

TÍTULO DE LA INVENCION

COMPOSICIONES QUE COMPRENDEN CONJUGADOS DE POLISACÁRIDO DE
STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE CON PROTEÍNA Y MÉTODOS DE USO DE ESTOS

5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

No aplicable

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona composiciones inmunógenas multivalentes que
 10 tienen conjugados de polisacárido-proteína distintivos. Cada conjugado consiste en un
 polisacárido capsular preparado de un serotipo diferente de *Streptococcus pneumoniae*
 conjugado con una proteína portadora, preferentemente, CRM197. Las composiciones
 inmunógenas proporcionan una cobertura amplia contra enfermedades neumocócicas.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El *Streptococcus pneumoniae* es una bacteria gram positiva y la causa más común
 de enfermedades bacterianas invasivas (tales como, neumonía, meningitis y otitis media) en
 infantes y niños pequeños. El neumococo se encapsula con un polisacárido químicamente ligado
 que confiere especificidad de serotipo. Existen más de 90 serotipos conocidos de neumococos, y
 20 la cápsula es el determinante de virulencia principal para los neumococos, ya que la cápsula no
 solo protege a la superficie interna de la bacteria del complemento sino que es en sí misma
 escasamente inmunógena. Los polisacáridos son antígenos independientes de linfocitos T y, en la
 mayoría de los casos, no se pueden procesar o presentar en las moléculas de MHC para
 interactuar con los linfocitos T. Sin embargo, pueden estimular el sistema inmunitario a través de
 25 un mecanismo alternativo que incluye la reticulación de los receptores de la superficie en los
 linfocitos B.

Las vacunas neumocócicas multivalentes de polisacáridos, que se han autorizado
 para comercialización durante muchos años, demostraron ser valiosas para prevenir las
 enfermedades neumocócicas en adultos, particularmente, personas mayores y aquellos con alto
 30 riesgo. Sin embargo, los infantes y niños pequeños responden de manera deficiente a los
 polisacáridos neumocócicos no conjugados. La vacuna neumocócica conjugada, Prevnar®, que
 contiene los 7 serotipos aislados más frecuentes (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F) que causaban
 enfermedades neumocócicas invasivas en niños pequeños e infantes en su momento, se autorizó
 para comercialización por primera vez en los Estados Unidos de América en febrero del año
 35 2000. Luego del uso universal de Prevnar® en los Estados Unidos de América, hubo una
 reducción significativa en las enfermedades neumocócicas invasivas en niños debido a los
 serotipos presentes en Prevnar®. Ver Centers for Disease Control and Prevention, MMWR Morb
 Mortal Wkly Rep 2005, 54(36):893-7. Sin embargo, existen limitaciones en la cobertura de los

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

La publicación de solicitud de patente estadounidense N.º US 2006/0228380 describe una vacuna neumocócica conjugada de polisacárido-proteína 13-valente que incluye los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F. La publicación de solicitud de patente china N.º CN 101590224 A describe una vacuna neumocócica conjugada de polisacárido-proteína 14-valente que incluye los serotipos 1, 2, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9N, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F.

Otros PCV cubrieron 7, 10, 11, o 13 de los serotipos contenidos en PCV-15 (publicación estadounidense N.º 2011/0195086), pero se observó interferencia inmunógena para algunos serotipos (por ejemplo, protección más baja para el serotipo 3 en PCV-11 de GSK) e índices más bajos de respuesta al serotipo 6B en PCV-13 de Pfizer (PREVNAR® 13). Ver Prymula *et al.*, 2006, *Lancet* 367:740-48 y Kieninger *et al.*, Safety and Immunologic Non-inferiority of 13-valent Pneumococcal Conjugate Vaccine Compared to 7-valent Pneumococcal Conjugate Vaccine Given as a 4-Dose Series in Healthy Infants and Toddlers, presentado en el 48.º ICAAC anual y en la 46.ª reunión anual de ISDA, Washington DC, del 25 al 28 de octubre, 2008.

Las vacunas neumocócicas multivalentes actuales han sido eficaces para reducir la incidencia de enfermedades neumocócicas asociadas con aquellos serotipos presentes en las vacunas. Sin embargo, ha aumentado la prevalencia de los serotipos que expresan neumococos no presentes en las vacunas disponibles en la actualidad. Consecuentemente, existe la necesidad de composiciones de vacunas neumocócicas adicionales que proporcionen protección contra conjuntos diferentes de serotipos y que puedan proporcionar protección complementaria contra los serotipos de neumococos no presentes en las vacunas disponibles actuales.

SUMARIO DE LA INVENCION

La invención proporciona composiciones inmunógenas multivalentes que comprenden conjugados de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína, en donde cada uno de los conjugados comprende un polisacárido de un serotipo de *S. pneumoniae* conjugado con una proteína portadora, en donde los serotipos de *S. pneumoniae* son como se definen en la presente.

En modos realización particulares de la invención, los serotipos de *S. pneumoniae* comprenden un conjunto de serotipos seleccionados del grupo que consiste en:

- a) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 y 35B;
- b) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, y 20; y

- c) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, y 20.

En otros modos de realización particulares de la invención, los serotipos de *S. pneumoniae* comprenden un conjunto de serotipos seleccionados del grupo que consiste en:

- 5 a) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 y 35B;
 b) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F y 20A; y
 c) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F y 20A.

10 En otros modos de realización particulares de la invención, los serotipos de *S. pneumoniae* comprenden un conjunto de serotipos seleccionados del grupo que consiste en:

- a) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 y 35B;
 b) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, y 20B; y
 15 c) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, y 20B.

En algunos modos de realización, el conjunto de serotipos de *S. pneumoniae* mencionado en a), b) o c) también comprende: serotipo 6C, serotipo 6A, o serotipos 6A y 6B.

En algunos modos de realización, al menos uno de los conjugados de polisacárido con proteína se forma mediante una reacción de conjugación que comprende un solvente aprótico, por ejemplo, dimetilsulfóxido (DMSO). En modos realización específicos, cada uno de los conjugados de polisacárido con proteína se forma mediante una reacción de conjugación que comprende un solvente aprótico. Como se muestra en la presente, el uso de DMSO como un solvente durante la aminación reductora de los conjugados de polisacárido-proteína genera una

20 estabilidad inesperadamente superior y una inmunogenicidad mejorada para aquellos serotipos relacionados a los mismos conjugados preparados en condiciones acuosas.

También se proporcionan métodos para inducir una respuesta inmunitaria protectora en un paciente humano que comprende administrar las composiciones inmunógenas multivalentes de la invención al paciente. En algunos modos de realización de los métodos de la invención, el paciente se trató previamente con una vacuna multivalente neumocócica.

30

Una composición inmunógena multivalente de la invención se puede usar como parte de un régimen de tratamiento con una vacuna neumocócica complementaria diferente. Consecuentemente, la invención proporciona un método para inducir una respuesta inmunitaria protectora en un paciente humano que comprende administrar una composición inmunógena multivalente de la invención al paciente, además comprende administrar una vacuna

35 neumocócica multivalente al paciente en cualquier orden. En modos realización particulares, la vacuna neumocócica multivalente está compuesta por conjugados múltiples de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína en donde cada uno de los conjugados comprende polisacáridos de un

serotipo de *S. pneumoniae* conjugado con una proteína portadora. En otros modos de realización, la vacuna neumocócica multivalente comprende polisacáridos capsulares no conjugados.

También se proporcionan métodos para preparar un conjugado de polisacárido de *Streptococcus pneumoniae* con proteína de serotipo 8 que utiliza una reacción de conjugación en un solvente aprótico, en donde la reacción de conjugación no usa cianoborohidruro.

La invención también proporciona composiciones inmunógenas multivalentes que comprenden conjugados de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína, en donde cada uno de los conjugados comprende un polisacárido de un serotipo de *S. pneumoniae* conjugado con una proteína portadora, en donde los serotipos seleccionados de *S. pneumoniae* proporcionan reactividad cruzada con otros serotipos seleccionados.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 ilustra el espectro de ^1H RMN de 600 MHz unidimensional del polisacárido capsular del serotipo 6C de *S. pneumonia* en óxido de deuterio (D_2O) a 50 °C. Se marcan las señales de los estándares internos (DMSO y DSS- d_6) y agua residual (HOD). Las señales menores marcadas por * se deben a los residuos de la pared celular de *S. pneumonia*, tales como C-polisacárido y/o peptidoglucanos.

La Figura 2 ilustra el espectro de ^1H RMN de 600 MHz unidimensional del polisacárido capsular de *S. pneumonia* serotipo 15A en óxido de deuterio (D_2O) a 50 °C. Se marcan las señales de los estándares internos (DMSO y DSS- d_6) y agua residual (HOD). Las señales menores marcadas por * se deben a los residuos de la pared celular de *S. pneumonia*, tales como C-polisacárido y/o peptidoglucanos.

La Figura 3 ilustra el espectro de ^1H RMN de 600 MHz unidimensional del polisacárido capsular de *S. pneumonia* serotipo 15B de-O-acetilado en óxido de deuterio (D_2O) a 50 °C. Se marcan las señales de los estándares internos (DMSO y DSS- d_6) y agua residual (HOD). Las señales menores marcadas por * se deben a los residuos de la pared celular de *S. pneumonia*, tales como C-polisacárido y/o peptidoglucanos.

La Figura 4 ilustra el espectro de ^1H RMN de 600 MHz unidimensional del polisacárido capsular de *S. pneumonia* de serotipo 35B en D_2O a 50 °C. Se marcan las señales de los estándares internos (DMSO y DSS- d_6) y agua residual (HOD). Las señales menores marcadas por * se deben a los residuos de la pared celular de *S. pneumonia*, tales como C-polisacárido y/o peptidoglucanos.

La Figura 5 ilustra la región de identidad de ^1H RMN útil para la identificación del serotipo 6C de *S. pneumonia*. Se marcan las posiciones de señal de cada protón anomérico de la unidad de repetición de cada residuo de monosacárido.

La Figura 6 ilustra la región de identidad de ^1H RMN útil para la identificación del serotipo 15A de *S. pneumonia*. Se marcan las posiciones de señal de cada protón anomérico de la unidad de repetición de cada residuo de monosacárido.

La Figura 7 ilustra la región de identidad de ^1H RMN útil para la identificación del serotipo 15B de-O-acetilado de *S. pneumonia*. Se marcan las posiciones de señal de cada protón anomérico de cada residuo de monosacárido.

La Figura 8 ilustra la región de identidad de ^1H RMN útil para la identificación del serotipo 35B de *S. pneumonia*. Se marcan las posiciones de señal de cada protón anomérico de la unidad de repetición de cada residuo de monosacárido.

Las Figuras 9A-9C ilustran el espectro de ^1H RMN de 600 MHz unidimensional de polisacárido capsular nativo del serotipo 15B de *S. pneumonia* (Figura 9A), el polisacárido capsular de de-O-acetilado del serotipo 15B de *S. pneumonia* (Figura 9B) y el polisacárido capsular del serotipo 15C de *S. pneumonia* (Figura 9C). Los espectros se adquirieron en dióxido de deuterio (D_2O) a 50 °C. Se marcan las señales que surgen de los estándares internos (DMSO y DSS-d6) y agua residual (HOD). Las señales marcadas por * se deben a los residuos de la pared celular de *S. pneumonia*, tales como C-polisacárido y/o peptidoglucanos.

Las Figuras 10A-10C muestran la región anomérica del espectro de ^1H RMN de 600 MHz unidimensional de polisacárido capsular nativo del serotipo 15B de *S. pneumonia* (Figura 10A), el polisacárido capsular de de-O-acetilado del serotipo 15B de *S. pneumonia* (Figura 10B) y el polisacárido capsular del serotipo 15C de *S. pneumonia* (Figura 10C). Las Figuras 10D-10F muestran regiones del espectro en donde las señales de O-acetilo y N-acetil metilo de polisacárido capsular nativo de serotipo 15B de *S. pneumonia* (Figura 10D), el polisacárido capsular de de-O-acetilado del serotipo 15B de *S. pneumonia* (Figura 10E) y el polisacárido capsular del serotipo 15C de *S. pneumonia* (Figura 10F).

La Figura 11 muestra el impacto del tiempo y la temperatura (hasta 12 semanas a 4 °C-rombos, hasta 4 semanas a 25 °C-cuadrados, hasta 4 semanas a 37 °C-triángulos) en la concentración de polisacáridos de un producto farmacológico PCV16 (0,128 mg/ml) o PCV21 (0,084 mg/ml o 0,169 mg/ml) con HPSEC-UV/MALS/RI (ver Ejemplo 39).

La Figura 12 muestra el impacto de la agitación por rotación horizontal y la temperatura (1 semana a 4 °C, 25 °C o 37 °C) en la concentración de polisacáridos de un producto farmacológico PCV16 (0,128 mg/ml) o PCV21 (0,084 mg/ml o 0,169 mg/ml) distribuido en jeringas prellenadas (ver Ejemplo 39).

La Figura 13 muestra el impacto de la concentración de PS en función del tiempo y la temperatura (hasta 4 semanas a 4 °C, 25 °C, o 37 °C) en el peso molecular promedio (M_w y M_n) de un producto farmacológico PCV16 (0,128 mg/ml) o PCV21 (0,084 mg/ml o 0,169 mg/ml) con HPSEC-UV/MALS/RI.

Las Figuras 14A y 14B muestran el impacto del tiempo y la temperatura (hasta 1 semana a 4 °C o 37 °C) en la estabilidad de la vacuna neumocócica conjugada (PCV15 o PCV16) preparada con sustancias de fármaco conjugadas en A) un solvente prótico (PCV15 formulado usando todas conjugaciones acuosas) o B) un solvente aprótico (PCV16 formulado usando todas

conjugaciones de DMSO a 0,064 mg/ml de PnPs) mediante espectroscopia de fluorescencia intrínseca de proteínas con una longitud de onda de excitación a 280 nm (Ejemplo 40).

La Figura 15 muestra títulos de dilución de anticuerpo IgG de ELISA (después de la dosis 2) para conejos inmunizados con serotipos monovalentes de *S. pneumoniae* conjugados con CRM197 y formulados con adyuvante de fosfato de aluminio (APA). Los símbolos indican los títulos individuales y las barras de error representan el 95 % de intervalos de confianza (CI) de los títulos de la media geométrica (GMT).

La Figura 16 proporciona títulos de dilución de OPA específicos del serotipo (después de la dosis 2) para conejos inmunizados con serotipos monovalentes de *S. pneumoniae* conjugados con CRM197 y formulados con adyuvante de fosfato de aluminio (APA). Los símbolos indican los títulos individuales y las barras de error representan el 95 % de intervalos de confianza (CI) de los títulos de la media geométrica (GMT).

La Figura 17 proporciona títulos de dilución de anticuerpo IgG de ELISA (después de la dosis 2) para conejos inmunizados con conjugados monovalentes de serotipo 15 de *S. pneumoniae*. El eje X indica la vacuna utilizada para inmunizar a los conejos. Las líneas punteadas separan tres ensayos ELISA separados con polisacáridos de neumococos separados como un agente de recubrimiento. Los símbolos indican los títulos individuales y las barras de error representan el 95 % de intervalos de confianza (CI) de los títulos de la media geométrica (GMT).

La Figura 18 muestra títulos de dilución de OPA específicos del serotipo (preinmunización, después de la dosis 1 (PD1, agrupados) y después de la dosis 2 (PD2)) para ratones inmunizados con conjugados monovalentes de serotipo 15 de *S. pneumoniae*. El eje X indica la vacuna utilizada para inmunizar a los conejos. Las líneas punteadas separan tres ensayos OPA con cepas bacterianas de *S. pneumoniae* separadas. Los símbolos indican los títulos individuales y las barras de error representan el 95 % de intervalos de confianza (CI) de los títulos de la media geométrica (GMT).

La Figura 19A proporciona una comparación de respuestas de anticuerpos contra PD1 en NZWR (5 por grupo) luego de la vacunación con 4, 2, 1, 0,4, 0,08 o 0,016 µg/dosis de PCV21. Los símbolos indican las relaciones del título de la media geométrica (GMT) de PD1 (grupo 2 µg/dosis en comparación con otros grupos de dosis) con barras de errores que representan el 95 % de intervalo de confianza (CI). La Figura 19B proporciona relaciones de GMT de PD1 de comparaciones de la dosis de PCV21 (95 % de CI) correspondiente a las relaciones de GMT de la Figura 19A cuyo intervalo de confianza de 95 % menor que excede 1,0 está sombreado de gris claro y las relaciones de GMT cuyo intervalo de confianza de 95 % mayor que es menos de 1.0 está sombreado de gris oscuro. Se incluyen los datos del serotipo 15B para evaluar la protección cruzada.

La Figura 20A proporciona una comparación de respuestas de anticuerpos contra PD2 en NZWR (5 por grupo) luego de la vacunación con 4, 2, 1, 0,4, 0,08 o 0,016 µg/dosis de

PCV21. Los símbolos indican las relaciones de GMT de PD2 (grupo 2 µg/dosis en comparación con otros grupos de dosis) con barras de errores que representan el 95 % de CI. La Figura 20B proporciona relaciones de GMT de PCV21 de comparaciones de la dosis (intervalo de confianza de 95 %) que corresponde a las relaciones de GMT de la Figura 20A cuyo intervalo de confianza de 95 % menor que excede 1,0 está sombreado de gris claro. Se incluyen los datos de serotipo 15B para evaluar la protección cruzada.

La Figura 21A muestra los títulos de dilución de OPA de PD1 específicos del serotipo para conejos inmunizados con PCV21 (2µg/PnPs). Los símbolos indican los títulos individuales y las barras de error representan el 95 % de intervalos de confianza (CI) de los títulos de la media geométrica (GMT). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. La Figura 21B muestra los títulos de dilución de OPA de PD2 específicos del serotipo para conejos inmunizados con PCV21 (2µg/PnPs). Los símbolos indican los títulos individuales y las barras de error representan el 95 % de intervalos de confianza (CI) de los títulos de la media geométrica (GMT), **** $p < 0,0001$. Se incluyen los datos de serotipo 15B para evaluar la protección cruzada.

Las Figuras 22A-C muestran el impacto del tiempo y la temperatura (es decir, 7 días a 4 °C, 1 día a 37 °C o 7 días a 37 °C) en la estabilidad de tres vacunas neumocócicas conjugadas (PCV1, PCV7, y PCV14), preparadas con todas las sustancias farmacológicas conjugadas en solvente acuoso o solvente DMSO, usando espectroscopia de fluorescencia intrínseca de proteínas a una longitud de onda de 280 nm. La Figura 22D muestra el impacto del tiempo y la temperatura (es decir, 7 días a 4 °C o 37 °C) en la estabilidad de una vacuna neumocócica conjugada 21-valente (PCV1 a 0,084 mg/ml de PnPs), preparada con todas las sustancias farmacológicas conjugadas en solvente DMSO, usando espectroscopia de fluorescencia intrínseca de proteínas a una longitud de onda de 280 nm.

La Figura 23 muestra el impacto de la temperatura (7 días a 4 °C o 37 °C) y agitación a 4 °C en la distribución del tamaño de partícula como se analizó mediante análisis de rastreo de nanopartículas (NTA) de seis (6) productos farmacológicos de vacuna neumocócica conjugada formulados con PS-20 (0 %, 0,025 %, 0,05 %, 0,1 %, 0,15 % o 0,2 %; p/v de PS-20) a 0,084 mg/ml de PnPs.

La Figura 24 muestra el impacto de la temperatura (4 °C y 37 °C) y la agitación en el peso molecular promedio de los tres productos farmacológicos PCV21 como se analizó mediante el ensayo HPSEC/UV/MALS/RI. Se formularon tres productos farmacológicos de vacuna neumocócica conjugada PCV21 con diferentes concentraciones de PS-20 (0,05 %, 0,1 %, y 0,15 % p/v) a 0,084 mg/ml de PnPs.

La Figura 25 muestra que los ratones inmunizados con PCV21 están protegidos de la exposición intratraqueal a *S. pneumoniae* 24F.

Las Figuras 26A-B muestran títulos de dilución de anticuerpo IgG preinmunización (agrupados), PD1 (agrupados) y PD2 como se determinó mediante ECL para

conejos inmunizados con PCV21 sin adyuvante o formulado con APA. Las barras de error representan 95 % de intervalos de confianza (CI) del título de la media geométrica (GMT). Se incluyen los datos del serotipo 15B para evaluar la protección cruzada.

Las Figuras 27A-C muestran títulos de dilución de anticuerpo IgG preinmunización (agrupados), PD1 (agrupados) y PD2 como se determinó mediante ECL para conejos inmunizados con PCV8 sin adyuvante, PCV16 sin adyuvante y PCV31 con APA. Las barras de error representan 95 % de intervalos de confianza (CI) del título de la media geométrica (GMT). Se incluyen los datos del serotipo 15B para evaluar la protección cruzada.

La Figura 28 muestra la comparación de las respuestas de anticuerpo PD2 mediante ECL en NZWR (5 por grupo) luego de vacunación con PCV21 con o sin APA. Los símbolos indican relación de GMT PD2 con barras de error que representan 95 % de CI. Se incluyen los datos del serotipo 15B para evaluar la protección cruzada.

La Figura 29 muestra la comparación de las respuestas de anticuerpo PD2 mediante ECL en NZWR (5 por grupo) para serotipos comunes y el serotipo 15B con protección cruzada luego de vacunación con PCV21, PCV8 o PCV16. Los símbolos indican relaciones de GMT PD2 mediante ECL con barras de error que representan 95 % de CI.

La Figura 30 muestra la comparación de las respuestas de anticuerpo PD2 mediante ECL en NZWR (5 por grupo) para serotipos comunes y el serotipo 15B con protección cruzada luego de la vacunación con PCV21/APA o PCV31/APA. Los símbolos indican relaciones de GMT PD2 mediante ECL con barras de error que representan 95 % de CI.

Las Figuras 31A-D muestran títulos de dilución de OPA específicos de serotipo preinmunización (agrupados) (A, B) y PD2 (C, D) para conejos inmunizados con PCV. Las barras de error representan el 95 % de CI de los GMT. Se usó PCV21 como referencia para comparaciones estadísticas, * $p < 0,05$. Las Figuras A y C muestran datos para 8 serotipos comunes en todos los PCV evaluados (6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B) y 8 serotipos comunes adicionales en PCV16, PCV21 y PCV31 (8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20B). Las Figuras B y D muestran datos para 16 serotipos adicionales no incluidos en las Figuras A y C. Cinco de estos también son serotipos comunes en PCV21 y PCV31 (3, 7F, 19A, 22F, 33F), 10 serotipos están contenidos exclusivamente en PCV31 (1, 4, 5, 6A, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F). Se incluyen los datos del serotipo 15B para evaluar la protección cruzada.

La Figura 32 muestra títulos de dilución de anticuerpo IgG preinmunización, PD1, PD2 y PD3 como se determinó mediante ECL para *Macaca mulatta* adultos (n=8) inmunizados con PCV21. Las barras de error representan el 95 % de CI de los GMT. Se incluyen los datos del serotipo 15B para evaluar la protección cruzada.

La Figura 33 muestra títulos de dilución de OPA preinmunización, PD1 (agrupados) y PD3 de *Macaca mulatta* adultos inmunizados con PCV21 (n=8). Las barras de error representan el 95 % de CI de los GMT. Se incluyen los datos del serotipo 15B para evaluar la protección cruzada.

La Figura 34 muestra títulos de OPA preinmunización y PD3 (día 70) para 4 serotipos no contenidos en la vacuna PCV21 para *Macaca mulatta* adultos inmunizados con PCV21.

La Figura 35 muestra la comparación de las respuestas de anticuerpo PD1 mediante ECL en *Macaca mulatta* adultos (5 por grupo) luego de vacunación con PCV21 con o sin APA. Los símbolos indican las relaciones de GMT PD1 mediante ECL (PCV21 en comparación con PCV21/APA) con barras de error que representan el 95 % de CI. Se incluyen los datos del serotipo 15B para evaluar la protección cruzada.

La Figura 36 muestra las respuestas de anticuerpo IgG PD1 para el serotipo 3, 7F, 19A, 22F, y 33F en *Macaca mulatta* adultos (2-5 por grupo) luego de vacunación con PCV21 en comparación con PCV15 o Pevnar13. Los símbolos indican relaciones de GMT PD1 mediante ECL con barras de error que representan 95 % de CI.

La Figura 37 muestra títulos de dilución de anticuerpo IgG mediante ELISA para 6A, 6B, y 6C ((preinmunización y PD1, agrupados) y PD2) para conejos inmunizados con productos farmacológicos monovalentes 6A-CRM197 (A) o 6B-CRM197 (B). Las barras indican títulos de la media geométrica (GMT) y las barras de error representan el 95 % de intervalos de confianza (CI) de los GMT.

La Figura 38 muestra títulos de dilución de OPA específicos de serotipo para 6A, 6B, y 6C ((preinmunización y PD1 agrupados) y PD2) para conejos inmunizados con productos farmacológicos monovalentes 6A-CRM197 (A) o 6B-CRM197 (B). Las barras indican títulos de la media geométrica (GMT) y las barras de error representan el 95 % de intervalos de confianza (CI) de los GMT.

La Figura 39 muestra títulos de dilución de OPA específicos de serotipo para 20A y 20B (preinmunización (agrupados), PD1 y PD2) para conejos inmunizados con 20A-CRM197/APA (A) o PCV21 (B). Las barras indican títulos de la media geométrica (GMT) y las barras de error representan el 95 % de intervalos de confianza (CI) de los GMT.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona composiciones inmunógenas multivalentes que comprenden conjugados de polisacárido neumocócico con proteína, en donde cada uno de los conjugados comprende un polisacárido de un serotipo de *S. pneumoniae* conjugado con una proteína portadora, en donde los serotipos de *S. pneumoniae* son como se definen en la presente. En algunos modos de realización, la composición inmunógena comprende un conjunto de serotipos neumocócicos seleccionados del grupo que consiste en: (a) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 y 35B; (b) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, y 20; y (c) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, y 20. En algunos modos de realización, la composición inmunógena comprende un conjunto de serotipos neumocócicos seleccionados del grupo que consiste en: (a) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F,

31 y 35B; (b) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, y 20B; y (c) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, y 20B. En otros modos de realización, la composición inmunógena comprende un conjunto de serotipos neumocócicos seleccionados del grupo que consiste en: (a) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 y 35B; (b) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, y 20A; y (c) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, y 20A. En otros modos de realización, la composición inmunógena comprende (i) serotipo 6A; (ii) serotipos 6A y 6B; o (iii) serotipo 6C. En un modo de realización particular, la invención comprende conjugados neumocócicos múltiples de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína en donde cada conjugado comprende un polisacárido de un serotipo de *S. pneumoniae* conjugado con una proteína portadora, en donde los serotipos de *S. pneumoniae* comprenden los serotipos 3, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B. Se descubrió que dicha composición es inmunógena en conejos y genera un anticuerpo funcional que inactiva las cepas bacterianas tipo vacuna en todas las dosis evaluadas (Ejemplo 43). En otro modo de realización particular, la invención comprende conjugados neumocócicos múltiples de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína en donde cada conjugado comprende un polisacárido de un serotipo de *S. pneumoniae* conjugado con una proteína portadora, en donde los serotipos de *S. pneumoniae* comprenden los serotipos 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20, 6A, 15A, 15C, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 y 35B. En otro modo de realización particular, la invención comprende conjugados neumocócicos múltiples de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína en donde cada conjugado comprende un polisacárido de un serotipo de *S. pneumoniae* conjugado con una proteína portadora, en donde los serotipos de *S. pneumoniae* comprenden los serotipos 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20B, 6A, 15A, 15C, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 y 35B. En otro modo de realización particular, la invención comprende conjugados neumocócicos múltiples de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína en donde cada conjugado comprende un polisacárido de un serotipo de *S. pneumoniae* conjugado con una proteína portadora, en donde los serotipos de *S. pneumoniae* comprenden los serotipos 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 15A, 15C, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 y 35B.

Las composiciones inmunógenas multivalentes de la invención son útiles para inmunizar a un paciente contra los serotipos de *S. pneumoniae* tipo vacuna y como parte de un régimen de tratamiento con vacunas neumocócicas complementarias y diferentes. Consecuentemente, la invención proporciona un método para inducir una respuesta inmunitaria protectora en un paciente humano que comprende administrar una composición inmunógena multivalente de la invención al paciente y, asimismo, comprende administrar una vacuna neumocócica multivalente al paciente en cualquier orden. En otros modos de realización, las composiciones inmunógenas multivalentes de la invención se administran a un paciente que ha sido previamente inmunizado con una vacuna neumocócica multivalente diferente.

En los modos de realización de la invención, los conjugados de al menos un serotipo de neumococo se preparan con aminación reductora en un solvente aprótico, tal como DMSO. En modos realización adicionales, la composición inmunógena multivalente comprende conjugados neumocócicos, en donde cada uno se prepara con aminación reductora en un solvente aprótico. En la presente, se muestra que los productos farmacológicos PCV1, PCV7, PCV14, PCV16 y PCV21 (como se define más adelante) que comprenden sustancias farmacológicas que se preparan con aminación reductora en un solvente aprótico eran estables contra la despolimerización o degradación química del carbohidrato y estables contra la agregación de la proteína en la formulación del producto farmacológico (ver Ejemplos 40 y 45). El uso del solvente DMSO mejora las asociaciones covalentes de polisacárido con respecto a la proteína mediante el consumo directo de los residuos de lisina en la superficie de la proteína portadora. La asociación covalente aumentada beneficia directamente el aumento de la estabilidad del conjugado de polisacárido con proteína de las composiciones inmunógenas multivalentes que comprenden antígenos polisacáridos conjugados en DMSO.

I. Definiciones y abreviaturas

Como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, se aplican las siguientes abreviaturas:

20	APA	adyuvante de fosfato de aluminio
	APC	célula presentadora de antígenos
	CI	intervalo de confianza
	DMSO	dimetilsulfóxido
	DS	Sustancia farmacológica de polisacárido-proteína
25	GMC	concentración de media geométrica
	GMT	título de la media geométrica
	HPSEC	cromatografía de exclusión por tamaño de alta resolución
	IM	intramuscular o por vía intramuscular
	LOS	lipo-oligosacárido
30	LPS	lipopolisacáridos
	MALS	dispersión de luz multiángulo
	MBC	conjugado monovalente a granel
	MOPA	ensayo opsonofagocítico mutiplexado
	MW	peso molecular
35	NMWCO	corte de peso molecular nominal
	NZWR	conejo blanco de Nueva Zelanda
	OPA	ensayo de opsonofagocitosis
	PCV	vacuna neumocócica conjugada

	PD1	después de la dosis 1
	PD2	después de la dosis 2
	PnPs	polisacárido neumocócico
	Ps	polisacárido
5	PS-20	polisorbato-20
	RI	índice de refracción
	UV	ultravioleta
	p/v	peso por volumen

10 Con el fin de que la invención se pueda entender con mayor facilidad, algunos términos técnicos y científicos se definen específicamente a continuación. A menos que se defina específicamente en otra parte en este documento, todos los términos técnicos y científicos que se utilizan en la presente tienen el significado que habitualmente le otorga un experto de conocimiento medio en la materia a la que pertenece la invención.

15 Como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen las referencias en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

La referencia a “o” indica cualquier posibilidad o ambas, a menos que el contexto indique claramente una de las posibilidades indicadas. En algunos casos, “y/o” se utilizó para enfatizar cualquiera o ambas posibilidades.

20 Las expresiones “solvente acuoso” o “condiciones acuosas” cuando se utilizan con la conjugación, tales como aminación reductora, se refieren al uso de agua como solvente para la reacción de conjugación. El agua puede contener amortiguadores y otros componentes excepto que no esté presente ningún solvente orgánico.

25 Las expresiones “solvente aprótico”, “solvente DMSO” o “condiciones de DMSO”, cuando se utilizan con la conjugación, tal como aminación reductora, se refieren al uso de un solvente aprótico, o una combinación de solventes apróticos, (o DMSO, según corresponda) como el solvente para la reacción de conjugación. El solvente aprótico puede tener presente un poco de agua, por ejemplo, 1 %, 2 %, 5 %, 10 % o 20 %.

30 El término “comprende”, cuando se usa con la composición inmunógena de la invención, se refiere a la inclusión de cualquier otro componente, tal como adyuvantes o excipientes, o la adición de uno o más conjugados de polisacárido-proteína que no se enumeran específicamente. La expresión “que consiste en”, cuando se usa con la mezcla de conjugado polisacárido-proteína multivalente, se refiere a una mezcla que tiene aquellos conjugados de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína particulares y ningún otro conjugado de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína de un serotipo diferente. “Consiste esencialmente en” y variaciones tales como “consisten esencialmente en” o “que consiste esencialmente en” indican la inclusión de cualquiera de los elementos o grupos de elementos mencionados, y la inclusión

opcional de otros elementos, de naturaleza similar o diferente a la de los elementos mencionados, que no cambian materialmente las propiedades básicas o novedosas del régimen de dosificación, método o composición especificados.

"Cantidad eficaz" de una composición de la invención se refiere a una dosis
 5 requerida para generar anticuerpos que reducen de manera significativa la posibilidad o gravedad de la infectividad de un microbio, por ejemplo, *S. pneumoniae*, durante una exposición posterior.

Como se usa en la presente, la frase "indicado para la prevención de enfermedad neumocócica" se refiere a que una vacuna o composición inmunógena está aprobada por una o más autoridades reguladoras, tales como Administración de Medicamentos y Alimentos de los
 10 Estados Unidos, para la profilaxis de una o más enfermedades causadas por cualquiera de los serotipos de *S. pneumoniae*, que incluye, entre otros: enfermedades neumocócicas, generalmente, neumonía neumocócica, meningitis neumocócica, bacteriemia neumocócica, enfermedad invasiva causada por *S. pneumoniae*, y otitis media causada por *S. pneumoniae*.

Una "vacuna neumocócica multivalente" es una preparación farmacéutica que
 15 comprende más de un agente activo (por ejemplo, un conjugado de polisacárido capsular neumocócico o polisacárido neumocócico con proteína) que proporciona inmunidad activa contra la enfermedad o condición patológica causada por más de un serotipo de *S. pneumoniae*.

El término "polisacárido" incluye cualquier elemento sacárido antigénico (o unidad antigénica) comúnmente utilizado en la técnica de las vacunas inmunológicas y
 20 bacterianas, que incluye, entre otros, un "sacárido", un "oligosacárido", un "polisacárido", un "liposacárido", un "lipo-oligosacárido (LOS)", un "lipopolisacárido (LPS)", un "glicosilato", un "glicoconjugado", y similares.

"PCV1", como se usa en la presente, se refiere a una vacuna neumocócica conjugada 1-valente que comprende un conjugado de polisacárido de *S. pneumoniae* con
 25 proteína, que comprende un polisacárido capsular de serotipo de *S. pneumoniae* conjugado con una proteína portadora, en donde el serotipo de *S. pneumoniae* es 3 (como se ejemplifica en los Ejemplos 38 y 45): En modos realización específicos, la proteína portadora es CRM197.

"PCV7", como se usa en la presente, se refiere a una vacuna neumocócica conjugada 7-valente que comprende siete conjugados de polisacárido de *S. pneumoniae* con
 30 proteína, en donde cada uno comprende polisacáridos capsulares de serotipo de *S. pneumoniae* conjugado con una proteína portadora, en donde los serotipos de *S. pneumoniae* son: 3, 8, 9N, 11A, 19A, 15A, y 10A. En modos realización específicos, la proteína portadora de uno o más conjugados de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína es CRM197. En modos realización adicionales, la proteína portadora de cada uno de los conjugados de polisacárido de *S.*
 35 *pneumoniae* con proteína es CRM197.

"PCV8", como se usa en la presente, se refiere a una vacuna neumocócica conjugada 8-valente que comprende ocho conjugados de polisacárido de *S. pneumoniae* con
 proteína, en donde cada uno comprende un polisacárido capsular de serotipo de *S. pneumoniae*

conjugado con una proteína portadora, en donde los serotipos de *S. pneumoniae* son: 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, y 35B. En modos realización específicos, la proteína portadora de uno o más conjugados de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína es CRM197. En modos realización adicionales, la proteína portadora de cada uno de los conjugados de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína es CRM197.

“PCV14”, como se usa en la presente, se refiere a una vacuna neumocócica conjugada 14-valente que comprende dieciséis conjugados de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína, en donde cada uno comprende polisacáridos capsulares de un serotipo de *S. pneumoniae* conjugado con una proteína portadora, en donde los serotipos de *S. pneumoniae* son: 3, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 16F, 17F, 19A, 20, 22F y 33F. En modos realización específicos, la proteína portadora de uno o más conjugados de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína es CRM197. En modos realización adicionales, la proteína portadora de cada uno de los conjugados de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína es CRM197.

“PCV15”, como se usa en la presente, se refiere a una vacuna neumocócica conjugada 15-valente que comprende dieciséis conjugados de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína, en donde cada uno comprende polisacáridos capsulares de serotipo de *S. pneumoniae* conjugado con una proteína portadora, en donde los serotipos de *S. pneumoniae* son: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F. En modos realización específicos, la proteína portadora de uno o más conjugados de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína es CRM197. En modos realización adicionales, la proteína portadora de cada uno de los conjugados de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína es CRM197.

“PCV16”, como se usa en la presente, se refiere a una vacuna neumocócica conjugada 16-valente que comprende dieciséis conjugados de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína, en donde cada uno comprende un polisacárido capsular de serotipo de *S. pneumoniae* conjugado con una proteína portadora, en donde los serotipos de *S. pneumoniae* son: 6C, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 16F, 17F, 20A, 23A, 23B, 24F, 31, y 35B, y al menos uno de los siguientes serotipos del serogrupo 15: 15B, 15C o 15B de-O-acetilado. En modos realización particulares, el serotipo del serogrupo 15 es el serotipo 15C o 15B de-O-acetilado. Como se muestra en la presente (ver Ejemplo 3 más adelante), el polisacárido neumocócico de serotipo 15B de-O-acetilado es equivalente al polisacárido neumocócico de serotipo 15C y tiene un espectro de RMN idéntico. En modos realización específicos, la proteína portadora de uno o más conjugados de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína es CRM197. En modos realización adicionales, la proteína portadora de cada uno de los conjugados de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína es CRM197.

“PCV21”, como se usa en la presente, se refiere a una vacuna neumocócica conjugada 21-valente que comprende veintiún conjugados de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína, en donde cada uno comprende un polisacárido capsular de serotipo de *S. pneumoniae* conjugado con una proteína portadora, en donde los serotipos de *S. pneumoniae* son: 3, 6C, 7F,

8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B, y al menos uno de los siguientes serotipos del serogrupo 15: 15B, 15C o 15B de-O-acetilado. En modos realización particulares, el serotipo del serogrupo 15 es el serotipo 15C o 15B de-O-acetilado. En modos realización específicos, la proteína portadora de uno o más conjugados de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína es CRM197. En modos realización adicionales, la proteína portadora de cada uno de los conjugados de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína es CRM197.

Se identificaron los serotipos 20A y 20B de *S. pneumoniae* (Calix, J.J. et al., J. Biol. Chem. (2012) 287(33): 27885-27894) dentro del serogrupo 20 en 2012 mediante análisis genético. Como se analizó en Calix J.J., et al., los métodos de serotipado convencionales y los anticuerpos disponibles en el comercio no pudieron distinguir estos dos serotipos anteriormente y, en la actualidad, hay información limitada con respecto a los esfuerzos de serotipado para los serotipos 20A y 20B. Asimismo, la prevalencia de la enfermedad de 20A o 20B dentro de una enfermedad identificada causada por el serogrupo 20 no se entiende con claridad. Como tal, un experto en la materia de nivel medio puede elegir incluir cualquiera o ambos de estos dos serotipos (20A y/o 20B) en una composición de vacuna contra *S. pneumoniae*. También es posible que una vacuna contra *S. pneumoniae* que contiene un antígeno polisacárido de serotipo 20 pueda proporcionar protección cruzada contra otro (por ejemplo, una vacuna que incluye conjugados de polisacárido con proteína de serotipo 20A de *S. pneumoniae*, y sin serotipo 20B, puede proporcionar protección cruzada contra la infección con serotipo 20B de *S. pneumoniae*). Por lo tanto, "serotipo 20" como se usa en la presente puede referirse a una composición que contiene conjugados de polisacárido con proteína de serotipo 20A y/o serotipo 20B.

Las expresiones "nucleótidos que contienen CpG", "oligonucleótidos que contienen CpG", "oligonucleótidos CpG", y similares, se refieren a una molécula de nucleótidos de 6 a 50 nucleótidos de longitud que contiene una porción de CpG no metilado. Ver, por ejemplo, Wang *et al.*, 2003, *Vaccine* 21:4297. Los oligonucleótidos que contienen CpG incluyen oligonucleótidos modificados con cualquier enlace entre nucleósidos sintéticos, base modificada y/o azúcar modificada.

Un "adyuvante", como se define en la presente, es una sustancia que sirve para mejorar la inmunogenicidad de una composición inmunógena de la invención. Un adyuvante inmunitario puede mejorar una respuesta inmunitaria a un antígeno que es levemente inmunógeno cuando se administra por separado, por ejemplo, mediante inducción de ninguna o una débil respuesta inmunitaria mediada por células o títulos de anticuerpos, aumentar los títulos de anticuerpos con respecto al antígeno, y/o disminuir la dosis de un antígeno efectivo para obtener una respuesta inmunitaria en el individuo. Por ende, los adyuvantes a menudo se administran para potenciar la respuesta inmunitaria y son conocidos por los expertos en la materia de nivel medio.

Un "paciente" (denominado alternativamente "sujeto") se refiere a un mamífero capaz de ser infectado con *S. pneumoniae*. En algunos modos de realización preferidas, el paciente es un ser humano. Un paciente se puede tratar de manera profiláctica o terapéutica. El tratamiento profiláctico proporciona inmunidad protectora suficiente para reducir la probabilidad o gravedad de una infección neumocócica o los efectos de esta, por ejemplo, neumonía neumocócica. El tratamiento terapéutico se puede realizar para reducir la gravedad o prevenir la recaída de una infección por *S. pneumoniae* o los efectos clínicos de esta. El tratamiento profiláctico se puede realizar usando una composición inmunógena multivalente de la invención, como se describe en la presente. La composición de la invención se puede administrar a la población general o a aquellas personas con un riesgo aumentado de infección neumocócica, por ejemplo, personas mayores, o aquellos que viven con personas mayores o cuidan de ellas.

Aquellos que "necesitan el tratamiento" incluyen aquellos anteriormente expuestos a o infectados con *S. pneumoniae*, aquellos que se vacunaron previamente contra *S. pneumoniae*, igual que aquellos propensos a tener una infección o cualquier persona en donde se desea una reducción en la probabilidad de la infección, por ejemplo, personas inmunocomprometidas, personas mayores, niños, adultos o personas en buen estado de salud.

Una composición inmunógena multivalente "estable" es una composición que no tiene cambios significativos observados a una temperatura refrigerada (por ejemplo, 2-8 °C o 4 °C) durante al menos 1 mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 12 meses y/o 24 meses.

Adicionalmente, una composición "estable" incluye una que exhibe características deseadas a temperaturas que incluyen 25 °C y 37 °C durante períodos que incluyen 1 mes, 3 meses, 6 meses, 12 meses, y/o 24 meses. El criterio aceptable típico para la estabilidad es el siguiente: no más de alrededor del 5 %, alrededor del 10 %, alrededor del 15 %, o alrededor del 20 % de variabilidad en uno o más de las siguientes: (a) el peso molecular promedio en número (Mn) de los conjugados de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína en la composición, (b) el peso molecular promedio en peso (Mw) de los conjugados de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína en la composición, (c) la concentración total del polisacárido en la composición, (d) la emisión máxima de la composición medida usando espectroscopia de fluorescencia intrínseca de proteínas a una longitud de onda de excitación, por ejemplo, 280 nanómetros, y (e) la intensidad de fluorescencia de la composición medida usando espectroscopia de fluorescencia intrínseca de proteínas a una longitud de onda de excitación. El término "estable" también se puede usar para referirse a un conjugado neumocócico particular dentro de una composición inmunógena multivalente. En tal caso, el término se refiere a un conjugado que exhibe las propiedades deseadas a lo largo del tiempo, a una temperatura particular, y dichas propiedades no varían más que alrededor de 5 %, alrededor de 10 %, alrededor de 15 %, o alrededor de 20 % durante el tiempo y la temperatura observados.

II. Composiciones inmunógenas multivalentes

La invención proporciona composiciones inmunógenas multivalentes que comprenden conjugados múltiples de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína en donde cada uno de los conjugados comprende polisacáridos de un serotipo de *S. pneumoniae* conjugado con una proteína portadora. Diferentes aspectos y modos realización de las composiciones

5 inmunógenas multivalentes de la invención se describen más adelante.

En un modo de realización (modo de realización E1), la invención proporciona una composición inmunógena multivalente que comprende conjugados múltiples de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína, en donde cada uno comprende un polisacárido capsular de un serotipo de *S. pneumoniae* conjugado con una proteína portadora, en donde los serotipos de *S.*

10 *pneumoniae* comprenden, consisten o consisten esencialmente en:

- (1) 15A,
- (2) 16F,
- (3) uno o más serotipos del serogrupo 23 seleccionados de: (a) 23A y 23B, (b) 23A y 23F, (c) 23B y 23F, (d) 23A, (e) 23B, y (f) 23F,
- 15 (4) 24F,
- (5) 31, y
- (6) 35B.

En un submodo de realización del modo de realización E1, el uno o más serotipos del serogrupo 23 son 23A y 23B (es decir, ningún otro serotipo del serogrupo 23 está presente).

20 En un submodo de realización adicional del modo de realización E1, el uno o más serotipos del serogrupo 23 son 23A y 23F. En otro submodo de realización adicional del modo de realización E1, el uno o más serotipos del serogrupo 23 son 23B y 23F. En aun otro submodo de realización del modo de realización E1, 23A es el único serotipo del serogrupo 23. En otro submodo de realización del modo de realización E1, 23B es el único serotipo del serogrupo 23. En otro

25 submodo de realización del modo de realización E1, 23F es el único serotipo del serogrupo 23.

En un segundo modo de realización (modo de realización E2), la invención proporciona una composición inmunógena multivalente que comprende conjugados múltiples de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína que comprenden un polisacárido capsular de un serotipo de *S. pneumoniae* conjugado con una proteína portadora, en donde los serotipos de *S.*

30 *pneumoniae* comprenden los serotipos establecidos en el modo de realización E1, o cualquier submodo de realización del modo de realización E1, y también comprende el serotipo: (1) 6C, (2) 6A, o (3) 6A y 6B.

En un submodo de realización del modo de realización E2, la composición comprende el serotipo 6C. En un submodo de realización adicional del modo de realización E2,

35 la composición comprende serotipos 6A y 6B y no comprende el serotipo 6C. En otro submodo de realización del modo de realización E2, la composición comprende el serotipo 6A.

En un tercer modo de realización (modo de realización E3), la invención proporciona una composición inmunógena multivalente que comprende conjugados múltiples de

polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína que comprende un polisacárido capsular de un serotipo de *S. pneumoniae* conjugado con una proteína portadora, en donde los serotipos de *S. pneumoniae* comprenden los serotipos establecidos en los modos de realización E1, o cualquier submodo de realización del modo de realización E1, o modo de realización E2, o cualquier submodo de realización del modo de realización E2, y también comprenden los serotipos:

- (1) 8,
- (2) 9N,
- (3) 11A
- (4) 12F,
- (5) 15B o 15C,
- (6) 17F, y
- (7) 20A y/o 20B.

En un cuarto modo de realización (modo de realización E4), la invención proporciona una composición inmunógena multivalente que comprende conjugados múltiples de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína que comprende un polisacárido capsular de un serotipo de *S. pneumoniae* conjugado con una proteína portadora, en donde los serotipos de *S. pneumoniae* comprenden los serotipos establecidos en cualquiera de los modos de realización E1-E3, o cualquiera de los submodos de realización de estas, y también comprenden serotipos: 10A o 39.

En un quinto modo de realización (modo de realización E5), la invención proporciona una composición inmunógena multivalente que comprende conjugados múltiples de polisacárido de *S. Pneumoniae* con proteína como se describió anteriormente, en donde los serotipos de *S. pneumoniae* comprenden, consisten o consisten esencialmente en: 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, y 35B.

En un sexto modo de realización (modo de realización E6), la invención proporciona una composición inmunógena multivalente que comprende conjugados múltiples de polisacárido de *S. Pneumoniae* con proteína como se describió anteriormente, en donde los serotipos de *S. pneumoniae* comprenden, consisten o consisten esencialmente en: 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, y 35B.

En un séptimo modo de realización (modo de realización E7), la invención proporciona una composición inmunógena multivalente que comprende conjugados múltiples de polisacárido de *S. Pneumoniae* con proteína como se describió anteriormente, en donde los serotipos de *S. pneumoniae* comprenden, consisten o consisten esencialmente en: 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, y 35B.

En un octavo modo de realización (modo de realización E8), la invención proporciona una composición inmunógena multivalente que comprende conjugados múltiples de polisacárido de *S. Pneumoniae* con proteína como se describió anteriormente, en donde los

serotipos de *S. pneumoniae* comprenden, consisten o consisten esencialmente en: 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, y 35B.

En un noveno modo de realización (modo de realización E9), la invención proporciona una composición inmunógena multivalente que comprende conjugados múltiples de polisacárido de *S. Pneumoniae* con proteína como se describió anteriormente, en donde los serotipos de *S. pneumoniae* comprenden los serotipos establecidos en cualquiera de los modos de realización E1-E8 (o cualquiera de los submodos de realización de estas), y también comprenden los serotipos: 3, 7F, y 19A.

En un décimo modo de realización (modo de realización E10), la invención proporciona una composición inmunógena multivalente que comprende conjugados múltiples de polisacárido de *S. Pneumoniae* con proteína como se describió anteriormente, en donde los serotipos de *S. pneumoniae* comprenden los serotipos establecidos en cualquiera de los modos de realización E1-E9 (o cualquiera de los submodos de realización de estas), y también comprenden el serotipo 22F:

En un decimoprimer modo de realización (modo de realización E11), la invención proporciona una composición inmunógena multivalente que comprende conjugados múltiples de polisacárido de *S. Pneumoniae* con proteína como se describió anteriormente, en donde los serotipos de *S. pneumoniae* comprenden los serotipos establecidos en cualquiera de los modos de realización E1-E10 (o cualquiera de los submodos de realización de estas), y también comprenden el serotipo 33F.

En un decimosegundo modo de realización (modo de realización E12), la invención proporciona una composición inmunógena multivalente que comprende conjugados múltiples de polisacárido de *S. Pneumoniae* con proteína como se describió anteriormente, en donde los serotipos de *S. pneumoniae* comprenden, consisten o consisten esencialmente en un conjunto de serotipos de *S. pneumoniae* seleccionados del grupo que consiste en:

- (1) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, y 35B,
- (2) 15A, 16F, 23F, 23B, 24F, 31, y 35B,
- (3) 15A, 16F, 23A, 23F, 24F, 31, y 35B,
- (4) 15A, 16F, 23A, 24F, 31, y 35B,
- (5) 15A, 16F, 23B, 24F, 31, y 35B,
- (6) 15A, 16F, 23F, 24F, 31, y 35B,
- (7) 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, y 35B,
- (8) 6C, 15A, 16F, 23F, 23B, 24F, 31, y 35B,
- (9) 6C, 15A, 16F, 23A, 23F, 24F, 31, y 35B,
- (10) 6C, 15A, 16F, 23A, 24F, 31, y 35B,
- (11) 6C, 15A, 16F, 23B, 24F, 31, y 35B,
- (12) 6C, 15A, 16F, 23F, 24F, 31, y 35B,
- (13) 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, y 35B,

- (14) 6A, 15A, 16F, 23F, 23B, 24F, 31, y 35B,
 (15) 6A, 15A, 16F, 23A, 23F, 24F, 31, y 35B,
 (16) 6A, 15A, 16F, 23A, 24F, 31, y 35B,
 (17) 6A, 15A, 16F, 23B, 24F, 31, y 35B,
 5 (18) 6A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31, y 35B,
 (19) 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, y 35B,
 (20) 6A, 6B, 15A, 16F, 23F, 23B, 24F, 31, y 35B,
 (21) 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23F, 24F, 31, y 35B,
 (22) 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 24F, 31, y 35B,
 10 (23) 6A, 6B, 15A, 16F, 23B, 24F, 31, y 35B, y
 (24) 6A, 6B, 15A, 16F, 23F, 24F, 31, y 35B.

