

**Box No. VIII (iv) DECLARATION: INVENTORSHIP (only for the purposes of the designation of the United States of America)**  
*The declaration must conform to the following standardized wording provided for in Section 214; see Notes to Boxes Nos. VIII, VIII (i) to (v) (in general) and the specific Notes to Box No. VIII (iv). If this Box is not used, this sheet should not be included in the request.*

**Declaration of inventorship (Rules 4.17(iv) and 51bis.1(a)(iv))  
 for the purposes of the designation of the United States of America:**

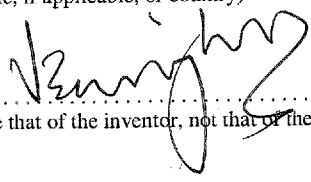
I hereby declare that I believe I am the original inventor or an original joint inventor of a claimed invention in the application.  
 This declaration is directed to the international application of which it forms a part (if filing declaration with application).  
 This declaration is directed to international application No. \_\_\_\_\_ (if furnishing declaration pursuant to Rule 26ter).  
 I hereby declare that the above-identified international application was made or authorized to be made by me.  
 I hereby acknowledge that any willful false statement made in this declaration is punishable under 18 U.S.C. 1001 by fine or Imprisonment of not more than five (5) years, or both.

**Name: DHERE, Rajeev Mhalasakant**

Residence: SERUM INSTITUTE OF INDIA LTD., 212/2, OFF SOLI POONAWALLA ROAD, HADAPSAR, PUNE-411028  
 MAHARASHTRA, INDIA.

(city and either US state, if applicable, or country)

Mailing Address:

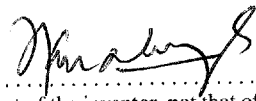
Inventor's Signature:  Date: 24/05/2016  
 (The signature must be that of the inventor, not that of the agent)

**Name: MALVIYA, Hitesh Kumar**

Residence: SERUM INSTITUTE OF INDIA LTD., 212/2, OFF SOLI POONAWALLA ROAD, HADAPSAR, PUNE-411028  
 MAHARASHTRA, INDIA.

(city and either US state, if applicable, or country)

Mailing Address:

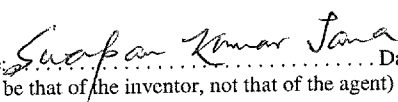
Inventor's Signature:  Date: 24 May 2016  
 (The signature must be that of the inventor, not that of the agent)

**Name: JANA, Swapan Kumar**

Residence: SERUM INSTITUTE OF INDIA LTD., 212/2, OFF SOLI POONAWALLA ROAD, HADAPSAR, PUNE-411028  
 MAHARASHTRA, INDIA.

(city and either US state, if applicable, or country)

Mailing Address:

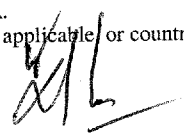
Inventor's Signature:  Date: 24/05/2016  
 (The signature must be that of the inventor, not that of the agent)

**Name: PISAL, Sambhaji Shankar**

Residence: SERUM INSTITUTE OF INDIA LTD., 212/2, OFF SOLI POONAWALLA ROAD, HADAPSAR, PUNE-411028  
 MAHARASHTRA, INDIA.

(city and either US state, if applicable, or country)

Mailing Address:

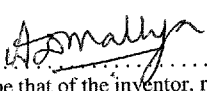
Inventor's Signature:  Date: 24/05/2016  
 (The signature must be that of the inventor, not that of the agent)

**Name: MALLYA, Asha Dinesh**

Residence: SERUM INSTITUTE OF INDIA LTD., 212/2, OFF SOLI POONAWALLA ROAD, HADAPSAR, PUNE-411028  
 MAHARASHTRA, INDIA.

(city and either US state, if applicable, or country)

Mailing Address:

Inventor's Signature:  Date: 24/05/2016  
 (The signature must be that of the inventor, not that of the agent)

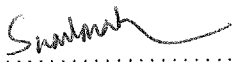


This declaration is continued on the following sheet, "Continuation of Box No. VIII (iv)".

**Name: MAHOR, Sunil**Residence: SERUM INSTITUTE OF INDIA LTD.212/2, OFF SOLI POONAWALLA ROAD, HADAPSAR, PUNE-411028  
MAHARASHTRA, INDIA.

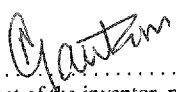
(city and either US state, if applicable, or country)

Mailing Address:

Inventor's Signature:  Date: 24.05.2016  
(The signature must be that of the inventor, not that of the agent)**Name: GAUTAM, Manish Maheshkumar**Residence: SERUM INSTITUTE OF INDIA LTD.212/2, OFF SOLI POONAWALLA ROAD, HADAPSAR, PUNE-411028  
MAHARASHTRA, INDIA.

(city and either US state, if applicable, or country)

Mailing Address:

Inventor's Signature:  Date: 24.05.2016  
(The signature must be that of the inventor, not that of the agent)**Name: JOSHI, Chetan Vilas**Residence: SERUM INSTITUTE OF INDIA LTD.212/2, OFF SOLI POONAWALLA ROAD, HADAPSAR, PUNE-411028  
MAHARASHTRA, INDIA.

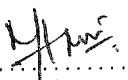
(city and either US state, if applicable, or country)

Mailing Address:

Inventor's Signature:  Date: 24.05.2016  
(The signature must be that of the inventor, not that of the agent)**Name: MALEPATI, Venkata Vamsi Krishna**Residence: SERUM INSTITUTE OF INDIA LTD.212/2, OFF SOLI POONAWALLA ROAD, HADAPSAR, PUNE-411028  
MAHARASHTRA, INDIA.

(city and either US state, if applicable, or country)

Mailing Address:

Inventor's Signature:  Date: 24.05.2016  
(The signature must be that of the inventor, not that of the agent)**Name: JADHAV, Prashant Shivaji**Residence: SERUM INSTITUTE OF INDIA LTD.212/2, OFF SOLI POONAWALLA ROAD, HADAPSAR, PUNE-411028  
MAHARASHTRA, INDIA.

(city and either US state, if applicable, or country)

Mailing Address:

Inventor's Signature:  Date: 24.05.2016  
(The signature must be that of the inventor, not that of the agent)

This declaration is continued on the following sheet, "Continuation of Box No. VIII (iv)".

(10) International Publication Number  
**WO 2016/199003 A1**(43) International Publication Date  
15 December 2016 (15.12.2016)

## (51) International Patent Classification:

*A61K 39/00* (2006.01) *A61K 39/116* (2006.01)  
*A61K 39/085* (2006.01) *A61K 47/36* (2006.01)  
*A61K 39/09* (2006.01) *C07K 14/315* (2006.01)

## (21) International Application Number:

PCT/IB2016/053265

## (22) International Filing Date:

3 June 2016 (03.06.2016)

## (25) Filing Language:

English

## (26) Publication Language:

English

## (30) Priority Data:

2185/MUM/2015 8 June 2015 (08.06.2015) IN

## (71) Applicant: SERUM INSTITUTE OF INDIA PRIVATE LTD. [IN/IN]; 212/2, Off Soli Poonawalla Road, Hadapsar, Pune, Maharashtra 411028 (IN).

## (72) Inventors: DHERE, Rajeev Mhalasakant; Serum Institute Of India Ltd.212/2, Off Soli Poonawalla Road, Hadapsar, Pune, Maharashtra 411028 (IN). MALVIYA, Hitesh Kumar; Serum Institute Of India Ltd.212/2, Off Soli Poonawalla Road, Hadapsar, Pune, Maharashtra 411028 (IN). JANA, Swapan Kumar; Serum Institute Of

India Ltd.212/2, Off Soli Poonawalla Road, Hadapsar, Pune, 411028 MAHARASHTRA (IN). **PISAL, Sambhaji Shankar**; Serum Institute Of India Ltd.212/2, Off Soli Poonawalla Road, Hadapsar, Pune, 411028 MAHARASHTRA (IN). **MALLYA, Asha Dinesh**; Serum Institute Of India Ltd.212/2, Off Soli Poonawalla Road, Hadapsar, Pune, Maharashtra 411028 (IN). **MAHOR, Sunil**; Serum Institute Of India Ltd.212/2, Off Soli Poonawalla Road, Hadapsar, Pune, Maharashtra 411028 (IN). **GAUTAM, Manish Maheshkumar**; Serum Institute Of India Ltd.212/2, Off Soli Poonawalla Road, Hadapsar, Pune, Maharashtra 411028 (IN). **JOSHI, Chetan Vilas**; Serum Institute Of India Ltd.212/2, Off Soli Poonawalla Road, Hadapsar, Pune, Maharashtra 411028 (IN). **MALEPATI, Venkata Vamsi Krishna**; Serum Institute Of India Ltd.212/2, Off Soli Poonawalla Road, Hadapsar, Pune, Maharashtra 411028 (IN). **JADHAV, Prashant Shivaji**; Serum Institute Of India Ltd.212/2, Off Soli Poonawalla Road, Hadapsar, Pune, Maharashtra 411028 (IN).

## (74) Agents: SHANKER, Archana et al.; B-41, Nizamuddin East, New Delhi 110013 (IN).

## (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY,

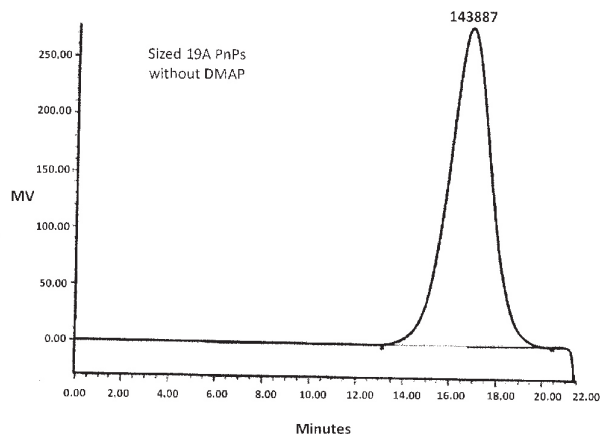
[Continued on next page]

## (54) Title: METHODS FOR IMPROVING THE ADSORPTION OF POLYSACCHARIDE-PROTEIN CONJUGATES AND MULTIVALENT VACCINE FORMULATION OBTAINED THEREOF

improved adsorption

Figure 1

|   | Peak Name | RT     | Area     | Mw (Da) | Mn (Da) | MP (Da) | % Area | Polydispersity |
|---|-----------|--------|----------|---------|---------|---------|--------|----------------|
| 1 | Peak 4    | 16.881 | 36050010 | 178357  | 124375  | 143887  | 100.00 | 1.434025       |



(57) Abstract: The present invention provides methods for preparation of stable multivalent pneumococcal polysaccharide-protein conjugate vaccine formulations. Instant stable formulations show optimal percent adsorption for each conjugate wherein, aggregation can be prevented by employing i) Individual or separate adsorption for conjugates that otherwise show lower percent adsorption by combined adsorption ii) Histidine-Succinic acid buffer system along with shift in pH from neutral pH to acidic pH iii) a polysaccharide to protein ratio between 0.5 to about 1.4 iv) a six-bladed Rushton type turbine impeller in formulation vessels.



BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) Designated States** (*unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,

DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Declarations under Rule 4.17:**

— *of inventorship (Rule 4.17(iv))*

**Published:**

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

— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))*

## PATENT COOPERATION TREATY

From the  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To: ARCHANA SHANKER  
B-41, NIZAMUDDIN EAST  
NEW DELHI, 110013  
INDIA

PCT

WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43bis.1)

|                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                            |                                                |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| Date of mailing<br>(day/month/year)                                                                                                                                                                                                                            |                                                            | 14 OCT 2016                                    |
| Applicant's or agent's file reference<br>15509-P58PCT                                                                                                                                                                                                          |                                                            | FOR FURTHER ACTION<br>See paragraph 2 below    |
| International application No.<br>PCT/IB2016/053265                                                                                                                                                                                                             | International filing date (day/month/year)<br>03 June 2016 | Priority date (day/month/year)<br>08 June 2015 |
| International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC<br>IPC(8) - A61K 39/00; A61K 39/085; A61K 39/09; A61K 39/116; A61K 47/36; C07K 14/315 (2016.01)<br>CPC - A61K 39/092; A61K 2039/6037; A61K 2039/6087; A61K 2039/70 (2016.08) |                                                            |                                                |
| Applicant<br>SERUM INSTITUTE OF INDIA PRIVATE LTD.                                                                                                                                                                                                             |                                                            |                                                |

## 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 and 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 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.

|                                                                                                                                                                           |                                                             |                                                                                                        |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Name and mailing address of the ISA/<br>Mail Stop PCT, Attn: ISA/US<br>Commissioner for Patents<br>P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450<br>Facsimile No. 571-273-8300 | Date of completion of this opinion<br><br>18 September 2016 | Authorized officer<br><br>Blaine R. Copenheaver<br>PCT Helpdesk: 571-272-4300<br>PCT OSP: 571-272-7774 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|

**WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.

PCT/IB2016/053265

**Box No. I      Basis of this 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. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43*bis*.1(a)).
3. ☐ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of a sequence listing:
  - a. ☐ forming part of the international application as filed:
    - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
    - ☐ on paper or in the form of an image file.
  - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
  - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
    - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
    - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

**WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.

PCT/IB2016/053265

**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. 18, 19

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. 18, 19 are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

Claims 18 and 19 are multiple dependent claims not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

☐ 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 said claims Nos. 18, 19

☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

☐ furnish a sequence listing in the form of an Annex C/ST.25 text file, and such listing was not available to the International Searching Authority in the form and manner acceptable to it; or the sequence listing furnished did not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions.

☐ furnish a sequence listing on paper or in the form of an image file 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 the form and manner acceptable to it; or the sequence listing furnished did not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions.

☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rule 13ter.1(a) or (b).

☐ See Supplemental Box for further details.

**WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.

PCT/IB2016/053265

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

## 1. Statement

|                               |        |      |     |
|-------------------------------|--------|------|-----|
| Novelty (N)                   | Claims | 1-17 | YES |
|                               | Claims | None | NO  |
| Inventive step (IS)           | Claims | 9-17 | YES |
|                               | Claims | 1-8  | NO  |
| Industrial applicability (IA) | Claims | 1-17 | YES |
|                               | Claims | None | NO  |

## 2. Citations and explanations:

Claims 1-8 lack an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Biemans et al. (hereinafter Biemans).

Regarding claim 1, Biemans discloses a method for the preparation of a stable multivalent pneumococcal polysaccharide-protein conjugate vaccine formulation (Para. [0024] an improved *Streptococcus pneumoniae* vaccine comprising 10 or more (e.g. 11, 12, 13, 14, or 15 or more) capsular saccharides from different *S. pneumoniae* serotypes conjugated to 2 or more carrier proteins; Paras. [0046]-[0047] Capsular polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae* comprise repeating oligosaccharide units which may contain up to 8 sugar residues ... Full length polysaccharides may be "sized" i.e. their size may be reduced by various methods ... The inventors have found that by using native or slightly sized polysaccharide conjugates, one or more of the following advantages may be realised: ... 3) immunogenic conjugates prone to hydrolysis may be stabilised by the use of larger saccharides for conjugation), in said method i. Individual or separate adsorption for conjugates that otherwise show relative lower adsorption by combined adsorption; ii. histidine-Succinic acid buffer system along with shift in pH from neutral pH to acidic pH; iii. a polysaccharide to protein ratio between 0.5 to about 1.4; and/or iv. the use of a rushton type turbine impeller in the formulation vessel (Para. [0024] The present invention provides an improved *Streptococcus pneumoniae* vaccine comprising 10 or more (e.g. 11, 12, 13, 14, or 15 or more) capsular saccharides from different *S. pneumoniae* serotypes conjugated to 2 or more carrier proteins; Paras. [0046]-[0047] Capsular polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae* comprise repeating oligosaccharide units which may contain up to 8 sugar residues ... Full length polysaccharides may be "sized" i.e. their size may be reduced by various methods ... The inventors have found that by using native or slightly sized polysaccharide conjugates, one or more of the following advantages may be realised: ... 2) the ratio of polysaccharide to protein in the conjugate can be altered such that the ratio of polysaccharide to protein (w/w) in the conjugate may be increased (which can have an effect on the carrier suppression effect), ...; Para. [0077] the majority of the conjugates, for example 6, 7, 8, 9 or more of the conjugates have a ratio of carrier protein to saccharide that is greater than 1:1, for example 1.1:1, 1.2:1, 1.3:1, 1.4:1, 1.5:1 or 1.6:1 [a polysaccharide to protein ratio 0.91, 0.83, 0.77, 0.71, 0.67, 0.63, respectively]). Biemans fails to explicitly disclose [formulation] showing optimal adsorption for each conjugate wherein, in said method, aggregation is prevented by employing at least one of [i ... ii ... iii ... iv ...]. However, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art at the time of the invention to modify Biemans to include [formulation] showing optimal adsorption for each conjugate wherein, in said method, aggregation is prevented by employing at least one of [i ... ii ... iii ... iv ...], since the discovery of a previously unappreciated property of a prior art composition, or of a scientific explanation for the prior art's functioning, does not render the old method for preparing a stable multivalent pneumococcal polysaccharide-protein conjugate vaccine formulation using a polysaccharide to protein ratio between 0.63 and 0.91 patentably new to the discoverer. Thus the claiming of a new use, new function or unknown property which is inherently present in the prior art does not necessarily make the claim patentable.

Regarding claim 2, modified Biemans the method as claimed in Claim 1.

In regards to "wherein the adsorption is in the range of 75 - 99%," the discovery of a previously unappreciated property of a prior art composition, or of a scientific explanation for the prior art's functioning, does not render the old method for preparing a stable multivalent pneumococcal polysaccharide-protein conjugate vaccine formulation using a polysaccharide to protein ratio between 0.63 and 0.91 patentably new to the discoverer. Thus the claiming of a new use, new function or unknown property which is inherently present in the prior art does not necessarily make the claim patentable.

Regarding claim 3, modified Biemans the method as claimed in Claim 1, and Biemans further discloses a multivalent pneumococcal conjugate vaccine composition prepared according to claim 1, wherein said composition comprises of at least 2 polysaccharide protein conjugates having polysaccharide selected from serotypes 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9F, 9N, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 33F and 45 (Para. [0024] The present invention provides an improved *Streptococcus pneumoniae* vaccine comprising 10 or more (e.g. 11, 12, 13, 14, or 15 or more) capsular saccharides from different *S. pneumoniae* serotypes conjugated to 2 or more carrier proteins; Para. [0029] In an embodiment, saccharides from at least serotypes 1 and 3, 1 and 4, 1 and 5, 1 and 6A, 1 and 6B, 1 and 7, 1 and 9V, 1 and 14, 1 and 22F, 1 and 23F, 3 and 4, 3 and 5, 3 and 6A, 3 and 6B, 3 and 7F, 3 and 9V, 3 and 14, 3 and 22F, 3 and 23F, 4 and 5, 4 and 6A, 4 and 6B, 4 and 7F, 4 and 9V, 4 and 14, 4 and 22F, 4 and 23F, 5 and 6A, 5 and 6B, 5 and 7F, 5 and 9V, 5 and 14, 5 and 22F, 5 and 23F, 6A and 6B, 6A and 7F, 6A and 9V, 6A and 14, 6A and 22F, 6A and 23F, 6B and 7F, 6B and 9V, 6B and 14, 6B and 22F, 6B and 23F, 7F and 9V, 7F and 14, 7F and 22F, 7F and 23F, 9V and 14, 9V and 22F, 9V and 23F, 14 and 22F, 14 and 23F or 22F and 23F are conjugated to protein D).

**WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.

PCT/IB2016/053265

**Supplemental Box**

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.

Continuation of:

Regarding claim 4, modified Biemans discloses the multivalent pneumococcal conjugate vaccine composition prepared according to claim 3, and Biemans further discloses wherein said composition comprises of at least 10 polysaccharide protein conjugates having polysaccharide from serotypes 1, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 19A, 19F and 23F (Para. [0024]) The present invention provides an improved *Streptococcus pneumoniae* vaccine comprising 10 or more (e.g. 11, 12, 13, 14, or 15 or more) capsular saccharides from different *S. pneumoniae* serotypes conjugated to 2 or more carrier proteins; Para. [0033] The composition in one embodiment includes capsular saccharides derived from serotypes 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F and 23F (preferably conjugated).

Regarding claim 5, modified Biemans discloses the multivalent pneumococcal conjugate vaccine composition prepared according to claim 3; but Biemans fails to disclose wherein said composition comprises of at least 16 polysaccharide protein conjugates having polysaccharide from serotypes 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F and 23F. However, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art at the time of the invention to modify Biemans to include wherein said composition comprises of at least 16 polysaccharide protein conjugates having polysaccharide from serotypes 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F and 23F, since where the general conditions of the claim are disclosed in the prior art (Para. [0024]) The present invention provides an improved *Streptococcus pneumoniae* vaccine comprising 10 or more (e.g. 11, 12, 13, 14, or 15 or more) capsular saccharides from different *S. pneumoniae* serotypes conjugated to 2 or more carrier proteins; Para. [0033] at least 12 or 13 saccharide antigens are included, for example a vaccine may comprise capsular saccharides derived from serotypes 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F and 23F or capsular saccharides derived from serotypes 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F and 23F, although further saccharide antigens, for example 23 valent (such as serotypes 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F and 33F), are also contemplated by the invention), designing at least 16 polysaccharide protein conjugates having polysaccharide from serotypes 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F and 23F involves only routine skill in the art. The motivation of doing so would be to develop various multivalent pneumococcal conjugate vaccine composition using various polysaccharides conjugated to the proteins.

Regarding claim 6, modified Biemans the composition as claimed in claim 1, and Biemans further discloses wherein carrier protein is one or more selected from the group consisting of CRM197, Pneumococcal surface adhesin A (PsaA), diphtheria toxoid (DT), tetanus toxoid (TT), fragment C of tetanus toxoid, pertussis toxoid, protein D of *H. influenzae*, *E. coli* LT, *E. coli* ST, and exotoxin A from *Pseudomonas aeruginosa*, outer membrane complex c (OMPc), porins, transferrin binding proteins, pneumolysin, pneumococcal surface protein A (PspA), pneumococcal surface adhesin A (PsaA), pneumococcal PhtD, pneumococcal surface proteins BVH-3 and BVH-11, protective antigen (PA) of *Bacillus anthracis* and detoxified edema factor (EF) and lethal factor (LF) of *Bacillus anthracis*, ovalbumin, keyhole limpet hemocyanin (KLH), human serum albumin, bovine serum albumin (BSA) and purified protein derivative of tuberculin (PPD), particularly CRM197, tetanus toxoid, diphtheria toxoid or PsaA (Para. [0036]) Each *Streptococcus pneumoniae* capsular saccharide may be conjugated to a carrier protein independently selected from the group consisting of TT, DT, CRM197, fragment C of TT, PhtD, PhtDE fusions (particularly those described in WO 01/98334 and WO 03/54007), detoxified pneumolysin and protein D, other than saccharide from serotype 19F which is always conjugated to DT or CRM 197, preferably DT).

Regarding claim 7, modified Biemans the composition as claimed in claim 1, but Biemans fails to disclose wherein said multivalent composition comprises of i. at least one polysaccharide protein conjugate having CRM197 as carrier protein at least one polysaccharide protein having TT as carrier protein; or ii. at least one polysaccharide protein conjugate having CRM197 as carrier protein at least one polysaccharide protein having DT as carrier protein; or iii. at least one polysaccharide protein conjugate having CRM197 as carrier protein at least one polysaccharide protein having pneumococcal surface adhesin A (PsaA) as carrier protein; or iv. at least one polysaccharide protein conjugate having CRM197 as carrier protein at least one polysaccharide protein having TT as carrier protein, at least one polysaccharide protein having DT as carrier protein; or v. at least one polysaccharide protein conjugate having CRM197 as carrier protein at least one polysaccharide protein having TT as carrier protein, at least one polysaccharide protein having pneumococcal surface adhesin A (PsaA) as carrier protein; or vi. at least one polysaccharide protein conjugate having CRM197 as carrier protein at least one polysaccharide protein having DT as carrier protein, at least one polysaccharide protein having pneumococcal surface adhesin A (PsaA) as carrier protein.

However, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art at the time of the invention to modify Biemans to include wherein said multivalent composition comprises of i. at least one polysaccharide protein conjugate having CRM197 as carrier protein at least one polysaccharide protein having TT as carrier protein; or ii. at least one polysaccharide protein conjugate having CRM197 as carrier protein at least one polysaccharide protein having DT as carrier protein; or iii. at least one polysaccharide protein conjugate having CRM197 as carrier protein at least one polysaccharide protein having pneumococcal surface adhesin A (PsaA) as carrier protein; or iv. at least one polysaccharide protein conjugate having CRM197 as carrier protein at least one polysaccharide protein having TT as carrier protein, at least one polysaccharide protein having DT as carrier protein; or v. at least one polysaccharide protein conjugate having CRM197 as carrier protein at least one polysaccharide protein having TT as carrier protein, at least one polysaccharide protein having pneumococcal surface adhesin A (PsaA) as carrier protein; or vi. at least one polysaccharide protein conjugate having CRM197 as carrier protein at least one polysaccharide protein having DT as carrier protein, at least one polysaccharide protein having pneumococcal surface adhesin A (PsaA) as carrier protein, since where the general conditions of the claim are disclosed in the prior art (Para. [0024]) wherein the vaccine comprises serotype 19F capsular saccharide conjugated to diphtheria toxoid or CRM197, and 2-8 *S. pneumoniae* capsular saccharides selected from different serotypes conjugated to protein D), designing wherein said multivalent composition comprises of ii. at least one polysaccharide protein conjugate having CRM197 as carrier protein at least one polysaccharide protein having DT as carrier protein involve only routine skill in the art. The motivation of doing so would be to develop various multivalent pneumococcal conjugate vaccine composition using various polysaccharides conjugated to the proteins.

**WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.

PCT/IB2016/053265

**Supplemental Box**

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.

Continuation of:

Regarding claim 8, modified Biemans the composition as claimed in Claim 3, but Biemans fails to disclose wherein serotype 3 is preferably conjugated to CRM-197, serotype 18C is preferably conjugated to CRM197 and Serotype 4 can be conjugated to TT or DT. However, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art at the time of the invention to modify Biemans to include wherein serotype 3 is preferably conjugated to CRM-197, serotype 18C is preferably conjugated to CRM197 and Serotype 4 can be conjugated to TT or DT, since where the general conditions of the claim are disclosed in the prior art (Para. [0024] an improved Streptococcus pneumoniae vaccine comprising 10 or more (e.g. 11, 12, 13, 14, or 15 or more) capsular saccharides from different S. pneumoniae serotypes conjugated to 2 or more carrier proteins; Para. [0036] Each Streptococcus pneumoniae capsular saccharide may be conjugated to a carrier protein independently selected from the group consisting of TT, DT, CRM197, fragment C of TT, PhtD, PhtDE fusions (particularly those described in WO 01/98334 and WO 03/54007), detoxified pneumolysin and protein D), designing the various combination of polysaccharide-protein conjugate involves only routine skill in the art. The motivation of doing so would be to develop various multivalent pneumococcal conjugate vaccine composition using various polysaccharides conjugated to the proteins.

