnC) composition comprising the seven serotypes in the 7vPnC vaccine (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F and 23F) plus six additional serotypes (1, 3, 5, 6A, 7F and 19A).

The present invention also provides a multivalent immunogenic composition, wherein the capsular polysaccharides are from serotypes 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F and 23F of *Streptococcus pneumoniae* and the carrier protein is CRM₁₉₇.

The present invention further provides a multivalent immunogenic composition, wherein the capsular polysaccharides are from serotypes 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9v, 14, 18C, 19A, 19F and 23F of *Streptococcus pneumoniae*, the carrier protein is CRM₁₉₇, and the adjuvant is an aluminum-based adjuvant, such as

00023

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

5 The present invention also provides a multivalent immunogenic composition, comprising polysaccharide-protein conjugates together with a physiologically acceptable vehicle, wherein each of the conjugates comprises a capsular polysaccharide from a different serotype of *Streptococcus pneumoniae* conjugated to a carrier protein, and the capsular polysaccharides are prepared from serotype 3 and at least one additional serotype.

10

In one embodiment of this multivalent immunogenic composition, the additional serotype is selected from the group consisting of serotypes 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, and 23F. In another embodiment, the carrier protein is CRM₁₉₇. In yet another embodiment, the composition comprises an adjuvant, such as an aluminum-based adjuvant selected from aluminum phosphate, aluminum sulfate and aluminum hydroxide. In a particular embodiment, the adjuvant is aluminum phosphate.

15

The present invention also provides a multivalent immunogenic composition, comprising polysaccharide-protein conjugates together with a physiologically acceptable vehicle, wherein each of the conjugates comprises a capsular polysaccharide from a different serotype of *Streptococcus pneumoniae* conjugated to a carrier protein, and the capsular polysaccharides are prepared from serotypes 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F and at least one additional serotype.

25

In one embodiment of this multivalent immunogenic composition, the additional serotype is selected from the group consisting of serotypes 1, 3, 5, 6A, 7F, and 19A. In another embodiment, the carrier protein is CRM₁₉₇. In yet another embodiment, the composition comprises an adjuvant, such as an aluminum-based adjuvant selected from aluminum phosphate, aluminum sulfate and aluminum hydroxide. In a particular embodiment, the adjuvant is aluminum phosphate.

30

The present invention also provides a method of inducing an immune response to a *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide conjugate, comprising administering to a human an immunologically effective amount of any of the immunogenic compositions just described.

5

The present invention further provides that any of the immunogenic compositions administered is a single 0.5 mL dose formulated to contain: 2 µg of each saccharide, except for 6B at 4 µg; approximately 29 µg CRM₁₉₇ carrier protein; 0.125 mg of elemental aluminum (0.5 mg aluminum phosphate) adjuvant; and
10 sodium chloride and sodium succinate buffer as excipients.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

FIG. 1 depicts the changes in IPD rates by serotype in US children <2 years of age from baseline (1998/1999) to 2001.

15 FIG. 2 depicts the distribution of pneumococcal isolates with resistance to penicillin (PCN) in children <5 years of age (1998).

FIG. 3 depicts the reverse cumulative distribution curves (RCDC) of OPA post-third dose results from the D118-P16 Prevnar trial.

20

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Inclusion of Prevnar Serotypes 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F

Data from IPD surveillance between 1995-1998 estimated that the seven serotypes in Prevnar were responsible for around 82% of IPD in children <2 years of age [5]. In Northern California, the site of the efficacy trial, the Prevnar serotypes accounted for 90% of all cases of IPD in infants and young children [10]. Since
25 introduction of the Prevnar vaccine in 2000, there has been a significant decrease in the overall IPD rates due to a decrease in disease due to the vaccine serotypes [3,4]. Therefore, there is no justification at this time to remove any of the Prevnar serotypes
30 from the next generation of pneumococcal conjugate vaccines but rather to add serotypes to obtain wider coverage.

Inclusion of Serotypes 1, 3, 5 and 7F

5 In the US, the rate of IPD caused by serotype 1 in children under the age of 5 years is <2%, about the same as for each of types 3 and 7F [1,6]. Serotypes 1 and 5 account for higher rates of IPD in US populations at high risk for invasive pneumococcal disease. Specifically, serotype 1 causes 3.5% of IPD in Alaskan native children <2 years of age, and 18% in children 2-4 years of age [11]. Both serotype 1 and serotype 5 significantly cause disease in other parts of the world and in indigenous populations in developed countries [12,13,14].

10 Serotype 1 may also be associated with more severe disease as compared with other pneumococcal serotypes [15]. This observation is based on the difference in rates of case identification between the US and Europe, and the associated difference in medical practice. Overall, the incidence of IPD is lower in Europe than in the US. However, the percent of IPD caused by serotype 1 in Europe is
15 disproportionately higher than in the US (6-7%, vs. 1-2%, respectively). In Europe, blood cultures are obtained predominantly from hospitalized children. In the US, it is routine medical practice to obtain blood cultures in an outpatient setting from children presenting with fever $\geq 39^{\circ}\text{C}$ and elevated white blood cell counts. Given the difference in medical practice, it is postulated that the lower percent of disease
20 caused by serotype 1 in the US may be diluted by higher rates of other serotypes causing milder disease, while the higher percent in Europe reflects more serious disease. In addition, seroepidemiology studies of children with complicated pneumonia demonstrate that serotype 1 is disproportionately represented [16,17,18]. This suggests that inclusion of serotype 1 may reduce the amount of severe
25 pneumococcal disease, as well as, contribute to a total reduction in invasive pneumococcal disease.

The addition of serotypes 3 and 7F will increase coverage against IPD in most areas of the world by approximately 3%-7%, and in Asia by around 9%. Thus,
30 an 11-valent vaccine would cover 50% in Asia and around 80% of IPD in all other regions [1,2]. These serotypes are also important with respect to otitis media coverage [19]. In a multinational study of pneumococcal serotypes causing otitis media, Hausdorff et al found serotype 3 to be the 8th most common middle ear fluid

isolate overall [20]. Serotype 3 accounted for up to 8.7% of pneumococcal serotypes associated with otitis media. Thus, the importance of types 3 and 7F in otitis media, as well as in IPD, warrants their inclusion in a pneumococcal conjugate vaccine.

5 However, attempts to produce a multivalent pneumococcal conjugate vaccine that exhibits significant immunogenicity with respect to serotype 3 polysaccharides have been unsuccessful. For example, in a study of the immunogenicity and safety of an 11-valent pneumococcal protein D conjugate vaccine (11-Pn-PD), no priming effect was observed for serotype 3 in infants who had received three doses of the
10 vaccine followed by a booster dose of either the same vaccine or a pneumococcal polysaccharide vaccine (Nurkka *et al.* (2004) *Ped. Inf. Dis. J.*, 23:1008-1014). In another study, opsonophagocytic assay (OPA) results from infants who had received doses of 11-Pn-PD failed to show antibody responses for serotype 3 at levels comparable to other tested serotypes (Gatchalian *et al.*, 17th Annual Meeting of the
15 Eur. Soc. Paed. Inf. Dis. (ESPID), Poster No. 4, P1A Poster Session 1, Istanbul Turkey, Mar. 27, 2001). In yet another study, which assessed the efficacy of an 11-Pn-PD in the prevention of acute otitis media, the vaccine did not provide protection against episodes caused by serotype 3 (Prymula *et al.* www.thelancet.com, Vol. 367: 740-748 (March 4, 2006)). Accordingly, a pneumococcal conjugate vaccine
20 comprising capsular polysaccharides from serotype 3 and capable of eliciting an immunogenic response to serotype 3 polysaccharides provides a significant improvement over the existing state of the art.

Inclusion of Serotypes 6A and 19A

a. Epidemiology of Serotypes 6A and 19A

25 Surveillance data in the literature suggest that serotypes 6A and 19A account for more invasive pneumococcal disease in US children <2 years of age than serotypes 1, 3, 5, and 7F combined (FIG. 1) [1,5]. In addition, these serotypes are commonly associated with antibiotic resistance (FIG. 2) and play an important role in
30 otitis media [6,19,20]. The ability of the current Prevnar vaccine to protect against disease due to 6A and 19A is not clear. The rationale for inclusion of 6A and 19A components in a 13vPnC vaccine is discussed below.

b. *Responses to 6A and 19A Induced by 6B and 19F Polysaccharides*

The licensed unconjugated pneumococcal polysaccharide vaccines (for use in persons at least two years of age) have contained 6A or 6B capsular polysaccharide but not both [21]. Immunogenicity data generated at the time of formulation of the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine demonstrated that a 6B monovalent vaccine induced antibody to both the 6A and 6B capsules. The data from several trials assessing IgG and opsonophagocytic assay (OPA) responses in a variety of populations with free polysaccharide and with pneumococcal conjugate vaccines suggested that IgG responses to 6A are induced by 6B antigens, but the responses are generally lower, and the OPA activity with 6A organisms is different than with 6B organisms [22,23,24,25]. In addition, subjects responding with high 6B antibody may have little or no activity against 6A.

In contrast to the chemical composition of the 6A and 6B capsular polysaccharides where there exists a high degree of similarity, the 19A and 19F capsules are quite different due to the presence of two additional side chains in the 19A polysaccharide. Not surprisingly, immune responses measured in human volunteers immunized with 19F polysaccharide vaccine showed that responses to 19F were induced in 80% of subjects, but only 20% of subjects had a response to 19A [26]. Low levels of cross-reactive IgG and OPA responses to serotype 19A after immunization with 19F polysaccharide have also been documented in trials with conjugate vaccines as well [24,26].

Internal data on cross-reactive OPA responses to 6A and 19A have been generated from the 7vPnC bridging trial (D118-P16) conducted in US infants (FIG. 3). These studies are consistent with the findings of others, and demonstrate induction of cross-reactive functional antibody to 6A polysaccharide after immunization with 6B polysaccharide, although at a lower level, and very little functional antibody to 19A after immunization with 19F.

00028

Impact of 6B and 19F Immunization on 6A and 19A in Animal Models

Animal models have been used to evaluate the potential for cross-protection with polysaccharide immunization. In an otitis media model developed by Giebink et al., chinchillas were immunized with a tetravalent polysaccharide outer membrane protein (OMP) conjugate vaccine (containing 6B, 14, 19F, 23F saccharides) or placebo [27]. In this trial there appeared to be some cross-protection for 6A; however this did not reach statistical significance and the level of protection was lower than with 6B against otitis media. In this same model there was 100% protection against 19F otitis media, but only 17% protection against 19A otitis media.

10

Saeland et al. used sera from infants immunized with an 8-valent pneumococcal tetanus conjugate vaccine (containing 6B and 19F) to passively immunize mice prior to an intranasal challenge with 6A organisms, in a lung infection model [28]. Of the 59 serum samples, 53% protected mice against bacteremia with 6B and 37% protected against 6A. Mice passively immunized with sera from infants immunized with four doses of an 11-valent pneumococcal conjugate vaccine (containing 19F conjugated to tetanus toxoid) were given an intranasal challenge with 19A organisms in the same model [29]. Of 100 mice passively immunized and then challenged, 60 mice had no 19A organisms detected in lung tissue, whereas organisms were identified in all mice given saline placebo. However, passive immunization did not protect against challenge with 19F organisms in this model; therefore, the relevance of the model for serogroup 19 is questionable. In general these models provide evidence of some biological impact of 6B immunization on 6A organisms although the effect on the heterologous serotype was not as great as that observed with the homologous serotype. The impact of 19F immunization on 19A organisms is not well understood from these models.

25

Impact of 6B and 19F Polysaccharide Conjugate Immunization on 6A and 19A Disease in Efficacy/Effectiveness Trials

30

The number of cases of disease due to the 6B, 6A, 19F and 19A serotypes in 7vPnC and 9vPnC (7vPnC plus serotypes 1 and 5) efficacy trials is noted in Table 1 [30,10,31]. The numbers of invasive disease cases are too small to allow any conclusions to be drawn for serotypes 6A and 19A. However, the Finnish otitis

000029

media trial generated a large number of pneumococcal isolates [32]. In the per protocol analysis 7vPnC was 84% (95% CI 62%, 93%) efficacious against otitis media due to serotype 6B and 57% (95% CI 24%, 76%) efficacious against otitis media due to serotype 6A (Table 1). In contrast, serotype-specific efficacy with the 7vPnC was not demonstrated for otitis media due to either 19F or 19A.

Table 1. Cases of Pneumococcal Disease Due to Serotypes 6B, 6A, 19F, and 19A in Efficacy Trials with the 7vPnC and 9vPnC Vaccines

	6B		6A		19F		19A	
	PnC	Contr.	PnC	Contr.	PnC	Contr.	PnC	Contr.
Kaiser Efficacy Trial – 7vPnC (ITT)	1	7	0	1	2*	13	0	1
Navajo Efficacy Trial – 7vPnC (ITT)	0	5	1	0	1	1	1	0
South African Efficacy Trial – 9vPnC HIV (-) (ITT)	1	2	1	0	0	1	3	1
South African Efficacy Trial – 9vPnC HIV (+) (ITT)	1	7	3	10	2	3	2	3
Finnish Otitis Media Trial – 7vPnC (PP)	9*	56	19*	45	43	58	17	26

*Statistically significant efficacy demonstrated
From references 30, 10 and 33, and personal communications
Contr = control
ITT = intention to treat analysis
PP = per protocol analysis

Post-marketing IPD surveillance data is also available from a case-control trial conducted by the Centers for Disease Control to evaluate the effectiveness of Prevnar [33]. Cases of pneumococcal invasive disease occurring in children 3 to 23 months of age were identified in the surveillance laboratories and matched with three control cases by age and zip code. After obtaining consent, medical and immunization history (subjects were considered immunized if they had received at least one dose of Prevnar) was obtained from parents and medical providers for cases and controls. The preliminary results were presented at the 2003 ICAAC meeting and a summary of the findings for 6B, 19F, 19A and 6A disease is presented in Table 2. These data indicate that Prevnar is able to prevent disease due to 6A, although at a level that may be somewhat lower than serotype 6B disease. These data also indicate that the cross-protection for invasive disease due to 19A is limited.

Table 2. Preliminary results of a Case Control Trial Performed by the CDC (presented at ICAAC, 2003)

Serotype	Informative Sets, n	VE* (95% CI)
Vaccine Type, All	115	94 (87, 97)
Vaccine Related, All	36	70 (38, 86)
Non-Vaccine Type, All	43	-4 (-106, 48)
6B	27	94 (72, 99)
19F	19	73 (16, 92)
6A	15	87 (53, 97)
19A	16	40 (-87, 80)

*Vaccine effectiveness comparing vaccinated (≥ 1 dose) vs. unvaccinated, and adjusted for underlying conditions
Reference 40 and personal/confidential communication

5

A published analysis [3] of the use of Prevnar also indicated that serotypes 6B and 19F conferred a moderate reduction in IPD caused by serotypes 6A and 19A among children under two years of age (Table 1 in [3]). Disease rates among unimmunized adults caused by serotypes 6A, 9A, 9L, 9N, 18A, 18B, 18F, 19A, 19B, 19C, 23A and 23B ("all vaccine-related serotypes") were somewhat reduced (Table 2 in [3]). These data establish that herd immunity from the use of Prevnar in children under two years of age was modest for serotypes 6A and 19A, and provide a basis for the inclusion of serotypes 6A and 19A in the 13vPnC vaccine of this invention.

15

Conclusion for addition of 6A and 19A

The post-marketing surveillance data and the case-control study results noted in FIG. 1 and Table 2 with the 7vPnC vaccine suggest that, consistent with the other information on immune responses and performance in the animals models described above, there may be some cross-protection against 6A disease, but to a lesser extent than to 6B disease. Furthermore, it appears the protection against 19A is limited. Therefore, a 13vPnC vaccine containing serotypes 6A and 19A provides coverage that is not dependent on the limitations of serogroup cross-protection by serotypes 6B and 19F.

25

00031

Accordingly, the present invention provides a multivalent immunogenic composition comprising 13 distinct polysaccharide-protein conjugates, wherein each of the conjugates contains a different capsular polysaccharide conjugated to a carrier protein, and wherein the capsular polysaccharides are prepared from serotypes 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F and 23F of *Streptococcus pneumoniae*, together with a physiologically acceptable vehicle. One such carrier protein is the diphtheria toxoid designated CRM₁₉₇. The immunogenic composition may further comprise an adjuvant, such as an aluminum-based adjuvant, such as aluminum phosphate, aluminum sulfate and aluminum hydroxide.