En un decimotercero modo de realización (modo de realización E13), la invención proporciona una composición inmunógena multivalente que comprende conjugados múltiples de polisacárido de *S. Pneumoniae* con proteína como se describió anteriormente, en donde los serotipos de *S. pneumoniae* comprenden, consisten o consisten esencialmente en un conjunto de serotipos de *S. pneumoniae* seleccionado del grupo que consiste en:

- (1) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 y 35B,
 (2) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 y 35B,
 20 (3) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 y 35B,
 (4) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 y 35B,
 25 (5) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 y 35B,
 (6) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 y 35B,
 (7) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 y 35B,
 30 (8) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 y 35B,
 (9) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 y 35B,
 (10) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 y 35B,
 35 (11) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 y 35B,

- (12) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 y 35B,
- (13) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 y 35B,
- 5 (14) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 y 35B,
- (15) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 y 35B,
- (16) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 y 35B,
- 10 (17) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 y 35B,
- (18) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 y 35B,
- (19) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 y 35B,
- (20) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 y 35B,
- (21) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 y 35B,
- 15 (22) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 y 35B,
- (23) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 y 35B,
- (24) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 y 35B,
- (25) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 y 35B,
- 20 (26) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 y 35B,
- (27) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 y 35B,
- (28) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 y 35B,
- 25 (29) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 y 35B,
- (30) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 y 35B,
- (31) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 y 35B, y
- (32) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 y 35B.

30 El decimotercer modo de realización (modo de realización E13), también comprende el conjunto de serotipos de *S. pneumoniae*, filas (1) a (32) en donde el serotipo 20A en cada conjunto se sustituye con serotipo 20 o serotipo 20B.

35 En un decimocuarto modo de realización de la invención (modo de realización E14), la invención proporciona una composición inmunógena multivalente que comprende conjugados múltiples de polisacárido de *S. Pneumoniae* con proteína como se describió anteriormente, en donde los serotipos de *S. pneumoniae* comprenden, consisten o consisten esencialmente en un conjunto de serotipos de *S. pneumoniae* seleccionado de cualquiera de los

conjuntos de serotipos establecidos en el modo de realización E13, filas (17) a (32), y también comprenden los serotipos 23A y/o 23B.

En un decimoquinto modo de realización (modo de realización E15), la invención proporciona una composición inmunógena multivalente que comprende conjugados múltiples de polisacárido de *S. Pneumoniae* con proteína como se describió anteriormente, en donde los serotipos de *S. pneumoniae* comprenden, consisten o consisten esencialmente en un conjunto de serotipos de *S. pneumoniae* seleccionado del grupo que consiste en:

- (1) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 y 35B,
- 10 (2) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 y 35B,
- (3) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 y 35B,
- (4) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 y 35B,
- 15 (5) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 y 35B,
- (6) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 y 35B,
- 20 (7) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 y 35B,
- (8) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 y 35B,
- (9) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 y 35B,
- 25 (10) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 y 35B,
- (11) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 y 35B,
- 30 (12) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 y 35B,
- (13) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 y 35B,
- (14) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 y 35B,
- 35 (15) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 y 35B,

- (16) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 y 35B,
- (17) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 y 35B,
- 5 (18) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 y 35B,
- (19) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 y 35B,
- 10 (20) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 y 35B,
- (21) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 y 35B,
- (22) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 y 35B,
- 15 (23) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 y 35B,
- (24) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 y 35B,
- 20 (25) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 y 35B,
- (26) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 y 35B,
- (27) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 y 35B,
- 25 (28) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 y 35B,
- (29) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 y 35B,
- 30 (30) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 y 35B,
- (31) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 y 35B,
- (32) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 y 35B,
- 35 (33) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, y 20B,
- (34) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24B, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, y 20A,

- 5 (35) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24B, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, y 20B,
- (36) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, y 20B,
- (37) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24B, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, y 20A,
- (38) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24B, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, y 20B,
- 10 (39) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, y 20,
- (40) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24B, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, y 20,
- (41) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24B, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, y 20,
- 15 (42) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, y 20,
- (43) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24B, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, y 20, y
- 20 (44) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24B, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, y 20.

En un decimosexto modo de realización de la invención (modo de realización E16), la invención proporciona una composición inmunógena multivalente que comprende conjugados múltiples de polisacárido de *S. Pneumoniae* con proteína como se describió anteriormente, en donde los serotipos de *S. pneumoniae* comprenden, consisten o consisten esencialmente en un conjunto de serotipos de *S. pneumoniae* seleccionado de cualquiera de los conjuntos de serotipos establecidos en el modo de realización E15, filas (17) a (32), y también comprende los serotipos 23A y/o 23B.

En un decimoséptimo modo de realización (modo de realización E17), la invención proporciona una composición inmunógena multivalente que comprende conjugados múltiples de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína que comprende un polisacárido capsular de un serotipo de *S. pneumoniae* conjugado con una proteína portadora, en donde los serotipos de *S. pneumoniae* comprenden un conjunto de serotipos seleccionados del grupo que consiste en:

- 35 i. 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 y 35B,
- ii. 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, y 20A, y
- iii. 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, y 20A;

En submodos de realización del modo de realización E17, la composición inmunógena no comprende ningún conjugado de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína.

En un decimotavo modo de realización (modo de realización E18), la invención proporciona una composición inmunógena multivalente que comprende conjugados múltiples de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína que comprende un polisacárido capsular de un serotipo de *S. pneumoniae* 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 y 35B. En submodos de realización del modo de realización E18, la composición inmunógena no comprende ningún conjugado de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína.

En un decimonoveno modo de realización (modo de realización E19), la invención proporciona una composición inmunógena multivalente que comprende conjugados múltiples de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína que comprende un polisacárido capsular de un serotipo de *S. pneumoniae* 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, y 20A. En submodos de realización del modo de realización E19, la composición inmunógena no comprende ningún conjugado de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína.

En un vigésimo modo de realización (modo de realización E20), la invención proporciona una composición inmunógena multivalente que comprende conjugados múltiples de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína que comprende un polisacárido capsular de un serotipo de *S. pneumoniae* 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, y 20A. En submodos de realización del modo de realización E20, la composición inmunógena no comprende ningún conjugado de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína.

En otro modo de realización, la invención proporciona una composición inmunógena multivalente que comprende conjugados múltiples de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína que comprende un polisacárido capsular de un serotipo de *S. pneumoniae* 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, y 20A. En submodo de realización de esta modo de realización (es decir, 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, y 20A), la composición inmunógena no comprende ningún otro conjugado de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína.

En otro modo de realización, la invención proporciona una composición inmunógena multivalente que comprende conjugados múltiples de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína que comprende un polisacárido capsular de un serotipo de *S. pneumoniae* 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, y 20. En submodos de realización de esta modo de realización (es decir, 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, y 20), la composición inmunógena no comprende ningún otro conjugado de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína.

En otro modo de realización, la invención proporciona una composición inmunógena multivalente que comprende conjugados múltiples de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína que comprende un polisacárido capsular de un serotipo de *S. pneumoniae* 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, y 20B. En submodos de realización de este modo de realización (es decir, 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, y 20B), la composición inmunógena no comprende ningún otro conjugado de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína.

Como se muestra en la presente (ver Ejemplo 3 más adelante), el polisacárido neumocócico de serotipo 15B de-O-acetilado es equivalente al polisacárido neumocócico de serotipo 15C y tiene un espectro de RMN idéntico. El polisacárido neumocócico de serotipo 15B de-O-acetilado, como se describe y se divulga en la presente, es equivalente al polisacárido neumocócico de serotipo 15C y puede que ambos tengan contenido de o-acetilo por unidad de repetición en el rango de 0-5 %, o en el rango de 0-4 %, o en el rango de 0-3 %, o en el rango de 0-2 %, o en el rango de 0-1 %, o en el rango de 0-0,5 %, o en el rango de 0-0,1 %, o sin contenido de o-acetilo. En un informe de Spencer B.L., et al., 15C puede estar ligeramente o-acetilado (Spencer, B.L. et al., Clin. Vac. Immuno. (2017) 24(8): 1-13). Por ende, en cualquiera de los modos de realización de las composiciones inmunógenas multivalentes de la presente, se puede usar el serotipo 15B de-O-acetilado en lugar del serotipo 15C. Los procesos para la de-O-acetilación son conocidos en el estado de la técnica, por ejemplo, como se describe en Rajam et al., *Clinical and Vaccine Immunology*, 2007, 14(9):1223–1227.

En algunos modos de realización cualquiera de las composiciones inmunógenas multivalentes de la invención, que incluyen modos realización E1 a E20 y cualquier submodo de realización de estas, la composición también comprende un portador farmacéuticamente aceptable.

Reactividad cruzada

En un modo de realización, la invención proporciona composiciones inmunógenas multivalentes que comprenden conjugados de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína, en donde cada uno de los conjugados comprende un polisacárido de un serotipo de *S. pneumoniae*, que incluye el serotipo 6C, conjugado con una proteína portadora, en donde el serotipo 6C de *S. pneumoniae* proporciona protección cruzada contra los serotipos 6A y 6B de *S. pneumoniae*.

En otro modo de realización, la invención proporciona composiciones inmunógenas multivalentes que comprenden conjugados de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína, seleccionados de los modos de realización E1 a E20, en donde cada uno de los conjugados comprende un polisacárido de un serotipo de *S. pneumoniae*, que incluye el serotipo 6C, conjugado con una proteína portadora, en donde el serotipo 6C de *S. pneumoniae* proporciona protección cruzada contra los serotipos 6A y 6B de *S. pneumoniae*.

En un modo de realización, la invención proporciona composiciones inmunógenas multivalentes que comprenden conjugados de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína, en donde cada uno de los conjugados comprende un polisacárido de un serotipo de *S. pneumoniae*, que incluye el serotipo 19A, conjugado con una proteína portadora, en donde el serotipo 19A de *S. pneumoniae* proporciona protección cruzada contra el serotipo 19F de *S. pneumoniae*.

5

En otro modo de realización, la invención proporciona composiciones inmunógenas multivalentes que comprenden conjugados de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína, seleccionados de los modos de realización E1 a E20, en donde cada uno de los conjugados comprende un polisacárido de un serotipo de *S. pneumoniae*, que incluye el serotipo 19A, conjugado con una proteína portadora, en donde el serotipo 19A de *S. pneumoniae* proporciona protección cruzada contra el serotipo 19F de *S. pneumoniae*.

10

En un modo de realización, la invención proporciona composiciones inmunógenas multivalentes que comprenden conjugados de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína, en donde cada uno de los conjugados comprende un polisacárido de un serotipo de *S. pneumoniae*, que incluye el serotipo 23A, conjugado con una proteína portadora, en donde los serotipos 23A y/o 23B de *S. pneumoniae* proporcionan protección cruzada contra el serotipo 23F de *S. pneumoniae*.

15

En otro modo de realización, la invención proporciona composiciones inmunógenas multivalentes que comprenden conjugados de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína, seleccionados de los modos de realización E1 a E20 en donde cada uno de los conjugados comprende un polisacárido de un serotipo de *S. pneumoniae*, que incluye el serotipo 23A, conjugado con una proteína portadora, en donde los serotipos 23A y/o 23B de *S. pneumoniae* proporcionan protección cruzada contra el serotipo 23F de *S. pneumoniae*.

20

En un modo de realización, la invención proporciona composiciones inmunógenas multivalentes que comprenden conjugados de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína, en donde cada uno de los conjugados comprende un polisacárido de un serotipo de *S. pneumoniae*, que incluye el serotipo 6A, conjugado con una proteína portadora, en donde el serotipo 6A de *S. pneumoniae* proporciona protección cruzada contra los serotipos 6B y/o 6C de *S. pneumoniae*.

25

En otro modo de realización, la invención proporciona composiciones inmunógenas multivalentes que comprenden conjugados de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína, seleccionados de los modos de realización E1 a E20, en donde cada uno de los conjugados comprende un polisacárido de un serotipo de *S. pneumoniae*, que incluye el serotipo 6A, conjugado con una proteína portadora, en donde el serotipo 6A de *S. pneumoniae* proporciona protección cruzada contra los serotipos 6B y/o 6C de *S. pneumoniae*.

30

En un modo de realización, la invención proporciona composiciones inmunógenas multivalentes que comprenden conjugados de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína, en donde cada uno de los conjugados comprende un polisacárido de un serotipo de *S. pneumoniae*,

35

que incluye el serotipo 20A, conjugado con una proteína portadora, en donde el serotipo 20A de *S. pneumoniae* proporciona protección cruzada contra el serotipo 20B de *S. pneumoniae*.

En otro modo de realización, la invención proporciona composiciones inmunógenas multivalentes que comprenden conjugados de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína, seleccionados de los modos de realización E1 a E20, en donde cada uno de los conjugados comprende un polisacárido de un serotipo de *S. pneumoniae*, que incluye el serotipo 20A, conjugado con una proteína portadora, en donde el serotipo 20A de *S. pneumoniae* proporciona protección cruzada contra el serotipo 20B de *S. pneumoniae*.

En un modo de realización, la invención proporciona composiciones inmunógenas multivalentes que comprenden conjugados de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína, en donde cada uno de los conjugados comprende un polisacárido de un serotipo de *S. pneumoniae*, que incluye el serotipo 20B, conjugado con una proteína portadora, en donde el serotipo 20B de *S. pneumoniae* proporciona protección cruzada contra el serotipo 20A de *S. pneumoniae*.

En otro modo de realización, la invención proporciona composiciones inmunógenas multivalentes que comprenden conjugados de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína, seleccionados de los modos de realización E1 a E20, en donde cada uno de los conjugados comprende un polisacárido de un serotipo de *S. pneumoniae*, que incluye el serotipo 20B, conjugado con una proteína portadora, en donde el serotipo 20B de *S. pneumoniae* proporciona protección cruzada contra el serotipo 20A de *S. pneumoniae*.

En un modo de realización, la invención proporciona composiciones inmunógenas multivalentes que comprenden conjugados de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína, en donde cada uno de los conjugados comprende un polisacárido de un serotipo de *S. pneumoniae*, que incluye el serotipo 15C, conjugado con una proteína portadora, en donde el serotipo 15C de *S. pneumoniae* proporciona protección cruzada contra el serotipo 15B de *S. pneumoniae*.

En otro modo de realización, la invención proporciona composiciones inmunógenas multivalentes que comprenden conjugados de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína, seleccionados de los modos de realización E1 a E20, en donde cada uno de los conjugados comprende un polisacárido de un serotipo de *S. pneumoniae*, que incluye el serotipo 15C, conjugado con una proteína portadora, en donde el serotipo 15C de *S. pneumoniae* proporciona protección cruzada contra el serotipo 15B de *S. pneumoniae*.

Proteína portadora

En modos realización particulares de la presente invención, CRM197 se utiliza como la proteína portadora. CRM197 es una variante no tóxica (es decir, toxoide) de toxina diftérica que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: .

GADDVVDSSK SFVMENFSSY HGTKPGYVDS IQKGIQKPKS GTQGNYYYYW
KEFYSTDN KY DAAGYSVDNE NPLSGKAGGV VKVTYPGLTK VLALKVDNAE
TIKKELGLSL TEPLMEQVGT EEFIKRFGDG ASRVVLSLPF AEGSSSVEYI

NNWEQAKALS VELEINFETR GKRQGDAMYE YMAQACAGNR VRRSVGSSLS
 CINLDWDVIR DKTKTKIESL KEHGIKNKM SESPNTVSE EKAKQYLEEF
 HQTALEHPEL SELKTVTGTN PVFAGANYAA WAVNVAQVID SETADNLEKT
 TAALSILPGI GSVMGIADGA VHHNTEEIVA QSIALSSLMV AQAIPLVGEL
 5 VDIGFAAYNF VESIINLFQV VHNSYNRPAY SPGHKTQPF LDGYAVSWNT
 VEDSIIRTGF QGESGHDIKI TAENTPLPIA GVLLPTIPGK LDVNKSKTHI
 SVNGRKIRMR CRAIDGDVTF CRPKSPVYVG NGVHANLHVA FHRSSSEKIH
 SNEISSDSIG VLG YQKTVDH TKVNSKLSLF FEIKS (SEQ ID NO:1)

En un modo de realización, CRM197 se aísla de los cultivos de *Corynebacterium*
 10 *diphtheria* cepa C7 (β197) cultivados en ácidos de casamino y un medio a base de extracto de
 levadura. En otro modo de realización, CRM197 se prepara de manera recombinante de acuerdo
 con el método descrito en U.S. 5.614.382. Generalmente, CRM197 se purifica a través de una
 combinación de ultrafiltración, precipitación de sulfato de amonio y cromatografía de
 intercambio iónico. En algunos modos de realización, CRM197 se prepara en *Pseudomonas*
 15 *fluorescens* con Pfenex Expression Technology™ (Pfenex Inc., San Diego, CA).

Otras proteínas portadoras adecuadas incluyen toxinas bacterianas inactivadas
 adicionales, tales como DT (toxoides diftérico) o fragmento B de DT (DTFB), TT (toxoides
 tetánico) o fragmento C de TT, toxoides pertussis, toxoides de cólera (por ejemplo, como se
 describe en WO 2004/083251), *E. coli* LT, *E. coli* ST, y exotoxina A de *Pseudomonas*
 20 *aeruginosa*. También se pueden usar las proteínas de la membrana externa bacteriana, tales como
 complejo de la membrana externa (OMPC), porinas, proteínas de fijación transferrina, proteína
 A de superficie neumocócica (PspA; ver WO 02/091998), proteína adhesina neumocócica
 (PsaA), peptidasa C5a de estreptococos del grupo A o grupo B, o proteína D de *Haemophilus*
influenzae, neumolisina neumocócica (Kuo *et al.*, 1995, *Infect Immun* 63; 2706-13) que incluye
 25 capa purificada de alguna manera, por ejemplo, dPLY-GMBS (ver WO 04/081515) o dPLY-
 formol, PhtX, que incluye PhtA, PhtB, PhtD, PhtE y fusiones de proteínas de Pht, por ejemplo,
 fusiones de PhtDE, fusiones de PhtBE (ver WO 01/98334 y WO 03/54007). También se pueden
 usar como proteínas portadoras otras proteínas, tales como ovalbúmina, hemocianina de lapa
 californiana (KLH), albúmina de suero bovino (BSA) o proteína purificada derivada de
 30 tuberculina (PPD), PorB (de *N. meningitidis*), PD (proteína D de *Haemophilus influenzae*; ver,
 por ejemplo, EP 0 594 610 B), o equivalentes inmunológicamente funcionales de estos, péptidos
 sintéticos (ver EP0378881 y EP0427347), proteínas de choque térmico (ver WO 93/17712 y WO
 94/03208), proteínas pertussis (ver WO 98/58668 y EP0471177), citocinas, linfocinas, hormonas
 o factores del crecimiento (ver WO 91/01146), proteínas artificiales que comprenden epítopos de
 35 linfocito T CD4+ humano múltiple de varios antígenos derivados de patógenos (ver Falugi *et al.*,
 2001, *Eur J Immunol* 31:3816-3824) tales como proteína N19 (ver Baraldoi *et al.*, 2004, *Infect*
Immun 72:4884-7), proteínas de absorción de hierro (ver WO 01/72337), toxina A o B de *C.*
difficile (ver WO 00/61761), y flagelina (ver Ben-Yedidia *et al.*, 1998, *Immunol Lett* 64:9).

Otros mutantes DT se pueden usar como proteínas portadoras, tales como CRM₁₇₆, CRM₂₂₈, CRM₄₅ (Uchida *et al.*, 1973, *J Biol Chem* 218:3838-3844); CRM₉, CRM₄₅, CRM₁₀₂, CRM₁₀₃ y CRM₁₀₇ y otras mutaciones descritas por Nicholls y Youle en Genetically Engineered Toxins, Ed: Frankel, Maecel Dekker Inc, 1992; eliminación o mutación de Glu-148 a Asp, Gln o Ser y/o Ala 158 a Gly y otras mutaciones descritas en U.S. 4.709.017 o U.S. 4.950.740; mutaciones de al menos uno o más residuos de Lys 516, Lys 526, Phe 530 y/o Lys 534 y otras mutaciones descritas en U.S. 5.917.017 o la patente U.S. N.º 6.455.673; o fragmentos descritos en U.S. 5.843.711. Dichos mutantes DT también se pueden usar para elaborar variantes de DTFB en donde las variantes comprenden el fragmento B contenido en las regiones de epítipo.

En algunos modos de realización, la proteína portadora se selecciona del grupo que consiste en: complejo de proteínas de la membrana externa (OMPC), toxoide tetánico, toxina de difteria, proteína D y CRM197.

En algunos modos de realización de la invención, un segundo portador se puede usar para uno o más conjugados de polisacárido con proteína en una composición inmunógena multivalente. La segunda proteína portadora es preferentemente una proteína no tóxica y no reactogénica que se puede obtener en una pureza y cantidad suficientes. La segunda proteína portadora también se conjuga o se une con el polisacárido de *S. pneumoniae* para mejorar la inmunogenicidad del antígeno. Las proteínas portadoras deben ser susceptibles a los procedimientos de conjugación estándar. En otro modo de realización, cada polisacárido capsular no conjugado con la primera proteína portadora se conjuga con la misma segunda proteína portadora (por ejemplo, cada molécula de polisacárido capsular que se conjuga con una sola proteína portadora). En otro modo de realización, los polisacáridos capsulares no conjugados con la primera proteína portadora se conjugan con dos o más proteínas portadoras (por ejemplo, cada molécula de polisacárido capsular que se conjuga con una sola proteína portadora). En dichas modos realización, cada polisacárido capsular del mismo serotipo se conjuga generalmente con la misma proteína portadora.

En los modos de realización de la invención, que incluye cualquiera de los modos de realización E1-E20 y cualquiera de los submodos de realización de estas, uno o más de los serotipos de polisacárido (que incluye 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, cuando corresponda) se conjuga con CRM197. En modos realización adicionales de la invención, que incluye cualquiera de los modos de realización E1-E20 y cualquiera de los submodos de realización de estas, cada serotipo de polisacárido se conjuga con CRM197.

La formulación de los conjugados de polisacárido-proteína de la presente invención se puede obtener mediante métodos reconocidos en el estado de la técnica. Por ejemplo, los conjugados neumocócicos individuales se pueden formular con un vehículo fisiológicamente aceptable para preparar la composición. Los ejemplos de dichos vehículos

incluyen, entre otros, agua, solución salina amortiguada, polioles (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido) y soluciones de dextrosa.

En un modo de realización preferida, la composición de vacuna se formula en un amortiguador de L-histidina con cloruro de sodio.

5 En algunos modos de realización de la invención, la composición inmunógena multivalente comprende conjugados múltiples de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína que comprenden polisacárido capsular de un serotipo de *S. pneumoniae* conjugado con una proteína portadora y un adyuvante, en donde los serotipos de *S. pneumoniae* son como se describen en la presente. Los adyuvantes adecuados para mejorar la efectividad de la
10 composición incluyen, entre otros:

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

(2) formulaciones de emulsión de aceite en agua (con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos, tales como péptido de muramilo (definidos más adelante) o
15 componentes de la pared celular bacteriana), tales como, por ejemplo, (a) MF59 (publicación de solicitud de patente internacional N.º WO 90/14837), que contiene 5 % de escualeno, 0,5 % de Tween 80, y 0,5 % de Span 85 (que opcionalmente contiene diversas cantidades de MTP-PE) formulado en partículas de submicrómetros con un microfluidizador, tal como microfluidizador Model 110Y (Microfluidics, Newton, MA), (b) SAF, que contiene 10 % de escualeno, 0,4 % de
20 Tween 80, 5 % de polímero L121 bloqueado con plurónico, y thr-MDP microfluidizado en una emulsión de submicrómetros o agitado en vórtice para generar una emulsión de tamaño de partícula mayor, (c) sistema adyuvante RibitTM (RAS), (Corixa, Hamilton, MT) que contiene 2 % de escualeno, 0,2 % de Tween 80, y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo que consiste en monofosforilípido A 3-O-desacilado (MPLTM) descrito en la patente
25 estadounidense N.º 4.912.094, dimicolato de trehalosa (TDM), y esqueleto de la pared celular (CWS), preferentemente, MPL+CWS (DetoxTM); y (d) Montanide ISA;

(3) adyuvante de saponina, tal como Quil A o STIMULONTM QS-21 (Antigenics, Framingham, MA) (ver, por ejemplo, patente estadounidense N.º 5.057.540) se pueden usar, o partículas generadas a partir de estos, tales como ISCOM (complejos inmunoestimulantes
30 formados por la combinación de colesterol, saponina, fosfolípido y proteínas anfipáticas) e Iscomatrix[®] (que tienen esencialmente la misma estructura que ISCOM pero sin la proteína);

(4) lipopolisacáridos bacterianos, análogos de lípido A sintéticos, tales como compuestos de aminoalquil glucosaminida fosfato (AGP), o derivados o análogos de estos, que están disponibles de Corixa, y que se describen en la patente estadounidense N.º 6.113.918; un
35 AGP es 2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoilamino]etil 2-desoxi-4-O-fosfono-3-O-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-2-[(R)-3-- tetradecanoiloxitetradecanoilamino]-b-D-glucopiranosida, que también se conoce como 529 (anteriormente conocido como RC529), que se formula como una forma acuosa o una emulsión estable

(5) polinucleótidos sintéticos tales como oligonucleótidos que contienen motivos de CpG (patente estadounidense N.º 6.207.646); y

(6) citocinas, tales como interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, etc.), interferones (por ejemplo, interferón gamma), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF), moléculas coestimulantes B7-1 y B7-2, etc; y

(7) complemento, tal como un trímero del componente complementario C3d.

En otro modo de realización, el adyuvante es una mezcla de 2, 3 o más de los adyuvantes antes mencionados, por ejemplo, SBAS2 (una emulsión de aceite en agua que también contiene monofosforilípido A 3-O-desacilado y QS21).

Los péptidos de muramilo incluyen, entre otros, N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanin-2-(1'-2' dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), etc.

En algunos modos de realización, el adyuvante es una sal de aluminio. El adyuvante de sal de aluminio puede ser una vacuna precipitada con aluminio o una vacuna absorbida con aluminio. Los adyuvantes de sal de aluminio son conocidos en el estado de la técnica y se describen, por ejemplo, en Harlow, E. y D. Lane (1988; Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory) y Nicklas, W. (1992; Aluminum salts. Research in Immunology 143:489-493). Las sales de aluminio incluyen, entre otras, alúmina hidratada, hidrato de alúmina, trihidrato de alúmina (ATH), hidrato de aluminio, trihidrato de aluminio, alhidrogel, Superfos, Amphogel, hidróxido de aluminio (III), sulfato de hidroxifosfato de aluminio, adyuvante de fosfato de aluminio (APA), alúmina amorfa, alúmina trihidratada o trihidroxialuminio.

APA es una suspensión acuosa de hidroxifosfato de aluminio. APA se elaboró mediante una mezcla de cloruro de aluminio y fosfato de sodio en una relación volumétrica de 1:1 para precipitar hidroxifosfato de aluminio. Luego del proceso de mezclado, el material se redujo de tamaño con una mezcladora de alto cizallamiento para obtener una distribución monodispersa del tamaño de la partícula. Luego, el producto se diafiltró en una solución salina fisiológica y se esterilizó con vapor.

En algunos modos de realización, un $\text{Al}(\text{OH})_3$ disponible en el comercio (por ejemplo, Alhydrogel o Superfos de Denmark/Accurate Chemical y Scientific Co., Westbury, NY) se usa para absorber proteínas en una relación de 50 - 200 μg de proteína/mg de hidróxido de aluminio. En otro modo de realización, la absorción de la proteína depende del pI (pH isoeléctrico) de la proteína y el pH del medio. Una proteína con un pI bajo absorbe el ión de aluminio con carga positiva con mayor potencia que una proteína con el pI más alto. Las sales de aluminio pueden establecer un depósito de antígeno que se libera lentamente durante un período de 2 a 3 semanas, pueden intervenir en la activación no específica de los macrófagos y la

activación complementaria y/o estimular el mecanismo inmunitario innato (posiblemente mediante la estimulación del ácido úrico). Ver, por ejemplo, Lambrecht *et al.*, 2009, Curr Opin Immunol 21:23.

5 Los conjugados acuosos monovalentes a granel generalmente se mezclan juntos y se diluyen para obtener 4 µg/ml para todos los serotipos excepto 6B, que se diluyen para obtener 8 µg/ml. Una vez diluidos, el lote se esteriliza por filtración, y un volumen igual de adyuvante de fosfato de aluminio se agrega de manera aséptica para obtener una concentración de aluminio final de 250 µg/ml. El lote adyuvante formulado se llena en viales descartables de 0,5 ml/dosis.

10 En algunos modos de realización, el adyuvante es una secuencia de nucleótidos que contiene, por ejemplo, un oligonucleótido que contiene CpG, en particular, un oligodesoxinucleótido que contiene CpG (CpG ODN). En otro modo de realización, el adyuvante es ODN 1826, que se puede adquirir en Coley Pharmaceutical Group.

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

20 En los modos de realización alternativas, la composición inmunógena comprende conjugados múltiples de polisacárido de *S. pneumoniae* y proteína como se describe en la presente, por ejemplo, en cualquiera de los modos de realización E1-E20 o cualquiera de los submodos de realización de estas, y no comprende un adyuvante.

Formulaciones

La composición de la invención se puede formular como viales de dosis única, viales de dosis múltiples o jeringas de vidrio o plástico prellenadas.

25 En otro modo de realización, las composiciones de la presente invención se administran por vía oral y, por lo tanto, se formulan en una forma adecuada para la administración oral, es decir, como una preparación sólida o líquida. Las formulaciones orales sólidas incluyen comprimidos, cápsulas, píldoras, gránulos, pelets y similares. Las formulaciones orales líquidas incluyen soluciones, suspensiones, dispersiones, emulsiones, aceites y similares.

30 Los portadores farmacéuticamente aceptables para las formulaciones líquidas son soluciones, suspensiones, emulsiones o aceites acuosos o no acuosos. Los ejemplos de solventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, que incluyen medios salinos y amortiguados. Los ejemplos de aceites son aquellos
35 de origen animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de maní, aceite de soja, aceite de oliva, aceite de girasol, otro aceite marino, o un lípido de leche o huevos.

La composición farmacéutica puede ser isotónica, hipotónica o hipertónica. Sin embargo, a menudo se prefiere que una composición farmacéutica para infusión o inyección sea

esencialmente isotónica, cuando se administra. Por lo tanto, para almacenamiento la composición farmacéutica puede ser preferentemente isotónica o hipertónica. Si la composición farmacéutica es hipertónica para almacenamiento, se puede diluir para transformarse en una solución isotónica antes de la administración.

5 El agente isotónico puede ser un agente isotónico iónico tal como una sal o un agente isotónico no iónico tal como un carbohidrato. Los ejemplos de agentes isotónicos iónicos incluyen, entre otros, NaCl, CaCl₂, KCl y MgCl₂. Los ejemplos de agentes isotónicos no iónicos incluyen, entre otros, manitol, sorbitol y glicerol.

Se prefiere que al menos un aditivo farmacéuticamente aceptable sea un
10 amortiguador. Para algunos fines, por ejemplo, cuando la composición farmacéutica es para infusión o inyección, a menudo es conveniente que la composición comprenda un amortiguador, que es capaz de amortiguar una solución a un pH en el rango de 4 a 10, tal como de 5 a 9, por ejemplo, de 6 a 8.

El amortiguador se puede seleccionar, por ejemplo, del grupo que consiste en
15 amortiguador de TRIS, acetato, glutamato, lactato, maleato, tartrato, fosfato, citrato, carbonato, glicinato, histidina, glicina, succinato y trietanolamina.

El amortiguador se puede seleccionar de amortiguadores compatibles de acuerdo con USP para uso parenteral, en particular, cuando la formulación farmacéutica es para uso parenteral. Por ejemplo, el amortiguador se puede seleccionar del grupo que consiste en ácidos
20 monobásicos tales como acético, benzoico, glucónico, glicérico y láctico; ácidos dibásicos tales como aconítico, adípico, ascórbico, carbónico, glutámico, malico, succínico y tartárico, ácidos polibásicos tales como cítrico y fosfórico; y bases tales como amoníaco, dietanolamina, glicina, trietanolamina y TRIS.

Los vehículos parenterales (para inyección subcutánea, intravenosa, intraarterial, o
25 intramuscular) incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, cloruro de sodio y dextrosa, Ringer lactada y aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen regeneradores de fluidos y nutrientes, regeneradores de electrolitos tales como aquellos a base de dextrosa de Ringer, y similares. Los ejemplos son líquidos estériles tales como agua y aceites, con o sin adición de tensioactivo y otros adyuvantes farmacéuticamente aceptables. En general, agua,
30 salina, dextrosa acuosa y soluciones de azúcares relacionadas, glicoles tales como propilenglicoles o polietilenglicol, polisorbato 80 (PS-80), polisorbato 20 (PS-20), y poloxámero 188 (P188) se prefieren como portadores líquidos, en particular, para soluciones inyectables. Los ejemplos de aceites son aquellos de origen animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de maní, aceite de soja, aceite de oliva, aceite de girasol, otro aceite marino, o un lípido de leche o
35 huevos.

Las formulaciones de la invención también pueden contener un tensioactivo. Los tensioactivos preferidos incluyen, entre otros: tensioactivos de ésteres de polioxietileno sorbitán (generalmente mencionados como Tweens), en especial, PS-20 y PS-80; copolímeros de óxido

de etileno (EO), óxido de propileno (PO), y/o óxido de butileno (BO), a la venta como DOWFAX™, tales como copolímeros de bloque EO/PO lineales; octoxinóles, que pueden variar en la cantidad de grupos etoxi (oxi-1,2-etanediilo) de repetición, en donde octoxinol-9 (Triton X-100, o t-octilfenoxipoliétoxietanol) es de particular interés; (octilfenoxi)poliétoxietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfolípidos tales como fosfatidilcolina (lecitina); etoxilatos de nonilfenol, tal como la serie NP Tergitol™; éteres grasos de polioxietileno derivados de laurilo, cetilo, estearilo y alcohol de oleílo (conocidos como tensioactivos Brij), tales como trietilenglicol monolauril éter (Brij 30); y ésteres de sorbitán (generalmente conocidos como SPAN), tales como trioleato de sorbitán (Span 85) y monolaurato de sorbitán. Un tensioactivo preferido para incluir en la emulsión es PS-80.

Se pueden usar mezclas de tensioactivos, por ejemplo, mezclas de PS-80/Span 85. También es adecuada una combinación de éster de polioxietileno sorbitán tal como monooleato de polioxietileno sorbitán (PS-80) y un octoxinol tal como t-octilfenoxipoliétoxietanol (Triton X-100). Otra combinación útil comprende laureth 9 más un éster de polioxietileno sorbitán y/o un octoxinol.

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

En algunos modos de realización, la composición consiste esencialmente en histidina (20 mM), solución salina (150 mM) y 0,2 % de PS-20 o 0,04 % de PS-80 a un pH de 5,8 con 250 µg/ml de APA (adyuvante de fosfato de aluminio). El PS-20 puede variar de 0,005 % a 0,3 % (p/v) con la presencia de PS-20 o PS-80 en la agregación de control de la formulación durante la fabricación simulada y en el envío usando envasado primario. En otro modo de realización, PS-20 puede variar de 0,025 % a 0,8 % (p/v). En otro modo de realización, PS-20 puede variar de 0,05 % a 0,8 % (p/v). En otro modo de realización, PS-20 puede variar de 0,05 % a 0,2 % (p/v). El proceso consiste en combinar una mezcla de hasta 24 serotipos en histidina, solución salina, y PS-20 o PS-80, luego combinar este material mezclado con APA y solución salina con o sin preservativos antimicrobiales.

En modos realización particulares, la composición inmunógena multivalente comprende conjugados de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína en donde cada uno de los conjugados comprende un polisacárido de un serotipo de *S. pneumoniae* conjugado con una proteína portadora, en donde los serotipos de *S. pneumoniae* en los conjugados de polisacárido y proteína comprenden cualquiera de los conjuntos de serotipos establecidos en la presente, y además comprende 20- 80 mM de histidina de pH 5,8 y 150 mM de NaCl. En algunos modos de realización, la composición inmunógena multivalente también comprende de 0,2 % a 0,8 % p/v de polisorbato 20.

La elección de tensioactivo puede necesitar optimizarse para diferentes productos farmacológicos y sustancias farmacológicas. Para vacunas multivalentes que tienen 15 o más serotipos, se prefieren PS-20 y P188. La elección de la química usada para elaborar el conjugado también puede tener una función importante en la estabilización de la formulación. En particular, cuando las reacciones de conjugación usadas para preparar diferentes conjugados de polisacárido con proteína en una composición multivalente incluyen solvente acuoso y solvente DMSO, los sistemas de tensioactivos particulares proporcionan diferencias significativas en la estabilidad. La estabilidad mejorada de conjugados de polisacárido con proteína se observó con polisorbato 20 solo o con poloxámero 188 en combinación con un poliol.

El mecanismo exacto de cómo un detergente específico protege un producto bioterapéutico no está muy claro y no se puede predecir *a priori*. Los mecanismos de estabilización posibles incluyen hidratación preferencial, exclusión preferencial, competición de la interfaz aire/líquido entre producto bioterapéutico y superficie, tensión de la superficie, y/o asociación directa del detergente con el producto bioterapéutico para enmascarar los parches hidrófilos que sirven como semillas para la agregación.

También se puede usar poloxámero en las composiciones de la invención. Un poloxámero es un copolímero tribloque no iónico compuesto por una cadena hidrófoba central de polioxipropileno (poli(ácido de propileno)) flanqueada por dos cadenas hidrófilas de polioxietileno (poli(óxido de etileno)). Los poloxámeros también son conocidos por la marca Pluronic®. Dado que la longitud de los bloques de polímero se puede personalizar, existen muchos poloxámeros diferentes que tienen propiedades ligeramente diferentes. Para el término genérico "poloxámero", estos copolímeros generalmente se denominan con la letra "P" (de poloxámero) seguida de tres dígitos, los primeros dos dígitos x 100 indica la masa molecular aproximada del núcleo del polioxipropileno, y el último dígito x 10 indica el porcentaje de contenido de polioxietileno (por ejemplo, P407 = poloxámero con una masa molecular de polioxipropileno de 4.000 g/mol y un 70 % de contenido de polioxietileno). Para la marca Pluronic®, la codificación de estos copolímeros comienza con una letra para definir su forma física a temperatura ambiente (L = líquido, P = pasta, F = laminilla (sólido)) seguido de dos o tres dígitos. El primer dígito (dos dígitos en un número de tres dígitos) en la designación numérica, multiplicado por 300, indica el peso molecular aproximado del hidrófobo; y el último dígito x 10 indica el porcentaje de contenido de polioxietileno (por ejemplo, L61 = Pluronic® con una masa molecular de polioxipropileno de 1,800 g/mol y un 10 % de contenido de polioxietileno). Ver la patente estadounidense N.º 3740421.

Los ejemplos de poloxámeros tienen la Fórmula general:

$\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_b(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a\text{H}$, en donde los bloques a y b tienen los siguientes valores:

Pluronic®	Poloxámero	A	B	Peso molecular
L31		2	16	1100 (promedio)
L35				1900 (promedio)

L44NF	124	12	20	2090 a 2360
L64				2900 (promedio)
L81				2800 (promedio)
L121				4400 (promedio)
P123		20	70	5750 (promedio)
F68NF	188	80	27	7680 a 9510
F87NF	237	64	37	6840 a 8830
F108NF	338	141	44	12700 a 17400
F127NF	407	101	56	9840 a 14600

Las unidades de peso molecular, como se usan en la presente, están en Dalton (Da) o g/mol.

Preferentemente, el poloxámero en general tiene un peso molecular en el rango de 1100 a 17.400 Da, de 7.500 a 15.000 Da, o de 7.500 a 10.000 Da. El poloxámero se puede seleccionar de poloxámero 188 o poloxámero 407. La concentración final del poloxámero en las formulaciones es de 0,001 % a 5 % peso/volumen, o 0,025 % a 1 % peso/volumen. En determinados aspectos, el poliol es propilenglicol y está en una concentración final de 1 % a 20 % peso/volumen. En determinados aspectos, el poliol es polietilenglicol 400 y está en una concentración final de 1 % a 20 % peso/volumen.

Los polioles adecuados para las formulaciones de la invención son polioles poliméricos, particularmente, dioles de poliéter que incluyen, entre otros, propilenglicol y polietilenglicol, polietilenglicol monometil éteres. El propilenglicol está disponible en un rango de pesos moleculares de ~425 a ~2700. El polietilenglicol y el polietilenglicol monometil éter también está disponible en un rango de pesos moleculares de ~200 a ~35000 que incluye, entre otros, PEG200, PEG300, PEG400, PEG1000, PEG MME 550, PEG MME 600, PEG MME 2000, PEG MME 3350 y PEG MME 4000. Un polietilenglicol preferido es polietilenglicol 400. La concentración final del poliol en las formulaciones de la invención puede ser de 1 % a 20 % peso/volumen, o 6 % a 20 % peso/volumen.

La formulación también contiene una solución salina con pH amortiguado. El amortiguador se puede seleccionar, por ejemplo, del grupo que consiste en TRIS, acetato, glutamato, lactato, maleato, tartrato, fosfato, citrato, carbonato, glicinato, histidina, glicina, succinato, HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinotansulfónico), MOPS (ácido 3-(N-morfolino)propansulfónico), MES (ácido 2-(N-morfolino)etansulfónico) y amortiguador de trietanolamina. El amortiguador es capaz de amortiguar una solución a un pH en el rango de 4 a 10, 5,2 a 7,5, o 5,8 a 7,0. En determinado aspecto de la invención, el amortiguador se selecciona del grupo que consiste en fosfato, succinato, histidina, MES, MOPS, HEPES, acetato o citrato. Asimismo, el amortiguador se puede seleccionar, por ejemplo, de amortiguadores compatibles de acuerdo con USP para uso parenteral, en particular, cuando la formulación farmacéutica es para

uso parenteral. Las concentraciones de amortiguador variarán de 1 mM a 100 mM. Las concentraciones de amortiguador variarán de 10 mM a 80 mM. Las concentraciones de amortiguador variarán de 1 mM a 50 mM o 5 mM a 50 mM. En determinados aspectos, el amortiguador es histidina en una concentración final de 5 mM a 50 mM, o succinato a una
 5 concentración final de 1 mM a 10 mM. En determinados aspectos, la histidina está en una concentración final de 20 mM $\pm$ 2 mM.

Si bien se prefiere la solución salina (es decir, una solución que contiene NaCl), otras sales adecuadas para la formulación incluyen, entre otras, CaCl₂, KCl y MgCl₂ y combinaciones de estas. Se pueden usar agentes isotónicos no iónicos que incluyen, entre otros,
 10 sacarosa, trehalosa, manitol, sorbitol y glicerol en lugar de sal. Los rangos de sal adecuados incluyen, entre otros, 25 mM a 500 mM o 40 mM a 170 mM. En un aspecto, la solución salina es NaCl, opcionalmente presente en una concentración de 20 mM a 170 mM.

En un modo de realización preferida, las formulaciones comprenden un amortiguador de L-histidina con cloruro de sodio.

15 En otro modo de realización, la composición farmacéutica se administra en un sistema de liberación controlado. Por ejemplo, el agente se puede administrar mediante una infusión intravenosa, un parche transdérmico, liposomas u otros modos de administración. En otro modo de realización, se usan materiales poliméricos; por ejemplo, en microesferas o en un implante.

20 La cantidad de conjugado en cada dosis vacunal se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin efectos adversos significativos. Dicha cantidad puede variar según el serotipo neumocócico. En general, para los conjugados a base de polisacárido, cada dosis comprenderá de 0,08 a 100 μ g de cada polisacárido. En algunos modos de realización de la invención, la dosis de cada conjugado de polisacárido es de 0,08 a 10 μ g. En
 25 otros modos de realización, la dosis es de 1 a 5 μ g, de 0,4 a 4 μ g, de 0,4 a 3 μ g, de 0,4 a 2 μ g, o de 0,4 a 1 μ g. En algunos modos de realización, la dosis de uno o más conjugados de polisacárido es 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, o 750 ng o 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,75, 0,8, 0,9, 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7.5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 20, 22, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, o 100 μ g.

30 En algunos modos de realización de las composiciones de la invención, todos los conjugados de polisacárido están presentes en la composición en la misma cantidad. En otros modos de realización, los conjugados de polisacárido están presentes en la composición en diferentes cantidades (es decir, al menos un conjugado de polisacárido está presente en una cantidad que es diferente a uno o más de los otros conjugados de polisacárido de la
 35 composición).

Las cantidades óptimas de los componentes para una vacuna en particular se pueden determinar mediante estudios estándar que implican la observación de respuestas inmunitarias adecuadas en los sujetos. Por ejemplo, en otro modo de realización, la dosificación

para la vacunación de seres humanos se determina mediante extrapolación de estudios en animales a datos de seres humanos. En otro modo de realización, la dosificación se determina de manera empírica.

En un modo de realización, la dosis de la sal de aluminio es 10, 15, 20, 25, 30, 50, 70, 100, 125, 150, 200, 300, 500, o 700 µg, o 1, 1,2, 1,5, 2, 3, 5 mg o más. En otro modo de realización, la dosis de sal de aluminio descrita anteriormente es por µg de proteínas recombinantes.

Las composiciones de esta invención pueden también incluir una o más proteínas de *S. pneumoniae*. Los ejemplos de proteínas de *S. pneumoniae* adecuadas para inclusión incluyen aquellas identificadas en las publicaciones de solicitud de patente internacional N.º WO 02/083855 y WO 02/053761.

En algunos modos de realización, las composiciones de la invención se administran a un sujeto mediante uno o más métodos conocidos por el experto en la materia de nivel medio, tales como por vía parenteral, transmucosa, transdérmica, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intranasal, subcutánea, intraperitoneal, y se formulan de manera acorde. En un modo de realización, las composiciones de la presente invención se administran mediante inyección epidérmica, inyección intramuscular, intravenosa, intraarterial, inyección subcutánea, o inyección mucosa intrarespiratoria de una preparación líquida. Las formulaciones líquidas para inyección incluyen soluciones y similares.

III. Métodos de elaboración

Los polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* se pueden preparar mediante técnicas estándar conocidas por los expertos en la materia de nivel medio. Por ejemplo, los polisacáridos se pueden aislar de bacterias y se pueden dimensionar hasta cierto grado mediante métodos conocidos (ver, por ejemplo, las patentes europeas N.º EP497524 y EP497525); y, preferentemente, mediante microfluidización lograda usando un homogeneizador o mediante hidrólisis química. En un modo de realización, cada serotipo de polisacárido neumocócico se cultiva en un medio a base de soja. Luego, los polisacáridos individuales se purifican mediante etapas estándar que incluyen centrifugación, precipitación y ultrafiltración. Ver, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente estadounidense N.º 2008/0286838 y la patente estadounidense N.º 5.847.112. Los polisacáridos se pueden dimensionar con el fin de reducir la viscosidad en muestras de polisacáridos y/o de mejorar la capacidad de filtración para productos conjugados mediante el uso de técnicas tales como dimensionamiento mecánico o químico. La hidrólisis química se puede llevar a cabo usando ácido acético. El dimensionamiento mecánico se puede llevar a cabo mediante cizallamiento de homogeneización de alta presión.

Los polisacáridos purificados se pueden activar químicamente para hacer que los sacáridos sean capaces de reaccionar con la proteína portadora. Los polisacáridos purificados se pueden conectar a un ligador. Una vez activado o conectado a un ligador, cada polisacárido

capsular se conjuga por separado con una proteína portadora para formar un glicoconjugado. Los conjugados de polisacárido se pueden preparar mediante técnicas de acoplamiento conocidas.

El polisacárido se puede acoplar a un ligador para formar un intermediario polisacárido-ligador en el que el terminal libre del ligador es un grupo éster. El ligador es, por lo tanto, uno en el que al menos un terminal es un grupo éster. El otro terminal se selecciona de manera que pueda reaccionar con el polisacárido para formar el intermediario polisacárido-ligador.

El polisacárido se puede acoplar a un ligador mediante un grupo amina primario en el polisacárido. En este caso, el ligador generalmente tiene un grupo éster en ambos terminales. Esto permite que el acoplamiento tenga lugar al hacer reaccionar uno de los grupos éster con el grupo amina primario en el polisacárido mediante sustitución acilo nucleofílica. La reacción produce un intermediario polisacárido-ligador en el que el polisacárido se acopla al ligador mediante un enlace de amida. El ligador es, por lo tanto, un ligador bifuncional que proporciona un primer grupo éster para la reacción con el grupo amina primario en el polisacárido y un segundo grupo éster para la reacción con el grupo amina primario en la molécula portadora. Un ligador típico es diéster de N-hidroxisuccinimida y ácido adípico (SIDEA).

El acoplamiento también puede ocurrir indirectamente, es decir, con un ligador adicional que se usa para derivatizar el polisacárido antes del acoplamiento con el ligador.

El polisacárido se acopla al ligador adicional mediante un grupo carbonilo en el terminal reducido del polisacárido. Este acoplamiento comprende dos etapas: (a1) hacer reaccionar el grupo carbonilo con el ligador adicional; y (a2) hacer reaccionar el terminal libre del ligador adicional con el ligador. En estas modos realización, el ligador adicional generalmente tiene un grupo amina primario en ambos terminales, lo que permite que la etapa (a1) tenga lugar al hacer reaccionar uno de los grupos amina primarios con el grupo carbonilo en el polisacárido mediante aminación reductora. Se usa un grupo amina primario que es reactivo con el grupo carbonilo en el polisacárido. Son adecuados los grupos hidrazida o hidroxilamino. El mismo grupo amina primario está presente generalmente en ambos terminales del ligador adicional. La reacción produce un intermediario polisacárido-ligador adicional en el que el polisacárido se acopla al ligador adicional mediante un enlace C—N.

El polisacárido se puede acoplar al ligador adicional mediante un grupo diferente en el polisacárido, en particular, un grupo carboxilo. Este acoplamiento comprende dos etapas: (a1) hacer reaccionar el grupo con el ligador adicional; y (a2) hacer reaccionar el terminal libre del ligador adicional con el ligador. En este caso, el ligador adicional generalmente tiene un grupo amina primario en ambos terminales, lo que permite que la etapa (a1) tenga lugar al hacer reaccionar uno de los grupos amina primarios con el grupo carboxilo en el polisacárido mediante activación EDAC. Se usa un grupo amina primario que es reactivo con el grupo carboxilo activado por EDAC en el polisacárido. Un grupo hidrazida es adecuado. El mismo grupo amina

primario está presente generalmente en ambos terminales del ligador adicional. La reacción produce un intermediario polisacárido-ligador adicional en el que el polisacárido se acopla al ligador adicional mediante un enlace de amida.

En un modo de realización, la activación química de los polisacáridos y la posterior conjugación con la proteína portadora mediante aminación reductora se puede lograr por los medios descritos en las patentes estadounidenses N.º 4.365.170, 4.673.574 y 4.902.506, las publicaciones de solicitud de patente estadounidense N.º 2006/0228380, 2007/184072, 2007/0231340 y 2007/0184071, y WO2006/110381, WO2008/079653, y WO2008/143709). La química puede incluir la activación del polisacárido neumocócico mediante la reacción con cualquier agente de oxidación que oxide un grupo hidroxilo terminal con un aldehído, tal como periodato (que incluye periodato de sodio, periodato de potasio o ácido periódico). La reacción produce una escisión oxidativa aleatoria de grupos hidroxilo próximos de los carbohidratos con la formación de grupos aldehído reactivos.