Claims 9-17 meet the criteria set out in PCT Article 33(2)-(3), because the prior art does not teach or fairly suggest:

Regarding claim 9, the prior art of record, individually or in combination, does not teach or fairly suggest the method as claimed in claim 1, wherein said histidine-succinic acid buffer has a concentration between 1mM and 200mM, preferably between 10mM and 40mM, more preferably 20mM.

Regarding claim 10, the prior art of record, individually or in combination, does not teach or fairly suggest the method as claimed in Claim 1, wherein the shift in pH for the histidine-succinic buffer occurs preferably from 6.8 to a pH between 5.6 and 5.8

Regarding claim 11, the prior art of record, individually or in combination, does not teach or fairly suggest the method as claimed in claim 1, wherein said method comprises of following steps: i. adding polysaccharide molecules to a protein carrier in a predetermined ratio, preferably 0.8 to 1.4 and more preferably 1:1, and at a predetermined pH, preferably between 5.2 and 5.9, to obtain a plurality of distinct polysaccharide-protein conjugates; ii. adsorbing individually on a first aluminium salt adjuvant in a histidine-succinic acid buffer having a predetermined concentration, a first predetermined set of polysaccharide-protein conjugates selected from said plurality of polysaccharide protein conjugates obtained in step (i), wherein the amount of said aluminium salt adjuvant ranges from 20-375 pg of Al<sup>+++</sup> per 0.5 ml dose of the final vaccine formulation; wherein the set of polysaccharide-protein conjugates comprises of 6A, 9V and 23F. iii. adsorbing in a combined mode on a second aluminium salt adjuvant in a histidine succinic acid buffer having a predetermined concentration, a second predetermined set of polysaccharide-protein conjugates selected from said plurality of polysaccharide-protein conjugates obtained in step (i), wherein the amount of said aluminium salt adjuvant ranges from 20-375 pg of Al<sup>+++</sup> per 0.5 ml dose of the final vaccine formulation; wherein the set of polysaccharide-protein conjugates comprises of 1, 5, 6B, 7F, 14, 19A and 19F. iv. blending said first adsorbed set obtained in step (ii) with said second adsorbed set obtained in step (iii), and optionally adding surfactant preferably Polysorbate-20 and/or at least one preservative selected from the group consisting of mercurial preservatives such as Thimerosal, 2-phenoxy-ethanol, methyl parabens, propyl parabens, benzyl alcohol and mixtures thereof, with the help of a Rushton turbine flat blade impeller to obtain a stable multivalent pneumococcal polysaccharide-protein conjugate vaccine formulation.

Regarding claim 12, the prior art of record, individually or in combination, does not teach or fairly suggest a method for reducing polysaccharide-polysaccharide aggregation across sizing and conjugation reactions, particularly for Streptococcus pneumoniae polysaccharide containing a phosphodiester linkage between repeat units covalently linked to a carrier protein using cyanilation chemistry, thereby providing improved immunogenicity and stability for each conjugate, wherein said method comprises of: i) reacting polysaccharide having average size between 130 KDa and 190 KDa with a cyanilation agent in a ratio between 1:0.8 and 1:1 at about 22 °C to about 25 °C for a period of about 4 min to about 10 min, resulting in a cyanate-activated polysaccharide; and ii) contacting cyanate-activated polysaccharide with protein in a ratio of 1:1 at a pH of about 9 to about 9.5 for a period of 3hr to 5 hr followed by quenching with glycine; wherein said conjugation process minimizes cyanilation agent by-product mediated degradation of sized polysaccharide and prevents subsequent polysaccharide-polysaccharide aggregation resulting in a conjugate having minimum free polysaccharide content.

Claims 13-16 depend from claim 12, and therefore meet the criteria set out in PCT Article 33(2)-(3) for at least the same reasons as claim 12.

Regarding claim 17, the prior art of record, individually or in combination, does not teach or fairly suggest the method of Claim 2, wherein percent adsorption is measured by a Sandwich ELISA particularly comprising of a step of dissolution of alum adsorbed conjugate samples using sodium hydroxide and citric acid.

**WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.

PCT/IB2016/053265

**Supplemental Box**

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.  
Continuation of:

The following prior art is made of record to support and further define the reasons claims 9-17 meet the criteria set out in PCT Article 33 (2)-(3):

(i) US 2010/0209450 A1 to Biemanns et al. discloses a method of conjugating a polysaccharide to a protein in a multivalent pneumococcal polysaccharide-protein conjugate vaccine, which said method comprises i) reacting polysaccharide with a cyanation agent, resulting in a cyanate-activated polysaccharide; and ii) contacting cyanate-activated polysaccharide with protein, followed by quenching with glycine (Para. [0024] The present invention provides an improved Streptococcus pneumoniae vaccine comprising 10 or more (e.g. 11, 12, 13, 14, or 15 or more) capsular saccharides from different S. pneumoniae serotypes conjugated to 2 or more carrier proteins; Para. [0059] The saccharide conjugates present in the immunogenic compositions of the invention may be prepared by any known coupling technique. The conjugation method may rely on activation of the saccharide with 1-cyano-4-dimethylamino pyridinium tetrafluoroborate (CDAP) to form a cyanate ester. The activated saccharide may thus be coupled directly or via a spacer (linker) group to an amino group on the carrier protein; Para. [0206] From a 100 mg/ml stock solution in acetonitrile or acetonitrile/water 50 percent /50 percent solution, CDAP (CDAP/PS ratio 0.5-1.5 mg/mg PS) was added to the polysaccharide solution. 1.5 minute later, 0.2M-0.3M NaOH was added to obtain the specific activation pH. The activation of the polysaccharide was performed at this pH during 3 minutes at 25 degrees centigrade Purified protein (protein D, PhtD, pneumolysin or DT) (the quantity depends on the initial PS/carrier protein ratio) was added to the activated polysaccharide and the coupling reaction was performed at the specific pH for up to 2 hour (depending upon serotype) under pH regulation. In order to quench un-reacted cyanate ester groups, a 2M glycine solution was then added to the mixture), but fails to disclose a method for reducing polysaccharide-polysaccharide aggregation across sizing and conjugation reactions, particularly for Streptococcus pneumoniae polysaccharide containing a phosphodiester linkage between repeat units covalently linked to a carrier protein using cyanation chemistry, thereby providing improved immunogenicity and stability for each conjugate, wherein said method comprises of: i) reacting polysaccharide having average size between 130 KDa and 190 KDa with a cyanation agent in a ratio between 1:0.8 and 1:1 at about 22 °C to about 25 °C for a period of about 4 min to about 10 min, resulting in a cyanate-activated polysaccharide; and ii) contacting cyanate-activated polysaccharide with protein in a ratio of 1:1 at a pH of about 9 to about 9.5 for a period of 3hr to 5 hr followed by quenching with glycine; wherein said conjugation process minimizes cyanation agent by-product mediated degradation of sized polysaccharide and prevents subsequent polysaccharide-polysaccharide aggregation resulting in a conjugate having minimum free polysaccharide content.

(ii) US 2014/0377302 A1 to Serum Institute of India Ltd. discloses a method of conjugating a polysaccharide to a protein in a multivalent polysaccharide-protein conjugate vaccine, which said method comprises i) reacting polysaccharide with a cyanation agent, resulting in a cyanate-activated polysaccharide; and ii) contacting cyanate-activated polysaccharide with protein, followed by quenching with glycine (Para. [0012] the instant invention relates to multivalent meningococcal polysaccharide protein conjugate composition; Example 2 Conjugation of Meningococcal X Polysaccharide to Carrier Protein a) Meningococcal X Polysaccharide of Varying Average Molecular Weight Conjugated to Hydrazine Derivatized Tetanus Toxoid (TT), Para. [0055] Firstly homogenized Polysaccharide of X (Strain 9601), Average molecular weight 215 kD on SEC HPLC, (30 mg/ml) 45 mg was activated with 90 mg CDAP (dissolved 100 mg/ml in acetonitrile), pH of mixture was adjusted to 9.5 with 1M NaOH. Then after 3 min hydrazine activated TT (30 mg/ml in 1M NaCl) 67.5 was added to the reaction. The reaction was monitored on HPLC and continued upto 18 hrs. After 18 hrs reaction was quenched by addition of glycine and crude conjugate was purified by dialfiltration 300 kD TFF membrane in Tris 10 mM pH 7.2; Para. [0044] a cyanation reagent selected from but not limited to 1-cyano-4-(dimethylamino)-pyridinium tetrafluoroborate ('CDAP'), ... 1-cyano-4-pyrrolidinopyridinium tetrafluoroborate (CPPT), ... ), but fails to disclose a method for reducing polysaccharide-polysaccharide aggregation across sizing and conjugation reactions, particularly for Streptococcus pneumoniae polysaccharide containing a phosphodiester linkage between repeat units covalently linked to a carrier protein using cyanation chemistry, thereby providing improved immunogenicity and stability for each conjugate, wherein said method comprises of: i) reacting polysaccharide having average size between 130 KDa and 190 KDa with a cyanation agent in a ratio between 1:0.8 and 1:1 at about 22 °C to about 25 °C for a period of about 4 min to about 10 min, resulting in a cyanate-activated polysaccharide; and ii) contacting cyanate-activated polysaccharide with protein in a ratio of 1:1 at a pH of about 9 to about 9.5 for a period of 3hr to 5 hr followed by quenching with glycine; wherein said conjugation process minimizes cyanation agent by-product mediated degradation of sized polysaccharide and prevents subsequent polysaccharide-polysaccharide aggregation resulting in a conjugate having minimum free polysaccharide content.

Claims 1-17 meet the criteria set out in PCT Article 33(4), and thus have industrial applicability because the subject matter claimed can be made or used in industry.

## **MÉTODOS PARA MEJORAR LA ADSORCIÓN DE CONJUGADOS DE POLISACÁRIDO-PROTEÍNA Y UNA FORMULACIÓN DE VACUNA MULTIVALENTE OBTENIDA CON LOS MISMOS.**

### Antecedentes de la invención

*Streptococcus pneumoniae* es una de las principales causas de neumonía, meningitis y sepsis causadas por bacterias en niños. Las estimaciones recientes de muertes infantiles causados por *S pneumoniae* varían en un rango de 0,7-1,0 millones por año en todo el mundo. En el año 2000, se estimó que se produjeron aproximadamente 14,5 millones de episodios de enfermedad neumocócica severa (un rango indefinido de 11,1-18,0 millones). La enfermedad neumocócica causó aproximadamente 0,826 millones de muertes (0,58-0,926 M) en niños de 1-59 meses de edad, de los cuales 0,091 millones (0,063-0,1 M) eran niños VIH-positivos y 0,735 millones (0,51-0,82 M) eran VIH-negativos.

Las vacunas antineumocócicas de polisacáridos multivalentes autorizadas con licencia por muchos años han demostrado ser valiosas en la prevención de la enfermedad neumocócica en adultos, en particular, en las personas de edad avanzada y en aquellos de alto riesgo. Sin embargo, los lactantes y niños jóvenes responden pobremente a los polisacáridos neumocócicas no conjugados. La vacuna antineumocócica conjugada, Prevnar®, que contiene los 7 serotipos aislados con mayor frecuencia (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F) que causaban una enfermedad neumocócica invasiva en niños jóvenes y lactantes en ese momento, fue autorizada en los EEUU en el mes de febrero, 2000.

Además, Prevnar™ 13 (Wyeth) es una vacuna aprobada que contiene

conjugados de polisacáridos de los serotipos 6A, 6B, 19A, 19F además de 1, 3, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C y 23F. Synflorix™ (GSK) es otra vacuna aprobada que proporciona protección contra 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F, así como una protección cruzada contra 19A y 6A.

En general, las formulaciones de vacuna deben ser estables y de consistencia uniforme como para satisfacer la necesidad de una vida útil prolongada y el uso de recipientes de múltiples dosis. Las vacunas basadas en proteínas, que incluyen conjugados de polisacárido-proteína, son objeto de agregación y precipitación de proteínas lo cual puede resultar en una concentración eficaz total más baja de la vacuna debido a la falta de disponibilidad del producto proteico precipitado. En particular, las vacunas conjugadas de polisacáridos-proteínas parecen tener una tendencia más fuerte a agregarse que la proteína transportadora sola (Véase Berti et al, 2004, *Biophys J* 86: 3-9). La elección de la formulación para una vacuna conjugada de polisacáridos-proteínas puede afectar considerablemente la agregación de lcomo proteínas. Véase Ho et al., 2001, *Vaccine* 19: 716-725.

A pesar del desarrollo existente de varias composiciones de vacunas antineumocóccicas multivalentes conjugadas de polisacáridos-proteínas en todo el mundo, existe una necesidad continua en el arte de formulaciones de vacuna que proporcionen una gran adsorción de conjugados individuales y sin agregación/precipitación de composiciones inmunogénicas que tengan conjugados de polisacárido-proteína.

Los adyuvantes usados tradicionalmente en dichas vacunas antineumocóccicas multivalentes han comprendido sales de aluminio, tal como hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio. Se conocen muchos otros

adyuvantes experimentales, sin embargo la adsorción a las sales de aluminio continúa siendo la formulación de adyuvante de vacuna más común. Aunque su uso está muy extendido, las sales de aluminio no siempre serán compatibles con antígenos particulares, resultando así en variaciones significativas con respecto al porcentaje de adsorción del conjugado de polisacárido-proteína sobre alúmina o la antigenicidad.