10

Capsular polysaccharides are prepared by standard techniques known to those skilled in the art. In the present invention, capsular polysaccharides are prepared from serotypes 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F and 23F of *Streptococcus pneumoniae*. These pneumococcal conjugates are prepared by separate processes and formulated into a single dosage formulation. For example, in one embodiment, each pneumococcal polysaccharide serotype is grown in a soy-based medium. The individual polysaccharides are then purified through centrifugation, precipitation, ultra-filtration, and column chromatography. The purified polysaccharides are chemically activated to make the saccharides capable of reacting with the carrier protein.

15
20

Once activated, each capsular polysaccharide is separately conjugated to a carrier protein to form a glycoconjugate. In one embodiment, each capsular polysaccharide is conjugated to the same carrier protein. In this embodiment, the conjugation is effected by reductive amination.

25

The chemical activation of the polysaccharides and subsequent conjugation to the carrier protein are achieved by conventional means. See, for example, U.S. Pat. Nos. 4,673,574 and 4,902,506 [34,35].

30

Carrier proteins are preferably proteins that are non-toxic and non-reactogenic and obtainable in sufficient amount and purity. Carrier proteins should be

amenable to standard conjugation procedures. In a particular embodiment of the present invention, CRM₁₉₇ is used as the carrier protein.

CRM₁₉₇ (Wyeth, Sanford, NC) is a non-toxic variant (i.e., toxoid) of diphtheria toxin isolated from cultures of *Corynebacterium diphtheria* strain C7 (β197) grown in casamino acids and yeast extract-based medium. CRM₁₉₇ is purified through ultra-filtration, ammonium sulfate precipitation, and ion-exchange chromatography. Alternatively, CRM₁₉₇ is prepared recombinantly in accordance with U.S. Patent No. 5,614,382, which is hereby incorporated by reference. Other diphtheria toxoids are also suitable for use as carrier proteins.

Other suitable carrier proteins include inactivated bacterial toxins such as tetanus toxoid, pertussis toxoid, cholera toxoid (e.g., as described in International Patent Application WO2004/083251 [38]), *E. coli* LT, *E. coli* ST, and exotoxin A from *Pseudomonas aeruginosa*. Bacterial outer membrane proteins such as outer membrane complex c (OMPC), porins, transferrin binding proteins, pneumolysin, pneumococcal surface protein A (PspA), pneumococcal adhesin protein (PsaA), C5a peptidase from Group A or Group B streptococcus, or *Haemophilus influenzae* protein D, can also be used. Other proteins, such as ovalbumin, keyhole limpet hemocyanin (KLH), bovine serum albumin (BSA) or purified protein derivative of tuberculin (PPD) can also be used as carrier proteins.

After conjugation of the capsular polysaccharide to the carrier protein, the polysaccharide-protein conjugates are purified (enriched with respect to the amount of polysaccharide-protein conjugate) by a variety of techniques. These techniques include concentration/diafiltration operations, precipitation/elution, column chromatography, and depth filtration. See examples below.

After the individual glycoconjugates are purified, they are compounded to formulate the immunogenic composition of the present invention, which can be used as a vaccine. Formulation of the immunogenic composition of the present invention can be accomplished using art-recognized methods. For instance, the 13 individual pneumococcal conjugates can be formulated with a physiologically acceptable

vehicle to prepare the composition. Examples of such vehicles include, but are not limited to, water, buffered saline, polyols (e.g., glycerol, propylene glycol, liquid polyethylene glycol) and dextrose solutions.

5 In certain embodiments, the immunogenic composition will comprise one or more adjuvants. As defined herein, an "adjuvant" is a substance that serves to enhance the immunogenicity of an immunogenic composition of this invention. Thus, adjuvants are often given to boost the immune response and are well known to the skilled artisan. Suitable adjuvants to enhance effectiveness of the composition
10 include, but are not limited to:

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

(2) oil-in-water emulsion formulations (with or without other specific immunostimulating agents such as muramyl peptides (defined below) or bacterial cell
15 wall components), such as, for example,

(a) MF59 (PCT Publ. No. WO 90/14837), containing 5% Squalene, 0.5% Tween 80, and 0.5% Span 85 (optionally containing various amounts of MTP-PE (see below, although not required)) formulated into submicron particles using a microfluidizer such as Model 110Y microfluidizer (Microfluidics, Newton, MA),

20 (b) SAF, containing 10% Squalene, 0.4% Tween 80, 5% pluronic-blocked polymer L121, and thr-MDP (see below) either microfluidized into a submicron emulsion or vortexed to generate a larger particle size emulsion, and

(c) Ribi™ adjuvant system (RAS), (Corixa, Hamilton, MT) containing 2% Squalene, 0.2% Tween 80, and one or more bacterial cell wall components from the group consisting of 3-O-deacylated monophosphorylipid A (MPL™) described in U.S.
25 Patent No. 4,912,094 (Corixa), trehalose dimycolate (TDM), and cell wall skeleton (CWS), preferably MPL + CWS (Detox™);

(3) saponin adjuvants, such as Quil A or STIMULON™ QS-21 (Antigenics, Framingham, MA) (U.S. Patent No. 5,057,540) may be used or particles generated
30 therefrom such as ISCOMs (immunostimulating complexes);

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

such AGP is 2-[(R)-3-Tetradecanoyloxytetradecanoylamino]ethyl 2-Deoxy-4-O-phosphono-3-O-[(R)-3-tetradecanoyloxytetradecanoyl]-2-[(R)-3-tetradecanoyloxytetradecanoylamino]- β -D-glucopyranoside, which is also known as 529 (formerly known as RC529), which is formulated as an aqueous form or as a stable emulsion, synthetic polynucleotides such as oligonucleotides containing CpG motif(s) (U.S. Patent No. 6,207,646);

(5) cytokines, such as interleukins (e.g., IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, etc.), interferons (e.g., gamma interferon), granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), macrophage colony stimulating factor (M-CSF), tumor necrosis factor (TNF), costimulatory molecules B7-1 and B7-2, etc.;

(6) detoxified mutants of a bacterial ADP-ribosylating toxin such as a cholera toxin (CT) either in a wild-type or mutant form, for example, where the glutamic acid at amino acid position 29 is replaced by another amino acid, preferably a histidine, in accordance with published international patent application number WO 00/18434 (see also WO 02/098368 and WO 02/098369), a pertussis toxin (PT), or an *E. coli* heat-labile toxin (LT), particularly LT-K63, LT-R72, CT-S109, PT-K9/G129 (see, e.g., WO 93/13302 and WO 92/19265); and

(7) other substances that act as immunostimulating agents to enhance the effectiveness of the composition.

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

The vaccine formulations of the present invention can be used to protect or treat a human susceptible to pneumococcal infection, by means of administering the vaccine via a systemic or mucosal route. These administrations can include injection via the intramuscular, intraperitoneal, intradermal or subcutaneous routes; or via mucosal administration to the oral/alimentary, respiratory or genitourinary tracts. In one embodiment, intranasal administration is used for the treatment of pneumonia or otitis media (as nasopharyngeal carriage of pneumococci can be more effectively prevented, thus attenuating infection at its earliest stage).

The amount of conjugate in each vaccine dose is selected as an amount that induces an immunoprotective response without significant, adverse effects. Such amount can vary depending upon the pneumococcal serotype. Generally, each dose will comprise 0.1 to 100 µg of polysaccharide, particularly 0.1 to 10 µg, and more particularly 1 to 5 µg.

Optimal amounts of components for a particular vaccine can be ascertained by standard studies involving observation of appropriate immune responses in subjects. Following an initial vaccination, subjects can receive one or several booster immunizations adequately spaced.

In a particular embodiment of the present invention, the 13vPnC vaccine is a sterile liquid formulation of pneumococcal capsular polysaccharides of serotypes 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, and 23F individually conjugated to CRM₁₉₇. Each 0.5 mL dose is formulated to contain: 2 µg of each saccharide, except for 6B at 4 µg; approximately 29 µg CRM₁₉₇ carrier protein; 0.125 mg of elemental aluminum (0.5 mg aluminum phosphate) adjuvant; and sodium chloride and sodium succinate buffer as excipients. The liquid is filled into single dose syringes without a preservative. After shaking, the vaccine is a homogeneous, white suspension ready for intramuscular administration.

The choice of dose level for the 13vPnC vaccine is similar to the marketed 7vPnC vaccine (Prevnar). The 2 µg saccharide dose level was selected for all serotypes, except for 6B, which is at 4 µg per dose. The 7vPnC vaccine has shown desirable safety, immunogenicity, and efficacy against IPD in the 2 µg saccharide dose level for serotypes 4, 9V, 14, 18C, 19F and 23F, and at the 4 µg dose for 6B.

The immunization schedule can follow that designated for the 7vPnC vaccine. For example, the routine schedule for infants and toddlers against invasive disease caused by *S. pneumoniae* due to the serotypes included in the 13vPnC vaccine is 2, 4, 6 and 12-15 months of age. The compositions of this invention are also suitable for use with older children, adolescents and adults.

The compositions of this invention may further include one or more additional antigens for use against otitis media caused by infection with other bacteria. Such bacteria include nontypable *Haemophilus influenza*, *Moraxella catarrhalis* (formerly known as *Branhamella catarrhalis*) and *Alloiococcus otitidis*.

5

Examples of nontypable *Haemophilus influenzae* antigens suitable for inclusion include the P4 protein, also known as protein "e" (U.S. Patent No. 5,601,831; International Patent Application WO03/078453), the P6 protein, also known as the PAL or the PBOMP-1 protein (U.S. Patent No. 5,110,908; International Patent Application WO0100790), the P5 protein (U.S. Reissue Patent No. 37,741), the *Haemophilus* adhesion and penetration protein (U.S. Patent Nos. 6,245,337 and 6,676,948), the LKP tip adhesin protein (U.S. Patent No. 5,643,725) and the NuCA protein (U.S. Patent No. 6,221,365).

15

Examples of *Moraxella catarrhalis* antigens suitable for inclusion include the UspA2 protein (U.S. Patent Nos. 5,552,146, 6,310,190), the CD protein (U.S. Patent No. 5,725,862), the E protein (U.S. Patent No. 5,948,412) and the 74 kilodalton outer membrane protein (U.S. Patent No. 6,899,885).

20

Examples of *Alloiococcus otitidis* antigens suitable for inclusion include those identified in International Patent Application WO03/048304.

25

The compositions of this invention may also include one or more proteins from *Streptococcus pneumoniae*. Examples of *Streptococcus pneumoniae* proteins suitable for inclusion include those identified in International Patent Application WO02/083855, as well as that described in International Patent Application WO02/053761.

30

The compositions of this invention may further include one or more proteins from *Neisseria meningitidis* type B. Examples of *Neisseria meningitidis* type B proteins suitable for inclusion include those identified in International Patent Applications WO03/063766, WO2004/094596, WO01/85772, WO02/16612 and WO01/87939.

The above disclosure generally describes the present invention. A more complete understanding can be obtained by reference to the following specific examples. These examples are described solely for the purpose of illustration and are not intended to limit the scope of the invention.

EXAMPLES

Example 1

Preparation of *S. Pneumoniae* Capsular Polysaccharide Serotype 1

Preparation of Master and Working Cell Banks

10 *S. pneumoniae* serotype 1 was obtained from the American Type Culture Collection, ATCC, strain 6301. Several generations of seed stocks were created in order to expand the strain and remove components of animal origin (generations F1, F2, and F3). Two additional generations of seed stocks were produced. The first additional generation was made from an F3 vial, and the subsequent generation was
15 made from a vial of the first additional generation. Seed vials were stored frozen (<-70°C) with synthetic glycerol as a cryopreservative. In addition to frozen vials, lyophilized vials were prepared for the F4 generation. For cell bank preparation, all cultures were grown in a soy-based medium. Prior to freezing, cells were concentrated by centrifugation, spent medium was removed, and cell pellets were re-
20 suspended in fresh medium containing a cryopreservative, such as synthetic glycerol.

Fermentation and Harvesting

25 Cultures from the working cell bank were used to inoculate seed bottles containing a soy-based medium. The bottles were incubated at 36°C ± 2° C without agitation until growth requirements were met. A seed bottle was used to inoculate a seed fermentor containing soy-based medium. A pH of about 7.0 was maintained with sterile sodium carbonate solution. After the target optical density was reached, the seed fermentor was used to inoculate the production fermentor containing soy-
30 based medium. The pH was maintained with sterile sodium carbonate solution. The fermentation was terminated after cessation of growth or when the working volume of

the fermentor was reached. An appropriate amount of sterile 12% deoxycholate sodium was added to the culture to lyse the bacterial cells and release cell-associated polysaccharide. After lysing, the fermentor contents were cooled. The pH of the lysed culture broth was adjusted to approximately pH 6.6 with acetic acid.

- 5 The lysate was clarified by continuous flow centrifugation followed by depth filtration and 0.45 μ m microfiltration.

In an alternate process, the fermentation pH of about 7.0 was maintained with 3N NaOH. After the target optical density was reached, the seed fermentor was
10 used to inoculate the production fermentor containing soy-based medium. The pH was maintained with 3N NaOH. The fermentation was terminated after cessation of growth or when the working volume of the fermentor was reached. An appropriate amount of sterile 12% deoxycholate sodium was added to the culture to obtain a 0.12% concentration in the broth, to lyse the bacterial cells and release cell-
15 associated polysaccharide. After lysing, the fermentor contents were held, with agitation, for a time interval between 8 and 24 hours at a temperature between 7°C and 13°C, to assure that complete cellular lysis and polysaccharide release had occurred. Agitation during this hold period prevented lysate sediment from settling on the fermentor walls and pH probe, thereby allowing the pH probe integrity to be
20 maintained. Next, the pH of the lysed culture broth was adjusted to approximately pH 5.0 with 50% acetic acid. After a hold time without agitation, for a time interval between 12 and 24 hours at a temperature between 15°C and 25°C, a significant portion of the previously soluble proteins dropped out of solution as a solid precipitate with little loss or degradation of the polysaccharide, which remained in solution. The
25 solution with the precipitate was then clarified by continuous flow centrifugation followed by depth filtration and 0.45 μ m microfiltration.

Purification

The purification of the pneumococcal polysaccharide consisted of several
30 concentration/diafiltration operations, precipitation/elution, column chromatography, and depth filtration steps. All procedures were performed at room temperature unless otherwise specified.

Clarified broth from the fermentor cultures of *S. pneumoniae* serotype 1 were concentrated and diafiltered using a 100 kDa MWCO (kilodalton molecular weight cutoff) filter. Diafiltration was accomplished using sodium phosphate buffer at neutral pH. Diafiltration removed the low molecular weight medium components from the higher molecular weight biopolymers such as nucleic acid, protein and polysaccharide.

The polysaccharide was precipitated from the concentrated and diafiltered solution by adding hexadecyltrimethyl ammonium bromide (HB) from a stock solution to give a final concentration of 1% HB (w/v). The polysaccharide/HB precipitate was captured on a depth filter and the filtrate was discarded. The polysaccharide precipitate was resolubilized and eluted by recirculating a sodium chloride solution through the precipitate-containing depth filter. The filters were then rinsed with additional sodium chloride solution.

Sodium iodide (NaI) was added to the polysaccharide solution from a stock NaI solution to achieve a final concentration of 0.5% to precipitate HB. The precipitate was removed by depth filtration. The filtrate contains the target polysaccharide. The precipitation vessel and the filter were rinsed with a NaCl/NaI solution and the rinse was combined with the partially purified polysaccharide solution. The filter was discarded. The polysaccharide was then filtered through a 0.2 μ m filter.

The polysaccharide solution was concentrated on a 30 kDa MWCO ultrafilter and diafiltered with a sodium chloride solution.

The partially purified polysaccharide solution was further purified by filtration through a depth filter impregnated with activated carbon. After filtration, the carbon filter was rinsed with a sodium chloride solution. The rinse is combined with the polysaccharide solution, which is then filtered through a 0.2 μ m filter.

The polysaccharide solution was concentrated on a 30 kDa MWCO ultrafilter and adjusted with a 1M sodium phosphate buffer to achieve a final concentration of 0.025 M sodium phosphate. The pH was checked and adjusted to 7.0 ± 0.2 .

The ceramic hydroxyapatite (HA) column was equilibrated with sodium phosphate buffer containing sodium chloride to obtain the appropriate conductivity ($<15 \mu$ S). The polysaccharide solution was then loaded onto the column. Under these conditions, impurities bound to the resin and the polysaccharide was recovered

nnn40

in the flow-through from the column. The polysaccharide solution was filtered through 0.2µm inline filters located before and after the column.

The polysaccharide solution was concentrated using a 30 kDa MWCO filter. The concentrate was then diafiltered with Water for Injection (WFI).