El acoplamiento con la proteína portadora es por aminación reductora mediante aminación directa con los grupos lisilo de la proteína. Por ejemplo, la conjugación se puede llevar a cabo al hacer reaccionar una mezcla del polisacárido activado y la proteína portadora con un agente reductor tal como cianoborohidruro de sodio en presencia de níquel. La reacción de conjugación puede tener lugar en una solución acuosa o en presencia de DMSO. Ver, por ejemplo, US2015/0231270, US2011/0195086 y EP 0471 177 B1. Los aldehídos sin reaccionar luego se tapan con la adición de un agente reductor fuerte, tal como borohidruro de sodio.

La aminación reductora implica dos etapas, (1) oxidación del polisacárido para formar aldehídos reactivos, (2) reducción de la imina (base de Schiff) formada entre el polisacárido activado y una proteína portadora para formar un enlace conjugado de amina estable. Antes de la oxidación, opcionalmente el polisacárido se reduce en tamaño. Se pueden usar métodos mecánicos (por ejemplo, homogeneización) o hidrólisis química. La hidrólisis química se puede llevar a cabo usando ácido acético. La etapa de oxidación puede implicar la reacción con periodato. A los fines de la presente invención, el término "periodato" incluye tanto periodato como ácido periódico; el término también incluye metaperiodato (IO_4^-) y ortoperiodato (IO_6^-) e incluye las distintas sales de periodato (por ejemplo, periodato de sodio y periodato de potasio). En un modo de realización, el polisacárido capsular se oxida en presencia de metaperiodato, preferentemente, en presencia de periodato de sodio (NaIO_4). En otro modo de realización, el polisacárido capsular se oxida en presencia de ortoperiodato, preferentemente, en presencia de ácido periódico.

En un modo de realización, el agente oxidante es un compuesto de radical nitroxilo o nitróxido estable, tal como compuestos de piperidin-N-oxi o pirrolidin-N-oxi, en presencia de un oxidante para oxidar selectivamente hidroxilos primarios (como se describe en WO 2014/097099). En dicha reacción, el oxidante real es la sal de N-oxoamonio, en un ciclo catalítico. En un aspecto, dicho compuesto de radical nitroxilo o nitróxido estable son

compuestos de piperidin-N-oxi o pirrolidin-N-oxi. En un aspecto, dicho compuesto de radical nitroxilo o nitróxido estable tiene una porción TEMPO (2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi) o PROXYL (2,2,5,5-tetrametil-1-pirrolidiniloxi). En un aspecto, dicho compuesto de radical nitroxilo estable es TEMPO o un derivado de este. En un aspecto, dicho oxidante es una

5 molécula que tiene una porción N-halo. En un aspecto, dicho oxidante se selecciona del grupo que consiste en N-clorosuccinimida, N-bromosuccinimida, N-iodosuccinimida, ácido dicloroisocianúrico, 1,3,5-tricloro-1,3,5-triazinan-2,4,6-triona, ácido dibromoisocianúrico, 1,3,5-tribromo-1,3,5-triazinan-2,4,6-triona, ácido diiodoisocianúrico y 1,3,5-triiodo-1,3,5-triazinan-2,4,6-triona. Preferentemente, dicho oxidante es N-clorosuccinimida.

10 En determinados aspectos, el agente oxidante es un radical libre 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi (TEMPO) y N-clorosuccinimida (NCS) como cooxidante (como se describe WO 2014/097099). Por lo tanto, en un aspecto, los glicoconjugados de *S. pneumoniae* se puede obtener mediante un método que comprende las etapas de: a) hacer reaccionar un sacárido con 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi (TEMPO) y N-clorosuccinimida (NCS) en un solvente acuoso

15 para producir un sacárido activado; y b) hacer reaccionar el sacárido activado con una proteína portadora que comprende uno o más grupos amina (dicho método se menciona en adelante como “aminación reductora de TEMPO/NCS”).

Opcionalmente, la reacción de oxidación se inactiva mediante la adición de un agente de inactivación. El agente de inactivación se puede seleccionar de dioles próximos, 1-, 2-

20 aminoalcoholes, aminoácidos, glutatión, sulfito, bisulfato, ditionito, metabisulfito, tiosulfato, fosfitos, hipofosfitos o ácido fosforoso (tal como glicerol, etilenglicol, propan-1-,2-diol, butan-1,2-diol o butan-2,3-diol, ácido ascórbico).

En algunos modos de realización, la presente invención proporciona un método para preparar un conjugado de polisacárido de *Streptococcus pneumoniae* con proteína de

25 serotipo 8 que utiliza una reacción de conjugación en un solvente aprótico, en donde la reacción de conjugación no usa cianoborohidruro. En otros modos de realización, la reacción de conjugación es una reducción de base de Schiff o aminación reductora. En otros modos de realización, la proteína es toxoide tetánico, toxoide diftérico, o CRM197. En otros modos de realización, la proteína es CRM197. En otros modos de realización, la reacción de conjugación

30 es una aminación reductora. En otros modos de realización, la aminación reductora se lleva a cabo en dimetilsulfóxido (DMSO).

En algunos modos de realización, los polisacáridos oxidados antes de la conjugación tienen un peso molecular entre 30 kDa y 1.000 kDa. El peso molecular se puede calcular mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) combinada con un detector de

35 dispersión de luz multiángulo (MALS) y un detector de índice de refracción (RI). En algunos modos de realización, el polisacárido tiene un peso molecular entre 50 kDa y 300 kDa. En algunos modos de realización, el polisacárido tiene un peso molecular entre 50 kDa y 1.000 kDa. En modos realización adicionales, el polisacárido tiene un peso molecular entre 70 kDa y 900

kDa. En otros modos de realización, el polisacárido tiene un peso molecular entre 100 kDa y 800 kDa. En otros modos de realización, el polisacárido tiene un peso molecular entre 200 kDa y 600 kDa. En otros modos de realización, el polisacárido tiene un peso molecular de 100 kDa a 1.000 kDa; 100 kDa a 900 kDa; 100 kDa a 800 kDa; 100 kDa a 700 kDa; 100 kDa a 600 kDa; 100 kDa a 500 kDa; 100 kDa a 400 kDa; 100 kDa a 300 kDa; 150 kDa a 1,000 kDa; 150 kDa a 900 kDa; 150 kDa a 800 kDa; 150 kDa a 700 kDa; 150 kDa a 600 kDa; 150 kDa a 500 kDa; 150 kDa a 400 kDa; 150 kDa a 300 kDa; 200 kDa a 1,000 kDa; 200 kDa a 900 kDa; 200 kDa a 800 kDa; 200 kDa a 700 kDa; 200 kDa a 600 kDa; 200 kDa a 500 kDa; 200 kDa a 400 kDa; 200 kDa a 300; 250 kDa a 1,000 kDa; 250 kDa a 900 kDa; 250 kDa a 800 kDa; 250 kDa a 700 kDa; 250 kDa a 600 kDa; 250 kDa a 500 kDa; 250 kDa a 400 kDa; 250 kDa a 350 kDa; 300 kDa a 1,000 kDa; 300 kDa a 900 kDa; 300 kDa a 800 kDa; 300 kDa a 700 kDa; 300 kDa a 600 kDa; 300 kDa a 500 kDa; 300 kDa a 400 kDa; 400 kDa a 1,000 kDa; 400 kDa a 900 kDa; 400 kDa a 800 kDa; 400 kDa a 700 kDa; 400 kDa a 600 kDa; 500 kDa a 600 kDa.

La segunda etapa del proceso de conjugación es la reducción del enlace de imina (base de Schiff base) entre el polisacárido activado y una proteína portadora para formar un enlace de conjugado estable (denominada aminación reductora), usando un agente reductor. Los agentes reductores adecuados incluyen los cianoborohidruros (tales como cianoborohidruro de sodio o borohidruro de sodio). En un modo de realización, el agente reductor es cianoborohidruro.

En algunos modos de realización, la reacción de aminación reductora se lleva a cabo en solvente aprótico (o una mezcla de solventes apróticos). En un modo de realización, la reacción de reducción se lleva a cabo en solvente DMSO o DMF (dimetilformamida). El solvente DMSO o DMF se puede usar para reconstituir el polisacárido activado y la proteína portadora, si se liofiliza. En un modo de realización, el solvente aprótico es DMSO.

Al final de la reacción de reducción, puede haber grupos aldehído sin reaccionar restantes en los conjugados, que se pueden terminar usando un agente de terminación adecuado. En un modo de realización, este agente de terminación es borohidruro de sodio (NaBH_4). Las alternativas adecuadas incluyen triacetoxiborohidruro de sodio o borohidruro de sodio o zinc en presencia de ácidos de Bronsted o Lewis), amina boranos tales como piridina borano, 2-picolina borano, 2,6-diborano-metanol, dimetilamina-borano, t-BuMe'PrN- BH_3 , bencilamina- BH_3 o 5-etil-2-metilpiridina borano (PEMB) o resina de intercambio de borohidruro. Después de la conjugación (la reacción de reducción y, opcionalmente, la terminación), los glicoconjugados se pueden purificar (enriquecer con respecto a la cantidad de conjugado de polisacárido-proteína) mediante una variedad de técnicas conocidas para el experto en la materia de nivel medio. Estas técnicas incluyen diálisis, operaciones de concentración/diafiltración, filtración de flujo tangencial, precipitación/elución, cromatografía de columna (cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de intercambio iónico multimodal, DEAE, o cromatografía de interacción hidrófoba) y filtración de profundidad. En un modo de realización, los glicoconjugados se

purifican mediante diafiltración o cromatografía de intercambio iónico o cromatografía de exclusión por tamaño.

Los glicoconjugados que se preparan mediante aminación reductora en un solvente aprótico generalmente se usan en vacunas neumocócicas conjugadas multivalentes. De este modo, en algunos modos de realización para composiciones multivalente en donde no todos los serotipos se preparan en un solvente aprótico, la reacción de reducción para los serotipos restantes se lleva a cabo en un solvente acuoso (por ejemplo, seleccionado de PBS (solución salina amortiguada con fosfato), MES (ácido 2-(*N*-morfolino)etansulfónico), HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetansulfónico), Bis-tris, ADA (ácido *N*-(2-acetamido)iminodiacético), PIPES (ácido piperazin-*N,N'*-bis(2-etansulfónico)), MOPSO (ácido 3-morfolino-2-hidroxipropansulfónico), BES (ácido *N,N*-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetansulfónico), MOPS (ácido 3-(*N*-morfolino)propansulfónico), DIPSO (ácido 3-bis(2-hidroxietil) amino-2-hidroxipropan-1-sulfónico), MOBS (ácido 4-(*N*-morfolino)butansulfónico), HEPPSO (ácido *N*-(2-hidroxietil)piperazin-*N*-(2-hidroxipropansulfónico)), POPSO (ácido piperazin-1,4-bis(2-hidroxietil)-3-propansulfónico)), TEA (trietanolamina), EPPS (ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-propanesulfónico), bicina a un pH entre 6,0 y 8,5, 7,0 y 8,0, o 7,0 y 7,5).

Los conjugados de polisacárido capsular de *S. pneumonia* con proteína que se pueden preparar mediante aminación reductora en un solvente aprótico, incluyen, entre otros, serotipos: 3, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 31, 33F, 35B y 39. Los conjugados de polisacárido capsular de *S. pneumonia* con proteína que se pueden preparar mediante aminación reductora en un solvente aprótico, incluyen, entre otros, serotipos: 3, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 31, 33F, 35B, y 39. Los conjugados de polisacárido capsular de *S. pneumonia* con proteína que se pueden preparar mediante aminación reductora en un solvente aprótico, incluyen, entre otros, serotipos: 3, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 19A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 31, 33F, 35B, y 39. Los polisacáridos se pueden usar en forma de oligosacáridos. Estos se forman convenientemente mediante fragmentación de polisacárido purificado (por ejemplo, mediante hidrólisis), y luego generalmente purificación de los fragmentos del tamaño deseado.

En algunos modos de realización, los conjugados de polisacárido neumocócico con proteína de uno o más de los serotipos 3, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 31, 33F, 35B y 39 se preparan mediante aminación reductora en un solvente aprótico. En algunos modos de realización, los conjugados de polisacárido neumocócico con proteína de uno o más de los serotipos 3, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 31, 33F, 35B y 39 se preparan mediante aminación reductora en un solvente aprótico. En algunos modos de realización, los conjugados de polisacárido neumocócico con proteína de uno o más de los serotipos 3, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 19A, 20B, 22F,

23A, 23B, 23F, 24F, 31, 33F, 35B y 39 se preparan mediante aminación reductora en un solvente aprótico. En algunos modos de realización, cada uno de los serotipos en la composición inmunógena multivalente se prepara mediante aminación reductora en un solvente aprótico. En algunos modos de realización, los polisacáridos de uno o más serotipos en una composición multivalente se conjugan mediante aminación reductora en un solvente aprótico y los polisacáridos de uno o más serotipos se conjugan mediante aminación reductora en un solvente acuoso. En algunos modos de realización, los polisacáridos de uno o más serotipos en una composición multivalente se conjugan mediante aminación reductora en un solvente aprótico. En otros modos de realización, los polisacáridos de 3 o más, 4 más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 11 o más, 12 o más, 13 o más, 14 o más, 15 o más, 16 o más, 17 o más, 18 o más, 19 o más, 20 o más, o 21 o más serotipos en una composición multivalente se conjugan mediante aminación reductora en un solvente aprótico. En algunos modos de realización, los polisacáridos de uno o más serotipos en una composición multivalente se conjugan mediante otras químicas que pueden ser en un solvente aprótico o en un solvente acuoso.

De este modo, la invención se refiere a una composición inmunógena multivalente que comprende conjugados múltiples de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína, en donde cada uno comprende un polisacárido capsular de un serotipo de *S. pneumoniae* conjugado con una proteína portadora, en donde los serotipos de *S. pneumoniae* son como se describen en la presente (es decir, en la sección II, “Composiciones inmunógenas multivalentes”), en donde la reacción de conjugación en la que el polisacárido de uno o más de los conjugados de polisacárido con proteína se conjugan con la proteína portadora es en un solvente aprótico. En algunos modos de realización, al menos 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, o 100 % de los serotipos en una composición multivalente se preparan en un solvente aprótico. El resto de los serotipos se preparan mediante una química alternativa y/o en un solvente acuoso.

Se determinó que el uso de DMSO como un solvente durante la aminación reductora de los conjugados de polisacárido-proteína genera una estabilidad inesperadamente superior y una inmunogenicidad mejorada para aquellos serotipos relacionados a los mismos conjugados preparados en condiciones acuosas (ver las solicitudes estadounidenses con N.º de acta 62/463.216 y 62/555.444). Como se muestra en la presente (ver Ejemplo 40), las formulaciones de los productos farmacológicos que contienen los conjugados neumocócicos de la invención que se preparan mediante aminación reductora en un solvente aprótico (por ejemplo, DMSO) tuvieron como resultado una estabilidad física y química superior en comparación con una vacuna que utiliza sustancias farmacológicas que se preparan usando un solvente prótico (es decir, acuoso) durante aminación reductora en proceso de conjugación. Por lo tanto, en algunos modos de realización, todos los conjugados de polisacáridos neumocócicos en la composición multivalente se preparan en un solvente aprótico.

En algunos modos de realización de la invención, la concentración total de polisacárido en la composición es de alrededor de 0,02 a alrededor de 0,175 mg/ml. En algunos modos de realización de la invención, la concentración total de polisacárido en la composición es de alrededor de 0,03 a alrededor de 0,175 mg/ml. En algunos modos de realización de la invención, la concentración total de polisacárido en la composición es de alrededor de 0,04 a alrededor de 0,175 mg/ml. En otros modos de realización, la concentración total de polisacárido en la composición es de alrededor de 0,065 a alrededor de 0,085 mg/ml, alrededor de 0,070 a alrededor de 0,080 mg/ml, alrededor de 0,065 a alrededor de 0,080 mg/ml, alrededor de 0,070 a alrededor de 0,085 mg/ml, alrededor de 0,110 a alrededor de 0,128 mg/ml, alrededor de 0,110 a alrededor de 0,175 mg/ml, alrededor de 0,10 a alrededor de 0,175 mg/ml, alrededor de 0,110 a alrededor de 0,170 mg/ml, alrededor de 0,115 a alrededor de 0,15 mg/ml, alrededor de 0,110 a alrededor de 0,15 mg/ml, alrededor de 0,110 a alrededor de 0,125 mg/ml, alrededor de 0,150 a alrededor de 0,170 mg/ml, alrededor de 0,150 a alrededor de 0,165 mg/ml, alrededor de 0,140 a alrededor de 0,170 mg/ml, alrededor de 0,130 a alrededor de 0,170 mg/ml, alrededor de 0,150 a alrededor de 0,175 mg/ml, alrededor de 0,070 a alrededor de 0,170 mg/ml, alrededor de 0,065 a alrededor de 0,175 mg/ml, o alrededor de 0,065 a alrededor de 0,180 mg/ml.

En modos realización de la invención en donde uno o más, o la totalidad, de los conjugados de polisacárido-proteína en las composiciones inmunógenas multivalentes se preparan en un solvente aprótico, la concentración total de polisacárido en la composición es estable durante 4 semanas o más a 37 °C, 4 semanas o más a 25 °C, y 12 semanas o más a 4 °C.

En algunos modos de realización de la invención en donde uno o más, o la totalidad, de los conjugados de polisacárido-proteína en las composiciones inmunógenas multivalentes se preparan en un solvente aprótico, el peso molecular promedio en peso (Mw) de la totalidad de los conjugados de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína en la composición (promedio de todos los conjugados en la composición) es de alrededor de 3500 a alrededor de 4.700 kDa, de alrededor de 3500 a alrededor de 4.600 kDa, de alrededor de 3500 a alrededor de 4.500 kDa, de alrededor de 3500 a alrededor de 4.400 kDa, de alrededor de 3500 a alrededor de 4.300 kDa, de alrededor de 3500 a alrededor de 4.200 kDa, de alrededor de 3600 a alrededor de 4.700 kDa, de alrededor de 3600 a alrededor de 4.600 kDa, de alrededor de 3600 a alrededor de 4.500 kDa, de alrededor de 3600 a alrededor de 4.400 kDa, de alrededor de 3600 a alrededor de 4.300 kDa, de alrededor de 3600 a alrededor de 4.200 kDa, de alrededor de 3700 a alrededor de 4.700 kDa, de alrededor de 3700 a alrededor de 4.600 kDa, de alrededor de 3700 a alrededor de 4.500 kDa, de alrededor de 3700 a alrededor de 4.400 kDa, de alrededor de 3700 a alrededor de 4.300 kDa, de alrededor de 3700 a alrededor de 4.200 kDa, de alrededor de 3800 a alrededor de 4.700 kDa, de alrededor de 3800 a alrededor de 4.600 kDa, de alrededor de 3800 a alrededor de 4.500 kDa, de alrededor de 3800 a alrededor de 4.400 kDa, de alrededor de 3800 a alrededor de 4.300 kDa, de alrededor de 3800 a alrededor de 4.200 kDa, de alrededor de 3900 a alrededor de 4.700 kDa, de alrededor de 3900 a alrededor de 4.600 kDa, de alrededor de 3900 a alrededor de

4.500 kDa, de alrededor de 3900 a alrededor de 4.400 kDa, de alrededor de 3900 a alrededor de 4.300 kDa, o de alrededor de 3900 a alrededor de 4.200 kDa.

En algunos modos de realización de la invención en donde los conjugados de polisacárido-proteína en las composiciones inmunógenas multivalentes se preparan en un solvente aprótico, el Mw de cada uno de los conjugados de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína en la composición (para un solo serotipo) es de alrededor de 1.000 a alrededor de 10.000 kDa, de alrededor de 1.500 a alrededor de 5.500 kDa, de alrededor de 1.500 a alrededor de 5.600 kDa, de alrededor de 1.500 a alrededor de 5.700 kDa, de alrededor de 1.500 a alrededor de 5.800 kDa, de alrededor de 1.500 a alrededor de 5.900 kDa, de alrededor de 1500 a alrededor de 6.000 kDa, de alrededor de 1.000 a alrededor de 5.500 kDa, de alrededor de 1.000 a alrededor de 5.000 kDa, de alrededor de 1.000 a alrededor de 4.000 kDa, de alrededor de 1.000 a alrededor de 4.500 kDa, de alrededor de 1.000 a alrededor de 4.000 kDa, o de alrededor de 1.000 a alrededor de 3.500 kDa. En otros modos de realización, el Mw de un conjugado de un solo serotipo dentro de la composición es de alrededor de 1.000 kDa, alrededor de 1.100 kDa, alrededor de 1.200 kDa, alrededor de 1.300 kDa, alrededor de 1.400 kDa, alrededor de 1.500 kDa, alrededor de 1.600 kDa, alrededor de 1.700 kDa, alrededor de 1.800 kDa, alrededor de 1.900 kDa, alrededor de 2.000 kDa, alrededor de 2.100 kDa, alrededor de 2.200 kDa, alrededor de 2.300 kDa, alrededor de 2.400 kDa, alrededor de 2.500 kDa, alrededor de 2.600 kDa, alrededor de 2.700 kDa, alrededor de 2.800 kDa, alrededor de 2.900 kDa, alrededor de 3.000 kDa, alrededor de 3.100 kDa, alrededor de 3.200 kDa, alrededor de 3.300 kDa, alrededor de 3.400 kDa, alrededor de 3.500 kDa, alrededor de 3.600 kDa, alrededor de 3.700 kDa, alrededor de 3.800 kDa, alrededor de 3.900 kDa, alrededor de 4.000 kDa, alrededor de 4.100 kDa, alrededor de 4.200 kDa, alrededor de 4.300 kDa, alrededor de 4.400 kDa, alrededor de 4.500 kDa, alrededor de 4.600 kDa, alrededor de 4.700 kDa, alrededor de 4.800 kDa, alrededor de 4.900 kDa, alrededor de 5.000 kDa, alrededor de 5.100 kDa, alrededor de 5.200 kDa, alrededor de 5.300 kDa, alrededor de 5.400 kDa, o alrededor de 5.500 kDa.

En algunos modos de realización de la invención los conjugados de polisacárido-proteína en las composiciones inmunógenas multivalentes se preparan en un solvente aprótico. Se prefieren las composiciones que contienen porcentajes mayores de polisacáridos de *S. pneumoniae* conjugados con una proteína portadora en un solvente aprótico (en contraposición a prepararse en solvente prótico). En algunos modos de realización, el porcentaje (según lo calculado por la cantidad de serotipos de polisacárido en un solvente aprótico dividido por la cantidad total de serotipos de polisacárido, en donde la cantidad total incluye aquellos preparados en un solvente aprótico o un solvente prótico) de conjugados de *S. pneumoniae* serotipo específico preparados en un solvente aprótico puede ser mayor de 50 %, o mayor de 60 %, o mayor de 70 %, o mayor de 80 %, o mayor de 90 % o ser 100 %.

En algunos modos de realización de la invención, el conjugado de polisacárido-proteína de serotipo 3 en la composición se prepara en un solvente aprótico y el Mw de dicho

conjugado es de alrededor de 1.000 a alrededor de 5.000 kDa, o de alrededor de 1.000 a alrededor de 4.000 kDa, o, de alrededor de 1.000 a alrededor de 3.000 kDa, o de alrededor de 1.000 a alrededor de 2.500 kDa, o de alrededor de 1.000 a alrededor de 2.000 kDa.

En algunos modos de realización de la invención en donde uno o más, o la totalidad, de los conjugados de polisacárido-proteína en las composiciones inmunógenas multivalentes se preparan en un solvente aprótico, el peso molecular promedio en número (Mn) de los conjugados de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína en la composición (promedio de todos los conjugados en la composición) es de alrededor de 900 a alrededor de 3.000 kDa, de alrededor de 1.000 a alrededor de 3.000 kDa, de alrededor de 1.000 a alrededor de 2.500 kDa, de alrededor de 1.500 a alrededor de 2.500 kDa, de alrededor de 1.800 a alrededor de 2.500 kDa, de alrededor de 1.900 a alrededor de 2.500 kDa, o de alrededor de 2.000 a alrededor de 2.500 kDa.

En algunos modos de realización de la invención en donde uno o más, o la totalidad, de los conjugados de polisacárido-proteína en las composiciones inmunógenas multivalentes se preparan en un solvente aprótico, el Mn de cada uno de los conjugados de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína en la composición (para un solo serotipo) es de alrededor de 700 a alrededor de 7.000 kDa, de alrededor de 1000 a alrededor de 6.000 kDa, de alrededor de 1000 a alrededor de 5.000 kDa, de alrededor de 1000 a alrededor de 4.000 kDa, de alrededor de 1000 a alrededor de 3.000 kDa, de alrededor de 900 a alrededor de 5.500 kDa, de alrededor de 900 a alrededor de 5.000 kDa, de alrededor de 900 a alrededor de 4.500 kDa, de alrededor de 900 a alrededor de 4.000 kDa, de alrededor de 900 a alrededor de 3.500 kDa, o de alrededor de 900 a alrededor de 3.000 kDa.

En modos realización de la invención, el Mw y/o Mn de los conjugados de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína en la composición es estable durante 4 semanas o más a 37 °C, 4 semanas o más a 25°C, y/o 12 semanas o más a 4 °C.

En modos realización de la invención, la concentración de polisacárido, Mw, y/o Mn se determinan mediante HPSEC UV/MALS/RI.

En algunos modos de realización de la invención, en donde uno o más, o la totalidad, de los conjugados de polisacárido-proteína en las composiciones inmunógenas multivalentes se preparan en un solvente aprótico, la máxima emisión de la composición medida usando espectroscopia de fluorescencia intrínseca de proteínas con una longitud de onda de excitación en 280 nanómetros (nm) es de alrededor de 335 nm a alrededor de 342 nm. En algunos modos de realización, la emisión máxima se mantiene en alrededor de 335 nm a alrededor de 342 nm y la intensidad de fluorescencia es estable durante al menos 1 semana a 37 °C. En algunos modos de realización, la máxima emisión se mantiene en alrededor de 335 nm a alrededor de 342 nm y la intensidad de fluorescencia es estable durante 1 semana a 37 °C.

En algunos modos de realización, todos los conjugados de polisacáridos neumocócicos en la composición multivalente se preparan mediante aminación reductora en

DMSO. En determinados submodos de realización, la composición multivalente comprende conjugados de polisacárido que se prepararon mediante DMSO no comprende un adyuvante.

Sin limitarse a ninguna teoría, un posible mecanismo para la inmunogenicidad mejorada observada en los glicoconjugados preparados en DMSO incluye una mayor cantidad de enlaces entre el carbohidrato (polisacárido capsular) y los residuos de lisina en la superficie de la proteína portadora que generaría puntos de unión adicionales entre la proteína y el polisacárido para impartir estabilidad y contrarrestar la depolimerización química o la degradación del enlace de péptido y carbohidrato. Ver, por ejemplo, Hsieh, Characterization of Saccharide-CRM197 Conjugate Vaccines in Brown F, Corbel M, Griffiths E (eds): Physico-Chemical Procedures for the Characterization of Vaccines. Dev. Biol. Basel, Karger, 2000, vol 103, pp. 93-104. Un beneficio adicional de los enlaces de polisacárido-proteína aumentados que se crean durante la conjugación en el solvente DMSO podrían ser posibilidades adicionales para la presentación exitosa de péptido-carbohidrato a los linfocitos T. Cabe destacar que debido a que la variabilidad genética en la población humana genera diversas capacidades y sensibilidades de carga o se asocia con secuencias de péptidos específicos conjugados con antígenos de carbohidrato, esos puntos de unión adicionales en la proteína portadora permitirían mayores posibilidades para la presentación exitosa de antígeno en la superficie de una célula presentadora de antígeno (APC) para permitir una respuesta dependiente de linfocitos T a un antígeno de otro modo independiente de los linfocitos T. Otro mecanismo posible de inmunogenicidad mejorada observado por la conjugación en el solvente DMSO puede ser debido a la desnaturalización de CRM197 en solvente orgánico, que exhibe lisinas adicionales para enlaces de polisacárido que dan mayores posibilidades para la presentación de glicopéptidos en la superficie de un APC para una respuesta dependiente de linfocitos a diferentes epítomos de péptido. Ver Avci *et al.*, 2011, Nature Medicine 17: 1602-1610.

Otro beneficio de la conjugación en un solvente orgánico que genera CRM197 desnaturalizado en los conjugados puede ser una interferencia inmunológica reducida de anticuerpos contra epítomos CRM197 nativos. Otro beneficio de los enlaces de polisacárido-proteína aumentados que se crean durante la conjugación en el solvente DMSO podría ser la formación de conjugados de polisacárido con proteína de mayor tamaño que producen una inmunogenicidad mejorada. Se cree que las composiciones de la invención brindan ventajas significativas para provocar una respuesta inmunitaria.

En algunos modos de realización, la reacción de conjugación se lleva a cabo mediante aminación reductora en donde se usa níquel para una mayor eficacia en la reacción de conjugación y para ayudar en la eliminación de cianuro libre. Se sabe que los metales de transición forman complejos estables con cianuro y mejoran la metilación reductiva de grupos amino de proteínas y formaldehído con cianoborohidruro de sodio (S Gidley *et al.*, *Biochem J.* 1982, 203: 331-334; Jentoft *et al.* *Anal Biochem.* 1980, 106: 186-190). Al llevar a cabo la complejación del cianuro inhibidor residual, la adición de níquel aumenta el consumo de proteína

durante la conjugación y genera la formación de conjugados más grandes y potencialmente más inmunógenos.

Las diferencias en los niveles de cianuro iniciales en lotes de reactivos de cianoborohidruro de sodio también generan un rendimiento de conjugación inconsistente, lo que genera atributos de producto variables, tales como tamaño del conjugado y relación de conjugado de Ps con respecto a CRM197. La adición de níquel redujo la inconsistencia en la conjugación al llevar a cabo la complejación del cianuro, eliminando las diferencias en los lotes de cianoborohidruro de sodio.

Las químicas alternativas adecuadas incluyen la activación del sacárido con tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino piridinio (CDAP) para formar un éster de cianato. De este modo, el sacárido activado se puede acoplar directamente o mediante un grupo espaciador (ligador) a un grupo amino en la proteína portadora. Por ejemplo, el espaciador podría ser cistamina o cisteamina para obtener un polisacárido tiolado que se podría acoplar con el portador mediante un enlace de tioéter obtenido después de la reacción con una proteína portadora activada por maleimida (por ejemplo, usando GMBS) o una proteína portadora haloacetilada (por ejemplo, usando iodoacetimida [por ejemplo, etil iodoacetimida HCl] o N-succinimidil bromoacetato o SIAB, o SIA, o SBAP). Preferentemente, el éster de cianato (opcionalmente elaborado mediante química de CDAP) se acopla con hexanodiamina o ácido adípico dihidrazida (ADH) y el sacárido derivatizado de amino se conjuga con la proteína portadora usando química de carbodiimida (por ejemplo, EDAC o EDC) mediante un grupo carboxilo en la proteína portadora. Tales conjugados se describen en las publicaciones de solicitud de patente internacional N.º WO 93/15760, WO 95/08348 y WO 96/29094; y Chu *et al.*, 1983, Infect. Immunity 40:245-256.

Otras técnicas adecuadas usan carbodiimidas, hidrazidas, ésteres activos, norborano, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S--NHS, EDC, TSTU. Muchas se describen en la publicación de solicitud de patente internacional N.º WO 98/42721. La conjugación puede incluir un enlace carbonilo que se puede formar mediante la reacción de un grupo hidroxilo libre del sacárido con CDI (ver Bethell *et al.*, 1979, J. Biol. Chem. 254:2572-4; Hearn *et al.*, 1981, J. Chromatogr. 218:509-18), y luego, la reacción con una proteína para formar un enlace carbamato. Esto puede implicar la reducción del terminal anomérico a un grupo hidroxilo primario, la protección/desprotección opcional del grupo hidroxilo primario, la reacción del grupo hidroxilo primario con CDI para formar un intermediario carbamato CDI y el acoplamiento del intermediario carbamato CDI con un grupo amino en una proteína.

Después de la conjugación del polisacárido capsular con la proteína portadora, los conjugados de polisacárido-proteína se purifican (se enriquecen con respecto a la cantidad de conjugado de polisacárido-proteína) mediante una o más de una variedad de técnicas. Los ejemplos de estas técnicas son conocidos para el experto en la materia de nivel medio e incluyen operaciones de concentración/diafiltración, ultrafiltración, precipitación/elución, cromatografía

de columna, y filtración de profundidad. Ver, por ejemplo, la patente estadounidense N.º 6.146.902.

Después de purificar los glicoconjugados, estos se combinan para formular la composición inmunógena de la presente invención. Estos conjugados neumocócicos se preparan mediante procesos separados y se formulan a granel en una formulación de dosis única.

Un método alternativo para caracterizar los glicoconjugados de la invención es según la cantidad de residuos de lisina en la proteína portadora (por ejemplo, CRM197) que se conjugan con el sacárido que se puede caracterizar como un rango de lisinas conjugadas (grado de conjugación). Las pruebas para la modificación de lisina de la proteína portadora, debido a los enlaces covalentes con los polisacáridos, se puede obtener mediante análisis de aminoácidos usando métodos de rutina conocidos por los expertos en la materia de nivel medio. La conjugación genera una reducción de la cantidad de residuos de lisina recuperados, en comparación con el material de inicio de la proteína portadora usado para generar los materiales conjugados. En un modo de realización preferida, el grado de conjugación del glicoconjugado de la invención es entre 2 y 15, entre 2 y 13, entre 2 y 10, entre 2 y 8, entre 2 y 6, entre 2 y 5, entre 2 y 4, entre 3 y 15, entre 3 y 13, entre 3 y 10, entre 3 y 8, entre 3 y 6, entre 3 y 5, entre 3 y 4, entre 5 y 15, entre 5 y 10, entre 8 y 15, entre 8 y 12, entre 10 y 15 o entre 10 y 12. En un modo de realización, el grado de conjugación del glicoconjugado de la invención es de alrededor de 2, alrededor de 3, alrededor de 4, alrededor de 5, alrededor de 6, alrededor de 7, alrededor de 8, alrededor de 9, alrededor de 10, alrededor de 11, alrededor de 12, alrededor de 13, alrededor de 14 o alrededor de 15. En un modo de realización preferida, el grado de conjugación del glicoconjugado de la invención es entre 4 y 7. En algunas de tales modos realización, la proteína portadora es CRM197.

Los glicoconjugados de las composiciones de la invención también se pueden caracterizar por la relación (peso/peso) del sacárido con respecto a la proteína portadora (Ps:Pr). En algunos modos de realización, la relación del polisacárido con respecto a la proteína portadora de los glicoconjugados (p/p) en la composición es entre 0,5 y 3,0 (por ejemplo, alrededor de 0,5, alrededor de 0,6, alrededor de 0,7, alrededor de 0,8, alrededor de 0,9, alrededor de 1,0, alrededor de 1,1, alrededor de 1,2, alrededor de 1,3, alrededor de 1,4, alrededor de 1,5, alrededor de 1,6, alrededor de 1,7, alrededor de 1,8, alrededor de 1,9, alrededor de 2,0, alrededor de 2,1, alrededor de 2,2, alrededor de 2,3, alrededor de 2,4, alrededor de 2,5, alrededor de 2,6, alrededor de 2,7, alrededor de 2,8, alrededor de 2,9, o alrededor de 3,0). En otros modos de realización, la relación de sacárido con respecto a proteína portadora (p/p) es entre 0,5 y 2,5, entre 0,5 y 1,5, entre 0,8 y 2,5, entre 0,5 y 1,0, entre 1,0 y 1,5, entre 1,0 y 2,0, entre 0,8 y 2,4, entre 0,8 y 2,3, entre 0,8 y 2,2, entre 0,8 y 2,1, entre 0,8 y 2,0, entre 0,8 y 1,9, entre 0,8 y 1,8, entre 0,8 y 1,7, entre 0,8 y 1,6, entre 0,8 y 1,5, entre 0,8 y 1,4, entre 0,8 y 1,3, entre 0,9 y 2,4, entre 0,9 y 2,3, entre 0,9 y 2,2, entre 0,9 y 2,1, entre 0,9 y 2,0, entre 0,9 y 1,9, entre 0,9 y 1,8, entre 0,9 y 1,7, entre 0,9 y 1,6, entre 0,9 y 1,5, entre 0,9 y 1,4, entre 0,9 y 1,3, entre 0,9 y 1,2,

entre 1,0 y 2,4, entre 1,0 y 2,3, entre 1,0 y 2,2, entre 1,0 y 2,1, entre 1,0 y 2,0, entre 1,0 y 1,9, entre 1,0 y 1,8, entre 1,0 y 1,7, entre 1,0 y 1,6, entre 1,0 y 1,5, entre 1,0 y 1,4, entre 1,0 y 1,3 o entre 1,0 y 1,2. En otros modos de realización, la relación (p/p) del sacárido con respecto a la proteína portadora es entre 0,8 y 1,2. En algunos de tales modos de realización, la proteína portadora es CRM197. Los glicoconjugados y las composiciones inmunógenas de la invención pueden contener sacárido libre que no está conjugado de manera covalente con la proteína portadora, pero que de todos modos está presente en la composición de glicoconjugado. El sacárido libre se puede asociar de manera no covalente con (es decir, unirse con, ser adsorbido o atrapado de manera no covalente por) el glicoconjugado.

10 En modos realización específicos, la relación del sacárido con respecto a la proteína portadora (p/p) para el conjugado del serotipo 15A es de alrededor de 1,0 a alrededor de 2,0, de alrededor de 1,25 a alrededor de 1,75, o de alrededor de 1,3 a alrededor de 1,7. En otros modos de realización, la relación del sacárido con respecto a la proteína (p/p) para el serotipo 15A es de alrededor de 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7 o 1,8.

15 En modos realización específicos, la relación del sacárido con respecto a la proteína portadora (p/p) para el conjugado del serotipo 15C es de alrededor de 1,0 a alrededor de 2,0, de alrededor de 1,25 a alrededor de 1,75, o de alrededor de 1,3 a alrededor de 1,7. En otros modos de realización, la relación del sacárido con respecto a la proteína (p/p) para el serotipo 15C es de alrededor de 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7 o 1,8.

20 En modos realización específicos, la relación del sacárido con respecto a la proteína portadora (p/p) para el conjugado del serotipo 33F es de alrededor de 1,0 a alrededor de 2,0, de alrededor de 1,25 a alrededor de 1,75, o de alrededor de 1,3 a alrededor de 1,7. En otros modos de realización, la relación del sacárido con respecto a la proteína (p/p) para el serotipo 33F es de alrededor de 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7 o 1,8.

25 En modos realización específicos, la relación del sacárido con respecto a la proteína portadora (p/p) para el conjugado del serotipo 35B es de alrededor de 1,25 a alrededor de 2,25, de alrededor de 1,25 a alrededor de 2,0, o de alrededor de 1,3 a alrededor de 1,8. En otros modos de realización, la relación del sacárido con respecto a la proteína (p/p) para el serotipo 33B es de alrededor de 1,2, 1,3, 1,3, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 o 2,0.

30 En modos realización específicos, la relación del sacárido con respecto a la proteína portadora (p/p) para el conjugado del serotipo 24F es de alrededor de 0,5 a alrededor de 1,5, de alrededor de 0,75 a alrededor de 1,25, o de alrededor de 0,8 a alrededor de 1,0. En otros modos de realización, la relación del sacárido con respecto a la proteína (p/p) para el serotipo 24F es de alrededor de 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 o 1,0.

35 En un modo de realización preferida, el glicoconjugado comprende menos de alrededor de 50 %, 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 % o 15 % de polisacárido libre en comparación con la cantidad total de polisacárido. En un modo de realización preferida, el glicoconjugado comprende menos de alrededor de 25 % de polisacárido libre en comparación

con la cantidad total de polisacárido. En un modo de realización preferida, el glicoconjugado comprende menos de alrededor de 20 % de polisacárido libre en comparación con la cantidad total de polisacárido. En un modo de realización preferida, el glicoconjugado comprende menos de alrededor de 15 % de polisacárido libre en comparación con la cantidad total de polisacárido.

5

IV. Métodos de uso

Algunos modos de realización de la invención también incluyen una o más de las composiciones inmunógenas multivalentes descritas en la presente (i) para uso en, (ii) para uso como medicamento o composición para, o (iii) para uso en la preparación de un medicamento de:

10 (a) tratamiento (por ejemplo, del cuerpo humano); (b) medicina; (c) inhibición de la infección con *Streptococcus pneumoniae*; (d) inducción de una respuesta inmunitaria o una respuesta inmunitaria protectora contra *S. pneumoniae*; (e) profilaxis de la infección por *S. pneumoniae*; (f) prevención de recaída de una infección por *S. pneumoniae*; (g) reducción de la progresión, aparición o gravedad de los síntomas patológicos asociados con la infección por *S. pneumoniae*

15 que incluyen la prevención de complicaciones asociadas tales como daño cerebral, pérdida de la audición, y convulsiones, (h) reducción de la posibilidad de una infección por *S. pneumoniae* o, (i) tratamiento, profilaxis o retraso en la aparición, gravedad o progresión de enfermedades neumocócicas, que incluyen, entre otras, neumonía neumocócica, bacteriemia neumocócica, meningitis neumocócica, otitis media y sinusitis. En estos usos, las composiciones de conjugado

20 de polisacárido neumocócico multivalente de la invención se pueden usar opcionalmente en combinación con uno o más adyuvantes o sin un adyuvante.

En consecuencia, la invención proporciona métodos para el tratamiento profiláctico de (es decir, protección contra) la infección de *S. pneumoniae* o enfermedad neumocócica que comprende administrar una o más de las composiciones de conjugado

25 neumocócico inmunógeno multivalente de polisacárido-proteína de la invención a un paciente que necesita el tratamiento.

Las composiciones y formulaciones de la presente invención se pueden usar para proteger o tratar a un ser humano susceptible a una infección, por ejemplo, una infección neumocócica, por medio de la administración de una composición de la invención por vía

30 sistémica o mucosa.

En un modo de realización, la invención proporciona un método de inducir una respuesta inmunitaria a *S. pneumoniae*, que comprende administrar a un paciente una cantidad eficaz desde el punto de vista inmunológico de una composición inmunógena multivalente de la invención. En otro modo de realización, la invención proporciona un método de vacunar a un ser

35 humano contra una infección neumocócica, que comprende la etapa de administrar a un ser humano una cantidad eficaz desde el punto de vista inmunológico de una composición inmunógena multivalente de la invención.

De este modo, en un aspecto, la invención proporciona un método para (1) inducir una respuesta inmunitaria en un paciente humano, (2) inducir una respuesta inmunitaria protectora en un paciente humano, (3) vacunar a un paciente humano contra una infección por *S. pneumoniae*, o (4) reducir la posibilidad de una infección por *S. pneumoniae* en un paciente humano, en donde el método comprende administrar una composición inmunógena multivalente de la invención al paciente (es decir, cualquier composición inmunógena multivalente descrita en la presente, tales como las composiciones inmunógenas multivalentes descritas en la sección II, titulada “Composiciones inmunógenas multivalentes,” más arriba).

En un modo de realización, la invención proporciona un método para la prevención de *pneumoniae* neumocócico y enfermedades invasivas en adultos de 18 años o más. En otro modo de realización, la invención proporciona un método para la prevención de *pneumoniae* neumocócico y enfermedades invasivas causadas por las 24 cepas de *Streptococcus pneumoniae* (3, 6A, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F, y 35B).

En un modo de realización de los métodos anteriores, la composición comprende conjugados múltiples de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína en donde cada uno de los conjugados comprende un polisacárido de un serotipo de *S. pneumoniae* conjugado con una proteína portadora, en donde los serotipos de *S. pneumoniae* comprenden el conjunto de serotipos: 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F y 20A. En un modo de realización de los métodos anteriores, la composición comprende conjugados múltiples de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína en donde cada uno de los conjugados comprende un polisacárido de un serotipo de *S. pneumoniae* conjugado con una proteína portadora, en donde los serotipos de *S. pneumoniae* comprenden el conjunto de serotipos: 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, y 20. En un modo de realización de los métodos anteriores, la composición comprende conjugados múltiples de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína en donde cada uno de los conjugados comprende un polisacárido de un serotipo de *S. pneumoniae* conjugado con una proteína portadora, en donde los serotipos de *S. pneumoniae* comprenden el conjunto de serotipos: 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, y 20B. En otro modo de realización de los métodos anteriores, la composición además comprende un conjugado de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína de serotipo 6A o 6C.

Se mostró que una vacuna conjugada neumocócica comprende el serotipo 6A puede proporcionar un tipo de protección cruzada contra el serotipo 6C (Cooper *et al.*, *Vaccine* 29 (2011) 7207– 7211). Por lo tanto, en algunos modos de realización de los métodos anteriores, la invención también proporciona el uso de composiciones inmunógenas multivalentes que no comprenden el serotipo 6C, pero en su lugar comprenden el serotipo 6A o los serotipos 6A y 6B. En otros modos de realización, la composición inmunógena comprende conjugados neumocócicos de los serotipos 6A, 6B y 6C. En modos realización particulares de los métodos

anteriores, los serotipos de *S. pneumoniae* comprenden un conjunto de serotipos seleccionados del grupo que consiste en:

- 5 I-a) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F y 20A;
 I-b) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F y 20A;
 I-c) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, y 20A; y
 10 I-d) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, y 20A.

En modos realización particulares del conjunto de serotipos anterior (I-a a I-d), el serotipo 20 o 20B se puede sustituir con serotipo 20A.

En otros modos de realización de los métodos anteriores, los serotipos de *S. pneumoniae* comprenden un conjunto de serotipos seleccionados del grupo que consiste en:

- 15 II-a) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 y 35B;
 II-b) 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 y 35B;
 II-c) 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 y 35B;
 II-d) 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 y 35B;
 20 II-e) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F y 20A;
 II-f) 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F y 20A;
 II-g) 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, y 20A; y
 25 II-h) 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F y 20A.

En modos realización particulares del conjunto de serotipos anterior (II-e a IIh), el serotipo 20 o 20B se puede sustituir con el serotipo 20A.

- 30 En otros modos de realización de los métodos anteriores, los serotipos de *S. pneumoniae* comprenden un conjunto de serotipos como se establece en cualquiera de los modos de realización I-a), II-a) o II-e) y también comprenden los serotipos 6A, 6B y 6C.

- 35 Asimismo, se mostró que una vacuna conjugada neumocócica comprende el serotipo 10A puede proporcionar un tipo de protección cruzada contra el serotipo 39 (ver WO 2017/ 085586). Por lo tanto, en algunos modos de realización de los métodos anteriores, la invención también proporciona el uso de composiciones inmunógenas multivalentes que no comprenden el serotipo 10A, pero en su lugar comprenden el serotipo 39. En otros modos de realización, la composición inmunógena comprende conjugados neumocócicos de los serotipos

10A y 39. En modos realización particulares de los métodos anteriores, los serotipos de *S. pneumoniae* comprenden un conjunto de serotipos seleccionados del grupo que consiste en:

- | | | |
|----|--------|--|
| | III-a) | 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F y 20A; |
| 5 | III-b) | 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F y 20A; |
| | III-c) | 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F y 20A; |
| 10 | III-d) | 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F y 20A; |
| | III-e) | 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F y 20A; |
| | III-f) | 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F y 20A; |
| 15 | III-g) | 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, y 20A; y |
| | III-h) | 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F y 20A. |

20 En modos realización particulares del conjunto de serotipos anterior (II-a a III-h), el serotipo 20 o 20B puede ser sustituido por el serotipo 20A.

En otros modos de realización de los métodos anteriores, los serotipos de *S. pneumoniae* comprenden un conjunto de serotipos como se establece en cualquiera de los modos de realización III-a) a III-h) y también comprenden el serotipo 10A.

25 También se mostró que los conjugados inmunógenos que comprenden el polisacárido capsular de serotipo 15B de *S. pneumoniae* unido de manera covalente a la proteína portadora pueden proporcionar un tipo de protección cruzada contra el serotipo 15C y/o el serotipo 15A (ver WO 2015/110942). Por lo tanto, en algunos modos de realización de los métodos anteriores, la invención también proporciona el uso de composiciones inmunógenas multivalentes que no comprenden el serotipo 15C (o 15B de-O-acetilado), pero en su lugar
30 comprenden el serotipo 15B (es decir, el polisacárido de serotipo 15B no está de-O-acetilado). En otros modos de realización, la composición inmunógena comprende conjugados neumocócicos de los serotipos 15B y 15C (o 15B de-O-acetilado). En modos realización particulares de los métodos anteriores, los serotipos de *S. pneumoniae* comprenden un conjunto de serotipos seleccionados del grupo que consiste en:

- | | | |
|----|-------|---|
| 35 | IV-a) | 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F y 20A; |
| | IV-b) | 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F y 20A; |

- IV-c) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F y 20A;
- IV-d) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F y 20A;
- 5 IV-e) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F y 20A;
- IV-f) 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F y 20A;
- 10 IV-g) 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, y 20A; y
- IV-h) 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F y 20A.

En modos realización particulares del conjunto de serotipos anterior (IVa a IVh), el serotipo 20 o 20B se puede sustituir con el serotipo 20A.

- 15 En otros modos de realización de los métodos anteriores, los serotipos de *S. pneumoniae* comprenden un conjunto de serotipos como se establece en cualquiera de los modos de realización IV-a) a IV-h) y también comprenden el serotipo 15C (y/o 15B de-O-acetilado).

- Las composiciones de la invención son útiles en los métodos para proporcionar protección complementaria contra *S. pneumoniae* en pacientes que previamente recibieron una
- 20 vacuna neumocócica multivalente. Es este uso, las composiciones de la invención pueden proporcionar protección contra serotipos particulares de *S. pneumoniae* contra los cuales un paciente no se haya vacunado previamente, pueden proporcionar protección adicional contra serotipos de *S. pneumoniae* contra los cuales un paciente ya se haya vacunado previamente, o pueden proporcionar protección tanto contra serotipos de *S. pneumoniae* contra los cuales un
- 25 paciente no se haya vacunado previamente como contra serotipos de *S. pneumoniae* contra los cuales un paciente ya se haya vacunado previamente.

- De este modo, la invención proporciona un método para inducir una respuesta inmunitaria, vacunar, o inducir una respuesta inmunitaria protectora contra *S. pneumoniae* en un paciente, que comprende administrar una composición inmunógena multivalente al paciente, en
- 30 donde la composición comprende conjugados múltiples de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína, en donde los conjugados de polisacárido con proteína comprenden un polisacárido capsular de un serotipo de *S. pneumoniae* conjugado con una proteína portadora, en donde el paciente ya se vacunó previamente contra *S. pneumoniae*. En modos realización de este aspecto de la invención, la composición inmunógena multivalente puede ser cualquier composición
- 35 inmunógena multivalente descrita en la presente. En modos realización particulares de los métodos de la invención, la composición inmunógena multivalente se administra al paciente que se trató previamente con una vacuna neumocócica multivalente. La vacuna neumocócica

multivalente puede ser cualquier vacuna indicada para la prevención de una enfermedad neumocócica causada por más de un serotipo de *S. pneumoniae*.

En modos realización específicos del método anterior, el paciente se trató previamente con una vacuna neumocócica multivalente que se indica para la prevención de enfermedad neumocócica causada por serotipos de *S. pneumoniae* seleccionados del grupo que consiste en:

- a) 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F;
- b) 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 6A, 7F, y 19A;
- c) 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F;
- d) 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 6A, 7F, 19A, 22F, y 33F;
- e) 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 7F, 19A, 22F, 33F, 2, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F y 20; y
- f) 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 6A, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 10A, 11A, 12F y 15B.

En modos realización específicos del método anterior, la vacuna neumocócica multivalente comprende polisacáridos capsulares de los serotipos de *S. pneumoniae* 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 7F, 19A, 22F, 33F, 2, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F y 20A. En modos realización específicos del método anterior, la vacuna neumocócica multivalente comprende polisacáridos capsulares de los serotipos de *S. pneumoniae* 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 7F, 19A, 22F, 33F, 2, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F y 20. En modos realización específicos del método anterior, la vacuna neumocócica multivalente comprende polisacáridos capsulares de los serotipos de *S. pneumoniae* 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 7F, 19A, 22F, 33F, 2, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F y 20B.