Las propiedades inmunológicas y la estabilidad de la vacuna conjugada candidato adsorbida sobre los adyuvantes de aluminio depende de varios parámetros como i) la antigenicidad de cada antígeno, ii) el tipo de proteína transportadora usada para la conjugación y iii) el tipo de adyuvante usado. Más importante aún, se ha informado con anterioridad que el grado de adsorción del antígeno sobre el adyuvante es uno de los parámetros clave para demostrar la consistencia entre lotes del proceso de formulación y su posible impacto sobre la eficacia del producto de vacuna. Además, el porcentaje de adsorción de los conjugados de polisacárido-proteína puede caer aún más con el almacenamiento de la formulación o bajo situaciones adversas tales como las amplitudes de temperatura. Véase, *54th Meeting of the WHO Expert Committee on Biological Standardization, Recommendations for the production & control of Pneumococcal conjugate vaccines*, 17-21 de noviembre, 2003; Carl E. Frasch, *Session IV: Conjugate Vaccines; Vaccine Technology II*; Portugal; 2008.

Según los lineamientos de la Agencia Reguladora Europea (EMA) para los conjugados de polisacárido-proteína neumocócicos, la completitud de adsorción (% de conjugado no unido) debería considerarse como un parámetro de control de calidad crucial junto con el contenido de alúmina, esterilidad, identidad y el contenido de polisacáridos libres. Véase, *Assessment Report for*

*Synflorix* 2009, N° Procedimiento EMEA/H/C/000973. La OMS recomienda maximizar la adsorción para los antígenos precipitados por alúmina (por ejemplo, el toxoide de la difteria y del tétano) en donde por lo menos se adsorberá un 80% de los antígenos en estas vacunas.

Durante la elaboración del conjugado de polisacárido-proteína, la formulación puede comprender agregados de tipo polisacárido-polisacárido, tipo proteína-proteína o tipo polisacárido-proteína. Dichas agregaciones también se observan en el producto terminado lo cual conduce al rechazo de entre un 4% y 10% de los viales rellenos de vacunas con conjugados de polisacárido-proteína, afectando de esa manera la estabilidad y la eficacia de la vacuna conjugada.

Dadas las limitaciones descritas previamente con respecto a la agregación y la estabilidad del polisacárido y su conjugado, persiste una necesidad distintiva de reducir la agregación y estabilización de dicho polisacárido en el procesamiento corriente abajo hasta la etapa de formulación final de la elaboración de vacunas antineumocóccicas conjugadas.

#### Resumen de la invención:

La invención provee mejoras en la estabilidad de vacunas que incluyen sales de aluminio, y en particular métodos para minimizar la agregación y mejorar el porcentaje de adsorción de conjugados individuales en vacunas antineumocóccicas conjugadas de polisacáridos-proteínas multivalentes. Los inventores de la presente invención han observado que la adsorción combinada de conjugados de polisacárido-proteína y el uso de una relación de polisacárido a proteína mayor que 1:1 da como resultado i) un porcentaje de adsorción menor que un 55% para los conjugados de *S. pneumoniae* de los serotipos 6A,

9V y 23F y ii) un porcentaje de adsorción de entre aproximadamente 80% y 90% para los conjugados de los serotipos remanentes, lo cual impide una adsorción completa de un conjugado de un serotipo individual para una formulación de conjugado neumocócica multivalente dada. También se observó que la formulación de vacuna preparada usando un pH de entre 6,8 y 7,0 daba como resultado una agregación de entre aproximadamente 4 y 10% y una menor adsorción.

La presente invención se relaciona con un método para la preparación de una formulación de vacuna antineumocócica conjugada de polisacáridos-proteínas multivalente estable, que presenta una adsorción óptima de entre 75 y 99% para cada conjugado, en donde, en dicho método, se previene la agregación mediante el empleo de al menos uno de:

- a. Una adsorción individual o separada para los conjugados que de lo contrario muestran una adsorción menor relativa por una adsorción combinada;
- b. Un sistema amortiguador de histidina-ácido succínico junto con un cambio en el pH de pH neutro a pH ácido;
- c. Una relación de polisacárido a proteína de entre 0,6 y aproximadamente 1,4; y/o
- d. El uso de un impulsor de turbina tipo Rushton de seis hojas en el recipiente de formulación.

La presente invención también divulga un método para preparar conjugados de polisacárido-proteína con una inmunogenicidad mejorada y un menor contenido de polisacáridos libres para polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* que contienen un enlace fosfodiéster, en particular 19A, 19F, 6A y

6B. Dicho proceso de conjugación minimiza la degradación mediada por productos secundarios de agentes de cianilación de polisacáridos reducidos e impide la subsiguiente agregación polisacárido-polisacárido estabilizando de esa manera los polisacáridos lábiles. Una clave de una agregación reducida puede atribuirse al uso de un polisacárido reducido en el rango de 100-200 KDa, y una relación de polisacárido a CDAP (agente de cianilación) en el rango de (1):(0,8-1).

La composición inmunogénica preparada según la presente invención provee una agregación reducida entre conjugados de polisacárido-polisacárido y polisacárido-proteína junto con una estabilidad e inmunogenicidad mejoradas.

Figuras:

Figura 1: Perfil de SEC-HP-RI del 19A PnPs reducido (178 KDa) antes del tratamiento con DMAP

Figura 2: Perfil de SEC-HP-RI del 19A PnPs reducido (70 KDa) después de 24 h (A) y perfiles de degradación por el tratamiento con DMAP de 14,5 KDa después de 72 h (B)

Figura 3: Perfiles de SEC-HP-RI del 19A PnPs reducido (178 KDa; A) y agregación dependiente del tiempo de polisacáridos activados mediada por CDAP (5B, 5C y 5D), 5E (conjugados sin DF de 10 KDa), 5F (conjugado con DF de 10 KDa), 19A activado por 5G-19A reducido/5H (Ps modificado: relación de CDAP de 1:1 para 19A) con un método de conjugación que no emplea un paso de diafiltración de 10 KDa.

Figura 4: Perfiles de SEC-HP-RI del 19F PnPs reducido (157 KDa; A) y agregación dependiente del tiempo de polisacáridos activados mediados por CDAP (B), 6C/6D (Ps modificados: relación de CDAP de 1:1 para 19F) con un

método de conjugación que no emplea un paso de diafiltración de 10 KDa

Figura 5: Impulsor de hojas planas de una turbina tipo Rushton de seis hojas

Figura 6: Protocolo de adsorción

Descripción detallada:

Un objeto de la invención consiste en proveer mejoras en la estabilidad de vacunas que incluyen sales de aluminio y, en particular, métodos para minimizar la agregación y mejorar el porcentaje de adsorción de conjugados individuales en vacunas antineumocócicas conjugadas con polisacárido-proteína multivalentes. Los inventores de la presente invención han observado que la adsorción combinada de conjugados de polisacárido-proteína y el uso de una relación de polisacárido a proteína mayor que 1:1 da como resultado i) un porcentaje de adsorción menor que un 55% para los conjugados de *S. pneumoniae* de los serotipos 6A, 9V y 23F y ii) un porcentaje de adsorción de entre aproximadamente 80% y 90% para los conjugados de los serotipos remanentes, lo cual impide una adsorción completa de un conjugado de un serotipo individual para una formulación de conjugado neumocócico multivalente dada. También se observó que la formulación de vacuna preparada usando un pH de entre 6,8 y 7,0 daba como resultado una agregación de entre aproximadamente 4 y 10% y una menor adsorción.

El polisacárido se cultivó usando el método descrito en la Patente WO2013088448A1, en donde dicho método comprende (a) proveer un inóculo de una cepa bacteriana que expresa el CP; (b) cultivar la cepa por fermentación a pH 7,2, en donde la velocidad de de adición del medio de alimentación es equivalente a la velocidad de adición de la mezcla alcalina para

mantener un pH predefinida; c) fermentar el medio de cultivo a 35-38 °C bajo agitación a 50-150 RPM con una velocidad de flujo de aire de 0,1-0,5 vvm.

El polisacárido se purificó mediante el proceso descrito en la Patente WO2012127485. Los Pn-Ps preparados mediante el proceso de la presente muestran una recuperación de entre aproximadamente 60 y 70%, en donde la reducción de la contaminación del polisacárido C es de 1 a 5 veces en comparación con el contenido de C-Ps según la cromatografía de interacción posthidrofóbica (HIC) o la cromatografía de intercambio preiónico (IEC), la contaminación proteica es menor que 1% y la contaminación por ácidos nucleicos es menor que un 1%. Dicho proceso se ha llevado a cabo a escala de investigación, piloto y comercial.

Este proceso permite purificar polisacáridos con un consumo de tiempo 80-90% menor y un costo 90% menor en comparación con los métodos basados en CTAB/alcohol.

De acuerdo con una forma de realización importante de la presente invención, se puede obtener un porcentaje de adsorción mejorado de entre 75 y 95% para los conjugados de *S. pneumoniae* mediante i) el uso de una relación de polisacárido a proteína de aproximadamente 0,8 a 1,4; ii) el uso de una adsorción individual o separada para los conjugados de *S. pneumoniae* de adsorción pobre, iii) el mantenimiento de un pH más bajo durante la formulación.

De acuerdo con un aspecto de la primera forma de realización, la relación preferida de polisacárido a proteína es de 1:1.

De acuerdo con un segundo aspecto de la primera forma de realización, dicha composición comprende por lo menos 2 conjugados de polisacárido-

proteína que comprenden un polisacárido seleccionado entre los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9F, 9N, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 33F y 45.

De acuerdo con un tercer aspecto de la primera forma de realización, se puede utilizar un modo de adsorción individual para cualquier serotipo de *S. pneumoniae* seleccionado entre los serotipos 2, 3, 4, 6A, 8, 9V, 9F, 9N, 12F, 15B, 17F, 18C, 20, 22F, 23F, 33F y 45, preferiblemente para los serotipos 6A, 9V y 23F de *S. pneumoniae*.

De acuerdo con un aspecto preferido de la primera forma de realización, la vacuna antineumocócica conjugada multivalente es 10-valente, en donde los serotipos 6A, 9V y 23F de *S. pneumoniae* se adsorben individualmente como una mezcla separada y luego se agrega a otra mezcla que comprende una mezcla de los serotipos 1, 5, 6B, 7F, 14, 19A y 19F de *S. pneumoniae* que se adsorbieron de un modo combinado.

De acuerdo con otro aspecto preferido de la primera forma de realización, la vacuna antineumocócica conjugada multivalente es 11, 13, 15, 16 o más valente, en donde por lo menos un serotipo de *S. pneumoniae* seleccionado del grupo de los serotipos 2, 3, 4, 6A, 8, 9V, 9F, 9N, 12F, 15B, 17F, 18C, 20, 22F, 23F, 33F y 45 se adsorben de manera individual o se adsorbe en un grupo más pequeño como una mezcla separada y luego se agrega a otra mezcla que comprende una mezcla de los serotipos de *S. pneumoniae* 1, 5, 6B, 7F, 14, 19A y 19F que se han adsorbido de un modo combinado.

De acuerdo con aún otro aspecto preferido de la primera forma de realización, la vacuna antineumocócica conjugada multivalente es 16 valente,

en donde por lo menos un serotipo de *S. pneumoniae* seleccionado de un grupo de 2, 3, 4, 6A, 9V, 12F, 15B, 18C y 23F se adsorbe de manera individual o en grupos más pequeños como una mezcla separada y luego se agrega a otra mezcla que comprende una mezcla de los serotipos de *S. pneumoniae* 1, 5, 6B, 7F, 14, 19A y 19F que se han adsorbido de un modo combinado.

Una segunda forma de realización de la presente invención es que la agregación en una formulación de un conjugado neumocócico de polisacárido-proteína multivalente se puede prevenir por completo mediante i) el uso de un cambio de pH de pH neutro a pH ácido y ii) el uso de una combinación de soluciones amortiguadoras de histidina-ácido succínico.

De acuerdo con un aspecto de la segunda forma de realización, dicho cambio de pH puede ser de 6,8 a un pH seleccionado, pero en un sentido no taxativo, entre 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8 y 5,9. Más preferiblemente, de 6,8 a un pH seleccionado entre 5,4, 5,5, 5,6, 5,7 y 5,8.

De acuerdo con otro aspecto de la segunda forma de realización, dicho sistema de solución amortiguadora de histidina-ácido succínico puede tener una concentración entre 1 mM y 200 M. La concentración preferiblemente es de por lo menos 1 mM (por ejemplo, a lo sumo de 200 mM, 150 mM, 100 mM, 90 mM, 80 mM, 70 mM, 60 mM, 50 mM, 40 mM, 30 mM, 20 mM, 10 mM etc.). Más preferiblemente la concentración de la solución amortiguadora de histidina-ácido succínico en la composición es de entre 10 mM y 40 mM.

Una tercera forma de realización de la presente invención es que se puede prevenir la formación de flóculos o agregados en los conjugados neumocócicos a granel mediante el uso de impulsores de hoja plana de una turbina Rushton en lugar de impulsores con agitación magnética, tipo axial y

tipo radial en los recipientes de formulación.

La estabilidad de una composición inmunogénica de la invención se determina fácilmente usando técnicas estándar, que son bien conocidas y de rutina para los especialistas en el arte. Por ejemplo, una composición inmunogénica se puede evaluar por el porcentaje de adsorción de conjugados, la estabilidad, agregación, inmunogenicidad, formación de particulados, pérdida de proteína (concentración) y semejantes, mediante métodos que incluyen, pero en un sentido no taxativo, ELISA, dispersión de luz, densidad óptica, centrifugación por velocidad de sedimentación, centrifugación por equilibrio de sedimentación, dicroísmo circular (CD), ensayo de Lowry, ensayo con ácido bicinconínico (BCA) y semejantes.