- 5 The diafiltered polysaccharide solution was filtered through a 0.2 µm membrane filter into polypropylene bottles. Samples were removed for release testing and the purified polysaccharide was stored frozen at $-25^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$.

Characterization

- 10 The ^1H -NMR data was consistent with the chemical structure by the assignment of signals assigned to the protons of the polysaccharide molecule. The ^1H -NMR spectrum showed a series of well-resolved signals (protons from the methyl group) for the quantitation of the O-acetyl functional group in the polysaccharide.

- 15 The identity of the monovalent polysaccharide was confirmed by countercurrent immunoelectrophoresis using specific antisera.

High performance gel filtration chromatography coupled with refractive index and multiangle laser light scattering (MALLS) detectors was used in conjunction with the sample concentration to calculate the molecular weight.

- 20 Size exclusion chromatography media (CL-4B) was used to profile the relative molecular size distribution of the polysaccharide.

Example 2

Preparation of Serotype 1 Pneumococcal Saccharide – CRM₁₉₇ Conjugate

Activation and Conjugation

- 25 Containers of purified polysaccharide were thawed and combined in a reaction vessel. To the vessel, 0.2 M sodium carbonate, pH 9.0 was added for partial deacetylation (hydrolysis) for 3 hours at 50°C. The reaction was cooled to 20°C and neutralization was performed by 0.2 M acetic acid. Oxidation in the presence of sodium periodate was performed by incubation at 2-8°C, and the mixture
- 30 was stirred for 15-21 hours.

nnn/1

The activation reaction mixture was concentrated and diafiltered 10x with 0.9% NaCl using a 30K MWCO membrane. The retentate was 0.2 µm filtered. The activated saccharide was filled into 100 mL glass lyophilization bottles and shell-frozen at -75°C and lyophilized.

- 5 "Shell-freezing" is a method for preparing samples for lyophilization (freeze-drying). Flasks are automatically rotated by motor driven rollers in a refrigerated bath containing alcohol or any other appropriate fluid. A thin coating of product is evenly frozen around the inside "shell" of a flask, permitting a greater volume of material to be safely processed during each freeze-drying run. These automatic, refrigerated
- 10 units provide a simple and efficient means of pre-freezing many flasks at a time, producing the desired coatings inside, and providing sufficient surface area for efficient freeze-drying.

- Bottles of lyophilized material were brought to room temperature and resuspended in CRM₁₉₇ solution at a saccharide/protein ratio of 2:1. To the
- 15 saccharide/protein mixture 1M sodium phosphate buffer was added to a final 0.2M ionic strength and a pH of 7.5, then sodium cyanoborohydride was added. The reaction was incubated at 23°C for 18 hours, followed by a second incubation at 37°C for 72 hours. Following the cyanoborohydride incubations, the reaction mixture was diluted with cold saline followed by the addition of 1M sodium carbonate to
- 20 adjust the reaction mixture to pH 9.0. Unreacted aldehydes were quenched by addition of sodium borohydride by incubation at 23°C for 3-6 hours.

- The reaction mixture was diluted 2-fold with saline and transferred through a 0.45 – 5 µm prefilter into a retentate vessel. The reaction mixture is diafiltered 30x with 0.15 M phosphate buffer, pH 6, and 20x with saline. The retentate was filtered
- 25 through a 0.2 µm filter.

The conjugate solution was diluted to a target of 0.5 mg/mL in 0.9% saline, and then sterile filtered into final bulk concentrate (FBC) containers in a Class 100 hood. The conjugate was stored at 2 – 8°C.

30 Characterization

Size exclusion chromatography media (CL-4B) was used to profile the relative molecular size distribution of the conjugate.

The identity of the conjugate was confirmed by the slot-blot assay using specific antisera.

The saccharide and protein concentrations were determined by the uronic acid and Lowry assays, respectively. The ratio of saccharide to protein in the covalently bonded conjugate complex was obtained by the calculation:

$$\text{Ratio} = \frac{\mu\text{g/mL saccharide}}{\mu\text{g/mL protein}}$$

O-acetyl content was measured by the Hestrin method (Hestrin et. al., J. Biol. Chem. 1949, 180, p. 249). The ratio of O-acetyl concentration to total saccharide concentration gave μmoles of O-acetyl per mg of saccharide.

Example 3

Preparation of *S. Pneumoniae* Capsular Polysaccharide Serotype 3

Preparation of Master and Working Cell Banks

S. pneumoniae serotype 3 was obtained from Dr. Robert Austrian, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania. For preparation of the cell bank system, see Example 1.

Fermentation and Harvesting

Cultures from the working cell bank were used to inoculate seed bottles containing soy-based medium. The bottles were incubated at $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ without agitation until growth requirements were met. A seed bottle was used to inoculate a seed fermentor containing soy-based medium. A pH of about 7.0 was maintained with sterile sodium carbonate solution. After the target optical density was reached, the seed fermentor was used to inoculate an intermediate seed fermentor. After the target optical density was reached, the intermediate seed fermentor was used to inoculate the production fermentor. The pH was maintained with sterile sodium carbonate solution. The fermentation was terminated after the working volume of the fermentor was reached. An appropriate amount of sterile 12% sodium deoxycholate was added to the culture to lyse the bacterial cells and release cell-associated polysaccharide. After lysing, the fermentor contents were cooled. The pH of the lysed culture broth was adjusted to approximately pH 6.6 with acetic acid. The lysate

was clarified by continuous flow centrifugation followed by depth filtration and 0.45 μm microfiltration.

Purification

5 The purification of the pneumococcal polysaccharide consisted of several concentration/diafiltration operations, precipitation/elution, column chromatography, and depth filtration steps. All procedures were performed at room temperature unless otherwise specified.

10 Clarified broth from the fermentor cultures of *S. pneumoniae* serotype 3 were concentrated and diafiltered using a 100 kDa MWCO filter. Diafiltration was accomplished using sodium phosphate buffer at neutral pH. Diafiltration removed the low molecular weight medium components from the higher molecular weight biopolymers such as nucleic acid, protein and polysaccharide.

15 Prior to the addition of hexadecyltrimethyl ammonium bromide (HB), a calculated volume of a NaCl stock solution was added to the concentrated and diafiltered polysaccharide solution to give a final concentration of 0.25 M NaCl. The polysaccharide was then precipitated by adding HB from a stock solution to give a final concentration of 1% HB (w/v). The polysaccharide/HB precipitate was captured on a depth filter and the filtrate was discarded. The polysaccharide precipitate was
20 resolubilized and eluted by recirculating a sodium chloride solution through the precipitate-containing depth filter. The filters were then rinsed with additional sodium chloride solution.

25 Sodium iodide (NaI) was added to the polysaccharide solution from a stock NaI solution to achieve a final concentration of 0.5% to precipitate HB. The precipitate was removed by depth filtration. The filtrate contained the target polysaccharide. The precipitation vessel and the filter were rinsed with a NaCl/NaI solution and the rinse was combined with the partially purified polysaccharide solution. The filter was discarded. The polysaccharide was then filtered through a 0.2 μm filter.

30 The polysaccharide solution was concentrated on a 30 kDa MWCO ultrafilter and diafiltered with a sodium chloride solution.

 The partially purified polysaccharide solution was further purified by filtration through a depth filter impregnated with activated carbon. After filtration, the carbon

000000

filter was rinsed with a sodium chloride solution. The rinse was combined with the polysaccharide solution, which was then filtered through a 0.2 μ m filter.

The polysaccharide solution was concentrated on a 30 kDa MWCO ultrafilter and adjusted with a 1M sodium phosphate buffer to achieve a final concentration of 0.025M sodium phosphate. The pH was checked and adjusted to 7.0 ± 0.2 .

The ceramic hydroxyapatite (HA) column was equilibrated with sodium phosphate buffer containing sodium chloride to obtain the appropriate conductivity (15 μ S). The polysaccharide solution was then loaded onto the column. Under these conditions, impurities bound to the resin and the polysaccharide was recovered in the flow-through from the column. The polysaccharide was flushed through the column with buffer and was filtered through a 0.2 μ m filter.

The polysaccharide solution was concentrated using a 30 kDa MWCO filter. The concentrate was then diafiltered with WFI.

The diafiltered polysaccharide solution was filtered through a 0.2 μ m membrane filter into stainless steel containers. Samples were removed for release testing and the purified polysaccharide was stored frozen at $-25^\circ \pm 5^\circ\text{C}$.

Characterization

The ^1H -NMR data was consistent with the chemical structure by the assignment of signals assigned to the protons of the polysaccharide molecule.

The identity of the monovalent polysaccharide was confirmed by countercurrent immunoelectrophoresis using specific antisera.

High performance gel filtration chromatography, coupled with refractive index and multiangle laser light scattering (MALLS) detectors, was used in conjunction with the sample concentration to calculate the molecular weight.

Size exclusion chromatography media (CL-4B) was used to profile the relative molecular size distribution of the polysaccharide.

Example 4

Preparation of Serotype 3 Pneumococcal Saccharide – CRM₁₉₇ Conjugate

Activation and Conjugation

Containers of purified serotype 3 saccharide were thawed and combined in a
5 reaction vessel. To the vessel, WFI and 2M acetic acid were added to a final
concentration of 0.2M and 2mg/mL saccharide. The temperature of the solution was
raised to 85°C for one hour to hydrolyze the polysaccharide. The reaction was
cooled to $\leq 25^{\circ}\text{C}$ and 1M magnesium chloride was added to a final concentration of
0.1M. Oxidation in the presence of sodium periodate was performed by incubation
10 for 16-24 hours at 23°C.

The activation reaction mixture was concentrated and diafiltered 10x with WFI
using a 100K MWCO membrane. The retentate was filtered through a 0.2- μm filter.

For compounding, 0.2M sodium phosphate, pH 7.0, was added to the
activated saccharide to a final concentration of 10mM and a pH of 6.0-6.5. CRM₁₉₇
15 carrier protein was mixed with the saccharide solution to a ratio of 2g of saccharide
per 1g of CRM₁₉₇. The combined saccharide/protein solution was filled into 100 mL
glass lyophilization bottles with a 50mL target fill, shell-frozen at -75°C , and
lyophilized.

Bottles of co-lyophilized saccharide/protein material were brought to room
20 temperature and resuspended in 0.1M sodium phosphate buffer, pH 7.0, to a final
saccharide concentration of 20 mg/mL. The pH was adjusted to 6.5 and then a 0.5
molar equivalent of sodium cyanoborohydride was added. The reaction was
incubated at 37°C for 48 hours. Following the cyanoborohydride incubation, the
reaction mixture was diluted with cold 5mM succinate/0.9% saline buffer. Unreacted
25 aldehydes were quenched by the addition of sodium borohydride and incubation at
23°C for 3-6 hours. The reaction mixture was transferred through a 0.45-5 μm
prefilter into a retentate vessel.

The reaction mixture was diafiltered 30x with 0.1M phosphate buffer (pH 9),
20x with 0.15M phosphate butter (pH 6), and 20x with 5mM succinate/0.9% saline.
30 The retentate was filtered through a 0.2- μm filter.

The conjugate solution was diluted to a saccharide target of 0.5 mg/mL, and then sterile filtered into FBC containers in a Class 100 hood. The conjugate was stored at 2 – 8°C.

Characterization

5 Size exclusion chromatography media (CL-4B) was used to profile the relative molecular size distribution of the conjugate.

The identity of the conjugate was confirmed by the slot-blot assay using specific antisera.

10 The saccharide and protein concentrations were determined by the Anthrone and Lowry assays, respectively. The ratio of saccharide to protein in the covalently bonded conjugate complex was obtained by the calculation:

$$15 \qquad \text{Ratio} = \frac{\mu\text{g/mL saccharide}}{\mu\text{g/mL protein}}$$

Example 5

Preparation of *S. Pneumoniae* Capsular Polysaccharide Serotype 5

20 *S. pneumoniae* serotype 5 was obtained from Dr. Gerald Schiffman of the State University of New York, Brooklyn, New York. For preparation of the cell bank system, see Example 1. For fermentation, harvesting, purification and characterization of the polysaccharide, see Example 1.

25 Alternate Fermentation Process

Cultures from the working cell bank were used to inoculate seed bottles containing a soy-based medium and a 10mM sterile NaHCO₃ solution. The bottles were incubated at 36°C ± 2° C without agitation until growth requirements were met.

30 A seed bottle was used to inoculate a seed fermentor containing soy-based medium and a 10mM sterile NaHCO₃ solution. A pH of about 7.0 was maintained with 3N NaOH. After the target optical density was reached, the seed fermentor was used to inoculate the production fermentor containing soy-based medium with a 10mM

NaHCO₃ concentration. The pH was maintained with 3N NaOH. The fermentation was terminated after cessation of growth or when the working volume of the fermentor was reached. An appropriate amount of sterile 12% sodium deoxycholate was added to the culture to obtain a 0.12% concentration in the broth, to lyse the bacterial cells and release cell-associated polysaccharide. After lysing, the fermentor contents were held, with agitation, for a time interval between 8 and 24 hours at a temperature between 7°C and 13°C to assure that complete cellular lysis and polysaccharide release had occurred. Agitation during this hold period prevented lysate sediment from settling on the fermentor walls and pH probe, thereby allowing the pH probe integrity to be maintained. Next, the pH of the lysed culture broth was adjusted to approximately pH 4.5 with 50% acetic acid. After a hold time without agitation, for a time interval between 12 and 24 hours at a temperature between 15°C and 25°C, a significant portion of the previously soluble proteins dropped out of solution as a solid precipitate with little loss or degradation of the polysaccharide, which remained in solution. The solution with the precipitate was then clarified by continuous flow centrifugation followed by depth filtration and 0.45 µm microfiltration.

Example 6

Preparation of Serotype 5 Pneumococcal Saccharide – CRM₁₉₇ Conjugate

Activation and Conjugation

Containers of serotype 5 saccharide were thawed and combined in a reaction vessel. To the vessel, 0.1M sodium acetate, pH 4.7, was added followed by oxidation in the presence of sodium periodate by incubation for 16-22 hours at 23°C.

The activation reaction mixture was concentrated and diafiltered 10x with WFI using a 100K MWCO membrane. The retentate was filtered through a 0.2 µm filter.

The serotype 5 activated saccharide was combined with CRM₁₉₇ at a ratio of 0.8:1. The combined saccharide/protein solution was filled into 100 mL glass lyophilization bottles (50 mL target fill), shell-frozen at -75°C, and co-lyophilized.

Bottles of co-lyophilized material were brought to room temperature and resuspended in 0.1M sodium phosphate, pH 7.5, and sodium cyanoborohydride was added. The reaction was incubated at 30°C for 72 hours, followed by a second addition of cyanoborohydride and incubated at 30°C for 20-28 hours.

Following the cyanoborohydride incubations, the reaction mixture was diluted 2-fold with saline and transferred through a 0.45-5 µm prefilter into a retentate vessel. The reaction mixture was diafiltered 30x with 0.01M phosphate buffer, pH 8, 20x with 0.15M phosphate buffer, pH 6, and 20x with saline. The retentate was filtered
5 through a 0.2 µm filter.

The conjugate solution was diluted to a saccharide target of 0.5 mg/mL, and then sterile filtered into FBC containers in a Class 100 hood. The conjugate was stored at 2 – 8°C.

For the characterization of the conjugate, see Example 2.

10

Example 7

Preparation of *S. Pneumoniae* Capsular Polysaccharide Serotype 6A

S. pneumoniae serotype 6A was obtained from Dr. Gerald Schiffman of the State University of New York, Brooklyn, New York. For preparation of the cell bank
15 system, see Example 1. For fermentation, harvesting and purification of the polysaccharide, see Example 1, except that during purification, the 30 kDa MWCO concentration step, prior to the chromatography step, is omitted.

Example 8

20 Preparation of Serotype 6A Pneumococcal Saccharide – CRM₁₉₇ Conjugate

Activation and Conjugation

Serotype 6A polysaccharide is a high molecular weight polymer that had to be reduced in size prior to oxidation. Containers of serotype 6A saccharide were
25 thawed and combined in a reaction vessel. To the vessel, 2 M acetic acid was added to a final concentration of 0.1 M for hydrolysis for 1.5 hours at 60°C. The reaction was cooled to 23°C and neutralization was performed by adjusting the reaction mixture with 1 M NaOH to pH 6. Oxidation in the presence of sodium periodate was performed by incubation at 23°C for 14-22 hours.

30 The activation reaction mixture was concentrated and diafiltered 10x with WFI using a 100K MWCO membrane. The retentate was filtered through a 0.2 µm filter.

Serotype 6A was compounded with sucrose and filled into 100 mL glass lyophilization bottles (50mL target fill) and shell-frozen at -75°C and lyophilized.