En modos realización específicos del método anterior, la vacuna neumocócica multivalente comprende múltiples conjugados de polisacárido con proteína, en donde los conjugados de polisacárido con proteína comprenden polisacárido de un serotipo de *S. pneumoniae* conjugado con una proteína portadora. En otros modos de realización, la vacuna neumocócica multivalente comprende múltiples polisacáridos capsulares de *S. pneumoniae* que no se conjugan con una proteína portadora.

En modos realización adicionales del método anterior, el paciente se trató previamente con PREVNAVAR® 13 (vacuna neumocócica conjugada 13-valente [proteína CRM197 difteria], Pfizer, Inc., Filadelfia, PA, EE. UU.).

En otros modos de realización del método anterior, el paciente se trató previamente con PNEUMOVAX® 23 (vacuna neumocócica polivalente, Merck & Co., Inc., Kenilworth, NJ, EE. UU.).

En otros modos de realización del método anterior, el paciente se trató previamente con SYNFLORIX™ (vacuna neumocócica conjugada de polisacárido (adsorbida), GlaxoSmithKline Biologicals s.a., Rixensart, Bélgica).

En modos realización del método anterior, la composición inmunógena multivalente de la invención se administra a un paciente en cualquier momento después de que el paciente haya recibido una vacuna neumocócica multivalente, de acuerdo con el régimen de tratamiento proporcionado por el profesional de la salud, por ejemplo, un médico. En modos

5 realización particulares, la composición inmunógena multivalente de la invención se administra a un paciente de 1 mes a 5 años después de que el paciente haya recibido la vacuna neumocócica multivalente, alternativamente, de 1 mes a 1 año, de 1 mes a 2 años, de 1 mes a 3 años, de 1 mes a 4 años, de 1 mes a 6 meses, de 2 meses a 6 meses, de 2 meses a 1 año, de 1 año a 5 años, de 6 meses a 5 años, de 6 meses a 4 años, de 6 meses a 3 años, de 6 meses a 2 años, de 6 meses a 1

10 año, de 1 año a 4 años, de 1 año a 3 años, o de 1 año a 2 años, después de que el paciente haya recibido la vacuna neumocócica multivalente. En otros modos de realización, la composición inmunógena multivalente se administra al paciente alrededor de 1 mes, alrededor de 2 meses, alrededor de 3 meses, alrededor de 4 meses, alrededor de 5 meses, alrededor de 6 meses, alrededor de 7 meses, alrededor de 8 meses, alrededor de 9 meses, alrededor de 10 meses,

15 alrededor de 11 meses, alrededor de 1 año, alrededor de 1,25 años, alrededor de 1,5 años, alrededor de 1,75 años, alrededor de 2 años, alrededor de 2,25 años, alrededor de 2,5 años, alrededor de 2,75 años, alrededor de 3 años, alrededor de 3,25 años, alrededor de 3,5 años, alrededor de 3,75 años, alrededor de 4 años, alrededor de 4,25 años, alrededor de 4,5 años, alrededor de 4,75 años, o alrededor de 5 años después de que el paciente haya recibido la vacuna

20 neumocócica multivalente.

En otros modos de realización, la invención proporciona un método para (1) inducir una respuesta inmunitaria en un paciente humano, (2) inducir una respuesta inmunitaria protectora en un paciente humano, (3) vacunar a un paciente humano contra una infección con *S. pneumoniae*, o (4) reducir la posibilidad de una infección de *S. pneumoniae* en un paciente

25 humano, en donde el método comprende administrar una composición inmunógena multivalente de la invención y administrar una vacuna multivalente neumocócica al paciente, en cualquier orden. La vacuna neumocócica multivalente puede ser cualquier vacuna indicada para la prevención de una enfermedad neumocócica causada por más de un serotipo de *S. pneumoniae*.

En modos realización específicos del método anterior, el paciente se trata con una

30 composición inmunógena multivalente de la invención y una vacuna neumocócica multivalente que se indica para la prevención de enfermedad neumocócica causada por serotipos de *S. pneumoniae* seleccionados del grupo que consiste en:

- a) 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F;
- b) 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 6A, 7F, y 19A;
- c) 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F;
- d) 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 6A, 7F, 19A, 22F, y 33F;
- e) 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 7F, 19A, 22F, 33F, 2, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F y 20; y

- f) 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 6A, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 10A, 11A, 12F y 15B.

En modos realización específicos del método anterior, la vacuna neumocócica multivalente comprende polisacáridos capsulares de los serotipos de *S. pneumoniae* 4, 6B, 9V,
5 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 7F, 19A, 22F, 33F, 2, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F y 20A.

En modos realización específicos del método anterior, la vacuna neumocócica multivalente comprende múltiples conjugados de polisacárido con proteína, en donde los conjugados de polisacárido con proteína comprenden polisacárido de un serotipo de *S. pneumoniae* conjugado con una proteína portadora. En otros modos de realización, la vacuna
10 neumocócica multivalente comprende múltiples polisacáridos capsulares de *S. pneumoniae* que no se conjugan con una proteína portadora.

En modos realización adicionales del método anterior, el paciente se trata con una composición inmunógena multivalente de la invención y se trata con PREVNAR® 13 (vacuna neumocócica conjugada 13-valente [proteína CRM197 difteria], Pfizer, Inc., Filadelfia, PA, EE.
15 UU.), en cualquier orden. En un modo de realización, al paciente se le administra, en primer lugar, PREVNAR® y, en segundo lugar, una composición inmunógena multivalente de la invención. En modos realización alternativas, al paciente se le administra, en primer lugar, una composición inmunógena multivalente de la invención y, en segundo lugar, PREVNAR® 13.

En otros modos de realización del método anterior, el paciente se trata con una
20 composición inmunógena multivalente de la invención y se trata con PNEUMOVAX® 23 (vacuna neumocócica polivalente, Merck & Co., Inc., Kenilworth, NJ, EE. UU.), en cualquier orden. En un modo de realización, al paciente se le administra, en primer lugar, PNEUMOVAX® 23 y, en segundo lugar, una composición inmunógena multivalente de la invención. En modos
realización alternativas, al paciente se le administra, en primer lugar, una composición
25 inmunógena multivalente de la invención y, en segundo lugar, se le administra PNEUMOVAX® 23.

En otros modos de realización del método anterior, el paciente se trata con una composición inmunógena multivalente de la invención y se trata con SYNFLORIX™ (vacuna conjugada neumocócica de polisacárido (adsorbida), GlaxoSmithKline Biologicals s.a.,
30 Rixensart, Bélgica), en cualquier orden. En un modo de realización, al paciente se le administra, en primer lugar, SYNFLORIX™ y, en segundo lugar, una composición inmunógena multivalente de la invención. En un modo de realización alternativa, al paciente se le administra, en primer lugar, una composición inmunógena multivalente de la invención y, en segundo lugar, SYNFLORIX™.

35 En algunos modos de realización del método anterior, la composición inmunógena multivalente y la vacuna neumocócica multivalente se administran de manera concurrente. Como se usa en la presente, “administración concurrente” no se limita a la dosificación de dos composiciones al mismo tiempo, sino que incluye la administración de una después de la otra en

cualquier orden. En algunos modos de realización, la composición inmunógena multivalente y la vacuna neumocócica multivalente se administran por vía intramuscular o subcutánea en sitios anatómicos separados, por ejemplo, dos brazos diferentes.

En algunos modos de realización del método anterior, la cantidad de tiempo entre la administración de la composición inmunógena multivalente de la invención y la vacuna neumocócica multivalente es de alrededor de 4 semanas a alrededor de 1 año. En modos de realización alternativas, la cantidad de tiempo es de alrededor de 1 mes a alrededor de 5 años.

En un modo de realización, al paciente se le administra, en primer lugar, la vacuna neumocócica multivalente y, en segundo lugar, la composición inmunógena multivalente de la invención. En modos de realización alternativas, al paciente se le administra, en primer lugar, una composición inmunógena multivalente de la invención y, en segundo lugar, la vacuna neumocócica multivalente.

También se proporciona un método para inducir una respuesta inmunitaria, vacunar o inducir una respuesta inmunitaria protectora contra *S. pneumoniae* en un paciente, que comprende:

- (1) administrar al paciente una composición inmunógena multivalente, la composición que comprende conjugados múltiples de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína, en donde cada uno de los conjugados de polisacárido con proteína comprende un polisacárido capsular de un serotipo de *S. pneumoniae* conjugado con una proteína portadora,
- (2) esperar que pase una cantidad predeterminada de tiempo, y
- (3) administrar al paciente una vacuna neumocócica multivalente.

En este método, la composición inmunógena multivalente puede comprender cualquier combinación de conjugados de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína establecidos en la presente y la vacuna neumocócica multivalente puede ser cualquier vacuna indicada para la prevención de una enfermedad causada por más de un serotipo de *S. pneumoniae*.

También se proporciona en la invención un método para inducir una respuesta inmunitaria, vacunar o inducir una respuesta inmunitaria protectora contra *S. pneumoniae* en un paciente, que comprende:

- (1) administrar al paciente una vacuna neumocócica multivalente,
- (2) esperar que pase una cantidad predeterminada de tiempo, y
- (3) administrar al paciente una composición inmunógena multivalente, la composición que comprende conjugados múltiples de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína, en donde cada uno de los conjugados de polisacárido con proteína comprende un polisacárido capsular de un serotipo de *S. pneumoniae* conjugado con una proteína portadora.

En este método, la composición inmunógena multivalente puede comprender cualquier combinación de conjugados de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína establecidos en la presente y la vacuna neumocócica multivalente puede ser cualquier vacuna

indicada para la prevención de una enfermedad causada por más de un serotipo de *S. pneumoniae*.

En algunos modos de realización de los métodos anteriores, la vacuna neumocócica multivalente comprende conjugados múltiples de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína, en donde los conjugados de polisacárido capsular con proteína comprenden polisacárido de un serotipo de *S. pneumoniae* conjugado con una proteína portadora. En modos realización alternativas, la vacuna neumocócica multivalente comprende polisacáridos capsulares de *S. pneumoniae* que no se conjugan con una proteína portadora.

En cualquiera de los modos de realización de acuerdo con los métodos de la invención (es decir, cualquiera de los métodos descritos en la presente), el método también puede comprender administrar al paciente una o más dosis adicionales de una composición inmunógena multivalente de la invención. En tales métodos, el paciente puede ya haber recibido una vacuna neumocócica multivalente antes de recibir la primera dosis de una composición inmunógena multivalente de la invención, más arriba, o puede no haberse vacunado contra *S. pneumoniae* antes de recibir una composición inmunógena multivalente de la invención. De este modo, en un modo de realización, a un paciente que ya había recibido una vacuna neumocócica multivalente indicada para la prevención de la enfermedad neumocócica causada por *S. pneumoniae* se le administran dos o más dosis de una composición inmunógena multivalente de la invención. En modos realización alternativas, a un paciente que no se trató previamente con ninguna vacuna indicada para la prevención de la enfermedad neumocócica, se le administran dos o más dosis de una composición inmunógena multivalente de la invención.

En modos realización del método anterior, las dos o más dosis son de la misma composición inmunógena multivalente de la invención. En modos realización alternativas, las dos o más dosis son de diferentes composiciones inmunógenas multivalentes de la invención.

En modos realización específicos de cualquiera de estos métodos, al paciente se le administran dos, tres o cuatro dosis de una composición inmunógena multivalente de la invención. En modos realización particulares, el paciente está inmunocomprometido (por ejemplo, en un régimen inmunosupresor después de un trasplante de células madre) y la cantidad de dosis es tres.

En algunos modos de realización, la cantidad de tiempo entre la administración de cada dosis de la composición inmunógena multivalente de la invención es de alrededor de 4 semanas a alrededor de 1 año. En un modo de realización alternativa, la cantidad de tiempo entre la administración de cada dosis de la composición inmunógena multivalente de la invención es de alrededor de 1 mes a alrededor de 5 años.

En modos realización de cualquiera de los métodos de la invención, el paciente a tratar con las composiciones de la invención es un ser humano. En algunos modos de realización, el paciente humano es un niño pequeño (aproximadamente 12 a 24 meses), o un niño (aproximadamente 2 a 5 años). Las composiciones de la presente invención también son

adecuadas para usar con niños más grandes, adolescentes y adultos (por ejemplo, de 18 a 45 años, de 18 a 50 años, de 18 a 55 años, de 18 a 60 años o 18 a 65 años). En otros modos de realización de cualquiera de los métodos de la invención, el paciente tiene alrededor de 2 a alrededor de 18 años. En otros modos de realización de cualquiera de los métodos de la invención, el paciente tiene 18 años o más.

En otros modos de realización de los métodos de la invención, el paciente humano es una persona mayor. En algunos modos de realización de cualquiera de los métodos de la invención, el paciente tiene 50 años o más. En algunos modos de realización de cualquiera de los métodos de la invención, el paciente tiene 55 años o más. En algunos modos de realización de cualquiera de los métodos de la invención, el paciente tiene 60 años o más. En aun otros modos de realización de cualquiera de los métodos de la invención, el paciente tiene 65 años o más. En modos realización adicionales de cualquiera de los métodos de la invención, el paciente tiene 70 años o más.

En algunos modos de realización de cualquiera de los métodos de la invención, el paciente a tratar con una composición inmunógena de la invención está inmunocomprometido.

En algunos modos de realización de cualquiera de los métodos de la invención, la composición inmunógena multivalente se administra de manera concomitante con una vacuna contra la influenza. En algunos modos de realización, la vacuna contra la influenza es una “vacuna contra la gripe para personas mayores”, una vacuna contra la gripe de dosis alta indicada para las personas mayores, por ejemplo, personas de 65 años o mayores.

La invención proporciona un método para inducir una respuesta inmunitaria protectora en un paciente contra una infección neumocócica que comprende la etapa de administrar al paciente una cantidad eficaz desde el punto de vista inmunológico de cualquiera de las composiciones descritas en la presente de conjugado neumocócico inmunógeno multivalente de polisacárido-proteína. Las cantidades óptimas de los componentes para una vacuna en particular (es decir, una composición inmunógena multivalente) se pueden determinar mediante estudios estándar que implican la observación de respuestas inmunitarias adecuadas en los sujetos. Por ejemplo, en otro modo de realización, la dosificación para la vacunación de seres humanos se determina mediante extrapolación de estudios en animales a datos de seres humanos. En otro modo de realización, la dosificación se determina de manera empírica.

Los métodos de la invención se pueden usar para la prevención y/o reducción de síndromes clínicos primarios causados por microbios, por ejemplo, *S. pneumonia*, que incluye infecciones invasivas (meningitis, neumonía y bacteriemia) e infecciones no invasivas (otitis media aguda y sinusitis).

La administración de las composiciones de la invención puede incluir una o más de: inyección por vía intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea; o administración por vía mucosa en el tracto oral/digestivo, respiratorio o genitourinario. En un modo de realización, la administración intranasal se usa para el tratamiento de la neumonía o la otitis

media (ya que el transporte nasofaríngeo de neumococos se puede prevenir con mayor eficacia, lo que así atenúa la infección en su etapa más temprana). En modos realización específicos, las composiciones de la invención se administran al paciente por vía intramuscular o subcutánea.

5 Todas las publicaciones que se mencionan en la presente se incorporan por referencia con el fin de describir y divulgar metodologías y materiales que se pueden usar en relación con la presente invención.

 Luego de describir diferentes modos realización de la invención en la presente con referencia a los dibujos adjuntos, cabe destacar que la invención no se limita a esos modos
10 realización, y que un experto en la materia de nivel medio puede realizar distintos cambios y modificaciones en estas sin alejarse del alcance o espíritu de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.

 Los siguientes ejemplos ilustran, pero no limitan, la invención.

EJEMPLO 1

15 Preparación de polisacáridos capsulares de *S. Pneumoniae*

 Los métodos para cultivar neumococos son conocidos en el estado de la técnica. Ver, por ejemplo, Chase, 1967, Methods of Immunology and Immunochemistry 1:52. Los métodos para preparar polisacáridos capsulares neumocócicos son también conocidos en el estado de la técnica. Ver, por ejemplo, la patente europea N.º EP 0 497 524 B1. El proceso
20 descrito más adelante sigue generalmente el método descrito en la patente europea N.º EP 0 497 524 B1 y se aplica generalmente a todos los serotipos neumocócicos.

 Los aislados de cepas neumocócicas para los serotipos 6C, 23B y 31 se obtuvieron de Centros para el Control y prevención de enfermedades (Atlanta, GA). Las cepas de serotipos 3, 8, 10A, 11A, 12F, 15B, 22F, y 33F se obtuvieron de la Universidad de Pensilvania (Dr. Robert
25 Austrian). Las cepas de serotipos 17F y 19A se obtuvieron de la Oficina de FDA de estándares biológicos (Dr. John Robbins). El serotipo 7F se obtuvo de la Universidad Estatal de Nueva York, Centro médico Downstate (Dr. Gerald Schiffman). Los aislados de serotipos neumocócicos no enumerados más arriba se obtuvieron de la Colección americana de cultivos tipo (Manassas, VA). Cuando fue necesario, los subtipos se diferenciaron en función de la
30 reacción de Quellung con el uso de antisuero específico. Ver, por ejemplo, la patente estadounidense N.º 5.847.112. Los aislados obtenidos se aislaron adicionalmente de manera clonal colocándolos en serie en placas de agar en dos etapas que consisten en un medio libre de componentes de origen animal que contiene peptona de soja, extracto de levadura, y glucosa sin hemina. En el caso del serotipo 7F, las placas de agar usadas también contenían hemina. Los
35 aislados clonales de cada serotipo se expandieron adicionalmente en cultivo líquido usando medios libres de componentes de origen animal que contenían peptona de soja, extracto de levadura, HEPES, cloruro de sodio, bicarbonato de sodio, fosfato de potasio, glucosa, y glicerol para preparar los bancos de células principal previo.

La producción de cada serotipo del polisacárido neumocócico consistió en una expansión celular y fermentación de la producción en lote y luego en la inactivación química antes de la purificación corriente abajo. Un vial de banco de células descongelado de cada serotipo se expandió usando un matraz de agitación o una botella de cultivo que contenía un medio de cultivo libre de componentes de origen animal previamente esterilizado que contenía peptona de soja o ultrafiltrado de peptona de soja, extracto de levadura o ultrafiltrado de extracto de levadura, HEPES, cloruro de sodio, bicarbonato de sodio, fosfato de potasio y glucosa. El cultivo de expansión celular se cultivó en un matraz de agitación sellado o una botella para minimizar el intercambio de gas con control de temperatura y agitación. En el caso de los serotipos 3, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 19A, 20, 22F y 33F, se expandió un vial de banco de células descongelado con el uso de un fermentador que contenía el mismo medio. Durante la expansión celular de estos serotipos, se controlaron la temperatura, el pH, la presión y la agitación. También se controló la superposición del flujo de aire dado que no se usó rociado. Después de alcanzar una densidad de cultivo específica, según se midió por densidad óptica a 600 nm, una porción del cultivo de expansión celular se transfirió a un fermentador de producción que contenía medio de cultivo libre de componentes de origen animal previamente esterilizado que contenía peptona de soja o ultrafiltrado de peptona de soja, extracto de levadura o ultrafiltrado de extracto de levadura, cloruro de sodio, fosfato de potasio y glucosa. Se controlaron la temperatura, el pH, la presión y la agitación. También se controló la superposición del flujo de aire dado que no se usó rociado.

La fermentación en lote finalizó con la adición de un agente de inactivación química, fenol, cuando la glucosa casi se agotó. El fenol puro se agregó a una concentración final de 0,8 - 1,2 % para inactivar las células y liberar el polisacárido capsular de la pared celular. La inactivación primaria ocurre durante un tiempo específico dentro del fermentador en donde la temperatura y la agitación se siguen controlando. Después de la inactivación primaria, el lote se transfirió a otro recipiente en donde se mantuvo durante un tiempo específico adicional a temperatura y agitación controladas para la inactivación completa. Esto se confirmó mediante técnicas de colocación en placas microbianas o mediante verificación de la concentración de fenol y el tiempo específico. Luego, el caldo inactivado se purificó.

30

EJEMPLO 2

Purificación de polisacáridos neumocócicos

El proceso de purificación para los polisacáridos neumocócicos consistió en varias operaciones de centrifugación, filtración de profundidad, concentración/diafiltración y etapas de precipitación. Todos los procedimientos se llevaron a cabo a temperatura ambiente a menos que se especifique lo contrario.

El caldo inactivado de los cultivos del fermentador de *S. pneumoniae* se floclaron con un polímero catiónico (tal como BPA-1000, TRETOLITE® (Baker Hughes Inc.,

Houston, TX), Spectrum 8160, poli(etilenimina), y Millipore pDADMAC). Los polímeros catiónicos se fijaron a las proteínas impuras, los ácidos nucleicos y el residuo celular. Luego de la etapa de floculación y un período de envejecimiento, se removieron los sólidos floculados mediante centrifugación y varias etapas de filtración de profundidad. El caldo clarificado se concentró y se diafiltró con el uso de un filtro de 100 kDa a 500 kDa MWCO (límite de peso molecular). La diafiltración se logró con el uso de amortiguador Tris, MgCl_2 y amortiguador de fosfato de sodio. La diafiltración eliminó el ácido nucleico y la proteína residuales.

La eliminación de otras impurezas se logró mediante reprecipitación del polisacárido en acetato de sodio y fenol con alcohol desnaturalizado y/o isopropanol. Durante la etapa de precipitación de fenol, se cargó acetato de sodio en amortiguador de solución salina de fosfato de sodio y fenol (fenoles licuados o fenoles sólidos) en el concentrado diafiltrado. Luego se llevó a cabo el fraccionamiento de alcohol del polisacárido en dos etapas. En la primera etapa se agregó un bajo porcentaje de alcohol a la preparación para precipitar el residuo celular y otras impurezas no deseadas, mientras se mantuvo el polisacárido crudo en la solución. Las impurezas se eliminaron mediante centrifugación seguida de una etapa de filtración de profundidad. Luego, el polisacárido se recuperó de la solución agregando isopropanol adicional o alcohol desnaturalizado al lote. El pelet de polisacárido precipitado se recuperó mediante centrifugación, se trituró y se secó como un polvo y se almacenó congelado a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

EJEMPLO 3

Análisis de identidad estructural de algunos serotipos neumocócicos mediante análisis por RMN

Las muestras de análisis por RMN se prepararon disolviendo polvo de polisacárido en solución de 5 mg polvo/ml en óxido de deuterio (D_2O) que contenía 0,01 % de dimetilsulfóxido (DMSO) y 0,01 % de sal de sodio 2,2-dimetil-2-silapentan-5-sulfonato- d_6 (DSS- d_6). DMSO es un estándar interno que se usó para el análisis cuantitativo y DSS- d_6 se usó para establecer la escala de desplazamiento químico a 0 ppm. Se adquirieron un conjunto de datos de RMN de protón unidimensional a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ y una porción de espectro que contenía las resonancias anoméricas escritas selectivamente como coordenadas x, y en un archivo ASCII para analizar en un libro de Microsoft Excel. Las coordenadas Y (es decir, el perfil espectral) se compararon luego con perfiles espectrales de polisacáridos bacterianos capsulares en una base de datos de referencia. Los perfiles de referencia se generaron de manera similar en preparaciones seleccionadas de cada serotipo designado en adelante como el lote de referencia. Se llevó a cabo una comparación por pares de los valores y de la muestra y de los espectros de referencia para producir un coeficiente de correlación ($\rho_{x,y}$) como una medida de similitud entre los espectros. Un valor ρ de $\geq 0,95$ con cualquiera de los espectros de referencia se tomó como una identificación positiva de la estructura del polisacárido.

Las Figuras 1-4 proporcionan los espectros ^1H RMN 600 MHz unidimensionales de polisacáridos capsulares de serotipos de *S. pneumonia* 6C, 15A, 15B de-O-acetilado y 35B, respectivamente. Las regiones de identidad ^1H RMN que se usan en la identificación de serotipo de los serotipos de *S. pneumonia* 6C, 15A, 15B de-O-acetilado y 35B se proporcionan en las Figuras 5-8, respectivamente.

Estructura de los polisacáridos capsulares de serotipos de S. pneumonia 15B de-O-acetilado y 15C

Los estudios de inmunogenicidad se llevaron a cabo usando PCV21 en conejos blancos de Nueva Zelanda (ver el Ejemplo 43, más adelante). En estos estudios, el serotipo 15B de-O-acetilado de polisacárido se usó en la composición polivalente en lugar del serotipo 15C. Los estudios de RMN se llevaron a cabo para confirmar que el polisacárido 15B de-O-acetilado era equivalente al polisacárido serotipo 15C.

Las diferencias estructurales entre los serotipos de polisacárido capsular se muestran como diferencias de desplazamiento químico en el espectro de RMN. La región anomérica (aproximadamente 4,4 ppm a 6,0 ppm) es sensible a cualquier característica estructural en la unidad de repetición del polisacárido. Las diferencias en la estereoquímica, la composición de monosacáridos, la O-acetilación y el enlace glucosídico tienen un impacto en los desplazamientos químicos de las señales anoméricas que dejan esta región del espectro único de cada serotipo. En el caso del polisacárido de serotipo 15B de-O-acetilado, el espectro de ^1H RMN completo fue idéntico al espectro de ^1H RMN del polisacárido del serotipo 15C, lo que indica que la unidad de repetición de ambos polisacáridos consistió en los mismos sustituyentes de monosacáridos y sitios de enlace glucosídico (ver las Figuras 9B-9C y 10B-10C). También se muestra claramente que la etapa de de-O-acetilación eliminó el grupo O-acetato presente en el polisacárido 15B, y que esencialmente ya no se observaron grupos O-acetato (ver las Figuras 10A-10F).

EJEMPLO 4

Preparación del conjugado de serotipo 3 para estudio polivalente usando la conjugación con DMSO

El polisacárido se disolvió, se dimensionó a una masa molecular diana, se activó químicamente y se intercambió en amortiguador mediante ultrafiltración. El polisacárido activado y CRM197 purificado se liofilizaron individualmente y se volvieron a disolver en dimetilsulfóxido (DMSO). Las soluciones de polisacárido y CRM197 que se volvieron a disolver se combinaron luego y se conjugaron como se describe a continuación. El conjugado resultante se purificó mediante ultrafiltración antes de una filtración final de 0,2 micrómetros. Varios parámetros de proceso en cada etapa, tal como pH, temperatura, concentración y tiempo, se controlaron para obtener conjugados con atributos deseados.

Reducción de tamaño y oxidación del polisacárido

El polvo de Ps capsular neumocócico purificado se disolvió en agua y se filtró a 0,45 micrómetros. El polisacárido disuelto se homogeneizó para reducir la masa molecular de Ps.

- 5 La presión de homogenización y la cantidad de pasadas por el homogeneizador se controlaron a 380 bar/5 pasadas.

El polisacárido de tamaño reducido se concentró y se diafiltró en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10 kDa con NMWCO.

- La solución de polisacárido se ajustó luego hasta 22 °C y pH 5 con un
10 amortiguador de acetato de sodio para minimizar la reducción de tamaño del polisacárido debido a la activación. La activación de polisacárido se inició con la adición de una solución de 100 mM de metaperiodato de sodio. La cantidad de metaperiodato de sodio agregada fue de 0,25 moles de metaperiodato de sodio por mol de unidad de repetición del polisacárido para alcanzar un nivel
15 diana de activación de polisacárido (moles de aldehído por mol de la unidad de repetición del polisacárido). La reacción de oxidación continuó durante 12 horas a 22 °C.

El producto activado se diafiltró en 10 mM de fosfato de potasio, pH 6,4 y luego mediante diafiltración en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10 kDa con NMWCO. La ultrafiltración se llevó a cabo a 2-8 °C.

20 *Conjugación de polisacárido con CRM197*

CRM197 purificado, obtenido a través de la expresión en *Pseudomonas fluorescens* como se describió anteriormente (WO 2012/173876 A1), se diafiltró en 2 mM de amortiguador de fosfato, pH 7,2 usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 5 kDa con NMWCO y se filtró a 0,2 micrómetros.

- 25 Los polisacáridos activados se formularon para la liofilización a 2 mg Ps/ml con concentración de sacarosa de 10 % p/v. CRM197 se formuló para la liofilización a 6 mg Pr/ml con concentración de sacarosa de 1 % p/v.

- Las soluciones de Ps y CRM197 formuladas se liofilizaron individualmente. Los materiales de Ps y CRM197 liofilizados se volvieron a disolver de manera individual en
30 volúmenes iguales de DMSO. Las soluciones de polisacárido y CRM197 se mezclaron para alcanzar una concentración de polisacáridos de 1,0 g Ps/l y una relación de masa de polisacárido con respecto a CRM197 de 1,3. La relación de masa se seleccionó para controlar la relación de polisacárido con respecto a CRM197 en el conjugado resultante. Se agregó cianoborohidruro de sodio (1 mol por mol de unidad de repetición del polisacárido), y la conjugación continuó
35 durante 1 hora a 22 °C.

Reducción con borohidruro de sodio

Se agregó borohidruro de sodio (2 moles por mol de unidad de repetición del polisacárido) luego de la reacción de conjugación y se incubó durante 1,6 horas a 22 °C. El lote se diluyó en 150 mM de cloruro de sodio, con aproximadamente 0,025 % (p/v) de polisorbato 20, a aproximadamente 4°C. El amortiguador de fosfato de potasio se agregó luego para neutralizar el pH. El lote se concentró y se diafiltró a aproximadamente 4°C en 150 mM de cloruro de sodio, 25 mM de fosfato de potasio, pH 7, con el uso de una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 30 kDa con NMWCO.

Filtración final y almacenamiento de producto

El lote se concentró y se diafiltró luego en 10 mM de histidina en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0, con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, a 4 °C usando membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 300 kDa con NMWCO.

El lote del concentrado fue filtrado a 0,2 micrómetros, luego se diluyó con 10 mM de histidina adicional en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0 con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, distribuido en alícuotas y congelado a ≤ -60 °C.

Tabla 1. Atributos del conjugado de serotipo 3 para el estudio polivalente de conjugación con DMSO

Ps oxidado en Mn / Mw	Conjugado en Mn / Mw	Ps:Pr	Consumo de lisina (CRM197 mol/ mol)	Ps libre / Ps total	Proteína libre / Proteína total
186 / 253 kD	862/1468 kD	1,16	8,2	<1 %	<1 %

EJEMPLO 5

Preparación del serotipo 6C para estudio monovalente de conjugado usando la conjugación con DMSO

El polisacárido se disolvió, se activó químicamente y se intercambió en amortiguador mediante ultrafiltración. El polisacárido activado y CRM197 purificado se liofilizaron individualmente y se volvieron a disolver en DMSO. Las soluciones de polisacárido y CRM197 que se volvieron a disolver se combinaron luego y se conjugaron como se describe a continuación. El conjugado resultante se purificó mediante ultrafiltración antes de una filtración final de 0,2 micrómetros. Varios parámetros de proceso en cada etapa, tal como pH, temperatura, concentración y tiempo, se controlaron para obtener conjugados con atributos deseados.

Oxidación de polisacárido

El polvo de Ps capsular neumocócico purificado se disolvió en agua y se filtró a 0,45 micrómetros. El polisacárido disuelto filtrado se concentró y se diafiltró en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10 kDa con NMWCO.

La solución de polisacárido se ajustó luego hasta 22 °C y pH 5 con un
 5 amortiguador de acetato de sodio para minimizar la reducción de tamaño del polisacárido debido a la activación. La activación de polisacárido se inició con la adición de una solución de 100 mM de metaperiodato de sodio. La cantidad de metaperiodato de sodio agregada fue de 0,10 moles de metaperiodato de sodio por mol de unidad de repetición del polisacárido para alcanzar un nivel
 10 diana de activación de polisacárido (moles de aldehído por mol de la unidad de repetición del polisacárido). La reacción de oxidación continuó durante 2 horas a 22 °C.

El producto activado se diafiltró en 10 mM de fosfato de potasio, pH 6,4 y luego mediante diafiltración en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10 kDa con NMWCO. La ultrafiltración se llevó a cabo a 2-8 °C.

15 *Conjugación de polisacárido con CRM197*

CRM197 purificado, obtenido a través de la expresión en *Pseudomonas fluorescens* como se describió anteriormente (WO 2012/173876 A1), se diafiltró en 2 mM de amortiguador de fosfato, pH 7,2 usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 5 kDa con NMWCO y se filtró a 0,2 micrómetros.

20 Los polisacáridos activados se formularon para la liofilización a 6 mg Ps/ml con concentración de sacarosa de 5 % p/v. CRM197 se formuló para la liofilización a 6 mg Pr/ml con concentración de sacarosa de 1 % p/v.

Las soluciones de Ps y CRM197 formuladas se liofilizaron individualmente. Los materiales de Ps y CRM197 liofilizados se volvieron a disolver de manera individual en
 25 volúmenes iguales de DMSO. Las soluciones de polisacárido y CRM197 se mezclaron para alcanzar una concentración de polisacáridos de 2,2 g Ps/l y una relación de masa de polisacárido con respecto a CRM197 de 1,4. La relación de masa se seleccionó para controlar la relación de polisacárido con respecto a CRM197 en el conjugado resultante. Se agregó cianoborohidruro de sodio (1 mol por mol de unidad de repetición del polisacárido), y la conjugación continuó
 30 durante 15 horas a 22 °C.

Reducción con borohidruro de sodio

Se agregó borohidruro de sodio (2 moles por mol de unidad de repetición del polisacárido) luego de la reacción de conjugación y se incubó durante 3 horas a 22 °C. El lote se
 35 diluyó en 150 mM de cloruro de sodio, con aproximadamente 0,025 % (p/v) de polisorbato 20, a aproximadamente 4°C. El amortiguador de fosfato de potasio se agregó luego para neutralizar el pH. El lote se concentró y se diafiltró a aproximadamente 4°C en 150 mM de cloruro de sodio,

25 mM de fosfato de potasio, pH 7, con el uso de una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 30 kDa con NMWCO.

Filtración final y almacenamiento de producto

5 El lote se concentró y se diafiltró luego en 10 mM de histidina en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0, con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, a 4 °C usando membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 300 kDa con NMWCO.

El lote del concentrado fue filtrado a 0,2 micrómetros, luego se diluyó con 10 mM de histidina adicional en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0 con 0,015 % (p/v) de polisorbato
10 20, distribuido en alícuotas y congelado a ≤ -60 °C.

Tabla 2. Atributos del conjugado de serotipo 6C para el estudio monovalente de conjugación con DMSO

Ps oxidado en Mn / Mw	Conjugado en Mn / Mw	Ps:Pr	Consumo de lisina (CRM197 mol/ mol)	Ps libre / Ps total	Proteína libre / Proteína total
144 / 229 kD	2038 / 4182 kD	1,20	9,2	3,1 %	5,8 %

15 EJEMPLO 6

Preparación del conjugado de serotipo 6C para estudio polivalente usando la conjugación con DMSO

El polisacárido se disolvió, se activó químicamente y se intercambió en amortiguador mediante ultrafiltración. El polisacárido activado y CRM197 purificado se
20 liofilizaron individualmente y se volvieron a disolver en DMSO. Las soluciones de polisacárido y CRM197 que se volvieron a disolver se combinaron luego y se conjugaron como se describe a continuación. El conjugado resultante se purificó mediante ultrafiltración antes de una filtración final de 0,2 micrómetros. Varios parámetros de proceso en cada etapa, tal como pH, temperatura, concentración y tiempo, se controlaron para obtener conjugados con atributos deseados.

25

Oxidación de polisacárido

El polvo de Ps capsular neumocócico purificado se disolvió en agua y se filtró a 0,45 micrómetros. El polisacárido disuelto filtrado se concentró y se diafiltró en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10 kDa con NMWCO.

30 La solución de polisacárido se ajustó luego hasta 22 °C y pH 5 con un amortiguador de acetato de sodio para minimizar la reducción de tamaño del polisacárido debido a la activación. La activación de polisacárido se inició con la adición de una solución de 100 mM de metaperiodato de sodio. La cantidad de metaperiodato de sodio agregada fue de 0,10 moles de

metaperiodato de sodio por mol de unidad de repetición del polisacárido para alcanzar un nivel diana de activación de polisacárido (moles de aldehído por mol de la unidad de repetición del polisacárido). La reacción de oxidación continuó durante 2 horas a 22 °C.

- 5 El producto activado se diafiltró en 10 mM de fosfato de potasio, pH 6,4 y luego mediante diafiltración en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10 kDa con NMWCO. La ultrafiltración se llevó a cabo a 2-8 °C.

Conjugación de polisacárido con CRM197

- 10 CRM197 purificado, obtenido a través de la expresión en *Pseudomonas fluorescens* como se describió anteriormente (WO 2012/173876 A1), se diafiltró en 2 mM de amortiguador de fosfato, pH 7,2 usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 5 kDa con NMWCO y se filtró a 0,2 micrómetros.

- 15 Los polisacáridos activados se formularon para la liofilización a 6 mg Ps/ml con concentración de sacarosa de 5 % p/v. CRM197 se formuló para la liofilización a 6 mg Pr/ml con concentración de sacarosa de 1 % p/v.

- 20 Las soluciones de Ps y CRM197 formuladas se liofilizaron individualmente. Los materiales de Ps y CRM197 liofilizados se volvieron a disolver de manera individual en volúmenes iguales de DMSO. Las soluciones de polisacárido y CRM197 se mezclaron para alcanzar una concentración de polisacáridos de 1,9 g Ps/l y una relación de masa de polisacárido con respecto a CRM197 de 1,4. La relación de masa se seleccionó para controlar la relación de polisacárido con respecto a CRM197 en el conjugado resultante. Se agregó cianoborohidruro de sodio (1 mol por mol de unidad de repetición del polisacárido), y la conjugación continuó durante 15 horas a 22 °C.

Reducción con borohidruro de sodio

- 25 Se agregó borohidruro de sodio (2 moles por mol de unidad de repetición del polisacárido) luego de la reacción de conjugación y se incubó durante 3 horas a 22 °C. El lote se diluyó en 150 mM de cloruro de sodio, con aproximadamente 0,025 % (p/v) de polisorbato 20, a aproximadamente 4°C. El amortiguador de fosfato de potasio se agregó luego para neutralizar el pH. El lote se concentró y se diafiltró a aproximadamente 4°C en 150 mM de cloruro de sodio, 25 mM de fosfato de potasio, pH 7, con el uso de una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 30 kDa con NMWCO.

Filtración final y almacenamiento de producto

- 35 El lote se concentró y se diafiltró luego en 10 mM de histidina en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0, con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, a 4 °C usando membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 300 kDa con NMWCO.

El lote del concentrado fue filtrado a 0,2 micrómetros, luego se diluyó con 10 mM de histidina adicional en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0 con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, distribuido en alícuotas y congelado a ≤ -60 °C.

5 Tabla 3. Atributos del conjugado de serotipo 6C para el estudio polivalente de conjugación con DMSO

Ps oxidado en Mn / Mw	Conjugado en Mn / Mw	Ps:Pr	Consumo de lisina (CRM197 mol/ mol)	Ps libre / Ps total	Proteína libre / Proteína total
144 / 229 kD	2104 / 5006 kD	1,11	8,4	4,9 %	2,2 %

Preparación del conjugado de serotipo 6A para estudios monovalentes usando la conjugación con DMSO

- 10 El polisacárido se disolvió, se activó químicamente y se intercambió en amortiguador mediante ultrafiltración. El polisacárido activado y CRM197 purificado se liofilizaron individualmente y se volvieron a disolver en DMSO. Las soluciones de polisacárido y CRM197 que se volvieron a disolver se combinaron luego y se conjugaron como se describe a continuación. El conjugado resultante se purificó mediante ultrafiltración antes de una filtración
- 15 final de 0,2 micrómetros. Varios parámetros de proceso en cada etapa, tal como pH, temperatura, concentración y tiempo, se controlaron para obtener conjugados con atributos deseados.

Reducción de tamaño y oxidación del polisacárido

- 20 El polvo de Ps capsular neumocócico purificado se disolvió en agua y se filtró a 0,45 micrómetros. El polisacárido disuelto se homogeneizó para reducir la masa molecular de Ps. La presión de homogenización y la cantidad de pasadas por el homogeneizador se controlaron a 200 bar/5 pasadas. El polisacárido de tamaño reducido se concentró y se diafiltró en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10 kDa con NMWCO.

- 25 La solución de polisacárido se ajustó luego hasta 22 °C y pH 5 con un amortiguador de acetato de sodio para minimizar la reducción de tamaño del polisacárido debido a la activación. La activación de polisacárido se inició con la adición de una solución de 100 mM de metaperiodato de sodio. La cantidad de metaperiodato de sodio agregada fue de 0,10 moles de metaperiodato de sodio por mol de unidad de repetición del polisacárido para alcanzar un nivel
- 30 diana de activación de polisacárido (moles de aldehído por mol de la unidad de repetición del polisacárido). La reacción de oxidación continuó durante 2 horas a 22 °C.

El producto activado se diafiltró en 10 mM de fosfato de potasio, pH 6,4 y luego mediante diafiltración en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10 kDa con NMWCO. La ultrafiltración se llevó a cabo a 2-8 °C.

Conjugación de polisacárido con CRM197

CRM197 purificado, obtenido a través de la expresión en *Pseudomonas fluorescens* como se describió anteriormente (WO 2012/173876 A1), se diafiltró en 2 mM de amortiguador de fosfato, pH 7,2 usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 5 kDa con NMWCO y se filtró a 0,2 micrómetros.

Los polisacáridos activados se formularon para la liofilización a 6 mg Ps/ml con concentración de sacarosa de 5 % p/v. CRM197 se formuló para la liofilización a 6 mg Pr/ml con concentración de sacarosa de 1 % p/v.

Las soluciones de Ps y CRM197 formuladas se liofilizaron individualmente. Los materiales de Ps y CRM197 liofilizados se volvieron a disolver de manera individual en volúmenes iguales de DMSO. Las soluciones de polisacárido y CRM197 se mezclaron para alcanzar una concentración de polisacáridos de 1,5 g Ps/l y una relación de masa de polisacárido con respecto a CRM197 de 1,4. La relación de masa se seleccionó para controlar la relación de polisacárido con respecto a CRM197 en el conjugado resultante. Se agregó cianoborohidruro de sodio (1 mol por mol de unidad de repetición del polisacárido), y la conjugación continuó durante 15 horas a 22 °C.

Reducción con borohidruro de sodio

Se agregó borohidruro de sodio (2 moles por mol de unidad de repetición del polisacárido) luego de la reacción de conjugación y se incubó durante 3 horas a 22 °C. El lote se diluyó en 150 mM de cloruro de sodio, con aproximadamente 0,025 % (p/v) de polisorbato 20, a aproximadamente 4 °C. Luego se agregó amortiguador de fosfato de potasio para neutralizar el pH. El lote se concentró y se diafiltró a aproximadamente 4 °C en 150 mM de cloruro de sodio, 25 mM de fosfato de potasio, pH 7, con el uso de una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 30 kDa con NMWCO.

Filtración final y almacenamiento de producto

El lote se concentró y se diafiltró luego en 10 mM de histidina en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0, con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, a 4 °C usando membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 300 kDa con NMWCO.

El lote del concentrado fue filtrado a 0,2 micrómetros, luego se diluyó con 10 mM de histidina adicional en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0 con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, distribuido en alícuotas y congelado a ≤ -60 °C.

Tabla 3a. Atributos del conjugado de serotipo 6A para el estudio monovalente de conjugación con DMSO

Ps oxidado en Mn / Mw	Conjugado en Mn / Mw	Ps:Pr	Consumo de lisina (CRM197 mol/ mol)	Ps libre / Ps total	Proteína libre / Proteína total
238 / 278 kD	2565 / 6310 kD	1,021	9,2	3 %	5 %

EJEMPLO 7

Preparación del conjugado de serotipo 7F para estudio polivalente usando la conjugación con DMSO

- 5 El polisacárido se disolvió, se dimensionó a una masa molecular diana, se activó químicamente y se intercambió en amortiguador mediante ultrafiltración. El polisacárido activado y CRM197 purificado se liofilizaron individualmente y se volvieron a disolver en DMSO. Las soluciones de polisacárido y CRM197 que se volvieron a disolver se combinaron luego y se conjugaron como se describe a continuación. El conjugado resultante se purificó
- 10 mediante ultrafiltración antes de una filtración final de 0,2 micrómetros. Varios parámetros de proceso en cada etapa, tal como pH, temperatura, concentración y tiempo, se controlaron para obtener conjugados con atributos deseados.

Reducción de tamaño y oxidación del polisacárido

- 15 El polvo de Ps capsular neumocócico purificado se disolvió en agua y se filtró a 0,45 micrómetros. El polisacárido disuelto se homogeneizó para reducir la masa molecular de Ps. La presión de homogenización y la cantidad de pasadas por el homogeneizador se controlaron a 150 bar/7 pasadas.

- 20 El polisacárido de tamaño reducido se concentró y se diafiltró en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10 kDa con NMWCO.

- La solución de polisacárido se ajustó luego hasta 22 °C y pH 5 con un amortiguador de acetato de sodio para minimizar la reducción de tamaño del polisacárido debido a la activación. La activación de polisacárido se inició con la adición de una solución de 100 mM de metaperiodato de sodio. La cantidad de metaperiodato de sodio agregada fue de 0,24 moles de metaperiodato de sodio por mol de unidad de repetición del polisacárido para alcanzar un nivel
- 25 diana de activación de polisacárido (moles de aldehído por mol de la unidad de repetición del polisacárido). La reacción de oxidación continuó durante 4 horas a 4 °C.

- El producto activado se diafiltró en 10 mM de fosfato de potasio, pH 6,4 y luego mediante diafiltración en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10
- 30 kDa con NMWCO. La ultrafiltración se llevó a cabo a 2-8 °C.

Conjugación de polisacárido con CRM197

CRM197 purificado, obtenido a través de la expresión en *Pseudomonas fluorescens* como se describió anteriormente (WO 2012/173876 A1), se diafiltró en 2 mM de

amortiguador de fosfato, pH 7,2 usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 5 kDa con NMWCO y se filtró a 0,2 micrómetros.

Los polisacáridos activados se formularon para la liofilización a 6 mg Ps/ml con concentración de sacarosa de 5 % p/v. CRM197 se formuló para la liofilización a 6 mg Pr/ml con
5 concentración de sacarosa de 1 % p/v.

Las soluciones de Ps y CRM197 formuladas se liofilizaron individualmente. Los materiales de Ps y CRM197 liofilizados se volvieron a disolver de manera individual en volúmenes iguales de DMSO. Las soluciones de polisacárido y CRM197 se mezclaron para alcanzar una concentración de polisacáridos de 2,6 g Ps/l y una relación de masa de polisacárido
10 con respecto a CRM197 de 1,5. La relación de masa se seleccionó para controlar la relación de polisacárido con respecto a CRM197 en el conjugado resultante. Se agregó cianoborohidruro de sodio (1 mol por mol de unidad de repetición del polisacárido), y la conjugación continuó durante 4 horas a 22 °C.

15 *Reducción con borohidruro de sodio*

Se agregó borohidruro de sodio (2 moles por mol de unidad de repetición del polisacárido) luego de la reacción de conjugación y se incubó durante 3 horas a 22 °C. El lote se diluyó en 150 mM de cloruro de sodio, con aproximadamente 0,025 % (p/v) de polisorbato 20, a aproximadamente 4°C. El amortiguador de fosfato de potasio se agregó luego para neutralizar el
20 pH. El lote se concentró y se diafiltró a aproximadamente 4°C en 150 mM de cloruro de sodio, 25 mM de fosfato de potasio, pH 7, con el uso de una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 30 kDa con NMWCO.

Filtración final y almacenamiento de producto

25 El lote se concentró y se diafiltró luego en 10 mM de histidina en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0, con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, a 4 °C usando membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 300 kDa con NMWCO.

El lote del concentrado fue filtrado a 0,2 micrómetros, luego se diluyó con 10 mM de histidina adicional en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0 con 0,015 % (p/v) de polisorbato
30 20, distribuido en alícuotas y congelado a ≤ -60 °C.

Tabla 4. Atributos del conjugado de serotipo 7F para el estudio polivalente de conjugación con DMSO

Ps oxidado en Mn / Mw	Conjugado en Mn / Mw	Ps:Pr	Consumo de lisina (CRM197 mol/ mol)	Ps libre / Ps total	Proteína libre / Proteína total
76 / 118 kD	1817 / 4026 kD	1,55	6,7	<1 %	3,2 %

EJEMPLO 8

Preparación del conjugado de serotipo 8 para estudio polivalente usando la conjugación con DMSO

- 5 El polisacárido se disolvió, se dimensionó a una masa molecular diana, se activó químicamente y se intercambió en amortiguador mediante ultrafiltración. El polisacárido activado y CRM197 purificado se liofilizaron individualmente y se volvieron a disolver en DMSO. Las soluciones de polisacárido y CRM197 que se volvieron a disolver se combinaron luego y se conjugaron como se describe a continuación. El conjugado resultante se purificó
10 mediante ultrafiltración antes de una filtración final de 0,2 micrómetros. Varios parámetros de proceso en cada etapa, tal como pH, temperatura, concentración y tiempo, se controlaron para obtener conjugados con atributos deseados.

Reducción de tamaño y oxidación del polisacárido

- 15 El polvo de Ps capsular neumocócico purificado se disolvió en agua y se filtró a 0,45 micrómetros. El polisacárido disuelto se homogeneizó para reducir la masa molecular de Ps. La presión de homogenización y la cantidad de pasadas por el homogeneizador se controlaron a 600 bar/5 pasadas.

- 20 El polisacárido de tamaño reducido se concentró y se diafiltró en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 5 kDa con NMWCO.

- La solución de polisacárido se ajustó luego hasta 22 °C y pH 5 con un amortiguador de acetato de sodio para minimizar la reducción de tamaño del polisacárido debido a la activación. La activación de polisacárido se inició con la adición de una solución de 100 mM de metaperiodato de sodio. La cantidad de metaperiodato de sodio agregada fue de 0,18 moles de
25 metaperiodato de sodio por mol de unidad de repetición del polisacárido para alcanzar un nivel diana de activación de polisacárido (moles de aldehído por mol de la unidad de repetición del polisacárido). La reacción de oxidación continuó durante 4 horas a 22 °C.

- El producto activado se diafiltró en 10 mM de fosfato de potasio, pH 6,4 y luego mediante diafiltración en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 5 kDa
30 con NMWCO. La ultrafiltración se llevó a cabo a 2-8 °C.

Conjugación de polisacárido con CRM197

- CRM197 purificado, obtenido a través de la expresión en *Pseudomonas fluorescens* como se describió anteriormente (WO 2012/173876 A1), se diafiltró en 2 mM de
35 amortiguador de fosfato, pH 7,2 usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 5 kDa con NMWCO y se filtró a 0,2 micrómetros.

Los polisacáridos activados se formularon para la liofilización a 6 mg Ps/ml con concentración de sacarosa de 5 % p/v. CRM197 se formuló para la liofilización a 6 mg Pr/ml con concentración de sacarosa de 1 % p/v.

Las soluciones de Ps y CRM197 formuladas se liofilizaron individualmente. Los materiales de Ps y CRM197 liofilizados se volvieron a disolver de manera individual en volúmenes iguales de DMSO. Las soluciones de polisacárido y CRM197 se mezclaron para alcanzar una concentración de polisacáridos de 4,0 g Ps/l y una relación de masa de polisacárido con respecto a CRM197 de 1,5. La relación de masa se seleccionó para controlar la relación de polisacárido con respecto a CRM197 en el conjugado resultante. Después de la mezcla, la reacción de conjugación continuó durante 2 horas a 22 °C. No se agregó cianoborohidruro de sodio a la reacción de conjugación porque se observó que la adición de cianoborohidruro de sodio podría producir una precipitación irreversible durante la reacción de conjugación para el serotipo 8. La omisión de cianoborohidruro de sodio en la reacción evitó la precipitación sin tener un impacto significativo en los atributos del conjugado.

Reducción con borohidruro de sodio

Se agregó borohidruro de sodio (2 moles por mol de unidad de repetición del polisacárido) luego de la reacción de conjugación y se incubó durante 1 hora a 22 °C. El lote se diluyó en 150 mM de cloruro de sodio, con aproximadamente 0,025 % (p/v) de polisorbato 20, a aproximadamente 4°C. El amortiguador de fosfato de potasio se agregó luego para neutralizar el pH. El lote se concentró y se diafiltró a aproximadamente 4°C en 150 mM de cloruro de sodio, 25 mM de fosfato de potasio, pH 7, con el uso de una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 30 kDa con NMWCO.

Filtración final y almacenamiento de producto

El lote se concentró y se diafiltró luego en 10 mM de histidina en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0, con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, a 4 °C usando membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 300 kDa con NMWCO.

El lote del concentrado fue filtrado a 0,2 micrómetros (con prefiltro a 0,5 micrómetros), luego se diluyó con 10 mM de histidina adicional en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0 con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, distribuido en alícuotas y congelado a ≤ -60 °C.

Tabla 5. Atributos del conjugado de serotipo 8 para el estudio polivalente de conjugación con DMSO

Ps oxidado en Mn / Mw	Conjugado en Mn / Mw	Ps:Pr	Consumo de lisina (CRM197 mol/ mol)	Ps libre / Ps total	Proteína libre / Proteína total
-----------------------------	----------------------------	-------	--	------------------------	---------------------------------------

110 / 128 kD	1479 / 2196 kD	1,17	10,3	3,7 %	<1 %
-----------------	-------------------	------	------	-------	------

EJEMPLO 9

Preparación del conjugado de serotipo 9N para estudio polivalente usando la conjugación con DMSO

- 5 El polisacárido se disolvió, se dimensionó a una masa molecular diana, se activó químicamente y se intercambió en amortiguador mediante ultrafiltración. El polisacárido activado y CRM197 purificado se liofilizaron individualmente y se volvieron a disolver en DMSO. Las soluciones de polisacárido y CRM197 que se volvieron a disolver se combinaron luego y se conjugaron como se describe a continuación. El conjugado resultante se purificó
10 mediante ultrafiltración antes de una filtración final de 0,2 micrómetros. Varios parámetros de proceso en cada etapa, tal como pH, temperatura, concentración y tiempo, se controlaron para obtener conjugados con atributos deseados.

Reducción de tamaño y oxidación del polisacárido

- 15 El polvo de Ps capsular neumocócico purificado se disolvió en agua y se filtró a 0,45 micrómetros. El polisacárido disuelto se homogeneizó para reducir la masa molecular de Ps. La presión de homogenización y la cantidad de pasadas por el homogeneizador se controlaron a 250 bar/5 pasadas.

- 20 El polisacárido de tamaño reducido se concentró y se diafiltró en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10 kDa con NMWCO.

- La solución de polisacárido se ajustó luego hasta 22 °C y pH 5 con un amortiguador de acetato de sodio para minimizar la reducción de tamaño del polisacárido debido a la activación. La activación de polisacárido se inició con la adición de una solución de 100 mM de metaperiodato de sodio. La cantidad de metaperiodato de sodio agregada fue de 0,16 moles de metaperiodato de sodio por mol de unidad de repetición del polisacárido para alcanzar un nivel
25 diana de activación de polisacárido (moles de aldehído por mol de la unidad de repetición del polisacárido). La reacción de oxidación continuó durante 4 horas a 22 °C.

- El producto activado se diafiltró en 10 mM de fosfato de potasio, pH 6,4 y luego mediante diafiltración en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10
30 kDa con NMWCO. La ultrafiltración se llevó a cabo a 2-8 °C.

Conjugación de polisacárido con CRM197

- CRM197 purificado, obtenido a través de la expresión en *Pseudomonas fluorescens* como se describió anteriormente (WO 2012/173876 A1), se diafiltró en 2 mM de
35 amortiguador de fosfato, pH 7,2 usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 5 kDa con NMWCO y se filtró a 0,2 micrómetros.

Los polisacáridos activados se formularon para la liofilización a 6 mg Ps/ml con concentración de sacarosa de 5 % p/v. CRM197 se formuló para la liofilización a 6 mg Pr/ml con concentración de sacarosa de 1 % p/v.

Las soluciones de Ps y CRM197 formuladas se liofilizaron individualmente. Los materiales de Ps y CRM197 liofilizados se volvieron a disolver de manera individual en volúmenes iguales de DMSO. Las soluciones de polisacárido y CRM197 se mezclaron para alcanzar una concentración de polisacáridos de 3,25 g Ps/l y una relación de masa de polisacárido con respecto a CRM197 de 1,5. La relación de masa se seleccionó para controlar la relación de polisacárido con respecto a CRM197 en el conjugado resultante. Se agregó cianoborohidruro de sodio (1 mol por mol de unidad de repetición del polisacárido), y la conjugación continuó durante 1 hora a 22 °C.

Reducción con borohidruro de sodio

Se agregó borohidruro de sodio (2 moles por mol de unidad de repetición del polisacárido) luego de la reacción de conjugación y se incubó durante 1 hora a 22 °C. El lote se diluyó en 150 mM de cloruro de sodio, con aproximadamente 0,025 % (p/v) de polisorbato 20, a aproximadamente 4°C. El amortiguador de fosfato de potasio se agregó luego para neutralizar el pH. El lote se concentró y se diafiltró a aproximadamente 4°C en 150 mM de cloruro de sodio, 25 mM de fosfato de potasio, pH 7, con el uso de una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 30 kDa con NMWCO.

Filtración final y almacenamiento de producto

El lote se concentró y se diafiltró luego en 10 mM de histidina en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0, con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, a 4 °C usando membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 300 kDa con NMWCO.

El lote del concentrado fue filtrado a 0,2 micrómetros, luego se diluyó con 10 mM de histidina adicional en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0 con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, distribuido en alícuotas y congelado a ≤ -60 °C.

Tabla 6. Atributos del conjugado de serotipo 9N para el estudio polivalente de conjugación con DMSO

Ps oxidado en Mn / Mw	Conjugado en Mn / Mw	Ps:Pr	Consumo de lisina (CRM197 mol/ mol)	Ps libre / Ps total	Proteína libre / Proteína total
195 / 226 kD	1407 / 3134 kD	1,33	10,1	1,9 %	<1 %

EJEMPLO 10

Preparación del conjugado de serotipo 10A para estudio monovalente usando la conjugación con DMSO

El polisacárido se disolvió, se dimensionó a una masa molecular diana, se activó químicamente y se intercambió en amortiguador mediante ultrafiltración. El polisacárido
 5 activado y CRM197 purificado se liofilizaron individualmente y se volvieron a disolver en DMSO. Las soluciones de polisacárido y CRM197 que se volvieron a disolver se combinaron luego y se conjugaron como se describe a continuación. El conjugado resultante se purificó mediante ultrafiltración antes de una filtración final de 0,2 micrómetros. Varios parámetros de
 10 proceso en cada etapa, tal como pH, temperatura, concentración y tiempo, se controlaron para obtener conjugados con atributos deseados.

Reducción de tamaño y oxidación del polisacárido

El polvo de Ps capsular neumocócico purificado se disolvió en agua y se filtró a 0,45 micrómetros. El polisacárido disuelto se homogeneizó para reducir la masa molecular de Ps.
 15 La presión de homogenización y la cantidad de pasadas por el homogeneizador se controlaron a 200 bar/5 pasadas y luego 600 bar/5 pasadas para alcanzar una masa molecular diana.

El polisacárido de tamaño reducido se concentró y se diafiltró en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10 kDa con NMWCO.

La solución de polisacárido se ajustó luego hasta 22 °C y pH 5 con un
 20 amortiguador de acetato de sodio para minimizar la reducción de tamaño del polisacárido debido a la activación. La activación de polisacárido se inició con la adición de una solución de 100 mM de metaperiodato de sodio. La cantidad de metaperiodato de sodio agregada fue de 0,15 moles de metaperiodato de sodio por mol de unidad de repetición del polisacárido para alcanzar un nivel
 25 diana de activación de polisacárido (moles de aldehído por mol de la unidad de repetición del polisacárido). La reacción de oxidación continuó durante 2 horas a 22 °C.

El producto activado se diafiltró en 10 mM de fosfato de potasio, pH 6,4 y luego mediante diafiltración en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10 kDa con NMWCO. La ultrafiltración se llevó a cabo a 2-8 °C.

30 *Conjugación de polisacárido con CRM197*

CRM197 purificado, obtenido a través de la expresión en *Pseudomonas fluorescens* como se describió anteriormente (WO 2012/173876 A1), se diafiltró en 2 mM de amortiguador de fosfato, pH 7,2 usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 5 kDa con NMWCO y se filtró a 0,2 micrómetros.

35 Los polisacáridos activados se formularon para la liofilización a 6 mg Ps/ml con concentración de sacarosa de 5 % p/v. CRM197 se formuló para la liofilización a 6 mg Pr/ml con concentración de sacarosa de 1 % p/v.

Las soluciones de Ps y CRM197 formuladas se liofilizaron individualmente. Los materiales de Ps y CRM197 liofilizados se volvieron a disolver de manera individual en volúmenes iguales de DMSO. Las soluciones de polisacárido y CRM197 se mezclaron para alcanzar una concentración de polisacáridos de 5,0 g Ps/l y una relación de masa de polisacárido con respecto a CRM197 de 2,0. La relación de masa se seleccionó para controlar la relación de polisacárido con respecto a CRM197 en el conjugado resultante. Se agregó cianoborohidruro de sodio (1 mol por mol de unidad de repetición del polisacárido), y la conjugación continuó durante 4 horas a 22 °C.

10 *Reducción con borohidruro de sodio*

Se agregó borohidruro de sodio (2 moles por mol de unidad de repetición del polisacárido) luego de la reacción de conjugación y se incubó durante 1 hora a 22 °C. El lote se diluyó en 150 mM de cloruro de sodio, con aproximadamente 0,025 % (p/v) de polisorbato 20, a aproximadamente 4°C. El amortiguador de fosfato de potasio se agregó luego para neutralizar el pH. El lote se concentró y se diafiltró a aproximadamente 4°C en 150 mM de cloruro de sodio, 25 mM de fosfato de potasio, pH 7, con el uso de una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 30 kDa con NMWCO.

Filtración final y almacenamiento de producto

El lote se concentró y se diafiltró luego en 10 mM de histidina en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0, con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, a 4 °C usando membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 300 kDa con NMWCO.

El lote del concentrado fue filtrado a 0,2 micrómetros (con prefiltro a 0,5 micrómetros), luego se diluyó con 10 mM de histidina adicional en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0 con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, distribuido en alícuotas y congelado a ≤ -60 °C.

Tabla 7. Atributos del conjugado de serotipo 10A para el estudio monovalente de conjugación con DMSO

Ps oxidado en Mn / Mw	Conjugado en Mn / Mw	Ps:Pr	Consumo de lisina (CRM197 mol/ mol)	Ps libre / Ps total	Proteína libre / Proteína total
76 / 111 kD	5137 / 7061 kD	1,13	5,1	<1 %	15 %

30

EJEMPLO 11

Preparación del conjugado de serotipo 10A para estudio polivalente usando la conjugación con DMSO

El polisacárido se disolvió, se dimensionó a una masa molecular diana, se activó químicamente y se intercambió en amortiguador mediante ultrafiltración. El polisacárido activado y CRM197 purificado se liofilizaron individualmente y se volvieron a disolver en DMSO. Las soluciones de polisacárido y CRM197 que se volvieron a disolver se combinaron luego y se conjugaron como se describe a continuación. El conjugado resultante se purificó mediante ultrafiltración antes de una filtración final de 0,2 micrómetros. Varios parámetros de proceso en cada etapa, tal como pH, temperatura, concentración y tiempo, se controlaron para obtener conjugados con atributos deseados.

10 *Reducción de tamaño y oxidación del polisacárido*

El polvo de Ps capsular neumocócico purificado se disolvió en agua y se filtró a 0,45 micrómetros. El polisacárido disuelto se homogeneizó para reducir la masa molecular de Ps. La presión de homogenización y la cantidad de pasadas por el homogeneizador se controlaron a 600 bar/5 pasadas.

15 El polisacárido de tamaño reducido se concentró y se diafiltró en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10 kDa con NMWCO.

La solución de polisacárido se ajustó luego hasta 22 °C y pH 5 con un amortiguador de acetato de sodio para minimizar la reducción de tamaño del polisacárido debido a la activación. La activación de polisacárido se inició con la adición de una solución de 100 mM de metaperiodato de sodio. La cantidad de metaperiodato de sodio agregada fue de 0,16 moles de metaperiodato de sodio por mol de unidad de repetición del polisacárido para alcanzar un nivel diana de activación de polisacárido (moles de aldehído por mol de la unidad de repetición del polisacárido). La reacción de oxidación continuó durante 2 horas a 22 °C.

25 El producto activado se diafiltró en 10 mM de fosfato de potasio, pH 6,4 y luego mediante diafiltración en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10 kDa con NMWCO. La ultrafiltración se llevó a cabo a 2-8 °C.

Conjugación de polisacárido con CRM197

CRM197 purificado, obtenido a través de la expresión en *Pseudomonas fluorescens* como se describió anteriormente (WO 2012/173876 A1), se diafiltró en 2 mM de amortiguador de fosfato, pH 7,2 usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 5 kDa con NMWCO y se filtró a 0,2 micrómetros.

Los polisacáridos activados se formularon para la liofilización a 6 mg Ps/ml con concentración de sacarosa de 5 % p/v. CRM197 se formuló para la liofilización a 6 mg Pr/ml con concentración de sacarosa de 1 % p/v.

Las soluciones de Ps y CRM197 formuladas se liofilizaron individualmente. Los materiales de Ps y CRM197 liofilizados se volvieron a disolver de manera individual en volúmenes iguales de DMSO. Las soluciones de polisacárido y CRM197 se mezclaron para

alcanzar una concentración de polisacáridos de 4,0 g Ps/l y una relación de masa de polisacárido con respecto a CRM197 de 1,75. La relación de masa se seleccionó para controlar la relación de polisacárido con respecto a CRM197 en el conjugado resultante. Se agregó cianoborohidruro de sodio (1 mol por mol de unidad de repetición del polisacárido), y la conjugación continuó durante 4 horas a 22 °C.

Reducción con borohidruro de sodio

Se agregó borohidruro de sodio (2 moles por mol de unidad de repetición del polisacárido) luego de la reacción de conjugación y se incubó durante 1 hora a 22 °C. El lote se diluyó en 150 mM de cloruro de sodio, con aproximadamente 0,025 % (p/v) de polisorbato 20, a aproximadamente 4°C. El amortiguador de fosfato de potasio se agregó luego para neutralizar el pH. El lote se concentró y se diafiltró a aproximadamente 4°C en 150 mM de cloruro de sodio, 25 mM de fosfato de potasio, pH 7, con el uso de una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 30 kDa con NMWCO.

Filtración final y almacenamiento de producto

El lote se concentró y se diafiltró luego en 10 mM de histidina en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0, con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, a 4 °C usando membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 300 kDa con NMWCO.

El lote del concentrado fue filtrado a 0,2 micrómetros (con prefiltro a 0,5 micrómetros), luego se diluyó con 10 mM de histidina adicional en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0 con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, distribuido en alícuotas y congelado a ≤ -60 °C.

Tabla 8. Atributos del conjugado de serotipo 10A para el estudio polivalente de conjugación con DMSO

Ps oxidado en Mn / Mw	Conjugado en Mn / Mw	Ps:Pr	Consumo de lisina (CRM197 mol/ mol)	Ps libre / Ps total	Proteína libre / Proteína total
94 / 130 kD	1540 / 3000 kD	1,54	7,7	8,5 %	<1 %

EJEMPLO 12

5 Preparación del conjugado de serotipo 11A para estudio polivalente usando la conjugación con DMSO

El polisacárido se disolvió, se dimensionó a una masa molecular diana, se activó químicamente y se intercambió en amortiguador mediante ultrafiltración. El polisacárido activado y CRM197 purificado se liofilizaron individualmente y se volvieron a disolver en DMSO. Las soluciones de polisacárido y CRM197 que se volvieron a disolver se combinaron luego y se conjugaron como se describe a continuación. El conjugado resultante se purificó mediante ultrafiltración antes de una filtración final de 0,2 micrómetros. Varios parámetros de proceso en cada etapa, tal como pH, temperatura, concentración y tiempo, se controlaron para obtener conjugados con atributos deseados.

15

Reducción de tamaño y oxidación del polisacárido

El polvo de Ps capsular neumocócico purificado se disolvió en agua y se filtró a 0,45 micrómetros. Se redujo el tamaño del polisacárido disuelto mediante hidrólisis ácida mediante la adición de 200 mM de ácido acético, la incubación a 92 °C durante 75 minutos, y la neutralización agregando 400 mM de amortiguador de fosfato de potasio frío, pH 7.

20

El polisacárido de tamaño reducido se concentró y se diafiltró en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 5 kDa con NMWCO.

25

La solución de polisacárido se ajustó luego hasta 22 °C y pH 5 con un amortiguador de acetato de sodio para minimizar la reducción de tamaño del polisacárido debido a la activación. La activación de polisacárido se inició con la adición de una solución de 100 mM de metaperiodato de sodio. La cantidad de metaperiodato de sodio agregada fue de 0,13 moles de metaperiodato de sodio por mol de unidad de repetición del polisacárido para alcanzar un nivel diana de activación de polisacárido (moles de aldehído por mol de la unidad de repetición del polisacárido). La reacción de oxidación continuó durante 2 horas a 22 °C.

30

El producto activado se diafiltró en 10 mM de fosfato de potasio, pH 6,4 y luego mediante diafiltración en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 5 kDa con NMWCO. La ultrafiltración se llevó a cabo a 2-8 °C.

Conjugación de polisacárido con CRM197

CRM197 purificado, obtenido a través de la expresión en *Pseudomonas fluorescens* como se describió anteriormente (WO 2012/173876 A1), se diafiltró en 2 mM de amortiguador de fosfato, pH 7,2 usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 5 kDa con NMWCO y se filtró a 0,2 micrómetros.

5 Los polisacáridos activados se formularon para la liofilización a 6 mg Ps/ml con concentración de sacarosa de 5 % p/v. CRM197 se formuló para la liofilización a 6 mg Pr/ml con concentración de sacarosa de 1 % p/v.

Las soluciones de Ps y CRM197 formuladas se liofilizaron individualmente. Los materiales de Ps y CRM197 liofilizados se volvieron a disolver de manera individual en volúmenes iguales de DMSO que contenían 25 mM de cloruro de sodio. Las soluciones de polisacárido y CRM197 se mezclaron para alcanzar una concentración de polisacáridos de 3,5 g Ps/l y una relación de masa de polisacárido con respecto a CRM197 de 1,5. La relación de masa se seleccionó para controlar la relación de polisacárido con respecto a CRM197 en el conjugado resultante. Se agregó cianoborohidruro de sodio (1 mol por mol de unidad de repetición del polisacárido), y la conjugación continuó durante 4 horas a 22 °C.

Reducción con borohidruro de sodio

Se agregó borohidruro de sodio (2 moles por mol de unidad de repetición del polisacárido) luego de la reacción de conjugación y se incubó durante 1 hora a 22 °C. El lote se diluyó en 150 mM de cloruro de sodio, con aproximadamente 0,025 % (p/v) de polisorbato 20, a aproximadamente 4°C. El amortiguador de fosfato de potasio se agregó luego para neutralizar el pH. El lote se concentró y se diafiltró a aproximadamente 4°C en 150 mM de cloruro de sodio, 25 mM de fosfato de potasio, pH 7, con el uso de una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 30 kDa con NMWCO.

25

Filtración final y almacenamiento de producto

El lote se concentró y se diafiltró luego en 10 mM de histidina en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0, con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, a 4 °C usando membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 300 kDa con NMWCO.

30

El lote del concentrado fue filtrado a 0,2 micrómetros (con prefiltro a 0,5 micrómetros), luego se diluyó con 10 mM de histidina adicional en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0 con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, distribuido en alícuotas y congelado a ≤ -60 °C.

Tabla 9. Atributos del conjugado de serotipo 11A para el estudio polivalente de conjugación con DMSO

Ps oxidado en Mn / Mw	Conjugado en Mn / Mw	Ps:Pr	Consumo de lisina (CRM197 mol/ mol)	Ps libre / Ps total	Proteína libre / Proteína total
63 / 96 kD	1584 / 2804 kD	0,89	7,4	2,2 %	2,8 %

EJEMPLO 13

- 5 Preparación del conjugado de serotipo 12F para estudio polivalente usando la conjugación con DMSO

El polisacárido se disolvió, se dimensionó a una masa molecular diana, se activó químicamente y se intercambió en amortiguador mediante ultrafiltración. El polisacárido activado y CRM197 purificado se liofilizaron individualmente y se volvieron a disolver en DMSO. Las soluciones de polisacárido y CRM197 que se volvieron a disolver se combinaron luego y se conjugaron como se describe a continuación. El conjugado resultante se purificó mediante ultrafiltración antes de una filtración final de 0,2 micrómetros. Varios parámetros de proceso en cada etapa, tal como pH, temperatura, concentración y tiempo, se controlaron para obtener conjugados con atributos deseados.

15

Reducción de tamaño y oxidación del polisacárido

- El polvo de Ps capsular neumocócico purificado se disolvió en agua y se filtró a 0,45 micrómetros. Se redujo el tamaño del polisacárido disuelto mediante hidrólisis ácida mediante la adición de 200 mM de ácido acético, la incubación a 90 °C durante 45 minutos, y la neutralización agregando 400 mM de amortiguador de fosfato de potasio frío, pH 7.

- 20 El polisacárido de tamaño reducido se concentró y se diafiltró en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 5 kDa con NMWCO.

- La solución de polisacárido se ajustó luego hasta 22 °C y pH 5 con un amortiguador de acetato de sodio para minimizar la reducción de tamaño del polisacárido debido a la activación. La activación de polisacárido se inició con la adición de una solución de 100 mM de metaperiodato de sodio. La cantidad de metaperiodato de sodio agregada fue de 0,26 moles de metaperiodato de sodio por mol de unidad de repetición del polisacárido para alcanzar un nivel diana de activación de polisacárido (moles de aldehído por mol de la unidad de repetición del polisacárido). La reacción de oxidación continuó durante 2 horas a 22 °C.

- 30 El producto activado se diafiltró en 10 mM de fosfato de potasio, pH 6,4 y luego mediante diafiltración en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 5 kDa con NMWCO. La ultrafiltración se llevó a cabo a 2-8 °C.

Conjugación de polisacárido con CRM197

CRM197 purificado, obtenido a través de la expresión en *Pseudomonas fluorescens* como se describió anteriormente (WO 2012/173876 A1), se diafiltró en 2 mM de amortiguador de fosfato, pH 7,2 usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 5 kDa con NMWCO y se filtró a 0,2 micrómetros.

Los polisacáridos activados se formularon para la liofilización a 6 mg Ps/ml con concentración de sacarosa de 5 % p/v. CRM197 se formuló para la liofilización a 6 mg Pr/ml con concentración de sacarosa de 1 % p/v.

Las soluciones de Ps y CRM197 formuladas se liofilizaron individualmente. Los materiales de Ps y CRM197 liofilizados se volvieron a disolver de manera individual en volúmenes iguales de DMSO que contenían 25 mM de cloruro de sodio. Las soluciones de polisacárido y CRM197 se mezclaron para alcanzar una concentración de polisacáridos de 3,0 g Ps/l y una relación de masa de polisacárido con respecto a CRM197 de 1,5. La relación de masa se seleccionó para controlar la relación de polisacárido con respecto a CRM197 en el conjugado resultante. Se agregó cianoborohidruro de sodio (1 mol por mol de unidad de repetición del polisacárido), y la conjugación continuó durante 4 horas a 22 °C.

Reducción con borohidruro de sodio

Se agregó borohidruro de sodio (2 moles por mol de unidad de repetición del polisacárido) luego de la reacción de conjugación y se incubó durante 3 horas a 22 °C. El lote se diluyó en 150 mM de cloruro de sodio, con aproximadamente 0,025 % (p/v) de polisorbato 20, a aproximadamente 4°C. El amortiguador de fosfato de potasio se agregó luego para neutralizar el pH. El lote se concentró y se diafiltró a aproximadamente 4°C en 150 mM de cloruro de sodio, 25 mM de fosfato de potasio, pH 7, con el uso de una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 30 kDa con NMWCO.

Filtración final y almacenamiento de producto

El lote se concentró y se diafiltró luego en 10 mM de histidina en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0, con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, a 4 °C usando membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 300 kDa con NMWCO.

El lote del concentrado fue filtrado a 0,2 micrómetros, luego se diluyó con 10 mM de histidina adicional en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0 con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, distribuido en alícuotas y congelado a ≤ -60 °C.

Tabla 10. Atributos del conjugado de serotipo 12F para el estudio polivalente de conjugación con DMSO

Ps oxidado en Mn / Mw	Conjugado en Mn / Mw	Ps:Pr	Consumo de lisina (CRM197 mol/ mol)	Ps libre / Ps total	Proteína libre / Proteína total
54 / 73 kD	1766 / 3119 Kd	1,20	9,6	1,3 %	1,5 %

EJEMPLO 14

Preparación del conjugado de serotipo 15A para estudio monovalente usando la conjugación con DMSO

- 5 El polisacárido se disolvió, se dimensionó a una masa molecular diana, se activó químicamente y se intercambió en amortiguador mediante ultrafiltración. El polisacárido activado y CRM197 purificado se liofilizaron individualmente y se volvieron a disolver en DMSO. Las soluciones de polisacárido y CRM197 que se volvieron a disolver se combinaron luego y se conjugaron como se describe a continuación. El conjugado resultante se purificó
- 10 mediante ultrafiltración antes de una filtración final de 0,2 micrómetros. Varios parámetros de proceso en cada etapa, tal como pH, temperatura, concentración y tiempo, se controlaron para obtener conjugados con atributos deseados.

Reducción de tamaño y oxidación del polisacárido

- 15 El polvo de Ps capsular neumocócico purificado se disolvió en agua y se filtró a 0,45 micrómetros. El polisacárido disuelto se homogeneizó para reducir la masa molecular de Ps. La presión de homogenización y la cantidad de pasadas por el homogeneizador se controlaron a 200 bar/5 pasadas.

- 20 El polisacárido de tamaño reducido se concentró y se diafiltró en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10 kDa con NMWCO.

- La solución de polisacárido se ajustó luego hasta 22 °C y pH 5 con un amortiguador de acetato de sodio para minimizar la reducción de tamaño del polisacárido debido a la activación. La activación de polisacárido se inició con la adición de una solución de 100 mM de metaperiodato de sodio. La cantidad de metaperiodato de sodio agregada fue de 1,75 moles de metaperiodato de sodio por mol de unidad de repetición del polisacárido para alcanzar un nivel
- 25 diana de activación de polisacárido (moles de aldehído por mol de la unidad de repetición del polisacárido). La reacción de oxidación continuó durante 20 horas a 22 °C.

- El producto activado se diafiltró en 10 mM de fosfato de potasio, pH 6,4 y luego mediante diafiltración en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10
- 30 kDa con NMWCO. La ultrafiltración se llevó a cabo a 2-8 °C.

Conjugación de polisacárido con CRM197

CRM197 purificado, obtenido a través de la expresión en *Pseudomonas fluorescens* como se describió anteriormente (WO 2012/173876 A1), se diafiltró en 2 mM de amortiguador de fosfato, pH 7,2 usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 5 kDa con NMWCO y se filtró a 0,2 micrómetros.

5 Los polisacáridos activados se formularon para la liofilización a 6 mg Ps/ml con concentración de sacarosa de 5 % p/v. CRM197 se formuló para la liofilización a 6 mg Pr/ml con concentración de sacarosa de 1 % p/v.

Las soluciones de Ps y CRM197 formuladas se liofilizaron individualmente. Los materiales de Ps y CRM197 liofilizados se volvieron a disolver de manera individual en volúmenes iguales de DMSO que contenían 25 mM de cloruro de sodio. Las soluciones de polisacárido y CRM197 se mezclaron para alcanzar una concentración de polisacáridos de 6,0 g Ps/l y una relación de masa de polisacárido con respecto a CRM197 de 2,0. La relación de masa se seleccionó para controlar la relación de polisacárido con respecto a CRM197 en el conjugado resultante. Se agregó cianoborohidruro de sodio (1 mol por mol de unidad de repetición del polisacárido), y la conjugación continuó durante 2,5 horas a 22 °C.

Reducción con borohidruro de sodio

Se agregó borohidruro de sodio (2 moles por mol de unidad de repetición del polisacárido) luego de la reacción de conjugación y se incubó durante 1 hora a 22 °C. El lote se diluyó en 150 mM de cloruro de sodio, con aproximadamente 0,025 % (p/v) de polisorbato 20, a aproximadamente 4°C. El amortiguador de fosfato de potasio se agregó luego para neutralizar el pH. El lote se concentró y se diafiltró a aproximadamente 4°C en 150 mM de cloruro de sodio, 25 mM de fosfato de potasio, pH 7, con el uso de una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 30 kDa con NMWCO.

25

Filtración final y almacenamiento de producto

El lote se concentró y se diafiltró luego en 10 mM de histidina en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0, con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, a 4 °C usando membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 300 kDa con NMWCO.

30

El lote del concentrado fue filtrado a 0,2 micrómetros (con prefiltro a 0,5 micrómetros), luego se diluyó con 10 mM de histidina adicional en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0 con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, distribuido en alícuotas y congelado a ≤ -60 °C.

Tabla 11. Atributos del conjugado de serotipo 15A para el estudio monovalente de conjugación con DMSO

Ps oxidado en Mn / Mw	Conjugado en Mn / Mw	Ps:Pr	Consumo de lisina (CRM197 mol/ mol)	Ps libre / Ps total	Proteína libre / Proteína total
158 / 200 kD	6949 / 9235 kD	1,05	9,7	10 %	5,0 %

EJEMPLO 15

- 5 Preparación del conjugado de serotipo 15A para el estudio de protección cruzada de 15A/B/C usando conjugación acuosa

El polisacárido se disolvió, se redujo su tamaño, se activó químicamente y se intercambió en amortiguador mediante ultrafiltración. El CRM197 purificado se conjugó luego en el polisacárido activado con el uso de cloruro de níquel en la mezcla de reacción acuosa, y el
10 conjugado resultante se purificó mediante ultrafiltración antes de una filtración final de 0,2 micrómetros. Varios parámetros de proceso en cada etapa, tal como pH, temperatura, concentración y tiempo, se controlaron para obtener conjugados con atributos deseados.

Reducción de tamaño y oxidación del polisacárido

- 15 El polisacárido capsular neumocócico purificado se disolvió en agua y se filtró a 0,45 micrómetros. El polisacárido disuelto se homogeneizó para reducir la masa molecular. La presión de homogenización y la cantidad de pasadas por el homogeneizador se controlaron a 200 bar/5 pasadas para alcanzar una masa molecular diana. El polisacárido de tamaño reducido se concentró luego y se diafiltró en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial
20 10 kDa con NMWCO.

- La solución de polisacárido se ajustó luego hasta 22 °C y pH 5 con un amortiguador de acetato de sodio para minimizar la reducción de tamaño del polisacárido debido a la activación. La activación de polisacárido se inició con la adición de una solución de 100 mM de metaperiodato de sodio. La cantidad de metaperiodato de sodio agregado fue de 0,45 moles de
25 metaperiodato de sodio por mol de la unidad de repetición del polisacárido. La reacción de oxidación continuó durante 20 horas a 22 °C. El producto activado fue diafiltrado en 10 mM de fosfato de potasio, pH 6,4 con el uso de una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10 kDa con NMWCO. La ultrafiltración se llevó a cabo a 2-8 °C. La activación adicional se alcanzó con el ajuste del producto ultrafiltrado hasta 22 °C y pH 5. La activación se llevó a cabo con la
30 adición de 100 mM de solución de metaperiodato de sodio con una carga de 2,0 moles de metaperiodato de sodio por mol de unidad de repetición del polisacárido para alcanzar un nivel diana de activación de polisacárido (moles de aldehído por mol de la unidad de repetición del polisacárido). La reacción de oxidación continuó durante 20 horas a 22 °C. El segundo producto

activado fue diafiltrado en 10 mM de fosfato de potasio, pH 6,4 con el uso de una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10 kDa con NMWCO. La ultrafiltración se llevó a cabo a 2-8 °C.

5 *Conjugación de polisacárido con CRM197*

La solución de polisacárido oxidada se mezcló con agua y 1,5 M de fosfato de potasio, pH 6,0. El pH del amortiguador se seleccionó para mejorar la estabilidad del polisacárido activado durante la reacción de conjugación. El CRM197 purificado, obtenido mediante la expresión en *Pseudomonas fluorescens* como se describió anteriormente (WO 2012/173876 A1), se filtró a 0,2 micrómetros y se combinó con la solución de polisacárido amortiguado en una relación de masa de polisacárido con respecto a CRM197 de 0,6. La relación de masa se seleccionó para controlar la relación de polisacárido con respecto a CRM197 en el conjugado resultante. Las concentraciones de polisacáridos y fosfatos fueron de 9,75 g/l y 100 mM respectivamente. La concentración de polisacáridos se seleccionó para controlar el tamaño del conjugado resultante. El cloruro de níquel se agregó a aproximadamente 2 mM usando una solución de cloruro de níquel de 100 mM. Se agregó cianoborohidruro de sodio (2 moles por mol de unidad de repetición del polisacárido). La conjugación continuó durante 148 horas a 10 °C para maximizar el consumo de polisacárido y proteína.

20 *Reducción con borohidruro de sodio*

Luego de la reacción de conjugación, el lote se diluyó a una concentración de polisacáridos de aproximadamente 3,0 g/l, se enfrió hasta 2-8 °C, y se filtró a 1,2 micrómetros. El lote se diafiltró en 100 mM de fosfato de potasio, pH 7,0 a 2-8 °C con el uso de una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 100 kDa con NMWCO. El lote, recuperado en el concentrado, se diluyó luego en aproximadamente 2,0 g de polisacárido/l y se ajustó el pH con la adición de 1,2 M de bicarbonato de sodio, pH 9,4. Se agregó borohidruro de sodio (1 mol por mol de unidad de repetición del polisacárido). Luego se agregó 1,5 M de fosfato de potasio, pH 6,0.

30 *Filtración final y almacenamiento de producto*

El lote se concentró y se diafiltró luego en 10 mM de L-histidina en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0 a 4 °C usando membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 300 kDa con NMWCO. Se agregó polisorbato 20 al lote de concentrado a una concentración de 0,05 % (p/v), luego se filtró el lote a 0,2 micrómetros (con prefiltro a 0,5 micrómetros).

El lote se ajustó a una concentración de polisacáridos de 1,0 g/l con 10 mM de L-histidina adicionales en 150 mM de amortiguador de cloruro de sodio, pH 7,0 con 0,03 % (p/v) de polisorbato 20. El lote se distribuyó en alícuotas y se congeló a ≤ -60 °C.

Tabla 12. Atributos del conjugado de serotipo 15A para el estudio de protección cruzada de 15A/B/C con conjugación acuosa

Ps oxidado en Mn / Mw	Conjugado en Mn / Mw	Ps:Pr	Consumo de lisina (CRM197 mol/ mol)	Ps libre / Ps total	Proteína libre / Proteína total
118 / 154 kDa	465 / 695 kDa	0,99	4,5	9,6 %	<1 %

EJEMPLO 16

5 Preparación del conjugado de serotipo 15A para estudio polivalente usando la conjugación con DMSO

El polisacárido se disolvió, se dimensionó a una masa molecular diana, se activó químicamente y se intercambió en amortiguador mediante ultrafiltración. El polisacárido activado y CRM197 purificado se liofilizaron individualmente y se volvieron a disolver en DMSO. Las soluciones de polisacárido y CRM197 que se volvieron a disolver se combinaron luego y se conjugaron como se describe a continuación. El conjugado resultante se purificó mediante ultrafiltración antes de una filtración final de 0,2 micrómetros. Varios parámetros de proceso en cada etapa, tal como pH, temperatura, concentración y tiempo, se controlaron para obtener conjugados con atributos deseados.

15

Reducción de tamaño y oxidación del polisacárido

El polvo de Ps capsular neumocócico purificado se disolvió en agua y se filtró a 0,45 micrómetros. El polisacárido disuelto se homogeneizó para reducir la masa molecular de Ps. La presión de homogenización y la cantidad de pasadas por el homogeneizador se controlaron a 200 bar/5 pasadas.

20

El polisacárido de tamaño reducido se concentró y se diafiltró en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10 kDa con NMWCO.

La solución de polisacárido se ajustó luego hasta 22 °C y pH 5 con un amortiguador de acetato de sodio para minimizar la reducción de tamaño del polisacárido debido a la activación. La activación de polisacárido se inició con la adición de una solución de 100 mM de metaperiodato de sodio. La cantidad de metaperiodato de sodio agregada fue de 1,75 moles de metaperiodato de sodio por mol de unidad de repetición del polisacárido para alcanzar un nivel diana de activación de polisacárido (moles de aldehído por mol de la unidad de repetición del polisacárido). La reacción de oxidación continuó durante 20 horas a 22 °C.

30

El producto activado se diafiltró en 10 mM de fosfato de potasio, pH 6,4 y luego mediante diafiltración en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10 kDa con NMWCO. La ultrafiltración se llevó a cabo a 2-8 °C.

Conjugación de polisacárido con CRM197

CRM197 purificado, obtenido a través de la expresión en *Pseudomonas fluorescens* como se describió anteriormente (WO 2012/173876 A1), se diafiltró en 2 mM de amortiguador de fosfato, pH 7,2 usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 5 kDa con NMWCO y se filtró a 0,2 micrómetros.

Los polisacáridos activados se formularon para la liofilización a 6 mg Ps/ml con concentración de sacarosa de 5 % p/v. CRM197 se formuló para la liofilización a 6 mg Pr/ml con concentración de sacarosa de 1 % p/v.

Las soluciones de Ps y CRM197 formuladas se liofilizaron individualmente. Los materiales de Ps y CRM197 liofilizados se volvieron a disolver de manera individual en volúmenes iguales de DMSO que se precalentó hasta 34 °C. La solución de polisacárido solución alcanzó su nivel máximo con cloruro de sodio a una concentración de 50 mM. Las soluciones de polisacárido y CRM197 se mezclaron para alcanzar una concentración de polisacáridos de 5,0 g Ps/l y una relación de masa de polisacárido con respecto a CRM197 de 2,0. La relación de masa se seleccionó para controlar la relación de polisacárido con respecto a CRM197 en el conjugado resultante. Se agregó cianoborohidruro de sodio (1 mol por mol de unidad de repetición del polisacárido), y la conjugación continuó durante 2 horas a 34 °C.

Reducción con borohidruro de sodio

Se agregó borohidruro de sodio (2 moles por mol de unidad de repetición del polisacárido) luego de la reacción de conjugación y se incubó durante 1 hora a 22 °C. El lote se diluyó en 150 mM de cloruro de sodio, con aproximadamente 0,025 % (p/v) de polisorbato 20, a aproximadamente 4°C. El amortiguador de fosfato de potasio se agregó luego para neutralizar el pH. El lote se concentró y se diafiltró a aproximadamente 4°C en 150 mM de cloruro de sodio, 25 mM de fosfato de potasio, pH 7, con el uso de una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 30 kDa con NMWCO.

Filtración final y almacenamiento de producto

El lote se concentró y se diafiltró luego en 10 mM de histidina en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0, con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, a 4 °C usando membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 300 kDa con NMWCO.

El lote del concentrado fue filtrado a 0,2 micrómetros, luego se diluyó con 10 mM de histidina adicional en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0 con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, distribuido en alícuotas y congelado a ≤ -60 °C.

Tabla 13. Atributos del conjugado de serotipo 15A para el estudio polivalente de conjugación con DMSO

Ps oxidado en Mn / Mw	Conjugado en Mn / Mw	Ps:Pr	Consumo de lisina (CRM197 mol/ mol)	Ps libre / Ps total	Proteína libre / Proteína total
214 / 231 kD	1628 / 3518 kD	1,57	7,3	17 %	7,8 %

EJEMPLO 17

Preparación del conjugado de serotipo 15B para el estudio de protección cruzada de 15A/B/C usando conjugación con DMSO

- 5 El polisacárido se disolvió, se dimensionó a una masa molecular diana, se activó químicamente y se intercambió en amortiguador mediante ultrafiltración. El polisacárido activado y CRM197 purificado se liofilizaron individualmente y se volvieron a disolver en DMSO. Las soluciones de polisacárido y CRM197 que se volvieron a disolver se combinaron luego y se conjugaron como se describe a continuación. El conjugado resultante se purificó
- 10 mediante ultrafiltración antes de una filtración final de 0,2 micrómetros. Varios parámetros de proceso en cada etapa, tal como pH, temperatura, concentración y tiempo, se controlaron para obtener conjugados con atributos deseados.

Reducción de tamaño y oxidación del polisacárido

- 15 El polvo de Ps capsular neumocócico purificado se disolvió en agua y se filtró a 0,45 micrómetros. El polisacárido disuelto se homogeneizó para reducir la masa molecular de Ps. La presión de homogenización y la cantidad de pasadas por el homogeneizador se controlaron a 300 bar/5 pasadas.

- 20 El polisacárido de tamaño reducido se concentró y se diafiltró en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10 kDa con NMWCO.

- La solución de polisacárido se ajustó luego hasta 22 °C y pH 5 con un amortiguador de acetato de sodio para minimizar la reducción de tamaño del polisacárido debido a la activación. La activación de polisacárido se inició con la adición de una solución de 100 mM de metaperiodato de sodio. La cantidad de metaperiodato de sodio agregada fue de 0,20 moles de
- 25 metaperiodato de sodio por mol de unidad de repetición del polisacárido para alcanzar un nivel diana de activación de polisacárido (moles de aldehído por mol de la unidad de repetición del polisacárido). La reacción de oxidación continuó durante 4 horas a 22 °C.

- El producto activado se diafiltró en 10 mM de fosfato de potasio, pH 6,4 y luego mediante diafiltración en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10
- 30 kDa con NMWCO. La ultrafiltración se llevó a cabo a 2-8 °C.

Conjugación de polisacárido con CRM197

CRM197 purificado, obtenido a través de la expresión en *Pseudomonas fluorescens* como se describió anteriormente (WO 2012/173876 A1), se diafiltró en 2 mM de amortiguador de fosfato, pH 7,2 usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 5 kDa con NMWCO y se filtró a 0,2 micrómetros.

5 Los polisacáridos activados se formularon para la liofilización a 6 mg Ps/ml con concentración de sacarosa de 5 % p/v. CRM197 se formuló para la liofilización a 6 mg Pr/ml con concentración de sacarosa de 1 % p/v.

Las soluciones de Ps y CRM197 formuladas se liofilizaron individualmente. Los materiales de Ps y CRM197 liofilizados se volvieron a disolver de manera individual en volúmenes iguales de DMSO. Las soluciones de polisacárido y CRM197 se mezclaron para 10 alcanzar una concentración de polisacáridos de 3,0 g Ps/l y una relación de masa de polisacárido con respecto a CRM197 de 2,0. La relación de masa se seleccionó para controlar la relación de polisacárido con respecto a CRM197 en el conjugado resultante. Se agregó cianoborohidruro de sodio (1 mol por mol de unidad de repetición del polisacárido), y la conjugación continuó 15 durante 5 horas a 22 °C.

Reducción con borohidruro de sodio

Se agregó borohidruro de sodio (2 moles por mol de unidad de repetición del polisacárido) luego de la reacción de conjugación y se incubó durante 1 hora a 22 °C. El lote se 20 diluyó en 150 mM de cloruro de sodio, con aproximadamente 0,025 % (p/v) de polisorbato 20, a aproximadamente 4°C. El amortiguador de fosfato de potasio se agregó luego para neutralizar el pH. El lote se concentró y se diafiltró a aproximadamente 4°C en 150 mM de cloruro de sodio, 25 mM de fosfato de potasio, pH 7, con el uso de una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 30 kDa con NMWCO.

25

Filtración final y almacenamiento de producto

El lote se concentró y se diafiltró luego en 10 mM de histidina en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0, con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, a 4 °C usando membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 300 kDa con NMWCO.

30

El lote del concentrado fue filtrado a 0,2 micrómetros (con prefiltro a 0,5 micrómetros), luego se diluyó con 10 mM de histidina adicional en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0 con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, distribuido en alícuotas y congelado a ≤ -60 °C.

Tabla 14. Atributos del conjugado de serotipo 15B para el estudio de protección cruzada de 15A/B/C de conjugación con DMSO

Ps oxidado en Mn / Mw	Conjugado en Mn / Mw	Ps:Pr	Consumo de lisina (CRM197 mol/ mol)	Ps libre / Ps total	Proteína libre / Proteína total
203 / 252 kD	2329 / 3881 kD	1,67	7,9	3,6 %	4,4 %

EJEMPLO 18

5 Preparación del conjugado de serotipo 15C para el estudio monovalente y el estudio de protección cruzada de 15A/B/C usando conjugación con DMSO

El polisacárido derivado del serotipo de *Streptococcus pneumoniae* 15B se disolvió, se dimensionó a una masa molecular diana, se sometió a hidrólisis básica moderada para liberar los grupos O-acetilo, se activó químicamente y se intercambió en amortiguador mediante ultrafiltración. El polisacárido activado y CRM197 purificado se liofilizaron individualmente y se volvieron a disolver en DMSO. Las soluciones de polisacárido y CRM197 que se volvieron a disolver se combinaron luego y se conjugaron como se describe a continuación. El conjugado resultante se purificó mediante ultrafiltración antes de una filtración final de 0,2 micrómetros. Varios parámetros de proceso en cada etapa, tal como pH, temperatura, concentración y tiempo, se controlaron para obtener conjugados con atributos deseados.

Reducción de tamaño, hidrólisis básica y oxidación del polisacárido

El polvo de Ps capsular neumocócico del serotipo 15B purificado se disolvió en agua y se filtró a 0,45 micrómetros. El polisacárido disuelto se homogeneizó para reducir la masa molecular de Ps. La presión de homogenización y la cantidad de pasadas por el homogeneizador se controlaron a 300 bar/5 pasadas.

El polisacárido de tamaño reducido se concentró y se diafiltró en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10 kDa con NMWCO.

La solución de polisacárido se calentó hasta 60 °C y se agregó amortiguador de bicarbonato de sodio, pH 9 a una concentración final de 50 mM. El lote se incubó con mezcla durante 13 horas a 60 °C para liberar grupos O-acetilo. El amortiguador de fosfato de potasio, pH 6 se agregó a una concentración final de 136 mM para neutralizar el pH, y la solución se enfrió hasta temperatura ambiente. La solución se concentró y se diafiltró luego en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10 kDa con NMWCO.

La solución de polisacárido se ajustó hasta 22 °C y pH 5 con un amortiguador de acetato de sodio para minimizar la reducción de tamaño del polisacárido debido a la activación. La activación de polisacárido se inició con la adición de una solución de 100 mM de metaperiodato de sodio. La cantidad de metaperiodato de sodio agregada fue de 0,20 moles de

metaperiodato de sodio por mol de unidad de repetición del polisacárido para alcanzar un nivel diana de activación de polisacárido (moles de aldehído por mol de la unidad de repetición del polisacárido). La reacción de oxidación continuó durante 2 horas a 22 °C.

- 5 El producto activado se diafiltró en 10 mM de fosfato de potasio, pH 6,4 y luego mediante diafiltración en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10 kDa con NMWCO. La ultrafiltración se llevó a cabo a 2-8 °C.

Conjugación de polisacárido con CRM197

- 10 CRM197 purificado, obtenido a través de la expresión en *Pseudomonas fluorescens* como se describió anteriormente (WO 2012/173876 A1), se diafiltró en 2 mM de amortiguador de fosfato, pH 7,2 usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 5 kDa con NMWCO y se filtró a 0,2 micrómetros.

- 15 Los polisacáridos activados se formularon para la liofilización a 6 mg Ps/ml con concentración de sacarosa de 5 % p/v. CRM197 se formuló para la liofilización a 6 mg Pr/ml con concentración de sacarosa de 1 % p/v.

- 20 Las soluciones de Ps y CRM197 formuladas se liofilizaron individualmente. Los materiales de Ps y CRM197 liofilizados se volvieron a disolver de manera individual en volúmenes iguales de DMSO. Las soluciones de polisacárido y CRM197 se mezclaron para alcanzar una concentración de polisacáridos de 3,0 g Ps/l y una relación de masa de polisacárido con respecto a CRM197 de 2,0. La relación de masa se seleccionó para controlar la relación de polisacárido con respecto a CRM197 en el conjugado resultante. Se agregó cianoborohidruro de sodio (1 mol por mol de unidad de repetición del polisacárido), y la conjugación continuó durante 4 horas a 22 °C.

Reducción con borohidruro de sodio

- 25 Se agregó borohidruro de sodio (2 moles por mol de unidad de repetición del polisacárido) luego de la reacción de conjugación y se incubó durante 1 hora a 22 °C. El lote se diluyó en 150 mM de cloruro de sodio, con aproximadamente 0,025 % (p/v) de polisorbato 20, a aproximadamente 4°C. El amortiguador de fosfato de potasio se agregó luego para neutralizar el pH. El lote se concentró y se diafiltró a aproximadamente 4°C en 150 mM de cloruro de sodio, 25 mM de fosfato de potasio, pH 7, con el uso de una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 30 kDa con NMWCO.

Filtración final y almacenamiento de producto

- 35 El lote se concentró y se diafiltró luego en 10 mM de histidina en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0, con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, a 4 °C usando membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 300 kDa con NMWCO.

El lote del concentrado fue filtrado a 0,2 micrómetros (con prefiltro a 0,5 micrómetros), luego se diluyó con 10 mM de histidina adicional en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0 con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, distribuido en alícuotas y congelado a ≤ -60 °C.

Tabla 15. Atributos del conjugado de serotipo 15C para el estudio monovalente y el estudio de protección cruzada de 15A/B/C de conjugación con DMSO

O-acetilo / Ps	Ps oxidado en Mn / Mw	Conjugado en Mn / Mw	Ps:Pr	Consumo de lisina (CRM197 mol/ mol)	Ps libre / Ps total	Proteína libre / Proteína total
Sin detectar	182 / 246 kD	1962 / 4019 kD	1,31	4,8	3,8 %	13 %

EJEMPLO 19

Preparación del conjugado de serotipo 15C para estudio polivalente usando la conjugación con DMSO

El polisacárido derivado del serotipo de *Streptococcus pneumoniae* 15B se disolvió, se dimensionó a una masa molecular diana, se sometió a hidrólisis básica moderada para liberar los grupos O-acetilo, se activó químicamente y se intercambió en amortiguador mediante ultrafiltración. El polisacárido activado y CRM197 purificado se liofilizaron individualmente y se volvieron a disolver en DMSO. Las soluciones de polisacárido y CRM197 que se volvieron a disolver se combinaron luego y se conjugaron como se describe a continuación. El conjugado resultante se purificó mediante ultrafiltración antes de una filtración final de 0,2 micrómetros. Varios parámetros de proceso en cada etapa, tal como pH, temperatura, concentración y tiempo, se controlaron para obtener conjugados con atributos deseados.

20 Reducción de tamaño, hidrólisis básica y oxidación del polisacárido

El polvo de Ps capsular neumocócico del serotipo 15B purificado se disolvió en agua y se filtró a 0,45 micrómetros. El polisacárido disuelto se homogeneizó para reducir la masa molecular de Ps. La presión de homogenización y la cantidad de pasadas por el homogeneizador se controlaron a 300 bar/5 pasadas.

25 El polisacárido de tamaño reducido se concentró y se diafiltró en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10 kDa con NMWCO.

La solución de polisacárido se calentó hasta 60 °C y se agregó amortiguador de bicarbonato de sodio, pH 9 a una concentración final de 50 mM. El lote se incubó con mezcla durante 13 horas a 60 °C para liberar grupos O-acetilo. El amortiguador de fosfato de potasio, pH 6 se agregó a una concentración final de 136 mM para neutralizar el pH, y la solución se enfrió hasta temperatura ambiente. La solución se concentró y se diafiltró luego en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10 kDa con NMWCO.

La solución de polisacárido se ajustó hasta 22 °C y pH 5 con un amortiguador de acetato de sodio para minimizar la reducción de tamaño del polisacárido debido a la activación. La activación de polisacárido se inició con la adición de una solución de 100 mM de metaperiodato de sodio. La cantidad de metaperiodato de sodio agregada fue de 0,20 moles de metaperiodato de sodio por mol de unidad de repetición del polisacárido para alcanzar un nivel diana de activación de polisacárido (moles de aldehído por mol de la unidad de repetición del polisacárido). La reacción de oxidación continuó durante 2 horas a 22 °C.

El producto activado se diafiltró en 10 mM de fosfato de potasio, pH 6,4 y luego mediante diafiltración en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10 kDa con NMWCO. La ultrafiltración se llevó a cabo a 2-8 °C.

Conjugación de polisacárido con CRM197

CRM197 purificado, obtenido a través de la expresión en *Pseudomonas fluorescens* como se describió anteriormente (WO 2012/173876 A1), se diafiltró en 2 mM de amortiguador de fosfato, pH 7,2 usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 5 kDa con NMWCO y se filtró a 0,2 micrómetros.

Los polisacáridos activados se formularon para la liofilización a 6 mg Ps/ml con concentración de sacarosa de 5 % p/v. CRM197 se formuló para la liofilización a 6 mg Pr/ml con concentración de sacarosa de 1 % p/v.

Las soluciones de Ps y CRM197 formuladas se liofilizaron individualmente. Los materiales de Ps y CRM197 liofilizados se volvieron a disolver de manera individual en volúmenes iguales de DMSO. Las soluciones de polisacárido y CRM197 se mezclaron para alcanzar una concentración de polisacáridos de 3,0 g Ps/l y una relación de masa de polisacárido con respecto a CRM197 de 1,75. La relación de masa se seleccionó para controlar la relación de polisacárido con respecto a CRM197 en el conjugado resultante. Se agregó cianoborohidruro de sodio (1 mol por mol de unidad de repetición del polisacárido), y la conjugación continuó durante 8 horas a 22 °C.

Reducción con borohidruro de sodio

Se agregó borohidruro de sodio (2 moles por mol de unidad de repetición del polisacárido) luego de la reacción de conjugación y se incubó durante 1 hora a 22 °C. El lote se diluyó en 150 mM de cloruro de sodio, con aproximadamente 0,025 % (p/v) de polisorbato 20, a aproximadamente 4°C. El amortiguador de fosfato de potasio se agregó luego para neutralizar el pH. El lote se concentró y se diafiltró a aproximadamente 4°C en 150 mM de cloruro de sodio, 25 mM de fosfato de potasio, pH 7, con el uso de una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 30 kDa con NMWCO.

Filtración final y almacenamiento de producto

El lote se concentró y se diafiltró luego en 10 mM de histidina en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0, con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, a 4 °C usando membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 300 kDa con NMWCO.

- 5 El lote del concentrado fue filtrado a 0,2 micrómetros (con prefiltro a 0,5 micrómetros), luego se diluyó con 10 mM de histidina adicional en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0 con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, distribuido en alícuotas y congelado a ≤ -60 °C.

Tabla 16. Atributos del conjugado de serotipo 15C para el estudio polivalente de conjugación con DMSO

O-acetilo / Ps	Ps oxidado en Mn / Mw	Conjugado en Mn / Mw	Ps:Pr	Consumo de lisina (CRM197 mol/mol)	Ps libre / Ps total	Proteína libre / Proteína total
Sin detectar	182 / 246 kD	1540 / 3230 kD	1,34	6,6	9,2 %	5,7 %

10

EJEMPLO 20

Preparación del conjugado de serotipo 16F para estudio monovalente usando la conjugación acuosa

- 15 El polisacárido se disolvió, se redujo su tamaño, se activó químicamente y se intercambió en amortiguador mediante ultrafiltración. El CRM197 purificado se conjugó luego en el polisacárido activado con el uso de cloruro de níquel en la mezcla de reacción acuosa, y el conjugado resultante se purificó mediante ultrafiltración antes de una filtración final de 0,2 micrómetros. Varios parámetros de proceso en cada etapa, tal como pH, temperatura, concentración y tiempo, se controlaron para obtener conjugados con atributos deseados.

20

Reducción de tamaño y oxidación del polisacárido

- 25 El polisacárido capsular neumocócico purificado se disolvió en agua y se filtró a 0,45 micrómetros. El polisacárido disuelto se homogeneizó para reducir la masa molecular. La presión de homogenización y la cantidad de pasadas por el homogeneizador se controlaron a 200 bar/5 pasadas y luego 500 bar/5 pasadas para alcanzar una masa molecular diana. El polisacárido de tamaño reducido se concentró y se diafiltró luego en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10 kDa con NMWCO.

- 30 La solución de polisacárido se ajustó luego hasta 22 °C y pH 5 con un amortiguador de acetato de sodio para minimizar la reducción de tamaño del polisacárido debido a la activación. La activación de polisacárido se inició con la adición de una solución de 100 mM de metaperiodato de sodio. La cantidad de metaperiodato de sodio agregada fue de 0,15 moles de metaperiodato de sodio por mol de unidad de repetición del polisacárido para alcanzar un nivel

diana de activación de polisacárido (moles de aldehído por mol de la unidad de repetición del polisacárido). La reacción de oxidación continuó durante 2 horas a 22 °C.

El producto activado se diafiltró en 10 mM de fosfato de potasio, pH 6,4 usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10 kDa con NMWCO. La ultrafiltración se
5 llevó a cabo a 2-8 °C.

Conjugación de polisacárido con CRM197

La solución de polisacárido oxidada se mezcló con agua y 1,5 M de fosfato de potasio, pH 7,0. El pH del amortiguador se seleccionó para mejorar la estabilidad del
10 polisacárido activado durante la reacción de conjugación. El CRM197 purificado, obtenido mediante la expresión en *Pseudomonas fluorescens* como se describió anteriormente (WO 2012/173876 A1), se filtró a 0,2 micrómetros y se combinó con la solución de polisacárido amortiguado en una relación de masa de polisacárido con respecto a CRM197 de 0,7. La relación de masa se seleccionó para controlar la relación de polisacárido con respecto a CRM197 en el
15 conjugado resultante. Las concentraciones de polisacáridos y fosfatos fueron de 7,5 g/l y 100 mM respectivamente. La concentración de polisacáridos se seleccionó para controlar el tamaño del conjugado resultante. La solución se filtró luego a 0,2 micrómetros. El cloruro de níquel se agregó a aproximadamente 2 mM usando una solución de cloruro de níquel de 100 mM. Se agregó cianoborohidruro de sodio (2 moles por mol de unidad de repetición del polisacárido). La
20 conjugación continuó durante 122 horas a 22 °C para maximizar el consumo de polisacárido y proteína.

Reducción con borohidruro de sodio

Luego de la reacción de conjugación, el lote se diluyó a una concentración de
25 polisacáridos de aproximadamente 3,0 g/l, se enfrió hasta 2-8 °C, y se filtró a 1,2 micrómetros. El lote se diafiltró en 100 mM de fosfato de potasio, pH 7,0 a 2-8 °C con el uso de una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 100 kDa con NMWCO. El lote, recuperado en el concentrado, se diluyó luego en aproximadamente 2,0 g de polisacárido/l y se ajustó el pH con la adición de 1,2 M de bicarbonato de sodio, pH 9,4. Se agregó borohidruro de sodio (1 mol por
30 mol de unidad de repetición del polisacárido). Luego se agregó 1,5 M de fosfato de potasio, pH 6,0.

Filtración final y almacenamiento de producto

El lote se concentró y se diafiltró luego en 10 mM de L-histidina en 150 mM de
35 cloruro de sodio, pH 7,0 a 4 °C usando membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 300 kDa con NMWCO. Se agregó polisorbato 20 al lote de concentrado a una concentración de 0,05 % (p/v), luego se filtró el lote a 0,2 micrómetros (con prefiltro a 0,5 micrómetros).

El lote se ajustó a una concentración de polisacáridos de 1,0 g/l con 10 mM de L-histidina adicionales en 150 mM de amortiguador de cloruro de sodio, pH 7,0 con 0,03 % (p/v) de polisorbato 20. El lote se distribuyó en alícuotas y se congeló a ≤ -60 °C.

5 Tabla 17. Atributos del conjugado de serotipo 16F para el estudio monovalente de conjugación acuosa

Ps oxidado en Mn / Mw	Conjugado en Mn / Mw	Ps:Pr	Consumo de lisina (CRM197 mol/ mol)	Ps libre / Ps total	Proteína libre / Proteína total
90 / 139 kD	1860 / 5539 kD	1,10	3,3	7,0 %	<1 %

EJEMPLO 21

10 Preparación del conjugado de serotipo 16F para estudio polivalente usando la conjugación con DMSO

El polisacárido se disolvió, se dimensionó a una masa molecular diana, se activó químicamente y se intercambió en amortiguador mediante ultrafiltración. El polisacárido activado y CRM197 purificado se liofilizaron individualmente y se volvieron a disolver en DMSO. Las soluciones de polisacárido y CRM197 que se volvieron a disolver se combinaron
15 luego y se conjugaron como se describe a continuación. El conjugado resultante se purificó mediante ultrafiltración antes de una filtración final de 0,2 micrómetros. Varios parámetros de proceso en cada etapa, tal como pH, temperatura, concentración y tiempo, se controlaron para obtener conjugados con atributos deseados.

20 *Reducción de tamaño y oxidación del polisacárido*

El polvo de Ps capsular neumocócico purificado se disolvió en agua y se filtró a 0,45 micrómetros. El polisacárido disuelto se homogeneizó para reducir la masa molecular de Ps. La presión de homogenización y la cantidad de pasadas por el homogeneizador se controlaron a 1000 bar/5 pasadas.

25 El polisacárido de tamaño reducido se concentró y se diafiltró en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10 kDa con NMWCO.

La solución de polisacárido se ajustó luego hasta 22 °C y pH 5 con un amortiguador de acetato de sodio para minimizar la reducción de tamaño del polisacárido debido a la activación. La activación de polisacárido se inició con la adición de una solución de 100 mM
30 de metaperiodato de sodio. La cantidad de metaperiodato de sodio agregada fue de 0,15 moles de metaperiodato de sodio por mol de unidad de repetición del polisacárido para alcanzar un nivel diana de activación de polisacárido (moles de aldehído por mol de la unidad de repetición del polisacárido). La reacción de oxidación continuó durante 2 horas a 22 °C.

El producto activado se diafiltró en 10 mM de fosfato de potasio, pH 6,4 y luego mediante diafiltración en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10 kDa con NMWCO. La ultrafiltración se llevó a cabo a 2-8 °C.

5 *Conjugación de polisacárido con CRM197*

CRM197 purificado, obtenido a través de la expresión en *Pseudomonas fluorescens* como se describió anteriormente (WO 2012/173876 A1), se diafiltró en 2 mM de amortiguador de fosfato, pH 7,2 usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 5 kDa con NMWCO y se filtró a 0,2 micrómetros.

10 Los polisacáridos activados se formularon para la liofilización a 6 mg Ps/ml con concentración de sacarosa de 5 % p/v. CRM197 se formuló para la liofilización a 6 mg Pr/ml con concentración de sacarosa de 1 % p/v.

Las soluciones de Ps y CRM197 formuladas se liofilizaron individualmente. Los materiales de Ps y CRM197 liofilizados se volvieron a disolver de manera individual en volúmenes iguales de DMSO. La solución de polisacárido alcanzó su nivel máximo con cloruro de sodio a una concentración de 50 mM. Las soluciones de polisacárido y CRM197 se mezclaron para alcanzar una concentración de polisacáridos de 2,0 g Ps/l y una relación de masa de polisacárido con respecto a CRM197 de 1,5. La relación de masa se seleccionó para controlar la relación de polisacárido con respecto a CRM197 en el conjugado resultante. Se agregó cianoborohidruro de sodio (1 mol por mol de unidad de repetición del polisacárido), y la conjugación continuó durante 2 horas a 22 °C.

Reducción con borohidruro de sodio

Se agregó borohidruro de sodio (2 moles por mol de unidad de repetición del polisacárido) luego de la reacción de conjugación y se incubó durante 1 hora a 22 °C. El lote se diluyó en 150 mM de cloruro de sodio, con aproximadamente 0,025 % (p/v) de polisorbato 20, a aproximadamente 4°C. El amortiguador de fosfato de potasio se agregó luego para neutralizar el pH. El lote se concentró y se diafiltró a aproximadamente 4°C en 150 mM de cloruro de sodio, 25 mM de fosfato de potasio, pH 7, con el uso de una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 30 kD con NMWCO.

Filtración final y almacenamiento de producto

El lote se concentró y se diafiltró luego en 10 mM de histidina en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0, con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, a 4 °C usando membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 300 kDa con NMWCO.

El lote del concentrado fue filtrado a 0,2 micrómetros, luego se diluyó con 10 mM de histidina adicional en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0 con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, distribuido en alícuotas y congelado a ≤ -60 °C.

Tabla 18. Atributos del conjugado de serotipo 16F para el estudio polivalente de conjugación con DMSO

Ps oxidado en Mn / Mw	Conjugado en Mn / Mw	Ps:Pr	Consumo de lisina (CRM197 mol/ mol)	Ps libre / Ps total	Proteína libre / Proteína total
91 / 177 kD	2075 / 3966 kD	1,29	11,0	<1 %	<1 %

5

EJEMPLO 22

Preparación del conjugado de serotipo 17F para estudio monovalente usando la conjugación con DMSO

El polisacárido se disolvió, se dimensionó a una masa molecular diana, se activó químicamente y se intercambió en amortiguador mediante ultrafiltración. El polisacárido
10 activado y CRM197 purificado se liofilizaron individualmente y se volvieron a disolver en DMSO. Las soluciones de polisacárido y CRM197 que se volvieron a disolver se combinaron luego y se conjugaron como se describe a continuación. El conjugado resultante se purificó mediante ultrafiltración antes de una filtración final de 0,2 micrómetros. Varios parámetros de proceso en cada etapa, tal como pH, temperatura, concentración y tiempo, se controlaron para
15 obtener conjugados con atributos deseados.

Reducción de tamaño y oxidación del polisacárido

El polvo de Ps capsular neumocócico purificado se disolvió en agua y se filtró a 0,45 micrómetros. El polisacárido disuelto se homogeneizó para reducir la masa molecular de Ps.
20 La presión de homogenización y la cantidad de pasadas por el homogeneizador se controlaron a 200 bar/5 pasadas.

El polisacárido de tamaño reducido se concentró y se diafiltró en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10 kDa con NMWCO.

La solución de polisacárido se ajustó luego hasta 22 °C y pH 5 con un
25 amortiguador de acetato de sodio para minimizar la reducción de tamaño del polisacárido debido a la activación. La activación de polisacárido se inició con la adición de una solución de 100 mM de metaperiodato de sodio. La cantidad de metaperiodato de sodio agregada fue de 0,11 moles de metaperiodato de sodio por mol de unidad de repetición del polisacárido para alcanzar un nivel diana de activación de polisacárido (moles de aldehído por mol de la unidad de repetición del
30 polisacárido). La reacción de oxidación continuó durante 2 horas a 22 °C.

El producto activado se diafiltró en 10 mM de fosfato de potasio, pH 6,4 y luego mediante diafiltración en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10 kDa con NMWCO. La ultrafiltración se llevó a cabo a 2-8 °C.

Conjugación de polisacárido con CRM197

CRM197 purificado, obtenido a través de la expresión en *Pseudomonas fluorescens* como se describió anteriormente (WO 2012/173876 A1), se diafiltró en 2 mM de amortiguador de fosfato, pH 7,2 usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 5 kDa con NMWCO y se filtró a 0,2 micrómetros.

Los polisacáridos activados se formularon para la liofilización a 6 mg Ps/ml con concentración de sacarosa de 5 % p/v. CRM197 se formuló para la liofilización a 6 mg Pr/ml con concentración de sacarosa de 1 % p/v.

Las soluciones de Ps y CRM197 formuladas se liofilizaron individualmente. Los materiales de Ps y CRM197 liofilizados se volvieron a disolver de manera individual en volúmenes iguales de DMSO. La solución de polisacárido alcanzó su nivel máximo con cloruro de sodio a una concentración de 50 mM. Las soluciones de polisacárido y CRM197 se mezclaron para alcanzar una concentración de polisacáridos de 2,0 g Ps/l y una relación de masa de polisacárido con respecto a CRM197 de 1,5. La relación de masa se seleccionó para controlar la relación de polisacárido con respecto a CRM197 en el conjugado resultante. Se agregó cianoborohidruro de sodio (1 mol por mol de unidad de repetición del polisacárido), y la conjugación continuó durante 2 horas a 22 °C.

Reducción con borohidruro de sodio

Se agregó borohidruro de sodio (2 moles por mol de unidad de repetición del polisacárido) luego de la reacción de conjugación y se incubó durante 1 hora a 22 °C. El lote se diluyó en 150 mM de cloruro de sodio, con aproximadamente 0,025 % (p/v) de polisorbato 20, a aproximadamente 4°C. El amortiguador de fosfato de potasio se agregó luego para neutralizar el pH. El lote se concentró y se diafiltró a aproximadamente 4°C en 150 mM de cloruro de sodio, 25 mM de fosfato de potasio, pH 7, con el uso de una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 30 kDa con NMWCO.

Filtración final y almacenamiento de producto

El lote se concentró y se diafiltró luego en 10 mM de histidina en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0, con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, a 4 °C usando membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 300 kDa con NMWCO.

El lote del concentrado fue filtrado a 0,2 micrómetros, luego se diluyó con 10 mM de histidina adicional en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0 con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, distribuido en alícuotas y congelado a ≤ -60 °C.

Tabla 19. Atributos del conjugado de serotipo 17F para el estudio monovalente de conjugación con DMSO

Ps oxidado en Mn / Mw	Conjugado en Mn / Mw	Ps:Pr	Consumo de lisina (CRM197 mol/ mol)	Ps libre / Ps total	Proteína libre / Proteína total
179/ 216 kD	2630 / 4632 kD	1,20	8,0	1,9 %	4,5 %

EJEMPLO 23

Preparación del conjugado de serotipo 17F para estudio polivalente usando la conjugación con DMSO

- 5 El polisacárido se disolvió, se dimensionó a una masa molecular diana, se activó químicamente y se intercambió en amortiguador mediante ultrafiltración. El polisacárido activado y CRM197 purificado se liofilizaron individualmente y se volvieron a disolver en DMSO. Las soluciones de polisacárido y CRM197 que se volvieron a disolver se combinaron luego y se conjugaron como se describe a continuación. El conjugado resultante se purificó
- 10 mediante ultrafiltración antes de una filtración final de 0,2 micrómetros. Varios parámetros de proceso en cada etapa, tal como pH, temperatura, concentración y tiempo, se controlaron para obtener conjugados con atributos deseados.

Reducción de tamaño y oxidación del polisacárido

- 15 El polvo de Ps capsular neumocócico purificado se disolvió en agua y se filtró a 0,45 micrómetros. El polisacárido disuelto se homogeneizó para reducir la masa molecular de Ps. La presión de homogenización y la cantidad de pasadas por el homogeneizador se controlaron a 200 bar/5 pasadas.

- 20 El polisacárido de tamaño reducido se concentró y se diafiltró en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10 kDa con NMWCO.

- La solución de polisacárido se ajustó luego hasta 22 °C y pH 5 con un amortiguador de acetato de sodio para minimizar la reducción de tamaño del polisacárido debido a la activación. La activación de polisacárido se inició con la adición de una solución de 100 mM de metaperiodato de sodio. La cantidad de metaperiodato de sodio agregada fue de 0,11 moles de
- 25 metaperiodato de sodio por mol de unidad de repetición del polisacárido para alcanzar un nivel diana de activación de polisacárido (moles de aldehído por mol de la unidad de repetición del polisacárido). La reacción de oxidación continuó durante 2 horas a 22 °C.

- El producto activado se diafiltró en 10 mM de fosfato de potasio, pH 6,4 y luego mediante diafiltración en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10
- 30 kDa con NMWCO. La ultrafiltración se llevó a cabo a 2-8 °C.

Conjugación de polisacárido con CRM197

CRM197 purificado, obtenido a través de la expresión en *Pseudomonas fluorescens* como se describió anteriormente (WO 2012/173876 A1), se diafiltró en 2 mM de amortiguador de fosfato, pH 7,2 usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 5 kDa con NMWCO y se filtró a 0,2 micrómetros.

5 Los polisacáridos activados se formularon para la liofilización a 6 mg Ps/ml con concentración de sacarosa de 5 % p/v. CRM197 se formuló para la liofilización a 6 mg Pr/ml con concentración de sacarosa de 1 % p/v.

Las soluciones de Ps y CRM197 formuladas se liofilizaron individualmente. Los materiales de Ps y CRM197 liofilizados se volvieron a disolver de manera individual en volúmenes iguales de DMSO. La solución de polisacárido alcanzó su nivel máximo con cloruro de sodio a una concentración de 20 mM. Las soluciones de polisacárido y CRM197 se mezclaron para alcanzar una concentración de polisacáridos de 2,1 g Ps/l y una relación de masa de polisacárido con respecto a CRM197 de 1,5. La relación de masa se seleccionó para controlar la relación de polisacárido con respecto a CRM197 en el conjugado resultante. Se agregó cianoborohidruro de sodio (1 mol por mol de unidad de repetición del polisacárido), y la conjugación continuó durante 2 horas a 22 °C.

Reducción con borohidruro de sodio

Se agregó borohidruro de sodio (2 moles por mol de unidad de repetición del polisacárido) luego de la reacción de conjugación y se incubó durante 1 hora a 22 °C. El lote se diluyó en 150 mM de cloruro de sodio, con aproximadamente 0,025 % (p/v) de polisorbato 20, a aproximadamente 4°C. El amortiguador de fosfato de potasio se agregó luego para neutralizar el pH. El lote se concentró y se diafiltró a aproximadamente 4°C en 150 mM de cloruro de sodio, 25 mM de fosfato de potasio, pH 7, con el uso de una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 30 kDa con NMWCO.

Filtración final y almacenamiento de producto

El lote se concentró y se diafiltró luego en 10 mM de histidina en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0, con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, a 4 °C usando membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 300 kDa con NMWCO.

El lote del concentrado fue filtrado a 0,2 micrómetros (con prefiltro a 0,5 micrómetros), luego se diluyó con 10 mM de histidina adicional en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0 con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, distribuido en alícuotas y congelado a ≤ -60 °C.

35 Tabla 20. Atributos del conjugado de serotipo 17F para el estudio polivalente de conjugación con DMSO

Ps oxidado en Mn / Mw	Conjugado en Mn / Mw	Ps:Pr	Consumo de lisina (CRM197 mol/ mol)	Ps libre / Ps total	Proteína libre / Proteína total
150 / 212 kD	2650 / 4110 kD	1,10	7,7	2,8 %	1,5 %

EJEMPLO 24

Preparación del conjugado de serotipo 19A para estudio polivalente usando la conjugación con DMSO

- 5 El polisacárido se disolvió, se activó químicamente y se intercambió en amortiguador mediante ultrafiltración. El polisacárido activado y CRM197 purificado se liofilizaron individualmente y se volvieron a disolver en DMSO. Las soluciones de polisacárido y CRM197 que se volvieron a disolver se combinaron luego y se conjugaron como se describe a continuación. El conjugado resultante se purificó mediante ultrafiltración antes de una filtración
- 10 final de 0,2 micrómetros. Varios parámetros de proceso en cada etapa, tal como pH, temperatura, concentración y tiempo, se controlaron para obtener conjugados con atributos deseados.

Oxidación de polisacárido

- 15 El polvo de Ps capsular neumocócico purificado se disolvió en agua y se filtró a 0,45 micrómetros. El polisacárido se concentró y se diafiltró en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10 kDa con NMWCO.

- La solución de polisacárido se ajustó luego hasta 22 °C y pH 5 con un amortiguador de acetato de sodio para minimizar la reducción de tamaño del polisacárido debido a la activación. La activación de polisacárido se inició con la adición de una solución de 100 mM
- 20 de metaperiodato de sodio. La cantidad de metaperiodato de sodio agregada fue de 0,26 moles de metaperiodato de sodio por mol de unidad de repetición del polisacárido para alcanzar un nivel diana de activación de polisacárido (moles de aldehído por mol de la unidad de repetición del polisacárido). La reacción de oxidación continuó durante 20 horas a 22 °C.

- 25 El producto activado se diafiltró en 10 mM de fosfato de potasio, pH 6,4 y luego mediante diafiltración en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10 kDa con NMWCO. La ultrafiltración se llevó a cabo a 2-8 °C.

Conjugación de polisacárido con CRM197

- 30 CRM197 purificado, obtenido a través de la expresión en *Pseudomonas fluorescens* como se describió anteriormente (WO 2012/173876 A1), se diafiltró en 2 mM de amortiguador de fosfato, pH 7,2 usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 5 kDa con NMWCO y se filtró a 0,2 micrómetros.

Los polisacáridos activados se formularon para la liofilización a 6 mg Ps/ml con concentración de sacarosa de 5 % p/v. CRM197 se formuló para la liofilización a 6 mg Pr/ml con concentración de sacarosa de 1 % p/v.

Las soluciones de Ps y CRM197 formuladas se liofilizaron individualmente. Los materiales de Ps y CRM197 liofilizados se volvieron a disolver de manera individual en volúmenes iguales de DMSO. Las soluciones de polisacárido y CRM197 se mezclaron para alcanzar una concentración de polisacáridos de 3,8 g Ps/l y una relación de masa de polisacárido con respecto a CRM197 de 1,33. La relación de masa se seleccionó para controlar la relación de polisacárido con respecto a CRM197 en el conjugado resultante. Se agregó cianoborohidruro de sodio (1 mol por mol de unidad de repetición del polisacárido), y la conjugación continuó durante 1,5 horas a 22 °C.

Reducción con borohidruro de sodio

Se agregó borohidruro de sodio (2 moles por mol de unidad de repetición del polisacárido) luego de la reacción de conjugación y se incubó durante 3 horas a 22 °C. El lote se diluyó en 150 mM de cloruro de sodio, con aproximadamente 0,025 % (p/v) de polisorbato 20, a aproximadamente 4°C. El amortiguador de fosfato de potasio se agregó luego para neutralizar el pH. El lote se concentró y se diafiltró a aproximadamente 4°C en 150 mM de cloruro de sodio, 25 mM de fosfato de potasio, pH 7, con el uso de una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 30 kDa con NMWCO.

Filtración final y almacenamiento de producto

El lote se concentró y se diafiltró luego en 10 mM de histidina en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0, con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, a 4 °C usando membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 300 kDa con NMWCO.

El lote del concentrado fue filtrado a 0,2 micrómetros, luego se diluyó con 10 mM de histidina adicional en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0 con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, distribuido en alícuotas y congelado a ≤ -60 °C.

Tabla 21. Atributos del conjugado de serotipo 19A para el estudio polivalente de conjugación con DMSO

Ps oxidado en Mn / Mw	Conjugado en Mn / Mw	Ps:Pr	Consumo de lisina (CRM197 mol/ mol)	Ps libre / Ps total	Proteína libre / Proteína total
96 / 186 kD	1714 / 3585 kD	1,22	9,1	7,0 %	1,4 %

EJEMPLO 25

Preparación del conjugado de serotipo 20A para estudio monovalente usando la conjugación con DMSO

El polisacárido previamente determinado como serotipo 20A (Calix *et al.*, Biochemical, Genetic, and Serological Characterization of Two Capsule Subtypes among *Streptococcus pneumoniae* Serotype 20 Strains, *J. Biol. Chem.* 287(33): 27885–27894, (2012)) se disolvió, se dimensionó a una masa molecular diana, se activó químicamente y se intercambió en amortiguador mediante ultrafiltración. El polisacárido activado y CRM197 purificado se liofilizaron individualmente y se volvieron a disolver en DMSO. Las soluciones de polisacárido y CRM197 que se volvieron a disolver se combinaron luego y se conjugaron como se describe a continuación. El conjugado resultante se purificó mediante ultrafiltración antes de una filtración final de 0,2 micrómetros. Varios parámetros de proceso en cada etapa, tal como pH, temperatura, concentración y tiempo, se controlaron para obtener conjugados con atributos deseados.

Reducción de tamaño y oxidación del polisacárido

El polvo de Ps capsular neumocócico purificado se disolvió en agua y se filtró a 0,45 micrómetros. El polisacárido disuelto se homogeneizó para reducir la masa molecular de Ps. La presión de homogenización y la cantidad de pasadas por el homogeneizador se controlaron a 200 bar/5 pasadas.

El polisacárido de tamaño reducido se concentró y se diafiltró en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10 kDa con NMWCO.

La solución de polisacárido se ajustó luego hasta 22 °C y pH 5 con un amortiguador de acetato de sodio para minimizar la reducción de tamaño del polisacárido debido a la activación. La activación de polisacárido se inició con la adición de una solución de 100 mM de metaperiodato de sodio. El metaperiodato de sodio agregado fue de 0,11 moles de metaperiodato de sodio por mol de unidad de repetición del polisacárido para alcanzar un nivel diana de activación de polisacárido (moles de aldehído por mol de la unidad de repetición del polisacárido). La reacción de oxidación continuó durante 2 horas a 22 °C.

El producto activado se diafiltró en 10 mM de fosfato de potasio, pH 6,4 y luego mediante diafiltración en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10 kDa con NMWCO. La ultrafiltración se llevó a cabo a 2-8 °C.

Conjugación de polisacárido con CRM197

CRM197 purificado, obtenido a través de la expresión en *Pseudomonas fluorescens* como se describió anteriormente (WO 2012/173876 A1), se diafiltró en 2 mM de amortiguador de fosfato, pH 7,2 usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 5 kDa con NMWCO y se filtró a 0,2 micrómetros.

Los polisacáridos activados se formularon para la liofilización a 6 mg Ps/ml con concentración de sacarosa de 5 % p/v. CRM197 se formuló para la liofilización a 6 mg Pr/ml con concentración de sacarosa de 1 % p/v.

Las soluciones de Ps y CRM197 formuladas se liofilizaron individualmente. Los materiales de Ps y CRM197 liofilizados se volvieron a disolver de manera individual en volúmenes iguales de DMSO. Las soluciones de polisacárido y CRM197 se mezclaron para alcanzar una concentración de polisacáridos de 2,0 g Ps/l y una relación de masa de polisacárido con respecto a CRM197 de 1,5. La relación de masa se seleccionó para controlar la relación de polisacárido con respecto a CRM197 en el conjugado resultante. Se agregó cianoborohidruro de sodio (1 mol por mol de unidad de repetición del polisacárido), y la conjugación continuó durante 6 horas a 22 °C.

Reducción con borohidruro de sodio

Se agregó borohidruro de sodio (2 moles por mol de unidad de repetición del polisacárido) luego de la reacción de conjugación y se incubó durante 1 hora a 22 °C. El lote se diluyó en 150 mM de cloruro de sodio, con aproximadamente 0,025 % (p/v) de polisorbato 20, a aproximadamente 4°C. El amortiguador de fosfato de potasio se agregó luego para neutralizar el pH. El lote se concentró y se diafiltró a aproximadamente 4°C en 150 mM de cloruro de sodio, 25 mM de fosfato de potasio, pH 7, con el uso de una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 30 kD con NMWCO.

Filtración final y almacenamiento de producto

El lote se concentró y se diafiltró luego en 10 mM de histidina en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0, con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, a 4 °C usando membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 300 kDa con NMWCO.

El lote del concentrado fue filtrado a 0,2 micrómetros (con prefiltro a 0,5 micrómetros), luego se diluyó con 10 mM de histidina adicional en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0 con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, distribuido en alícuotas y congelado a ≤ -60 °C.

Tabla 22. Atributos del conjugado de serotipo 20A para el estudio monovalente de conjugación con DMSO

Ps oxidado en Mn / Mw	Conjugado en Mn / Mw	Ps:Pr	Consumo de lisina (CRM197 mol/ mol)	Ps libre / Ps total	Proteína libre / Proteína total
165 / 215 kD	5159 / 7778 kD	1,17	6,1	<1 %	6,5 %

EJEMPLO 26

Preparación del conjugado de serotipo 20A para estudio polivalente usando la conjugación con DMSO

El polisacárido se disolvió, se dimensionó a una masa molecular diana, se activó químicamente y se intercambió en amortiguador mediante ultrafiltración. El polisacárido
 5 activado y CRM197 purificado se liofilizaron individualmente y se volvieron a disolver en DMSO. Las soluciones de polisacárido y CRM197 que se volvieron a disolver se combinaron luego y se conjugaron como se describe a continuación. El conjugado resultante se purificó mediante ultrafiltración antes de una filtración final de 0,2 micrómetros. Varios parámetros de
 10 proceso en cada etapa, tal como pH, temperatura, concentración y tiempo, se controlaron para obtener conjugados con atributos deseados.

Reducción de tamaño y oxidación del polisacárido

El polvo de Ps capsular neumocócico purificado se disolvió en agua y se filtró a 0,45 micrómetros. El polisacárido disuelto se homogeneizó para reducir la masa molecular de Ps.
 15 La presión de homogenización y la cantidad de pasadas por el homogeneizador se controlaron a 220 bar/5 pasadas.

El polisacárido de tamaño reducido se concentró y se diafiltró en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10 kDa con NMWCO.

La solución de polisacárido se ajustó luego hasta 22 °C y pH 5 con un
 20 amortiguador de acetato de sodio para minimizar la reducción de tamaño del polisacárido debido a la activación. La activación de polisacárido se inició con la adición de una solución de 100 mM de metaperiodato de sodio. El metaperiodato de sodio agregada fue de 0,16 moles de metaperiodato de sodio por mol de unidad de repetición del polisacárido para alcanzar un nivel
 25 diana de activación de polisacárido (moles de aldehído por mol de la unidad de repetición del polisacárido). La reacción de oxidación continuó durante 2 horas a 22 °C.

El producto activado se diafiltró en 10 mM de fosfato de potasio, pH 6,4 y luego mediante diafiltración en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10 kDa con NMWCO. La ultrafiltración se llevó a cabo a 2-8 °C.

Conjugación de polisacárido con CRM197

CRM197 purificado, obtenido a través de la expresión en *Pseudomonas fluorescens* como se describió anteriormente (WO 2012/173876 A1), se diafiltró en 2 mM de amortiguador de fosfato, pH 7,2 usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 5 kDa con NMWCO y se filtró a 0,2 micrómetros.

35 Los polisacáridos activados se formularon para la liofilización a 6 mg Ps/ml con concentración de sacarosa de 5 % p/v. CRM197 se formuló para la liofilización a 6 mg Pr/ml con concentración de sacarosa de 1 % p/v.

Las soluciones de Ps y CRM197 formuladas se liofilizaron individualmente. Los materiales de Ps y CRM197 liofilizados se volvieron a disolver de manera individual en volúmenes iguales de DMSO. La solución de polisacárido alcanzó su nivel máximo con cloruro de sodio a una concentración de 20 mM. Las soluciones de polisacárido y CRM197 se mezclaron para alcanzar una concentración de polisacáridos de 1,4 g Ps/l y una relación de masa de polisacárido con respecto a CRM197 de 1,5. La relación de masa se seleccionó para controlar la relación de polisacárido con respecto a CRM197 en el conjugado resultante. Se agregó cianoborohidruro de sodio (1 mol por mol de unidad de repetición del polisacárido), y la conjugación continuó durante 4 horas a 22 °C.

Reducción con borohidruro de sodio

Se agregó borohidruro de sodio (2 moles por mol de unidad de repetición del polisacárido) luego de la reacción de conjugación y se incubó durante 1 hora a 22 °C. El lote se diluyó en 150 mM de cloruro de sodio, con aproximadamente 0,025 % (p/v) de polisorbato 20, a aproximadamente 4°C. El amortiguador de fosfato de potasio se agregó luego para neutralizar el pH. El lote se concentró y se diafiltró a aproximadamente 4°C en 150 mM de cloruro de sodio, 25 mM de fosfato de potasio, pH 7, con el uso de una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 30 kD con NMWCO.

Filtración final y almacenamiento de producto

El lote se concentró y se diafiltró luego en 10 mM de histidina en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0, con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, a 4 °C usando membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 300 kDa con NMWCO.

El lote del concentrado fue filtrado a 0,2 micrómetros (con prefiltro a 0,5 micrómetros), luego se diluyó con 10 mM de histidina adicional en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0 con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, distribuido en alícuotas y congelado a ≤ -60 °C.

Tabla 23. Atributos del conjugado de serotipo 20A para el estudio polivalente de conjugación con DMSO

Ps oxidado en Mn / Mw	Conjugado en Mn / Mw	Ps:Pr	Consumo de lisina (CRM197 mol/ mol)	Ps libre / Ps total	Proteína libre / Proteína total
178 / 215 kD	2478 / 3863 kD	1,10	8,3	1,0 %	1,0 %

EJEMPLO 27

Preparación del conjugado de serotipo 22F para estudio polivalente usando la conjugación con DMSO

El polisacárido se disolvió, se dimensionó a una masa molecular diana, se activó químicamente y se intercambió en amortiguador mediante ultrafiltración. El polisacárido
 5 activado y CRM197 purificado se liofilizaron individualmente y se volvieron a disolver en DMSO. Las soluciones de polisacárido y CRM197 que se volvieron a disolver se combinaron luego y se conjugaron como se describe a continuación. El conjugado resultante se purificó mediante ultrafiltración antes de una filtración final de 0,2 micrómetros. Varios parámetros de
 10 proceso en cada etapa, tal como pH, temperatura, concentración y tiempo, se controlaron para obtener conjugados con atributos deseados.

Reducción de tamaño y oxidación del polisacárido

El polvo de Ps capsular neumocócico purificado se disolvió en agua y se filtró a 0,45 micrómetros. El polisacárido disuelto se homogeneizó para reducir la masa molecular de Ps.
 15 La presión de homogenización y la cantidad de pasadas por el homogeneizador se controlaron a 400 bar/5 pasadas.

El polisacárido de tamaño reducido se concentró y se diafiltró en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10 kDa con NMWCO.

La solución de polisacárido se ajustó luego hasta 22 °C y pH 5 con un
 20 amortiguador de acetato de sodio para minimizar la reducción de tamaño del polisacárido debido a la activación. La activación de polisacárido se inició con la adición de una solución de 100 mM de metaperiodato de sodio. El metaperiodato de sodio agregada fue de 0,12 moles de metaperiodato de sodio por mol de unidad de repetición del polisacárido para alcanzar un nivel
 25 diana de activación de polisacárido (moles de aldehído por mol de la unidad de repetición del polisacárido). La reacción de oxidación continuó durante 2 horas a 22 °C.

El producto activado se diafiltró en 10 mM de fosfato de potasio, pH 6,4 y luego mediante diafiltración en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10 kDa con NMWCO. La ultrafiltración se llevó a cabo a 2-8 °C.

Conjugación de polisacárido con CRM197

CRM197 purificado, obtenido a través de la expresión en *Pseudomonas fluorescens* como se describió anteriormente (WO 2012/173876 A1), se diafiltró en 2 mM de amortiguador de fosfato, pH 7,2 usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 5 kDa con NMWCO y se filtró a 0,2 micrómetros.

35 Los polisacáridos activados se formularon para la liofilización a 6 mg Ps/ml con concentración de sacarosa de 5 % p/v. CRM197 se formuló para la liofilización a 6 mg Pr/ml con concentración de sacarosa de 1 % p/v.

Las soluciones de Ps y CRM197 formuladas se liofilizaron individualmente. Los materiales de Ps y CRM197 liofilizados se volvieron a disolver de manera individual en volúmenes iguales de DMSO. Las soluciones de polisacárido y CRM197 se mezclaron para alcanzar una concentración de polisacáridos de 1,8 g Ps/l y una relación de masa de polisacárido con respecto a CRM197 de 1,5. La relación de masa se seleccionó para controlar la relación de polisacárido con respecto a CRM197 en el conjugado resultante. Se agregó cianoborohidruro de sodio (1 mol por mol de unidad de repetición del polisacárido), y la conjugación continuó durante 1 hora a 22 °C.

10 *Reducción con borohidruro de sodio*

Se agregó borohidruro de sodio (2 moles por mol de unidad de repetición del polisacárido) luego de la reacción de conjugación y se incubó durante 1 hora a 22 °C. El lote se diluyó en 150 mM de cloruro de sodio, con aproximadamente 0,025 % (p/v) de polisorbato 20, a aproximadamente 4°C. El amortiguador de fosfato de potasio se agregó luego para neutralizar el pH. El lote se concentró y se diafiltró a aproximadamente 4°C en 150 mM de cloruro de sodio, 25 mM de fosfato de potasio, pH 7, con el uso de una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 30 kD con NMWCO.

Filtración final y almacenamiento de producto

El lote se concentró y se diafiltró luego en 10 mM de histidina en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0, con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, a 4 °C usando membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 300 kDa con NMWCO.

El lote del concentrado fue filtrado a 0,2 micrómetros, luego se diluyó con 10 mM de histidina adicional en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0 con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, distribuido en alícuotas y congelado a ≤ -60 °C.

Tabla 24. Atributos del conjugado de serotipo 22F para el estudio polivalente de conjugación con DMSO

Ps oxidado en Mn / Mw	Conjugado en Mn / Mw	Ps:Pr	Consumo de lisina (CRM197 mol/ mol)	Ps libre / Ps total	Proteína libre / Proteína total
170 / 196 kD	1800 / 3970 kD	1,13	7,0	<1 %	1,1 %

30

EJEMPLO 28

Preparación del conjugado de serotipo 23A para estudio monovalente usando la conjugación con DMSO

El polisacárido se disolvió, se dimensionó a una masa molecular diana, se activó químicamente y se intercambió en amortiguador mediante ultrafiltración. El polisacárido activado y CRM197 purificado se liofilizaron individualmente y se volvieron a disolver en DMSO. Las soluciones de polisacárido y CRM197 que se volvieron a disolver se combinaron luego y se conjugaron como se describe a continuación. El conjugado resultante se purificó mediante ultrafiltración antes de una filtración final de 0,2 micrómetros. Varios parámetros de proceso en cada etapa, tal como pH, temperatura, concentración y tiempo, se controlaron para obtener conjugados con atributos deseados.

10 *Reducción de tamaño y oxidación del polisacárido*

El polvo de Ps capsular neumocócico purificado se disolvió en agua y se filtró a 0,45 micrómetros. Se redujo el tamaño del polisacárido disuelto mediante hidrólisis ácida mediante la adición de 200 mM de ácido acético, la incubación a 90 °C durante 1,5 horas, y la neutralización agregando 400 mM de amortiguador de fosfato de potasio frío, pH 7.

15 El polisacárido de tamaño reducido se concentró y se diafiltró en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 5 kDa con NMWCO.

La solución de polisacárido se ajustó luego hasta 22 °C y pH 5 con un amortiguador de acetato de sodio para minimizar la reducción de tamaño del polisacárido debido a la activación. La activación de polisacárido se inició con la adición de una solución de 100 mM de metaperiodato de sodio. El metaperiodato de sodio agregado fue de 0,20 moles de metaperiodato de sodio por mol de unidad de repetición del polisacárido para alcanzar un nivel diana de activación de polisacárido (moles de aldehído por mol de la unidad de repetición del polisacárido). La reacción de oxidación continuó durante 2 horas a 22 °C.

25 El producto activado se diafiltró en 10 mM de fosfato de potasio, pH 6,4 y luego mediante diafiltración en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 5 kDa con NMWCO. La ultrafiltración se llevó a cabo a 2-8 °C.

Conjugación de polisacárido con CRM197

CRM197 purificado, obtenido a través de la expresión en *Pseudomonas fluorescens* como se describió anteriormente (WO 2012/173876 A1), se diafiltró en 2 mM de amortiguador de fosfato, pH 7,2 usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 5 kDa con NMWCO y se filtró a 0,2 micrómetros.

Los polisacáridos activados se formularon para la liofilización a 6 mg Ps/ml con concentración de sacarosa de 5 % p/v. CRM197 se formuló para la liofilización a 6 mg Pr/ml con concentración de sacarosa de 1 % p/v.

Las soluciones de Ps y CRM197 formuladas se liofilizaron individualmente. Los materiales de Ps y CRM197 liofilizados se volvieron a disolver de manera individual en volúmenes iguales de DMSO. La solución de polisacárido alcanzó su nivel máximo con cloruro

de sodio a una concentración de 50 mM. Las soluciones de polisacárido y CRM197 se mezclaron para alcanzar una concentración de polisacáridos de 3,0 g Ps/l y una relación de masa de polisacárido con respecto a CRM197 de 1,5. La relación de masa se seleccionó para controlar la relación de polisacárido con respecto a CRM197 en el conjugado resultante. Se agregó cianoborohidruro de sodio (1 mol por mol de unidad de repetición del polisacárido), y la conjugación continuó durante 2 horas a 22 °C.

Reducción con borohidruro de sodio

Se agregó borohidruro de sodio (2 moles por mol de unidad de repetición del polisacárido) luego de la reacción de conjugación y se incubó durante 3 horas a 22 °C. El lote se diluyó en 150 mM de cloruro de sodio, con aproximadamente 0,025 % (p/v) de polisorbato 20, a aproximadamente 4°C. El amortiguador de fosfato de potasio se agregó luego para neutralizar el pH. El lote se concentró y se diafiltró a aproximadamente 4°C en 150 mM de cloruro de sodio, 25 mM de fosfato de potasio, pH 7, con el uso de una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 30 kD con NMWCO.

Filtración final y almacenamiento de producto

El lote se concentró y se diafiltró luego en 10 mM de histidina en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0, con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, a 4 °C usando membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 300 kDa con NMWCO.

El lote del concentrado fue filtrado a 0,2 micrómetros, luego se diluyó con 10 mM de histidina adicional en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0 con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, distribuido en alícuotas y congelado a ≤ -60 °C.

Tabla 25. Atributos del conjugado de serotipo 23A para el estudio monovalente de conjugación con DMSO

Ps oxidado en Mn / Mw	Conjugado en Mn / Mw	Ps:Pr	Consumo de lisina (CRM197 mol/ mol)	Ps libre / Ps total	Proteína libre / Proteína total
70 / 97 kD	2183 / 3837 kD	1,20	11,8	<1 %	<1 %

EJEMPLO 29

Preparación del conjugado de serotipo 23A para estudio polivalente usando la conjugación con DMSO

El polisacárido se disolvió, se dimensionó a una masa molecular diana, se activó químicamente y se intercambió en amortiguador mediante ultrafiltración. El polisacárido

activado y CRM197 purificado se liofilizaron individualmente y se volvieron a disolver en DMSO. Las soluciones de polisacárido y CRM197 que se volvieron a disolver se combinaron luego y se conjugaron como se describe a continuación. El conjugado resultante se purificó mediante ultrafiltración antes de una filtración final de 0,2 micrómetros. Varios parámetros de proceso en cada etapa, tal como pH, temperatura, concentración y tiempo, se controlaron para obtener conjugados con atributos deseados.

Reducción de tamaño y oxidación del polisacárido

El polvo de Ps capsular neumocócico purificado se disolvió en agua y se filtró a 0,45 micrómetros. Se redujo el tamaño del polisacárido disuelto mediante hidrólisis ácida mediante la adición de 200 mM de ácido acético, la incubación a 90 °C durante 1,5 horas, y la neutralización agregando 400 mM de amortiguador de fosfato de potasio frío, pH 7.

El polisacárido de tamaño reducido se concentró y se diafiltró en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 5 kDa con NMWCO.

La solución de polisacárido se ajustó luego hasta 22 °C y pH 5 con un amortiguador de acetato de sodio para minimizar la reducción de tamaño del polisacárido debido a la activación. La activación de polisacárido se inició con la adición de una solución de 100 mM de metaperiodato de sodio. El metaperiodato de sodio agregado fue de 0,20 moles de metaperiodato de sodio por mol de unidad de repetición del polisacárido para alcanzar un nivel diana de activación de polisacárido (moles de aldehído por mol de la unidad de repetición del polisacárido). La reacción de oxidación continuó durante 2 horas a 22 °C.

El producto activado se diafiltró en 10 mM de fosfato de potasio, pH 6,4 y luego mediante diafiltración en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 5 kDa con NMWCO. La ultrafiltración se llevó a cabo a 2-8 °C.

Conjugación de polisacárido con CRM197

CRM197 purificado, obtenido a través de la expresión en *Pseudomonas fluorescens* como se describió anteriormente (WO 2012/173876 A1), se diafiltró en 2 mM de amortiguador de fosfato, pH 7,2 usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 5 kDa con NMWCO y se filtró a 0,2 micrómetros.

Los polisacáridos activados se formularon para la liofilización a 6 mg Ps/ml con concentración de sacarosa de 5 % p/v. CRM197 se formuló para la liofilización a 6 mg Pr/ml con concentración de sacarosa de 1 % p/v.

Las soluciones de Ps y CRM197 formuladas se liofilizaron individualmente. Los materiales de Ps y CRM197 liofilizados se volvieron a disolver de manera individual en volúmenes iguales de DMSO. Las soluciones de polisacárido y CRM197 se mezclaron para alcanzar una concentración de polisacáridos de 3,5 g Ps/l y una relación de masa de polisacárido con respecto a CRM197 de 1,5. La relación de masa se seleccionó para controlar la relación de

polisacárido con respecto a CRM197 en el conjugado resultante. Se agregó cianoborohidruro de sodio (1 mol por mol de unidad de repetición del polisacárido), y la conjugación continuó durante 2 horas a 22 °C.

5 *Reducción con borohidruro de sodio*

Se agregó borohidruro de sodio (2 moles por mol de unidad de repetición del polisacárido) luego de la reacción de conjugación y se incubó durante 1 hora a 22 °C. El lote se diluyó en 150 mM de cloruro de sodio, con aproximadamente 0,025 % (p/v) de polisorbato 20, a aproximadamente 4°C. El amortiguador de fosfato de potasio se agregó luego para neutralizar el pH. El lote se concentró y se diafiltró a aproximadamente 4°C en 150 mM de cloruro de sodio, 25 mM de fosfato de potasio, pH 7, con el uso de una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 30 kD con NMWCO.

Filtración final y almacenamiento de producto

El lote se concentró y se diafiltró luego en 10 mM de histidina en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0, con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, a 4 °C usando membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 300 kDa con NMWCO.

El lote del concentrado fue filtrado a 0,2 micrómetros, luego se diluyó con 10 mM de histidina adicional en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0 con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, distribuido en alícuotas y congelado a ≤ -60 °C.

Tabla 26. Atributos del conjugado de serotipo 23A para el estudio polivalente de conjugación con DMSO

Ps oxidado en Mn / Mw	Conjugado en Mn / Mw	Ps:Pr	Consumo de lisina (CRM197 mol/ mol)	Ps libre / Ps total	Proteína libre / Proteína total
116 / 175 kD	2156 / 4933 kD	1,12	6,3	3,3 %	2,1 %

25

EJEMPLO 30

Preparación del conjugado de serotipo 23B para estudio monovalente usando la conjugación con DMSO

El polisacárido se disolvió, se dimensionó a una masa molecular diana, se activó químicamente y se intercambió en amortiguador mediante ultrafiltración. El polisacárido activado y CRM197 purificado se liofilizaron individualmente y se volvieron a disolver en DMSO. Las soluciones de polisacárido y CRM197 que se volvieron a disolver se combinaron luego y se conjugaron como se describe a continuación. El conjugado resultante se purificó mediante ultrafiltración antes de una filtración final de 0,2 micrómetros. Varios parámetros de

proceso en cada etapa, tal como pH, temperatura, concentración y tiempo, se controlaron para obtener conjugados con atributos deseados.

Reducción de tamaño y oxidación del polisacárido

5 El polvo de Ps capsular neumocócico purificado se disolvió en agua y se filtró a 0,45 micrómetros. El polisacárido disuelto se homogeneizó para reducir la masa molecular de Ps. La presión de homogenización y la cantidad de pasadas por el homogeneizador se controlaron a 400 bar/5 pasadas.

10 El polisacárido de tamaño reducido se concentró y se diafiltró en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10 kDa con NMWCO.

La solución de polisacárido se ajustó luego hasta 22 °C y pH 5 con un amortiguador de acetato de sodio para minimizar la reducción de tamaño del polisacárido debido a la activación. La activación de polisacárido se inició con la adición de una solución de 100 mM de metaperiodato de sodio. El metaperiodato de sodio agregada fue de 0,10 moles de
15 metaperiodato de sodio por mol de unidad de repetición del polisacárido para alcanzar un nivel diana de activación de polisacárido (moles de aldehído por mol de la unidad de repetición del polisacárido). La reacción de oxidación continuó durante 2 horas a 22 °C.

20 El producto activado se diafiltró en 10 mM de fosfato de potasio, pH 6,4 y luego mediante diafiltración en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10 kDa con NMWCO. La ultrafiltración se llevó a cabo a 2-8 °C.

Conjugación de polisacárido con CRM197

CRM197 purificado, obtenido a través de la expresión en *Pseudomonas fluorescens* como se describió anteriormente (WO 2012/173876 A1), se diafiltró en 2 mM de
25 amortiguador de fosfato, pH 7,2 usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 5 kDa con NMWCO y se filtró a 0,2 micrómetros.

Los polisacáridos activados se formularon para la liofilización a 6 mg Ps/ml con concentración de sacarosa de 5 % p/v. CRM197 se formuló para la liofilización a 6 mg Pr/ml con concentración de sacarosa de 1 % p/v.

30 Las soluciones de Ps y CRM197 formuladas se liofilizaron individualmente. Los materiales de Ps y CRM197 liofilizados se volvieron a disolver de manera individual en volúmenes iguales de DMSO. La solución de polisacárido alcanzó su nivel máximo con cloruro de sodio a una concentración final de 50 mM. Las soluciones de polisacárido y CRM197 se mezclaron para alcanzar una concentración de polisacáridos de 5,0 g Ps/l y una relación de masa
35 de polisacárido con respecto a CRM197 de 1,5. La relación de masa se seleccionó para controlar la relación de polisacárido con respecto a CRM197 en el conjugado resultante. Se agregó cianoborohidruro de sodio (1 mol por mol de unidad de repetición del polisacárido), y la conjugación continuó durante 2 horas a 22 °C.

Reducción con borohidruro de sodio

Se agregó borohidruro de sodio (2 moles por mol de unidad de repetición del polisacárido) luego de la reacción de conjugación y se incubó durante 1 hora a 22 °C. El lote se diluyó en 150 mM de cloruro de sodio, con aproximadamente 0,025 % (p/v) de polisorbato 20, a aproximadamente 4°C. El amortiguador de fosfato de potasio se agregó luego para neutralizar el pH. El lote se concentró y se diafiltró a aproximadamente 4°C en 150 mM de cloruro de sodio, 25 mM de fosfato de potasio, pH 7, con el uso de una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 30 kD con NMWCO.

Filtración final y almacenamiento de producto

El lote se concentró y se diafiltró luego en 10 mM de histidina en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0, con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, a 4 °C usando membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 300 kDa con NMWCO.

El lote del concentrado fue filtrado a 0,2 micrómetros, luego se diluyó con 10 mM de histidina adicional en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0 con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, distribuido en alícuotas y congelado a ≤ -60 °C.

Tabla 27. Atributos del conjugado de serotipo 23B para el estudio monovalente de conjugación con DMSO

Ps oxidado en Mn / Mw	Conjugado en Mn / Mw	Ps:Pr	Consumo de lisina (CRM197 mol/ mol)	Ps libre / Ps total	Proteína libre / Proteína total
155 / 179 kD	1322 / 3299 kD	1,28	6,2	13 %	5,1 %

EJEMPLO 31

Preparación del conjugado de serotipo 23B para estudio polivalente usando la conjugación con DMSO

El polisacárido se disolvió, se dimensionó a una masa molecular diana, se activó químicamente y se intercambió en amortiguador mediante ultrafiltración. El polisacárido activado y CRM197 purificado se liofilizaron individualmente y se volvieron a disolver en DMSO. Las soluciones de polisacárido y CRM197 que se volvieron a disolver se combinaron luego y se conjugaron como se describe a continuación. El conjugado resultante se purificó mediante ultrafiltración antes de una filtración final de 0,2 micrómetros. Varios parámetros de proceso en cada etapa, tal como pH, temperatura, concentración y tiempo, se controlaron para obtener conjugados con atributos deseados.

Reducción de tamaño y oxidación del polisacárido

El polvo de Ps capsular neumocócico purificado se disolvió en agua y se filtró a 0,45 micrómetros. El polisacárido disuelto se homogeneizó para reducir la masa molecular de Ps. La presión de homogenización y la cantidad de pasadas por el homogeneizador se controlaron a 5 400 bar/5 pasadas.

El polisacárido de tamaño reducido se concentró y se diafiltró en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10 kDa con NMWCO.

La solución de polisacárido se ajustó luego hasta 22 °C y pH 5 con un amortiguador de acetato de sodio para minimizar la reducción de tamaño del polisacárido debido a la activación. La activación de polisacárido se inició con la adición de una solución de 100 mM de metaperiodato de sodio. El metaperiodato de sodio agregada fue de 0,13 moles de metaperiodato de sodio por mol de unidad de repetición del polisacárido para alcanzar un nivel diana de activación de polisacárido (moles de aldehído por mol de la unidad de repetición del polisacárido). La reacción de oxidación continuó durante 2 horas a 22 °C.

El producto activado se diafiltró en 10 mM de fosfato de potasio, pH 6,4 y luego mediante diafiltración en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10 kDa con NMWCO. La ultrafiltración se llevó a cabo a 2-8 °C.

Conjugación de polisacárido con CRM197

CRM197 purificado, obtenido a través de la expresión en *Pseudomonas fluorescens* como se describió anteriormente (WO 2012/173876 A1), se diafiltró en 2 mM de amortiguador de fosfato, pH 7,2 usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 5 kDa con NMWCO y se filtró a 0,2 micrómetros.

Los polisacáridos activados se formularon para la liofilización a 6 mg Ps/ml con concentración de sacarosa de 5 % p/v. CRM197 se formuló para la liofilización a 6 mg Pr/ml con concentración de sacarosa de 1 % p/v.

Las soluciones de Ps y CRM197 formuladas se liofilizaron individualmente. Los materiales de Ps y CRM197 liofilizados se volvieron a disolver de manera individual en volúmenes iguales de DMSO. Las soluciones de polisacárido y CRM197 se mezclaron para alcanzar una concentración de polisacáridos de 5,0 g Ps/l y una relación de masa de polisacárido con respecto a CRM197 de 1,5. La relación de masa se seleccionó para controlar la relación de polisacárido con respecto a CRM197 en el conjugado resultante. Se agregó cianoborohidruro de sodio (1 mol por mol de unidad de repetición del polisacárido), y la conjugación continuó durante 4 horas a 22 °C.

35

Reducción con borohidruro de sodio

Se agregó borohidruro de sodio (2 moles por mol de unidad de repetición del polisacárido) luego de la reacción de conjugación y se incubó durante 1 hora a 22 °C. El lote se

diluyó en 150 mM de cloruro de sodio, con aproximadamente 0,025 % (p/v) de polisorbato 20, a aproximadamente 4°C. El amortiguador de fosfato de potasio se agregó luego para neutralizar el pH. El lote se concentró y se diafiltró a aproximadamente 4°C en 150 mM de cloruro de sodio, 25 mM de fosfato de potasio, pH 7, con el uso de una membrana de ultrafiltración de flujo

5 tangencial 30 kD con NMWCO.

Filtración final y almacenamiento de producto

El lote se concentró y se diafiltró luego en 10 mM de histidina en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0, con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, a 4 °C usando membrana de
10 ultrafiltración de flujo tangencial 300 kDa con NMWCO.

El lote del concentrado fue filtrado a 0,2 micrómetros, luego se diluyó con 10 mM de histidina adicional en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0 con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, distribuido en alícuotas y congelado a ≤ -60 °C.

15 Tabla 28. Atributos del conjugado de serotipo 23B para el estudio polivalente de conjugación con DMSO

Ps oxidado en Mn / Mw	Conjugado en Mn / Mw	Ps:Pr	Consumo de lisina (CRM197 mol/ mol)	Ps libre / Ps total	Proteína libre / Proteína total
172 / 197 kD	1076 / 2514 kD	1,26	7,4	12 %	3,2 %

EJEMPLO 32

Preparación del conjugado de serotipo 24F para estudios monovalente y
20 polivalente usando la conjugación con DMSO

El polisacárido se disolvió, se dimensionó a una masa molecular diana, se activó químicamente y se intercambió en amortiguador mediante ultrafiltración. El polisacárido activado y CRM197 purificado se liofilizaron individualmente y se volvieron a disolver en DMSO. Las soluciones de polisacárido y CRM197 que se volvieron a disolver se combinaron
25 luego y se conjugaron como se describe a continuación. El conjugado resultante se purificó mediante ultrafiltración antes de una filtración final de 0,2 micrómetros. Varios parámetros de proceso en cada etapa, tal como pH, temperatura, concentración y tiempo, se controlaron para obtener conjugados con atributos deseados.

30 *Reducción de tamaño y oxidación del polisacárido*

El polvo de Ps capsular neumocócico purificado se disolvió en agua y se filtró a 0,45 micrómetros. Se redujo el tamaño del polisacárido disuelto mediante hidrólisis ácida

mediante la adición de 200 mM de ácido acético, la incubación a 92 °C durante 50 minutos, y la neutralización agregando 400 mM de amortiguador de fosfato de potasio frío, pH 7.

El polisacárido de tamaño reducido se concentró y se diafiltró en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 5 kDa con NMWCO.

- 5 La solución de polisacárido se ajustó luego hasta 22 °C y pH 5 con un amortiguador de acetato de sodio para minimizar la reducción de tamaño del polisacárido debido a la activación. La activación de polisacárido se inició con la adición de una solución de 100 mM de metaperiodato de sodio. El metaperiodato de sodio agregado fue de 0,18 moles de metaperiodato de sodio por mol de unidad de repetición del polisacárido para alcanzar un nivel
- 10 diana de activación de polisacárido (moles de aldehído por mol de la unidad de repetición del polisacárido). La reacción de oxidación continuó durante 2 horas a 22 °C.

El producto activado se diafiltró en 10 mM de fosfato de potasio, pH 6,4 y luego mediante diafiltración en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 5 kDa con NMWCO. La ultrafiltración se llevó a cabo a 2-8 °C.

15

Conjugación de polisacárido con CRM197

- CRM197 purificado, obtenido a través de la expresión en *Pseudomonas fluorescens* como se describió anteriormente (WO 2012/173876 A1), se diafiltró en 2 mM de amortiguador de fosfato, pH 7,2 usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 5
- 20 kDa con NMWCO y se filtró a 0,2 micrómetros.

Los polisacáridos activados se formularon para la liofilización a 2 mg Ps/ml con concentración de sacarosa de 10 % p/v. CRM197 se formuló para la liofilización a 6 mg Pr/ml con concentración de sacarosa de 1 % p/v.

- Las soluciones de Ps y CRM197 formuladas se liofilizaron individualmente. Los
- 25 materiales de Ps y CRM197 liofilizados se volvieron a disolver de manera individual en volúmenes iguales de DMSO. La solución de polisacárido alcanzó su nivel máximo con cloruro de sodio a una concentración final de 50 mM. Las soluciones de polisacárido y CRM197 se mezclaron para alcanzar una concentración de polisacáridos de 1,5 g Ps/l y una relación de masa de polisacárido con respecto a CRM197 de 1,5. La relación de masa se seleccionó para controlar
- 30 la relación de polisacárido con respecto a CRM197 en el conjugado resultante. Se agregó cianoborohidruro de sodio (1 mol por mol de unidad de repetición del polisacárido), y la conjugación continuó durante 2 horas a 22 °C.

Reducción con borohidruro de sodio

- 35 Se agregó borohidruro de sodio (2 moles por mol de unidad de repetición del polisacárido) luego de la reacción de conjugación y se incubó durante 1 hora a 22 °C. El lote se diluyó en 150 mM de cloruro de sodio, con aproximadamente 0,025 % (p/v) de polisorbato 20, a aproximadamente 4°C. El amortiguador de fosfato de potasio se agregó luego para neutralizar el

pH. El lote se concentró y se diafiltró a aproximadamente 4°C en 150 mM de cloruro de sodio, 25 mM de fosfato de potasio, pH 7, con el uso de una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 30 kD con NMWCO.

5 *Filtración final y almacenamiento de producto*

El lote se concentró y se diafiltró luego en 10 mM de histidina en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0, con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, a 4 °C usando membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 300 kDa con NMWCO.

El lote del concentrado fue filtrado a 0,2 micrómetros, luego se diluyó con 10 mM de histidina adicional en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0 con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, distribuido en alícuotas y congelado a ≤ -60 °C.

Tabla 29. Atributos del conjugado de serotipo 24F para los estudios monovalente y polivalente de conjugación con DMSO

Ps oxidado en Mn / Mw	Conjugado en Mn / Mw	Ps:Pr	Consumo de lisina (CRM197 mol/ mol)	Ps libre / Ps total	Proteína libre / Proteína total
56 / 100 kD	2233 / 4875 kD	0,94	7,3	4,4 %	1,4 %

15

EJEMPLO 33

Preparación del conjugado de serotipo 31 para estudio monovalente usando la conjugación con DMSO

El polisacárido se disolvió, se dimensionó a una masa molecular diana, se activó químicamente y se intercambió en amortiguador mediante ultrafiltración. El polisacárido activado y CRM197 purificado se liofilizaron individualmente y se volvieron a disolver en DMSO. Las soluciones de polisacárido y CRM197 que se volvieron a disolver se combinaron luego y se conjugaron como se describe a continuación. El conjugado resultante se purificó mediante ultrafiltración antes de una filtración final de 0,2 micrómetros. Varios parámetros de proceso en cada etapa, tal como pH, temperatura, concentración y tiempo, se controlaron para obtener conjugados con atributos deseados.

Reducción de tamaño y oxidación del polisacárido

El polvo de Ps capsular neumocócico purificado se disolvió en agua y se filtró a 0,45 micrómetros. Se redujo el tamaño del polisacárido disuelto mediante hidrólisis ácida mediante la adición de 200 mM de ácido acético, la incubación a 90 °C durante 30 minutos, y la neutralización agregando 400 mM de amortiguador de fosfato de potasio frío, pH 7.

El polisacárido de tamaño reducido se concentró y se diafiltró en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 5 kDa con NMWCO.

La solución de polisacárido se ajustó luego hasta 22 °C y pH 5 con un amortiguador de acetato de sodio para minimizar la reducción de tamaño del polisacárido debido a la activación. La activación de polisacárido se inició con la adición de una solución de 100 mM de metaperiodato de sodio. El metaperiodato de sodio agregado fue de 0,16 moles de metaperiodato de sodio por mol de unidad de repetición del polisacárido para alcanzar un nivel diana de activación de polisacárido (moles de aldehído por mol de la unidad de repetición del polisacárido). La reacción de oxidación continuó durante 2 horas a 22 °C.

El producto activado se diafiltró en 10 mM de fosfato de potasio, pH 6,4 y luego mediante diafiltración en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 5 kDa con NMWCO. La ultrafiltración se llevó a cabo a 2-8 °C.

Conjugación de polisacárido con CRM197

CRM197 purificado, obtenido a través de la expresión en *Pseudomonas fluorescens* como se describió anteriormente (WO 2012/173876 A1), se diafiltró en 2 mM de amortiguador de fosfato, pH 7,2 usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 5 kDa con NMWCO y se filtró a 0,2 micrómetros.

Los polisacáridos activados se formularon para la liofilización a 6 mg Ps/ml con concentración de sacarosa de 5 % p/v. CRM197 se formuló para la liofilización a 6 mg Pr/ml con concentración de sacarosa de 1 % p/v.

Las soluciones de Ps y CRM197 formuladas se liofilizaron individualmente. Los materiales de Ps y CRM197 liofilizados se volvieron a disolver de manera individual en volúmenes iguales de DMSO. Las soluciones de polisacárido y CRM197 se mezclaron para alcanzar una concentración de polisacáridos de 4,0 g Ps/l y una relación de masa de polisacárido con respecto a CRM197 de 1,5. La relación de masa se seleccionó para controlar la relación de polisacárido con respecto a CRM197 en el conjugado resultante. Se agregó cianoborohidruro de sodio (1 mol por mol de unidad de repetición del polisacárido), y la conjugación continuó durante 1 hora a 22 °C.

Reducción con borohidruro de sodio

Se agregó borohidruro de sodio (2 moles por mol de unidad de repetición del polisacárido) luego de la reacción de conjugación y se incubó durante 1 hora a 22 °C. El lote se diluyó en 150 mM de cloruro de sodio, con aproximadamente 0,025 % (p/v) de polisorbato 20, a aproximadamente 4°C. El amortiguador de fosfato de potasio se agregó luego para neutralizar el pH. El lote se concentró y se diafiltró a aproximadamente 4°C en 150 mM de cloruro de sodio, 25 mM de fosfato de potasio, pH 7, con el uso de una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 30 kD con NMWCO.

Filtración final y almacenamiento de producto

- El lote se concentró y se diafiltró luego en 10 mM de histidina en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0, con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, a 4 °C usando membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 300 kDa con NMWCO.

El lote del concentrado fue filtrado a 0,2 micrómetros, luego se diluyó con 10 mM de histidina adicional en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0 con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, distribuido en alícuotas y congelado a ≤ -60 °C.

- 10 Tabla 30. Atributos del conjugado de serotipo 31 para el estudio monovalente de conjugación con DMSO

Ps oxidado en Mn / Mw	Conjugado en Mn / Mw	Ps:Pr	Consumo de lisina (CRM197 mol/ mol)	Ps libre / Ps total	Proteína libre / Proteína total
96 / 119 kD	1818 / 2999 kD	1,15	9,5	<1 %	<1 %

EJEMPLO 34

- 15 Preparación del conjugado de serotipo 31 para estudio polivalente usando la conjugación con DMSO

El polisacárido se disolvió, se dimensionó a una masa molecular diana, se activó químicamente y se intercambió en amortiguador mediante ultrafiltración. El polisacárido activado y CRM197 purificado se liofilizaron individualmente y se volvieron a disolver en DMSO. Las soluciones de polisacárido y CRM197 que se volvieron a disolver se combinaron luego y se conjugaron como se describe a continuación. El conjugado resultante se purificó mediante ultrafiltración antes de una filtración final de 0,2 micrómetros. Varios parámetros de proceso en cada etapa, tal como pH, temperatura, concentración y tiempo, se controlaron para obtener conjugados con atributos deseados.

- 25 *Reducción de tamaño y oxidación del polisacárido*

El polvo de Ps capsular neumocócico purificado se disolvió en agua y se filtró a 0,45 micrómetros. El polisacárido disuelto se homogeneizó para reducir la masa molecular de Ps. La presión de homogenización y la cantidad de pasadas por el homogeneizador se controlaron a 400 bar/5 pasadas.

- 30 El polisacárido de tamaño reducido se concentró y se diafiltró en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10 kDa con NMWCO.

La solución de polisacárido se ajustó luego hasta 22 °C y pH 5 con un amortiguador de acetato de sodio para minimizar la reducción de tamaño del polisacárido debido

a la activación. La activación de polisacárido se inició con la adición de una solución de 100 mM de metaperiodato de sodio. El metaperiodato de sodio agregada fue de 0,12 moles de metaperiodato de sodio por mol de unidad de repetición del polisacárido para alcanzar un nivel diana de activación de polisacárido (moles de aldehído por mol de la unidad de repetición del polisacárido). La reacción de oxidación continuó durante 2 horas a 22 °C.

El producto activado se diafiltró en 10 mM de fosfato de potasio, pH 6,4 y luego mediante diafiltración en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10 kDa con NMWCO. La ultrafiltración se llevó a cabo a 2-8 °C.

10 *Conjugación de polisacárido con CRM197*

CRM197 purificado, obtenido a través de la expresión en *Pseudomonas fluorescens* como se describió anteriormente (WO 2012/173876 A1), se diafiltró en 2 mM de amortiguador de fosfato, pH 7,2 usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 5 kDa con NMWCO y se filtró a 0,2 micrómetros.

15 Los polisacáridos activados se formularon para la liofilización a 6 mg Ps/ml con concentración de sacarosa de 5 % p/v. CRM197 se formuló para la liofilización a 6 mg Pr/ml con concentración de sacarosa de 1 % p/v.

Las soluciones de Ps y CRM197 formuladas se liofilizaron individualmente. Los materiales de Ps y CRM197 liofilizados se volvieron a disolver de manera individual en volúmenes iguales de DMSO. La solución de polisacárido alcanzó su nivel máximo con cloruro de sodio a una concentración final de 50 mM. Las soluciones de polisacárido y CRM197 se mezclaron para alcanzar una concentración de polisacáridos de 3,5 g Ps/l y una relación de masa de polisacárido con respecto a CRM197 de 1,5. La relación de masa se seleccionó para controlar la relación de polisacárido con respecto a CRM197 en el conjugado resultante. Se agregó cianoborohidruro de sodio (1 mol por mol de unidad de repetición del polisacárido), y la conjugación continuó durante 1 hora a 22 °C.

Reducción con borohidruro de sodio

30 Se agregó borohidruro de sodio (2 moles por mol de unidad de repetición del polisacárido) luego de la reacción de conjugación y se incubó durante 1 hora a 22 °C. El lote se diluyó en 150 mM de cloruro de sodio, con aproximadamente 0,025 % (p/v) de polisorbato 20, a aproximadamente 4°C. El amortiguador de fosfato de potasio se agregó luego para neutralizar el pH. El lote se concentró y se diafiltró a aproximadamente 4°C en 150 mM de cloruro de sodio, 25 mM de fosfato de potasio, pH 7, con el uso de una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 30 kD con NMWCO.

Filtración final y almacenamiento de producto

El lote se concentró y se diafiltró luego en 10 mM de histidina en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0, con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, a 4 °C usando membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 300 kDa con NMWCO.

- 5 El lote del concentrado fue filtrado a 0,2 micrómetros, luego se diluyó con 10 mM de histidina adicional en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0 con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, distribuido en alícuotas y congelado a ≤ -60 °C.

Tabla 31. Atributos del conjugado de serotipo 31 para el estudio polivalente de conjugación con DMSO

Ps oxidado en Mn / Mw	Conjugado en Mn / Mw	Ps:Pr	Consumo de lisina (CRM197 mol/ mol)	Ps libre / Ps total	Proteína libre / Proteína total
149 / 186 kD	2354 / 5971 kD	1,26	8,9	<1 %	1,8 %

10

EJEMPLO 35

Preparación del conjugado de serotipo 33F para estudio polivalente usando la conjugación con DMSO

- 15 El polisacárido se disolvió, se dimensionó a una masa molecular diana, se activó químicamente y se intercambió en amortiguador mediante ultrafiltración. El polisacárido activado y CRM197 purificado se liofilizaron individualmente y se volvieron a disolver en DMSO. Las soluciones de polisacárido y CRM197 que se volvieron a disolver se combinaron luego y se conjugaron como se describe a continuación. El conjugado resultante se purificó mediante ultrafiltración antes de una filtración final de 0,2 micrómetros. Varios parámetros de proceso en cada etapa, tal como pH, temperatura, concentración y tiempo, se controlaron para obtener conjugados con atributos deseados.
- 20

Reducción de tamaño y oxidación del polisacárido

- 25 El polvo de Ps capsular neumocócico purificado se disolvió en agua y se filtró a 0,45 micrómetros. El polisacárido disuelto se homogeneizó para reducir la masa molecular de Ps. La presión de homogenización y la cantidad de pasadas por el homogeneizador se controlaron a 350 bar/4 pasadas.

El polisacárido de tamaño reducido se concentró y se diafiltró en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10 kDa con NMWCO.

- 30 La solución de polisacárido se ajustó luego hasta 22 °C y pH 5 con un amortiguador de acetato de sodio para minimizar la reducción de tamaño del polisacárido debido a la activación. La activación de polisacárido se inició con la adición de una solución de 100 mM de metaperiodato de sodio. Se agregó metaperiodato de sodio a 0,12 moles de metaperiodato de

sodio por mol de unidad de repetición del polisacárido para alcanzar un nivel diana de activación de polisacárido (moles de aldehído por mol de la unidad de repetición del polisacárido). La reacción de oxidación continuó durante 2 horas a 22 °C.

- 5 El producto activado se diafiltró en 10 mM de fosfato de potasio, pH 6,4 y luego mediante diafiltración en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10 kDa con NMWCO. La ultrafiltración se llevó a cabo a 2-8 °C.

Conjugación de polisacárido con CRM197

- 10 CRM197 purificado, obtenido a través de la expresión en *Pseudomonas fluorescens* como se describió anteriormente (WO 2012/173876 A1), se diafiltró en 2 mM de amortiguador de fosfato, pH 7,2 usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 5 kDa con NMWCO y se filtró a 0,2 micrómetros.

- 15 Los polisacáridos activados se formularon para la liofilización a 6 mg Ps/ml con concentración de sacarosa de 5 % p/v. CRM197 se formuló para la liofilización a 6 mg Pr/ml con concentración de sacarosa de 1 % p/v.

- 20 Las soluciones de Ps y CRM197 formuladas se liofilizaron individualmente. Los materiales de Ps y CRM197 liofilizados se volvieron a disolver de manera individual en volúmenes iguales de DMSO. Las soluciones de polisacárido y CRM197 se mezclaron para alcanzar una concentración de polisacáridos de 1,8 g Ps/l y una relación de masa de polisacárido con respecto a CRM197 de 1,75. La relación de masa se seleccionó para controlar la relación de polisacárido con respecto a CRM197 en el conjugado resultante. Se agregó cianoborohidruro de sodio (1 mol por mol de unidad de repetición del polisacárido), y la conjugación continuó durante 4 horas a 22 °C.

Reducción con borohidruro de sodio

- 25 Se agregó borohidruro de sodio (2 moles por mol de unidad de repetición del polisacárido) luego de la reacción de conjugación y se incubó durante 1 hora a 22 °C. El lote se diluyó en 150 mM de cloruro de sodio, con aproximadamente 0,025 % (p/v) de polisorbato 20, a aproximadamente 4°C. El amortiguador de fosfato de potasio se agregó luego para neutralizar el pH. El lote se concentró y se diafiltró a aproximadamente 4°C en 150 mM de cloruro de sodio, 25 mM de fosfato de potasio, pH 7, con el uso de una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 30 kD con NMWCO.

Filtración final y almacenamiento de producto

- 35 El lote se concentró y se diafiltró luego en 10 mM de histidina en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0, con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, a 4 °C usando membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 300 kDa con NMWCO.

El lote del concentrado fue filtrado a 0,2 micrómetros (con prefiltro a 0,5 micrómetros), luego se diluyó con 10 mM de histidina adicional en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0 con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, distribuido en alícuotas y congelado a ≤ -60 °C.

- 5 Tabla 32. Atributos del conjugado de serotipo 33F para el estudio polivalente de conjugación con DMSO

Ps oxidado en Mn / Mw	Conjugado en Mn / Mw	Ps:Pr	Consumo de lisina (CRM197 mol/ mol)	Ps libre / Ps total	Proteína libre / Proteína total
186 / 220 kD	1630 / 2470 kD	1,28	8,4	1,3 %	5,4 %

EJEMPLO 36

- 10 Preparación del conjugado de serotipo 35B para estudio monovalente usando la conjugación con DMSO

El polisacárido se disolvió, se activó químicamente y se intercambió en amortiguador mediante ultrafiltración. El polisacárido activado y CRM197 purificado se liofilizaron individualmente y se volvieron a disolver en DMSO. Las soluciones de polisacárido y CRM197 que se volvieron a disolver se combinaron luego y se conjugaron como se describe a
15 continuación. El conjugado resultante se purificó mediante ultrafiltración antes de una filtración final de 0,2 micrómetros. Varios parámetros de proceso en cada etapa, tal como pH, temperatura, concentración y tiempo, se controlaron para obtener conjugados con atributos deseados.

Oxidación de polisacárido

- 20 El polvo de Ps capsular neumocócico purificado se disolvió en agua y se filtró a 0,45 micrómetros. El polisacárido disuelto se concentró y se diafiltró en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10 kDa con NMWCO.

La solución de polisacárido se ajustó luego hasta 22 °C y pH 5 con un amortiguador de acetato de sodio para minimizar la reducción de tamaño del polisacárido debido
25 a la activación. La activación de polisacárido se inició con la adición de una solución de 100 mM de metaperiodato de sodio. El metaperiodato de sodio agregado fue de 0,05 moles de metaperiodato de sodio por mol de unidad de repetición del polisacárido para alcanzar un nivel diana de activación de polisacárido (moles de aldehído por mol de la unidad de repetición del polisacárido). La reacción de oxidación continuó durante 2 horas a 22 °C.

- 30 El producto activado se diafiltró en 10 mM de fosfato de potasio, pH 6,4 y luego mediante diafiltración en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10 kDa con NMWCO. La ultrafiltración se llevó a cabo a 2-8 °C.

Conjugación de polisacárido con CRM197

CRM197 purificado, obtenido a través de la expresión en *Pseudomonas fluorescens* como se describió anteriormente (WO 2012/173876 A1), se diafiltró en 2 mM de amortiguador de fosfato, pH 7,2 usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 5 kDa con NMWCO y se filtró a 0,2 micrómetros.

Los polisacáridos activados se formularon para la liofilización a 6 mg Ps/ml con concentración de sacarosa de 5 % p/v. CRM197 se formuló para la liofilización a 6 mg Pr/ml con concentración de sacarosa de 1 % p/v.

Las soluciones de Ps y CRM197 formuladas se liofilizaron individualmente. Los Ps y CRM197 liofilizados se volvieron a disolver de manera individual en volúmenes iguales de DMSO que contenían 25 mM de cloruro de sodio. Las soluciones de polisacárido y CRM197 se mezclaron para alcanzar una concentración de polisacáridos de 10 g Ps/l y una relación de masa de polisacárido con respecto a CRM197 de 4,0. La relación de masa se seleccionó para controlar la relación de polisacárido con respecto a CRM197 en el conjugado resultante. La conjugación continuó durante 2,5 horas a 22 °C. Se agregó borohidruro de sodio (0,025 moles por mol de unidad de repetición de polisacárido) en dos espículas durante la incubación de conjugación.

Reducción con borohidruro de sodio

Se agregó borohidruro de sodio (2 moles por mol de unidad de repetición del polisacárido) luego de la reacción de conjugación y se incubó durante 1,5 horas a 22 °C. El lote se diluyó en 150 mM de cloruro de sodio, con aproximadamente 0,025 % (p/v) de polisorbato 20, a aproximadamente 4°C. El amortiguador de fosfato de potasio se agregó luego para neutralizar el pH. El lote se concentró y se diafiltró a aproximadamente 4°C en 150 mM de cloruro de sodio, 25 mM de fosfato de potasio, pH 7, con el uso de una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 30 kD con NMWCO.

Filtración final y almacenamiento de producto

El lote se concentró y se diafiltró luego en 10 mM de histidina en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0, con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, a 4 °C usando membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 300 kDa con NMWCO.

El lote del concentrado fue filtrado a 0,2 micrómetros (con prefiltro a 0,5 micrómetros), luego se diluyó con 10 mM de histidina adicional en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0 con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, distribuido en alícuotas y congelado a ≤ -60 °C.

Tabla 33. Atributos del conjugado de serotipo 35B para el estudio monovalente de conjugación con DMSO

Ps oxidado en Mn / Mw	Conjugado en Mn / Mw	Ps:Pr	Consumo de lisina (CRM197 mol/ mol)	Ps libre / Ps total	Proteína libre / Proteína total
48 / 82 kD	5494 / 7385 kD	1,26	4,5	1,8 %	11 %

EJEMPLO 37

Preparación del conjugado de serotipo 35B para estudio polivalente usando la conjugación con DMSO

- 5 El polisacárido se disolvió, se activó químicamente y se intercambió en amortiguador mediante ultrafiltración. El polisacárido activado y CRM197 purificado se liofilizaron individualmente y se volvieron a disolver en DMSO. Las soluciones de polisacárido y CRM197 que se volvieron a disolver se combinaron luego y se conjugaron como se describe a continuación. El conjugado resultante se purificó mediante ultrafiltración antes de una filtración
10 final de 0,2 micrómetros. Varios parámetros de proceso en cada etapa, tal como pH, temperatura, concentración y tiempo, se controlaron para obtener conjugados con atributos deseados.

Oxidación de polisacárido

- 15 El polvo de Ps capsular neumocócico purificado se disolvió en agua y se filtró a 0,45 micrómetros. El polisacárido disuelto se concentró y se diafiltró en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10 kDa con NMWCO.

- La solución de polisacárido se ajustó luego hasta 22 °C y pH 5 con un amortiguador de acetato de sodio para minimizar la reducción de tamaño del polisacárido debido a la activación. La activación de polisacárido se inició con la adición de una solución de 100 mM
20 de metaperiodato de sodio. El metaperiodato de sodio agregado fue de 0,05 moles de metaperiodato de sodio por mol de unidad de repetición del polisacárido para alcanzar un nivel diana de activación de polisacárido (moles de aldehído por mol de la unidad de repetición del polisacárido). La reacción de oxidación continuó durante 2 horas a 22 °C.

- 25 El producto activado se diafiltró en 10 mM de fosfato de potasio, pH 6,4 y luego mediante diafiltración en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 5 kDa con NMWCO. La ultrafiltración se llevó a cabo a 2-8 °C.

Conjugación de polisacárido con CRM197

- 30 CRM197 purificado, obtenido a través de la expresión en *Pseudomonas fluorescens* como se describió anteriormente (WO 2012/173876 A1), se diafiltró en 2 mM de amortiguador de fosfato, pH 7,2 usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 5 kDa con NMWCO y se filtró a 0,2 micrómetros.

Los polisacáridos activados se formularon para la liofilización a 6 mg Ps/ml con concentración de sacarosa de 5 % p/v. CRM197 se formuló para la liofilización a 6 mg Pr/ml con concentración de sacarosa de 1 % p/v.

Las soluciones de Ps y CRM197 formuladas se liofilizaron individualmente. El Ps liofilizado se volvió a disolver en DMSO con 50 mM de cloruro de sodio. El CRM197 liofilizado se volvió a disolver volúmenes iguales de DMSO. Las soluciones de polisacárido y CRM197 se mezclaron para alcanzar una concentración de polisacáridos de 5,25 g Ps/l y una relación de masa de polisacárido con respecto a CRM197 de 3,5. La relación de masa se seleccionó para controlar la relación de polisacárido con respecto a CRM197 en el conjugado resultante. La conjugación continuó durante 3 horas a 34 °C. Se agregó borohidruro de sodio (0,0375 moles por mol de unidad de repetición de polisacárido) en tres espículas durante la incubación de conjugación.

Reducción con borohidruro de sodio

Se agregó borohidruro de sodio (2 moles por mol de unidad de repetición del polisacárido) luego de la reacción de conjugación y se incubó durante 1 hora a 34 °C. El lote se diluyó en 150 mM de cloruro de sodio, con aproximadamente 0,025 % (p/v) de polisorbato 20, a aproximadamente 4°C. El amortiguador de fosfato de potasio se agregó luego para neutralizar el pH. El lote se concentró y se diafiltró a aproximadamente 4°C en 150 mM de cloruro de sodio, 25 mM de fosfato de potasio, pH 7, con el uso de una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 30 kD con NMWCO.

Filtración final y almacenamiento de producto

El lote se concentró y se diafiltró luego en 10 mM de histidina en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0, con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, a 4 °C usando membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 300 kDa con NMWCO.

El lote del concentrado fue filtrado a 0,2 micrómetros (con prefiltro a 0,5 micrómetros), luego se diluyó con 10 mM de histidina adicional en 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,0 con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, distribuido en alícuotas y congelado a ≤ -60 °C.

Tabla 34. Atributos del conjugado de serotipo 35B para el estudio polivalente de conjugación con DMSO

Ps oxidado en Mn / Mw	Conjugado en Mn / Mw	Ps:Pr	Consumo de lisina (CRM197 mol/ mol)	Ps libre / Ps total	Proteína libre / Proteína total
48 / 82 kD	1287 / 2585 kD	2,1	6,9	7,8 %	4,6 %

Algunos métodos de conjugación acuosa no se describieron para todos los serotipos en los Ejemplos 38-51. Para aquellos métodos de conjugación acuosa no descritos en la presente se pueden encontrar métodos similares en WO2018/156491.

5 EJEMPLO 38

Formulación de vacunas neumocócicas conjugadas

Los conjugados de polisacárido neumocócico con proteína individuales preparados con el uso de diferentes sustancias químicas como se describió en los Ejemplos anteriores, se usaron para la formulación de vacunas neumocócicas conjugadas 1-, 7-, 8-, 14-,
10 15-, 16-, 21- y 31-valente denominadas PCV1, PCV7, PCV8, PCV14, PCV15, PCV16, PCV21, y PCV31, respectivamente.

La formulación del producto farmacológico de la vacuna PCV1 contenía serotipo 3 conjugado usando aminación reductora en un solvente prótico (acuoso) o un solvente aprótico (DMSO) y formulado en 20 mM de L-histidina pH 5,8, 150 mM de NaCl y 0,1 % (p/v) de PS-20
15 para una concentración final diana de 84 µg/ml (p/v) de polisacárido neumocócico (PnPs) en la vacuna.

La formulación del producto farmacológico de la vacuna PCV7 contenía serotipos 3, 8, 9N, 10A, 11A, 15A y 19A, conjugados usando aminación reductora en un solvente prótico (acuoso) o aprótico (por ejemplo, DMSO) y formulados en 20 mM de L-histidina pH 5,8, 150
20 mM de NaCl y 0,1 % (p/v) de PS-20. Cada conjugado de polisacárido-proteína en PCV7 se formuló a 12 µg/ml (p/v) de polisacárido neumocócico (PnPs) para una concentración final diana de 84 µg/ml de PnPs en la vacuna.

El producto farmacológico de la vacuna PCV8 contenía serotipos 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 y 35B, conjugados con aminación reductora en un solvente aprótico (por
25 ejemplo, DMSO) y formulados en 20 mM de L-histidina, pH 5,8, 150 mM de NaCl y 0,2 % (p/v) de PS-20. Cada conjugado de polisacárido-proteína en PCV8 se formuló a 4 µg/ml (p/v) de polisacárido neumocócico (PnPs) para una concentración final diana de 32 µg/ml de PnPs en la vacuna.

El producto farmacológico de la vacuna PCV14 contenía serotipos 3, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F y 33F, conjugados usando aminación reductora
30 en un solvente prótico (acuoso) o aprótico (por ejemplo, DMSO) y formulados en 20 mM de L-histidina pH 5,8, 150 mM de NaCl y 0,1 % (p/v) de PS-20. Cada conjugado de polisacárido-proteína en PCV14 se formuló a 6 µg/ml (p/v) de polisacárido neumocócico (PnPs) para una concentración final diana de 84 µg/ml de PnPs en la vacuna.

El producto farmacológico de la vacuna PCV15 contenía serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F, conjugados en un solvente prótico (acuoso) y
35 formulados en 20 mM de L-histidina, pH 5,8, 150 mM de NaCl y 0,2 % (p/v) de PS-20. Cada conjugado de polisacárido-proteína se formuló a 4 µg/ml (p/v) de polisacárido neumocócico

(PnPs), con la excepción de 6B, que se formuló a 8 µg/ml, para una concentración final diana de 64 µg/ml de PnPs en la vacuna.

5 El producto farmacológico de la vacuna PCV16 contenía serotipos 6C, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 20A, 23A, 23B, 24F, 31, y 35B, conjugados con aminación reductora en un solvente aprótico (por ejemplo, DMSO) y formulados en 20 mM de L-histidina, pH 5,8, 150 mM de NaCl y 0,2 % (p/v) de PS-20. Cada conjugado de polisacárido-proteína se formuló a 4 µg/ml (p/v) u 8 µg/ml (p/v) de polisacárido neumocócico (PnPs) para una concentración final diana de 64 µg/ml o 128 µg/ml de PnPs en la vacuna.

10 El producto farmacológico de la vacuna PCV21 contenía serotipos 3, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B, conjugados con aminación reductora en un solvente aprótico (por ejemplo, DMSO) y formulados en 20 mM de L-histidina, pH 5,8, 150 mM de NaCl y distinta concentración de PS-20 como se define en cada ejemplo. Cada conjugado de polisacárido-proteína se formuló a 4 µg/ml (p/v) u 8 µg/ml (p/v) de polisacárido neumocócico (PnPs) para una concentración final diana de 84 µg/ml o 168 µg/ml de PnPs en la vacuna. En algunos ejemplos, PCV21 se formuló con 250 µg [Al]/ml en forma de fosfato de aluminio.

20 El producto farmacológico de la vacuna PCV31 contenía serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 16F, 17F, 18C, 19A, 19F, 20A, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 31, 33F y 35B, conjugados con aminación reductora en un solvente prótico (acuoso) o un solvente aprótico (por ejemplo, DMSO) y formulados en 20 mM de L-histidina, pH 5,8, 150 mM de NaCl y 0,2 % de PS-20. Cada conjugado de polisacárido-proteína se formuló a 4 µg/ml (p/v) de polisacárido neumocócico (PnPs), con la excepción de 6B, que se formuló a 8 µg/ml de PnPs, para una concentración final diana de 128 µg/ml de PnPs en la vacuna. En algunos ejemplos, PCV31 se formuló con 250 µg [Al]/ml en forma de fosfato de aluminio.

25 Se prepararon formulaciones adicionales de producto farmacológico PCV monovalente utilizando conjugado neumocócico de polisacárido-proteína de serotipos 6A, 6B, 6C, 10A, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 20A, 23A, 23B, 24F, 31 o 35B. Los detalles adicionales se describieron en los ejemplos específicos para estas formulaciones.

30 Para preparar la formulación del producto farmacológico PCV, los volúmenes requeridos de conjugados a granel necesarios para obtener la concentración final indicada (p/v) de polisacárido neumocócico (también denominado PnPs) se calcularon en función del volumen por lote y la concentración de polisacáridos a granel.

35 El proceso de formulación consistió en una preparación de mezcla a granel de conjugado de 1X a 4X de la concentración final de mezclas de PnPs en 10-80 mM de histidina, 0,0-0,8 % (p/v) de PS-20, y 150 mM de cloruro de sodio, pH 5,8.

Se prepararon las soluciones de histidina, pH 5,8, PS-20 (si se utilizó) y 150 mM de cloruro de sodio, y se agregaron al recipiente de formulación. Los conjugados neumocócicos de polisacárido-proteína individuales, almacenados congelados, se descongelaron a 2-8 °C y

luego se agregaron al recipiente de formulación. Durante la adición del conjugado de polisacárido-proteína al amortiguador de formulación (mezcla de conjugado), el recipiente se mezcló para garantizar la homogeneidad con el uso de una barra agitadora magnética o un impulsor magnético. Después de que se realizaron todas las adiciones y de que se agitó la solución, la mezcla de conjugado se hizo pasar a través de filtros de esterilización y se recolectó en un recipiente con o sin adyuvante de fosfato de aluminio. En algunos casos, se agregaron a los filtros de esterilización 150 mM de cloruro de sodio para ajustar el lote a la concentración diana.

Las formulaciones se cargaron en jeringas plásticas, jeringas de vidrio o viales.

10

EJEMPLO 39

Evaluación de estabilidad de vacunas neumocócicas conjugadas

Los productos farmacológicos de la vacuna neumocócica conjugada PCV16 (128 µg/ml PnPs) o dos PCV21 (84 µg/ml o 168 µg/ml PnPs) se cargaron en jeringas o viales. Los conjugados de polisacárido con proteína se realizaron mediante aminación reductora en un solvente aprótico (por ejemplo, DMSO) y se formularon en 20 mM de L-histidina, pH 5,8, 150 mM de NaCl, y 0,2 % (p/v) de PS-20. Estos productos farmacológicos se colocaron a 25 °C o 37 °C por hasta cuatro semanas y a 4 °C por hasta doce semanas. En algunos casos, las jeringas se colocaron en una plataforma de rotación horizontal y se agitaron por hasta 18 horas después de almacenarse por 1 semana a 4 °C, 25 °C o 37 °C. Esto se realizó para simular los esfuerzos de manipulación y envío que pueden ocasionar la elaboración y distribución del producto farmacológico. Para evaluar la estabilidad de los productos farmacológicos PCV16 o PCV21, se usó HPSEC UV/MALS/RI. Se usaron cromatografía de exclusión por tamaño de alta resolución (HPSEC), con dos columnas Shodex (803 y 806), acopladas en serie, y dispersión de luz multiángulo (MALS) ultravioleta (UV) y detección de índice de refracción (RI) para medir la concentración y la masa molar de las formulaciones del producto farmacológico PCV durante el almacenamiento. La concentración se calcula para cada intervalo de tiempo en el pico y se integra luego en todos los intervalos para alcanzar el valor de concentración final. La dispersión de luz es proporcional al producto de la masa molecular y la concentración del analito. Las masas molares o el peso molecular en cada intervalo se calcula de las señales del detector. La masa molecular promedio en peso (Mw) o promedio en número (Mn) se calcula en todos los intervalos para determinar el pico y se informa como peso molecular promedio.

El almacenamiento puede producir daños en la proteína y/o carbohidrato de una vacuna conjugada. Los antígenos de carbohidrato que poseen enlaces de cadena principal de fosfodiéster u otras inestabilidades en la unidad de repetición del polisacárido pueden ser susceptibles a la despolimerización a través de hidrólisis tras el almacenamiento en temperaturas y tiempo extendidos. Además, la proteína portadora o el carbohidrato que se usa en la vacuna conjugada puede ser susceptible a agregación tras el almacenamiento y los esfuerzos físicos.

Como se muestra en la Figura 11, los productos farmacológicos PCV16 y PCV21 fueron estables por 4 semanas a 25 °C y 37 °C y hasta 12 semanas a 4 °C independientemente de la concentración de polisacárido. Además, tras la agitación horizontal después del esfuerzo térmico, los productos farmacológicos PCV16 y PCV21 demostraron ser estables. No se observó pérdida de cantidad de antígeno debido a la adsorción no específica en la parte lateral de los contenedores o recipientes bajo estos esfuerzos térmicos y físicos. Además, no se observó agregación del producto farmacológico, lo que tendría un impacto en la resolución de la columna (por ejemplo, fijación irreversible a la columna o imposibilidad de ingresar/salir de las columnas de resolución) para estimar la dosis vacunal (Figura 12).

HPSEC UV/MALs/RI se usó para medir el peso molecular de un conjugado de polisacárido-proteína. Si los conjugados de polisacárido-proteína en el producto farmacológico se degradaran o despolimerizaran, resultaría evidente un descenso en el peso molecular y si ocurriera la agregación del producto farmacológico, ocurriría un aumento en el peso molecular. Esta medición proporciona caracterización adicional en la calidad del producto farmacológico o intermediario de la vacuna. Como se muestra en la Figura 13, los productos farmacológicos PCV16 y PCV21 que comprenden sustancias farmacológicas que se prepararon cada una con aminación reductora en un solvente aprótico (por ejemplo, DMSO) fueron estables ante la despolimerización o la degradación química del carbohidrato y estables ante la agregación de la proteína en la formulación del producto farmacológico. Esto indica que los productos farmacológicos PCV16 y PCV21 que usan conjugados de polisacárido con proteína preparados mediante aminación reductora en un solvente aprótico, tal como DMSO, son estables ante esfuerzos físicos y temperaturas elevadas. Las formulaciones demuestran excelente estabilidad en cuanto a cantidad y calidad. La formulación no pierde la dosis total debido a la adsorción no específica en la parte lateral de los contenedores u otras superficies y la formulación no se degrada ni agrega como lo indica en peso molecular estable del producto farmacológico de la vacuna (peso molecular promedio en peso (Mw) y peso molecular promedio en número (Mn)).

EJEMPLO 40

Impacto de la química de la conjugación en la estabilidad de una vacuna neumocócica conjugada

Los conjugados de polisacárido neumocócico con proteína individuales preparados con el uso de diferentes sustancias químicas como se describió en los Ejemplos anteriores, se usaron para la formulación de vacunas neumocócicas conjugadas 15- y 16- valente denominadas PCV15 y PCV16 a 64 µg/ml. El producto farmacológico de la vacuna PCV15 contenía serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F, conjugados con aminación reductora en un solvente prótico (completamente acuoso) y formulados en 20 mM de L-histidina, pH 5,8, 150 mM de NaCl y 0,2 % p/v de PS-20 (ver Ejemplo 38). El producto farmacológico PCV16 contenía serotipos 6C, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 20A, 23A, 23B, 24F, 31, y 35B, conjugados con aminación reductora en un solvente aprótico (por

ejemplo, completamente de DMSO) y formulados en 20 mM de L-histidina, pH 5,8, 150 mM de NaCl y 0,2 % (p/v) de PS-20 (ver Ejemplo 38). Cada conjugado de polisacárido-proteína se formuló a 4 µg/ml (p/v) de polisacárido neumocócico (PnPs), con la excepción de 6B en PCV15, que se formuló a 8 µg/ml, para una concentración final de 64 µg/ml de PnPs en cada vacuna.

5 Los contenedores cargados con vacuna se colocaron a 4 °C o 37 °C por hasta 1 semana. Se usó espectroscopia de fluorescencia intrínseca de proteínas (IPFS) para evaluar la estabilidad de la proteína portadora conjugada con polisacárido neumocócico, CRM197, en las composiciones PCV15 o PCV16 tras el almacenamiento por hasta 1 semana a 4 °C y 37 °C. Los espectros de emisión de fluorescencia (Em 290-400 nm) de muestras sin diluir se recolectaron
10 con el uso de un espectrofluorómetro Jasco FP-6500 a temperatura ambiente en una cubeta de cuarzo de longitud de vía de 1 cm. Una longitud de onda de excitación de 280 nm se usó con una velocidad de barrido de 100 nm/min y un pasabanda de excitación y emisión de 3nm.

Como se muestra en la Figura 14, la formulación del producto farmacológico que contenía sustancias farmacológicas preparadas con aminación reductora en un solvente aprótico
15 (por ejemplo, completamente de DMSO) generó estabilidad física y química superior en comparación con una vacuna que utilizó sustancias farmacológicas preparadas con un solvente prótico durante la aminación reductora en el proceso de conjugación (conjugación completamente acuosa). En tan solo 16 horas a 37 °C, se redujo la intensidad de fluorescencia del producto farmacológico PCV15, a 64 µg/ml de PnPs, preparado mediante una aminación
20 reductora en un solvente prótico (completamente acuoso) para el proceso de conjugación acuosa, y la emisión máxima de la vacuna se modificó de 332 nm a 338 nm. El producto farmacológico de la vacuna PCV16, a 64 µg/ml de PnPs, con sustancias farmacológicas preparadas con química de aminación reductora en un solvente aprótico (por ejemplo, completamente de DMSO) no mostró un cambio en la intensidad de fluorescencia o emisión máxima de 338 nm. Se debe
25 comprender que la intensidad de señal resultante y la emisión máxima adquiridos de la medición de IPFS se debe a la estabilidad colectiva de las sustancias farmacológicas individuales en un producto farmacológico de complejo multivalente. Se demostró que un producto farmacológico de la vacuna que utilizaba todas las sustancias farmacológicas preparadas en un solvente aprótico era estable mientras que un producto farmacológico de la vacuna que utilizaba todas las
30 sustancias farmacológicas preparadas en un solvente prótico no era estable.

Sin limitarse a ninguna teoría en particular, esta estabilidad podría ser debido a la conjugación en DMSO lo que produce el despliegue y la desnaturalización de la proteína portadora. La conjugación con la proteína portadora desnaturalizada cerraría la conformación en el estado desnaturalizado después de la conjugación. De ser así, este estudio también sugeriría
35 que la confirmación final es estable en el estudio de esfuerzo evaluado en la presente. Por lo tanto, se prefiere el uso de una vacuna con conjugado preparado mayormente con solventes apróticos para proporcionar un producto farmacológico de vacuna consistente y estable.

Si una composición de producto farmacológico de la vacuna incluyera una mezcla de sustancias farmacológicas, glicoconjugados o conjugados de polisacárido con proteína que utiliza diferentes solventes de aminación reductora (acuosos o DMSO) en los procesos de conjugación, se pesaría la emisión máxima promedio o la intensidad medidas de la formulación del producto farmacológico debido a la contribución de cada emisión de conjugado de polisacárido con proteína acuoso a 332 nm y cada emisión de conjugado de polisacárido con proteína no acuoso a 338 nm. Cabe esperar que ocurra un cambio, ya sea en la intensidad o la emisión máxima, tras la temperatura elevada para dicha mezcla que no usa todos los conjugados de polisacárido con proteína, preparados mediante aminación reductora en un solvente aprótico, en la formulación del producto farmacológico multivalente. Por lo tanto, se prefiere el uso de una vacuna con conjugado preparado mayormente con solventes apróticos para proporcionar un producto farmacológico de vacuna consistente y estable.

EJEMPLO 41

Estudios recopilados de inmunogenicidad de conejo monovalente para serotipos seleccionados

Los conejos blancos de Nueva Zelanda (NZWR, n=3/grupo) adultos se inmunizaron de manera intramuscular (IM) con 0,25 ml o 0,5 ml (para 15C únicamente) de vacuna conjugada monovalente respectiva en el día 0 y el día 14 (lados alternativos). Las vacunas neumocócicas monovalentes, formuladas en 20 mM de L-histidina, pH 5,8, 150 mM de NaCl, y 0,2 % (p/v) de PS-20, con el proceso de formulación descrito en el Ejemplo 38, se dosificaron de la siguiente manera: (1) 1 µg de PnPs (6C, 10A, 15A, 16F, 17F, 20A, 23A, 23B, 24F, 31 o 35B, cada uno conjugado en CRM197) con 62,5 µg de adyuvante de fosfato de aluminio (APA) por inmunización, o (2) 2 µg de PnPs (15C) con 125 µg de APA por inmunización. Se recolectó suero antes del inicio del estudio (preinmunización) y en los días 14 (después de la dosis 1, PD1) y 28 (después de la dosis 2, PD2). Se observaron NZWR al menos diariamente por parte del personal de cuidado de los animales capacitado para determinar signos de enfermedad o malestar. Las formulaciones de la vacuna en NZWR se consideraron seguras y de buena tolerancia, dado que no se notaron eventos adversos relacionados con la vacuna. Todos los experimentos en animales se llevaron a cabo en estricta conformidad con las recomendaciones de la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio de los Institutos Nacionales de la Salud. El protocolo experimental de NZWR fue aprobado por los Comités institucionales de uso y cuidado animal en Merck & Co., Inc. (Kenilworth, NJ) y Covance (Denver, PA).

Los sueros de NZWR se analizaron en ensayos ELISA para evaluar la inmunogenicidad de IgG con el uso de 1-2 mg/ml de concentración de recubrimiento de PnPs respectivos. El anticuerpo funcional se determinó a través de ensayos de opsonofagocitosis (OPA) en función de los protocolos descritos anteriormente disponibles en línea en el Laboratorio de referencia de patógenos respiratorios bacterianos de la Universidad de Alabama

en Birmingham con el uso del *software* Opsotiter® 3 (UAB Research Foundation, Caro-Aguilar *et al.* Immunogenicity differences of a 15-valent pneumococcal polysaccharide conjugate vaccine (PCV15) based on vaccine dose, route of immunization and mouse strain. *Vaccine* 35(6):865-72 (2017); Burton *et al.* Development and validation of a fourfold multiplexed opsonization assay (MOPA4) for pneumococcal antibodies. *Clin Vaccine Immunol* 13(9):1004-9 (2006)).

Se descubrió que todas las vacunas neumocócicas conjugadas monovalentes fueron inmunógenas en conejos (Figura 15) y generaron anticuerpos funcionales que inactivaron la cepa bacteriana respectiva (Figura 16).

EJEMPLO 42

Evaluación de la protección cruzada de serotipos 15A, 15B, 15C

Los conejos se inmunizaron con 15A-CRM197/APA, 15B-CRM197/APA o 15C-CRM197/APA para evaluar la reactividad cruzada entre cada serotipo.

Los conejos blancos de Nueva Zelanda (NZWR, n=3/grupo) adultos se inmunizaron de manera intramuscular (IM) con 0,5 ml de vacuna conjugada monovalente respectiva en el día 0 y el día 14 (lados alternativos). La vacuna neumocócica conjugada monovalente, formulada en 20 mM de L-histidina, pH 5,8, 150 mM de NaCl, y 0,2 % (p/v) de PS-20 y el proceso de formulación descrito en el Ejemplo 38, se dosificó en 2 µg de PnPs (15A, 15B o 15C cada uno conjugado con CRM197) con 125 µg de APA por inmunización. Se recolectó suero antes del inicio del estudio (preinmunización) y en los días 14 (después de la dosis 1, PD1) y 28 (después de la dosis 2, PD2). Se observaron NZWR al menos diariamente por parte del personal de cuidado de los animales capacitado para determinar signos de enfermedad o malestar. Las formulaciones de la vacuna en NZWR se consideraron seguras y de buena tolerancia, dado que no se notaron eventos adversos relacionados con la vacuna. Todos los experimentos en animales se llevaron a cabo en estricta conformidad con las recomendaciones de la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio de los Institutos Nacionales de la Salud. El protocolo experimental de NZWR fue aprobado por los Comités institucionales de uso y cuidado animal en Merck & Co., Inc y Covance (Denver, PA).

Los sueros de NZWR se analizaron en ensayos ELISA para evaluar la inmunogenicidad de IgG con el uso de 1-2 mg/ml de concentración de recubrimiento de PnPs respectivos. El anticuerpo funcional se determinó a través de OPA en función de los protocolos descritos anteriormente disponibles en línea en el Laboratorio de referencia de patógenos respiratorios bacterianos Bacterial Respiratory Pathogen Reference Laboratory de la Universidad de Alabama en Birmingham con el uso del *software* Opsotiter® 3 (UAB Research Foundation (Caro-Aguilar *et al.*, 2017; Burton *et al.*, 2006).

Se descubrió que las tres vacunas neumocócicas conjugadas monovalentes de serogrupo 15 fueron inmunógenas en conejos (Figura 17) y generaron anticuerpos funcionales

que inactivaron la cepa bacteriana respectiva (Figura 18). Además, los conejos inmunizados con las vacunas neumocócicas conjugadas monovalentes del serogrupo 15 tuvieron títulos de OPA e IgG PD2 equivalentes con respecto al polisacárido homólogo y heterólogo y la cepa bacteriana, respectivamente. Los conejos inmunizados con 15A-CRM197/APA, 15B-CRM197/APA o 15C-CRM197/APA tuvieron reactividad cruzada con respecto a cada polisacárido neumocócico (15A, 15B, 15C) (Figura 17). Con el uso de los datos de IgG transformado con log después de la dosis 2 (PD2) que se analizaron mediante ANOVA de un factor con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey (valor $P=0,354$), no se observó diferencia significativa en los títulos de IgG en el serogrupo 15. Además, se observó reactividad cruzada en los conejos inmunizados con 15A-CRM197/APA, 15B-CRM197/APA o 15C-CRM197/APA con respecto a cada cepa bacteriana *S. pneumoniae*, (15A, 15B, 15C), dado que todo el suero hiperinmune de conejo tuvo anticuerpo funcional con respecto a cada cepa evaluada, e inactivó la bacteria (Figura 18). De manera similar, con el uso de los datos de OPA transformado con log después de la dosis 2 (PD2) que se analizaron mediante ANOVA de un factor con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey (valor $P=0,054$), no se observó diferencia significativa en los títulos de OPA en el serogrupo 15.

EJEMPLO 43

Inmunogenicidad de PCV21 en conejos blancos de Nueva Zelanda

Los conejos blancos de Nueva Zelanda (NZWR, $n=5/\text{grupo}$) adultos se inmunizaron por vía intramuscular (IM) con 0,1-0,5 ml de vacuna neumocócica conjugada en el día 0 y el día 14 (lados alternativos). Una vacuna neumocócica PCV21, formulada en 20 mM de L-histidina, pH 5,8, 150 mM de NaCl, y 0,2 % (p/v) de PS-20 y con el proceso de formulación descrito en el Ejemplo 38, se dosificó a 4, 2, 1, 0,4, 0,08 o 0,016 μg de PnPs (3, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F o 35B, cada uno conjugado con CRM197) por inmunización. Se recolectó suero antes del inicio del estudio (preinmunización) y en los días 14 (después de la dosis 1, PD1) y 28 (después de la dosis 2, PD2). Se observaron NZWR al menos diariamente por parte del personal de cuidado de los animales capacitado para determinar signos de enfermedad o malestar. Las formulaciones de la vacuna en NZWR se consideraron seguras y de buena tolerancia, dado que no se notaron eventos adversos relacionados con la vacuna. Todos los experimentos en animales se llevaron a cabo en estricta conformidad con las recomendaciones de la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio de los Institutos Nacionales de la Salud. El protocolo experimental de NZWR fue aprobado por los Comités institucionales de uso y cuidado animal en Merck & Co., Inc y Covance (Denver, PA).

Los sueros de NZWR se evaluaron para determinar la inmunogenicidad de IgG con el uso de ensayo de electroquimioluminiscencia mutiplexado (ECL). Este ensayo se desarrolló para usar con suero de conejo en función del ensayo sobre humanos descrito por

Marchese *et al.* (Optimization and validation of a multiplex, electrochemiluminescence-based detection assay for the quantitation of immunoglobulin G serotype-specific antipneumococcal antibodies in human serum. *Clin Vaccine Immunol.* 16(3): 387-96 (2009)) con el uso de tecnología desarrollada por MesoScale Discovery (una división de MesoScale Diagnostics, LLC, Gaithersburg, MD) que utiliza una etiqueta SULFO-TAG™ que emite luz ante la estimulación electroquímica. El anti-IgG de conejo etiquetado SULFO-TAG™ se usó como anticuerpo secundario para analizar muestras de suero de NZWR. El anticuerpo funcional se determinó a través de ensayos opsonofagocíticos mutiplexados (MOPA) en función de los protocolos descritos anteriormente disponibles en línea en el Laboratorio de referencia de patógenos respiratorios bacterianos Bacterial Respiratory Pathogen Reference Laboratory de la Universidad de Alabama en Birmingham con el uso del *software* Opsotiter® 3 (UAB Research Foundation, Caro-Aguilar *et al*, 2017, *supra*, Burton *et al.*, 2006, *supra*).

Se descubrió que las vacunas neumocócicas conjugadas PCV21 fueron inmunógenas en conejos (Figuras 19A, 19B, 20A, y 20B) y generaron anticuerpos funcionales que inactivaron cepas bacterianas tipo vacuna (Figuras 21A y 21B) en todas las dosis analizadas.

La inmunogenicidad PD1 comparable se observó en PCV21 dosificado a 4, 2, 1 y 0,4 µg por PnPs, con la excepción de 24F que tuvo mayor inmunogenicidad en la dosis de 2 µg en comparación con las dosis de 4 o 1 µg y 15A, 15B y 15C que tuvieron mayor inmunogenicidad en la dosis de 0,4 µg en comparación con la dosis de 2 µg (Figuras 19A y 19B). Por lo tanto, casi no existió respuesta de dosis vacunal en las dosis de PnPs mayores (0,4-4 µg/PnPs). La inmunogenicidad inferior se observó en las dosis de vacuna de 0,08 y 0,016 µg de PnPs, dado que muchos serotipos fueron significativamente menores en comparación con la dosis de vacuna de 2 µg.

La inmunogenicidad PD2 comparable se observó en PCV21 dosificado a 4, 2, 1 y 0,4 µg por PnPs (Figuras 20A y 20B).

En general, se observaron títulos de MOPA PD2 comparables en PCV21 dosificado a 4, 2, 1 y 0,4 µg por PnPs con títulos de MOPA menores para las dosis de vacuna de 0,08 y 0,016 µg de PnPs, aunque muchos no alcanzaron importancia estadística (no se muestran los datos). PCV21 dosificado a 2 µg por PnPs se seleccionó como un conjunto de datos representativos para MOPA. Específicamente, se observaron mayores títulos de MOPA PD1 en los conejos inmunizados con PCV21 en la dosis de 2 µg para todos los serotipos en comparación con el suero preinmune de conejo con la excepción del serotipo 3 (Figura 21A). Se debe tener en cuenta que el suero preinmune de conejo de este estudio tuvo títulos de fondo mayores con respecto a los serotipos 16F, 31 y 35B. Los conejos inmunizados con PCV21 en la dosis de 2 µg tuvieron títulos de MOPA PD2 significativamente mayores para todos los serotipos comparados con el suero preinmune de conejo (Figura 21B). Los datos transformados con log se analizaron mediante ANOVA de un factor con la prueba de Dunnett para determinar la importancia.

EJEMPLO 44

Materiales y métodos

Análisis de polisacárido libre

El polisacárido libre (polisacárido que no está conjugado con CRM197) en la muestra del conjugado se midió precipitando en primer lugar la proteína libre y los conjugados con desoxicolato (DOC) y ácido clorhídrico. Los precipitados se filtraron luego y los filtrados se analizaron para la concentración de polisacárido libre mediante HPSEC/UV/MALS/RI. El polisacárido libre se calculó como un porcentaje de polisacárido total medido con HPSEC/UV/MALS/RI.

Análisis de proteína libre

El polisacárido libre, el conjugado de polisacárido-CRM197, y el CRM197 libre en las muestras de conjugado se separaron mediante electroforesis capilar en modo cromatografía electrocinética micelar (MEKC). En resumen, las muestras se mezclaron con amortiguador de corrida en MEKC que contenía 25 mM de borato, 100 mM de SDS, pH 9,3, y se separaron en un capilar de sílice fusionado previamente acondicionado. La separación se monitoreó a 200 nm y el CRM197 libre se cuantificó con una curva estándar de CRM197. Los resultados de proteína libre se informaron como un porcentaje del contenido de proteína total determinado con el procedimiento de HPSEC/UV/MALS/RI.

Peso molecular y análisis de concentración de conjugados con el uso del ensayo HPSEC/UV/MALS/RI

Las muestras de conjugado se inyectaron y separaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño de alta resolución (HPSEC). La detección se logró con dispersión de luz multiángulo (MALS) ultravioleta (UV) y detectores de índice de refracción (RI) en serie. La concentración de proteína se calculó de UV280 con el uso de un coeficiente de extinción. La concentración de polisacárido se deconvolucionó de la señal de RI (con la contribución de la proteína y el polisacárido) con el uso de factores dn/dc que fueron un cambio en la concentración del soluto informada en ml/g. El peso molecular promedio de las muestras se calculó con el *software* Astra (Wyatt Technology Corporation, Santa Barbara, CA) con el uso de concentración medida e información de dispersión de luz en todo el pico de la muestra. Existen diversas formas de valores promedio de peso molecular para moléculas polidispersas. Por ejemplo, el peso molecular promedio en número M_n , el peso molecular promedio en peso M_w , y el peso molecular promedio z M_z (Molecules, 2015, 20, 10313-10341). A menos que se especifique, los pesos moleculares son el peso molecular promedio en peso.

Determinación del consumo de lisina en proteína conjugada como una medición del número de uniones covalentes entre polisacárido y proteína portadora

El análisis de aminoácidos (AAA) de Waters AccQ-Tag se usó para medir la extensión de la conjugación en muestras de conjugado. Las muestras se hidrolizaron con el uso de hidrólisis ácida en fase de vapor en la estación de trabajo Eldex, para descomponer las proteínas portadoras en sus aminoácidos componentes. Los aminoácidos libres se derivatizaron usando 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato (AQC). Las muestras derivatizadas se analizaron luego usando UPLC con detección UV en una columna C18. La concentración de proteína promedio se obtuvo con el uso de aminoácidos representativos distintos de la lisina. El consumo de lisina durante la conjugación (es decir, la pérdida de lisina) se determinó mediante la diferencia entre la cantidad promedio medida de lisina en el conjugado y la cantidad esperada de lisina en la proteína de inicio.

EJEMPLO 45

Impacto del proceso de conjugación en la estabilidad de una vacuna neumocócica conjugada

Los conjugados de polisacárido neumocócico con proteína individuales preparados utilizando diferentes solventes de aminación reductora (acuosos o DMSO) como se describió en los Ejemplos anteriores, se usaron para la formulación del producto farmacológico de vacunas neumocócicas conjugadas 1-, 7-, 14- y 21- valente denominadas PCV1, PCV7, PCV14 y PCV21 a 84 ug/ml.

Los contenedores cargados con vacuna de producto farmacológico se colocaron a 4 °C o 37 °C por hasta 7 días. Se usó espectroscopia de fluorescencia intrínseca de proteínas (IPFS) para evaluar la estabilidad de la proteína portadora conjugada con polisacárido neumocócico, CRM197, en las composiciones PCV1, PCV7, PCV14 o PCV21 tras el almacenamiento por hasta [omisión en el texto fuente] a 4 °C y 37 °C. Los espectros de emisión de fluorescencia (Em 290-400 nm) de muestras sin diluir se recolectaron con el uso de un espectrofluorómetro Jasco FP-6500 a temperatura ambiente en una cubeta de cuarzo de longitud de vía de 1 cm. Una longitud de onda de excitación de 280 nm se usó con una velocidad de barrido de 100 nm/min y un pasabanda de excitación y emisión de 3nm.

Como se muestra en las Figuras 22 A-C, las formulaciones del producto farmacológico que contenían todos los conjugados de polisacárido-proteína preparados mediante aminación reductora en un solvente aprótico (por ejemplo, DMSO) generaron estabilidad física y química superior en comparación con una vacuna que utilizó conjugados de polisacárido-proteína preparados con un solvente acuoso durante la aminación reductora en el proceso de conjugación (prótico). En tan solo 16 horas a 37 °C, se redujo la intensidad de fluorescencia de los productos farmacológicos PCV1, PCV7 y PCV14 preparados utilizando todos los conjugados de polisacárido-proteína que se prepararon mediante aminación reductora en un solvente acuoso a 84 µg/ml de PnPs, y la emisión máxima de la vacuna se modificó de 332 nm a 338 nm. Los productos farmacológicos de las vacunas PCV1, PCV7 y PCV14, a 84 µg/ml de PnPs, con sustancias farmacológicas preparadas con química de aminación reductora en un solvente

aprótico (por ejemplo, DMSO) no mostró un cambio en la intensidad de fluorescencia o emisión máxima a 338 nm. Asimismo, se estudió un producto farmacológico PCV21. Se formuló en 20 mM de L-histidina, pH 5,8, 150 mM de NaCl, y 0,1 % (p/v) de PS-20, como se describió en el Ejemplo 38, que contenían conjugados de polisacárido-proteína preparados mediante aminación reductora en un solvente aprótico (por ejemplo, DMSO). El estudio mostró una estabilidad física y química superior después de almacenamiento a 37 °C. PCV21 no mostró un cambio en la intensidad de fluorescencia o la emisión máxima de 338 nm (Figura 22D).

Se debe comprender que la intensidad de señal resultante y la emisión máxima adquiridas de la medición de IPFS (Ejemplo 40) se debe a la estabilidad colectiva de los conjugados de polisacárido-proteína individuales en un producto farmacológico de complejo multivalente. Se demostró que un producto farmacológico de la vacuna que utilizaba todos los conjugados de polisacárido-proteína preparados en un solvente aprótico era estable mientras que un producto farmacológico de la vacuna que utilizaba todas las sustancias farmacológicas preparadas en un solvente prótico no era estable en condiciones de esfuerzo. Si una composición de producto farmacológico de la vacuna incluyera una mezcla de conjugados de polisacárido-proteína mediante un proceso de conjugación prótico y aprótico, se pesaría la emisión máxima promedio o la intensidad medidas del producto farmacológico debido a la contribución de cada emisión de conjugado de polisacárido-proteína prótica a 332 nm y cada emisión de conjugado de polisacárido-proteína aprótica. Se esperaría que ocurra un cambio ponderado, en la intensidad o la emisión máxima, tras la temperatura elevada para dicha mezcla debido a la presencia de conjugados de polisacárido con proteína preparados mediante un proceso de conjugación prótico.

Como se muestra en la Figura 23, para evaluar la estabilidad del producto farmacológico PCV21 preparado en 0,084 mg/ml de PnPs, se utilizó un análisis de rastreo de nanopartículas (NTA). La técnica recolecta videos de poblaciones de nanopartículas rastreadas directamente mientras se mueven mediante movimiento browniano para extrapolar la concentración y el tamaño de partícula. Un láser de 635 nm clase 1 enfoca un haz de láser rojo de 80 micrómetros a través de la muestra líquida, iluminando las partículas como puntos de luz de difusión rápida. Una cámara CCD registra un video de 30 cuadros por segundo para rastrear el movimiento de cada partícula iluminada individual en el tiempo. El *software* del sistema identifica el centro de cada partícula individual del video y rastrea la distancia atravesada independientemente para determinar el desplazamiento de la media cuadrática. Este rastreo se realiza simultáneamente para cada partícula dentro de la población de muestra en cada cuadro hasta que se analizan los datos sin procesar recolectados del video completo. Al medir simultáneamente el desplazamiento de la media cuadrática de cada partícula individual rastreada, su coeficiente de difusión (Dt) y el radio hidrodinámico esférico equivalente (rh) se determinan mediante la aplicación de la ecuación de Stokes-Einstein. El *software* luego representa estos datos acumulados como distribución de tamaño de partícula y concentración. Se recolecta información de los datos sin procesar no solo respecto del tamaño de partícula y la

concentración, sino también la intensidad, o brillo de las partículas individuales. Los datos, considerados en conjunto, se ajustan y representan individualmente como intensidad de partícula con relación al tamaño de partícula, y la concentración de partícula con relación al tamaño de partícula, y luego en tres gráficos de curvas dimensionales que comparan el tamaño de partícula, la concentración y la intensidad de todas las poblaciones de partículas.

Una vacuna conjugada compuesta por una proteína portadora y un antígeno polisacárido pueden de manera conjunta o por separado ser susceptibles a agregación dentro de un rango de tamaño de partícula de 10-1000 nm, lo que genera que NTA sea una técnica que indica la estabilidad adecuada para evaluar y cuantificar el fenómeno de agregación. Luego de la exposición del producto farmacológico a 4 °C y 37 °C durante 1 semana, no se observó una agregación de producto farmacológico significativa mediante NTA para formulaciones que contienen PS-20 en concentraciones de 0,025 % p/v, 0,05 % p/v, 0,1 % p/v, 0,15 % p/v, y 0,2 % p/v de PS20 (como se muestra en la Figura 23). Sin embargo, después de someter las formulaciones a agitación durante 6 h a 4 °C, la formulación que carece de polisorbato 20 no fue eficaz para mitigar la agregación inducida por agitación del producto farmacológico, como lo demuestra el mayor tamaño de partícula D90 mayor, la distribución de tamaño de partícula más amplia, y la mayor intensidad de partícula como se proporciona mediante NTA. Por lo tanto, se prefiere mantener el polisorbato 20 de 0,025 a 0,2 % o niveles mayores (p/v) para estabilizar el producto farmacológico durante la fabricación, almacenamiento, envío y manipulación de rutina.

Como se describió en el Ejemplo 39, se usó HPSEC UV/MALS/RI para medir el peso molecular de un producto farmacológico de conjugado de polisacárido-proteína 21-valente (PCV21), formulado en 20 mM de L-histidina, pH 5,8, 150 mM de NaCl, y 0 a 0,2 % (p/v) de PS-20, con el proceso de formulación descrito en el Ejemplo 38. Las formulaciones se colocaron a 4 °C o 37 °C por hasta 1 semana. En algunos casos, las jeringas se colocaron en una plataforma de rotación horizontal y se agitaron por hasta 6 horas después de almacenarse por 1 semana a 4 °C o 37 °C. Esto se realizó para simular los esfuerzos de manipulación y envío que pueden ocasionar la elaboración y distribución del producto farmacológico. Si los conjugados de polisacárido-proteína en los productos farmacológicos se degradaran o despolimerizaran, resultaría evidente un descenso en el peso molecular y si ocurriera la agregación de la formulación del producto farmacológico, ocurriría un aumento en el peso molecular. Esta medición proporciona caracterización adicional en la calidad del producto farmacológico de la vacuna o los conjugados de polisacárido-proteína como una función de concentración de PS-20. Como se muestra en la Figura 24, las formulaciones del producto farmacológico PCV21 que comprenden todas las sustancias farmacológicas que se prepararon cada una con aminación reductora en un solvente aprótico (por ejemplo, DMSO) fueron estables ante la despolimerización o la degradación química del carbohidrato y estables ante la agregación de la proteína en la formulación del producto farmacológico debido al tratamiento térmico entre 0,05 % y 0,15 % de PS-20. En forma colectiva, esto indica que un producto farmacológico PCV21 es

estable ante temperatura elevada y esfuerzos físicos cuando se formula usando PS-20 de 0,025 % y 0,2 % o niveles mayores.

EJEMPLO 46

5 Protección PCV21 de la exposición en ratones

Se inmunizaron ratones Swiss Webster hembra jóvenes (6-8 semanas, n=10/grupo) por vía intraperitoneal (IP) inmunizados con 0,1-0,5 ml de una vacuna neumocócica conjugada 21-valente (PCV21) en el día 0, día 14, y día 28. La vacuna neumocócica PCV21 se dosificó a 4, 2, 0,4, 0,08 o 0,016 µg de PnPs (3, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 10 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B cada uno conjugado con CRM197) por inmunización. Se observaron ratones al menos diariamente por parte del personal de cuidado de los animales capacitado para determinar signos de enfermedad o malestar. Las formulaciones de la vacuna en ratones se consideraron seguras y de buena tolerancia, dado que no se notaron eventos adversos relacionados con la vacuna. El día 52 los ratones se expusieron por vía 15 intratraqueal a serotipo 24F de *Streptococcus pneumoniae*. Cultivos de fase exponencial de *S. pneumoniae* se centrifugaron, lavaron, y suspendieron en PBS estéril. Los ratones se anestesiaron con isoflurano antes de la exposición. Se colocaron 105 cfu de *S. pneumoniae* en 0,1 ml de PBS en la garganta de ratones colgados en forma vertical de sus incisivos. La aspiración de las bacterias se indujo al halar suavemente la lengua hacia afuera y cubrir las fosas nasales. Los 20 ratones se pesaron diariamente y se sometieron a eutanasia si la pérdida de peso excedía 20 % del peso inicial. Se recolectó sangre a las 24 horas, 48 horas, y 72 horas para evaluar la bacteriemia. Los ratones se observaron al menos dos veces al día por el personal de cuidado de los animales capacitado para determinar signos de enfermedad o malestar. Todos los experimentos en animales se llevaron a cabo en estricta conformidad con las recomendaciones de 25 la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio de los Institutos Nacionales de la Salud. El protocolo experimental de ratones fue aprobado por el Comité institucional de uso y cuidado animal en Merck & Co., Inc.

Los sueros de ratón se evaluaron para determinar la inmunogenicidad de IgG con el uso de ensayo de electroquimioluminiscencia multiplexado (ECL). Este ensayo se desarrolló 30 para usar con suero de ratón en función del ensayo sobre humanos descrito por Marchese et al., Clin Vaccine Immunol. (2009) 16(3):387-96, con el uso de tecnología desarrollada por MesoScale Discovery (una división de MesoScale Diagnostics, LLC, Gaithersburg, MD) que utiliza una etiqueta SULFO-TAG™ que emite luz ante la estimulación electroquímica. El anti-IgG de ratón etiquetado SULFO-TAG™ se usó como anticuerpo secundario para analizar 35 muestras de suero de ratón. El anticuerpo funcional se determinó mediante ensayos opsonofagocíticos multiplexados (MOPA) con base en protocolos descritos anteriormente en www.vaccine.uab.edu y el *software* OpsoTiter® 3 bajo titularidad y autorización para comercializar de la Universidad de Alabama (UAB) Research Foundation (Ver, Caro-Aguilar I.

et al., Vaccine (2017) 35(6):865-72 y Burton R.L. Y Nahm M.H. Clin. Vaccine Immunol. (2006) 13(9):1004-9).

La inmunización con PCV21 generó títulos de anticuerpos en ratones Swiss Webster para todos los serotipos en la vacuna (los datos no se muestran). PCV21 también fue
 5 inmunógeno en ratones Balb/c y CD1 (los datos no se muestran). Los ratones Swiss Webster inmunizados con PCV21 también se protegieron de la exposición a serotipo 24F de *S. pneumoniae* (Figura 25). La prueba logrank de Mantel Cox indica que todos los grupos inmunizados con PCV21 estuvieron protegidos significativamente de la exposición en comparación con el grupo sin tratamiento previo ($P < 0,05$). Asimismo, los grupos de ratones
 10 inmunizados con PCV21 tuvieron poca o ninguna bacteriemia, lo que fue significativamente menor en comparación con el grupo sin tratamiento previo (los datos no se muestran).

EJEMPLO 47

Inmunogenicidad de PCV y anticuerpo funcional en conejos

15 Los conejos blancos de Nueva Zelanda (NZWR, $n=5/\text{grupo}$) adultos se inmunizaron por vía intramuscular (IM) con 0,1 ml de PCV en el día 0 y el día 14 (lados alternativos). PCV se dosificó a 0,4 μg de PnPs por serotipo por inmunización con 25 μg [Al] en la forma de adyuvante de fosfato de aluminio (APA). En el caso de PCV31, la concentración de dosis de serotipo 6B se duplicó a 0,8 μg de PnPs por inmunización. PCV21 (como se describe
 20 en el Ejemplo 38) incluyó polisacáridos purificados de los serotipos 3, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B cada uno conjugado con CRM197. Cada conjugado de polisacárido-proteína se preparó sin adyuvante o se formuló con 250 μg [Al]/ml en forma de fosfato de aluminio o APA para evaluar el efecto del adyuvante (PCV21/APA). Las PCV de valente menor también se formularon (como se describe en el
 25 Ejemplo 38) para incluir 8 ST nuevos (PCV8: 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 y 35B, cada uno conjugado con CRM197, sin adyuvante), 16 ST no se incluyeron en ninguna PCV con autorización para comercialización (PCV16 : 6C, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 20, 23A, 23B, 24F, 31 y 35B cada uno conjugado con CRM197, sin adyuvante) o PCV31 (1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 16F, 17F, 18C, 19A, 19F, 20A, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B cada uno conjugado con CRM197, formulado con 250 μg
 30 [Al]/ml en forma de fosfato de aluminio) para evaluar la eliminación del portador como una valencia de vacuna mayor (PCV31/APA). Cada vacuna usó conjugados de polisacárido con proteína formulados a 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (p/v) de polisacárido neumocócico (PnPs), excepto por 6B que se formuló a 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (p/v) de polisacárido neumocócico (PnPs) en PCV31o PCV31/APA. La
 35 concentración final de polisacárido neumocócico (PnPs) en cada vacuna fue de 128 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de PnPs en PCV31, 84 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de PnPs en PCV21, 64 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en PCV16 y 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en PCV8.

Se recolectó suero antes del inicio del estudio (preinmunización) y en los días 14 (PD1) y 28 (PD2). Se observaron NZWR al menos diariamente por parte del personal de cuidado

de los animales capacitado para determinar signos de enfermedad o malestar. Las formulaciones de la vacuna en NZWR se consideraron seguras y de buena tolerancia, dado que no se notaron eventos adversos relacionados con la vacuna. Todos los experimentos en animales se llevaron a cabo en estricta conformidad con las recomendaciones de la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio de los Institutos Nacionales de la Salud. El protocolo experimental de NZWR fue aprobado por los Comités institucionales de uso y cuidado animal en Merck & Co., Inc y Covance (Denver, PA).

Los sueros de conejo se evaluaron para determinar la inmunogenicidad de IgG con el uso de ensayo de electroquimioluminiscencia mutiplexado (ECL). Este ensayo se desarrolló para usar con suero de conejo en función del ensayo sobre humanos descrito por Marchese et al., Clin Vaccine Immunol. (2009) 16(3):387-96, con el uso de tecnología desarrollada por MesoScale Discovery (una división de MesoScale Diagnostics, LLC, Gaithersburg, MD) que utiliza una etiqueta SULFO-TAG™ que emite luz ante la estimulación electroquímica. El anti-IgG de conejo etiquetado SULFO-TAG™ se usó como anticuerpo secundario para analizar muestras de suero de NZWR. El anticuerpo funcional se determinó mediante ensayos opsonofagocíticos multiplexados (MOPA) con base en protocolos descritos anteriormente en www.vaccine.uab.edu y el *software* Opsotiter® 3 bajo titularidad y autorización para comercializar de la Universidad de Alabama (UAB) Research Foundation (Ver, Caro-Aguilar I. et al., Vaccine (2017) 35(6):865-72 y Burton R.L. Y Nahm M.H. Clin. Vaccine Immunol. (2006) 13(9):1004-9).

Se evaluó suero de conejo como una mezcla para pre-inmunización y PD1, e individualmente para PD2 en ensayos de electroquimioluminiscencia mutiplexados para determinar los títulos de anticuerpos. PCV generó títulos de anticuerpos en conejos para todos los serotipos luego de inmunizaciones con la vacuna (los datos no se muestran). El polisacárido de serotipo 15B no se incluyó en PCV16, PCV21 o PCV31, sin embargo se observaron los títulos de anticuerpos para el serotipo 15B luego de la inmunización con PCV16, PCV21 y PCV31.

PCV21 sin adyuvante tenía inmunogenicidad comparable o significativamente mayor (serotipos 3, 7F, 10A, 19A, 23A y 23B) en comparación con PCV21 con APA (Figura 26A-B y Figura 28), lo que sugiere que no hubo beneficio de inmunogenicidad adicional en conejos con APA incluido en la vacuna.

La eliminación epitópica inducida por portadores se refiere a la interferencia con la respuesta de anticuerpo a un antígeno (tal como polisacárido capsular) acoplado a la misma proteína portadora (tal como CRM197). Se considera que la interferencia surge de la competición para un número limitado de linfocitos T colaboradores cebados específicos de portadores. Como resultado, puede haber una disminución en respuesta al polisacárido capsular. Pfizer observó una disminución en la inmunogenicidad de la vacuna de serotipos compartidos mientras la valencia de la vacuna aumentó de 7-valente a 13-valente [Comparison of IgG

antibody GMC of Prevnar (7 valent) vs Prevnar13. (tabla 9, página 29 de monografía de PCV13)]. Por lo tanto, se busca investigar la inmunogenicidad de PCV de menor valencia en comparación con PCV21 (Figura 27A-C). PCV8 (8 serotipos nuevos) tuvieron una inmunogenicidad comparable en relación con PCV21 para los 8 serotipos compartidos (Figura 29). PCV16 (PCV21 menos 5 serotipos superpuestos de PCV15) tuvo una inmunogenicidad comparable en relación con PCV21 para 15 de los 16 serotipos compartidos (Figura 29). El serotipo 31 tuvo una inmunogenicidad mayor en PCV16 (Figura 29). En general, no hubo tendencias importantes de eliminación de portadores con PCV21 en NZWR. PCV31/APA tuvo una inmunogenicidad comparable en relación con PCV21/APA para los 12 de los 21 serotipos compartidos. 10 serotipos (6C, 7F, 9N, 12F, 15A, 15B (no en PCV21), 15C, 17F, 19A, y 23A) tuvieron inmunogenicidad mayor en PCV31, que varió de 2,9 veces a 11 veces (Figura 30). En general, no hubo tendencias importantes de eliminación de portadores con PCV31 en NZWR.

Se descubrió que las PCV son inmunógenas en conejos y generan anticuerpos funcionales que inactivan las cepas bacterianas tipo vacuna. Los sueros de conejo se evaluaron en ensayos opsonofagocíticos multiplexados (MOPA) para determinar títulos de anticuerpo funcionales. PCV21 tuvo títulos de OPA PD2 comparables o mayores en comparación con PCV21/APA, PCV8 y PCV16 (Figura 31). Los datos transformados con log se analizaron mediante ANOVA de un factor con la prueba de Dunnett para determinar la importancia. PCV21 tuvo títulos de OPA significativamente mayores para el serotipo 16F en comparación con PCV8 y para los serotipos 12F, 23A y 19A en comparación con PCV21/APA. PCV31 tuvo títulos de OPA significativamente mayores para el serotipo 23A en comparación con PCV21.

EJEMPLO 48

Inmunogenicidad de PCV21 en *Macaca mulatta* adultos

PCV21 también se evaluó en modelos de inmunogenicidad de *Macaca mulatta* adultos. Los *Macaca mulatta* se inmunizaron por vía intramuscular con PCV21 los días 0, 28 y 56. PCV21 se dosificó a 1 µg PnPs en un volumen de 0,25 ml (3, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B cada uno conjugado con CRM197) por inmunización. Los sueros se recolectaron antes del inicio del estudio (preinmunización, día 0) y en los días 14 (PD1), 28, 42 (PD2), 56, 70 (PD3) y 84.

Los sueros de *Macaca mulatta* se evaluaron para determinar la inmunogenicidad de IgG con el uso de ensayo de electroquimioluminiscencia multiplexado (ECL). Este ensayo se desarrolló para usar con suero de *Macaca mulatta* en función del ensayo sobre humanos descrito por Marchese et al. y Skinner et al. (Marchese R.D. et al., Clin. Vaccine Immunol. (2009) 16(3):387-96 y Skinner, J.M. et al., Vaccine (2011) 29(48):8870-8876) con el uso de tecnología desarrollada por MesoScale Discovery (una división de MesoScale Diagnostics, LLC, Gaithersburg, MD) que utiliza una etiqueta SULFO-TAG™ que emite luz ante la estimulación electroquímica. El anti-IgG humano etiquetado SULFO-TAG™ se usó como anticuerpo

secundario para analizar muestras de suero de *Macaca mulatta*. El anticuerpo funcional se determinó mediante ensayos opsonofagocíticos multiplexados (MOPA) con base en protocolos descritos anteriormente en www.vaccine.uab.edu y el *software* Opsotiter® 3 bajo titularidad y autorización para comercializar de la Universidad de Alabama (UAB) Research Foundation (Ver, Caro-Aguilar I. et al., Vaccine (2017) 35(6):865-72 y Burton R.L. Y Nahm M.H. Clin. Vaccine Immunol. (2006) 13(9):1004-9).

Se descubrió que PCV21 fue inmunógena en monos adultos y generó anticuerpos funcionales que inactivaron las cepas bacterianas tipo vacuna en todos los puntos temporales evaluados (Figuras 32 y 33). También cabe destacar que PCV21, que contiene conjugados de polisacárido 15A-CRM197 y 15C-CRM197, también proporciona reactividad cruzada a 15B, como se demostró en el ECL. PCV21 fue inmunógeno con una dosis de vacuna en los monos (Figura 32). La mayoría de los serotipos alcanzó su título máximo en PD1, con la excepción de los ST 6C, 12F y 24F, que se beneficiaron con las inmunizaciones adicionales. Los monos *Macaca mulatta* adultos tenían títulos de anticuerpo preexistentes mayores en comparación con estudios de PCV anteriores en crías de monos *Macaca mulatta*. Los títulos de anticuerpo preexistentes fueron más evidentes cuando se evaluaron las muestras de sueros en MOPA, lo que hizo que determinar el título opsonofagocítico sea difícil. Todos los puntos temporales de estudio se evaluaron en MOPA como muestras agrupadas o individuales, pero para mejor observación, solo se muestran pre-inmunización, PD1 y PD3 (Figura 33), ya que no había mucha diferencia en los títulos de OPA entre PD1 y PD3.

Los sueros de *Macaca mulatta* adultos inmunizados con PCV21 se evaluaron para determinar la protección cruzada con otras bacterias de *S. pneumoniae* (Figura 34). Los sueros de *Macaca mulatta* inmunizados con PCV21 tuvieron protección cruzada contra los serotipos 6A, 6B y 23F, pero no con 19F. La protección cruzada contra 6A y 6B se debe probablemente a la inmunización con el conjugado de polisacárido 6C-CRM197 como parte de una PCV21 multivalente. De manera similar, la inmunización con conjugados de polisacárido 23A-CRM197 y 23B-CRM197 como parte de una PCV multivalente generó protección cruzada con el serotipo 23F. La inmunización con PCV21 que incluye el conjugado de polisacárido 19A-CRM197 no proporcionó protección cruzada con 19F.

30

EJEMPLO 49

Inmunogenicidad de PCV21 en *Macaca mulatta* adultos - Evaluación de eliminación de portadores y adyuvantes

Otro estudio de monos incluyó la evaluación de PCV21 con y sin APA y la comparación de inmunogenicidad de serotipos compartidos para evaluar la eliminación de portadores. Los *Macaca mulatta* adultos (n=5/grupo) se inmunizaron por vía intramuscular con vacunas en la mitad de una dosis humana el día 0 del estudio. PCV21 se dosificó a 1 µg PnPs en un volumen de 0,25 ml (3, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20, 22F,

23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B cada uno conjugado con CRM197) por inmunización. Un grupo incluyó PCV21, con adyuvante de 62,5 µg [Al] en forma de fosfato de aluminio. Otro grupo incluyó PCV15 dosificado en 1 µg de PnPs en un volumen de 0,25 ml (1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F cada uno conjugado con CRM197 con 6B dosificado a 2 µg) por
 5 inmunización y adyuvante de 62,5 µg [Al] en forma de fosfato de aluminio. Otro grupo incluyó Prevnar13® (PCV13) dosificado en 1,1 µg de PnPs en un volumen de 0,25 ml (1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F cada uno conjugado con CRM197 con 6B dosificado a 2,2 µg) por inmunización. Los sueros se recolectaron antes del inicio del estudio (pre-inmunización, día 0) y el día 28.

10 Se descubrió que PCV21 fue inmunógena en monos adultos y generó anticuerpos funcionales que inactivaron las cepas bacterianas tipo vacuna. PCV21 sin adyuvante tuvo una inmunogenicidad comparable o significativamente mayor (serotipos 15A y 15B) en comparación con PCV21 con APA (Figura 35). PCV21 no incluyó el serotipo 15B.

Los monos inmunizados con PCV21 se compararon con aquellos inmunizados
 15 con PCV15 y Prevnar13. PCV21 y PCV15 tienen 5 serotipos compartidos (3, 7F, 19A, 22F, 33F); no hubo diferencia en la inmunogenicidad de estos 5 serotipos entre los monos inmunizados con PCV21 o PCV15 (Figura 36). PCV21 y Prevnar13 tienen 3 serotipos compartidos (3, 7F, 19A); no hubo diferencia en la inmunogenicidad para los serotipos 7F y 19A. Los monos inmunizados con Prevnar13 tuvieron títulos de anticuerpo menores para el
 20 serotipo 3 en comparación con PCV21 (Figura 36). Este descubrimiento es consistente con los datos clínicos humanos de PCV15, y muestra que el serotipo 3 es más inmunógeno en la vacuna PCV15 de Merck. Estos resultados, considerados en conjunto, sugieren que no se observó eliminación de portadores en *Macaca mulatta* adultos inmunizados con PCV21 en comparación con Prevnar13 o PCV15.

EJEMPLO 50

Reactividad cruzada de serotipo 6A, 6B and 6C – Estudio monovalente

El producto farmacológico monovalente se preparó usando conjugado de polisacárido neumocócico 6A-CRM197 o conjugado de polisacárido neumocócico 6B-CRM197
 30 y se formuló en 20 mM de histidina pH 5,8 y 150 mM de cloruro de sodio y 0,1 % p/v de polisorbato-20 (PS-20) en una concentración de polisacárido total diana de 4,0 µg/ml de cualquier serotipo. Los conjugados se prepararon conjugando individualmente la proteína CRM197 con tipos de polisacárido neumocócico (PnPs) (ya sea -6A o -6B). El volumen requerido de conjugados a granel necesario para obtener la concentración diana de serotipos
 35 individuales se calculó en función del volumen a granel y las concentraciones de polisacárido a granel individuales. Los conjugados individuales se agregaron a una solución de histidina, cloruro de sodio y PS-20 para crear una mezcla de conjugados 2X. El recipiente de formulación que contenía una mezcla de conjugados 2X se mezcló con una barra agitadora magnética y se

esterilizó por filtración a otro recipiente. La mezcla 2X esterilizada por filtración se diluyó con solución salina para alcanzar las concentraciones de polisacárido y excipiente totales diana deseadas. Las formulaciones luego se cargaron en viales y se almacenaron a 2-8 °C.

Los conejos se inmunizaron con 6A-CRM197 o 6B-CRM197 para evaluar la reactividad cruzada dentro del serogrupo 6. Los conejos blancos de Nueva Zelanda (NZWR, n=3/grupo) adultos se inmunizaron de manera intramuscular (IM) con 0,25 ml de vacuna conjugada monovalente respectiva en el día 0 y el día 14 (lados alternativos). La vacuna neumocócica conjugada monovalente, formulada en 20 mM de L-histidina, pH 5,8, 150 mM de NaCl y 0,1 % (p/v) de PS-20 con un proceso de formulación descrito en el Ejemplo 38, se dosificó en 1 µg de PnPs (6A o 6B cada uno conjugado con CRM197). Se recolectó suero antes del inicio del estudio (preinmunización) y en los días 14 (después de la dosis 1, PD1) y 28 (después de la dosis 2, PD2). Se observaron NZWR al menos diariamente por parte del personal de cuidado de los animales capacitado para determinar signos de enfermedad o malestar. Las formulaciones de la vacuna en NZWR se consideraron seguras y de buena tolerancia, dado que no se notaron eventos adversos relacionados con la vacuna. Todos los experimentos en animales se llevaron a cabo en estricta conformidad con las recomendaciones de la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio de los Institutos Nacionales de la Salud. El protocolo experimental de NZWR fue aprobado por los Comités institucionales de uso y cuidado animal en Merck & Co., Inc y Covance (Denver, PA).

Los sueros de NZWR se analizaron en ensayos ELISA para evaluar la inmunogenicidad de IgG con el uso de 2-2 mg/ml de concentración de recubrimiento de PnPs respectivos. El anticuerpo funcional se determinó mediante ensayos de opsonofagocitosis (OPA) con base en protocolos descritos anteriormente en www.vaccine.uab.edu y el *software* Opsotiter® 3 bajo titularidad y autorización para comercializar de UAB Research Foundation (Ver, Caro-Aguilar I. et al., Vaccine (2017) 35(6):865-72 y Burton R.L. Y Nahm M.H. Clin. Vaccine Immunol. (2006) 13(9):1004-9).

Se descubrió que 6A-CRM197 y 6B-CRM197 fueron inmunógenas en conejos (Figura 37) y generaron anticuerpos funcionales que inactivaron la cepa bacteriana respectiva (Figura 38). Además, los conejos inmunizados con las vacunas neumocócicas conjugadas monovalentes del serogrupo 6 tuvieron títulos de OPA e IgG PD2 equivalentes con respecto al polisacárido homólogo y heterólogo y la cepa bacteriana, respectivamente. Los conejos inmunizados con 6A-CRM197 o 6B-CRM197 tuvieron reactividad cruzada con respecto a cada polisacárido neumocócico (PnPs 6A, PnPs 6B y PnPs 6C) (Figura Con el uso de los datos de IgG transformado con log después de la dosis 2 (PD2) que se analizaron mediante ANOVA de un factor, no se observó diferencia significativa en los títulos de IgG en el serogrupo 6. Además, se observó reactividad cruzada en los conejos inmunizados con 6A-CRM197 o 6B-CRM197 con respecto a cada cepa bacteriana *S. pneumoniae*, (6A, 6B y 6C), dado que todo el suero hiperinmune de conejo tuvo anticuerpo funcional con respecto a cada cepa evaluada, e inactivó

la bacteria (Figura 38). De manera similar, con el uso de los datos de OPA transformado con log después de la dosis 2 (PD2) que se analizaron mediante ANOVA de un factor, no se observó diferencia significativa en los títulos de OPA en el serogrupo 6.

5

EJEMPLO 51

Reactividad cruzada de serotipo 20A y 20B – Estudio monovalente

El producto farmacológico monovalente se preparó usando conjugado de polisacárido neumocócico 20A-CRM197 y se formuló en 20 mM de histidina pH 5,8 y 150 mM de cloruro de sodio y 0,2 % p/v de polisorbato-20 (PS-20) a 4,0 µg/ml. La formulación se preparó con 250,0 µg [Al]/ml en forma de fosfato de aluminio como adyuvante (20A-CRM197/APA). El conjugado se preparó conjugando individualmente la proteína CRM197 con polisacárido neumocócico (PnPs) tipo 20. El volumen requerido de conjugado a granel necesario para obtener la concentración diana de serotipo individual se calculó en función del volumen a granel y la concentración de polisacárido a granel individual. El conjugado único se agregó a una solución de histidina, cloruro de sodio y PS-20 para producir una mezcla de conjugados 4X en 16,0 µg/ml. El recipiente de formulación que contenía una mezcla de conjugados se mezcló con una barra agitadora magnética y se esterilizó por filtración a otro recipiente. La mezcla 2X esterilizada por filtración luego se agregó a otro recipiente que contenía adyuvante de fosfato de aluminio para alcanzar las concentraciones de polisacárido, excipiente y adyuvante totales diana deseadas. Las formulaciones luego se cargaron en viales de vidrio y se almacenaron a 2-8 °C.

Los conejos se inmunizaron con 20A-CRM197/APA o PCV21 para evaluar la reactividad cruzada en el serogrupo 20. Los conejos blancos de Nueva Zelanda (NZWR, n=3/grupo) adultos se inmunizaron de manera intramuscular (IM) con vacuna neumocócica conjugada en el día 0 y el día 14 (lados alternativos). La vacuna neumocócica conjugada monovalente, formulada como se describió anteriormente, se dosificó a 1 µg de PnPs en 0,25 ml (ST20A conjugado con CRM197 y 62,5 µg [Al] en forma de fosfato de aluminio se usó como adyuvante); una vacuna neumocócica conjugada multivalente PCV21 (84 µg/ml de PnPs), formulada en 20 mM de L-histidina pH 5,8 150 mM de NaCl y 0,2 % (p/v) de PS-2, con un proceso de formulación descrito en el Ejemplo 38, se dosificó a 0,4 µg de PnPs en 0,1 ml (serotipos 3, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F y 35B cada uno conjugado con CRM197). Se recolectó suero antes del inicio del estudio (preinmunización) y en los días 14 (después de la dosis 1, PD1) y 28 (después de la dosis 2, PD2). Se observaron NZWR al menos diariamente por parte del personal de cuidado de los animales capacitado para determinar signos de enfermedad o malestar. Las formulaciones de la vacuna en NZWR se consideraron seguras y de buena tolerancia, dado que no se notaron eventos adversos relacionados con la vacuna. Todos los experimentos en animales se llevaron a cabo en estricta conformidad con las recomendaciones de la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio de los Institutos Nacionales de la Salud. El protocolo experimental de NZWR fue

aprobado por los Comités institucionales de uso y cuidado animal en Merck & Co., Inc y Covance (Denver, PA).

Los sueros de NZWR se evaluaron en ensayos de opsonofagocitosis (OPA) para evaluar el anticuerpo funcional con base en protocolos descritos anteriormente en

- 5 www.vaccine.uab.edu y el *software* Opsotiter® 3 bajo titularidad y autorización para comercializar de UAB Research Foundation (Ver, Caro-Aguilar I. et al., Vaccine (2017) 35(6):865-72 y Burton R.L. Y Nahm M.H. Clin. Vaccine Immunol. (2006) 13(9):1004-9).

Los conejos inmunizados con las vacunas 20A-CRM197/APA monovalente y PCV21 multivalente generaron anticuerpos funcionales que inactivaron los serotipos 20A y 20B
10 de *S. pneumoniae* (Figura 39). Esto sugiere que los serotipos 20A y 20B comparten una similaridad estructural, que genera reactividad cruzada dentro del serogrupo.