En una forma de realización preferida, la presente invención provee un nuevo ELISA que permite cuantificar directamente polisacárido conjugados/unidos sin afectar la antigenicidad de los conjugados en vacunas antineumocócicas conjugadas multivalentes. El mismo se puede utilizar para la cuantificación del contenido de conjugado no adsorbido en la matriz de la formulación como un parámetro indicativo del porcentaje de adsorción, en donde los conjugados presentan más de un 70% de adsorción. Preferiblemente, dicho ELISA puede emplear un paso de pre-ensayo que comprende la desorción del conjugado de un adyuvante de alúmina sin afectar la antigenicidad de la proteína transportadora así como del polisacárido conjugado. Más específicamente, la disolución de las muestras de conjugado adsorbido sobre alúmina se logra usando hidróxido de sodio y ácido cítrico.

La proteína transportadora se puede seleccionar de un grupo que comprende, pero en un sentido no taxativo, CRM197, P4, toxoide de la difteria,

toxóide del tétano, fragmento C del toxóide del tétano, toxóide de Pertussis, proteína D de *H. influenzae*, LT de *E. coli*, ST de *E. coli* y la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*, complejo c de la membrana exterior (OMPC), porinas, proteínas de unión a transferrina, neumolisina, proteína de la superficie neumocócica A (PspA), adhesina de la superficie neumocócica A (PsaA), PhtD neumocócica, las proteínas de la superficie neumocócica BVH-3 y BVH-11, el antígeno protector (PA) de *Bacillus anthracis* y factor de edema detoxificado (EF) y el factor letal (LF) de *Bacillus anthracis*, ovoalbúmina, hemocianina de lapa (KLH), albúmina de suero humano, albúmina de suero bovino (BSA) y la proteína purificada derivada de tuberculina (PPD), en particular CRM197 o P4.

De acuerdo con una forma de realización preferida, dicha composición multivalente puede comprender:

- i) por lo menos un conjugado de polisacárido-proteína que comprende CRM197 como proteína transportadora, por lo menos un conjugado de polisacárido-proteína que tiene TT como proteína transportadora; o
- ii) por lo menos un conjugado de polisacárido-proteína que tiene CRM197 como proteína transportadora, por lo menos un conjugado de polisacárido-proteína que tiene DT como proteína transportadora; o
- iii) por lo menos un conjugado de polisacárido-proteína que tiene CRM197 como proteína transportadora, por lo menos un conjugado de polisacárido-proteína que comprende la adhesina de la superficie neumocócica A (PsaA) como proteína transportadora; o
- iv) por lo menos un conjugado de polisacárido-proteína que tiene CRM197 como proteína transportadora, por lo menos un conjugado de

polisacárido-proteína que tiene TT como proteína transportadora, por lo menos un conjugado de polisacárido-proteína que tiene DT como proteína transportadora; o

v) por lo menos un conjugado de polisacárido-proteína que tiene CRM197 como proteína transportadora, por lo menos un conjugado de polisacárido-proteína que tiene TT como proteína transportadora, por lo menos un conjugado de polisacárido-proteína que tiene adhesina de la superficie neumocócica A (PsaA) como proteína transportadora; o

vi) por lo menos un conjugado de polisacárido-proteína que tiene CRM197 como proteína transportadora, por lo menos un conjugado de polisacárido-proteína que tiene TT como proteína transportadora, por lo menos un conjugado de polisacárido-proteína que tiene adhesina de la superficie neumocócica A (PsaA) como proteína transportadora.

En otra forma de realización, la proteína transportadora preferida conjugada al Serotipo 3 es CRM-197, al Serotipo 4 es TT o DT y al Serotipo 18C es CRM197.

Otra forma de realización de la presente invención incluye el uso de PsaA como proteína transportadora en la formulación final. La PsaA también se puede usar en la formulación final como un adyuvante.

En determinadas formas de realización, la formulación multivalente de la presente invención puede comprender un agente tensioactivo, preferiblemente polisorbato 20. En determinadas formas de realización, la concentración final del polisorbato 20 en la formulación es de entre 0,01% y 10% de polisorbato 20 en peso/volumen de la formulación. En aún otras formas de realización, la concentración final del polisorbato 20 en la formulación es de 0,01% de

polisorbato 20 en peso/volumen de la formulación. En otras formas de realización, la concentración final del polisorbato 20 en la formulación es de 0,05% de polisorbato 20 en peso/volumen de la formulación. En aún otras formas de realización, la concentración final del polisorbato 20 en la formulación es de 0,1% de polisorbato 20 en peso/volumen de la formulación. En otra forma de realización, la concentración final del polisorbato 20 en la formulación es de 1,0% de polisorbato 20 en peso/volumen de la formulación. En aún otra forma de realización, la concentración final del polisorbato 20 en la formulación es de 10,0% de polisorbato 20 en peso/volumen de la formulación.

Las formulaciones de vacunas multivalentes de la presente pueden comprender conservantes seleccionados de un grupo que comprende, pero en un sentido no taxativo, conservantes mercuriales (por ejemplo, timerosal), 2-fenoxi-etanol, metilparabeno, propilparabeno y alcohol bencílico (o mezclas de los mismos).

De acuerdo con una forma de realización preferida de la presente invención, dicha formulación de vacuna antineumocócica conjugada de polisacárido-proteína multivalente, preferiblemente 10 ó 16 valente, puede comprender conjugados adsorbidos sobre fosfato de aluminio, histidina, ácido succínico, cloruro de sodio, Polisorbato 20 y tiomersal.

La composición de vacuna de la presente invención puede comprender un paso de adición de un adyuvante de una sal de aluminio en una cantidad de 20-375 µg, 20-300 µg, 20-200 µg, 25-150 µg de Al+++ por dosis de 0,5 ml.

Típicamente, las composiciones inmunogénicas se preparan como inyectables, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas; pero también se pueden preparar como formas sólidas adecuadas para obtener una solución o

una suspensión en un vehículo líquido antes de la inyección. La preparación también se puede emulsionar o encapsular en liposomas para lograr un efecto adyuvante mejorado. El suministro directo de las composiciones generalmente será parenteral (por ejemplo, inyección, por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa y/o intramuscular o administración en el espacio intersticial de un tejido). Las composiciones también se pueden administrar en una lesión. Otros modos de administración incluyen una administración oral y pulmonar, supositorios y con agujas para aplicaciones transdérmicas o transcutáneas, e hipoaerosoles. El tratamiento con la dosificación puede realizarse según un programa de dosis única o un programa de múltiples dosis (por ejemplo, inclusive dosis de refuerzo).

Preferiblemente, las vacunas de la presente invención se pueden guardar en una solución o liofilizadas, en donde la composición de vacuna liofilizada de la presente invención se puede administrar como una formulación de 1, 5 ó 10 dosis con un diluyente que contiene gel de fosfato de aluminio y NaCl.

Otra forma de realización de la presente invención incluye el uso de un impulsor de hoja plana de una turbina Rushton en el recipiente de formulación (refiérase a la Figura 5).

### **Ejemplos:**

#### **Ejemplo 1: Fermentación**

El método comprende (a) proveer un inóculo de una cepa bacteriana que expresa el CP; (b) cultivar la cepa por fermentación a pH 7,2, en donde la velocidad de de adición del medio de alimentación es equivalente a la velocidad de adición de la mezcla alcalina para mantener un pH predefinida; c)

fermentar el medio de cultivo a 35-38 °C bajo agitación a 50-150 RPM con una velocidad de flujo de aire de 0-0,5 vvm.

### **Ejemplo 2: Purificación del polisacárido capsular**

#### **Purificación del polisacárido capsular del serotipo 19F de *S. pneumoniae* (HIC seguido por IEC)**

Se concentraron 5 l de caldo clarificado a partir de cultivos de fermentado del serotipo 19F de *S. pneumoniae* y se diafiltraron hasta 500 ml usando una membrana de MWCO [*corte de Peso Molecular*] de 100 KDa. La diafiltración se llevó a cabo usando una solución amortiguadora de fosfato de sodio 25 mM a pH neutro seguido por diafiltración con agua para inyección (WFI).

Se agregó nucleasa a la solución de polisacárido para alcanzar una concentración final de 8 U/ml de solución. El tratamiento con la enzima se llevó a cabo a 37 °C, durante  $10 \pm 2$  h con agitación.

Se agregó sulfato de amonio a la solución de polisacáridos tratada con nucleasa hasta un 50% de saturación y se incubó a 2-8 °C durante  $12 \pm 2$  h (excepto los serotipos 5 y 4). La mezcla fue sometida a centrifugación. Se descartó el pélet (precipitado). La solución (~500 ml) es sometida a una diafiltración de 100 kD usando NaCl seguido por WFI enfriado. Esta solución diafiltrada que contiene polisacáridos con una solución amortiguadora y una gran concentración de sales se cargó en una columna de HIC.

La columna de cromatografía de interacción hidrofóbica (300 ml) se equilibró con 50% de solución amortiguadora de sulfato de amonio saturada y luego se cargó la solución de polisacáridos (500 ml) en la columna en un rango de pH de 6 a 8, preferiblemente un pH de 6 a un pH de 7. La columna también

se lavó con la solución amortiguadora que contiene 50% de sulfato de amonio saturado. En estas condiciones, el polisacárido se recuperó en el flujo y lava de equilibrio de la columna.

Después se concentró la solución de polisacáridos usando un filtro de MWCO de 100 KDa y luego se diafiltró con NaCl y agua para inyección (WFI).

La columna de cromatografía de interacción iónico (300 ml) (intercambiador aniónico fuerte) se equilibró con solución amortiguadora de sulfato de sodio 20 mM saturada y luego se cargó la solución de polisacáridos (500 ml) en la columna en un rango de pH de 6 a 8, preferiblemente un pH de 6,5 a un pH de 7,5. La columna se lavó además con solución amortiguadora. Los polisacáridos adsorbidos se eluyeron con una elución con gradiente por pasos usando NaCl 1,0 M (varios polisacáridos eluyeron a diferentes fuerzas iónicas de NaCl).

Después se concentró la solución de polisacáridos usando un filtro de MWCO de 100 KDa y luego se diafiltró con agua para inyección (WFI).

La solución de polisacárido diafiltrada se filtró a través de un filtro de membrana de 0,22  $\mu$  en botellas de polipropileno. El polisacárido purificado se guardó congelado a  $-20 \pm 5$  °C.

El proceso anterior también se utilizó para los serotipos 4, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 14, 18C, 19A, 19F y 23F.

#### *Resultados:*

El polisacárido C post cromatografía de HIC y de intercambio iónico se estimó con los espectros de H1/P31 NMR. El proceso dio como resultado una reducción 2-3 veces del contenido de contaminantes.

#### **Ejemplo 3: Reducción de polisacáridos**

Se usó un aparato homogeneizador (Microfluidics) para reducir el peso molecular del polisacárido antes del paso de activación. Para 19A, la reducción del tamaño se efectuó a 24-28 KPSI, en tanto para 19F la reducción del tamaño se efectuó a 26-30 KPSI en donde el número de pases era de aproximadamente 1 a 3. El polisacárido reducido se diafiltró y se concentró seguido por filtración a 0,22  $\mu$ . El polisacárido reducido fue sometido luego a HPSEC-RI para la estimación del peso molecular promedio.

#### **Ejemplo 4: Proceso de conjugación general**

La conjugación del polisacárido con la proteína transportadora se llevó a cabo usando el método de conjugación de CDAP de Lees et al (*Vaccine* 26: 190-198, 1996). Los polisacáridos de tamaño reducido mecánicamente (excepto por 6A que se usó en una forma nativa o reducido dependiente del tamaño de 6A) se disolvieron en NaCl 2 M. Se agregó CDAP (en acetonitrilo) de una solución madre 100 mg/ml a la solución de polisacárido según la relación de polisacárido:CDAP. Aproximadamente 1 minuto después, se agregó NaOH 2 M para obtener la activación con pH específica. La activación del polisacárido se efectuó a este pH durante 4-10 minutos a 22 °C. Se agregó CRM-197 (la cantidad depende de la relación inicial de Ps/proteína) al polisacárido activado y la reacción de acoplamiento se realizó al pH específico por 3-8 h dependiendo del serotipo. Luego se neutralizó la reacción con glicina durante 1 h a 22 °C, y durante la noche a 12 °C. A continuación, se purificaron los conjugados mediante una diafiltración de 300 kDa a 500 kDa seguido por diafiltración a 100 kDa. Además, se determinó el contenido de polisacárido y proteína de los conjugados purificados filtrados a 0,22  $\mu$ m.