Bottles of lyophilized material were brought to room temperature and resuspended in dimethylsulfoxide (DMSO) at a saccharide/protein ratio of 1:1. After addition of sodium cyanoborohydride, the reaction mixture was incubated at 23°C for 18 hours. Following the cyanoborohydride incubation, the reaction mixture was diluted with cold saline. Unreacted aldehydes were quenched by addition of sodium borohydride by incubation at 23°C for 3-20 hours.

The diluted reaction mixture was transferred through a 5 µm prefilter into a retentate vessel. The reaction mixture was diafiltered 10x with 0.9% NaCl and 30x with succinate-buffered NaCl. The retentate was filtered through a 0.2 µm filter.

The conjugate solution was diluted to a saccharide target of 0.5 mg/mL, and then sterile filtered into FBC containers in a Class 100 hood. The conjugate was stored at 2 - 8°C.

For the characterization of the conjugate, see Example 2.

15

Example 9

Preparation of *S. Pneumoniae* Capsular Polysaccharide Serotype 7F

S. pneumoniae serotype 7F was obtained from Dr. Gerald Schiffman of the State University of New York, Brooklyn, New York. For preparation of the cell bank system, and for fermentation and harvesting of the polysaccharide, see Example 3.

For an alternate fermentation and harvesting process, see the alternate process described in Example 1.

Purification

The purification of the pneumococcal polysaccharide consisted of several concentration/diafiltration operations, precipitation/elution, column chromatography, and depth filtration steps. All procedures were performed at room temperature unless otherwise specified.

Clarified broth from fermentor cultures of *S. pneumoniae* serotype 7F were concentrated and diafiltered using a 100 kDa MWCO filter. Diafiltration was accomplished using sodium phosphate buffer at neutral pH. Diafiltration removed the low molecular weight medium components from the higher molecular weight biopolymers such as nucleic acid, protein and polysaccharide.

Serotype 7F does not form a precipitate with HB. Instead, impurities were precipitated from the concentrated and diafiltered solution by adding the HB from a stock solution to a final concentration of 1% HB. The precipitate was captured on a depth filter and the filter was discarded. The polysaccharide was contained in the
5 filtrate.

Sodium iodide (NaI) was added to the polysaccharide solution from a stock NaI solution to achieve a final concentration of 0.5% to precipitate HB. The precipitate was removed by depth filtration. The filtrate contained the target polysaccharide. The precipitation vessel and the filter were rinsed with a NaCl/NaI
10 solution and the rinses were combined with the partially purified polysaccharide solution. The filter was discarded. The polysaccharide was then filtered through a 0.2µm filter.

The polysaccharide solution was concentrated on a 30 kDa MWCO ultrafilter and diafiltered with a sodium chloride solution.

15 The partially purified polysaccharide solution was further purified by filtration through a depth filter impregnated with activated carbon. After filtration, the carbon filter was rinsed with a sodium chloride solution. The rinse was combined with the polysaccharide solution, which was then filtered through a 0.2 µm filter.

The polysaccharide solution was concentrated on a 30 kDa MWCO ultrafilter
20 and adjusted with a 1M sodium phosphate buffer to achieve a final concentration of 0.025M sodium phosphate. The pH was checked and adjusted to 7.0 ± 0.2 .

The ceramic hydroxyapatite (HA) column was equilibrated with sodium phosphate buffer containing sodium chloride to obtain the appropriate conductivity (15 µS). The polysaccharide solution was then loaded onto the column. Under these
25 conditions, impurities bound to the resin and the polysaccharide was recovered in the flow-through from the column. The polysaccharide was flushed through the column with buffer and was filtered through a 0.2 µm filter.

The polysaccharide solution was concentrated using a 30 kDa MWCO filter. The concentrate was then diafiltered with WFI.

30 The diafiltered polysaccharide solution was filtered through a 0.2 µm membrane filter into stainless steel containers. Samples were removed for release testing and the purified polysaccharide was stored at 2° - 8°C.

For characterization of the polysaccharide, see Example 3.

Example 10

Preparation of Serotype 7F Pneumococcal Saccharide – CRM₁₉₇ Conjugate

Activation and Conjugation

5 Oxidation in the presence of sodium periodate was performed by incubation for 16-24 hrs at 23°C.

 The activation reaction mixture was concentrated and diafiltered 10x with 10mM NaOAc, pH 4.5, using a 100K MWCO membrane. The retentate was filtered through a 0.2 µm filter.

10 Serotype 7F was filled into 100 mL glass lyophilization bottles (50 mL target fill) and shell-frozen at -75°C and lyophilized.

 Bottles of lyophilized serotype 7F and CRM₁₉₇ were brought to room temperature and resuspended in DMSO at a saccharide/protein ratio of 1.5:1. After the addition of sodium cyanoborohydride, the reaction was incubated at 23°C for 8-
15 10 hours. Unreacted aldehydes were quenched by the addition of sodium borohydride by incubation at 23°C for 16 hours.

 The reaction mixture was diluted 10-fold with cold saline and transferred through a 5 µm prefilter into a retentate vessel. The reaction mixture was diafiltered 10x with 0.9% saline and 30x with succinate-buffered saline. The retentate was
20 filtered through a 0.2 µm filter.

 The conjugate solution was diluted to a saccharide target of 0.5 mg/mL 0.9% saline, and then sterile filtered into FBC containers in a Class 100 hood. The conjugate was stored at 2 - 8°C.

 For characterization of the conjugate, see Example 4.
25

Example 11**Preparation of *S. Pneumoniae* Capsular Polysaccharide Serotype 19A**

5 *S. pneumoniae* serotype 19A was obtained from Dr. Gerald Schiffman of the State University of New York, Brooklyn, New York. For preparation of the cell bank system, see Example 1. For fermentation, harvesting and purification of the polysaccharide, see Example 7. For characterization, see Example 3.

Example 12**Preparation of Serotype 19A Pneumococcal Saccharide – CRM₁₉₇ Conjugate**Activation and Conjugation

Containers of serotype 19A saccharide were thawed and combined in a reaction vessel. Sodium acetate was added to 10 mM (pH 5.0) and oxidation was
15 carried out in the presence of sodium periodate by incubation for 16-24 hrs at 23°C.

The activation reaction mixture was concentrated and diafiltered 10x with 10mM acetate, pH 5.0, using a 100K MWCO membrane. The retentate was filtered through a 0.2 µm filter.

The activated saccharide was compounded with sucrose followed by the
20 addition of CRM₁₉₇. The serotype 19A activated saccharide and CRM₁₉₇ mixture (0.8:1 ratio) was filled into 100 mL glass lyophilization bottles (50 mL target fill) and shell-frozen at -75°C and lyophilized.

Bottles of lyophilized material were brought to room temperature and resuspended in DMSO. To the saccharide/protein mixture, sodium
25 cyanoborohydride (100 mg/ml) was added. The reaction was incubated at 23°C for 15 hours. Following the cyanoborohydride incubation, unreacted aldehydes were quenched by the addition of sodium borohydride by incubation at 23°C for 3-20 hours.

The reaction mixture was diluted 10-fold with cold saline and transferred
30 through a 5 µm prefilter into a retentate vessel. The reaction mixture was diafiltered 10x with 0.9% NaCl, 0.45-µm filtered, and 30x with diafiltration using 5mM succinate/0.9% NaCl buffer, pH 6. The retentate was filtered through a 0.2 µm filter.

The conjugate solution was diluted to a target of 0.5 mg/mL using 5mM succinate/0.9% saline, and then sterile filtered into FBC containers in a Class 100 hood. The conjugate was stored at 2 - 8°C.

For characterization of the conjugate, see Example 4.

5

Example 13

Preparation of *S. Pneumoniae* Capsular Polysaccharide Serotypes 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F and 23F

10 Preparation of the *S. pneumoniae* Seed Culture

S. pneumoniae serotypes 4, 6B, 9V, 18C, 19F and 23F were obtained from Dr. Gerald Schiffman, State University of New York, Brooklyn, New York. *S. pneumoniae* serotype 14 was obtained from the ATCC, strain 6314.

15 Separately, one vial of each of the desired serotypes of *Streptococcus pneumoniae* was used to start a fermentation batch. Two bottles containing a soy-based medium and phenol red were adjusted to a pH range of 7.4 ± 0.2 using sodium carbonate, and the required volume of 50% dextrose/1% magnesium sulfate solution was then added to the bottles. The two bottles were inoculated with different amounts of seed. The bottles were incubated at $36^\circ \pm 2^\circ\text{C}$ until the medium turned
20 yellow. Following incubation, samples were removed from each bottle and tested for optical density (OD) (0.3 to 0.9) and pH (4.6 to 5.5). One of the two bottles was selected for inoculation of the seed fermentor.

Soy-based medium was transferred to the seed fermentor and sterilized. Then a volume of 50% dextrose/1% magnesium sulfate solution was added to the
25 fermentor. The pH and agitation of the seed fermentor were monitored and controlled (pH 6.7 to 7.4). The temperature was maintained at $36^\circ \pm 2^\circ\text{C}$. The seed inoculum (bottle) was aseptically connected to the seed fermentor and the inoculum was transferred. The fermentor was maintained in pH control and samples were periodically removed and tested for OD and pH. When the desired OD of 0.5 at 600
30 nm was reached, the intermediate fermentor was inoculated with the fermentation broth from the seed fermentor.

Soy-based medium was transferred to the intermediate fermentor and sterilized. Then a volume of 50% dextrose/1% magnesium sulfate solution was

00054

added to the fermentor. The pH and agitation of the intermediate fermentor were monitored and controlled (pH 6.7 to 7.4). The temperature was maintained at $36^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. The contents of the seed fermentor were transferred to the intermediate fermentor. The fermentor was maintained in pH control and samples were
5 periodically removed and tested for OD and pH. When the desired OD of 0.5 at 600 nm was reached, the production fermentor was inoculated with the fermentation broth from the intermediate fermentor.

Soy-based medium was transferred to the production fermentor and sterilized. Then a volume of 50% dextrose/1% magnesium sulfate solution was
10 added to the fermentor. The pH and agitation of the production fermentor were monitored and controlled (pH 6.7 to 7.4). The temperature was maintained at $36^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. The fermentor was maintained in pH control and samples were periodically removed and tested for OD and pH, until the fermentation was complete.

Deoxycholate sodium was added to the fermentor to a final concentration of
15 approximately 0.12% w/v. The culture was mixed for a minimum of thirty minutes and the temperature set point was reduced to 10°C . The culture was incubated overnight and following confirmation of inactivation, the pH of the culture was adjusted to between 6.4 and 6.8, as necessary, with 50% acetic acid. The temperature of the fermentor was increased to $20^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$ and the contents were
20 transferred to the clarification hold tank.

The contents of the clarification hold tank (including the cellular debris) were processed through a centrifuge at a flow rate between 25 and 600 liters per hour (except Serotype 4, wherein the cell debris was discarded and the flow rate tightened to between 25 and 250 liters per hour). Samples of the supernatant were removed
25 and tested for OD. The desired OD during the centrifugation was ≤ 0.15 .

Initially, the supernatant was recirculated through a depth filter assembly until an OD of 0.05 ± 0.03 was achieved. Then the supernatant was passed through the depth filter assembly and through a $0.45\ \mu\text{m}$ membrane filter to the filtrate hold tank.

Subsequently, the product was transferred through closed pipes to the
30 purification area for processing.

All of the above operations (centrifugation, filtration and transfer) were performed between 10°C to 30°C .

For an alternate fermentation and harvesting process for serotypes 4 and 6B, see the alternate process described in Example 1.

Purification

5 The purification of each pneumococcal polysaccharide consisted of several concentration/diafiltration operations, precipitation/elution, column chromatography, and depth filtration steps. All procedures were performed at room temperature unless otherwise specified.

10 Clarified broth from the fermentor cultures of the desired *S. pneumoniae* serotype was concentrated and diafiltered using a 100 kDa MWCO filter. Diafiltration was accomplished using sodium phosphate buffer at pH < 9.0. Diafiltration removed the low molecular weight medium components from the higher molecular weight biopolymers such as nucleic acid, protein and polysaccharide.

15 The polysaccharide was precipitated from the concentrated and diafiltered solution by adding HB from a stock solution to give a final concentration of 1% HB (w/v) (except Serotype 23F, which had a final concentration of 2.5%). The polysaccharide/HB precipitate was captured on a depth filter and the filtrate was discarded. (Note: Serotype 14 does not precipitate; therefore the filtrate was retained.) The polysaccharide precipitate was resolubilized and eluted by
20 recirculating a sodium chloride solution through the precipitate-containing depth filter. The filters were then rinsed with additional sodium chloride solution.

25 Sodium iodide (NaI) was added to the polysaccharide solution from a stock NaI solution to achieve a final concentration of 0.5% to precipitate HB (except for Serotype 6B, which had a final concentration of 0.25%). The precipitate was removed by depth filtration. The filtrate contained the target polysaccharide. The filter was discarded. The polysaccharide was then filtered through a 0.2µm filter.

 The polysaccharide solution was concentrated on a 30 kDa MWCO ultrafilter and diafiltered with a sodium chloride solution.

30 The partially purified polysaccharide solution was further purified by filtration through a depth filter impregnated with activated carbon. After filtration, the carbon filter was rinsed with a sodium chloride solution. The rinse was combined with the polysaccharide solution, which was then filtered through a 0.2µm filter.

00056

The polysaccharide solution was concentrated on a 30 kDa MWCO ultrafilter and the filter was rinsed with a sodium chloride solution. The pH was checked and adjusted to 7.0 ± 0.3 .

5 The ceramic hydroxyapatite (HA) column was equilibrated with sodium phosphate buffer containing sodium chloride until the pH is 7.0 ± 0.3 and the conductivity was $26 \pm 4 \mu\text{S}$. The polysaccharide solution was then loaded onto the column. Under these conditions, impurities bound to the resin and the polysaccharide was recovered in the flow through from the column. The polysaccharide solution was filtered through a $0.2 \mu\text{m}$ filter.

10 The polysaccharide solution was concentrated using a 30 kDa MWCO filter. The concentrate was then diafiltered with WFI until the conductivity was $< 15 \mu\text{S}$.

The diafiltered polysaccharide solution was filtered through a $0.2 \mu\text{m}$ membrane filter into bulk containers and stored at $2-8^\circ\text{C}$.

15

Example 14

Preparation of Pneumococcal Saccharide – CRM₁₉₇ Conjugates For Serotypes 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F and 23F

Activation Process

20 The different serotype saccharides follow different pathways for activation (hydrolysis or no hydrolysis prior to activation) and conjugation (aqueous or DMSO reactions) as described in this example.

Polysaccharide was transferred from the bulk containers to the reactor vessel. The polysaccharide was then diluted in WFI and sodium phosphate to a final
25 concentration range of 1.6 - 2.4 mg/mL.

Step 1.

For serotypes 6B, 9V, 14, 19F and 23F, pH was adjusted to $\text{pH } 6.0 \pm 0.3$.

30 For serotype 4, hydrochloric acid (0.01 M final acid concentration) was added and the solution was incubated for 25 - 35 minutes at $45^\circ \pm 2^\circ\text{C}$. Hydrolysis was stopped by cooling to $21 - 25^\circ\text{C}$ and adding 1M sodium phosphate to a target of $\text{pH } 6.7 \pm 0.2$. An in-process test was done to confirm an appropriate level of depyruvylation.

For serotype 18C, glacial acetic acid (0.2 M final acid concentration) was added and the solution was incubated for 205 - 215 minutes at $94^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Temperature was then decreased to $21 - 25^{\circ}\text{C}$ and 1 - 2 M sodium phosphate was added to a target of $\text{pH } 6.8 \pm 0.2$.

5

Step 2: Periodate Reaction

The required sodium periodate molar equivalents for pneumococcal saccharide activation was determined using total saccharide content (except for serotype 4). For serotype 4, a ratio of 0.8-1.2 moles of sodium periodate per mole of saccharide was used. With thorough mixing, the oxidation reaction was allowed to proceed between 16 to 20 hours at $21 - 25^{\circ}\text{C}$ for all serotypes except 19F for which the temperature was $\leq 15^{\circ}\text{C}$.

10

Step 3: Ultrafiltration

The oxidized saccharide was concentrated and diafiltered with WFI (0.01 M sodium phosphate buffer $\text{pH } 6.0$ for serotype 19F) on a 100 kDa MWCO ultrafilter (5 kDa ultrafilter for 18C). The permeate was discarded and the retentate was filtered through a $0.22 \mu\text{m}$ filter.

