

TÍTULO DE LA INVENCION

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

5 CAMPO DE LA INVENCION

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

La presente solicitud contiene un Listado de Secuencias que se presentó electrónicamente en formato ASCII y se incorpora en la presente por referencia en su totalidad. La copia ASCII, creada el martes, 03 de diciembre de 2019, se denomina 24683WOPCT-SEQTXT-03DEC2019, y su tamaño es de 6 kilobytes.

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
 20 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 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
 25 interactuar con los linfocitos T. Sin embargo, pueden estimular el sistema inmunitario a través de 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
 30 enfermedades neumocócicas en adultos, particularmente, personas mayores y aquellos con alto 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
 35 para comercialización por primera vez en los Estados Unidos de América en febrero del año 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 con 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 con proteína 14-valente que incluye los serotipos 1, 2, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9N, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F.

Otras 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 (PREVNAR® 13) de Pfizer. 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 puedan proporcionar protección contra los serotipos neumocócicos 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 conjugados de polisacárido con proteína incluyen polisacáridos de un grupo de serotipos de *S. pneumoniae* seleccionados del grupo que consiste en:

- a) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, DeOAc15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;

- b) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- c) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, DeOAc15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- 5 d) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- e) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- f) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, DeOAc15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- 10 g) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- h) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- 15 i) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- j) 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- k) 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- 20 l) 1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- m) 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- 25 n) 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- o) 1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- p) 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- 30 q) 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- r) 1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- 35 s) 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;

- 5 t) 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- u) 1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- 10 v) 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- w) 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- x) 1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- 15 y) 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- z) 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B; y
- aa) 1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B.

La invención proporciona una composición inmunógena multivalente que comprende 22 conjugados de polisacárido con proteína distintos, en donde cada uno de los conjugados comprende un polisacárido capsular de un serotipo de *S. pneumoniae* conjugado con una proteína portadora, en donde el polisacárido se prepara de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B de *S. pneumoniae*.

La invención proporciona una composición inmunógena multivalente que comprende 22 conjugados de polisacárido con proteína distintos en donde cada uno de los conjugados comprende un polisacárido de un serotipo de *S. pneumoniae* conjugado con una proteína portadora, en donde los conjugados de polisacárido con proteína incluyen polisacáridos de un grupo de serotipos de *S. pneumoniae* seleccionados del grupo que consiste en: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B.

La invención proporciona una composición inmunógena multivalente que comprende 23 conjugados de polisacárido con proteína distintos, en donde cada uno de los conjugados comprende un polisacárido capsular de un serotipo de *S. pneumoniae* conjugado con una proteína portadora, en donde el polisacárido se prepara de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B de *S. pneumoniae*.

La invención proporciona una composición inmunógena multivalente que comprende 23 conjugados de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína distintos, en donde cada uno de los conjugados comprende un polisacárido capsular de un serotipo de *S. pneumoniae*

conjugado con una proteína portadora, en donde cada conjugado de polisacárido con proteína distinto comprende un polisacárido de serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B de *S. pneumoniae*, respectivamente, y en donde la proteína portadora es CRM197.

5 La invención proporciona una composición inmunógena multivalente que comprende 24 conjugados de polisacárido con proteína distintos, en donde cada uno de los conjugados comprende un polisacárido capsular de un serotipo de *S. pneumoniae* conjugado con una proteína portadora, en donde el polisacárido se prepara de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B de *S.*
10 *pneumoniae*.

La invención proporciona una composición inmunógena multivalente que comprende 24 conjugados de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína distintos, en donde cada uno de los conjugados comprende un polisacárido capsular de un serotipo de *S. pneumoniae* conjugado con una proteína portadora, en donde cada conjugado de polisacárido con proteína
15 distinto comprende un polisacárido de serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B de *S. pneumoniae*, respectivamente, y en donde la proteína portadora es CRM197.

La invención proporciona una composición inmunógena multivalente que comprende 24 conjugados de polisacárido con proteína distintos, en donde cada uno de los
20 conjugados comprende un polisacárido capsular de un serotipo de *S. pneumoniae* conjugado con una proteína portadora, en donde el polisacárido se prepara de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B de *S. pneumoniae*.

La invención proporciona una composición inmunógena multivalente que
25 comprende 24 conjugados de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína distintos, en donde cada uno de los conjugados comprende un polisacárido capsular de un serotipo de *S. pneumoniae* conjugado con una proteína portadora, en donde cada conjugado de polisacárido con proteína distinto comprende un polisacárido de serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B de *S. pneumoniae*, respectivamente, y
30 en donde la proteína portadora es CRM197.

La invención proporciona una composición inmunógena multivalente que comprende hasta 33 conjugados de polisacárido con proteína distintos, en donde cada uno de los
conjugados comprende un polisacárido de un serotipo de *S. pneumoniae* conjugado con una
35 proteína portadora, en donde los conjugados de polisacárido con proteína incluyen polisacáridos de un grupo de serotipos de *S. pneumoniae* seleccionados del grupo que consiste en: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y

35B, y también incluyen uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve serotipos de *S. pneumoniae* adicionales seleccionados de 7C, 9N, 16F, 21, 23A, 31, 34, 35F y 38.

La invención proporciona una composición inmunógena multivalente que comprende hasta 30 conjugados de polisacárido con proteína distintos, en donde cada uno de los
 5 conjugados comprende un polisacárido de un serotipo de *S. pneumoniae* conjugado con una proteína portadora, en donde los conjugados de polisacárido con proteína incluyen polisacáridos de un grupo de serotipos de *S. pneumoniae* seleccionados del grupo que consiste en: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B, y también incluyen uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis serotipos de *S. pneumoniae*
 10 adicionales seleccionados de 7C, 9N, 16F, 23A, 35F y 38.

La invención proporciona una composición inmunógena multivalente que comprende hasta 33 conjugados de polisacárido con proteína distintos, en donde cada uno de los conjugados comprende un polisacárido de un serotipo de *S. pneumoniae* conjugado con una proteína portadora, en donde los conjugados de polisacárido con proteína incluyen polisacáridos
 15 de un grupo de serotipos de *S. pneumoniae* seleccionados del grupo que consiste en: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B, y también incluyen uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve serotipos de *S. pneumoniae* adicionales seleccionados de 7C, 9N, 16F, 21, 23A, 31, 34, 35F y 38.

La invención proporciona una composición inmunógena multivalente que comprende hasta 30 conjugados de polisacárido con proteína distintos, en donde cada uno de los conjugados comprende un polisacárido de un serotipo de *S. pneumoniae* conjugado con una proteína portadora, en donde los conjugados de polisacárido con proteína incluyen polisacáridos de un grupo de serotipos de *S. pneumoniae* seleccionados del grupo que consiste en: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y
 25 35B, y también incluyen uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis serotipos de *S. pneumoniae* adicionales seleccionados de 7C, 9N, 16F, 23A, 35F y 38.

En algunas formas 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 formas de realización específicas, cada uno
 30 de los conjugados de polisacárido con proteína se forma mediante una reacción de conjugación que comprende un solvente aprótico, por ejemplo, DMSO.

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 algunas formas de realización de los métodos de la
 35 invención, el paciente se trató previamente con una vacuna neumocócica multivalente.

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 neumocócica multivalente al paciente en cualquier orden. En formas de 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 otras formas de realización, la vacuna neumocócica multivalente comprende polisacáridos capsulares no conjugados.

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

FIGURA 1. Títulos de dilución de anticuerpo IgG preinmunización (Pre), después de la dosis 1 (PD1), 2 (PD2) y 3 (PD3) como se determina mediante ECL para ratones inmunizados con PCV22 sin adyuvante (PCV22 unadj) o formulada con adyuvante de fosfato de aluminio (PCV22/APA). De izquierda a derecha; Pre PCV22 unadj, Pre PCV22/APA, PCV22 unadj PD1, PCV22/APA PD1, PCV22 unadj PD2, PCV22/APA PD2, PCV22 unadj PD3, y PCV22/APA PD3.

FIGURA 2. Relación de títulos de dilución mediante ECL de PCV22/APA en comparación con PCV22 sin adyuvante (PCV22 unadj) en PD3.

FIGURA 3. Títulos de dilución de OPA específicos de serotipo (preinmunización, PD1, PD2, PD3) para ratones inmunizados con PCV22 sin adyuvante (PCV22 unadj) o formulada con APA (PCV22/APA). De izquierda a derecha; Pre PCV22 unadj, Pre PCV22/APA, PCV22 unadj PD1, PCV22/APA PD1, PCV22 unadj PD2, PCV22/APA PD2, PCV22 unadj PD3, y PCV22/APA PD3.

FIGURA 4. Relación de títulos de dilución mediante OPA de PCV22/APA en comparación con PCV22 sin adyuvante (PCV22 unadj) en PD3.

FIGURA 5. Los ratones inmunizados con PCV22 se protegen de la exposición intratraqueal a 24F de *S. pneumoniae*.

FIGURA 6. Títulos de dilución de anticuerpo IgG preinmunización (Pre), PD1 y PD2 como se determina mediante ECL para conejos inmunizados con PCV22 sin adyuvante o PCV22/APA. Las barras de error representan 95 % de intervalos de confianza (CI) del título de la media geométrica (GMT). De izquierda a derecha; Pre PCV22 unadj, Pre PCV22/APA, PCV22 unadj PD1, PCV22/APA PD1, PCV22 unadj PD2 y PCV22/APA PD2.

FIGURA 7. Relación de GMT mediante ECL de PCV22/APA en comparación con PCV22 sin adyuvante en PD2. Las barras de error representan 95 % de intervalos de confianza (CI).

FIGURA 8. Títulos de dilución de OPA específicos de serotipo (preinmunización “Pre” y PD2) para conejos inmunizados con PCV22 sin adyuvante o PCV22/APA. Las barras de error representan la variación en títulos de anticuerpo funcional para cinco conejos.

FIGURA 9. Títulos de dilución de anticuerpo IgG preinmunización (Pre), PD1, PD2, y PD3 como se determina mediante ECL para IRM inmunizados con A) PCV23 sin adyuvante, B) PCV23 (DMSO)/APA, C) PCV23 (DMSO+Ac)/APA, y D) PCV15/APA + PCV8/APA. Las barras de error representan 95 % de intervalos de confianza (CI) del título de la media geométrica (GMT).

FIGURA 10. Comparación de las respuestas de anticuerpo mediante ECL en los IRM (8-9 por grupo) luego de vacunación con PCV23 con o sin APA. Los símbolos indican relaciones en A) PD1, B) PD2, o C) PD3. Relaciones de GMT con barras de error que representan 95 % de CI.

FIGURA 11. Comparación de las respuestas de anticuerpo mediante ECL en IRM (9 por grupo) luego de vacunación con PCV23 (DMSO+Ac)/APA o coadministración con PCV15/APA + PCV8/APA. Los símbolos indican relaciones en A) PD1, B) PD2, y C) PD3. Relaciones de GMT con barras de error que representan 95 % de CI.

FIGURA 12. Respuestas de anticuerpo mediante ECL potenciadas en IRM (8-9 por grupo) luego de vacunación con PCV23 sin adyuvante, PCV23 (DMSO)/APA, PCV23 (DMSO+Ac)/APA o PCV15/APA + PCV8/APA. A) PD1/Pre, B) PD2/Pre, C) PD3/Pre, D) PD2/PD1 y E) PD3/PD2. Los símbolos son relaciones de GMT con barras de error que representan 95 % de CI.

FIGURA 13. (A) Títulos de dilución de anticuerpo IgG preinmunización (Pre), después de la dosis 1 (PD1) y 2 (PD2) como se determina mediante ECL para conejos blancos de

Nueva Zelanda inmunizados con PCV24 formulada con adyuvante de fosfato de aluminio (PCV24/APA). Las barras de error representan 95 % de intervalos de confianza (CI) del título de la media geométrica (GMT). (B) Títulos de dilución de OPA específicos de serotipo (preinmunización y PD2) para NZWR inmunizados con PCV24/APA. Las barras de error representan la variación en títulos de anticuerpo funcional para ocho NZWR.

FIGURA 14. (A) Títulos de dilución de anticuerpo IgG preinmunización (Pre), después de la dosis 1 (PD1), 2 (PD2) y 3 (PD3) como se determina mediante ECL para crías de Macaca mulatta (IRM) inmunizadas con PCV24 formulada con adyuvante de fosfato de aluminio (PCV24/APA). Las barras de error representan 95 % de intervalos de confianza (CI) del título de la media geométrica (GMT). (B) Títulos de dilución de OPA específicos de serotipo (preinmunización y PD3) para IRM inmunizados con PCV24/APA. Las barras de error representan la variación en títulos de anticuerpo funcional para cinco IRM.

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 algunas formas 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* conjugado con una proteína portadora, en donde los conjugados de polisacárido con proteína incluyen polisacáridos de un grupo de serotipos de *S. pneumoniae* seleccionados del grupo que consiste en:

- a) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, DeOAc15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- b) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- c) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, DeOAc15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- d) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- e) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;

- 5
- f) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, DeOAc15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- g) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- 10
- h) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- i) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- j) 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- 15
- k) 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- l) 1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- 20
- m) 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- n) 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- o) 1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- 25
- p) 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- q) 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- 30
- r) 1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- s) 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- t) 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- 35
- u) 1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- v) 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- w) 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;

- 5 x) 1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
 y) 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
 z) 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
 aa) 1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
 bb) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 15A, DeOAc15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B y 39;
 10 cc) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B y 39;
 dd) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 12F, 14, 15A, DeOAc15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B y 39;
 15 ee) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B y 39;
 ff) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B y 39;
 gg) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 11A, 12F, 14, 15A, DeOAc15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B y 39;
 20 hh) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B y 39;
 ii) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B y 39;
 25 jj) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B y 39;
 kk) 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B y 39;
 ll) 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B y 39;
 30 mm) 1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 9V, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B y 39;
 nn) 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B y 39;
 35 oo) 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B y 39;

	pp)	1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 8, 9V, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B y 39;
	qq)	1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B y 39;
5	rr)	1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B y 39;
	ss)	1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 8, 9V, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B y 39;
10	tt)	1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B y 39;
	uu)	1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B y 39;
	vv)	1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 9V, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B y 39;
15	ww)	1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B y 39;
	xx)	1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B y 39;
20	yy)	1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 8, 9V, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B y 39;
	zz)	1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B y 39;
	aaa)	1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B y 39; y
25	bbb)	1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 8, 9V, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B y 39.

En algunas formas de realización, la composición inmunógena multivalente comprende serotipos neumocócicos seleccionados del grupo que consiste en: i) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B; o ii) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B; o iii) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B; o iv) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B. En una forma de realización particular, una composición inmunógena multivalente de la invención comprende conjugados neumocócicos 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 los serotipos: i) 1, 3, 4, 5, 6A,

6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B o ii) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B o iii) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B. Se descubrió que dichas composiciones son inmunógenas en ratones, conejos y/o monos, y generan un anticuerpo funcional que inactiva las cepas bacterianas tipo vacuna en todas las dosis evaluadas.

Las composiciones inmunógenas multivalentes de la invención son útiles para inmunizar a un paciente contra los serotipos de *S. pneumoniae* tipo vacuna y/o 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 además comprende administrar una vacuna neumocócica multivalente al paciente en cualquier orden. En otras formas 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 las formas de realización de la invención, los conjugados de al menos un serotipo neumocócico se preparan con aminoración reductora en un solvente aprótico, tal como DMSO. En formas de realización adicionales, la composición inmunógena multivalente comprende conjugados neumocócicos, en donde cada uno se prepara con aminoración reductora en un solvente aprótico. 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:

30	APA	adyuvante de fosfato de aluminio
	APC	célula presentadora de antígenos
	CI	intervalo de confianza
	DMSO	dimetilsulfóxido
	DS	sustancia farmacológica de polisacárido con proteína
35	GMC	concentración de la media geométrica
	GMT	título de la media geométrica
	HPSEC	cromatografía de exclusión por tamaño de alta resolución

	IM	intramuscular o por vía intramuscular
	IRM	cría de <i>Macaca mulatta</i>
	LOS	lipo-oligosacárido
	LPS	lipopolisacáridos
5	MALS	dispersión de luz multiángulo
	MBC	conjugado monovalente a granel
	Mn	peso molecular promedio en número
	MOPA	ensayo opsonofagocítico mutiplexado
	MW	peso molecular
10	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
15	PD2	después de la dosis 2
	PD3	después de la dosis 3
	PnPs	polisacárido neumocócico
	Ps	polisacárido
	PS-20	polisorbato-20
20	RI	índice de refracción
	UV	ultravioleta
	p/v	peso por volumen

Con el fin de que la invención se pueda entender con mayor facilidad, algunos
 25 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 en la materia al que pertenece la invención.

Como se usan en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las
 30 formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen la referencia al 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.

35 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.

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 %.

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 con proteína que no se enumeran específicamente. La expresión "que consiste en", cuando se usa con la mezcla de conjugado de polisacárido con 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 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 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 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 afección 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 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.

El término "sin adyuvante", en el contexto de una vacuna o composición inmunógena de la presente invención, se refiere a una composición de polisacáridos

5 neumocócicos, que incluye, entre otras, PCV8, PCV15, PCV22, PCV23 y PCV24, en donde la composición no contiene adyuvantes.

"PCV8" se refiere a una composición inmunógena que contiene los serotipos de polisacárido de *S. pneumoniae* (PnPs) -8, -10A, -12F, -15A, -15C, -23B, -24F y -35B.

10 "PCV15" se refiere a una composición inmunógena que contiene los serotipos de polisacárido de *S. pneumoniae* (PnPs) -1, -3, -4, -5, -6A, -6B, -7F, -9V, -14, -18C, -19A, -19F, -22F, -23F, y -33F.

"PCV22" se refiere a una composición inmunógena que contiene los serotipos de polisacárido de *S. pneumoniae* (PnPs) -1, -3, -4, -5, -6A, -6B, -7F, -9V, -10A, -12F, -14, -15A, -15C, -18C, -19A, -19F, -22F, -23B, -23F, -24F, -33F, y -35B.

15 "PCV23" se refiere a una composición inmunógena que contiene los serotipos de polisacárido de *S. pneumoniae* (PnPs) -1, -3, -4, -5, -6A, -6B, -7F, -8, -9V, -10A, -12F, -14, -15A, -15C, -18C, -19A, -19F, -22F, -23B, -23F, -24F, -33F, y -35B.

20 "PCV24" se refiere a una composición inmunógena que contiene los serotipos de polisacárido de *S. pneumoniae* (PnPs) -1, -3, -4, -5, -6A, -6B, -7F, -8, -9V, -10A, -11A, -12F, -14, -15A, -15C, -18C, -19A, -19F, -22F, -23B, -23F, -24F, -33F, y -35B.

25 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.

30 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 anticuerpo, aumentar los títulos de anticuerpo 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.

Un "paciente" (denominado alternativamente "sujeto") se refiere a un mamífero capaz de ser infectado con *S. pneumoniae*. En formas 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 particular. 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 un polisacárido de un serotipo de *S. pneumoniae* conjugado con una proteína portadora. Diferentes aspectos y formas de realización de las composiciones inmunógenas multivalentes de la invención se describen más adelante.

En una forma de realización (forma 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 polisacárido capsular de un serotipo de *S. pneumoniae* conjugado con una proteína portadora, en donde los serotipos de *S. pneumoniae* comprenden, consisten, o consisten esencialmente en: i) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B o ii) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B o iii) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B. En subformas de realización de la forma de realización E1, la composición inmunógena no comprende ningún conjugado de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína.

Como se usa en la presente, el polisacárido neumocócico de serotipo 15B de-O-acetilado (DeOAc15B) es sustancialmente equivalente al polisacárido neumocócico de serotipo 15C y tiene un espectro de RMN sustancialmente idéntico (no se muestran datos). Como se usa en la presente, el polisacárido neumocócico de serotipo 15B de-O-acetilado y el polisacárido neumocócico de serotipo 15C pueden tener, cada uno, 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., el polisacárido neumocócico de 15C puede estar ligeramente o-acetilado (Spencer, B.L. et al., Clin. Vac. Immuno. (2017) 24(8): 1-13). Por ende, en cualquiera de las formas de realización de las composiciones inmunógenas multivalentes de la presente, se puede usar el serotipo 15B de-O-acetilado (DeOAc15B) 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 algunas formas de realización de cualquiera de las composiciones inmunógenas multivalentes de la invención, que incluyen la forma de realización E1 y cualquier subforma de realización de esta, la composición también comprende un portador farmacéuticamente aceptable.

Reactividad cruzada

En una forma 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 reactividad cruzada contra los serotipos 6A y 6B de *S. pneumoniae*.

5 En una forma 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
10 *S. pneumoniae*.

En una forma 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 6B, conjugado con una proteína portadora, en donde el
15 serotipo 6B de *S. pneumoniae* proporciona protección cruzada contra los serotipos 6A y/o 6C de *S. pneumoniae*.

En una forma 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
20 serotipo 15C de *S. pneumoniae* proporciona protección cruzada contra el serotipo 15B de *S. pneumoniae*.

En una forma 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 15B, conjugado con una proteína portadora, en donde el
25 serotipo 15B de *S. pneumoniae* proporciona protección cruzada contra el serotipo 15C de *S. pneumoniae*.

30 *Proteína portadora*

En formas de 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:

35 GADDVVDSSK SFVMENFSSY HGTKPGYVDS IQKGIQKPKS GTQGNYYYYD
KEFYSTDNKY DAAGYSVDNE NPLSGKAGGV VKVTYPGLTK VLALKVDNAE
TIKKELGLSL TEPLMEQVGT EEFIKRFGDG ASRVVLSLPF AEGSSSVEYI
NNWEQAKALS VELEINFETR GKRQDAMYE YMAQACAGNR VRRSVGSSLS

CINLDWDVIR DTKTKIESL KEHGPIKNKM SESPNTVSE EKAKQYLEEF
 HQTALHPPEL SELKTVTGTN PVFAGANYAA WAVNVAQVID SETADNLEKT
 TAALSILPGI GSVMGIADGA VHHNTEEIVA QSIALSSLMV AQAIPLVGEL
 VDIGFAAYNF VESIINLFQV VHNSYNRPAY SPGHKTQPFLL HDGYAVSWNT
 5 VEDSIIRTGF QGESGHDIKI TAENTPLPIA GVLLPTIPGK LDVKNKSKTHI
 SVNGRKIRMR CRAIDGDVTF CRPKSPVYVG NGVHANLHVA FHRSSSEKIH
 SNEISSDSIG VLGYQKTVDH TKVNSKLSLF FEIKS (SEQ ID NO:1)

En una forma de realización, CRM197 se aísla de los cultivos de
Corynebacterium diphtheria cepa C7 (β 197) cultivados en ácidos de casamino y un medio a base
 10 de extracto de levadura. En otra forma 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 algunas formas de realización, CRM197 se prepara en
Pseudomonas fluorescens con Pfenex Expression Technology™ (Pfenex Inc., San Diego, CA).

15 Otras proteínas portadoras adecuadas incluyen toxinas bacterianas inactivadas
 adicionales, tales como DT (toxóide diftérico) o fragmento B de DT (DTFB), TT (toxóide
 tetánico) o fragmento C de TT, toxóide pertussis, toxóide de cólera (por ejemplo, como se
 describe en WO 2004/083251), *E. coli* LT, *E. coli* ST, y exotoxina A de *Pseudomonas*
aeruginosa. También se pueden usar las proteínas de la membrana externa bacteriana, tales
 20 como complejo de proteínas 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 capa purificada de alguna manera, por ejemplo, dPLY-GMBS (ver WO
 25 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 tuberculina (PPD), PorB (de *N. meningitidis*), PD (proteína D de *Haemophilus*
 30 *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 epítomos de linfocito T CD4+ humano múltiple de varios antígenos derivados de
 35 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 estadounidense 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 algunas formas de realización, la proteína portadora se selecciona del grupo que consiste en: complejo de proteínas de la membrana externa (OMPC), toxoide tetánico, toxoide diftérico, proteína D y CRM197.

En algunas formas 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 otra forma 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 otra forma 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 formas de realización, cada polisacárido capsular del mismo serotipo se conjuga generalmente con la misma proteína portadora.

En las formas de realización de la invención, que incluye la forma de realización E1 y cualquier subforma de realización de esta, uno o más de los serotipos de polisacárido (que incluyen 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o más, cuando corresponda) se conjuga con CRM197. En formas de realización adicionales de la invención, que incluyen la forma de realización E1 y cualquiera de las subformas de realización de esta, cada serotipo de polisacárido se conjuga con CRM197.

La formulación de los conjugados de polisacárido con 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.

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

En algunas formas 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
10 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 composición incluyen, entre otros:

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

15 (2) formulaciones de emulsión de aceite en agua (con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos, tales como péptido de muramilo (definidos más adelante) o 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)
20 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 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 Ribi™ (RAS), (Corixa, Hamilton, MT) que contiene 2 %
25 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 (MPL™) descrito en la patente estadounidense N.º 4.912.094, dimicolato de trehalosa (TDM), y esqueleto de la pared celular (CWS), preferentemente, MPL+CWS (Detox™); y (d) Montanide ISA;

(3) adyuvantes de saponina, tal como Quil A o STIMULON™ QS-21
30 (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 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);

35 (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

AGP es 2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoilamino]etil 2-desoxi-4-O-fosfono-3-O-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoilamino]-β-D-glucopiranosida, que también se conoce como 529 (anteriormente conocido como RC529), que se formula como una forma acuosa o una emulsión estable

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

(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 otra forma de realización, el adyuvante es una mezcla de 2, 3, o más de los adyuvantes anteriores, por ejemplo, SBAS2 (una emulsión de aceite en agua que también

15 contiene monofosforilípido A 3-desacilado y QS21).

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

En algunas formas de realización, el adyuvante es una sal de aluminio. El

20 adyuvante de sal de aluminio puede ser una vacuna precipitada con aluminio o una vacuna adsorbida 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,

25 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

30 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 una forma de realización, la dosis de la sal de aluminio

35 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 otra forma de realización, la dosis de sal de aluminio descrita anteriormente es por µg de proteínas recombinantes.

En algunas formas 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 adsorber proteínas en una relación de 50 - 200 μg de proteína/mg de hidróxido de aluminio. En otra forma de realización, la adsorción de la proteína depende del pI (pH isoelectrico) de la proteína y el pH del medio. Una proteína con un pI bajo adsorbe el ion de aluminio con carga positiva con mayor potencia que una proteína con un 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.

Los conjugados acuosos monovalentes a granel generalmente se mezclan juntos y se diluyen para obtener 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para todos los serotipos excepto 6B, que se puede diluir para obtener 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$. 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$. El lote adyuvante formulado se llena en viales descartables de 0,5 ml/dosis.

En algunas formas de realización, el adyuvante es una secuencia de nucleótidos que contiene CpG, por ejemplo, un oligonucleótido que contiene CpG, en particular, un oligodesoxinucleótido que contiene CpG (CpG ODN). En otra forma de realización, el adyuvante es ODN 1826, que se puede adquirir en Coley Pharmaceutical Group.

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.

En las formas de realización alternativas, la composición inmunógena comprende conjugados múltiples de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína como se describe en la presente, por ejemplo, en la forma de realización E1 o cualquiera de las subformas de realización de esta, y no comprende un adyuvante.

Formulaciones

Las composiciones inmunógenas multivalentes de la invención se pueden formular como viales de dosis única, viales de dosis múltiples o jeringas de vidrio o plástico prellenadas.

En otra forma de realización, las composiciones inmunógenas multivalentes 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.

Los portadores farmacéuticamente aceptables para las formulaciones líquidas son
 5 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 de origen animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de maní, aceite de soja, aceite de oliva,
 10 aceite de girasol, otro aceite marino, o un lípido de leche o huevos.

Las composiciones inmunógenas multivalentes de la presente invención pueden ser isotónicas, hipotónicas o hipertónicas. Sin embargo, a menudo se prefiere que una composición para infusión o inyección sea esencialmente isotónica, cuando se administra. Por lo tanto, para almacenamiento, una composición puede ser, preferentemente, isotónica o
 15 hipertónica. Si la composición es hipertónica para almacenamiento, se puede diluir para transformarse en una solución isotónica antes de la administración.

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

Se prefiere que al menos un aditivo farmacéuticamente aceptable sea un 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
 25 ejemplo, de 6 a 8.

El amortiguador se puede seleccionar, por ejemplo, del grupo que consiste en 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
 30 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 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,
 35 trietanolamina y TRIS.

Los vehículos parenterales (para inyección subcutánea, intravenosa, intraarterial, o 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, 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 huevos.

Las formulaciones de la invención también pueden contener un tensioactivo. Los tensioactivos preferidos incluyen, entre otros: poloxámero -188 (P188; Pluoronic; F68 NF), 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; octoxinoles, que pueden variar en la cantidad de grupos etoxi (oxi-1,2-etanediilo) de repetición, en donde octoxinol-9 (Triton X-100, o t-octilfenoxipolietoxietanol) es de particular interés; (octilfenoxi)polietoxietanol (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 oleilo (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-octilfenoxipolietoxietanol (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) de 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) de 0,001 a 0,1 %, en particular, 0,005 a 0,02 %; éteres de polioxietileno (tal como laureth 9) de 0,1 a 20 %, preferentemente, 0,1 a 10 % y, en particular, 0,1 a 1 % o alrededor de 0,5 %.

En algunas formas de realización, la composición consiste esencialmente en histidina (20 mM), solución salina (150 mM) y 0,2 % de PS-20 a un pH de 5,8 con 250 µg/ml de APA (adyuvante de fosfato de aluminio). PS-20 puede variar de 0,005 % a 0,3 % (p/v). En otra forma de realización, PS-20 puede variar de 0,025 % a 0,8 % (p/v). En otra forma de

realización, PS-20 puede variar de 0,05 % a 0,8 % (p/v). En otra forma 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, luego combinar este material mezclado con APA y solución salina con o sin preservativos antimicrobiales.

- 5 En formas de 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 con proteína comprenden cualquiera de los conjuntos de serotipos establecidos en la presente, y
10 además comprende 20- 80 mM de histidina, pH 5,8 y 150 mM de NaCl. En algunas formas de realización, la composición inmunógena multivalente también comprende de 0,2 % a 0,8 % p/v de polisorbato 20.

- La composición inmunógena multivalente PCV24 se preparó al conjugar individualmente la proteína CRM197 con los serotipos de polisacárido de *S. pneumoniae* (PnPs)
15 -1, -3, -4, -5, -6A, -6B, -7F, -8, -9V, -10A, -11A, -12F, -14, -15A, -15C, -18C, -19A, -19F, -22F, -23B, -23F, -24F, -33F, y -35B mediante aminación reductora en un solvente aprótico (también denominada química de DMSO), se formuló en 20 mM de L-histidina, pH 5,8 y 150 mM de NaCl y 0,1 % p/v de polisorbato-20 (PS-20) a 4 µg/ml o 8 µg/ml de cada serotipo de polisacárido para una concentración de polisacáridos total de 96 µg/ml o 192 µg/ml, respectivamente, y se
20 denominó “PCV24 unadj”. En otra forma de realización específica, la composición inmunógena multivalente PCV24 se preparó en 20 mM de L-Histidina, pH 5,8, 150 mM de NaCl y 0,2 % p/v de polisorbato -20 (PS-20) a 4 µg/ml de cada serotipo de polisacárido para una concentración de polisacáridos total de 96 µg/ml que además comprende 250 µg [Al]/ml en forma de adyuvante de fosfato de aluminio. Esta se denomina “PCV24/APA”.

- 25 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 conjugados 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
30 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
35 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 hidrófobos 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 3.740.421.

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 ~2.700. El polietilenglicol y el polietilenglicol monometil éter también está disponible en un rango de pesos moleculares de ~200 a ~35.000 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-piperazinetansulfónico), 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. Además, por ejemplo, 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. En una forma de realización, la concentración de amortiguador variará de 1 mM a 100 mM. En otra forma de realización, la concentración de amortiguador variará de 10 mM a 80 mM. En otra forma de realización, la concentración de amortiguador variará de 1 mM a 50 mM o 5 mM a 50 mM. En determinados aspectos, el amortiguador es histidina a una concentración final de 5 mM a 50 mM, o succinato a una concentración final de 1 mM a 10 mM. En determinados aspectos, el amortiguador de histidina está a una concentración final de 20 mM $\pm$ 2 mM.

Si bien se prefiere la solución salina (por ejemplo, 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,

sacarosa, trehalosa, manitol, sorbitol y glicerol en lugar de sal. Los rangos de sal adecuados incluyen, entre otros, 20 mM a 500 mM o 40 mM a 170 mM. En un aspecto, la solución salina es NaCl, opcionalmente presente en una concentración de 25 mM a 170 mM.

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

En otra forma 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 otra forma de realización, se usan materiales poliméricos; por ejemplo, en microesferas o en un
10 implante.

La cantidad de conjugado en cada dosis de la composición 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 µg de cada polisacárido. En
15 algunas formas de realización de la invención, la dosis de cada conjugado de polisacárido es de 0,08 a 10 µg. En otras formas de realización, la dosis de cada conjugado es de 1 a 5 µg, de 0,4 a 4 µg, de 0,4 a 3 µg, de 0,4 a 2 µg, o de 0,4 a 1 µg. En algunas formas 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,
20 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, o 100 µg.

En algunas formas de realización de las composiciones de la invención, todos los conjugados de polisacárido están presentes en la composición en la misma cantidad. En otras formas 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
25 cantidad que es diferente a uno o más de los otros conjugados de polisacárido de la composición).

Las cantidades óptimas de los componentes para una composición inmunógena en particular se pueden determinar mediante estudios estándar que implican la observación de respuestas inmunitarias adecuadas en los sujetos. Por ejemplo, en otra forma de realización, la
30 dosificación para la vacunación de seres humanos se determina mediante extrapolación de estudios en animales a datos de seres humanos. En otra forma de realización, la dosificación se determina de manera empírica.

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
35 incluyen aquellas identificadas en las publicaciones de solicitud de patente internacional N.º WO 02/083855 y WO 02/053761.

En algunas formas de realización, las composiciones de la invención se administran a un sujeto mediante uno o más métodos conocidos por el experto en la materia, tales como por vía parenteral, transmucosa, transdérmica, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intranasal, subcutánea, intraperitoneal, y se formulan de manera acorde. En una forma 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.

10 III. Métodos de elaboración

Los polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* se pueden preparar mediante técnicas estándar conocidas por los expertos en la materia. 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 una forma 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 intermedio 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 intermedio polisacárido-ligador.

El polisacárido se puede acoplar a un ligador mediante un grupo amina primario en el polisacárido. Es 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 intermedio 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

5 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

10 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 formas de 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

15 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 intermedio 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

25 reaccionar uno de los grupos amina primarios con el grupo carboxilo en el polisacárido mediante activación de 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 intermedio polisacárido-ligador adicional en el que el polisacárido se acopla al

30 ligador adicional mediante un enlace de amida.

En una forma 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,

35 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
 5 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. 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
 10 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
 15 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
 20 periodato de potasio). En una forma de realización, el polisacárido capsular se oxida en presencia de metaperiodato, preferentemente, en presencia de periodato de sodio (NaIO_4). En otra forma de realización, el polisacárido capsular se oxida en presencia de ortoperiodato, preferentemente, en presencia de ácido periódico.

En una forma de realización, el agente oxidante es un compuesto de radical
 25 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
 30 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 molécula que tiene una porción N-halo. En un aspecto, dicho oxidante se selecciona del grupo que consiste en N-clorosuccinimida, N-bromosuccinimida, N-yodosuccinimida, ácido
 35 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 diyodoisocianúrico y 1,3,5-triyodo-1,3,5-triazinan-2,4,6-triona. Preferentemente, dicho oxidante es N-clorosuccinimida.

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 en WO 2014/097099). Por lo tanto, en un aspecto, los glicoconjugados de *S.*

pneumoniae se pueden 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 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-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 algunas formas de realización, la presente invención proporciona un método 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. En otras formas de realización, la reacción de conjugación es una reducción de base de Schiff o aminación reductora. En otras formas de realización, la proteína es toxoide tetánico, toxoide diftérico, o CRM197. En otras formas de realización, la proteína es CRM197. En otras formas de realización, la reacción de conjugación es aminación reductora. En otras formas de realización, la aminación reductora se lleva a cabo en dimetilsulfóxido (DMSO).

En algunas formas 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 dispersión de luz multiángulo (MALS) y un detector de índice de refracción (RI). En algunas formas de realización, el polisacárido tiene un peso molecular entre 50 kDa y 300 kDa. En algunas formas de realización, el polisacárido tiene un peso molecular entre 50 kDa y 1.000 kDa. En formas de realización adicionales, el polisacárido tiene un peso molecular entre 70 kDa y 900 kDa. En otras formas de realización, el polisacárido tiene un peso molecular entre 100 kDa y 800 kDa. En otras formas de realización, el polisacárido tiene un peso molecular entre 200 kDa y 600 kDa. En otras formas 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; o 500 kDa a 600 kDa.

La segunda etapa del proceso de conjugación es la reducción del enlace de imina (base de Schiff) 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 una forma de realización, el agente reductor es cianoborohidruro.

En algunas formas de realización, la reacción de aminación reductora se lleva a cabo en solvente aprótico (o una mezcla de solventes apróticos). En una forma 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 una forma 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 una forma 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-BH₃, bencilamina-BH₃ 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 con proteína) mediante una variedad de técnicas conocidas por el experto en la materia. Estas técnicas incluyen diálisis, operaciones de concentración/diafiltración, filtración de flujo tangencial, precipitación/elución, cromatografía en columna (cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de intercambio iónico multimodal, DEAE, o cromatografía de interacción hidrófoba) y filtración de profundidad. En una forma 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 algunas formas de realización para composiciones multivalentes 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-hidroxi-3-propansulfónico), BES (ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetansulfónico), MOPS (ácido 3-(N-morfolino)propansulfónico), DIPSO (ácido 3-bis(2-hidroxietil) amino-2-hidroxi-3-propansulfónico), MOBS (ácido 4-(N-morfolino)butansulfónico), HEPPSO (ácido N-(2-hidroxietil)piperazin-N-(2-hidroxi-3-propansulfónico)), POPSO (ácido piperazin-1,4-bis(2-hidroxietil)-3-propansulfónico)), TEA (trietanolamina), EPPS (ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-propansulfónico), o 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. pneumoniae* con proteína que se pueden preparar mediante aminación reductora en un solvente aprótico, incluyen, entre otros, serotipos de *S. pneumoniae*: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B. 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 algunas formas de realización, los conjugados de polisacárido neumocócico con proteína de uno o más de los serotipos de *S. pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B se preparan usando aminación reductora en un solvente aprótico. En algunas formas de realización, cada uno de los conjugados en la composición inmunógena multivalente se prepara mediante aminación reductora en un solvente aprótico. En algunas formas de realización, los polisacáridos de uno o más serotipos en una composición multivalente de la invención se conjugan con una proteína portadora 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 algunas formas de realización, los polisacáridos de uno o más serotipos en una composición multivalente de la invención se conjugan con una proteína portadora mediante aminación reductora en un solvente aprótico. En otras formas de realización, los polisacáridos de 3 o más, 4 o 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, 22 o más, 23 o más, o 24 o más serotipos en una composición multivalente de la invención se conjugan con una proteína portadora mediante aminación reductora en un solvente aprótico. En algunas formas de realización, los polisacáridos de uno o más serotipos en una composición multivalente de la invención se conjugan con una proteína portadora 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 *S. pneumoniae* de uno o más de los conjugados de polisacárido con proteína se conjuga con la proteína

5 portadora es en un solvente aprótico. En algunas formas de realización, al menos 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 100 % de los serotipos neumocócicos en una composición inmunógena multivalente se conjugan en un solvente aprótico. El resto de los serotipos se conjugan mediante una química alternativa y/o en un solvente acuoso.

10 Se determinó que el uso de DMSO como un solvente durante la aminación reductora de los conjugados de polisacárido con proteína genera una estabilidad inesperadamente superior y una inmunogenicidad mejorada para aquellos serotipos relacionados a los mismos conjugados preparados en condiciones acuosas (ver solicitudes de patente estadounidenses con N.º de acta 62/463.216 y 62/555.444).

15 En algunas formas de realización de la invención, la concentración total de polisacárido en la composición es de alrededor de 0,02 a alrededor de 0,288 mg/ml. En algunas formas de realización de la invención, la concentración total de polisacárido en la composición es de alrededor de 0,03 a alrededor de 0,192 mg/ml. En algunas formas de realización de la invención, la concentración total de polisacárido en la composición es de alrededor de 0,04 a
20 alrededor de 0,192 mg/ml. En otras formas de realización, la concentración total de polisacárido en la composición es de alrededor de 0,065 a alrededor de 0,096 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
25 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
30 alrededor de 0,175 mg/ml, o alrededor de 0,065 a alrededor de 0,180 mg/ml.

En formas de realización de la invención en donde uno o más, o la totalidad, de los conjugados de polisacárido con 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, o 12 semanas o más a 4 °C.

35 En algunas formas de realización de la invención en donde uno o más, o la totalidad, de los conjugados de polisacárido con proteína en las composiciones inmunógenas multivalentes se preparan en un solvente aprótico, el peso molecular promedio (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 2.000 a alrededor de 6.500 kDa, de alrededor de 2.500 a alrededor de 6.000 kDa, de alrededor de 3.000 a alrededor de 5.500 kDa, de alrededor de 3.500 a alrededor de 5.000 kDa, de alrededor de 3.500 a alrededor de 4.500 kDa, de alrededor de 3.500 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 3.600 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 3.700 a alrededor de 4.700 kDa, de alrededor de 3.700 a alrededor de 4.600 kDa, de alrededor de 3.700 a alrededor de 4.500 kDa, de alrededor de 3.700 a alrededor de 4.400 kDa, de alrededor de 3.700 a alrededor de 4.300 kDa, de alrededor de 3.700 a alrededor de 4.200 kDa, de alrededor de 3.800 a alrededor de 4.700 kDa, de alrededor de 3.800 a alrededor de 4.600 kDa, de alrededor de 3.800 a alrededor de 4.500 kDa, de alrededor de 3.800 a alrededor de 4.400 kDa, de alrededor de 3.800 a alrededor de 4.300 kDa, de alrededor de 3.800 a alrededor de 4.200 kDa, de alrededor de 3.900 a alrededor de 4.700 kDa, de alrededor de 3.900 a alrededor de 4.600 kDa, de alrededor de 3.900 a alrededor de 4.500 kDa, de alrededor de 3.900 a alrededor de 4.400 kDa, de alrededor de 3.900 a alrededor de 4.300 kDa, o de alrededor de 3.900 a alrededor de 4.200 kDa.

En algunas formas de realización de la invención en donde los conjugados de polisacárido con 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 1000 a alrededor de 10.000 kDa, de alrededor de 1500 a alrededor de 5500 kDa, de alrededor de 1500 a alrededor de 5600 kDa, de alrededor de 1500 a alrededor de 5700 kDa, de alrededor de 1500 a alrededor de 5800 kDa, de alrededor de 1500 a alrededor de 5900 kDa, de alrededor de 1500 a alrededor de 6000 kDa, de alrededor de 1000 a alrededor de 5500 kDa, de alrededor de 1000 a alrededor de 5000 kDa, de alrededor de 1000 a alrededor de 4000 kDa, de alrededor de 1000 a alrededor de 4500 kDa, de alrededor de 1000 a alrededor de 4000 kDa, o de alrededor de 1000 a alrededor de 3500 kDa. En otras formas 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 algunas formas de realización de la invención los conjugados de polisacárido con proteína en las composiciones inmunógenas multivalentes se preparan en un solvente aprótico. En algunas formas 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 algunas formas de realización de la invención, el conjugado de polisacárido con 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 algunas formas de realización de la invención en donde uno o más, o la totalidad, de los conjugados de polisacárido con 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 algunas formas de realización de la invención en donde uno o más, o la totalidad, de los conjugados de polisacárido con 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 formas de 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 formas de realización de la invención, la concentración de polisacárido, Mw, y/o Mn se determinan mediante HPSEC UV/MALS/RI.

En algunas formas de realización de la invención, en donde uno o más, o la totalidad, de los conjugados de polisacárido con 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 algunas formas 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 algunas formas 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 algunas formas de realización, todos los conjugados de polisacáridos neumocócicos en la composición multivalente se preparan mediante aminación reductora en DMSO. En determinadas subformas de realización, la composición multivalente comprende conjugados de polisacárido que se prepararon mediante DMSO no comprende un adyuvante.

Sin limitarse a ninguna teoría en particular, 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 en 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 con 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. Un 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 T 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 epítopos CRM197 nativos. Otro beneficio de los enlaces de polisacárido con proteína aumentados que se crean durante la conjugación en el solvente DMSO podría ser la
 5 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 algunas formas 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
 10 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
 15 durante la conjugación de, 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
 20 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.
 25 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
 30 haloacetilada (por ejemplo, usando yodoacetimida [por ejemplo, etil yodoacetimida 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
 35 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 de conjugación 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 intermedio carbamato CDI y el acoplamiento del intermedio carbamato CDI con un grupo amino en una proteína.

Después de la conjugación del polisacárido capsular con la proteína portadora, los conjugados de polisacárido con proteína se purifican (se enriquecen con respecto a la cantidad de conjugado de polisacárido con proteína) mediante una o más de una variedad de técnicas. Los ejemplos de estas técnicas son conocidas por el experto en la materia e incluyen operaciones de concentración/diafiltración, ultrafiltración, precipitación/elución, cromatografía en 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 pueden preparar mediante procesos separados y se pueden formular 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. 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 una forma de realización preferida, la extensión de conjugación, según se midió por el consumo de lisina 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 una forma 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 otra forma de realización, el grado de conjugación del

glicoconjugado de la invención es entre 4 y 7. En algunas de tales formas de realización, la proteína portadora es CRM197.

Los glicoconjugados de las composiciones de la invención también se pueden caracterizar por la relación (peso/peso) del polisacárido con respecto a la proteína portadora (Ps:Pr). En algunas formas 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 otras formas de realización, la relación de polisacárido 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 otras formas de realización, la relación (p/p) del sacárido con respecto a la proteína portadora es entre 0,8 y 1,2. En algunas de tales formas 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 (por ejemplo, unirse con, ser adsorbido o atrapado de manera no covalente por) el glicoconjugado.

En formas de realización específicas, 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 otras formas de realización, la relación del sacárido con respecto a la proteína portadora (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.

En formas de realización específicas, 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 otras formas de realización, la relación del sacárido con respecto a la proteína portadora (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.

En formas de realización específicas, 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 otras formas de realización, la relación del sacárido con respecto a la proteína portadora (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.

En formas de realización específicas, 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 otras formas de realización, la relación del sacárido con respecto a la proteína portadora (p/p) para el serotipo 35B es de alrededor de 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 o 2,0.

En formas de realización específicas, 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 otras formas de realización, la relación del sacárido con respecto a la proteína portadora (p/p) para el serotipo 24F es de alrededor de 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 o 1,0.

En una forma de realización preferida, la composición de 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 una forma de realización preferida, la composición de glicoconjugado comprende menos de alrededor de 25 % de polisacárido libre en comparación con la cantidad total de polisacárido. En una forma de realización preferida, la composición de glicoconjugado comprende menos de alrededor de 20 % de polisacárido libre en comparación con la cantidad total de polisacárido. En una forma de realización preferida, la composición de glicoconjugado comprende menos de alrededor de 15 % de polisacárido libre en comparación con la cantidad total de polisacárido.

IV. Métodos de uso

Algunas formas 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: (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* 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 de polisacárido neumocócico multivalente de la invención se pueden usar opcionalmente en combinación con uno o más adyuvantes o sin un adyuvante.

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

10 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 dicha composición o formulación por vía sistémica o mucosa.

 En una forma de realización, la invención proporciona un método para inducir
15 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 otra forma de realización, la invención proporciona un método para vacunar a un ser 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
20 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
25 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 una forma de realización, la invención proporciona un método para la
30 prevención de neumonía neumocócica y/o enfermedades neumocócicas invasivas en un lactante (menor de 1 año), niño pequeño (aproximadamente 12 a 24 meses), o niño (aproximadamente 2 a 5 años).

 En otra forma de realización, la invención proporciona un método para la
prevención de neumonía neumocócica y/o enfermedades neumocócicas invasivas en pacientes de
35 6 semanas a 17 años.

En otra forma de realización, la invención proporciona un método para la prevención de neumonía neumocócica y/o enfermedades neumocócicas invasivas en pacientes de 6 semanas a 17 años.

5 En otra forma de realización, la invención proporciona un método para la prevención de neumonía neumocócica y/o enfermedades neumocócicas invasivas en adultos de 18 años o más.

En otra forma de realización, la invención proporciona un método para la prevención de neumonía neumocócica y/o enfermedades neumocócicas invasivas en adultos de 50 años o más.

10 En otra forma de realización, la invención proporciona un método para la prevención de neumonía neumocócica y/o enfermedades neumocócicas invasivas en adultos de 65 años o más.

En otra forma de realización, la invención proporciona un método para la prevención de neumonía neumocócica y/o enfermedades neumocócicas invasivas causadas por una o más de las siguientes cepas de *Streptococcus pneumoniae*: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B.

En una forma 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 los serotipos: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B o serotipos: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B. En otra forma 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* consisten en los serotipos: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B o serotipos: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B. En una forma 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 los serotipos: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B o serotipos: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B. En otra forma 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* consisten en los serotipos: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B o serotipos: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B.

- 5 En una forma 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 los serotipos: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B. En otra forma
- 10 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* consisten en los serotipos: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B o serotipos: .

- 15 Se mostró que una vacuna neumocócica conjugada que comprende polisacárido de 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 algunas formas de realización de los métodos anteriores, la invención también proporciona el uso de composiciones inmunógenas multivalentes que no comprenden conjugado de polisacárido de serotipo 6C, pero en su lugar
- 20 comprenden conjugado de polisacárido de serotipo 6A o conjugados de polisacárido de los serotipos 6A y 6B. En otras formas de realización, la composición inmunógena comprende conjugados de polisacárido neumocócico de los serotipos 6A, 6B y 6C.

- En formas de realización particulares de los métodos anteriores, las composiciones inmunógenas multivalentes comprenden conjugados neumocócicos que incluyen
- 25 polisacáridos de un grupo de serotipos de *S. pneumoniae* seleccionados del grupo que consiste en:

- a) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, DeOAc15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- b) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- 30 c) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, DeOAc15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- d) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- 35 e) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;

- f) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, DeOAc15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- g) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- 5 h) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- i) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- 10 j) 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- k) 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- l) 1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- 15 m) 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- n) 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- 20 o) 1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- p) 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- q) 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- 25 r) 1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- s) 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- 30 t) 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- u) 1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- v) 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- 35 w) 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;

- x) 1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- y) 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B;
- 5 z) 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B; y
- aa) 1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B.

En otras formas de realización de los métodos anteriores, la composición
 10 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 los serotipos:
 i) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B o ii) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F,
 15 24F, 33F y 35B o iii) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B; o iv) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B.

También se mostró que una vacuna neumocócica conjugada que comprende polisacárido de serotipo 10A puede proporcionar un tipo de protección cruzada contra el serotipo
 20 39 (ver WO 2017/ 085586). Por lo tanto, en algunas formas de realización de los métodos anteriores, la invención también proporciona el uso de composiciones inmunógenas multivalentes que no comprenden conjugado de polisacárido de serotipo 10A, pero en su lugar comprenden conjugado de polisacárido de serotipo 39. En otras formas de realización, la composición inmunógena comprende conjugados de polisacárido neumocócico de los serotipos
 25 10A y 39. En formas de realización particulares de los métodos anteriores, los serotipos de *S. pneumoniae* comprenden un grupo de serotipos seleccionados del grupo que consiste en:

- bb) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 15A, DeOAc15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B y 39;
- cc) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B y 39;
- 30 dd) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 12F, 14, 15A, DeOAc15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B y 39;
- ee) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B y 39;
- 35 ff) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B y 39;

	gg)	1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 11A, 12F, 14, 15A, DeOAc15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B y 39;
	hh)	1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B y 39;
5	ii)	1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B y 39;
	jj)	1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B y 39;
10	kk)	1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B y 39;
	ll)	1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B y 39;
	mm)	1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 9V, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B y 39;
15	nn)	1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B y 39;
	oo)	1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B y 39;
20	pp)	1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 8, 9V, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B y 39;
	qq)	1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B y 39;
	rr)	1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B y 39;
25	ss)	1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 8, 9V, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B y 39;
	tt)	1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B y 39;
30	uu)	1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B y 39;
	vv)	1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 9V, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B y 39;
	ww)	1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B y 39;
35	xx)	1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B y 39;

- yy) 1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 8, 9V, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B y 39;
- zz) 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B y 39;
- 5 aaa) 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B y 39; y
- bbb) 1, 3, 4, 5, 6C, 7F, 8, 9V, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B y 39.

También se mostró que los conjugados inmunógenos que comprenden el
 10 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 algunas formas de realización de los
 métodos anteriores, la invención también proporciona el uso de composiciones inmunógenas
 multivalentes que no comprenden conjugado de polisacárido de serotipo 15C (o 15B de-O-
 15 acetilado), pero en su lugar comprenden conjugado de polisacárido de serotipo 15B (es decir, el
 polisacárido de serotipo 15B no es sustancialmente de-O-acetilado). En otras formas de
 realización, la composición inmunógena comprende conjugados de polisacárido neumocócico de
 los serotipos 15B y 15C (o 15B de-O-acetilado).

Las composiciones de la invención son útiles en los métodos para proporcionar
 20 protección complementaria contra *S. pneumoniae* en pacientes que previamente recibieron una
 vacuna neumocócica multivalente. En 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
 25 pueden proporcionar protección tanto contra serotipos de *S. pneumoniae* contra los cuales un
 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
 30 paciente, que comprende administrar una composición inmunógena multivalente al paciente, en
 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 formas de realización de este
 35 aspecto de la invención, la composición inmunógena multivalente puede ser cualquier
 composición inmunógena multivalente descrita en la presente. En formas de 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 inmunógena multivalente puede ser cualquier vacuna que se indica para la prevención de una enfermedad neumocócica causada por más de un serotipo de *S. pneumoniae*.

5 En formas de realización específicas del método anterior, el paciente se trató previamente con una vacuna neumocócica multivalente que se indica para la prevención de una enfermedad neumocócica causada por uno o más serotipos de *S. pneumoniae* dentro de un grupo de serotipos seleccionados del grupo que consiste en:

- i. 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F;
- ii. 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 6A, 7F y 19A;
- 10 iii. 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F;
- iv. 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 6A, 7F, 19A, 22F y 33F;
- v. 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
- 15 vi. 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 6A, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 10A, 11A, 12F y 15B.

En formas de realización específicas del método anterior, la vacuna neumocócica multivalente comprende conjugados múltiples 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 otras formas de realización, la vacuna

20 neumocócica multivalente comprende múltiples polisacáridos capsulares de *S. pneumoniae* que no se conjugan con una proteína portadora.

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

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

En otras formas de realización del método anterior, el paciente se trató previamente con SYNFLORIX™ (vacuna neumocócica conjugada de polisacárido (adsorbida),

30 GlaxoSmithKline Biologicals s.a., Rixensart, Bélgica).

En formas de 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 formas de

35 realización particulares, la composición inmunógena multivalente de la invención se administra a un paciente de alrededor de 1 mes a alrededor de 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 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 otras formas de

- 5 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, 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, 10 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 neumocócica multivalente.

- En otras formas de realización, la invención proporciona un método para (1) 15 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 humano, en donde el método comprende administrar una composición inmunógena multivalente de la invención y administrar una vacuna neumocócica multivalente al paciente, en cualquier 20 orden. Por ejemplo, al paciente se le administra, en primer lugar, una vacuna neumocócica multivalente y, en segundo lugar, una composición inmunógena multivalente de la invención. De manera alternativa, al paciente se le administra, en primer lugar, una composición inmunógena multivalente de la invención y, en segundo lugar, una vacuna neumocócica multivalente. La vacuna neumocócica multivalente puede ser cualquier vacuna indicada para la prevención de una 25 enfermedad neumocócica causada por más de un serotipo de *S. pneumoniae*.

- En formas de realización específicas del método anterior, el paciente se trata con una composición inmunógena multivalente de la invención y una vacuna neumocócica multivalente que se indica para la prevención de enfermedad neumocócica causada por uno o más serotipos de *S. pneumoniae* de un grupo de serotipos seleccionados del grupo que consiste 30 en:

- i. 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F;
- ii. 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 6A, 7F y 19A;
- iii. 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F;
- iv. 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 6A, 7F, 19A, 22F y 33F;
- 35 v. 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

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

En formas de realización específicas 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 formas de realización específicas del método anterior, la vacuna neumocócica multivalente comprende conjugados múltiples 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 otras formas de realización, la vacuna neumocócica multivalente comprende múltiples polisacáridos capsulares de *S. pneumoniae* que no se conjugan con una proteína portadora.

En formas de 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. UU.), en cualquier orden. En una forma de realización, al paciente se le administra, en primer lugar, PREVNAR® 13 y, en segundo lugar, una composición inmunógena multivalente de la invención. En formas de realización alternativas, al paciente se le administra, en primer lugar, una composición inmunógena multivalente de la invención y, en segundo lugar, PREVNAR® 13.

En otras formas de realización del método anterior, el paciente se trata con una 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 una forma de realización, al paciente se le administra, en primer lugar, PNEUMOVAX® 23 y, en segundo lugar, una composición inmunógena multivalente de la invención. En formas de realización alternativas, al paciente se le administra, en primer lugar, una composición inmunógena multivalente de la invención y, en segundo lugar, PNEUMOVAX® 23.

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

En algunas formas 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 algunas formas de realización, la composición inmunógena multivalente y la vacuna neumocócica multivalente se administran por vía

5 intramuscular o subcutánea en sitios anatómicos separados, por ejemplo, dos brazos diferentes.

En algunas formas 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 formas de realización alternativas, la cantidad de tiempo es de alrededor de 1 mes a alrededor de 5 años.

10 En una forma 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 formas 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.

15 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 una composición inmunógena multivalente de la invención al paciente,
- 20 (2) esperar a 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

25 prevención de una enfermedad causada por más de un serotipo de *S. pneumoniae*.

La invención también 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 vacuna neumocócica multivalente,
- 30 (2) esperar a que pase una cantidad predeterminada de tiempo, y
- (3) administrar una composición inmunógena multivalente de la invención al paciente.

En este método, la composición inmunógena multivalente puede comprender cualquier combinación de conjugados de polisacárido de *S. pneumoniae* con proteína

35 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 algunas formas 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 con proteína comprenden polisacárido capsular de un serotipo de *S. pneumoniae* conjugado con una proteína portadora. En formas de realización alternativas, la vacuna neumocócica multivalente comprende polisacáridos capsulares de *S. pneumoniae* que no se conjugan con una proteína portadora.

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

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

En algunas formas 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 una forma 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 formas de realización de cualquiera de los métodos de la invención, el paciente a tratar con las composiciones de la invención es un ser humano. En algunas formas de realización, el paciente humano es un lactante (aproximadamente, 6 semanas a 12 meses). En algunas formas 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 otras formas de realización de cualquiera de los métodos de la invención, el paciente tiene alrededor de 2 a alrededor de 18 años. En otras formas de realización de cualquiera de los métodos de la invención, el paciente tiene 18 años o más.

- 5 En otras formas de realización de los métodos de la invención, el paciente es un lactante y a este se le administran 1, 2, o 3 dosis de una composición inmunógena multivalente de la presente invención. La cantidad de tiempo entre la administración de cada dosis puede variar, pero un ejemplo de cronograma de dosis incluye la administración de una dosis a los 2 meses de vida, luego otra administración de una dosis a los 4 meses de vida, y, por último, una
- 10 administración final de una dosis a los 6 meses de vida. Otro ejemplo de cronograma de administración en lactantes es la administración de una dosis a los 2 meses de vida y luego otra administración de una dosis a los 3 meses de vida. Otro ejemplo de cronograma de administración en lactantes es la administración de una dosis a los 2 meses de vida, luego otra administración de una dosis a los 3 meses de vida y, por último, una administración final de una
- 15 dosis los 6 meses de vida. En otras formas de realización, un paciente que es lactante puede recibir una dosis “de refuerzo” adicional de una composición inmunógena multivalente de la presente invención cuando el lactante se vuelve un niño pequeño. Por ejemplo, un lactante recibe una dosis a los 2 meses de vida, luego otra administración de una dosis a los 4 meses de vida y, por último, una administración final de una dosis a los 6 meses de vida; luego, cuando el
- 20 lactante alcanza la edad de un niño pequeño, se le administra una dosis “de refuerzo” adicional de una composición inmunógena multivalente de la presente invención entre los 11 y 15 meses de vida.

En una forma de realización, a un lactante se le administran 2 dosis de una composición inmunógena multivalente de la presente invención.

- 25 En una forma de realización, a un lactante se le administran 3 dosis de una composición inmunógena multivalente de la presente invención.

- En una forma de realización, a un paciente se le administran 3 dosis de una composición inmunógena multivalente de la presente invención, en donde la primera y segunda dosis se administran entre los 2 y 10 meses de vida y la tercera dosis se administra entre los 11 y
- 30 15 meses de vida.

- En una forma de realización, a un paciente se le administran 4 dosis de una composición inmunógena multivalente de la presente invención, en donde la primera dosis se administra a los 2 meses de vida, la segunda dosis se administra a los 4 meses de vida, la tercera dosis se administra a los 6 meses de vida y la cuarta dosis se administra entre los 11 y 15 meses
- 35 de vida.

En otras formas de realización de los métodos de la invención, el paciente humano es una persona mayor. En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos

de la invención, el paciente tiene 50 años o más. En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos de la invención, el paciente tiene 55 años o más. En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos de la invención, el paciente tiene 60 años o más. En aun otras formas de realización de cualquiera de los métodos de la invención, el paciente tiene 65 años o más. En formas de realización adicionales de cualquiera de los métodos de la invención, el paciente tiene 70 años o más.

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

En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos de la invención, la composición inmunógena multivalente de la invención se administra de manera concomitante con una vacuna contra la influenza. En algunas formas 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 con proteína. Las cantidades óptimas de los componentes para una vacuna en particular (por ejemplo, una composición inmunógena multivalente de la invención) se pueden determinar mediante estudios estándar que implican la observación de respuestas inmunitarias adecuadas en los sujetos. Por ejemplo, en otra forma de realización, la dosificación para la vacunación de seres humanos se determina mediante extrapolación de estudios en animales a datos de seres humanos. En otra forma 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. pneumoniae*, 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 una forma 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 formas de realización específicas, las composiciones de la invención se administran al paciente por vía intramuscular o subcutánea.

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.

5 Luego de describir diferentes formas de realización de la invención en la presente con referencia a los dibujos adjuntos, cabe destacar que la invención no se limita a esas formas de realización, y que un experto en la materia 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.

10

EJEMPLO 1

Preparación de polisacáridos capsulares de *S. pneumoniae*

15 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 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.

20 Se obtuvieron aislados de cepas neumocócicas de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, y 35B de la Colección de cultivos de Merck. Las cepas de los serotipos 23B se obtuvieron de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades y la Universidad de Alabama Birmingham. Las cepas del serotipo 24F se obtuvieron de la Colección de cultivos de Merck y la Universidad de Alabama Birmingham. Cuando fue necesario, los subtipos se diferenciaron en función de la
25 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
30 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.

35 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

5 minimizar el intercambio de gas con control de temperatura y agitación. 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

10 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.

15 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

20 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.

25 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

30 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

35 la etapa de floclación y un período de envejecimiento, se removieron los sólidos floclados 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
 5 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
 10 impurezas no deseadas, a la vez que 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 trituro y se secó como un polvo y se almacenó congelado a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

15 EJEMPLO 3

Preparación del conjugado de serotipo 1 para estudio polivalente de PCV23 (DMSO) 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
 20 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 diálisis antes de una filtración final de 0,2 micrómetros. Varios parámetros de proceso en cada etapa, tal como pH, temperatura, concentración y tiempo, se
 25 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
 30 Ps. La presión de homogenización y la cantidad de pasadas por el homogeneizador se controlaron a 250 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 $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ y pH 5 con un
 35 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 reacción de oxidación continuó durante 15 horas a $22\text{ }^{\circ}\text{C}$.

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 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.

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

El polisacárido activado se formuló para la liofilización a 2,5 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.

15

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 1,0 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 a 22 °C.

20

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 dializó a aproximadamente 4 °C durante 3 días en 150 mM de cloruro de sodio, 0,05 % (p/v) de polisorbato 20, usando un casete de diálisis 300 kDa con NMWCO.

30

Filtración final y almacenamiento de producto

El lote fue filtrado a 0,2 micrómetros (con prefiltro a 0,5 micrómetros), distribuido en alícuotas y congelado a ≤ -60 °C.

35

EJEMPLO 4

Preparación del conjugado de serotipo 1 para estudio polivalente de PCV23 (DMSO + Ac) usando la conjugación acuosa

El polisacárido se disolvió, se redujo de 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, 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.

Reducción de tamaño y oxidación del polisacárido

El polvo de 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 250 bar/5 pasadas para reducir el tamaño a una masa molecular diana. El polisacárido de tamaño reducido luego 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 reacción de oxidación continuó durante 15 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 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 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 combinó con la solución de polisacárido amortiguado en una relación de masa de polisacárido con respecto a CRM197 de 0,5. 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 6,9 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 120 horas para maximizar el consumo de polisacárido y proteína.

5

Reducción con borohidruro de sodio

Luego de la reacción de conjugación, el lote se diluyó a una concentración de polisacáridos de aproximadamente 3,5 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
10 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.

15

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 una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 300 kDa con NMWCO. Se agregó polisorbato 20 al lote del concentrado a una concentración de
20 0,05 % (p/v), luego se filtró el lote a 0,2 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 0,015 % (p/v) de polisorbato 20. El lote se distribuyó en alícuotas y se congeló a ≤ -60 °C.

25

EJEMPLO 5

Preparación del conjugado de serotipo 1 para estudio polivalente de PCV22 usando la conjugación acuosa

El polisacárido se disolvió, se redujo de tamaño, se activó químicamente y se intercambió en amortiguador mediante ultrafiltración. El CRM197 purificado se conjugó luego
30 en el polisacárido activado con el uso de cloruro de níquel en la mezcla de reacción, 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.

Reducción de tamaño y oxidación del polisacárido

5 El polvo de 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 250 bar/5 pasadas para reducir el tamaño a una masa molecular diana. El polisacárido de tamaño reducido luego se concentró y se diafiltró en agua usando una membrana
10 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 reacción de oxidación continuó durante 15 horas a 22 °C.

15 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 llevó a cabo a 2-8 °C.

Conjugación de polisacárido con CRM197

20 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 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 combinó con la solución de polisacárido amortiguado en una relación de
25 masa de polisacárido con respecto a CRM197 de 0,5. 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 6,9 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
30 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 120 horas 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 polisacáridos de aproximadamente 3,5 g/l, se enfrió hasta 2-8 °C, y se filtró a 1,2 micrómetros.

- 5 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
- 10 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 cloruro de sodio, pH 7,0 a 4 °C usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 300

15 kDa con NMWCO. Se agregó polisorbato 20 al lote del concentrado a una concentración de 0,05 % (p/v), luego se filtró el lote a 0,2 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 0,015 % (p/v) de polisorbato 20. El lote se distribuyó en alícuotas y se congeló a ≤ -60 °C.

20

EJEMPLO 6

Preparación del conjugado de serotipo 3 para estudio polivalente de PCV 23 (DMSO) usando la conjugación con DMSO

- 25 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.
- 30 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 810 bar/6 pasadas y luego 900 bar/3 pasadas.

5 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 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 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 kDa con NMWCO y se filtró a 0,2 micrómetros.

20 El polisacárido activado se formuló para la liofilización a 2,5 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 volúmenes iguales de DMSO. Las soluciones de polisacárido y CRM197 se mezclaron para alcanzar una concentración de polisacáridos de 2,25 g Ps/l y una relación de masa de polisacárido con respecto a CRM197 de 1,35. 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 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.

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 una 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.

10

EJEMPLO 7

Preparación del conjugado de serotipo 3 para estudios polivalentes de PCV22 y PCV23 (DMSO + Ac) usando la conjugación acuosa

El polisacárido se disolvió, se redujo de 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, 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*

El polvo de 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 380 bar/5 pasadas para reducir el tamaño a una masa molecular diana. El polisacárido de tamaño reducido luego 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 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 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

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 4,1 g/l y 150 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 conjugación continuó durante 120 horas a 10 °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 polisacáridos de aproximadamente 3,5 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.

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 una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 300 kDa con NMWCO. El lote se filtró a 0,2 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. El lote se distribuyó en alícuotas y se congeló a ≤ -60 °C.

5

EJEMPLO 8

Preparación del conjugado de serotipo 4 para estudio polivalente de PCV23 (DMSO) 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 diálisis 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
 15 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
 20 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 ajustó luego hasta 50 °C y pH 4,1 con un
 25 amortiguador de acetato de sodio para desacetilar parcialmente el polisacárido. Luego, la solución de polisacárido se enfrió hasta 22 °C antes de la activación. La activación de polisacárido se inició con la adición de una solución de 100 mM de metaperiodato de sodio. 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 usando
 30 una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10 kDa con NMWCO 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

35 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.

El polisacárido activado se formuló 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 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 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 dializó a aproximadamente 4°C durante 3 días en 150 mM de cloruro de sodio, 0,05 % (p/v) de polisorbato 20, usando un casete de diálisis 300 kDa con NMWCO.

Filtración final y almacenamiento de producto

El lote fue filtrado a 0,2 micrómetros (con prefiltro a 0,5 micrómetros), distribuido en alícuotas y congelado a ≤ -60 °C.

EJEMPLO 9

Preparación del conjugado de serotipo 4 para estudios polivalentes de PCV23 (DMSO + Ac) y PCV22 usando la conjugación acuosa

El polisacárido se disolvió, se redujo de 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, 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.

Reducción de tamaño y oxidación del polisacárido

El polvo de 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 300 bar/5 pasadas para reducir el tamaño a una masa molecular diana. El polisacárido de tamaño reducido luego 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 50 °C y pH 4,1 con un amortiguador de acetato de sodio para desacetilizar parcialmente el polisacárido. Luego, la solución de polisacárido se enfrió hasta 22 °C antes de la activación. La activación de polisacárido se inició con la adición de una solución de 100 mM de metaperiodato de sodio. 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 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

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 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 0,5. 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 8,3 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 conjugación continuó durante 120 horas 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 polisacáridos de aproximadamente 3,5 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

5 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.

10

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 una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 300 kDa con NMWCO. Luego, el lote se filtró a 0,2 micrómetros.

15

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. El lote se distribuyó en alícuotas y se congeló a ≤ -60 °C.

EJEMPLO 10

20

Preparación del conjugado de serotipo 5 para estudio polivalente de PCV23 (DMSO) 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

25 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 diálisis 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. 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.

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

5 La solución de polisacárido se ajustó luego hasta 4 °C y pH 4,1 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 reacción de oxidación continuó durante 4 horas a 4 °C.

10 El producto activado se diafiltró en 10 mM de acetato de sodio, pH 4,1 usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10 kDa con NMWCO 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

15 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 El polisacárido activado se formuló 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.

25 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 2,0 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
30 conjugación continuó a 22 °C.

Dilución y neutralización

35 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 dializó a aproximadamente 4°C durante 3 días en 150 mM de cloruro de sodio, 0,05 % (p/v) de polisorbato 20, usando un casete de diálisis 300 kDa con NMWCO.

Filtración final y almacenamiento de producto

El lote del concentrado fue filtrado a 0,2 micrómetros (con prefiltro a 0,5 micrómetros), distribuido en alícuotas y congelado a ≤ -60 °C.

5

EJEMPLO 11

Preparación del conjugado de serotipo 5 para estudios polivalentes de PCV22 y PCV23 (DMSO + Ac) usando la conjugación acuosa

El polisacárido se disolvió, se redujo de 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, 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.

15

Reducción de tamaño y oxidación del polisacárido

El polvo de 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 600 bar/5 pasadas para reducir el tamaño a una masa molecular diana. El polisacárido de tamaño reducido luego se concentró y se diafiltró en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10 kDa con NMWCO.

20

La solución de polisacárido se ajustó luego hasta 4 °C y pH 4,1 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 reacción de oxidación continuó durante 4 horas a 4 °C.

25

El producto activado se diafiltró en 10 mM de acetato de sodio, pH 4,1 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

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 combinó con la solución de polisacárido amortiguado en una relación de masa de polisacárido con respecto a CRM197 de 0,4. 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 3,8 g/l y 150 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 conjugación continuó durante 96 horas para maximizar el consumo de polisacárido y proteína.

Purificación y neutralización

Luego de la reacción de conjugación, el lote se diluyó a una concentración de polisacáridos de aproximadamente 3,5 g/l, se enfrió hasta 2-8 °C, y se filtró a 1,2 micrómetros. El lote se diafiltró en 300 mM de bicarbonato de sodio, pH 9,3 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, luego se neutralizó con 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 cloruro de sodio, pH 7,0 a 4 °C usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 300 kDa con NMWCO. Se agregó polisorbato 20 al lote del concentrado a una concentración de 0,05 % (p/v) y luego se filtró el lote a 0,2 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 0,015 % (p/v) de polisorbato 20. El lote se distribuyó en alícuotas y se congeló a ≤ -60 °C.

EJEMPLO 12

Preparación del conjugado de serotipo 6A para estudios polivalentes de PCV23 (DMSO) y PCV23 (DMSO + Ac) y PCV 22 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

lioofilizaron 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, 5 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 10 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 15 a la activación. La activación de polisacárido se inició con la adición de una solución de 100 mM de metaperiodato de sodio. 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.

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 25 kDa con NMWCO y se filtró a 0,2 micrómetros.

El polisacárido activado se formuló 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 30 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 35 sodio (1 mol por mol de unidad de repetición del polisacárido), y la conjugación continuó 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
 5 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.

10 *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 una 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
 15 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.

EJEMPLO 13

Preparación del conjugado de serotipo 6B para estudios polivalentes de PCV 23 (DMSO) y
 20 PCV 23 (DMSO/Ac) 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. 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.

35 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 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 El polisacárido activado se formuló 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 1,85 g Ps/l y una relación de masa de polisacárido con respecto a CRM197 de 1,35. 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 a 22 °C.

25

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 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.

- 35 *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 una 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.

EJEMPLO 14

- 10 Preparación del conjugado de serotipo 6B para estudio polivalente de PCV22 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 200 bar/5 pasadas. El polisacárido de tamaño reducido se concentró y se diafiltró
25 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 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

- 35 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.

- El polisacárido activado se formuló 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
- 5 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 1,75 g Ps/l y una relación de masa de
- 10 polisacárido con respecto a CRM197 de 1,35. 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 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 una 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.

EJEMPLO 15

Preparación del conjugado de serotipo 7F para estudios polivalentes de PCV23 (DMSO) y PCV23 (DMSO + Ac) usando la conjugación con DMSO

- 35 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
5 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
10 Ps. La presión de homogenización y la cantidad de pasadas por el homogeneizador se controlaron a 150 bar/7 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 4 °C y pH 5 con un amortiguador de acetato de sodio para minimizar la reducción de tamaño del polisacárido debido
15 a la activación. La activación de polisacárido se inició con la adición de una solución de 100 mM de metaperiodato de sodio. 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 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
25 kDa con NMWCO y se filtró a 0,2 micrómetros.

El polisacárido activado se formuló 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
30 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 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
35 sodio (1 mol por mol de unidad de repetición del polisacárido), y la conjugación continuó 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
 5 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.

10 *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 una 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
 15 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.

EJEMPLO 16

Preparación del conjugado de serotipo 7F para estudio polivalente de PCV22 usando la
 20 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. 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. El polisacárido de tamaño reducido se concentró y se diafiltró
 35 en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 10 kDa con NMWCO.

La solución de polisacárido se ajustó luego hasta 4 °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 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 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.

El polisacárido activado se formuló 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 2,04 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 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 una 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

EJEMPLO 17

Preparación del conjugado de serotipo 8 para estudios polivalentes de PCV23 (DMSO) y PCV23 (DMSO + Ac) 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
20 Ps. La presión de homogenización y la cantidad de pasadas por el homogeneizador se controlaron a 600 bar/6 pasadas. 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
25 a la activación. La activación de polisacárido se inició con la adición de una solución de 100 mM de metaperiodato de sodio. 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 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
35 kDa con NMWCO y se filtró a 0,2 micrómetros.

El polisacárido activado se formuló 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 4,5 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. Después de la mezcla, la reacción de conjugación continuó 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.

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 una 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.

EJEMPLO 18

Preparación del conjugado de serotipo 9V para estudio polivalente de PCV23 (DMSO) 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 230 bar/5,5 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. La reacción de oxidación continuó durante 6 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.

El polisacárido activado se formuló 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 3,0g 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 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.

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 una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 300 kDa con NMWCO.

10 El lote del concentrado fue filtrado a 0,2 micrómetros (con un 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.

EJEMPLO 19

15 Preparación del conjugado de serotipo 9V para estudio polivalente de PCV22 usando la conjugación acuosa

El polisacárido se disolvió, se redujo de 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, 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.

Reducción de tamaño y oxidación del polisacárido

25 El polvo de 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 100 bar/5 pasadas para reducir el tamaño a una masa molecular diana. El polisacárido de tamaño reducido luego 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 reacción de oxidación continuó durante 6 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 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 7,0. 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 0,7. 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 10,0 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 conjugación continuó durante 120 horas 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 3,5 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 una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 300 kDa con NMWCO. Se agregó polisorbato 20 al lote del concentrado a una concentración de 0,05 % (p/v), luego se filtró el lote a 0,2 micrómetros.

- 5 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 0,015 % (p/v) de polisorbato 20. El lote se distribuyó en alícuotas y se congeló a ≤ -60 °C.

EJEMPLO 20

- 10 Preparación del conjugado de serotipo 9V para estudio polivalente de PCV23 (DMSO + Ac) usando la conjugación acuosa

El polisacárido se disolvió, se redujo de 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, y el

- 15 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

- 20 El polvo de 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 100 bar/5 pasadas para reducir el tamaño a una masa molecular diana. El polisacárido de tamaño reducido luego se concentró y se diafiltró en agua usando una membrana
- 25 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 reacción de oxidación continuó durante 6 horas a 22 °C.

- 30 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 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 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 conjugado resultante. Las concentraciones de polisacáridos y fosfatos fueron de 10,0 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 conjugación continuó durante 120 horas 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 polisacáridos de aproximadamente 3,5 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.

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 una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 300 kDa con NMWCO. Se agregó polisorbato 20 al lote del concentrado a una concentración de 0,05 % (p/v), luego se filtró el lote a 0,2 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 0,015 % (p/v) de polisorbato 20. El lote se distribuyó en alícuotas y se congeló a ≤ -60 °C.

5

EJEMPLO 21

Preparación del conjugado de serotipo 10A para estudio polivalente de PCV23 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
20 Ps. La presión de homogenización y la cantidad de pasadas por el homogeneizador se controlaron a 615 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 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
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.

El polisacárido activado se formuló 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
5 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 1,6. La relación de masa se seleccionó para controlar la relación de polisacárido con respecto a CRM197 en el conjugado resultante. Se agregó cianoborohidruro de
10 sodio (1 mol por mol de unidad de repetición del polisacárido), y la conjugación continuó a 22 °C.

Reducción con borohidruro de sodio

Se agregó borohidruro de sodio (2 moles por mol de unidad de repetición del
15 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.

Filtración final y almacenamiento de producto

El lote se concentró y se diafiltró 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 una 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
25 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.

EJEMPLO 22

Preparación del conjugado de serotipo 10A para estudio polivalente de PCV23 (DMSO + Ac)
30 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
35 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 600 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.
- 10 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 reacción de oxidación continuó durante 2 horas a 22 °C.
- 15 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

- 20 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 El polisacárido activado se formuló 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. Las soluciones de polisacárido y CRM197 se mezclaron para alcanzar una concentración de polisacáridos de 3,4 g Ps/l y una relación de masa de polisacárido con respecto a CRM197 de 1,6. 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 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.

5 *Filtración final y almacenamiento de producto*

El lote se concentró y se diafiltró luego en 150 mM de cloruro de sodio, 25 mM de fosfato de potasio, pH 7 y luego mediante diafiltración 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 una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 300 kDa con NMWCO.

- 10 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.

EJEMPLO 23

- 15 Preparación del conjugado de serotipo 10A para estudio polivalente de PCV22 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 600 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.

- 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 reacción de oxidación continuó durante 2 horas a 22 °C.
- 35

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 El polisacárido activado se formuló 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 15 alcanzar una concentración de polisacáridos de 3,8 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 a 20 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 25 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.

30

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 una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 300 kDa con NMWCO.

35 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.

EJEMPLO X

Preparación del conjugado de serotipo 11A para estudio polivalente de PCV24 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 800 bar/8 pasadas. El polisacárido de tamaño reducido se concentró y se diafiltró en agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 5 kDa con NMWCO.
20 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 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
25 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*
30 *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.
El polisacárido activado se formuló 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
35 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 2,3 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 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.

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 una 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.

EJEMPLO 24

Preparación del conjugado de serotipo 12F para estudios polivalentes de PCV23 (DMSO) y PCV23 (DMSO + Ac) 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 80 °C durante 155 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. La reacción de oxidación continuó durante 2 horas a 22 °C.

10 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

15 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 El polisacárido activado se formuló 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.

25 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 2,7 g Ps/l y una relación de masa de polisacárido con respecto a CRM197 de 1,8. 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 a 22 °C.

30 *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.

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 una 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.

EJEMPLO 25

- 10 Preparación del conjugado de serotipo 12F para estudios polivalentes de PCV23 (DMSO) y PCV23 (DMSO + Ac) 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*

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 60 minutos, y la neutralización agregando 400 mM de amortiguador de fosfato de potasio frío, pH 7.

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

- 35 *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.

El polisacárido activado se formuló 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 1,5. 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 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 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 7,0, 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 una 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.

EJEMPLO 26

Preparación del conjugado de serotipo 14 para estudio polivalente de PCV23 (DMSO) 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 diálisis 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

5 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
10 Ps. La presión de homogenización y la cantidad de pasadas por el homogeneizador se controlaron a 200 bar/6 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
15 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 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
20 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.

El polisacárido activado se formuló 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. 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
35 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 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 dializó a aproximadamente 4°C durante 22,5 horas en 150 mM de cloruro de sodio, 0,05 % de polisorbato 20, usando un casete de diálisis 300 kDa con MWCO.

10 *Filtración final y almacenamiento de producto*

El lote del concentrado fue filtrado a 0,2 micrómetros (con prefiltro a 0,5 micrómetros), distribuido en alícuotas y congelado a ≤ -60 °C.

EJEMPLO 27

- 15 Preparación del conjugado de serotipo 14 para estudio polivalente de PCV22 y PCV23 (DMSO + Ac) usando la conjugación acuosa

- El polisacárido se disolvió, se redujo de 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, 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.

Reducción de tamaño y oxidación del polisacárido

- 25 El polvo de 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/6 pasadas para reducir el tamaño a una masa molecular diana. El polisacárido de tamaño reducido luego 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 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 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*

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 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 1,0. 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 3,8 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 conjugación continuó durante 72 horas 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 3,5 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 una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 300 kDa con NMWCO. El lote se filtró luego a 0,2 micrómetros.

- 5 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. El lote se distribuyó en alícuotas y se congeló a ≤ -60 °C.

EJEMPLO 28

- 10 Preparación del conjugado de serotipo 15A para estudios polivalentes de PCV23 (DMSO) y PCV23 (DMSO + Ac) 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 210 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
30 mM de metaperiodato de sodio. 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 kDa con NMWCO. La ultrafiltración se llevó a cabo a 2-8 °C.

- 35 *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 El polisacárido activado se formuló 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 alcanzó su nivel máximo con cloruro de sodio a una concentración de 25 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 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 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.

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 una 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.

EJEMPLO 29

- Preparación del conjugado de serotipo 15A para estudio polivalente de PCV22 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
 5 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
 10 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.

15 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 reacción de oxidación continuó durante 20 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*
 25 *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
 30 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 alcanzó su nivel máximo con cloruro de sodio a una concentración de 25 mM. Las soluciones de
 35 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 a 34 °C.

Reducción con borohidruro de sodio

- 5 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,
- 10 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

- 15 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 una 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.
- 20

EJEMPLO 30

Preparación del conjugado de serotipo 15C para estudios polivalentes de PCV23 (DMSO) y PCV23 (DMSO + Ac) usando la conjugación con DMSO

- 25 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
- 30 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.

- 35 *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.

5 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
10 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 reacción de oxidación continuó durante 2 horas a 22 °C.

15 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

20 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.

El polisacárido activado se formuló para la liofilización a 6 mg Ps/ml con
25 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
30 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 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 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 una 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.

EJEMPLO 31

Preparación del conjugado de serotipo 15C para estudio polivalente de PCV22 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.

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. La solución de polisacárido reducido en tamaño se calentó hasta 60 °C y se agregó amortiguador de bicarbonato de sodio, pH 9,4 a una concentración final de 50 mM. El lote se incubó con mezcla durante 12 horas a 60 °C para

liberar grupos O-acetilo. El amortiguador de fosfato de potasio, pH 6 se agregó a una concentración final de 150 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.

5 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 reacción de oxidación continuó durante 2 horas a 22 °C.

10 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

15 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 El polisacárido activado se formuló 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.

25 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 3,2 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 a 22 °C.

30 *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 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 una 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.

10 EJEMPLO 32

Preparación del conjugado de serotipo 18C para estudios polivalentes de PCV23 (DMSO) y PCV23 (DMSO + Ac) 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 160 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. 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.

- 5 El polisacárido activado se formuló 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 3,49 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 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 una 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.

EJEMPLO 33

- 35 Preparación del conjugado de serotipo 18C para estudio polivalente de PCV22 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 160 minutos, 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. 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.

25 *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.

30 El polisacárido activado se formuló 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 2,49 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 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 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 una 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.

EJEMPLO 34

Preparación del conjugado de serotipo 19A para estudios polivalentes de PCV23 (DMSO) y PCV23 (DMSO + Ac) 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 0,22 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 de metaperiodato de sodio. La reacción de oxidación continuó durante 20 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 El polisacárido activado se formuló 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 3,8 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 a 22 °C.

25

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 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.

- 35 *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 una 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.

EJEMPLO 35

- 10 Preparación del conjugado de serotipo 19A para estudio polivalente de PCV22 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.

- 20 *Oxidación de polisacárido*

El polvo de Ps capsular neumocócico purificado se disolvió en agua y se filtró a 0,22 micrómetros. El polisacárido 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 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
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.

El polisacárido activado se formuló 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
5 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
10 sodio (1 mol por mol de unidad de repetición del polisacárido), y la conjugación continuó a 22 °C.

Reducción con borohidruro de sodio

Se agregó borohidruro de sodio (2 moles por mol de unidad de repetición del
15 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
20 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 una membrana de
25 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.

30 EJEMPLO 36

Preparación del conjugado de serotipo 19F para estudios polivalentes de PCV23 (DMSO), PCV23 (DMSO + Ac) y PCV22 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
35 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.

5 *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 150 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 4 °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
15 mM de metaperiodato de sodio. 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 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 El polisacárido activado se formuló 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
30 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 1,2. 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 a
35 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. El lote del concentrado se filtró a 0,2 micrómetros y luego se incubó a 22 °C durante 4,5 días.

10 *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 a 4 °C usando una 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.

EJEMPLO 37

Preparación del conjugado de serotipo 22F para estudio polivalente de PCV23 (DMSO) 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.

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. 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 810 bar/5 pasadas.

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 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 5 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 El polisacárido activado se formuló 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 2,3 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 a 22 °C.

25

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.

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 una 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 EJEMPLO 38

Preparación del conjugado de serotipo 22F para estudios polivalentes de PCV22 y PCV23 (DMSO + Ac) usando la conjugación acuosa

El polisacárido se disolvió, se redujo de 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, 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.

15 *Reducción de tamaño y oxidación del polisacárido*

El polvo de 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 350 bar/5 pasadas para reducir el tamaño a una masa molecular diana. El polisacárido de tamaño reducido luego 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 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 llevó a cabo a 2-8 °C.

30 *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 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 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 conjugación continuó durante 120 horas 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 polisacáridos de aproximadamente 3,5 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.

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 una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 300 kDa con NMWCO.

El lote se filtró a 0,2 micrómetros y 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. El lote se distribuyó en alícuotas y se congeló a ≤ -60 °C.

EJEMPLO 39

Preparación del conjugado de serotipo 23B para estudios polivalentes de PCV23 (DMSO), PCV23 (DMSO + Ac) y PCV22 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 proceso en cada etapa, tal como pH, temperatura, concentración y tiempo, se controlaron para
10 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
15 Ps. 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. 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
25 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
30 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.

El polisacárido activado se formuló 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.

35 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 a

5 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.

15

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 una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 300 kDa con NMWCO.

20

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.

EJEMPLO 40

25 Preparación del conjugado de serotipo 23F para estudios polivalentes de PCV23 (DMSO) y PCV23 (DMSO + Ac) 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.

35

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.

5 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 reacción de oxidación continuó durante 5 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 El polisacárido activado se formuló 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 2,1 g Ps/l y una relación de masa de polisacárido con respecto a CRM197 de 1,25. 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 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

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 una 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.

EJEMPLO 41

Preparación del conjugado de serotipo 23F para estudio polivalente de PCV22 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
20 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

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 400 bar/5 pasadas.

El polisacárido de tamaño reducido se concentró y se diafiltró en agua usando una
30 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 reacción de oxidación continuó durante 4 horas a 22 °C.

35 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.

El polisacárido activado se formuló 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 2,1 g Ps/l y una relación de masa de polisacárido con respecto a CRM197 de 1,25. 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 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 una 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.

EJEMPLO 42

Preparación del conjugado de serotipo 24F para estudios polivalentes de PCV23 (DMSO) y PCV23 (DMSO + Ac) usando la conjugación con DMSO

El polisacárido se disolvió, se dimensionó a una masa molecular diana, se activó químicamente y se intercambi6 en amortiguador mediante ultrafiltraci6n. 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 continuaci6n. El conjugado resultante se purific6 mediante ultrafiltraci6n antes de una filtraci6n final de 0,2 micrómetros. Varios parámetros de proceso en cada etapa, tal como pH, temperatura, concentraci6n y tiempo, se controlaron para
10 obtener conjugados con atributos deseados.

Reducci6n de tamaño y oxidaci6n del polisacárido

El polvo de Ps capsular neumoc6cico purificado se disolvi6 en agua y se filtr6 a 0,45 micrómetros. Se redujo el tamaño del polisacárido disuelto mediante hidrólisis ácida
15 mediante la adici6n de 200 mM de ácid6 acético, la incubaci6n a 80 °C durante 150 minutos, y la neutralizaci6n agregando 400 mM de amortiguador de fosfato de potasio frío, pH 7.

El polisacárido de tamaño reducido se concentr6 y se diafiltr6 en agua usando una membrana de ultrafiltraci6n de flujo tangencial 5 kDa con NMWCO.

La soluci6n de polisacárido se ajust6 luego hasta 22 °C y pH 5 con un
20 amortiguador de acetato de sodio para minimizar la reducci6n de tamaño del polisacárido debido a la activaci6n. La activaci6n de polisacárido se inici6 con la adici6n de una soluci6n de 100 mM de metaperiodato de sodio. La reacci6n de oxidaci6n continu6 durante 2 horas a 22 °C.

El producto activado se diafiltr6 en 10 mM de fosfato de potasio, pH 6,4 y luego mediante diafiltraci6n en agua usando una membrana de ultrafiltraci6n de flujo tangencial 5 kDa
25 con NMWCO. La ultrafiltraci6n se llev6 a cabo a 2-8 °C.

Conjugaci6n de polisacárido con CRM197

CRM197 purificado, obtenido a través de la expresi6n en *Pseudomonas fluorescens* como se describi6 anteriormente (WO 2012/173876 A1), se diafiltr6 en 2 mM de
30 amortiguador de fosfato, pH 7,2 usando una membrana de ultrafiltraci6n de flujo tangencial 5 kDa con NMWCO y se filtr6 a 0,2 micrómetros.

El polisacárido activado se formul6 para la liofilizaci6n a 2 mg Ps/ml con concentraci6n de sacarosa de 10 % p/v. CRM197 se formul6 para la liofilizaci6n a 6 mg Pr/ml con concentraci6n de sacarosa de 1 % p/v.

35 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 soluci6n de polisacárido alcanz6 su nivel máxido con cloruro

de sodio a una concentración final de 10 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

5 cianoborohidruro de sodio (1 mol por mol de unidad de repetición del polisacárido), y la conjugación continuó a 22 °C.

Reducción con borohidruro de sodio

Se agregó borohidruro de sodio (2 moles por mol de unidad de repetición del

10 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

15 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 una membrana de

20 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.

25 EJEMPLO 43

Preparación del conjugado de serotipo 24F para estudio polivalente de PCV22 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

30 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

35 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 80 °C durante 150 minutos, y la neutralización agregando 400 mM de amortiguador de fosfato de potasio frío, pH 7.

5 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
10 mM de metaperiodato de sodio. 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 kDa con NMWCO y se filtró a 0,2 micrómetros.

20 El polisacárido activado se formuló 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
25 volúmenes iguales de DMSO. La solución de polisacárido alcanzó su nivel máximo con cloruro de sodio a una concentración final de 25 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
30 cianoborohidruro de sodio (1 mol por mol de unidad de repetición del polisacárido), y la conjugación continuó 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 kDa 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 una 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.

EJEMPLO 44

Preparación del conjugado de serotipo 33F para estudio polivalente de PCV23 (DMSO) 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 510 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. 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 El polisacárido activado se formuló 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 15 alcanzar una concentración de polisacáridos de 2,5 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 a 20 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 25 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.

Filtración final y almacenamiento de producto

30 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 una 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, 35 pH 7,0 con 0,015 % (p/v) de polisorbato 20, distribuido en alícuotas y congelado a ≤ -60 °C.

Preparación del conjugado de serotipo 33F para estudios polivalentes de PCV22 y PCV23 (DMSO + Ac) usando la conjugación acuosa

El polisacárido se disolvió, se redujo de 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, 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.

10 *Reducción de tamaño y oxidación del polisacárido*

El polvo de 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 350 bar/4 pasadas para reducir el tamaño a una masa molecular diana. El polisacárido de tamaño reducido luego 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 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 llevó a cabo a 2-8 °C.

25 *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 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 conjugado resultante. Las concentraciones de polisacáridos y fosfatos fueron de 6,5 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 conjugación continuó durante 96 horas 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 polisacáridos de aproximadamente 3,5 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.

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 una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial 300 kDa con NMWCO. El lote se filtró a 0,2 micrómetros y 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. El lote se distribuyó en alícuotas y se congeló a ≤ -60 °C.

25 EJEMPLO 46

Preparación del conjugado de serotipo 35B para estudios polivalentes de PCV23 (DMSO) y PCV23 (DMSO + Ac) 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

5 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 de metaperiodato de sodio. 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 kDa con NMWCO y se filtró a 0,2 micrómetros.

El polisacárido activado se formuló 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 20 mM. 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 3,0. La relación de masa se seleccionó para controlar la relación de polisacárido con respecto a CRM197 en el conjugado resultante. La conjugación continuó 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 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 kDa 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 una 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.

EJEMPLO 47

Preparación del conjugado de serotipo 35B para estudio polivalente de PCV22 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.

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 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 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.

- 5 El polisacárido activado se formuló 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 20 mM. 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 3,0. La relación de masa se seleccionó para controlar la relación de polisacárido con respecto a CRM197 en el conjugado resultante. La conjugación continuó 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 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 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 una 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.

EJEMPLO Y

- 35 Preparación de serotipos para estudio polivalente de PCV24 usando la conjugación con DMSO

Los conjugados se prepararon para el estudio de PCV24 usando métodos similares a los descritos en los Ejemplos anteriores. Para cada serotipo, 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. Las diferencias con los ejemplos anteriores pueden incluir: presión de homogenización y la cantidad de pasadas, tiempo de oxidación, concentración de polisacáridos y sacarosa para liofilización, concentración de polisacáridos durante conjugación, relación de masa de polisacárido con respecto a CRM197 y concentración de sal en la reacción de conjugación.

EJEMPLO 48

Formulación de vacunas neumocócicas conjugadas

Los conjugados de polisacárido neumocócico con proteína individuales preparados utilizando distintas químicas, como se describió en los Ejemplos anteriores, se usaron para la formulación de vacunas neumocócicas conjugadas 8-, 15- 22-, 23- y 24-valente.

El producto farmacológico de la vacuna PCV8/APA se preparó al conjugar individualmente la proteína CRM197 con los tipos de polisacárido neumocócico (PnPs) (-8, -10A, -12F, -15A, -15C, -23B, -24F y -35B) mediante aminación reductora en un solvente aprótico (también denominada química de DMSO) y se formuló en 20 mM de L-histidina, pH 5,8 y 150 mM de NaCl, 0,1 % p/v de polisorbato-20 (PS-20) y 250 µg [Al]/ml en forma de adyuvante de fosfato de aluminio como adyuvante a 4 µg/ml de cada serotipo para una concentración de polisacáridos total de 32 µg/ml.

El producto farmacológico de la vacuna PCV15/APA se preparó al conjugar individualmente la proteína CRM197 con los tipos de polisacárido neumocócico (PnPs) (-6A, -6B, -7F, -9V, -18C, -19A, -19F, -23F) mediante aminación reductora en un solvente aprótico (también denominada química de DMSO) o para los tipos -1, -3,-4, -5, -14, -22F y -33F mediante aminación reductora en un solvente prótico (también denominada química acuosa) y se formuló en 20 mM de L-histidina, pH 5,8 y 150 mM de NaCl, 0,2 % p/v de polisorbato-20 (PS-20) y 250 µg [Al]/ml en forma de fosfato de aluminio como adyuvante a 4 µg/ml de cada serotipo (excepto 6B a 8 µg/ml) para una concentración de polisacáridos total de 64 µg/ml.

El producto farmacológico de la vacuna PCV22 que se usó para inmunizar ratones y conejos se preparó al conjugar individualmente la proteína CRM197 con los tipos de polisacárido neumocócico (PnPs) (-1, -3, -4, -5, -6A, -6B, -7F, -9V, -10A, -12F, -14, -15A, -15C,

-18C, -19A, -19F, -22F, -23B, -23F, -24F, -33F, y -35B) mediante aminación reductora en soluciones próticas y aprólicas (DMSO / acuoso “Ac”) y se formuló en 20 mM de L-histidina, pH 5,8, y 150 mM de NaCl y 0,2 % p/v de polisorbato-20 (PS-20) a 0,8 µg/ml de cada serotipo (excepto 6B a 1,6 µg/ml) para una concentración de polisacáridos total de 18,4 µg/ml que se denomina PCV22 sin adyuvante o unadj. En otra forma de realización específica, la formulación se preparó con 50 µg [Al]/ml en forma de fosfato de aluminio como el adyuvante denominada PCV22/APA.

El producto farmacológico de la vacuna PCV23 se preparó al conjugar individualmente la proteína CRM197 con los tipos de polisacárido neumocócico (PnPs) (-1, -3, -4, -5, -6A, -6B, -7F, -8, -9V, -10A, -12F, -14, -15A, -15C, -18C, -19A, -19F, -22F, -23B, -23F, -24F, -33F, y -35B) mediante aminación reductora en un solvente aprótico (también denominada química de DMSO) y se formuló en 20 mM de L-histidina, pH 5,8 y 150 mM de NaCl y 0,2 % p/v de polisorbato-20 (PS-20) a 4 µg/ml de cada serotipo para una concentración de polisacáridos total de 92 µg/ml denominada PCV23 unadj. En otra forma de realización específica, la formulación se preparó con 250 µg [Al]/ml en forma de adyuvante de fosfato de aluminio como adyuvante denominada PCV23/APA. En otra forma de realización, el producto farmacológico de la vacuna PCV23 se preparó al conjugar individualmente la proteína CRM197 con los tipos de polisacárido neumocócico (PnPs) (-1, -3, -4, -5, -9V, -14, -22F, y -33F) mediante aminación reductora en un solvente prótico (también denominada química acuosa) y al conjugar la proteína CRM197 con los tipos de polisacárido neumocócico (PnPs) (-6A, -6B, -7F, -8, -10A, -12F, -15A, -15C, -18C, -19A, -19F, -23B, -23F, -24F, y -35B) mediante aminación reductora en un solvente aprótico (también denominada química de DMSO). El producto farmacológico de vacunas se formuló en 20 mM de L-histidina, pH 5,8 y 150 mM de NaCl y 0,1 % p/v de polisorbato-20 (PS-20) con 0,01 % de carboximetilcelulosa (CMC) a 4 µg/ml de cada serotipo (excepto 6B a 8 µg/ml) para una concentración de polisacáridos total de 96 µg/ml, se preparó con 250 µg [Al]/ml en forma de adyuvante de fosfato de aluminio como adyuvante y se denominó PCV23 (DMSO + Ac)/APA.

La composición inmunógena multivalente PCV24 se preparó al conjugar individualmente la proteína CRM197 con los serotipos de polisacárido de *S. pneumoniae* (PnPs) -1, -3, -4, -5, -6A, -6B, -7F, -8, -9V, -10A, -11A, -12F, -14, -15A, -15C, -18C, -19A, -19F, -22F, -23B, -23F, -24F, -33F, y -35B mediante aminación reductora en un solvente aprótico (también denominada química de DMSO), se formuló en 20 mM de L-histidina, pH 5,8 y 150 mM de NaCl y 0,1 % p/v de polisorbato-20 (PS-20) a 4 µg/ml o 8 µg/ml de cada serotipo de polisacárido para una concentración de polisacáridos total de 96 µg/ml o 192 µg/ml, respectivamente, y se denominó “PCV24 unadj”. En otra forma de realización específica, la composición inmunógena multivalente PCV24 se preparó en 20 mM de L-Histidina, pH 5,8, 150 mM de NaCl y 0,2 % p/v de polisorbato -20 (PS-20) a 4 µg/ml de cada serotipo de polisacárido para una concentración de

polisacáridos total de 96 µg/ml que además comprende 250 µg [Al]/ml en forma de adyuvante de fosfato de aluminio. Esta se denomina “PCV24/APA”.

- El volumen requerido de conjugados a granel necesario para obtener la concentración diana de serotipos 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 polisorbato-20 (PS-20) para producir una mezcla de conjugados 2X-4X. 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-4x esterilizada por filtración se agregó a otro recipiente que contenía adyuvante de fosfato de aluminio o se diluyó con solución salina para alcanzar las concentraciones de polisacárido, excipiente y adyuvante APA (de ser necesario) totales diana deseadas. Las formulaciones luego se cargaron en viales de vidrio o jeringas y se almacenaron a 2-8 °C.

EJEMPLO 49

- 15 Inmunogenicidad de PCV22 y anticuerpo funcional en ratones

- Se inmunizaron ratones Balb/c hembra jóvenes (6-8 semanas, n=10/grupo) con 0,1 ml de una vacuna neumocócica conjugada 22-valente (PCV22/APA o PCV22 sin adyuvante) en el día 0, día 14, y día 28. PCV22 se dosificó en 0,08 µg de cada polisacárido neumocócico (1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B) y 6B en 0,16 µg, todos conjugados con CRM197 sin adyuvante o con 5 µg de adyuvante de fosfato de aluminio (APA) por inmunización. Se observaron los 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 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 los ratones sostenidos verticalmente por sus dientes incisivos. La aspiración de las bacterias se indujo al halar suavemente la lengua hacia afuera y cubrir las fosas nasales. Los 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. Se observaron los ratones al menos dos veces por día por parte del 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 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 ratones 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 ratón en función del ensayo sobre humanos descrito por Marchese et al. [3] 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 muestras de suero de ratones. 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 Fundación de Investigación de la Universidad de Alabama (UAB) [UAB Research Foundation] [1, 2].

Los sueros de ratones se agruparon para cada grupo y se evaluaron en ensayos de electroquimioluminiscencia multiplexados para determinar títulos de anticuerpo. PCV22 generó títulos de anticuerpo en ratones para todos los serotipos luego de 1, 2, y 3 inmunizaciones con la vacuna (FIGURA 1). PCV22 mostró reactividad cruzada para el serotipo 15B, como lo demuestran los títulos de IgG (FIGURA 1). PCV22 formulada con APA tuvo una tendencia hacia una inmunogenicidad más alta en comparación con PCV22 sin adyuvante en ratones en PD2 (no se muestran datos) y PD3 (FIGURA 2).

Los sueros de ratones se agruparon para cada grupo y se evaluaron en ensayos opsonofagocíticos multiplexados (MOPA) para determinar títulos de anticuerpo funcional. PCV22 generó títulos de anticuerpo funcional en ratones que inactivaron serotipos bacterianos tipo vacuna luego de 3 inmunizaciones con la vacuna (FIGURA 3). PCV22 formulada con APA tuvo una tendencia hacia títulos de anticuerpo funcional más altos en comparación con PCV22 sin adyuvante en PD2 (no se muestran datos) y PD3 (FIGURA 4), de manera similar a los títulos de IgG (FIGURA 2).

Los ratones inmunizados con PCV22 se protegieron de la exposición intratraqueal a 24F de *S. pneumoniae* (FIGURA 5). La prueba logrank de Mantel Cox indicó que los grupos de PCV22 sin adyuvante (PCV22 unadj) y PCV22/APA estuvieron protegidos significativamente de la exposición en comparación con el grupo sin tratamiento previo

($P < 0,0001$). Asimismo, ambos grupos de ratones inmunizados con PCV22 tuvieron poca o ninguna bacteriemia, lo que fue significativamente menor en comparación con el grupo sin tratamiento previo (los datos no se muestran).

5

EJEMPLO 50

Inmunogenicidad de PCV22 y anticuerpo funcional en conejos

Los conejos blancos de Nueva Zelanda (NZWR, $n=5$ /grupo) adultos se inmunizaron por vía intramuscular (IM) con 0,1 ml de una vacuna neumocócica conjugada 22-valente (PCV22/APA o PCV22 sin adyuvante) en el día 0 y el día 14 (lados alternativos).

10 PCV22 se dosificó en 0,08 μg de cada polisacárido neumocócico (1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B) y 6B en 0,16 μg , todos conjugados con CRM197 y sin adyuvante o formulados con 5 μg de APA por inmunización. 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

15 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

20 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

25 Marchese et al. ^[3] con el uso de tecnología desarrollada por MesoScale Discovery (una división de MesoScale Diagnostics, LLC, Gaithersburg, MD) que utiliza una etiqueta SULFO-TAGTM que emite luz ante la estimulación electroquímica. El anti-IgG de conejo etiquetado SULFO-TAGTM se usó como anticuerpo secundario para analizar muestras de suero de NZWR. El anticuerpo funcional se determinó mediante ensayos opsonofagocíticos multiplexados (MOPA)

30 con base en protocolos descritos anteriormente en www.vaccine.uab.edu y el *software* Opsotiter® 3 bajo titularidad y autorización para comercializar de la Fundación de Investigación de la Universidad de Alabama (UAB) [UAB Research Foundation] ^[1, 2].

Los sueros de conejo se evaluaron individualmente en ensayos de electroquimioluminiscencia multiplexados para determinar títulos de anticuerpo. PCV22 generó títulos de anticuerpo en conejos para todos los serotipos luego de inmunizaciones con la vacuna (FIGURA 6). La inmunización de conejos con PCV22 también generó anticuerpos que se

5 fijaron al polisacárido de serotipo 15B (FIGURA 6). No se produjo ningún beneficio a partir de incluir APA con PCV22 en conejos, puesto que la inmunogenicidad era comparable o más baja que PCV22 (serotipo 1) sin adyuvante en PD2 (FIGURA 7).

Los sueros de conejo se evaluaron individualmente en ensayos opsonofagocíticos multiplexados (MOPA) para determinar títulos de anticuerpo funcional. PCV22 generó títulos

10 de anticuerpo funcional en conejos que inactivaron serotipos bacterianos tipo vacuna luego de 2 inmunizaciones con la vacuna (FIGURA 8). PCV22 sin adyuvante tuvo títulos de anticuerpo funcional más altos en PD1 para el serotipo 4 (no se muestran datos) y en PD2 para los serotipos 1, 3 y 4 en comparación con PCV22 formulada con APA. PCV22 formulada con APA no tuvo títulos de anticuerpo funcional más altos en PD1 (no se muestran datos) y PD2 para la mayoría

15 de los serotipos en comparación con PCV22 sin adyuvante (FIGURA 8).

EJEMPLO 51

Inmunogenicidad de PCV23 en cría de *Macaca mulatta*

Se inmunizaron crías de *Macaca mulatta* (IRM, 2-3 meses de vida, n=8-9/grupo)

20 por vía intramuscular con 0,1 ml de una vacuna neumocócica conjugada 23-valente (PCV23) en los días 0, 28, y 56. PCV23 se dosificó en 9,6 µg de polisacárido neumocócico total (1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B en 0,4 µg, 6B en 0,8 µg, todos conjugados con CRM197) sin adyuvante o formulado con 25 µg de adyuvante de fosfato de aluminio (APA) por inmunización. Se inmunizó un grupo adicional de

25 IRM por vía intramuscular con 0,1 ml de PCV15. PCV15 se dosificó en 6,4 µg de polisacárido neumocócico total (1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F en 0,4 µg, 6B en 0,8 µg, todos conjugados con CRM197 con 25 µg de APA por inmunización) en un cuádriceps y

0,1 ml de PCV8 (8, 10A, 12F, 15A, 15C, 23B, 24F y 35B en 0,4 µg, todos conjugados con CRM197 con 25 µg de APA por inmunización) en un cuádriceps distinto siguiendo el mismo

30 cronograma como se describió anteriormente. Los sueros se recolectaron antes del inicio del estudio (preinmunización, día 0) y en los días 14 (PD1), 28, 42 (PD2), 56 y 70 (PD3). Se observaron IRM al menos diariamente por parte del 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 la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio de los Institutos Nacionales de la Salud. El protocolo experimental fue aprobado por el Comité institucional de uso y cuidado animal en Merck & Co., Inc. y New Iberia Research Center.

Los sueros de *Macaca mulatta* 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 *Macaca mulatta* en función del ensayo sobre humanos descrito por Marchese et al y Skinner et al ^[3,4] 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*.

La inmunización de IRM con PCV23 generó títulos de anticuerpo para todos los serotipos para todas las formulaciones evaluadas de la vacuna PCV23 (FIGURAS 9A-9D). También cabe destacar que PCV23, que contiene conjugados de polisacárido 15A-CRM197 y 15C-CRM197, también proporciona reactividad cruzada a 15B, como se demostró en el ECL (FIGURAS 9A-9D). PCV23 fue inmunógena con una dosis de vacuna en los IRM (FIGURAS 9A-9D).

La formulación de PCV23 (DMSO)/APA tuvo inmunogenicidad más alta para el serotipo 22F en comparación con PCV23 sin adyuvante en PD1 mientras que PCV23 (DMSO+Ac)/APA tuvo inmunogenicidad más alta para el serotipo 1 y el serotipo 15C en comparación con PCV23 sin adyuvante en PD1 (FIGURA 10A). La formulación de PCV23 (DMSO)/APA tuvo inmunogenicidad más alta para el serotipo 18C en comparación con PCV23 sin adyuvante en PD2 (FIGURA 10B). PCV23 (DMSO+Ac)/APA tuvo inmunogenicidad más alta para la mayoría de los serotipos (1, 3, 4, 7F, 8, 9V, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19F, 22F y 23F) en comparación con PCV23 sin adyuvante en PD2 (FIGURA 10B). PCV23 (DMSO+Ac)/APA tuvo inmunogenicidad más alta para los serotipos 1, 4 y 9V en comparación con PCV23 sin adyuvante en PD3 (FIGURA 10C).

Los IRM vacunados con PCV23 (DMSO+Ac)/APA o mediante una coadministración de PCV15/APA + PCV8/APA en miembros distintos no mostraron muchas diferencias de inmunogenicidad en PD1, con la excepción del serotipo 10A, el cual tuvo

inmunogenicidad más alta en el grupo de coadministración (FIGURA 11A). Sin embargo los IRM vacunados con PCV23 (DMSO+Ac)/APA tuvieron inmunogenicidad en PD2 más alta para la mayoría de los serotipos 1, 3, 4, 5, 7F, 8, 9V, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19F, 22F, 23B y 23F en comparación con la coadministración de PCV15/APA + PCV8/APA (FIGURA 11B). No
 5 hubo diferencias de inmunogenicidad entre las dos vacunas en PD3 (FIGURA 11C).

Al evaluar los efectos de refuerzo de anticuerpos, todas las PCV generaron respuestas inmunitarias primarias en PD1 en comparación con los sueros preinmunización para todos los serotipos con la excepción del serotipo 23B en IRM inmunizados con PCV23 (DMSO+Ac)/APA (FIGURA 12A). Todas las PCV evaluadas generaron títulos de anticuerpo
 10 significativamente más altos en PD2 y PD3 en comparación con los sueros preinmunización para todos los serotipos (FIGURAS 12B y 12C). Una segunda dosis de PCV resultó en títulos de anticuerpo aumentados de PD2 en comparación con PD1 para todos los serotipos excepto el serotipo 3 y el serotipo 1 en IRM inmunizados con PCV23 sin adyuvante, PCV23 (DMSO)/APA y PCV15/APA + PCV8/APA (FIGURA 12D). Una tercera dosis de PCV resultó en un aumento
 15 en títulos de anticuerpo para la mayoría de los serotipos, con la excepción de IRM inmunizados con PCV23 (DMSO+Ac)/APA en donde hubo una disminución en PD3 en comparación con PD2, lo que sugiere que los IRM inmunizados con PCV23 (DMSO+Ac)/APA alcanzaron la máxima respuesta al anticuerpo en PD2 (FIGURA 12E).

20 EJEMPLO Z

Inmunogenicidad de PCV24 en conejos blancos de Nueva Zelanda y cría de *Macaca mulatta*

Se inmunizaron conejos blancos de Nueva Zelanda (NZWR, n=8/grupo) por vía intramuscular con 0,1 ml de una vacuna neumocócica conjugada 24-valente (PCV24) en los días 0 y 14. PCV24 se dosificó en 9,6 µg de polisacárido neumocócico total (1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8,
 25 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, deOAc15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B en 0,4 µg y todos conjugados con CRM197) y formulado con adyuvante de fosfato de aluminio (APA, 25 µg) por inmunización. Se recolectó suero antes del inicio del estudio (preinmunización, día 0) 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
 30 malestar.

Se inmunizaron crías de *Macaca mulatta* (IRM, 2-3 meses de vida, n=5/grupo) por vía intramuscular con 0,1 ml de una vacuna neumocócica conjugada 24-valente (PCV24) en

los días 0, 28, y 56. PCV24 se dosificó en 9,6 µg de polisacárido neumocócico total (1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, deOAc15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F y 35B en 0,4 µg y todos conjugados con CRM197) y formulado con adyuvante de fosfato de aluminio (APA, 25 µg) por inmunización. Los sueros se recolectaron antes del inicio del estudio (preinmunización, día 0) y en los días 14 (PD1), 28, 42 (PD2), 56 y 70 (PD3). Se observaron IRM al menos diariamente por parte del 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 la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio de los Institutos Nacionales de la Salud. El protocolo experimental fue aprobado por el Comité institucional de uso y cuidado animal en Merck & Co., Inc. y New Iberia Research Center.

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 [3, 4] 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* y un anti-IgG de conejo etiquetado SULFO-TAG™ para las muestras de conejo blanco de Nueva Zelanda.

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 Fundación de Investigación de la Universidad de Alabama (UAB) [UAB Research Foundation] [1, 2].

La inmunización de NZWR con PCV24 generó títulos de anticuerpo para todos los serotipos en la vacuna (FIGURA 13A). Además, cabe destacar que PCV24, que contiene conjugados de polisacárido 15A-CRM197, deOAc15B-CRM197, 6A-CRM197, 6B-CRM197, también proporciona reactividad cruzada a 15B y 6C, como se demostró en el ECL (FIGURA 13A).

Los sueros de NZWR se evaluaron individualmente en ensayos opsonofagocíticos multiplexados (MOPA) para determinar títulos de anticuerpo funcional. PCV24 generó títulos

de anticuerpo funcional en NZWR que inactivaron todos los serotipos bacterianos tipo vacuna (FIGURA 13B).

La inmunización de IRM con PCV24 generó títulos de anticuerpo para todos los serotipos en la vacuna (FIGURA 14A). Además, cabe destacar que PCV24, que contiene
 5 conjugados de polisacárido 15A-CRM₁₉₇, deOAc15B-CRM₁₉₇, 6A-CRM₁₉₇, 6B-CRM₁₉₇, también proporciona reactividad cruzada a 15B y 6C, como se demostró en el ECL (FIGURA 14A).

Los sueros de IRM se evaluaron individualmente en ensayos opsonofagocíticos multiplexados (MOPA) para determinar títulos de anticuerpo funcional. PCV24 generó títulos
 10 de anticuerpo funcional en IRM que inactivaron todos los serotipos bacterianos tipo vacuna (FIGURA 14B), con la excepción de 33F, que también tenía títulos de anticuerpo de fijación preinmunización/PD3 más bajos en ECL. Sin embargo, cuando se evaluó PCV24/APA en conejos blancos de Nueva Zelanda, los títulos de OPA de 33F PD2 eran 58 veces más altos que los títulos preinmunización (FIGURA 13B).

15 Referencias

1. Caro-Aguilar I, Indrawati L, Kaufhold RM, Gaunt C, Zhang Y, Nawrocki DK, et al. Immunogenicity differences of a 15-valent pneumococcal polysaccharide conjugate vaccine (PCV15) based on vaccine dose, route of immunization and mouse strain. Vaccine, 7 de febrero de 2017;35(6):865-72.
- 20 2. Burton RL, Nahm MH. Development and validation of a fourfold multiplexed opsonization assay (MOPA4) for pneumococcal antibodies. Clin Vaccine Immunol, septiembre de 2006;13(9):1004-9.
3. Marchese RD, Puchalski D, Miller P, Antonello J, Hammond O, Green T, Rubinstein LJ, Caulfield MJ, Sikkema D. Optimization and validation of a multiplex,
 25 electrochemiluminescence-based detection assay for the quantitation of immunoglobulin G serotype-specific antipneumococcal antibodies in human serum. Clin Vaccine Immunol. marzo de 2009;16(3):387-96.
4. Skinner, J.M., et al., Pre-clinical evaluation of a 15-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV15-CRM197) in an infant-rhesus monkey immunogenicity model. Vaccine, 2011. 29(48):
 30 p. 8870-8876.

Materialles 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.

10 *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.

20 *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.

35

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.