**Tabla 1:** Variaciones de los parámetros de la reacción de conjugación

específica del serotipo para 10 serotipos:

| <b>Detalles de conjugación para 10 serotipos</b>    |                                                       |             |             |             |             |             |             |          |             |             |
|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------|-------------|-------------|
| <b>Características</b>                              | <b>Condiciones de proceso de diferentes serotipos</b> |             |             |             |             |             |             |          |             |             |
|                                                     | 1                                                     | 5           | 6A          | 6B          | 7F          | 9V          | 14          | 19A      | 19F         | 23F         |
| <b>Conc. de Ps (mg/ml)</b>                          | 4,5                                                   | 5           | 5           | 11          | 10          | 8           | 10          | 9,5      | 9,5         | 9           |
| <b>Disolución de Ps</b>                             | NaCl 1/2 M                                            | NaCl 2 M    | NaCl 2 M    | NaCl 2 M    | NaCl 1/2 M  | NaCl 1/2 M  | NaCl 2 M    | NaCl 2 M | NaCl 1/2 M  | NaCl 2 M    |
| <b>Tiempo de activación (min)</b>                   | 4                                                     | 4           | 4           | 4           | 4           | 4           | 4           | 4        | 10          | 4           |
| <b>Relación Ps/CDAP</b>                             | 1:1, 25                                               | 1:1         | 1:1         | 1:1, 5      | 1:1, 25     | 1:1, 2      | 1:1, 1      | 1:1      | 1:0, 8      | 1:1, 1      |
| <b>Conc. de CRM 197 (mg/ml)</b>                     | 20                                                    | 20          | 20          | 20          | 20          | 20          | 20          | 20       | 20          | 20          |
| <b>Relación de Ps/CRM</b>                           | 0,82                                                  | 0,75        | 1,05        | 0,77        | 0,85        | 0,87        | 0,82        | 0,86     | 0,96        | 0,71        |
| <b>pH<sup>a</sup>:pH<sup>c</sup>:pH<sup>q</sup></b> | 9,5:9,5:9,5                                           | 9,5:9,5:9,5 | 9,5:9,5:9,5 | 9,5:9,5:9,5 | 9,5:9,5:9,5 | 9,5:9,5:9,5 | 9,5:9,5:9,5 | 09:09:09 | 9,5:9,5:9,5 | 9,5:9,5:9,5 |
| <b>Ps libre (%)</b>                                 | < 1                                                   | 6,3         | 2,63        | 1,57        | < 1         | ND          | 2,53        | 1,5      | 1,07        | 2,59        |
| <b>Proteína libre (%)</b>                           | ND                                                    | 1,54        | 2,2         | ND          | ND          | ND          | ND          | ND       | 2,2         | ND          |
| <b>Distribución de tamaño mol. (%)</b>              | 70,56                                                 | 74,93       | 67,67       | 76,52       | 75,68       | 72,75       | 76,59       | 78,1     | 74,35       | 72,91       |

**Tabla 2:** Comparación del porcentaje de adsorción de los serotipos individuales de las formulaciones PCV-10 según un abordaje de una y dos mezclas del proceso de formulación.

| <b>N° S.</b> | <b>Serotipos de las formulaciones PCV-10</b> | <b>Abordaje de una mezcla (todos los antígenos juntos) % de adsorción</b> |               |               | <b>Abordaje de dos mezclas (Mezcla A y B) % de adsorción</b> |               |               |
|--------------|----------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|---------------|---------------|--------------------------------------------------------------|---------------|---------------|
|              |                                              | <b>Exp. 1</b>                                                             | <b>Exp. 2</b> | <b>Exp. 3</b> | <b>Exp. 4</b>                                                | <b>Exp. 5</b> | <b>Exp. 6</b> |
| 1            | Serotipo 1                                   | 90                                                                        | 85            | 92            | >99                                                          | >99           | 97            |
| 2            | Serotipo 5                                   | 84                                                                        | 82            | 85            | 90                                                           | 88            | 97            |
| 3            | Serotipo 6A                                  | <b>67</b>                                                                 | <b>51</b>     | <b>61</b>     | <b>77</b>                                                    | <b>71</b>     | <b>93</b>     |
| 4            | Serotipo 6B                                  | 82                                                                        | 72            | 83            | 84                                                           | 80            | 86            |

|    |              |           |           |           |           |           |           |
|----|--------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 5  | Serotipo 7F  | 83        | 77        | 81        | 87        | 86        | 84        |
| 6  | Serotipo 9V  | <b>67</b> | <b>43</b> | <b>74</b> | <b>89</b> | <b>85</b> | <b>85</b> |
| 7  | Serotipo 14  | 86        | 83        | 88        | 92        | 91        | 90        |
| 8  | Serotipo 19A | 95        | 92        | 97        | 95        | 93        | 85        |
| 9  | Serotipo 19F | 91        | 87        | 93        | 91        | 88        | 75        |
| 10 | Serotipo 23F | <b>56</b> | <b>52</b> | <b>58</b> | <b>84</b> | <b>81</b> | <b>81</b> |

En el abordaje de una mezcla, los serotipos 6A, 9V y 23F eran adsorbidos pobremente en la formulación, en tanto en el abordaje de dos mezclas el porcentaje de adsorción era de >70% para todos los serotipos.

**Tabla 3: Efecto del cambio de pH sobre el comportamiento de agregación de las formulaciones PCV-10**

| N° S. | Descripciones de la formulación                                   | % de viales rechazados debido a agregados (partículas/flóculos blancos) |                                         |                                         |
|-------|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|
|       |                                                                   | Experimento 7                                                           | Experimento 8                           | Experimento 9                           |
| 1     | Formulaciones de PCV-10 sin 'cambio de pH'                        | 10%                                                                     | 4%                                      | 6%                                      |
| 2     | Formulaciones de PCV-10 con 'cambio de pH' de pH 6,8 a pH 5,6-5,8 | <b>Experimento 10</b>                                                   | <b>Experimento 11</b>                   | <b>Experimento 12</b>                   |
|       |                                                                   | Sin agregados (no se rechaza la prueba)                                 | Sin agregados (no se rechaza la prueba) | Sin agregados (no se rechaza la prueba) |

No se encontraron agregados al pH de 5,6-5,8 en la formulación PCV10 en comparación con la formulación a pH 6,8.

Se encontró que la relación de polisacárido a proteína (1:1) tenía un efecto ventajoso sobre el grado de adsorción del conjugado neumocócico presente en la formulación.

**Tabla 4: Efecto de la relación de Ps a CRM<sub>197</sub> sobre la adsorción del conjugado neumocócico (serotipo 6A) en la Formulación**

| N° S. | Conjugado neumocócico del serotipo 6A a granel | Relación de Ps a proteína | Adsorción (%) |
|-------|------------------------------------------------|---------------------------|---------------|
| 1     | ZPN6ACP1201                                    | 1,95                      | 34            |

|   |               |      |    |
|---|---------------|------|----|
| 2 | ZPN6ACP1203   | 1,51 | 42 |
| 3 | ZPN6ACP1204-A | 1,32 | 87 |
| 4 | ZPN6ACP1204-B | 1,15 | 95 |
| 5 | ZPN6ACP1205   | 1,09 | 86 |

Se observó un efecto de la relación de polisacárido a proteína sobre la adsorción de los conjugados. Los conjugados 6A que tenían una relación de Ps a proteína de  $>1,5$  mostraron una adsorción pobre. La mayoría de los serotipos usados en la formulación PCV-10 contenía una relación de Ps:Pr en el rango de 0,6-1,3 lo que dio como resultado una adsorción óptima de varios serotipos, incluido el serotipo 6A. Sobre la base de los datos de adsorción obtenidos para el experimento con el serotipo 6A y la formulación PCV-10, haciendo una formulación 16 valente, se puede extrapolar que la relación de Ps:Pr de los 6 conjugados remanentes en el rango similar podría asegurar una adsorción consistente de los 16 conjugados de serotipos.

**Tabla 5: Especificaciones del impulsor de hoja plana de la turbina**

**Rushton para diferentes recipientes**

|                             |           |
|-----------------------------|-----------|
| Volumen geométrico (l)      | 14        |
| Volumen de trabajo (l)      | 10,0      |
| Diámetro de la hoja (mm)    | 74,7      |
| Altura de la hoja (mm)      | 17,3      |
| Número de hojas             | 6         |
| Control de agitación (rpm)  | 50-500    |
| Velocidad del extremo (m/s) | 0,19-1,95 |

**Ejemplo 6: Protocolo del ELISA**

El contenido de antígeno y el porcentaje de adsorción se determinaron usando un ELISA sándwich modificado.

Se modificó el ELISA sándwich convencional con respecto a las siguientes condiciones de prueba/condiciones de ensayo y de esa manera tiene los siguientes atributos ventajosos.

- i. cuantificar el polisacárido conjugado en la presencia de otros 9

antígenos conjugados en una vacuna 10 valente

ii. eluir los diez conjugados a partir de un gel de fosfato de aluminio, donde la adsorción es de más del 80%

iii. en donde hay captura de conjugados aún si está a pH 9 sin dañar la antigenicidad del conjugado

El contenido de antígeno y el porcentaje de adsorción se determinaron usando un ELISA según el protocolo indicado a continuación:

#### Día 1

1. Las placas se recubrieron con un anticuerpo de captura (anticuerpo anti-proteína transportadora) seguido por incubación durante 0,5-2 h a  $35 \pm 5^\circ\text{C}$

2. Las placas se lavaron 3-6 veces usando un lavador de placas para ELISA

3. Las placas se bloquearon con solución amortiguadora de bloqueo (3% de BSA en PBS 1X y solución amortiguadora Tris para los serotipos 14 y 9V) seguido por incubación durante 1,5-2,5 h a  $30 \pm 5^\circ\text{C}$

4. Las placas se lavaron 3 veces usando un lavador de placas para ELISA

5. Las muestras se agregaron a las placas

6. Las placas se incubaron durante la noche a  $5 \pm 3^\circ\text{C}$

#### Día 2

1. Se dejó que las placas alcanzaran temperatura ambiente

2. El anticuerpo primario se agregó después de lavar las placas 3 veces seguido por incubación a RT de  $25 \pm 2$  durante 30 min seguido por un lavado.

3. Se agregó el anticuerpo secundario y fue seguido por incubación a  $25\pm 2$  durante 30 minutos.

4. Se agregó el sustrato TMB seguido por incubación a RT durante 15-20 min en oscuridad

5. Se agregó solución de detención

6. Las placas se leyeron a 405 nm.

Procedimiento para disolver la muestra sin dañar el epítopo de la proteína transportadora

Se agregó una cantidad apropiada de NaOH 0,5 M-2 M a 2 ml de la muestra de vacuna. Dicha muestra fue sometida a agitación por vortexeo suave hasta que la solución se volvió clara. El pH de la solución se ajustó en 9-12 hasta que la solución se volvió translúcida. El pH de la solución se volvió a llevar a 6-7,4 usando entre 0,5 M y 2 M de ácido cítrico. Dicha solución fue sometida a centrifugación (muestras disueltas) a entre 3000 y 6000 x g durante 5 min y se recolectó el sobrenadante para las pruebas.

**Tabla 6**

| Serotipo    | Lote 1                        |                | Lote 2                        |                |
|-------------|-------------------------------|----------------|-------------------------------|----------------|
|             | Contenido en $\mu\text{g/ml}$ | % de adsorción | Contenido en $\mu\text{g/ml}$ | % de adsorción |
| Serotipo 1  | 3,87                          | 89             | 4,66                          | 99,4           |
| Serotipo 5  | 3,57                          | 83             | 4,03                          | 90,8           |
| Serotipo 6A | 3,39                          | 83             | 4,6                           | 68,3           |
| Serotipo 6B | 8,01                          | 80             | 6,8                           | 85             |
| Serotipo 7F | 4,72                          | 97             | 4,18                          | 84,4           |
| Serotipo 9V | 4,61                          | 80             | 3,95                          | 70,4           |
| Serotipo 14 | 5,11                          | 94             | 5,06                          | 92,5           |

|              |      |    |      |      |
|--------------|------|----|------|------|
| Serotipo 19A | 4,42 | 94 | 3,65 | 91,8 |
| Serotipo 19F | 4,35 | 82 | 4,14 | 81,4 |
| Serotipo 23F | 3,66 | 72 | 4,03 | 75   |

### Ejemplo 7: Vacuna antineumocócica conjugada - 10 valente (PCV10)

**Tabla 7:** Composición de PCV10:

| N° muestra | Nombre del ingrediente                                              | Cantidad/dosis(0,5 ml)          |
|------------|---------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| 1          | Polisacárido de los serotipos 1, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 19A, 19F y 23F* | 2 µg de cada uno                |
| 2          | Polisacárido del serotipo 6B*                                       | 4 µg                            |
| 3          | Fosfato de aluminio Adju-Phos®                                      | 0,125 mg como Al <sup>+++</sup> |
| 4          | Cloruro de sodio                                                    | 4,5 mg                          |
| 5          | Ácido succínico                                                     | 1,18 mg                         |
| 6          | Polisorbato 20                                                      | 50 µg                           |
| 7          | Tiomersal (solo para la presentación de múltiples dosis)            | 25 µg                           |
| 8          | L-histidina                                                         | 1,55 mg                         |

\* Los ingredientes activos se conjugan con la proteína transportadora CRM197

### Ejemplo 8: Formulación 1 (PCV16)

Vacuna antineumocócica conjugada - 16 valente (PCV16)

**Tabla 8:** Composición "I" de PCV16

| N° S.                      | Composiciones | Cantidad/dosis |
|----------------------------|---------------|----------------|
| <b>Ingrediente activo*</b> |               |                |
| 1                          | Serotipo 1    | 2,0 µg         |
| 2                          | Serotipo 2    | 2,0 µg         |
| 3                          | Serotipo 3    | 2,0 µg         |

|                               |                           |                                 |
|-------------------------------|---------------------------|---------------------------------|
| 4                             | Serotipo 4                | 2,0 µg                          |
| 5                             | Serotipo 5                | 2,0 µg                          |
| 6                             | Serotipo 6A               | 2,0 µg                          |
| 7                             | Serotipo 6B               | 4,0 µg                          |
| 8                             | Serotipo 7F               | 2,0 µg                          |
| 9                             | Serotipo 9V               | 2,0 µg                          |
| 10                            | Serotipo 12F              | 2,0 µg                          |
| 11                            | Serotipo 14               | 2,0 µg                          |
| 12                            | Serotipo 15B              | 2,0 µg                          |
| 13                            | Serotipo 18C              | 2,0 µg                          |
| 14                            | Serotipo 19A              | 2,0 µg                          |
| 15                            | Serotipo 19F              | 2,0 µg                          |
| 16                            | Serotipo 23F              | 2,0 µg                          |
| <b>Ingredientes inactivos</b> |                           |                                 |
| 17                            | Fosfato de aluminio       | NMT 1,25 mg de Al <sup>3+</sup> |
| 18                            | Histidina                 | 1,55 mg                         |
| 19                            | Proteínas transportadoras | 11,3 – 113,3 µg                 |
| 20                            | Ácido succínico           | 1,18 mg                         |
| 21                            | Cloruro de sodio          | 4,5 mg                          |
| 22                            | Polisorbato 20            | 50 µg                           |
| 23                            | Tiomersal**               | 25 µg                           |
| 24                            | WFI                       | c.s.                            |