15

Step 4: Lyophilization

For serotypes 4, 9V, and 14 the concentrated saccharide was mixed with CRM₁₉₇ carrier protein, filled into glass bottles, shell-frozen and stored at $\leq -65^{\circ}\text{C}$. The frozen concentrated saccharide-CRM₁₉₇ was lyophilized and then stored at $-25^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$.

20

For serotypes 6B, 19F, and 23F a specified amount of sucrose was added which was calculated to achieve a $5\% \pm 3\%$ sucrose concentration in the conjugation reaction mixture. Serotype 18C did not require sucrose addition. The concentrated saccharide was then filled into glass bottles, shell-frozen and stored at $\leq -65^{\circ}\text{C}$. The frozen concentrated saccharide was lyophilized and then stored at $-25^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$.

25

30

Conjugation Process

Two conjugation processes were used: aqueous conjugation for serotypes 4, 9V, 14 and 18C, and DMSO conjugation for serotypes 6B, 19F and 23F.

Aqueous Conjugation

Step 1: Dissolution

For serotypes 4, 9V and 14, the lyophilized activated saccharide-CRM₁₉₇ mixture
5 was thawed and equilibrated at room temperature. The lyophilized activated
saccharide-CRM₁₉₇ was then reconstituted in 0.1M sodium phosphate buffer at a
typical ratio of:

- 1L of buffer per 16 - 24 g of saccharide for serotype 4 and 9V
- 1L of buffer per 6 - 10 g of saccharide for serotype 14

10

The reaction mixture was incubated at $37^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ until total dissolution for the
serotype 9V and at $23^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ for serotypes 4 and 14.

For serotype 18C, the lyophilized saccharide was reconstituted in a solution of
CRM₁₉₇ in 1M dibasic sodium phosphate at a typical ratio of 0.11 L of sodium
15 phosphate per 1 L of CRM₁₉₇ solution. The reaction mixture (8-12 g/L saccharide
concentration) was incubated at $23^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ until total dissolution.

The pH was tested as an in-process control at this stage.

Step 2: Conjugation Reaction

20 For serotypes 4 and 9V, the conjugation reaction was initiated by adding the
sodium cyanoborohydride solution (100 mg/mL) to achieve 1.0 - 1.4 moles sodium
cyanoborohydride per mole of saccharide. The reaction mixture was incubated for
44 - 52 hours at $37^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. The temperature was then reduced to $23^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ and
sodium chloride 0.9% was added to the reactor. Sodium borohydride solution (100
25 mg/mL) was added to achieve 1.8 - 2.2 molar equivalents of sodium borohydride per
mole saccharide. The mixture was incubated for 3 - 6 hours at $23^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. The
mixture was diluted with sodium chloride 0.9% and the reactor was rinsed. The
diluted conjugation mixture was filtered using a 1.2 μm pre-filter into a holding vessel.

For serotypes 14 and 18C, the conjugation reaction was initiated by adding the
30 cyanoborohydride solution (100 mg/mL) to achieve 1.0 - 1.4 moles of sodium
cyanoborohydride per mole of saccharide. The reaction mixture was incubated for
12 - 24 hours at $23^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. The temperature was increased to $37^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ and the
reaction was incubated for 72 - 96 hours. The temperature was then reduced to 23°

nnn59

± 2°C and 0.9% sodium chloride was added to the reactor. Sodium borohydride solution (100mg/mL) was added to achieve 1.8 - 2.2 molar equivalents of sodium borohydride per mole of saccharide. The mixture was incubated for 3 - 6 hours at 23° ± 2°C. The mixture was diluted with 0.9% sodium chloride and the reactor was
5 rinsed. The diluted conjugation mixture was then filtered using a 1.2 µm pre-filter into a holding vessel.

Step 3: Ultrafiltration 100 kDa

The diluted conjugation mixture was concentrated and diafiltered on a 100 kDa
10 MWCO ultrafilter with either a minimum of 15 volumes (serotype 4) or 40 volumes (serotypes 9V, 14, and 18C) of 0.9% sodium chloride.

The permeate was discarded.

For serotype 4, the retentate was filtered through a 0.45µm filter.

An in-process control (saccharide content) was performed at this step.

15

Step 4: HA Column Purification

This step was only performed for the serotype 4 conjugate.

The HA column was first neutralized using 0.5M sodium phosphate buffer (pH 7.0 ± 0.3) and then equilibrated with 0.9% sodium chloride. The filtered retentate
20 (serotype 4) was loaded onto the column at a flow rate of 1.0 L/min. The column was washed with 0.9% sodium chloride at a flow rate of ≤ 2.0 L/min. The product was then eluted with 0.5M sodium phosphate buffer at a flow rate of ≤ 2.0 L/min.

The HA fraction was then concentrated and diafiltered on a 100 kDa MWCO membrane with a minimum of 20 volumes of 0.9% sodium chloride. The permeate
25 was discarded.

Step 5: Sterile Filtration

The retentate after the 100 kDa MWCO diafiltration was filtered through a 0.22µm filter. In-process controls (saccharide content, free protein, free saccharide
30 and cyanide) were performed on the filtered product. In-process controls on filtered retentate were performed to determine whether additional concentration, diafiltration, and/or dilution were needed to meet FBC targets. These and additional tests were repeated in FBC samples.

nnn50

As necessary, the filtered conjugate was diluted with 0.9% sodium chloride in order to achieve a final concentration of less than 0.55 g/L. Release tests for saccharide content, protein content and saccharide:protein ratio were performed at this stage.

- 5 Finally, the conjugate was filtered (0.22 μ m) and filled into 10 L stainless steel canisters at a typical quantity of 2.64 g/canister. At this stage, yield, saccharide content, protein content, pH, saccharide:protein ratio and lysine content were performed as in-process controls. Release testing (appearance, free protein, free saccharide, endotoxin, molecular size determination, residual cyanide, saccharide
10 identity, CRM₁₉₇ identity) was performed at this stage.

DMSO Coniugation

Step I: Dissolution

- The lyophilized activated saccharide serotypes 6B, 19F, 23F and the lyophilized
15 CRM₁₉₇ carrier protein were equilibrated at room temperature and reconstituted in DMSO. The dissolution concentration typically ranged from 2-3 grams of saccharide (2-2.5 g protein) per liter of DMSO.

Step II: Conjugation Reaction

- 20 The activated saccharide and CRM₁₉₇ carrier protein were mixed for 60 - 75 minutes at 23° $\pm$ 2°C at a ratio range of 0.6 g – 1.0 g saccharide/g CRM₁₉₇ for serotypes 6B and 19F or 1.2 to 1.8 g saccharide/g CRM₁₉₇ for serotype 23F.

- The conjugation reaction was initiated by adding the sodium cyanoborohydride solution (100mg/mL) at a ratio of 0.8 - 1.2 molar equivalents of sodium
25 cyanoborohydride to one mole activated saccharide. WFI was added to the reaction mixture to a target of 1% (v/v) and the mixture was incubated for over 40 hours at 23° $\pm$ 2°C.

- Sodium borohydride solution, 100 mg/mL (typical 1.8 - 2.2 molar equivalents sodium borohydride per mole activated saccharide) and WFI (target 5% v/v) were
30 added to the reaction and the mixture was incubated for 3 - 6 hours at 23° $\pm$ 2°C. This procedure reduced any unreacted aldehydes present on the saccharides. Then the reaction mixture was transferred to a dilution tank containing 0.9% sodium chloride at < 15°C.

00061

Step III: 100 kDa Ultrafiltration

5 The diluted conjugate mixture was filtered through a 1.2 μ m filter and concentrated and diafiltered on a 100 kDa MWCO membrane with a minimum of 15 volumes of 0.9% sodium chloride (0.01M sodium phosphate/0.05M NaCl buffer was used for serotype 23F). The permeate was discarded. The retentate was filtered through a 0.45 μ m filter. An in-process saccharide content sample was taken at this stage.

10 *Step IV: DEAE Column Purification*

This step was only performed for serotype 23F.

The DEAE column was equilibrated with 0.01M sodium phosphate/0.05M sodium chloride buffer. The filtered retentate (serotype 23F) was loaded onto the column and washed with 0.01M sodium phosphate/0.05M sodium chloride buffer.

15 The column was then washed with 0.01M sodium phosphate/0.9% NaCl buffer. The product was then eluted with 0.01M sodium phosphate/0.5M sodium chloride buffer.

Step V: 100 kDa Ultrafiltration

The retentate from 6B and 19F was concentrated and diafiltered with at least 30 volumes of 0.9% sodium chloride. The permeate was discarded.

20 The eluate from serotype 23F was concentrated and diafiltered with a minimum of 20 volumes of 0.9% sodium chloride. The permeate was discarded.

Step VI: Sterile Filtration

25 The retentate after the 100 kDa MWCO dialfiltration was filtered through 0.22 μ m filter. In-process controls (saccharide content, free protein, free saccharide, residual DMSO and residual cyanide) were performed on the filtered product. In-process controls on filtered retentate were performed to determine whether additional concentration, diafiltration, and/or dilution were needed to meet FBC targets. These and additional tests were repeated in FBC samples.

30 As necessary, the filtered conjugate was diluted with 0.9% sodium chloride to achieve a final concentration of less than 0.55 g/L. Release tests for saccharide content, protein content and saccharide:protein ratio were performed at this stage.

Finally, the conjugate was filtered (0.22 μ m) and filled into 10 L stainless steel canisters at a quantity of 2.64 g/canister. At this stage, yield, saccharide content, protein content, pH, saccharide:protein ratio and lysine content were performed as in-process controls. Release testing (appearance, free protein, free saccharide, endotoxin, molecular size determination, residual cyanide, residual DMSO, saccharide identity and CRM₁₉₇ identity) was performed at this stage.

Example 15

Formulation of a Multivalent Pneumococcal Conjugate Vaccine

The final bulk concentrates of the 13 conjugates contain 0.85% sodium chloride. Type 3, 6A, 7F and 19A bulk concentrates also contain 5 mM sodium succinate buffer at pH 5.8. The required volumes of bulk concentrates were calculated based on the batch volume and the bulk saccharide concentrations. After 80% of the 0.85% sodium chloride (physiological saline) and the required amount of succinate buffer were added to the pre-labeled formulation vessel, bulk concentrates were added. The preparation was then sterile filtered through a 0.22 μ m membrane into a second container by using a Millipore Durapore membrane filter unit. The first container was washed with the remaining 20% of 0.85% sodium chloride and the solution was passed through the same filter and collected into the second container. The formulated bulk was mixed gently during and following the addition of bulk aluminum phosphate. The pH was checked and adjusted if necessary. The formulated bulk product was stored at 2-8°C.

The formulated bulk product was filled into Type 1 borosilicate glass syringes obtained from Becton Dickinson. The vaccine was monitored at regular intervals for turbidity to ensure the uniformity of the filling operation. The filled vaccine (Final Product) was stored at 2-8°C.

Example 16

Immunogenicity of the 13-Valent Conjugate Vaccine

To date, the preclinical studies performed on the 13vPnC vaccine have been in rabbits. Studies #HT01-0021 and #HT01-0036 were designed to independently examine the effect of chemical conjugation of capsular polysaccharides (PSs) from *S. pneumoniae* to CRM₁₉₇ and the effect of aluminum phosphate (AlPO₄) adjuvant on the immune response to the 13vPnC vaccine in rabbits. These effects were

00003

characterized by antigen-specific ELISA for serum IgG concentrations and for antibody function by opsonophagocytic assay (OPA).

Study #HT01-0021

Study #HT01-0021 examined the ability of the 13vPnC vaccine with AlPO₄ adjuvant to elicit vaccine serotype-specific immune responses. The pneumococcal serotypes represented in the 13vPnC vaccine include types 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F and 23F. Secondary objectives included an evaluation of the kinetics and duration of the antibody response. New Zealand White rabbits were immunized intramuscularly at week 0 and week 2 with the planned human clinical dose of each polysaccharide (2 µg of each PS, except 4 µg of 6B) formulated with or without AlPO₄ (100 µg /dose). Sera were collected at various time points. Serotype specific IgG was measured by ELISA and functional activity was assessed by OPA.

Table 3 shows the geometric mean titer (GMT) achieved in pooled serum samples, following two doses of the 13vPnC vaccine. A ratio of the IgG GMTs was used to compare responses from week 4 to week 0. These data demonstrate that the inclusion of AlPO₄ in the 13vPnC formulation elicited higher levels of IgG antibody in comparison to the same vaccine without adjuvant. Although the antibody responses were greater when AlPO₄ was included in the formulation, these increases were not statistically significant.

Functional antibody responses were also assessed in rabbits following immunization with the two 13vPnC formulations (Table 4). When comparing vaccine formulations with or without adjuvant, higher OPA GMTs were observed in the 13vPnC + AlPO₄ vaccine treatment group. OPA titers were detected in week 4 serum pools to all vaccine serotypes in both groups. For the majority of the serotypes, OPA titers measured at week 4 were at least 4-fold higher than those at week 0 (baseline).

The kinetic responses to each of the 13vPnC vaccine serotypes were evaluated from serum pools of both treatment groups. IgG titers to each serotype were measured from blood draws at week 0 and weeks 1, 2, 3, 4, 8, 12, 26, and 39 and then compared. With the exception of serotype 1, antibody responses in

animals receiving adjuvanted vaccine were superior to those that received non-adjuvanted vaccine and peaked at week 2 of the immunization schedule (data not shown).

- 5 Overall, the data indicate that the 13vPnC vaccine formulated with aluminum phosphate is immunogenic in rabbits, eliciting substantial antibody responses to the pneumococcal capsular polysaccharides contained in the vaccine and these responses are associated with functional activity. The responses observed to the seven core serotypes following immunization with 13vPnC + AlPO₄ are consistent with historical responses of rabbits to the heptavalent formulation.

Table 3. Rabbit IgG Immune Responses (GMTs) Following Immunization with Two Doses of 13-valent Pneumococcal Glycoconjugate

Serotype	Diluent with ALPO ₄ ^a			13vPnC ^a			13vPnC + ALPO ₄ ^a		
	Week 0	Week 4	Ratio Wk4:Wk0	Week 0	Week 4 (95% CI)	Ratio Wk4:Wk0	Week 0	Week 4 (95% CI)	Ratio 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: GMTs of pooled sera consisted of equal volumes of serum from each individual rabbit within a group

b: Statistically different (p=0.022) from treatment group without ALPO₄

Table 4. *S. pneumoniae* OPA GMTs for NZW Rabbit Serum Pools Following Immunization with Two Doses of 13-valent Pneumococcal Glycoconjugate

Serotype	13vPnC ^a			13vPnC + ALPO ₄ ^a		
	Week 0	Week 4	Ratio Wk4:Wk0	Week 0	Week 4	Ratio 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
9V	8	64	8	8	128	16
14	16	32	2	16	32	2
18C	8	256	32	<8	256	64
19A	<8	256	64	<8	1,024	256
19F	<8	128	32	<8	512	128
23F	8	64	8	<8	256	64

A: Pools consisted of equal volumes of serum from individual rabbits within a treatment group (n=12)

5

Study #HT01-0036

Study #HT01-0036 compared rabbit immune responses to the polysaccharides (PSs) contained in the vaccine, after immunization with the 13vPnC vaccine with or without conjugation to the CRM₁₉₇ protein. New Zealand White rabbits were immunized intramuscularly at week 0 and week 2 with a dose of 2.2 µg of each PS (except 4.4 µg of 6B). Animals received one of three vaccine preparations: (a) 13vPnC (PS directly conjugated to CRM₁₉₇), (b) 13vPnPS, (free PS) or (c) 13vPnPS + CRM₁₉₇ (free PS mixed with CRM₁₉₇). All vaccine preparations contained AIPO₄ as the adjuvant at 125 µg/dose.

Serotype specific immune responses for all vaccine preparations were evaluated in an IgG ELISA and complement-mediated OPA measuring functional antibody. The immune responses were compared between the treatment groups.

Table 5 presents GMT data obtained from week 4 bleeds analyzed in antigen specific IgG ELISAs. Additional analyses show the ratio of GMT values at week 4 to week 0. The data indicate that the conjugate vaccine preparation elicited greater serum IgG titers than free PS or free PS + CRM₁₉₇ vaccine. With the exception of *S.*

000057

pneumoniae type 14, the 13vPnC vaccine was able to induce functional antibodies to the representative strains of *S. pneumoniae* in an OPA (Table 6). After two immunizations with either the 13vPnPS or 13vPnPS + CRM₁₉₇ vaccine, neither could induce OPA titers $\geq$ 8-fold at week 4 relative to week 0 for 10 out of the 13 serotypes measured (Table 6).