**\* Los ingredientes activos de la vacuna se conjugan con al menos una proteína transportadora seleccionada entre CRM197, TT y DT.**

**\*\* Solo se agregó en la presentación de múltiples dosis**

#### **Ejemplo 9: Formulación 1 (PCV16)**

**Tabla 9: Composición "II" de PCV16**

| <b>N° S.</b>              | <b>Composiciones</b> | <b>Cantidad/dosis</b> |
|---------------------------|----------------------|-----------------------|
| <b>Ingrediente activo</b> |                      |                       |
| 1                         | Serotipo 1           | 2,0 µg                |
| 2                         | Serotipo 2           | 2,0 µg                |
| 3                         | Serotipo 3           | 2,0 µg                |
| 4                         | Serotipo 4           | 2,0 µg                |
| 5                         | Serotipo 5           | 2,0 µg                |
| 6                         | Serotipo 6A          | 2,0 µg                |
| 7                         | Serotipo 6B          | 4,0 µg                |
| 8                         | Serotipo 7F          | 2,0 µg                |
| 9                         | Serotipo 9V          | 2,0 µg                |

|                               |                           |                                 |
|-------------------------------|---------------------------|---------------------------------|
| 10                            | Serotipo 12F              | 2,0 µg                          |
| 11                            | Serotipo 14               | 2,0 µg                          |
| 12                            | Serotipo 15B              | 2,0 µg                          |
| 13                            | Serotipo 18C              | 2,0 µg                          |
| 14                            | Serotipo 19A              | 2,0 µg                          |
| 15                            | Serotipo 19F              | 2,0 µg                          |
| 16                            | Serotipo 23F              | 2,0 µg                          |
| <b>Ingredientes inactivos</b> |                           |                                 |
| 17                            | Fosfato de aluminio       | NMT 1,25 mg de Al <sup>3+</sup> |
| 18                            | Histidina                 | 1,55 mg                         |
| 19                            | Proteínas transportadoras | 11,3 – 113,3 µg                 |
| 20                            | Ácido succínico           | 1,18 mg                         |
| 21                            | Cloruro de sodio          | 4,5 mg                          |
| 22                            | Polisorbato 20            | 50 µg                           |
| 23                            | 2-fenoxietanol**          | 10 mg                           |
| 24                            | WFI                       | c.s.                            |

**\* Los ingredientes activos de la vacuna se conjugan con al menos una proteína transportadora seleccionada entre CRM197, TT y DT.**

**\*\* Solo se agregó en la presentación de múltiples dosis**

#### **Ejemplo 10:**

#### **I) Degradación de PnPs reducidos (19A, 19F, 6A y 6B) en la presencia de DMAP:**

Los PnPs reducidos en la solución de reacción se trataron con DMAP en una relación de 1:1,5 y se comprobó su perfil de degradación mediante SEC-HP-Rl.

#### **Resultados:**

Se observó que solo el PnPs 19A sufre degradación en la presencia de DMAP en tanto otros PnPs que contienen fosfodiéster (19F, 6A y 6B) permanecen intactos. Refiérase a las Figuras 1 (sin DMAP) y 2 donde se muestra la degradación de PnPs mediada por DMAP.

Para minimizar dicha degradación de 19A, el PnPs activado fue

sometido a una diafiltración de 10 KDa usando NaCl 2 M para eliminar el DMAP formado a partir de la solución de reacción antes de la conjugación con CRM<sub>197</sub>.

**II) Degradación y agregación de PnPs reducidos (19A, 19F, 6A y 6B) en la presencia de CDAP:**

Se trataron los PnPs reducidos en solución de reacción con CDAP a la relación de 1:1,5 durante la activación. Se observó que el 50% de DMAP se genera como un producto secundario (medido mediante RP-HPLC) que conduce a degradación de PnPs, así como a la agregación de PnPs activados después de un determinado tiempo de activación (refiérase a la Tabla 2). La degradación y agregación se comprobaron mediante el perfil de SEC-HP-RI. Refiérase a las Figuras 3A (sin CDAP), 3B, 3C y 3D (para 19A) y 4A (sin CDAP), 4B (para 19F) que muestran agregación y degradación de PnPs mediadas por CDAP.

**Tabla 10: Factores responsables del entrecruzamiento y la agregación de polisacárido-polisacárido**

Efecto de la “duración de la activación de CDAP” sobre la formación de “agregados de polisacárido-polisacárido”

| Serotipos | PM de PnPs reducidos/modificados (KDa) [SEC-HP-RI] | PnPs activados modificados (KDa) [SEC-HP-RI] | Efectos                                         |
|-----------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| 6A        | 432                                                | 435                                          | No hay agregación entre polisacáridos activados |
| 6B        | 131                                                | 131                                          | No hay agregación entre polisacáridos activados |
| 19A       | 178                                                | 254 (después de 20 min)                      | Hay agregación entre polisacáridos activados    |
|           |                                                    | 487 (después de 60 min)                      | Hay agregación entre polisacáridos activados    |

|     |     |                           |                                              |
|-----|-----|---------------------------|----------------------------------------------|
|     |     | min)                      | polisacáridos activados                      |
|     |     | 1173 (después de 120 min) | Hay agregación entre polisacáridos activados |
| 19F | 157 | 205 (después de 30 min)   | Hay agregación entre polisacáridos activados |

**III) Prevención de la degradación y agregación de PnPs reducidos (19A y 19F) que tienen una relación PnPs:CDAP de 1:1,5 empleando un paso de diafiltración:**

Para minimizar dicha degradación y agregación de 19A, el PnPs activado fue sometido a una diafiltración de 10 KDa usando NaCl 2 M para eliminar el DMAP formado a partir de la solución de reacción antes de la conjugación con CRM<sub>197</sub>. Refiérase a las Figuras 3E (conjugado sin DF de 10 KDa) y 3F (conjugado con DF de 10 KDa) donde se muestra el perfil de SEC-HP-RI del conjugado usando PnPs activados diafiltrados con 10 KDa y CRM<sub>197</sub>. Sin embargo, el paso de diafiltración afectaba adversamente el rendimiento del conjugado lo que dio como resultado una disminución del 30%-40% en el rendimiento global.

**IV) Prevención de la degradación y agregación de PnPs reducidos (19A y 19F) mediante una reducción de la relación de PnPs:CDAP a 1:1 (19A) y a 1:0,8 (19F) sin emplear un paso de diafiltración**

Los PnPs reducidos en solución de reacción se trataron con CDAP a las relaciones de 1:1 y 1:0,8 para 19A y 19F, respectivamente, y sus perfiles de degradación y agregación se comprobaron mediante SEC-HP-RI.

**Resultados:**

Se observó que las relaciones modificadas de Ps:CDAP (1:1 para 19A y 1:0,8 para 19F) impedían la degradación y agregación de ambos PnPs 19A y 19F. Refiérase a las Figuras 3 (G y H para 19A) y 4 (C y D para 19F). Una

ventaja adicional de usar relaciones modificadas era que carecía de un paso de diafiltración de 10 KDa asegurando así una pérdida mínima en el rendimiento global.

Se observó que en el caso del serotipo 19A, cuando la “duración de la activación de CDAP” era de más de 10 min, daba como resultado el entrecruzamiento de polisacárido activado con polisacárido activado, lo que finalmente conduce a la formación de “agregados de polisacárido-polisacárido”.

Además, en el caso del serotipo 19F, cuando la “duración de la activación de CDAP” era de más de 20 min, daba como resultado el entrecruzamiento de polisacárido activado con polisacárido activado, lo que finalmente conduce a la formación de “agregados de polisacárido-polisacárido”. Además, se encontró que la duración de la reacción de conjugación era más de la duración requerida para el entrecruzamiento del polisacárido activado con polisacárido activado, lo que dio como resultado la formación de agregados. Refiérase a las Figuras 3 y 4.

Sin embargo, dicho entrecruzamiento no se observó en otros serotipos como 6APnPs y 6BPnPs.

### **Ejemplo 11:**

#### **Preparación de conjugados: PnPs19A y PnPs19F**

La conjugación del polisacárido con la proteína transportadora se llevó a cabo usando el método de conjugación de CDAP de Lees et al (*Vaccine* 26: 190-198, 1996) con las siguientes modificaciones:

i) Para preparar el conjugado 19A, se usó una relación de polisacárido a CDAP de 1:1 a 22 °C con un período de activación de 4 min y una relación de polisacárido a proteína de 1:1

ii) Para preparar el conjugado 19F, se usó una relación de polisacárido a CDAP de 1:0,8 a 22 °C con un período de activación de 9 a 10 min y una relación de polisacárido a proteína de 1:1 para 19F.

**Tabla 10: Comparación de los resultados de conjugados para 19A y 19F con el “método de conjugación con CDAP tradicional” (Lote 1) y el “método de conjugación mejorado” (Lote 2)**

| <b>I) Detalles de la reacción de conjugación</b>    |                      |               |                      |               |
|-----------------------------------------------------|----------------------|---------------|----------------------|---------------|
| <b>Conjugados</b>                                   | <b>Conjugado 19A</b> |               | <b>Conjugado 19F</b> |               |
| <b>Número de lote</b>                               | <b>Lote 1</b>        | <b>Lote 2</b> | <b>Lote 1</b>        | <b>Lote 2</b> |
| <b>Conc. de PnPs (mg/ml)</b>                        | 9,5                  | 9,5           | 9,5                  | 9,5           |
| <b>Disolución de PnPs</b>                           | NaCl 2 M             | NaCl 2 M      | NaCl 2 M             | NaCl 2 M      |
| <b>Tiempo de activación (min)</b>                   | 4                    | 4             | 4                    | 9 a 10        |
| <b>Relación de PnPs/CDAP</b>                        | 1,0:1,5              | 1,0:1,0       | 1,0:1,5              | 1,0:0,8       |
| <b>Conc. de CRM (mg/ml)</b>                         | 20                   | 20            | 20                   | 20            |
| <b>Relación inicial de Ps/CRM<sub>197</sub></b>     | 1,0:1,5              | 1,0:1,0       | 1,0:1,5              | 1,0:1,0       |
| <b>pH<sup>a</sup>:pH<sup>c</sup>:pH<sup>q</sup></b> | 9,0:9,0:9,0          | 9,0:9,0:9,0   | 9,5:9,5:9,5          | 9,5:9,5:9,5   |
| <b>II) Características del conjugado final</b>      |                      |               |                      |               |
| <b>Conjugados</b>                                   | <b>Conjugado 19A</b> |               | <b>Conjugado 19F</b> |               |
| <b>Número de lote</b>                               | <b>Lote 1</b>        | <b>Lote 2</b> | <b>Lote 1</b>        | <b>Lote 2</b> |
| <b>Relación final de PnPs/CRM<sub>197</sub></b>     | 0,53                 | 0,86          | 0,52                 | 0,96          |
| <b>CRM<sub>197</sub>/PnPs</b>                       | 1,88                 | 1,16          | 1,92                 | 1,04          |
| <b>PnPs libre (%)</b>                               | 1,9                  | 1,5           | 1,7                  | 1,07          |
| <b>CRM<sub>197</sub> libre (%)</b>                  | ND                   | ND            | ND                   | 2,2           |
| <b>Tamaño mol. prom. de SEC-HP-I (KDa)</b>          | 1081                 | 853           | 994                  | 847           |

| Tamaño mol.<br>prom.<br>(UV/RI/MALS)<br>(KDa) | 8212 | 6012 | 6393 | 4773 |
|-----------------------------------------------|------|------|------|------|
|-----------------------------------------------|------|------|------|------|

### Resultados:

Se observó que la relación modificada de polisacárido:CDAP, el tiempo de activación de CDAP y la relación inicial de polisacárido:proteína, minimizaba la degradación del polisacárido reducido mediada por 4-dimetilaminopiridina durante la activación y también impidió la subsiguiente agregación polisacárido-polisacárido, mejorando así las características del conjugado final con respecto al contenido de polisacárido libre.

El método de conjugación mejorado empleado para preparar los conjugados 19A y 19F dio como resultado conjugados que no mostraban ninguna señal fosfomonoéster en los respectivos perfiles del conjugado (NMR  $^{31}\text{P}$  protones), lo cual indicaba que se observaba que el método de conjugación modificado era eficaz para prevenir la hidrólisis de polisacáridos en las reacciones de conjugación.

En vista de las numerosas formas de realización posibles a las cuales se pueden aplicar los principios de la invención divulgada, se podrá reconocer que las formas de realización ilustradas solamente son ejemplos preferidos de la invención y no deberían considerarse en un sentido limitativo del alcance de la misma. En su lugar, el alcance de la invención se define mediante las siguientes reivindicaciones. Por ello, los autores reivindican como invención de su autoría todo aquello que se encuentra dentro del alcance y espíritu de estas reivindicaciones.

**REIVINDICACIONES:**

1. Un método para la preparación de una formulación de vacuna antineumocócica conjugada de polisacáridos-proteínas multivalente estable, que presenta una adsorción óptima para cada conjugado en donde, en dicho método, se previene la agregación mediante el empleo de al menos uno de:

i. Una adsorción individual o separada para los conjugados que de lo contrario muestran una adsorción menor relativa por una adsorción combinada;

ii. Un sistema amortiguador de histidina-ácido succínico junto con un cambio en el pH de pH neutro a pH ácido;

iii. Una relación de polisacárido a proteína de entre 0,5 y aproximadamente 1,4; y/o

iv. El uso de un impulsor de turbina tipo Rushton en el recipiente de formulación.

2. El método de la reivindicación 1, en donde la adsorción se encuentra en el rango de 75 – 99%.

3. Una composición de vacuna antineumocócica conjugada multivalente preparada de acuerdo con la reivindicación 1; en donde dicha composición comprende por lo menos 2 conjugados de polisacárido-proteína que contienen un polisacárido seleccionado entre los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9F, 9N, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 33F y 45.

4. Una composición de vacuna antineumocócica conjugada multivalente preparada de acuerdo con la reivindicación 3; en donde dicha composición comprende por lo menos 10 conjugados de polisacárido-proteína

que contienen un polisacárido de los serotipos 1, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 19A, 19F y 23F.

5. Una composición vacuna antineumocócica conjugada multivalente preparada de acuerdo con la reivindicación 3; en donde dicha composición comprende por lo menos 16 conjugados de polisacárido-proteína que contienen un polisacárido de los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F y 23F.

6. La composición de la reivindicación 1, en donde la proteína transportadora comprende una o más seleccionadas del grupo que consiste en CRM197, adhesina de la superficie neumocócica A (PsaA), toxoide de la difteria (DT), toxoide del tétano (TT), fragmento C de toxoide del tétano, toxoide de Pertussis, proteína D de *H. influenzae*, LT de *E. coli*, ST de *E. coli* y exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*, complejo c de la membrana exterior (OMPC), porinas, proteínas de unión a transferrina, neumolisina, proteína de la superficie neumocócica A (PspA), adhesina de la superficie neumocócica A (PsaA), PhtD neumocócica, proteínas de la superficie neumocócica BVH-3 y BVH-11, antígeno protector (PA) de *Bacillus anthracis* y el factor de edema detoxificado (EF) y el factor letal (LF) de *Bacillus anthracis*, ovoalbúmina, hemocianina de lapa (KLH), albúmina de suero humano, albúmina de suero bovina (BSA) y proteína purificada derivado de tuberculina (PPD), en particular CRM197, el toxoide del tétano, el toxoide de la difteria o PsaA.

7. La composición de la reivindicación 1, en donde dicha composición multivalente comprende

i. por lo menos un conjugado de polisacárido-proteína que comprende CRM197 como proteína transportadora, por lo menos un conjugado

de polisacárido-proteína que tiene TT como proteína transportadora; o

ii. por lo menos un conjugado de polisacárido-proteína que tiene CRM197 como proteína transportadora, por lo menos un conjugado de polisacárido-proteína que tiene DT como proteína transportadora; o

iii. por lo menos un conjugado de polisacárido-proteína que tiene CRM197 como proteína transportadora, por lo menos un conjugado de polisacárido-proteína que comprende la adhesina de la superficie pneumocócica A (PsaA) como proteína transportadora; o

iv. por lo menos un conjugado de polisacárido-proteína que tiene CRM197 como proteína transportadora, por lo menos un conjugado de polisacárido-proteína que tiene TT como proteína transportadora, por lo menos un conjugado de polisacárido-proteína que tiene DT como proteína transportadora; o

v. por lo menos un conjugado de polisacárido-proteína que tiene CRM197 como proteína transportadora, por lo menos un conjugado de polisacárido-proteína que tiene TT como proteína transportadora, por lo menos un conjugado de polisacárido-proteína que tiene adhesina de la superficie pneumocócica A (PsaA) como proteína transportadora; o

vi. por lo menos un conjugado de polisacárido-proteína que tiene CRM197 como proteína transportadora, por lo menos un conjugado de polisacárido-proteína que tiene TT como proteína transportadora, por lo menos un conjugado de polisacárido-proteína que tiene adhesina de la superficie pneumocócica A (PsaA) como proteína transportadora.

8. La composición de la reivindicación 3, en donde el serotipo 3 preferiblemente está conjugado con CRM-197, el serotipo 18C preferiblemente

está conjugado con CRM197 y el serotipo 4 se puede conjugar con TT o DT.

9. El método de la reivindicación 1, en donde dicha solución amortiguadora de histidina-ácido succínico tiene una concentración de entre 1 mM y 200 mM, preferiblemente entre 10 mM y 40 mM, más preferiblemente de 20 mM.

10. El método de la reivindicación 1, en donde el cambio en el pH para la solución amortiguadora de histidina-succínico preferiblemente tiene lugar de 6,8 a un pH de entre 5,6 y 5,8.

11. El método de la reivindicación 1, en donde dicho método comprende los siguientes pasos:

i. agregar moléculas de polisacárido a un transportador proteico en una relación predeterminada, preferiblemente de 0,8 a 1,4 y más preferiblemente 1:1, y a un pH predeterminado, preferiblemente entre 5,2 y 5,9, para obtener una pluralidad de distintos conjugados de polisacárido-proteína;

ii. adsorber de manera individual sobre un primer adyuvante de sal de aluminio en una solución amortiguadora de histidina-ácido succínico a una concentración predeterminada, un primer conjunto predeterminado de conjugados de polisacárido-proteína seleccionados entre dicha pluralidad de conjugados de polisacárido-proteína obtenida en el paso el (i), en donde la cantidad de dicho adyuvante de sal de aluminio varía en un rango entre 20-375  $\mu\text{g}$  de  $\text{Al}^{+++}$  por 0,5 ml de dosis de la formulación de vacuna final; en donde el conjunto de conjugados de polisacárido-proteína comprende 6A, 9V y 23F.

iii. adsorber de un modo combinado sobre un segundo adyuvante de sal de aluminio en una solución amortiguadora de histidina-ácido succínico que se encuentra a una concentración predeterminada, un segundo conjunto

predeterminado de conjugados de polisacárido-proteína seleccionado entre dicha pluralidad de conjugados de polisacárido-proteína obtenida en el paso (i), en donde la cantidad de dicho adyuvante de sal de aluminio varía en un rango entre 20-375  $\mu\text{g}$  de  $\text{Al}^{+++}$  por 0,5 ml de dosis de la formulación de vacuna final; en donde el conjunto de conjugados de polisacárido-proteína comprende 1, 5, 6B, 7F, 14, 19A y 19F.

iv. mezclar dicho primer conjunto adsorbido obtenido en el paso (ii) con dicho segundo conjunto adsorbido obtenido en el paso (iii), y opcionalmente agregar un agente tensioactivo, preferiblemente Polisorbato-20, y/o por lo menos un conservante seleccionado del grupo que consiste en conservantes mercuriales tales como Timerosal, 2-fenoxi-etanol, metilparabeno, propilparabeno, alcohol bencílico y mezclas de los mismos, con la ayuda de un impulsor de hoja plana de una turbina de Rushton para obtener una formulación estable de una vacuna antineumocócica conjugada de polisacárido-proteína multivalente.

12. Un método para reducir la agregación de polisacárido-polisacárido en reacciones de reducción y conjugación, en particular para polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* que contienen un enlace fosfodiéster entre unidades repetidas unidas de manera covalente a una proteína transportadora usando química de cianilación, para así proporcionar una inmunogenicidad y estabilidad mejoradas para cada conjugado, en donde dicho método comprende:

i) hacer reaccionar un polisacárido que tiene un tamaño promedio entre 130 KDa y 190 KDa con un agente de cianilación a una relación de entre 1:0,8 y 1:1 a una temperatura entre aproximadamente 22 °C y

aproximadamente 25 °C por un período de entre aproximadamente 4 min y aproximadamente 10 min, lo que da como resultado un polisacárido activado por cianato; y

ii) poner el polisacárido activado por cianato en contacto con una proteína a una relación de 1:1, a un pH de entre aproximadamente 9 y aproximadamente 9,5, por un período de 3 h y 5 h, seguido por neutralización con glicina;

en donde dicho proceso de conjugación minimiza la degradación mediada por los productos secundarios del agente de cianilación de un polisacárido reducido e impide la subsiguiente agregación de polisacárido-polisacárido, dando como resultado un conjugado que tiene un contenido mínimo de polisacáridos libres.

13. El método de la reivindicación 12, en donde el polisacárido que comprende un enlace fosfodiéster entre unidades repetidas deriva de un serotipo 19A, 19F, 6A o 6B de *Streptococcus pneumoniae*.

14. El método de la reivindicación 13, en donde el polisacárido es un polisacárido del serotipo 19A de *Streptococcus pneumoniae* y el agente de cianilación es tetrafluoroborate de 1-ciano-4-dimetil-amino-piridinio mezclados a una relación de 1:1 a 22 °C por un período de 4 minutos dando como resultado un polisacárido activado por cianato.

15. El método de la reivindicación 13, en donde el polisacárido es un polisacárido del serotipo 19F de *Streptococcus pneumoniae* y el agente cianilante es tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetil-amino-piridinio mezclados a una relación de 1:0,8 a 22°C por un período de 8-10 minutos dando como resultado un polisacárido activado por cianato.

16. El método de la reivindicación 14 ó 15, en donde dicho conjugado tiene un contenido de polisacárido libre menor que 1,6%.

17. El método de la reivindicación 2, en donde el porcentaje de adsorción se mide mediante un ELISA sándwich, que comprende en particular un paso de disolución de muestras de conjugados adsorbidos sobre alúmina usando hidróxido de sodio y ácido cítrico.

18. La composición reivindicada en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde se usa PsaA como un adyuvante.

19. La composición reivindicada en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que además incluye el paso de guardar dicha formulación de vacuna conjugada obtenida en un estado liofilizado, hasta la administración como una formulación de 1, 5 ó 10 dosis con un diluyente que contiene gel de fosfato de aluminio y NaCl.

## **MÉTODOS PARA MEJORAR LA ADSORCIÓN DE CONJUGADOS DE POLISACÁRIDOS-PROTEÍNAS Y UNA FORMULACIÓN DE VACUNA MULTIVALENTE OBTENIDA CON LOS MISMOS.**

### **RESUMEN**

Métodos para la preparación de formulaciones estables de vacunas antineumocóccicas conjugadas de polisacárido-proteína multivalentes. Las formulaciones estables de la presente presentan un porcentaje óptimo de adsorción para cada conjugado, en donde se puede prevenir la agregación mediante el uso de i) una adsorción individual o separada de conjugados que de lo contrario presentan un porcentaje de adsorción menor con una adsorción combinada ii) un sistema de solución amortiguadora de histidina-ácido succínico junto con un cambio en el pH de pH neutro a pH ácido iii) una relación de polisacárido a proteína de 0,5 a aproximadamente 1,4 iv) un impulsor de turbina tipo Rushton de seis hojas en los recipientes de formulación.

## PATENT COOPERATION TREATY

## PCT

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

|                                                       |                                                                                            |                                                                    |
|-------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| Applicant's or agent's file reference<br>15509-P58PCT | <b>FOR FURTHER ACTION</b> see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below. |                                                                    |
| International application No.<br>PCT/IB2016/053265    | International filing date ( <i>day/month/year</i> )<br>03 June 2016                        | (Earliest) Priority Date ( <i>day/month/year</i> )<br>08 June 2015 |
| Applicant<br>SERUM INSTITUTE OF INDIA PRIVATE LTD.    |                                                                                            |                                                                    |

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 3 sheets.

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

## 1. Basis of the report

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

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

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

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

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

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

4. With regard to the **title**,

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

5. With regard to the **abstract**,

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

6. With regard to the **drawings**,

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2016/053265

**Box No. 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:
  
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.: 18, 19  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. 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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
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 and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2016/053265

| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>IPC(8) - A61K 39/00; A61K 39/085; A61K 39/09; A61K 39/116; A61K 47/36; C07K 14/315 (2016.01)<br>CPC - A61K 39/092; A61K 2039/6037; A61K 2039/6087; A61K 2039/70 (2016.08)<br>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                 |                                                                                                    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>IPC - A61K 39/00; A61K 39/085; A61K 39/09; A61K 39/116; A61K 47/36; C07K 14/315<br>CPC - A61K 39/092; A61K 2039/6037; A61K 2039/6087; A61K 2039/70<br>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched<br>USPC - 424/194.1; 424/197.11; 424/203.1; 424/244.1 (keyword delimited)<br>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)<br>PatBase, Google Patents, Google Scholar, PubMed<br>Search terms used: protein polysaccharide pneumococcal multivalent vaccine adsorption aggregation cyanation                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                 |                                                                                                    |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                 |                                                                                                    |
| Category*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages              | Relevant to claim No.                                                                              |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | US 2010/0209450 A1 (BIEMANS et al) 19 August 2010 (19.08.2010) entire document                  | 1-8                                                                                                |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | US 2014/0377302 A1 (SERUM INSTITUTE OF INDIA LTD) 25 December 2014 (25.12.2014) entire document | 1-17                                                                                               |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | US 2011/0195086 A1 (CAULFIELD et al) 11 August 2011 (11.08.2011) entire document                | 1-17                                                                                               |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | US 2007/0110762 A1 (JESSOUROUN et al) 17 May 2007 (17.05.2007) entire document                  | 1-17                                                                                               |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | US 5,623,057 A (MARBURG et al) 22 April 1997 (22.04.1997) entire document                       | 1-17                                                                                               |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | EP 2865392 A1 (SK CHEMICALS CO., LTD.) 29 April 2015 (29.04.2015) entire document               | 1-17                                                                                               |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                 |                                                                                                    |
| * Special categories of cited documents:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>"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)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"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<br>"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<br>"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<br>"&" document member of the same patent family |                                                                                                 |                                                                                                    |
| Date of the actual completion of the international search<br>18 September 2016                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                 | Date of mailing of the international search report<br><b>14 OCT 2016</b>                           |
| Name and mailing address of the ISA/<br>Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents<br>P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450<br>Facsimile No. 571-273-8300                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                 | Authorized officer<br>Blaine R. Copenheaver<br>PCT Helpdesk: 571-272-4300<br>PCT OSP: 571-272-7774 |