In conclusion, these results indicate that conjugation of the 13-valent pneumococcal vaccine polysaccharides produces higher serum IgG titers and overall greater functional antibody activity than seen with free polysaccharide alone or mixed with unconjugated CRM₁₉₇.

000058

Table 5. Rabbit IgG Responses (GMTs) to PnPS by ELISA Following Immunization with Two Doses of 13-valent Pneumococcal Glycoconjugate

Serotype	13vPnPS (free PS)			13vPnPS = CRM ¹⁸⁷ (PS mixed with CRM ₉₇)			13vPnC		
	Week 0	Week 4	Ratio Wk4:Wk0	Week 0	Week 4	Ratio Wk4:Wk0	Week 0	Week 4	Ratio Wk4:Wk0
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 (64-808)	4.2	89	163 (74-358)	1.8	50	10,414 (10,414-16,676)	208.3
4	50	379 (150-959)	7.6	50	607 (313-1,178)	12.1	50	12,890 (9,117-18,224)	257.8
5	343	226 (113-450)	4.5	50	321 (147-701)	6.4	50	35,264 (24,467-50,824)	705.3
6A	154	466 (316-688)	3.0	98	210 (95-464)	2.1	163	234,245 (167,152-328,283)	1,437.1
6B	63	727 (384-1,375)	11.6	62	745 (384-1,440)	12.0	131	33,599 (22,934-49,222)	256.5
7F	50	61 (39-95)	1.2	50	72 (47-111)	1.4	50	35,702 (24,350-52,347)	714.0
9V	50	104 (48-195)	2.1	55	169 (74-390)	3.0	50	50,033 (34,765-72,007)	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

Table 6. *S. pneumoniae* OPA Titers for Rabbit Serum Pools Following Immunization with Two Doses of 13-valent Pneumococcal Vaccines

Serotype	OPA Titers						
	No Treatment	13vPnPS (free PS)		13vPnPS + CRM ₁₉₇ (free PS mixed with CRM ₁₉₇)		13vPnC	
	Week 0 ^a	Week 4	Ratio Wk4:Wk0	Week 4	Ratio Wk4:Wk0	Week 4	Ratio 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: Used as week 0 values for all groups

5 It should be understood that the foregoing discussion and examples merely present a detailed description of certain embodiments. It therefore should be apparent to those of ordinary skill in the art that various modifications and equivalents can be made without departing from the spirit and scope of the invention.

10 All journal articles, other references, patents and patent applications that are identified in this patent application are incorporated by reference in their entirety.

REFERENCES

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.

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.
- 5 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.
- 10 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.
- 15 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.
- 20 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.
- 25 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.

000072

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, Magyarlaci M. Identification of cross-reactive antibodies with low opsonophagocytic activity for *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 1997; 176:698-703.
23. Yu X, Gray B, Chang S, Ward JI, 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.
- 5 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.
- 10 28. Saeland E, Jakobsen H, Ingolfsdottir G, Sigurdardottir ST, Jonsdottir I. Serum samples from infants vaccinated with a pneumococcal conjugate vaccine, PncT, protect mice against invasive infection caused by *Streptococcus pneumoniae* serotypes 6A and 6B. *J Infect Dis* 2001; 183:253-60.
- 15 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.
- 20 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.
- 25 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.

What is claimed is:

1. A multivalent immunogenic composition, comprising: 13 distinct polysaccharide-protein conjugates, together with a physiologically acceptable vehicle, wherein each of the conjugates comprises a capsular polysaccharide from a different serotype of *Streptococcus pneumoniae* conjugated to a carrier protein, and the capsular polysaccharides are prepared from serotypes 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F and 23F.
2. The immunogenic composition of claim 1, wherein the carrier protein is CRM₁₉₇.
3. The immunogenic composition of claim 1, further comprising an adjuvant.
4. The immunogenic composition claim 3, wherein the adjuvant is an aluminum-based adjuvant.
5. The immunogenic composition of claim 4, wherein the adjuvant is selected from the group consisting of aluminum phosphate, aluminum sulfate and aluminum hydroxide.
6. The immunogenic composition of claim 5, wherein the adjuvant is aluminum phosphate.
7. A method of inducing an immune response to a *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide conjugate, comprising administering to a human an immunologically effective amount of the immunogenic composition of claim 1.
8. The method of claim 7, wherein the immunogenic composition administered is a single 0.5 mL dose formulated to contain: 2 µg of each saccharide, except for 6B at 4 µg; approximately 29 µg CRM₁₉₇ carrier protein; 0.125 mg of elemental aluminum (0.5 mg aluminum phosphate) adjuvant; and sodium chloride and sodium succinate buffer as excipients.

9. A multivalent immunogenic composition, comprising polysaccharide-protein conjugates together with a physiologically acceptable vehicle, wherein each of the conjugates comprises a capsular polysaccharide from a different serotype of *Streptococcus pneumoniae* conjugated to a carrier protein, and the capsular polysaccharides are prepared from serotype 3 and at least one additional serotype.
10. The immunogenic composition of claim 9, wherein the additional serotype is selected from the group consisting of serotypes 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, and 23F.
11. The immunogenic composition of claim 9, wherein the carrier protein is CRM₁₉₇.
12. The immunogenic composition of claim 9, further comprising an adjuvant.
13. The immunogenic composition claim 12, wherein the adjuvant is an aluminum-based adjuvant.
14. The immunogenic composition of claim 13, wherein the adjuvant is selected from the group consisting of aluminum phosphate, aluminum sulfate and aluminum hydroxide.
15. The immunogenic composition of claim 14, wherein the adjuvant is aluminum phosphate.
16. A method of inducing an immune response to a *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide conjugate, comprising administering to a human an immunologically effective amount of the immunogenic composition of claim 9.
17. The method of claim 16, wherein the immunogenic composition administered is a single 0.5 mL dose formulated to contain: 2 µg of each saccharide,

except for 6B at 4 µg; approximately 29 µg CRM₁₉₇ carrier protein; 0.125 mg of elemental aluminum (0.5 mg aluminum phosphate) adjuvant; and sodium chloride and sodium succinate buffer as excipients.

- 5 18. A multivalent immunogenic composition, comprising polysaccharide-protein conjugates together with a physiologically acceptable vehicle, wherein each of the conjugates comprises a capsular polysaccharide from a different serotype of *Streptococcus pneumoniae* conjugated to a carrier protein, and the capsular polysaccharides are prepared from serotypes 4, 6B, 9V, 14, 10 18C, 19F, 23F and at least one additional serotype.
19. The immunogenic composition of claim 18, wherein said additional serotype is selected from the group consisting of serotypes 1, 3, 5, 6A, 7F, and 19A.
- 15 20. The immunogenic composition of claim 18, wherein the carrier protein is CRM₁₉₇.
21. The immunogenic composition of claim 18, further comprising an adjuvant.
- 20 22. The immunogenic composition claim 21, wherein the adjuvant is an aluminum-based adjuvant.
23. The immunogenic composition of claim 22, wherein the adjuvant is selected from the group consisting of aluminum phosphate, aluminum sulfate and 25 aluminum hydroxide.
24. The immunogenic composition of claim 23, wherein the adjuvant is aluminum phosphate.
- 30 25. A method of inducing an immune response to a *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide conjugate, comprising administering to a human an immunologically effective amount of the immunogenic composition of claim 18.

26. The method of claim 25, wherein the immunogenic composition administered is a single 0.5 mL dose formulated to contain: 2 μ g of each saccharide, except for 6B at 4 μ g; approximately 29 μ g CRM₁₉₇ carrier protein; 0.125 mg of elemental aluminum (0.5 mg aluminum phosphate) adjuvant; and sodium chloride and sodium succinate buffer as excipients.
- 5

000079

1/3

Changes in IPD Rates by Serotype in US Children <2 years
of Age from Baseline (1998/1999) to 2001 (ABCs Surveillance)

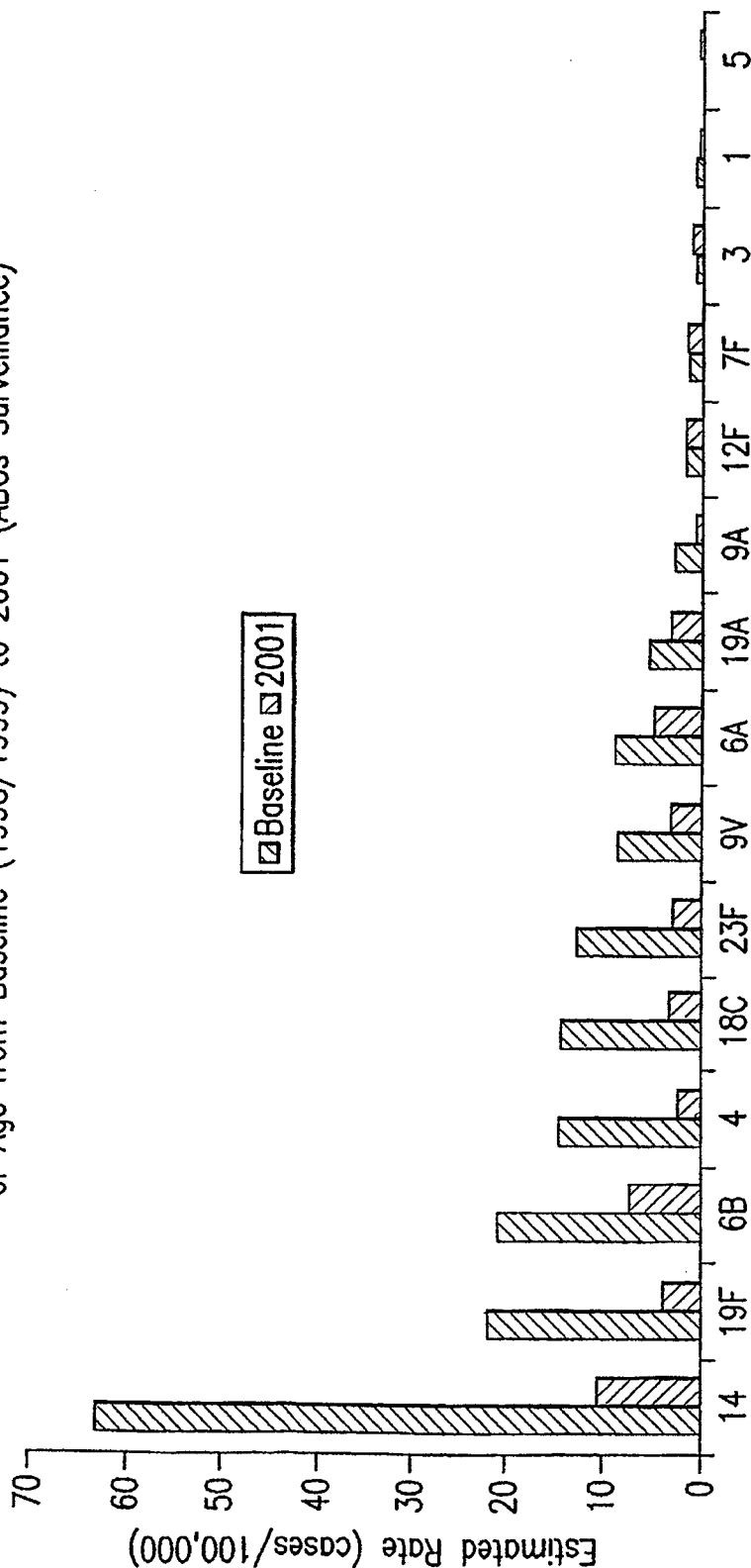


FIG.1

Distribution of Pneumococcal Isolates with Resistance to PCN in Children <5 years (1998)

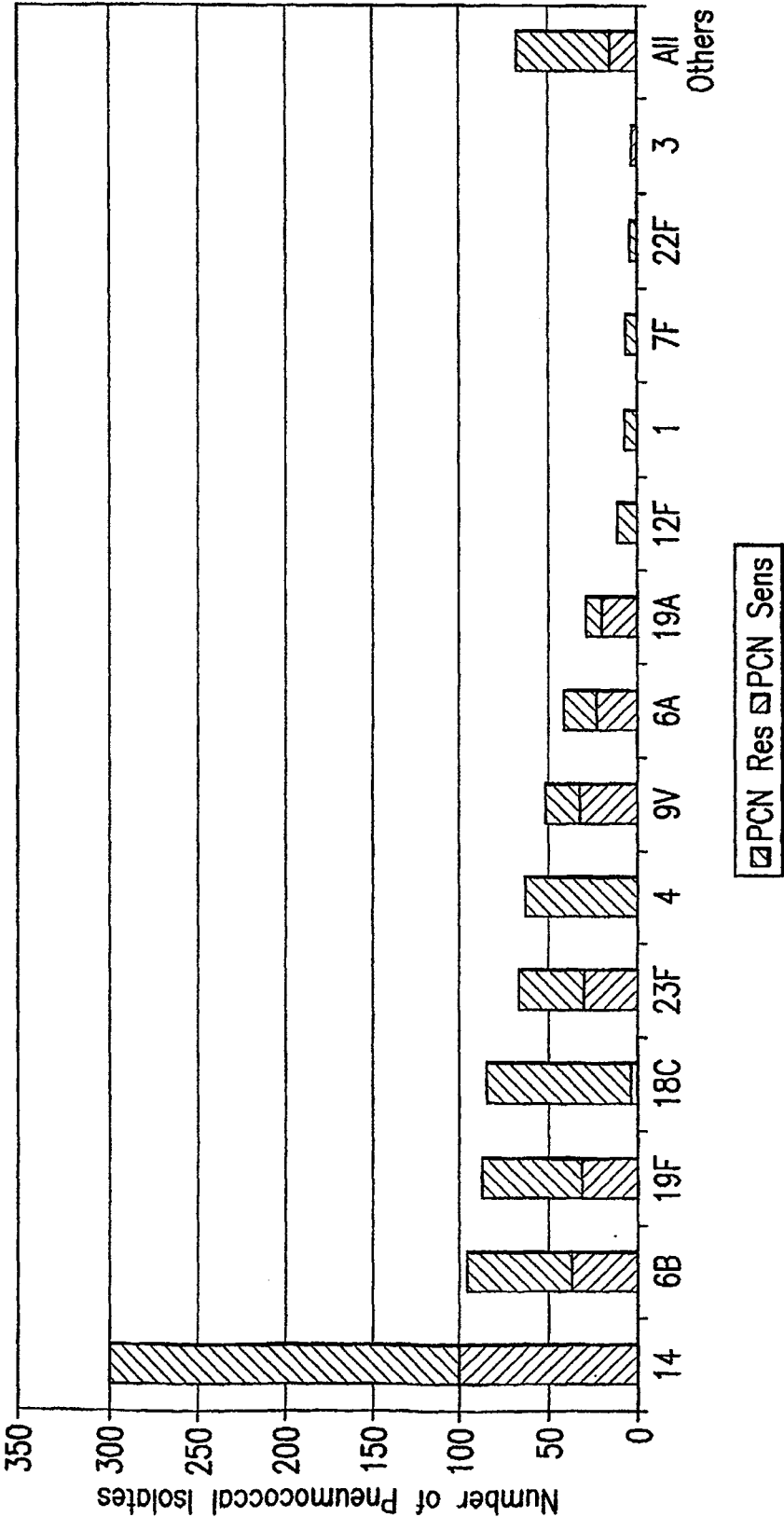


FIG.2

000081

3/3

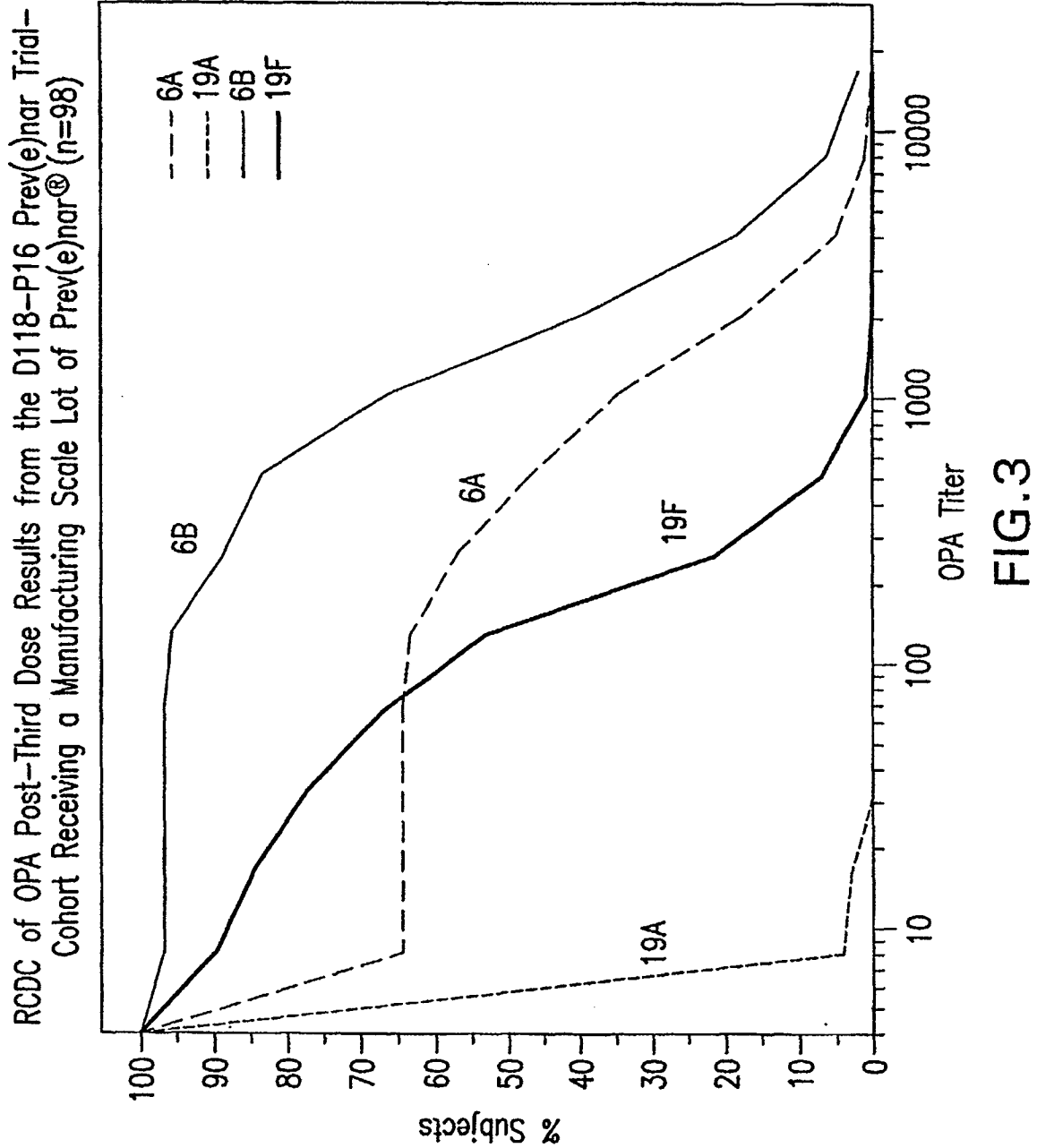


FIG.3

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

000083

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].

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) [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 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 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

nnnqz

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,

- 000085

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.

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 Prevnar.

000088

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

5

Los datos provenientes de la vigilancia IPD entre 1995-1998 estimaron que los siete serotipos en Prevnar 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 Prevnar contaron con el 90% de todos los casos de IPD en recién nacidos y niños jóvenes [10]. Desde la introducción de la vacuna Prevnar 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 Prevnar 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

nnnng

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

nnngg

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

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.

Inclusión de los Serotipos 6A y 19A

a. Epidemiología de los Serotipos 6A y 19A

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,

000002

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

. . . 000093

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

nnnnq4

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

nnnq5

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.

nnnq6

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

10

nnnnq7

inmunizados si ellos habían recibido por lo menos una dosis de Pevnar) 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 Pevnar 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

15

Un análisis publicado [3] del uso de Pevnar 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

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

nnnag

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.

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 (β 197) 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.

00101

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/elución, cromatografía de columna, y filtración profunda. Ver los ejemplos adelante.

nn102

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

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 RibiTM (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 (MPLTM) descrito en la Patente U.S. No. 4,912,094
(Corixa), dimicolato de trehalosa (TDM), y esqueleto de pared
celular (CWS), preferiblemente MPL + CWS (DetoxTM);

25

(3) Adyuvantes de saponina, tales como Quil A o
ESTIMULONTM 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);

00104

(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

nn105

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).

00106

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.

00107

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;

- 00108

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 5 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.

nn1ng

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.

15

EJEMPLOS

Ejemplo 1

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

20

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

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.

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 terminó después de cesar el crecimiento o cuando se alcanzó el volumen de trabajo del fermentador. 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 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 13°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,

00112

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

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

00113

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 .

00114

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.

00115

La solución de polisacárido se concentró utilizando un filtro MWC0 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 μm 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
15 protones de la molécula de polisacárido. El espectro $^1\text{H-NMR}$ 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.

n0116

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

00117

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.

00118

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

00120

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.

15

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

00121

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.

00122

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 fue purificada además 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 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 ± 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 ($<15 \mu\text{S}$). 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. El polisacárido fue fluido a través de la

25

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.

25

La cromatografía de filtración de gel de alto desempeño 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.

00124

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

00125

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 coliofilizadas 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.

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.

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

00126

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.

15

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 aproximadamente 7.0 se mantuvo con NaOH 3N. Después de que se
15 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 NaHCO_3 de 10mM. El pH se mantuvo con NaOH 3N. La fermentación se terminó luego de cesar el crecimiento y cuando el volumen
20 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 lisar las células bacterianas y liberar el polisacárido asociado a la célula. Después de lisar, los contenidos del
25 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

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.

00129

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

00130

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

00131

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

00132

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

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

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.

00134

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 se purificó adicionalmente mediante filtración a través de un
10 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 $\pm$
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 μS). La
25 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

00135

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.

Ejemplo 10

Preparación del Conjugado de Sacárido Neumocócico Serotipo 7F

- CRM₁₉₇

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.

- 00136

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.

00137

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.

nn138

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.

00139

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.

00141

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.

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.

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 .

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

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
5 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
10 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
15 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
25 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.

00144

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 μ m.

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 $26 \pm 4 \mu$ 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 μ m.

00145

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 $\text{pH } 6.0 \pm 0.3$.

00146

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

- 00147

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.

Etapas 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.

00148

Conjugación 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.

Etapa 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

- 00150

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

- 00151

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

El retenido después de diafiltración MWCO de 100 kDa se filtró a través de un filtro de 0.22 μm . 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, diafiltración, y/o dilución eran necesarias para cumplir los objetivos FBC. Estas y pruebas adicionales se repitieron en muestras FBC.

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 esta etapa.

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

00152

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

00153

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
10 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 **Etapas 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
20 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

Etapas IV: Purificación de Columna DEAE

Esta etapa se desarrolló solamente para el serotipo 23F.

00154

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

00155

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 μ m) 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

00156

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 μ m 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

00157

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

El estudio #HT01-0021 examinó la capacidad de la vacuna 13vPnC con el adyuvante AlPO₄ para elicitare 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.

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

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
5 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
10 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
15 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).

20 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
25 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).

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%Cl)	Proporción Wk4:Wk0	Semana 0	Semana 4 (95% Cl)	Proporción Wk4:Wk0	Semana 0	Semana 4 (95% Cl)	Proporción Wk4:Wk0
1	< 100	< 100	1.0	50	5,926 (2,758-12,733)	119	50	11,091 (5,327-23,093)	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)	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)	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)	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)	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)	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)	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)	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)	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)	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)	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)	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)	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

nn161

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.

nn152

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 (95%CI)	Proporción Wk4:Wk0	Semana 0	Semana 4 (95%CI)	Proporción Wk4:Wk0	Semana 0	Semana 4 (95%CI)	Proporción Wk4:Wk0
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

00164

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

Títulos OPA							
Serotipo	Sin	13vPnPS (PS		13vPnPS + CRM ₁₉₇		13vPnC	
	tratamiento	libre)		(PS libre			
		libre)		mezclado con			
		CRM ₁₉₇					
	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.

nn156

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.

00157

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.

nn188

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, Quarley MK, Liebeler CL, Le CT. Immunogenicity and efficacy of *Streptococcus pneumoniae* polysaccharide-protein conjugate vaccines against homologous and heterologous serotypes in the chinchilla otitis media model. *J Infect Dis* 1996; 173:119-27.
28. Saeland E, Jakobsen H, 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. Pillishvili 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.

REIVINDICACIONES:

1. Una composición inmunogénica multivalente, que
comprende: 13 diferentes conjugados de polisacárido-
5 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
10 los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A,
19F y 23F.
2. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, en
donde la proteína portadora es CRM₁₉₇.
- 15 3. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, que
comprende además un adyuvante.
4. La composición inmunogénica de la reivindicación 3, en
20 donde el adyuvante es una adyuvante a base de aluminio.
5. La composición inmunogénica de la reivindicación 4, en
donde el adyuvante se selecciona del grupo que consiste
de fosfato de aluminio, sulfato de aluminio e hidróxido
25 de aluminio.
6. La composición inmunogénica de la reivindicación 5, en
donde el adyuvante es fosfato de aluminio.

7. 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 la composición inmunogénica de la reivindicación 1.

8. El método de la reivindicación 7, en donde la composición inmunogénica administrada es una dosis de 0.5 mL simple formulada para 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.

9. Una composición inmunogénica multivalente, que comprende los 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 del serotipo 3 y por lo menos un serotipo adicional.

10. La composición inmunogénica de la reivindicación 9, en donde el serotipo adicional se selecciona del grupo

00171

que consiste de los serotipos 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V,
14, 18C, 19A, 19F, y 23F.

11. La composición inmunogénica de la reivindicación 9,
5 en donde la proteína portadora es CRM₁₉₇.

12. La composición inmunogénica de la reivindicación 9,
que comprende además un adyuvante.

10 13. La composición inmunogénica de la reivindicación
12, en donde el adyuvante es un adyuvante a base de
aluminio.

14. La composición inmunogénica de la reivindicación
15 13, en donde el adyuvante se selecciona del grupo que
consiste de fosfato de aluminio, sulfato de aluminio e
hidróxido de aluminio.

15. La composición inmunogénica de la reivindicación
20 14, en donde el adyuvante es fosfato de aluminio.

16. Un método para inducir una respuesta inmune a un
conjugado de polisacárido capsular de *Streptococcus*
pneumoniae, que comprende administrar a un humano una
25 cantidad inmunológicamente efectiva de la composición
inmunogénica de la reivindicación 9.

00172

17. El método de la reivindicación 16, en donde la composición inmunogénica administrada es una dosis simple de 0.5 mL formulada para contener: 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.
18. 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 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.
19. La composición inmunogénica de la reivindicación 18, en donde dicho serotipo adicional se selecciona del grupo que consiste de los serotipos 1, 3, 5, 6A, 7F, y 19A.
20. La composición inmunogénica de la reivindicación 18, en donde la proteína portadora es CRM₁₉₇.
21. La composición inmunogénica de la reivindicación 18, que comprende además un adyuvante.

00173

22. La composición inmunogénica de la reivindicación 21, en donde el adyuvante es un adyuvante basado en aluminio.

5

23. La composición inmunogénica de la reivindicación 22, en donde el adyuvante se selecciona del grupo que consiste de fosfato de aluminio, sulfato de aluminio e hidróxido de aluminio.

10

24. La composición inmunogénica de la reivindicación 23, en donde el adyuvante es fosfato de aluminio.

25. 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 la composición inmunogénica de la reivindicación 18.

15

26. El método de la reivindicación 25, en donde la composición inmunogénica administrada es una dosis simple de 0.5 mL formulada para contener: 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.

20

25

COMPOSICIÓN DE CONJUGADO DE POLISACÁRIDO-PROTEÍNA NEUMOCÓCICA
MULTIVALENTE

5

Resumen

Se describe una composición inmunogénica que tiene 13 diferentes conjugados de polisacárido-proteína y opcionalmente, un adyuvante basado en aluminio. Cada
10 conjugado contiene un polisacárido capsular preparado de un serotipo diferente de *Streptococcus pneumoniae* (1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F) conjugados a una proteína portadora. La composición inmunogénica, formulada como una vacuna, incrementa el cubrimiento contra enfermedad
15 neumocócica en recién nacidos y en niños jóvenes globalmente, y suministra cubrimiento para los serotipos 6A y 19A que no es dependiente de las limitaciones de la protección cruzada del serogrupo.

20

Cambios en tasas IPD por serotipo en niños E.U.A < 2 años de edad de línea base (1998/1999) a 2001 (Vigilan con ABCs)

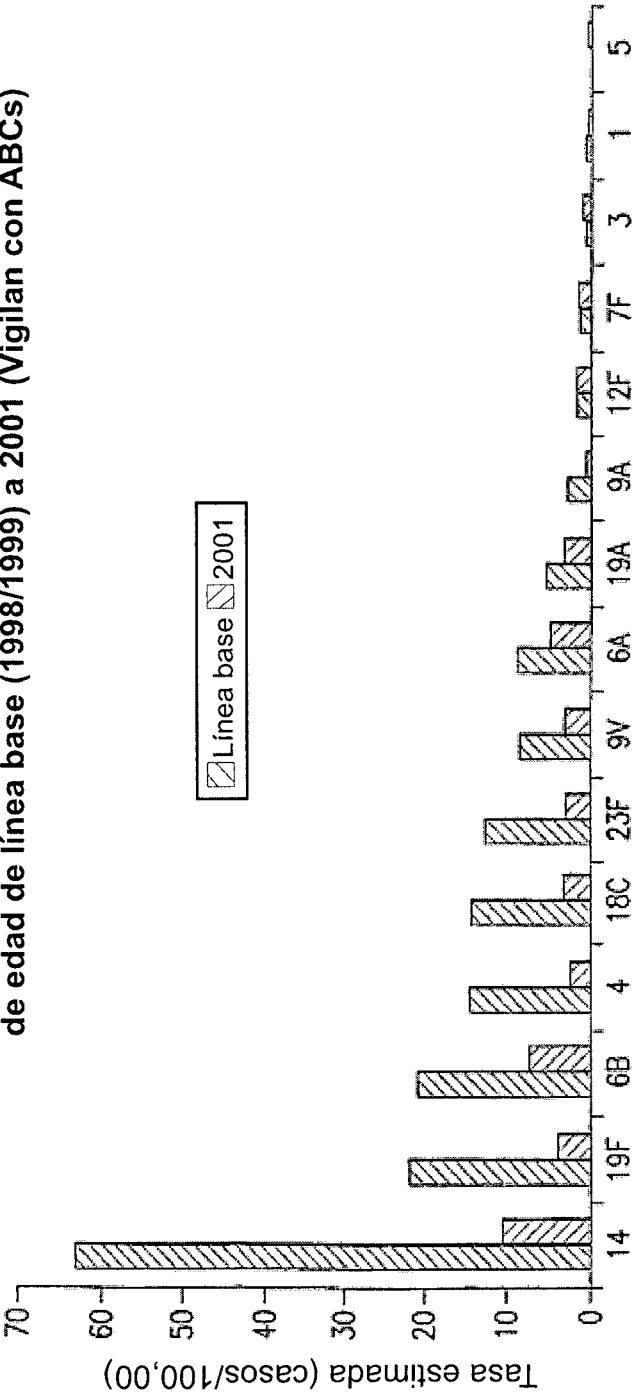


FIG. 1



FIG. 2

RCDC de resultado Post-Tercera dosis OPA del ensayo cohorte
D118-P16 Prev(e)nar que recibe un lote de fabricación a escala
de Prev(e)nar® (n=98)

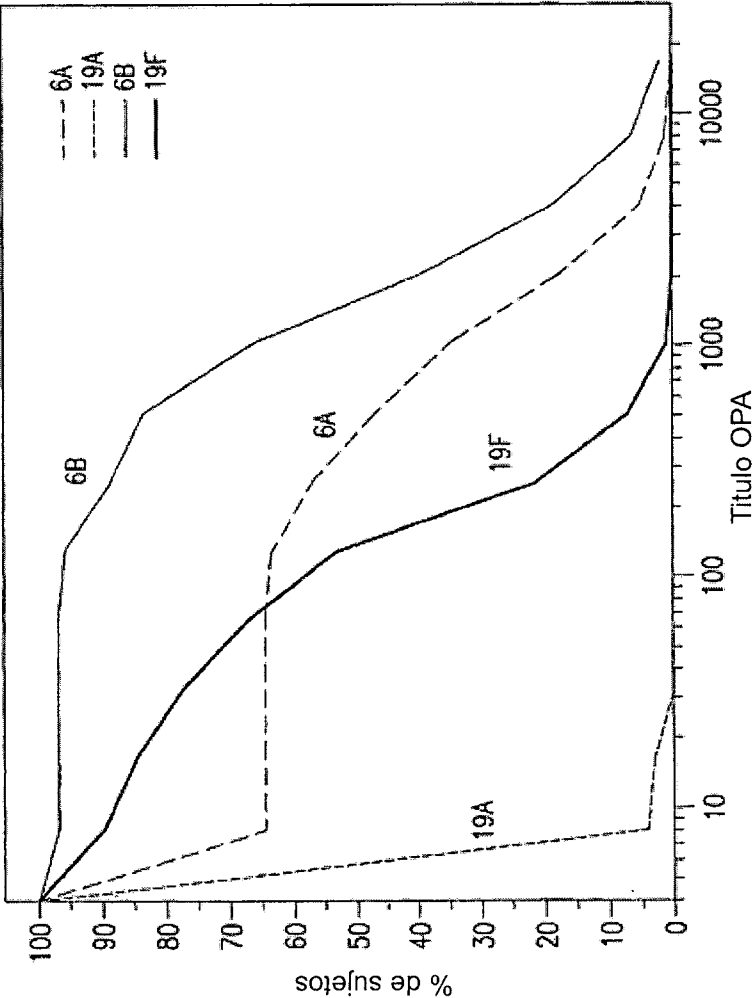
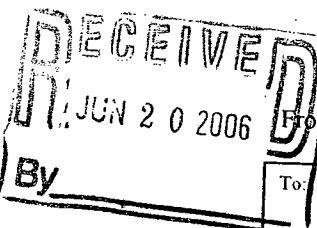


FIG. 3

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/US2006/012354



PCT

By

To:

From the INTERNATIONAL BUREAU

CC: PEARL RIVER

NOTIFICATION CONCERNING SUBMISSION OR TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT

RECEIVED

JUN 27 2006

00178

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

Date of mailing (day/month/year) 07 June 2006 (07.06.2006)	ROZEK, Carol, E. Wyeth Patent Law Department Five Giralda Farms Madison, NJ 07940 ETATS-UNIS D'AMERIQUE
Applicant's or agent's file reference AM101883	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US2006/012354	International filing date (day/month/year) 31 March 2006 (31.03.2006)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 08 April 2005 (08.04.2005)
Applicant WYETH et al	

- By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- (If applicable) An asterisk (*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
08 April 2005 (08.04.2005)	60/669,605	US	24 May 2006 (24.05.2006)

RECEIVED

JUN 27 2006

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Masashi Honda	CAROL E. ROZEK PATENT LAW DEPARTMENT PEARL RIVER, NEW YORK
Facsimile No. +41 22 338 82 70	Telephone No. +41 22 338 82 54	
PCT/IB/304 (October 2005)		

I/CVIZX2RU0

REC'D SEP 15 2006

00179

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND
THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

To:
WYETH
Attn. Rozek, Carol E.
Patent Law Department
Five Giralda Farms
Madison, New Jersey 07940
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

RECEIVED
SEP 12 2006
By

(PCT Rule 44.1)

Date of mailing
(day/month/year) 07/09/2006

Applicant's or agent's file reference

AM101883

FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below

International application No.

PCT/US2006/012354

International filing date
(day/month/year)

31/03/2006

Applicant

WYETH

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the International Application (see Rule 46):

When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the International Search Report.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 338.82.70

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.
3. ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:
- ☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.
- ☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Reminders

Shortly after the expiration of **18 months** from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.

Within **19 months** from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until **30 months** from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, within **20 months** from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

In respect of other designated Offices, the time limit of **30 months** (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

RECEIVED

SEP 15 2006

CAROL E. ROZEK
PATENT LAW DEPARTMENT
PEARL RIVER, NEW YORK

Name and mailing address of the International Searching Authority

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Catriona Cleere

NOTES TO FORM PCT/ISA/220

00180

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the *PCT Applicant's Guide*, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article", "Rule", and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions, respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report and the written opinion of the International Searching Authority, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the latter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, Annexes B1 and B2).

The attention of the applicant is drawn to the fact that amendments to the claims under Article 19 are not allowed where the International Searching Authority has declared, under Article 17(2), that no international search report would be established (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, paragraph 296).

What parts of the international application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When?

Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

Where not to file the amendments?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 46.2).

Where a demand for international preliminary examination has been/is filed, see below.

How?

Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments?

Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference AM101883	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2006/012354	International filing date (day/month/year) 31/03/2006	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 08/04/2005
Applicant WYETH		

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

This international search report consists of a total of 5 sheets.

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

1. Basis of the report

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

- ☒ the international application in the language in which it was filed
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

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

2. ☒ Certain claims were found unsearchable (See Box No. II)

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

4. With regard to the title,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

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

6. With regard to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. 1
☒ as suggested by the applicant
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2006/012354

00182

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K39/395 A61K39/09 A61K39/295 A61K39/02

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

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

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MBELLE N ET AL: "Immunogenicity and impact on nasopharyngeal carriage of a nonavalent pneumococcal conjugate vaccine." THE JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES. OCT 1999, vol. 180, no. 4, October 1999 (1999-10), pages 1171-1176, XP002393672 ISSN: 0022-1899 the whole document ----- -/--	1-26

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 August 2006

Date of mailing of the international search report

07/09/2006

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hermann, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No
PCT/US2006/012354

00183

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HAUSDORFF W P ET AL: "Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I." CLINICAL INFECTIOUS DISEASES : AN OFFICIAL PUBLICATION OF THE INFECTIOUS DISEASES SOCIETY OF AMERICA. JAN 2000, vol. 30, no. 1, January 2000 (2000-01), pages 100-121, XP002393673 ISSN: 1058-4838 the whole document	1-26
X	US 2001/048929 A1 (CHONG PELE ET AL) 6 December 2001 (2001-12-06) the whole document	1-26
X	EP 0 497 525 A (MERCK & CO. INC; MERCK & CO., INC) 5 August 1992 (1992-08-05) the whole document	1-26
A	WO 2004/011027 A (BAXTER INTERNATIONAL INC; BAXTER HEALTHCARE S.A) 5 February 2004 (2004-02-05) the whole document	1-26
A	CHOO S ET AL: "Immunogenicity and reactogenicity of a pneumococcal conjugate vaccine administered combined with a Haemophilus influenzae type b conjugate in United Kingdom infants" PEDIATRIC INFECTIOUS DISEASE JOURNAL, WILLIAMS & WILKINS, BALTIMORE, MD, US, vol. 19, no. 9, 2000, pages 854-862, XP002970987 ISSN: 0891-3668 the whole document	1-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2006/012354

00184

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 7, 8, 16, 17, 25 and 26 are directed to a method of treatment of the human/animal body by therapy and/or surgery (Rule 39.1(iv) PCT), the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/US2006/012354

00185

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2001048929	A1	06-12-2001	
		AU 754021 B2	31-10-2002
		AU 2606499 A	06-09-1999
		BR 9908163 A	06-11-2001
		CA 2321973 A1	26-08-1999
		WO 9942130 A1	26-08-1999
		EP 1056470 A1	06-12-2000
		JP 2002503705 T	05-02-2002
		JP 2004346084 A	09-12-2004
		NZ 506617 A	25-07-2003
		US 6656472 B1	02-12-2003
EP 0497525	A	05-08-1992	
		AT 169825 T	15-09-1998
		AU 651656 B2	28-07-1994
		AU 1046792 A	30-07-1992
		CA 2059692 A1	29-07-1992
		CN 1064217 A	09-09-1992
		CS 9200199 A3	14-10-1992
		DE 69226668 D1	24-09-1998
		DE 69226668 T2	22-04-1999
		DK 497525 T3	26-10-1998
		ES 2121820 T3	16-12-1998
		FI 920353 A	29-07-1992
		HU 69968 A2	28-09-1995
		IE 920244 A1	29-07-1992
		IL 100716 A	22-12-1999
		JP 2069074 C	10-07-1996
		JP 5065300 A	19-03-1993
		JP 7094472 B	11-10-1995
		KR 243958 B1	01-02-2000
		LV 12309 A	20-07-1999
		MX 9200328 A1	01-09-1992
		NO 920350 A	29-07-1992
		NZ 241367 A	27-04-1994
		SK 280659 B6	16-05-2000
		US 5623057 A	22-04-1997
WO 2004011027	A	05-02-2004	
		AU 2003257003 A1	16-02-2004

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

see form PCT/ISA/220

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/US2006/012354

International filing date (day/month/year)
31.03.2006

Priority date (day/month/year)
08.04.2005

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. A61K39/395 A61K39/09 A61K39/295 A61K39/02

Applicant
WYETH

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Hermann, P

Telephone No. +49 89 2399-7109



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**International application No.
PCT/US2006/012354**Box No. I Basis of the opinion**

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☐ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☐ on paper
 - ☐ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☐ contained in the international application as filed.
 - ☐ filed together with the international application in electronic form.
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
4. Additional comments:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2006/012354

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of

- ☐ the entire international application
- ☒ claims Nos. 7, 8, 16, 17, 25, 26 (for I.A.)

because:

- ☐ the said international application, or the said claims Nos. relate to the following subject matter which does not require an international search (*specify*):
- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☒ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos. 7, 8, 16, 17, 25, 26 (for I.A.)
- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:
- ☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13ter.1(a) or (b).
- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.
- ☐ See Supplemental Box for further details

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2006/012354

nn189

**Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or
industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	1-8, 11-15, 17
	No: Claims	9-10, 16, 18-26
Inventive step (IS)	Yes: Claims	-
	No: Claims	1-26
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-6, 9-15, 18-24
	No: Claims	-

2. Citations and explanations

see separate sheet

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2006/012354

Re Item III

Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

Claims 7, 8, 16, 17, 25 and 26 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(i) PCT).

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Reference is made to the following documents:

- D1: Mbelle N. *et al.* - 'Immunogenicity and impact on nasopharyngeal carriage of a nonavalent pneumococcal conjugate vaccine' - 1999 - *The Journal of Infectious Diseases*, **180**: 1171-1176
- D2: Hausdorff W. *et al.* - 'Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: Implications for conjugate vaccine formulation and use, Part I' - 2000 - *Clinical Infectious Diseases*, **30**: 100-121
- D3: US-A-2001/0048929
- D4: EP-A-0497525
- D5: WO-A-2004/011027

2. Novelty (Article 33(2) PCT)

- 2.1 Document D1 already discloses a nonavalent vaccine formulation comprising capsule polysaccharides conjugated to CRM₁₉₇ and immunization of children with the said formulation (cf. D1 abstract, p. 1171 right-hand column 2nd §, p. 1173 right-hand column 2nd § - 1175 left-hand column 3rd §). The formulation contains 2 µg of saccharide conjugates from the serotypes 1, 4, 5, 9V, 14, 18C, 19F and 23F and 4µg of saccharide from serotype 6B. The vaccine formulation of D1 and the method of D1 anticipate

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2006/012354

therefore the subject-matter of claims 18-20 and 25-26.

Hence claims 18-20, 25 and 26 do not meet the requirements of Articles 33(1) and 33(2) PCT.

- 2.2 Document D2 already discloses an 11-valent conjugate vaccine formulation comprising capsular polysaccharides from serotype 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F and 23F and its use in immunization protocol (cf. D2 abstract, p. 101 right-hand column 6th § - p. 103 left-hand column 2nd §, p. 111 right-hand column 3rd § - p. 118 left-hand column 4th §). Thus, in the absence of evidence to the contrary, the vaccine formulations and method of use of said formulations of document D2 fall within the scope of present claims 9, 10, 16, 18, 19, 25.

Hence claims 9, 10, 16, 18, 19 and 25 do not meet the requirements of Articles 33(1) and 33(2) PCT.

- 2.3 Document D3 already discloses a multivalent immunogenic composition comprising polysaccharides protein conjugates together with a physiologically acceptable vehicle, wherein the capsular polysaccharides are prepared from serotype 1, 4, 5, 6B, 9V, 14, 18C, 19F and 23F. The multivalent vaccine composition of D3 comprises also an adjuvant selected from aluminum hydroxide or aluminum phosphate and the carrier protein of said conjugate is tetanus toxoid and is used as a vaccine to generate an immune response (cf. D3 abstract, [0013]-[0026]; [0092]-[0113]; examples 5, 12 and claims 1-24).

The disclosure of document D3 anticipates therefore the subject-matter of present claims 18, 19 and 21-25 and claims 18, 19 and 21-25 do not meet the requirements of Articles 33(1) and 33(2) PCT.

- 2.4 Similarly, document D4 discloses a vaccine composition comprising capsule polysaccharides conjugates together with aluminum hydroxide or alum wherein the capsule polysaccharides are from one or all of the serotypes 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F and 23F.

The disclosure of document D4 anticipates therefore the subject-matter of present claims 18, 19 and 21-25 and claims 18, 19 and 21-25 do not meet the requirements of

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2006/012354

Articles 33(1) and 33(2) PCT.

- 2.5 None of the documents cited in the International Search Report discloses the subject-matter of present claims 1-8, 11-15 and 17. Claims 1-8, 11-15 and 17 meet therefore the requirements of Article 33(2) PCT.

3. Inventive step (Article 33(3) PCT)

- 3.1 However, taking into account the prior art cited in the International Search Report, the subject-matter of present claims 1-8, 11-15 and 17 does not meet the requirements of Articles 33(1) and 33(3) PCT because of lack of inventive step, the reasons being as follows:
- 3.2 Document D1 can be considered to represent the closest prior art for the method of independent claim 1. The vaccine formulation of independent claim 1 differs from that of D1 by the fact that capsule saccharides from 4 more serotypes of *S. pneumoniae* are added to the formulation. The obvious effect being seen in the obtention of a 13 valent vaccine which when used in immunization protocol lead to a broader spectrum of protection against various serotypes of *S. pneumoniae*.

In view of the prior art at hand, the problem to be solved by the subject-matter of independent claim 1 can be seen in the provision of an improved vaccine formulation.

The solution to said problem, i.e. the addition in the formulation of polysaccharides from other serotypes of *Streptococcus pneumoniae*, is not considered inventive. The reasons being that the skilled person having knowledge of the fact that the already existing vaccine is not covering certain diseases observed in presence of other *Streptococcus pneumoniae* serotypes (see for example D2 p. 117 left-hand column 4th-6th §), would have been driven to enlarge the spectrum of coverage of vaccine protection and include the corresponding polysaccharides conjugates in the already existing formulation thereby arriving to the composition of independent claim 1.

Thus the subject-matter of independent claim 1 do not meet the requirements of Articles 33(1) and 33(3) PCT.

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2006/012354

- 3.2 In view of the prior-art documents at hand, dependent claims 2-8 and 11-15 and 17 do not appear to contain any additional features which, in combination with the features of any claim to which they refer, i.e. those of claims 1 and 9, meet the requirements of the EPC with respect to inventive step (Articles 33(1) and 33(3) PCT) since these additional features appear to be conventional and do not appear to result in any unexpected effect (Articles 33(1) and 33(3) PCT).

4. Industrial applicability (Article 33(4) PCT)

- 4.1 For the assessment of the present claims 7, 8, 16, 17, 25 and 26 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT		<i>nn1q4</i>	
(21) N° de solicitud:			(51) Int Cl: A61K 39/395, A61K 39/02, A61K 39/09, A61K 39/295		
22) Fecha de solicitud:			(71) Solicitante(s) WYETH		
(30) Prioridad	(31) No.	32) Fecha	(33) País	(72) Inventor(es)	
	60/669,605	08/04/05	US	HAUSDORFF, William P. SIBER, George Rainer y PARADISO, Peter R.	
				(74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDOÑEZ	
(85)	Fecha limite inicio fase nacional: 08/11/07			(87) Publicación internacional	
(86)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT			Fecha: 19/10/06	
	Fecha de presentación de la solicitud: 31/03/06			N° publicación: WO/2006/110381	
	No. de solicitud PCT/US2006/012354				
(54) Titulo: COMPOSICIÓN CONJUGADA DE POLISACÁRIDO-PROTEÍNA NEUMOCÓCICA MULTIVALENTE					

Reivindicación(es):

1. 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.

916

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION []

MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ◆ Descripción de la invención
- Dibujos de ser estos pertinentes
- Comprobante de pago de las tasas establecidas

☒
☒
☒
☒
☒

COMPLETA []

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas

[]
[]
[]
[]

COMPLETA []

INCOMPLETA []

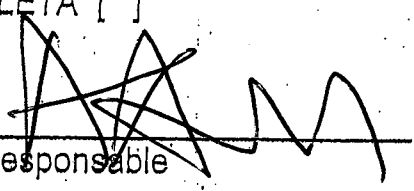
ESQUEMA DE TRAZADO []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- Representación gráfica del esquema trazado
- Comprobante de pago de las tasas establecidas

[]
[]
[]
[]

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Firma Responsable 

Fecha _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-117685- -00000-0000
Fecha: 2007-11-07 16:22:27 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 196

raera 13, No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52-20
E-mail: Info@slc.gov.co
www.slc.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia