

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 994 040**

51 Int. Cl.:

A61K 31/35 (2006.01)
A61K 31/715 (2006.01)
A61K 39/085 (2006.01)
C12P 19/04 (2006.01)
A61K 39/09 (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01)
A61K 47/18 (2007.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61K 47/64 (2007.01)
A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.09.2018** **PCT/US2018/049308**
87 Fecha y número de publicación internacional: **14.03.2019** **WO19050815**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.09.2018** **E 18853342 (6)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2024** **EP 3678654**

54 Título: **Polisacáridos neumocócicos y su uso en conjugados inmunogénicos polisacárido-proteína transportadora**

30 Prioridad:

07.09.2017 US 201762555461 P
20.03.2018 US 201862645252 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.01.2025

73 Titular/es:

MERCK SHARP & DOHME LLC (100.00%)
126 East Lincoln Avenue
Rahway, New Jersey 07065, US

72 Inventor/es:

PORAMBO, RICHARD, J.;
ABEYGUNAWARDANA, CHITRANANDA;
MUSEY, LUWY KAVUKA;
KOSINSKI, MICHAEL, J.;
CUI, YADONG ADAM;
MCHUGH, PATRICK y
KONIETZKO, JANELLE

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 994 040 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Polisacáridos neumocócicos y su uso en conjugados inmunogénicos polisacárido-proteína transportadora

5 **Campo de la invención**

La presente invención proporciona un conjugado polisacárido-proteína transportadora que tiene polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 24F. Los conjugados polisacárido-proteína de este serotipo pueden incluirse en vacunas neumocócicas conjugadas multivalentes.

10 **Antecedentes de la invención**

Streptococcus pneumoniae, un ejemplo de una bacteria encapsulada, es una causa importante de enfermedades graves en todo el mundo. En 1997, los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) estimaron que había 3.000 casos de meningitis neumocócica, 50.000 casos de bacteriemia neumocócica, 7.000.000 de casos de otitis media neumocócica y 500.000 casos de neumonía neumocócica anualmente en los Estados Unidos. Véase Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1997, 46(RR-8):1-13. Además, las complicaciones de estas enfermedades pueden ser significativas y algunos estudios publican hasta un 8 % de mortalidad y un 25 % de secuelas neurológicas con la meningitis neumocócica. Véase Arditi *et al.*, 1998, *Pediatrics* 102:1087-97.

Las vacunas multivalentes de polisacáridos neumocócicos autorizadas desde hace muchos años han demostrado ser muy valiosas para prevenir la enfermedad neumocócica en adultos, particularmente, en ancianos y aquellos en riesgo alto. Sin embargo, los lactantes y los niños pequeños responden mal a los polisacáridos neumocócicos no conjugados. Los polisacáridos bacterianos son inmunógenos independientes de linfocitos T, que provocan una respuesta débil o nula en los lactantes. La conjugación química de un inmunógeno de polisacárido bacteriano con una proteína transportadora convierte la respuesta inmunitaria en una dependiente de linfocitos T en los lactantes. El toxoide diftérico (DTx, una versión químicamente desintoxicada de DT) y CRM197 se han descrito como proteínas transportadoras de inmunógenos de polisacáridos bacterianos debido a la presencia de epítomos estimulantes de linfocitos T en sus secuencias de aminoácidos.

La vacuna neumocócica conjugada, Plevnar[®], que contiene los 7 serotipos más frecuentemente aislados (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F) que provocaban enfermedad neumocócica invasiva en niños pequeños y lactantes en ese momento, obtuvo la licencia por primera vez en los Estados Unidos en febrero de 2000. Después del uso universal de Plevnar[®] en los Estados Unidos, ha habido una reducción significativa de la enfermedad neumocócica invasiva en niños debido a los serotipos presentes en Plevnar[®]. Véase Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2005, 54(36):893-7. Sin embargo, existen limitaciones en la cobertura de serotipos con Plevnar[®] en determinadas regiones del mundo y cierta evidencia de determinados serotipos emergentes en los Estados Unidos (por ejemplo, 19A y otros). Véase 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.

Plevnar 13[®] es una vacuna neumocócica de conjugados polisacárido-proteína de 13-valente que incluye los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F. Véase, por ejemplo, Publicación de solicitud de patente de los EE. UU. N.º US 2006/0228380 A1, 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 la 48.^a Reunión Anual de ICAAC/ISDA 46.^a Reunión anual, Washington DC, 25-28 de octubre de 2008. Véase, también, Dagan *et al.*, 1998, *Infect Immun.* 66: 2093-2098 y Fattom, 1999, *Vaccine* 17:126.

S. pneumoniae se ha clasificado en más de noventa serotipos basándose en la estructura del polisacárido capsular. Se proporciona una lista de estructuras de polisacáridos capsulares neumocócicos conocidas en Geno, 2015, *Clinical Microbiology Reviews* 28:871-899. Geno divulga un polisacárido capsular de serotipo de *S. pneumoniae* 24F.

Kamerling *et al.*, : "*Pneumococcal Polysaccharides: A Chemical View*", 1995, ISBN: 978-0-913113-85-1 divulga un polisacárido capsular de serotipo de *S. pneumoniae* 24F.

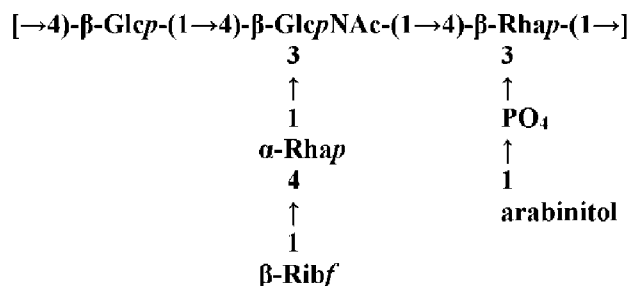
Las vacunas neumocócicas conjugadas multivalentes actuales han sido eficaces para reducir la incidencia de la enfermedad neumocócica asociada a los serotipos presentes en las vacunas. Sin embargo, la prevalencia de neumococos que expresan serotipos no presentes en la vacuna ha ido en aumento. En consecuencia, es necesario identificar y caracterizar los serotipos neumocócicos emergentes para incluirlos en futuras vacunas.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un conjugado polisacárido-proteína transportadora que tiene polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 24F. La presente invención se basa, en parte, en la identificación estructural de

polisacáridos capsulares de este serotipo.

En consecuencia, la presente invención proporciona un polisacárido con la siguiente unidad de repetición:



conjugado con una proteína transportadora.

En determinadas realizaciones, el polisacárido tiene entre 5 y 5000 unidades de repetición. En determinados aspectos, el polisacárido tiene entre 10 y 3000, 20 y 2000, de 50 a 1500 o de 100 a 1000 unidades de repetición.

En determinadas realizaciones, el polisacárido tiene un peso molecular de 5 kDa a 5.000 kDa. En determinados aspectos, el polisacárido tiene un peso molecular de 10 kDa a 2.000 kDa, de 50 kDa a 1500 kDa o 100 kDa a 1000 kDa.

La presente invención proporciona además polisacáridos activados producidos a partir de cualquiera de las realizaciones anteriores en donde el polisacárido se activa con un reactivo químico para producir grupos reactivos para la conjugación con un enlazador o proteína transportadora. En determinadas realizaciones, la activación se produce en el arabinitol-1-PO₄. En determinadas realizaciones, el polisacárido se activa con peryodato. En determinados aspectos de esta realización, la activación se produce en la posición del carbono 2 del arabinitol-1-PO₄.

La presente invención proporciona además conjugados polisacárido-proteína en los que polisacáridos o polisacáridos activados como se han proporcionado anteriormente se conjugan con una proteína transportadora. En determinados aspectos, la proteína transportadora se selecciona de CRM197, fragmento B de la toxina diftérica (DTFB, por sus siglas en inglés), DTFB C8, toxoide diftérico (DT, por sus siglas en inglés), toxoide tetánico (TT, por sus siglas en inglés), fragmento C del TT, toxoide pertúsico, toxoide colérico, *E. coli* LT, *E. coli* ST y exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*. En un aspecto específico, la proteína transportadora es CRM197.

En determinados aspectos, los conjugados polisacárido-proteína se preparan usando química de aminación reductora en condiciones acuosas o en un disolvente aprótico tal como dimetilsulfóxido (DMSO). En un aspecto específico, los conjugados polisacárido-proteína se preparan usando química de aminación reductora en DMSO.

En el presente documento también se describe una composición inmunogénica multivalente que comprende polisacáridos no conjugados o conjugados polisacárido-proteína de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 24F, y polisacáridos no conjugados o conjugados polisacárido-proteína de uno o más de *Streptococcus pneumoniae* serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 6D, 7B, 7C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18B, 18C, 19A, 19F, 20, 21, 22A, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 27, 28A, 31, 33F, 34, 35A, 35B, 35F y 38. La composición inmunogénica multivalente puede comprender polisacáridos no conjugados o conjugados polisacárido-proteína transportadora, pero no ambos. La composición inmunogénica multivalente puede comprender una mezcla de polisacáridos no conjugados o conjugados polisacárido-proteína transportadora. La composición inmunogénica multivalente puede tener hasta 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 o 90 serotipos.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A-B representan una representación gráfica de la estructura de la unidad de repetición de A) polisacárido de *S. pneumoniae* serotipo 24F; y B) estructura repetitiva de *S. pneumoniae* serotipo 24F activada con peryodato. Nótese que la estructura que se muestra en la Figura 1B muestra el sitio de activación predominante (en forma de un sacárido activado). Dentro de una cadena de polisacárido, no es necesario que todas las unidades de repetición se activen como se muestra en la Figura 1B.

La Figura 2 representa el espectro de RMN 1H unidimensional de 600 MHz del polisacárido capsular de *S. pneumoniae* serotipo 24F en D₂O a 50 °C. Se marcan las señales provenientes de patrones internos (DMSO y DSS-d6), agua residual (HOD) y otros componentes residuales del proceso de purificación; etanol (EtOH), isopropanol (IPA) y acetato. Las señales menores marcadas con * se deben a residuos de la pared celular de *S. pneumoniae*, tal como el polisacárido C y/o peptidoglicanos.

La Figura 3 representa la región de identidad de RMN ^1H unidimensional (1D) que se ha de usar para la identificación de serotipos de *S. pneumoniae* serotipo 24F. Se marcan las posiciones de señal de cada protón anomérico de la unidad de repetición de cada resto de monosacárido.

La Figura 4 representa el espectro parcial de RMN ^1H - ^{13}C bidimensional (2D) de correlación de múltiples enlaces de *S. pneumoniae* serotipo 24F que establece uniones covalentes entre restos de azúcar en la estructura de repetición. En la figura se rotulan las correlaciones que establecen uniones glicosídicas.

La Figura 5 representa el establecimiento de uniones fosfodiéster en la unidad de repetición de polisacárido capsular de *S. pneumoniae* serotipo 24F.

Figura 6 Espectro superior; TOCSY 1D del polisacárido de serotipo 24F activado con excitación centrada en el pico a 5,19 ppm que muestra una correlación única con la señal a 3,86 ppm. El espectro inferior es un espectro de protones 1D patrón del serotipo 24F que identifica el triplete a 5,19 ppm.

El Espectro superior de la Figura 7 muestra el TOCSY 1D del polisacárido de serotipo 24F activado con excitación centrada en la señal a 5,19 ppm. La figura inferior es el gHSQCAD editado por multiplicidad. Los óvalos rellenos son grupos metilo y metino, los óvalos abiertos son metilenos.

La Figura 8 muestra títulos de anticuerpos IgG de ELISA (después de la dosis 2) para conejos inmunizados con serotipos monovalentes de *S. pneumoniae* conjugados con CRM197 y formulados con adyuvante de fosfato de aluminio (APA). Las barras de error representan la media geométrica + intervalo de confianza del 95 %.

La Figura 9 muestra títulos de OPA específicos de serotipo (después de la dosis 2) para conejos inmunizados con serotipos monovalentes de *S. pneumoniae* conjugados con CRM197 y formulados con adyuvante de fosfato de aluminio (APA). Las barras de error representan la media geométrica + intervalo de confianza del 95 %.

La Figura 10 muestra protección frente a la exposición intratraqueal a *S. pneumoniae* serotipo 24F de ratones C57BL/6 inmunizados con vacuna conjugada monovalente 24F-CRM197 formulada con adyuvante de fosfato de aluminio (APA). El ensayo de intervalo logarítmico de Mantel Cox indica que los ratones C57BL/6 inmunizados con la vacuna 24F-CRM197/APA estaban significativamente protegidos frente a la exposición en comparación con los ratones inmunizados con APA ($P = 0,0004$) y los ratones sin tratamiento previo ($P < 0,0001$).

La Figura 11 muestra protección frente a la exposición intratraqueal a *S. pneumoniae* serotipo 24F de ratones CD-1 inmunizados con vacuna conjugada monovalente 24F-CRM197 formulada con adyuvante de fosfato de aluminio (APA). El ensayo de intervalo logarítmico de Mantel Cox indica que los ratones CD-1 inmunizados con la vacuna 24F-CRM197/APA estaban significativamente protegidos frente a la exposición en comparación con los ratones inmunizados con APA ($P = 0,0099$) y los ratones sin tratamiento previo ($P = 0,0076$).

La Figura 12 muestra protección frente a la exposición intratraqueal a *S. pneumoniae* serotipo 24F de ratones Swiss Webster inmunizados con vacuna conjugada monovalente 24F-CRM197 formulada con adyuvante de fosfato de aluminio (APA). El ensayo de intervalo logarítmico de Mantel Cox indica que los ratones Swiss Webster inmunizados con la vacuna 24F-CRM197/APA estaban significativamente protegidos frente a la exposición en comparación con los ratones inmunizados con APA ($P < 0,0001$) y los ratones sin tratamiento previo ($P = 0,0002$).

La Figura 13 muestra los títulos de anticuerpos medios geométricos preinmunitarios, PD1 y PD2 específicos de serotipo (*S. pneumoniae* serotipos 16F, 23A, 23B, 24F, 31) para conejos inmunizados con una vacuna neumocócica conjugada multivalente (2 μg /PnPs). Las barras de error representan 2 errores típicos del título medio geométrico de cada serotipo (eje X).

La Figura 14 muestra los títulos de dilución OPA preinmunitarios, PD1 y PD2 específicos de serotipo (*S. pneumoniae* serotipos 16F, 23A, 23B, 24F, 31) para conejos inmunizados con una vacuna neumocócica conjugada multivalente (2 μg /PnPs). Los símbolos indican los títulos individuales y las barras de error representan los intervalos de confianza (IC) del 95 % de los títulos medios geométricos (TMG). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ns = no significativo.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa, en parte, en la identificación de una o más estructuras novedosas de polisacáridos neumocócicos mediante tecnología de RMN. Se cree que la estructura proporcionada en el presente documento es la primera identificación o la primera identificación correcta de *S. pneumoniae* serotipo 24F.

El polisacárido de *S. pneumoniae* serotipo 24F se produjo partir de su cepa respectiva y se purificó. Los polisacáridos producidos (y purificados) se usaron para generar conjugados Ps-CRM197 individuales. *S.*

pneumoniae serotipo 24F tiene un polisacárido único, que da como resultado un proceso de producción de conjugados único. Se demostró que el uno o más conjugados resultantes son inmunogénicos en estudios con animales.

5 Como se usa en el presente documento, el término "polisacárido" (Ps) pretende incluir cualquier elemento sacárido antigénico (o unidad antigénica) habitualmente utilizado en las técnicas de vacunas inmunológicas y bacterianas, incluyendo, pero sin limitación, un "sacárido", un "oligosacárido", un "polisacárido", un "liposacárido", un "lipooligosacárido (LOS)", un "lipopolisacárido (LPS)", un "glicosilado", un "glicoconjugado", un "polisacárido u oligosacárido derivatizado o activado", y similares. A menos que se especifique otra cosa, la nomenclatura de
10 polisacáridos utilizada en el presente documento sigue las recomendaciones de 1980 de la Comisión Conjunta de Nomenclatura Bioquímica (JCBM, por sus siglas en inglés) de la IUB-IUPAC. Véase JCBN, 1982, *J. Biol. Chem.* 257:3352-3354.

15 Como se usa en el presente documento, "composición inmunogénica" se refiere a una composición que contiene un antígeno, tal como un polisacárido capsular bacteriano o un conjugado polisacárido-proteína, que tiene la capacidad de provocar una respuesta inmunitaria en un hospedador tal como un mamífero, ya sea mediada humoral o celularmente, o ambas. La composición inmunogénica puede servir para sensibilizar al hospedador mediante la presentación del antígeno en asociación con moléculas del MHC en la superficie celular. Además, se pueden generar linfocitos T o anticuerpos específicos de antígeno para permitir la protección futura de un hospedador
20 inmunizado. Las composiciones inmunogénicas pueden proteger de este modo al hospedador de la infección por bacterias, reducir la gravedad o pueden proteger al hospedador de la muerte debida a la infección bacteriana. También pueden usarse composiciones inmunogénicas para generar anticuerpos policlonales o monoclonales, que pueden usarse para conferir inmunidad pasiva a un sujeto. También pueden usarse composiciones inmunogénicas para generar anticuerpos que sean funcionales medidos mediante la destrucción de bacterias en un modelo de
25 eficacia animal o a través de un ensayo de destrucción opsonofagocítica.

Como se usa en el presente documento, el término "aislado" en relación con un polisacárido se refiere al aislamiento de polisacárido capsular específico de serotipo de *S. pneumoniae* a partir de polisacárido purificado usando técnicas de purificación conocidas en la técnica, incluido el uso de centrifugación, filtración en profundidad, precipitación, ultrafiltración, tratamiento con carbón activado, diafiltración y/o cromatografía en columna. Generalmente un polisacárido aislado se refiere a la eliminación parcial de proteínas, ácidos nucleicos y polisacárido endógeno no específico (polisacárido C). El polisacárido aislado contiene menos del 10 %, 8 %, 6 %, 4 % o 2 % de impurezas proteicas y/o ácidos nucleicos. El polisacárido aislado contiene menos del 20 % de polisacárido C con respecto a los polisacáridos específicos de tipo.

35 Como se usa en el presente documento, el término "purificado" en relación con un polisacárido capsular bacteriano se refiere a la purificación del polisacárido a partir de lisado celular a través de medios tales como centrifugación, precipitación y ultrafiltración. En general, un polisacárido purificado se refiere a la eliminación de residuos celulares y ADN.

40 Como se usa en el presente documento, el término "Mw" se refiere al peso molecular promedio en peso y normalmente se expresa en Da o kDa. El Mw tiene en cuenta que una molécula más grande contiene más masa total de una muestra de polímero que las moléculas más pequeñas. El Mw puede determinarse mediante técnicas como la dispersión de luz estática, la dispersión de neutrones en ángulo pequeño, la dispersión por rayos X y la velocidad de sedimentación.

Como se usa en el presente documento, el término "Mn" se refiere a un peso molecular promedio en número y normalmente se expresa en Da o kDa. Mn se calcula tomando el peso total de una muestra dividido por el número de moléculas en la muestra y puede determinarse mediante técnicas tales como la cromatografía de permeación en gel, la viscometría a través de la (ecuación de Mark-Houwink), métodos coligativos tales como la osmometría de presión de vapor, la determinación de grupos terminales o la RMN de protones. Mw/Mn refleja polidispersidad.

50 Como se usa en el presente documento, la expresión "relación molar" es una fracción que normalmente se expresa como decimal hasta el lugar de las décimas o centésimas. Por ejemplo, una relación molar de 0 o 0,1 a 1,0 expresada en décimas incluirá cualquiera de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 o 1,0.

Como se usa en el presente documento, la abreviatura "PnPs" se refiere a polisacárido neumocócico.

60 Como se usa en el presente documento, el término "comprende", cuando se usa con la composición inmunogénica de la invención, se refiere a la inclusión de cualquier otro componente (sujeto a las limitaciones de la expresión "que consiste en" para la mezcla de antígenos), tales como adyuvantes y excipientes. La expresión "que consiste en", cuando se usa con la mezcla de conjugado polisacárido-proteína multivalente de la invención se refiere a una mezcla que tiene esos conjugados de polisacárido y proteína de *S. pneumoniae* particulares y ningún otro conjugado de polisacárido y proteína de *S. pneumoniae* de un serotipo diferente.

65 Como se usa en el presente documento, la expresión "sitio de activación" en un azúcar significa que el sitio puede

modificarse químicamente para formar un grupo reactivo. El sitio de activación tiene en cuenta la tendencia preferida de un agente de activación a reaccionar en un sitio específico.

Como se usa en el presente documento, la expresión "polisacárido activado" se refiere a un polisacárido que se ha modificado químicamente para formar grupos reactivos en una cadena de polisacárido. Un polisacárido activado no significa necesariamente que todos los sitios de activación disponibles se hayan modificados químicamente.

Como se usa en el presente documento, la expresión "grado de activación" en una cadena de polisacárido se refiere a la relación global entre el número de grupos químicos activados y el número de unidades de repetición en la cadena de polisacárido.

A menos que se especifique otra cosa, todos los intervalos proporcionados en el presente documento incluyen los límites superior e inferior citados.

El análisis de monosacáridos de *S. pneumoniae* serotipo 24F mostró Glc, Rha, GlcN, Rib (ribosa) y Rib-ol-P (ribosa fosfato) como constituyentes (pero no ha habido información disponible sobre la estructura). Véase Kamerling, 2000, *Pneumococcal polysaccharides: a chemical view*, pág. 81-114. En Tomasz (ed.), *Streptococcus pneumoniae molecular biology & mechanisms of disease*. María Ana Liebert, Inc., Larchmont, Nueva York. La estructura identificada en los Ejemplos es coherente con la composición de sacáridos identificada previamente. Hasta la fecha no hay información estructural disponible para los polisacáridos de serotipo 24A o 24B para la comparación.

La identificación de la estructura de estos uno o más serotipos de polisacáridos puede permitir su incorporación en vacunas neumocócicas, ya sea no conjugadas o como conjugado polisacárido-proteína. Las vacunas conjugadas que comprenden Ps estreptocócicos y neumocócicos son bien conocidas en la técnica. Véanse, por ejemplo, las Pat. de los EE. UU. N.º 6.248.570; 5.866.135; y 5.773.007.

Polisacáridos capsulares

Pueden prepararse polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* a partir del serotipo o serotipos de la invención mediante técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, los polisacáridos pueden aislarse de bacterias y pueden dimensionarse en cierta medida mediante métodos conocidos (véanse, por ejemplo, las Patentes europeas N.º EP497524 y EP497525); y preferentemente mediante microfluidificación lograda usando un homogeneizador o mediante hidrólisis química. En una realización, se cultivan cepas de *S. pneumoniae* correspondientes a cada serotipo de polisacárido en un medio a base de soja. Después, los polisacáridos individuales se purifican a través de etapas convencionales que incluyen centrifugación, precipitación y ultrafiltración. Véase, por ejemplo, la Publicación de solicitud de patente de los EE. UU. N.º 2008/0286838 y la Patente de los EE. UU. N.º 5.847.112. Los polisacáridos pueden dimensionarse con el fin de reducir la viscosidad y/o mejorar la filtrabilidad de productos conjugados posteriores. La hidrólisis química puede realizarse usando ácido acético. El dimensionamiento mecánico puede realizarse usando Cizalla por homogeneización a alta presión.

En algunas realizaciones, los polisacáridos purificados antes de la conjugación tienen un peso molecular de entre 5 kDa y 4.000 kDa. El peso molecular puede calcularse mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, por sus siglas en inglés) combinada con un detector de dispersión de luz multiángulo (MALS, por sus siglas en inglés) y un detector de índice de refracción (RI, por sus siglas en inglés). En otras de dichas realizaciones, el polisacárido tiene un peso molecular medio de entre 10 kDa y 4.000 kDa; entre 50 kDa y 4.000 kDa; entre 50 kDa y 3.000 kDa; entre 50 kDa y 2.000 kDa; entre 50 kDa y 1.500 kDa; entre 50 kDa y 1.000 kDa; entre 50 kDa y 750 kDa; entre 50 kDa y 500 kDa; entre 100 kDa y 4.000 kDa; entre 100 kDa y 3.000 kDa; entre 5 kDa y 2.000 kDa; entre 10 kDa y 2.000 kDa; entre 50 kDa y 2.000 kDa; entre 100 kDa y 2.000 kDa; entre 100 kDa y 1.500 kDa; entre 100 kDa y 1.000 kDa; entre 100 kDa y 750 kDa; entre 100 kDa y 500 kDa; entre 100 y 400 kDa; entre 200 kDa y 4.000 kDa; entre 200 kDa y 3.000 kDa; entre 200 kDa y 2.000 kDa; entre 200 kDa y 1.500 kDa; entre 200 kDa y 1.000 kDa; o entre 200 kDa y 500 kDa. En determinadas realizaciones, el polisacárido tiene un peso molecular de 50 kDa a 5.000 kDa. En determinados aspectos, el polisacárido tiene un peso molecular de 10 kDa a 2.000 kDa, de 50 kDa a 1500 kDa o 75 kDa a 200 kDa.

En determinadas realizaciones, el polisacárido de *S. pneumoniae* serotipo 24F tiene entre 5 y 2000 unidades de repetición. En determinados aspectos, el polisacárido tiene entre 15 y 1500, 20 y 400, de 30 a 300, de 40 a 250 o de 50 a 200 unidades de repetición.

Proteína transportadora

Los polisacáridos de uno o más de los serotipos pueden conjugarse con una proteína transportadora ("Pr") para mejorar la inmunogenicidad en niños, personas mayores y/o sujetos inmunocomprometidos. Cuando se use más de un serotipo en una composición multivalente, los serotipos pueden prepararse con la misma proteína transportadora o con diferentes proteínas transportadoras. Cada polisacárido capsular del mismo serotipo normalmente se conjuga con la misma proteína transportadora.

En una realización particular de la presente invención, se usa CRM197 como proteína transportadora. la CRM197 es una variante no tóxica de la toxina diftérica (DT). La proteína transportadora CRM197 es una forma mutante de DT que se vuelve no tóxica mediante una sustitución de un único aminoácido en el Fragmento A en el resto 52. En una realización, la proteína transportadora CRM197 se aísla de cultivos de *Corynebacterium diphtheria* cepa C7 (β197) cultivada en casaminoácidos y medio a base de extracto de levadura. En otra realización, la CRM197 se prepara de forma recombinante de acuerdo con los métodos descritos en la Patente de los EE. UU. N.º 5.614.382. Normalmente, la CRM197 se purifica mediante una combinación de ultrafiltración, precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de intercambio iónico. En algunas realizaciones, la CRM197 se prepara en *Pseudomonas fluorescens* usando la tecnología de expresión Pfenex Expression Technology™ (Pfenex Inc., San Diego, CA).

Otras proteínas transportadoras adecuadas incluyen toxinas bacterianas inactivadas adicionales tales como DT, fragmento B del toxoide diftérico (DTFB), TT (tóxico tetánico) o fragmento C del TT, toxoide pertúsico, toxoide colérico (por ejemplo, como se describe en la Publicación de solicitud de patente internacional N.º WO 2004/083251), *E. coli* LT (enterotoxina termolábil), *E. coli* ST (enterotoxina termoestable) y exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*. También pueden usarse proteínas de la membrana externa bacteriana tales como el complejo c de la membrana externa (OMPC), porinas, proteínas de unión a transferrina, proteína de superficie neumocócica A (PspA; Véase la Publicación de Patente de Solicitud Internacional N.º WO 02/091998), proteína adhesina neumocócica (PsaA), peptidasa C5a de estreptococos del grupo A o del grupo B, o proteína D de *Haemophilus influenzae*, neumolisina neumocócica (Kuo *et al.*, 1995, *Infect Immun* 63: 2706-13) incluyendo las desintoxicadas con respecto a Ply de alguna manera, por ejemplo dPLY-GMBS (Véase la Publicación de solicitud de patente internacional N.º WO 04/081515) o dPLY-formol, PhtX, incluyendo PhtA, PhtB, PhtD, PhtE y fusiones de proteínas Pht, por ejemplo, fusiones PhtDE, fusiones PhtBE (véanse las Publicaciones de solicitud de patente internacional N.º WO 01/98334 y WO 03/54007). Otras proteínas, tales como ovoalbúmina, hemocianina de lapa californiana (KLH), seroalbúmina bovina (BSA) o derivado proteico purificado de la tuberculina (PPD), PorB (de *N. meningitidis*), PD (proteína D de *Haemophilus influenzae*; véanse, por ejemplo, la Patente europea N.º EP 0 594 610 B) o equivalentes inmunológicamente funcionales de las mismas, péptidos sintéticos (véanse las Patentes europeas N.º EP0378881 y EP0427347), proteínas de choque térmico (véanse las Publicaciones de solicitud de patente internacional N.º WO 93/17712 y Documento WO 94/03208), proteínas pertúsicas (Véase la Publicación de solicitud de patente internacional N.º WO 98/58668 y la Patente europea N.º EP0471177), citocinas, linfocinas, factores de crecimiento u hormonas (Véase la Publicación de solicitud de patente internacional N.º WO 91/01146), proteínas artificiales que comprenden múltiples epítopos de linfocitos T CD4+ humanos de diversos antígenos derivados de patógenos (Véase Falugi *et al.*, 2001, *Eur J Immunol* 31:3816-3824) tales como la proteína N19 (véase Baraldoi *et al.*, 2004, *Infect Immun* 72:4884-7), proteínas de captación de hierro (Véase la Publicación de solicitud de patente internacional N.º WO 01/72337), toxina A o B de *C. difficile* (Véase la Publicación de patente internacional N.º WO 00/61761) y flagelina (véase Ben-Yedidia *et al.*, 1998, *Inmunol Lett* 64:9) también pueden usarse como proteínas transportadoras.

También pueden usarse otros mutantes de DT como proteína transportadora, 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; la supresión o mutación de Glu-148 a Asp, Gln o Ser y/o Ala 158 a Gly y otras mutaciones divulgadas en la Patente de los EE. UU. N.º 4.709.017 o la Patente de los EE. UU. N.º 4.950.740; la mutación de al menos uno o más restos Lys 516, Lys 526, Phe 530 y/o Lys 534 y otras mutaciones descritas en la Patente de los EE. UU. N.º 5.917.017 o la Patente de los EE. UU. N.º 6.455.673; o un fragmento divulgado en la Patente de los EE. UU. N.º 5.843.711.

Cuando se usan vacunas multivalentes, puede usarse una segunda proteína transportadora para uno o más de los antígenos. La segunda proteína transportadora es preferentemente una proteína que no es tóxica ni reactogénica y que puede obtenerse en cantidad y pureza suficientes. La segunda proteína transportadora también se conjuga o se une a un antígeno, por ejemplo, un polisacárido de *S. pneumoniae* para potenciar la inmunogenicidad del antígeno. Las proteínas transportadoras deben ser adecuadas para los procedimientos de conjugación convencionales. En una realización, cada polisacárido capsular no conjugado con la primera proteína transportadora está conjugado con la misma segunda proteína transportadora (por ejemplo, estando cada molécula de polisacárido capsular conjugada con una única proteína transportadora). En otra realización, los polisacáridos capsulares no conjugados con la primera proteína transportadora se conjugan con dos o más proteínas transportadoras (estando cada molécula de polisacárido capsular conjugada con una única proteína transportadora). En dichas realizaciones, cada polisacárido capsular del mismo serotipo normalmente se conjuga con la misma proteína transportadora.

Conjugación

Antes de la conjugación, los polisacáridos purificados pueden activarse químicamente para hacer que los sacáridos sean capaces de reaccionar con la proteína transportadora para formar un polisacárido activado. Como se usa en el presente documento, la expresión "polisacárido activado" se refiere a un polisacárido que se ha modificado químicamente como se describe a continuación para permitir la conjugación con un enlazador o una proteína transportadora. Los polisacáridos purificados pueden estar conectados opcionalmente a un enlazador. Una vez activado o conectado a un enlazador, cada polisacárido capsular se conjuga por separado con una proteína transportadora para formar un glucoconjugado. Los conjugados de polisacáridos pueden prepararse mediante

técnicas de acoplamiento conocidas.

La presente invención proporciona además polisacáridos activados producidos a partir de cualquiera de las realizaciones anteriores en donde el polisacárido se activa con un reactivo químico para producir grupos reactivos para la conjugación con un enlazador o proteína transportadora. En determinadas realizaciones, la activación se produce en el arabinitol-1-PO₄. En determinadas realizaciones, el polisacárido se activa con peryodato. En determinados aspectos de esta realización, la activación se produce en la posición del carbono 2 del arabinitol-1-PO₄. Véase la Figura 1B para consultar la estructura del polisacárido de serotipo 24F activado con peryodato. La formación de un aldehído predominantemente en el segundo carbono fue sorprendente porque requiere una escisión selectiva de los carbonos 2,3 con dioles vecinales o series continuas preferidas de oxidación en carbonos de mayor número con dioles vecinales (o aldehído) hasta finalmente la oxidación en el 2.º carbono del azúcar arabinitol. En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona polisacáridos activados y mezclas de polisacáridos activados en donde más del 50 %, 60 %, 70 % u 80 % de los grupos aldehído (a través de activación con peryodato) están en el arabinitol. En un aspecto de esta realización, el polisacárido activado tiene una estructura como se muestra en la Figura 1B.

En determinadas realizaciones, el polisacárido puede acoplarse a un enlazador para formar un intermedio polisacárido-enlazador en el que el extremo libre del enlazador es un grupo éster. Por lo tanto, el enlazador es uno en el que al menos un extremo es un grupo éster. El otro extremo se selecciona de manera que pueda reaccionar con el polisacárido para formar el intermedio polisacárido-enlazador.

En determinadas realizaciones, el polisacárido puede acoplarse a un enlazador usando un grupo amina primaria en el polisacárido. En este caso, el enlazador normalmente tiene un grupo éster en ambos extremos. Esto permite que el acoplamiento tenga lugar haciendo reaccionar uno de los grupos éster con el grupo amina primaria en el polisacárido mediante sustitución de acilo nucleófilo. La reacción da como resultado un intermedio polisacárido-enlazador en el que el polisacárido se acopla al enlazador a través de una unión amida. Por lo tanto, el enlazador es un enlazador bifuncional que proporciona un primer grupo éster para reaccionar con el grupo amina primaria en el polisacárido y un segundo grupo éster para reaccionar con el grupo amina primaria en la molécula transportadora. Un enlazador típico es el diéster de N-hidroxisuccinimida del ácido adípico (SIDEA).

En determinadas realizaciones, el acoplamiento también puede realizarse indirectamente, es decir, con un enlazador adicional que se usa para derivatizar el polisacárido antes del acoplamiento al enlazador. El polisacárido se acopla al enlazador adicional usando un grupo carbonilo en el extremo reductor del polisacárido. Este acoplamiento comprende dos etapas: (a1) hacer reaccionar el grupo carbonilo con el enlazador adicional; y (a2) hacer reaccionar el extremo libre del enlazador adicional con el enlazador. En estas realizaciones, el enlazador adicional normalmente tiene un grupo amina primaria en ambos extremos, lo que permite que tenga lugar la etapa (a1) haciendo reaccionar uno de los grupos amina primaria con el grupo carbonilo en el polisacárido por aminación reductora. Se usa un grupo amina primaria que es reactivo con el grupo carbonilo en el polisacárido. Son adecuados los grupos hidrazida o hidroxilamino. El mismo grupo amina primaria está presente normalmente en ambos extremos del enlazador adicional. La reacción da como resultado un intermedio polisacárido-enlazador adicional en el que el polisacárido se acopla al enlazador adicional mediante una unión C-N.

En determinadas realizaciones, el polisacárido puede acoplarse al enlazador adicional usando un grupo diferente en el polisacárido, particularmente un grupo carboxilo. Este acoplamiento comprende dos etapas: (a1) hacer reaccionar el grupo con el enlazador adicional; y (a2) hacer reaccionar el extremo libre del enlazador adicional con el enlazador. En este caso, el enlazador adicional normalmente tiene un grupo amina primaria en ambos extremos, lo que permite que tenga lugar la etapa (a1) haciendo reaccionar uno de los grupos de amina primaria con el grupo carboxilo en el polisacárido por activación con EDAC. Se usa un grupo amina primaria que es reactivo con el grupo carboxilo activado con EDAC en el polisacárido. Es adecuado un grupo hidrazida. El mismo grupo amina primaria está presente normalmente en ambos extremos del enlazador adicional. La reacción da como resultado un intermedio polisacárido-enlazador adicional en el que el polisacárido se acopla al enlazador adicional mediante una unión de amida.

En una realización, la activación química de los polisacáridos y la posterior conjugación con la proteína transportadora mediante aminación reductora puede conseguirse por los medios descritos en las Patentes de los EE. UU. N.º 4.365.170, 4.673.574 y 4.902.506, la Publicaciones de solicitud de patente de los EE. UU. N.º 2006/0228380, 2007/184072, 2007/0231340 y 2007/0184071, y las Publicaciones de solicitud internacional de patente N.º WO2006/110381, WO2008/079653 y WO2008/143709. La química puede implicar la activación del polisacárido neumocócico mediante la reacción con cualquier agente oxidante que transforme un grupo hidroxilo primario en un aldehído, tal como TEMPO en presencia de oxidante (documento WO2104/097099) o hacer reaccionar dos grupos hidroxilo vecinales a aldehídos, tales como peryodato (incluyendo peryodato de sodio, peryodato de potasio o ácido peryódico). Las reacciones conducen a una oxidación aleatoria de los grupos hidroxilo primarios o a una escisión oxidativa aleatoria de los grupos hidroxilo vecinales de los hidratos de carbono con la formación de grupos aldehído reactivos.

En esta realización, el acoplamiento a la proteína transportadora se realiza mediante aminación reductora a través

de aminación directa a los grupos lisilo de la proteína. Por ejemplo, la conjugación se realiza haciendo reaccionar una mezcla del polisacárido activado y la proteína transportadora con un agente reductor tal como cianoborohidruro de sodio en presencia de níquel. La reacción de conjugación puede tener lugar en solución acuosa o en presencia de dimetilsulfóxido (DMSO). Véanse, por ejemplo, las Publicaciones de solicitud de patente de los EE. UU. N.º 5 US2015/0231270 y US2011/0195086 y la Patente europea N.º EP 0471 177 B1. Después, los aldehídos sin reaccionar se protegen con caperuza con la adición de un agente reductor fuerte, tal como borohidruro de sodio.

La aminación reductora implica dos etapas, (1) oxidación del polisacárido para formar aldehídos reactivos, (2) 10 reducción de la imina (base de Schiff) formada entre el polisacárido activado y una proteína transportadora para formar un enlace conjugado de amina estable. Antes de la oxidación, opcionalmente el polisacárido tiene un tamaño reducido. Pueden emplearse métodos mecánicos (por ejemplo, homogeneización) o hidrólisis química. La hidrólisis química puede realizarse usando ácido acético. La etapa de oxidación puede implicar una reacción con peryodato. Para el fin de la presente invención, el término "peryodato" incluye tanto peryodato como ácido peryódico; el término 15 también incluye tanto metaperyodato (IO_4^-) como ortoperyodato (IO_6^{5-}) e incluye las diversas sales de peryodato (por ejemplo, peryodato de sodio y peryodato de potasio). En una realización, el polisacárido capsular se oxida en presencia de metaperyodato, preferentemente en presencia de peryodato de sodio (NaIO_4). En otra realización, el polisacárido capsular se oxida en presencia de ortoperyodato, preferentemente en presencia de ácido peryódico.

En una realización, el agente oxidante es un compuesto de radical nitroxilo o nitróxido estable, tal como compuestos 20 de piperidina-N-oxi o pirrolidina-N-oxi, en presencia de un oxidante para oxidar selectivamente hidroxilos primarios (como se describe en, por ejemplo, la Publicación de solicitud de patente internacional N.º WO 2014/097099). En dicha reacción, el oxidante real es la sal de N-oxoamonio, en un ciclo catalítico. En un aspecto, dichos compuestos de radicales nitroxilo o nitróxido estables son compuestos de piperidina-N-oxi o pirrolidina-N-oxi. En un aspecto, dicho compuesto de radical nitroxilo o nitróxido estable lleva un resto TEMPO (2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi) o 25 PROXYL (2,2,5,5-tetrametil-1-pirrolidiniloxi). En un aspecto, dicho compuesto de radical nitroxilo estable es TEMPO o un derivado del mismo. En un aspecto, dicho oxidante es una molécula que lleva un resto N-halo. En un aspecto, dicho oxidante se selecciona del grupo que consiste en N-clorosuccinimida, N-bromosuccinimida, N-yodosuccinimida, ácido dicloroisocianúrico, 1,3,5-tricloro-1,3,5-triazinano-2,4,6-triona, ácido dibromoisocianúrico, 1,3,5-tribromo-1,3,5-triazinano-2,4,6-triona, ácido diyodoisocianúrico y 1,3,5-triyodo-1,3,5-triazinano-2,4,6-triona. 30 Preferentemente, dicho oxidante es N-clorosuccinimida.

En determinados aspectos, el agente oxidante es el radical libre 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi (TEMPO) y N-clorosuccinimida (NCS) como cooxidante (como se describe en la Publicación de solicitud de patente internacional N.º WO2014/097099). Por lo tanto, en un aspecto, los glicoconjugados de *S. pneumoniae* pueden obtenerse 35 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 disolvente acuoso para producir un sacárido activado; y b) hacer reaccionar el sacárido activado con una proteína transportadora que comprende uno o más grupos amina (dicho método se denomina en adelante "aminación reductora TEMPO/NCS").

Opcionalmente, la reacción de oxidación se interrumpe mediante la adición de un agente de interrupción. El agente de interrupción puede seleccionarse de dioles vecinales, 1,2-aminoalcoholes, aminoácidos, glutatión, sulfito, 40 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).

La segunda etapa del proceso de conjugación para la aminación reductora es la reducción del enlace imina (base de Schiff) entre el polisacárido activado y una proteína transportadora para formar un enlace conjugado estable (la denominada aminación reductora), usando un agente reductor. Los agentes reductores que son adecuados incluyen los cianoborohidruros (tales como cianoborohidruro de sodio) o borohidruro de sodio. En una realización, el agente 45 reductor es cianoborohidruro de sodio.

En determinadas realizaciones de los métodos de la invención, la reacción de aminación reductora se realiza en un disolvente aprótico (o una mezcla de disolventes apróticos). En una realización, la reacción de reducción se realiza en DMSO (dimetilsulfóxido) o en disolvente DMF (dimetilformamida). El disolvente DMSO o DMF puede usarse para 50 reconstituir el polisacárido activado y la proteína transportadora, si está liofilizado. En una realización, el disolvente aprótico es DMSO.

Al final de la reacción de reducción, pueden quedar grupos aldehído sin reaccionar restantes en los conjugados, que pueden protegerse con caperuza o inactivarse usando un agente de protección con caperuza o de inactivación adecuado. En una realización, este agente de protección con caperuza o inactivación es borohidruro de sodio 60 (NaBH_4). Las alternativas adecuadas incluyen triacetoxiborohidruro de sodio o borohidruro de sodio o cinc en presencia de ácidos de Bronsted o Lewis), amina boranos tales como piridina borano, 2-picolina borano, 2,6-diborano-metanol, dimetilamina-borano, t-BuMePrN-BH₃, bencilamina-BH₃ o 5-etil-2-metilpiridina borano (PEMB) o resina de intercambio de borohidruro.

Los glicoconjugados preparados usando aminación reductora en un disolvente aprótico se usan generalmente en 65 vacunas neumocócicas conjugadas multivalentes. Por lo tanto, en determinadas realizaciones para composiciones

multivalentes donde no todos los serotipos se preparan en un disolvente aprótico, la reacción de reducción para los serotipos restantes se realiza en un disolvente acuoso (por ejemplo, seleccionado de PBS (solución salina tamponada con fosfato), MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico), HEPES, (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico), Bis-tris, ADA (ácido N-(2-acetamido)iminodiacético), PIPES (ácido piperazina-N,N'-bis(2-etanosulfónico)), MOPSO (ácido 3-morfolino-2-hidroxipropanosulfónico), BES (ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico), MOPS (ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico), DIPSO (ácido 3-bis(2-hidroxietil)amino-2-hidroxipropano-1-sulfónico), MOBS (ácido 4-(N-morfolino)butanosulfónico), HEPPSO (ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N-(2-hidroxipropanosulfónico)), POPSO (piperazina-1,4-bis(ácido 2-hidroxipropanosulfónico)), TEA (trietanolamina), EPPS (ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-propanosulfónico), Bicine o HEPB, a un pH entre 6,0 y 8,5, 7,0 y 8,0 o 7,0 y 7,5).

En algunas realizaciones, los glicoconjugados de la presente invención comprenden un polisacárido que tiene un peso molecular de entre 10 kDa y 10.000 kDa. En otras de dichas realizaciones, el polisacárido tiene un peso molecular de entre 25 kDa y 5.000 kDa. En otras de dichas realizaciones, el polisacárido tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 1.000 kDa. En otras de dichas realizaciones, el polisacárido tiene un peso molecular de entre 70 kDa y 900 kDa. En otras de dichas realizaciones, el polisacárido tiene un peso molecular de entre 100 kDa y 800 kDa. En otras de dichas realizaciones, el polisacárido tiene un peso molecular de entre 200 kDa y 600 kDa. En realizaciones de este tipo adicionales, el polisacárido tiene un peso molecular de 100 kDa a 1.000 kDa; de 100 kDa a 900 kDa; de 100 kDa a 800 kDa; de 100 kDa a 700 kDa; de 100 kDa a 600 kDa; de 100 kDa a 500 kDa; de 100 kDa a 400 kDa; de 100 kDa a 300 kDa; de 150 kDa a 1.000 kDa; de 150 kDa a 900 kDa; de 150 kDa a 800 kDa; de 150 kDa a 700 kDa; de 150 kDa a 600 kDa; de 150 kDa a 500 kDa; de 150 kDa a 400 kDa; de 150 kDa a 300 kDa; de 200 kDa a 1.000 kDa; de 200 kDa a 900 kDa; de 200 kDa a 800 kDa; de 200 kDa a 700 kDa; de 200 kDa a 600 kDa; de 200 kDa a 500 kDa; de 200 kDa a 400 kDa; de 200 kDa a 300; de 250 kDa a 1.000 kDa; de 250 kDa a 900 kDa; de 250 kDa a 800 kDa; de 250 kDa a 700 kDa; de 250 kDa a 600 kDa; de 250 kDa a 500 kDa; de 250 kDa a 400 kDa; de 250 kDa a 350 kDa; de 300 kDa a 1.000 kDa; de 300 kDa a 900 kDa; de 300 kDa a 800 kDa; de 300 kDa a 700 kDa; de 300 kDa a 600 kDa; de 300 kDa a 500 kDa; de 300 kDa a 400 kDa; de 400 kDa a 1.000 kDa; de 400 kDa a 900 kDa; de 400 kDa a 800 kDa; de 400 kDa a 700 kDa; de 400 kDa a 600 kDa; o de 500 kDa a 600 kDa.

En determinadas realizaciones, la reacción de conjugación se realiza mediante aminación reductora en donde se usa níquel para una mayor eficacia de la reacción de conjugación y para ayudar en la eliminación del cianuro libre. Se sabe que los metales de transición forman complejos estables con cianuro y mejoran la metilación reductora 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). Mediante la complejación del cianuro inhibidor residual, la adición de níquel aumenta el consumo de proteína durante la conjugación y conduce a la formación de proteínas conjugados más grandes y potencialmente más inmunogénicos.

Las químicas alternativas adecuadas incluyen la activación del sacárido con tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridinio (CDAP) para formar un éster de cianato. El sacárido activado, por lo tanto, puede acoplarse directamente o a través de un grupo espaciador (enlazador) con un grupo amino en la proteína transportadora. Por ejemplo, el espaciador podría ser cistamina o cisteamina para proporcionar un polisacárido tiolado que podría acoplarse al transportador a través de una unión tioéter obtenida después de la reacción con una proteína transportadora activada por maleimida (por ejemplo, usando GMBS) o una proteína transportadora haloacetilada (por ejemplo, usando yodoacetimida [por ejemplo, HCl de etil yodoacetimida] o bromoacetato de N-succinimidilo o SIAB, o SIA, o SBAP). Preferentemente, el éster de cianato (opcionalmente preparado mediante química CDAP) se acopla con hexanodiamina o dihidrazida de ácido adípico (ADH) y el sacárido aminoderivatizado se conjuga con la proteína transportadora usando química de carbodiimida (por ejemplo, EDAC o EDC) a través de un grupo carboxilo en la proteína transportadora. Dichos conjugados se describen en las Publicaciones de solicitud de patente internacional N.º WO 93/15760, WO 95/08348 y WO 96/29094; y Chu *et al.*, 1983, *Infect. Immunity* 40:245-256.

Otras técnicas adecuadas usan carbodiimidas, hidrazidas, ésteres activos, norborano, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxiuccinimida, S-NHS, EDC, TSTU. Muchas se describen en la Publicación de solicitud de patente internacional N.º WO 98/42721. La conjugación puede implicar un enlazador carbonilo que puede formarse mediante la reacción de un grupo hidroxilo libre del sacárido con CDI (véase Bethell *et al.*, 1979, *J. Biol. Chem.* 254:2572-4; Hearn *et al.*, 1981, *J. Chromatogr.* 218:509-18) seguido de una reacción con una proteína para formar una unión carbamato. Esto puede implicar la reducción del extremo 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 de carbamato de CDI y el acoplamiento del intermedio de carbamato de CDI con un grupo amino en una proteína.

Después de la conjugación (la reacción de reducción y opcionalmente la reacción de protección o inactivación), los glicoconjugados pueden purificarse (enriquecerse con respecto a la cantidad de conjugado polisacárido-proteína) mediante una diversidad de técnicas conocidas por el experto. Estas técnicas incluyen diálisis, operaciones de concentración/diafiltración, filtración de flujo tangencial, ultrafiltración, precipitación/elución, cromatografía en columna (cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de intercambio iónico multimodal, DEAE o cromatografía de interacción hidrófoba) y filtración en profundidad. Véase, por ejemplo, la Patente de los EE. UU. N.º 6.146.902. En una realización, los glicoconjugados se purifican mediante diafiltración o cromatografía de intercambio iónico o cromatografía de exclusión por tamaño.

Una forma de caracterizar los glicoconjugados de la invención es por el número de restos lisina en la proteína transportadora (por ejemplo, CRM197) que se conjugan con el sacárido, que puede caracterizarse como un intervalo de lisinas conjugadas (grado de conjugación). La evidencia de la modificación por lisina de la proteína transportadora, debido a uniones covalentes a los polisacáridos, puede obtenerse mediante análisis de aminoácidos usando métodos rutinarios conocidos por los expertos en la materia. La conjugación da como resultado una reducción en el número de restos lisina recuperados, en comparación con el material de partida de proteína transportadora utilizado para generar los materiales conjugados. En una realización preferida, el grado de conjugación del glicoconjugado de la invención está es de 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 realización, el grado de conjugación del glicoconjugado de la invención es de aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 11, aproximadamente 12, aproximadamente 13, aproximadamente 14 o aproximadamente 15. En una realización preferida, el grado de conjugación del glicoconjugado de la invención es de entre 4 y 7. En algunas de dichas realizaciones, la proteína transportadora es CRM197.

Los glicoconjugados de la invención también pueden caracterizarse por la relación (peso/peso) de sacárido a proteína transportadora. En algunas realizaciones, la relación de polisacárido a proteína transportadora en el glicoconjugado (p/p) es de entre 0,4 y 2,0. En algunas de dichas realizaciones, la proteína transportadora es CRM197. Los glicoconjugados y las composiciones inmunogénicas de la invención pueden contener sacárido libre que no está conjugado covalentemente con la proteína transportadora, pero, no obstante, está presente en la composición de glicoconjugado. El sacárido libre puede estar asociado de forma no covalente a (es decir, unido de forma no covalente a, adsorbido a o atrapado en o con) el glicoconjugado.

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

Vacunas de conjugado polisacárido-proteínas multivalentes

En el presente documento también se describen vacunas de polisacáridos multivalentes que comprenden polisacáridos no conjugados o conjugados polisacárido-proteína de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 24F y polisacáridos capsulares de uno o más de *S. pneumoniae* serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 6D, 7B, 7C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18B, 18C, 19A, 19F, 20, 21, 22A, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 27, 28A, 31, 33F, 34, 35A, 35B, 35F y 38 ya sea como polisacáridos libres, un componente de un conjugado polisacárido-proteína o una combinación de los mismos, para proporcionar una vacuna neumocócica multivalente. La composición inmunogénica puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en, polisacáridos capsulares de 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 o 44 serotipos de *S. pneumoniae* conjugados individualmente con una o más proteínas transportadoras. Preferentemente, los sacáridos de un serotipo particular no están conjugados con más de una proteína transportadora.

Después de purificar los glicoconjugados individuales, se componen para formular la composición inmunogénica de la presente invención. Estos conjugados neumocócicos se preparan mediante procesos separados y se formulan en masa en una formulación de dosificación única.

Composiciones farmacéuticas/de vacuna

La presente invención proporciona además composiciones, incluyendo composiciones farmacéuticas, inmunogénicas y de vacuna, que comprenden, consisten esencialmente en o, como alternativa, consisten en cualquiera de las combinaciones de polisacáridos de serotipos de *S. pneumoniae* descritas anteriormente junto con un portador farmacéuticamente aceptable y un adyuvante.

La formulación de los conjugados polisacárido-proteína de la presente invención se puede lograr usando métodos reconocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden formular conjugados neumocócicos individuales con un vehículo fisiológicamente aceptable para preparar la composición. Como ejemplos de dichos vehículos se incluyen, pero sin limitación, agua, solución salina tamponada, polioles (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido) y soluciones de dextrosa.

La composición de la vacuna puede formularse en tampón de L-histidina con cloruro de sodio.

Como se define en el presente documento, un "adyuvante" es una sustancia que sirve para potenciar la inmunogenicidad de una composición inmunogénica. Un adyuvante inmunológico puede potenciar una respuesta inmunitaria a un antígeno que es débilmente inmunogénico cuando se administra solo, por ejemplo, que no induce títulos de anticuerpos o que induce títulos de anticuerpos débiles o una respuesta inmunitaria mediada por células, aumentar los títulos de anticuerpos contra el antígeno y/o reduce la dosis del antígeno eficaz para lograr una respuesta inmunitaria en el individuo. Por lo tanto, a menudo se proporcionan adyuvantes para reforzar la respuesta inmunitaria y son muy conocidos por el experto en la materia. Los adyuvantes adecuados para mejorar la eficacia de la composición incluyen, pero sin limitación:

- (1) sales de aluminio (alumbre), tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio, etc.;
- (2) formulaciones de emulsión de aceite en agua (con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos tales como péptidos de muramilo (que se definen a continuación a continuación) 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 escualeno al 5 %, Tween 80 al 0,5 % y Span 85 al 0,5 % (que contiene opcionalmente diversas cantidades de MTP-PE) formulado en partículas submicrónicas usando un microfluidificador tal como el microfluidificador Modelo 110Y (Microfluidics, Newton, MA), (b) SAF, que contiene escualeno al 10 %, Tween 80 al 0,4 %, Pluronic al 5 %-polímero bloqueado L121 y thr-MDP, ya sea microfluidificados en una emulsión submicrónica o agitados con formación de vórtice para generar una emulsión de mayor tamaño de partículas, (c) sistema adyuvante Ribi™ (RAS), (Corixa, Hamilton, MT) que contiene escualeno al 2 %, Tween 80 al 0,2 % 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 de los EE. UU. N.º 4.912.094, dimicolato de trehalosa (TDM) y cadena principal de la pared celular (CWS, por sus siglas en inglés), preferentemente MPL+CWS (Detox™); y (d) una ISA Montanida;
- (3) adyuvantes de saponina, tales como Quil A o STIMULON™ QS-21 (Antigenics, Framingham, MA) (véase, por ejemplo, la Patente de los EE. UU. N.º 5.057.540) o partículas generadas a partir de los mismos, tales como ISCOM (complejos inmunoestimulantes formados por la combinación de colesterol, saponina, fosfolípidos y proteínas anfipáticas) e Iscomatrix® (que tiene esencialmente la misma estructura que un ISCOM, pero sin la proteína);
- (4) lipopolisacáridos bacterianos, análogos sintéticos del lípido A tales como compuestos de aminoalquilglucosaminafosfato (AGP), o derivados o análogos de los mismos, que están disponibles en Corixa, y que se describen en la Patente de los EE. UU. N.º 6.113.918; uno de dichos AGP es 2-2-Desoxi-4-O-fosfono-3-O-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoilamino]-b-D-glucopiranosido de [(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoilamino]etilol, que también se conoce como 529 (anteriormente conocido como RC529), que se formula como una forma acuosa o como una emulsión estable;
- (5) polinucleótidos sintéticos tales como oligonucleótidos que contienen uno o más motivos CpG (Patente de los EE. UU. 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 (GM-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF), moléculas coestimuladoras B7-1 y B7-2, etc.; y
- (7) complemento, tal como un trímero del componente del complemento C3d.

El adyuvante puede ser una mezcla de 2, 3 o más de los adyuvantes anteriores, por ejemplo, SBAS2 (una emulsión de aceite en agua que también contiene monofosforil lípido A 3-desacilado y QS21).

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

El adyuvante puede ser una sal de aluminio. El adyuvante de sal de aluminio puede ser una vacuna precipitada con alumbre o una vacuna adsorbida en alumbre. Los adyuvantes de sal de aluminio son bien conocidos en 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). La sal de aluminio incluye, pero sin limitación, alúmina hidratada, hidrato de alúmina, trihidrato de alúmina (ATH), hidrato de aluminio, trihidrato de aluminio, Alhydrogel®, Superfós, Amphogel®, hidróxido de aluminio (III), 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 fabrica combinando cloruro de aluminio y fosfato de sodio en una relación volumétrica 1:1 para precipitar hidroxifosfato de aluminio. Después del proceso de combinación, el material se reduce de tamaño con un mezclador de alta cizalla para conseguir una distribución de tamaño de partícula monodispersada. Después, el producto se diafiltra contra solución salina fisiológica y se esteriliza con vapor.

Un Al(OH)₃ disponible en el mercado (por ejemplo, Alhydrogel® o Superfós de Dinamarca/Accurate Chemical and Scientific Co., Westbury, NY) puede usarse para adsorber proteínas. La adsorción de proteínas puede depender, del pI (pH isoelectrico) de la proteína y el pH del medio. Una proteína con un pI más bajo se adsorbe al ion aluminio cargado positivamente con más fuerza que una proteína con un pI más alto. Las sales de aluminio pueden establecer un depósito de Ag que se libera lentamente durante un período de 2 a 3 semanas, estar implicadas en la

activación inespecífica de macrófagos y la activación del complemento, y/o estimular el mecanismo inmunitario innato (posiblemente a través de la estimulación del ácido úrico). Véase, por ejemplo, Lambrecht *et al.*, 2009, *Curr Opin Immunol* 21:23.

Los conjugados acuosos monovalentes en masa normalmente se combinan entre sí y se diluyen. Una vez diluido, el lote se filtra de forma estéril. Se añade asépticamente adyuvante de fosfato de aluminio para alcanzar una concentración final de 4 µg/ml para todos los serotipos de *S. pneumoniae* excepto el serotipo 6B, que se diluye hasta un objetivo de 8 µg/ml y una concentración final de aluminio de 250 µg/ml. El lote formulado y adyuvado se cargará en viales o jeringas.

El adyuvante puede ser una secuencia de nucleótidos que contiene CpG, por ejemplo, un oligonucleótido que contiene CpG, en particular, un oligodesoxinucleótido que contiene CpG (CpG ODN). El adyuvante puede ser ODN 1826, que puede adquirirse en Coley Pharmaceutical Group.

"Nucleótido que contiene CpG", "Oligonucleótido que contiene CpG", "Oligonucleótido de CpG", y expresiones similares se refieren a una molécula de nucleótidos de 6-50 nucleótidos de longitud que contiene un resto CpG no metilado. Véase, por ejemplo, Wang *et al.*, 2003, *Vaccine* 21:4297. Se prevé cualquier otra definición de los términos aceptada en la técnica. Los oligonucleótidos que contienen CpG incluyen oligonucleótidos modificados que usan cualquier unión internucleosídica sintética, base modificada y/o azúcar modificada.

Los métodos para el uso de oligonucleótidos CpG son bien conocidos en la técnica y se describen, 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.

Administración/dosificación

Las composiciones y formulaciones de la presente invención pueden usarse para proteger o tratar a un ser humano susceptible de infección, por ejemplo, una infección neumocócica, por medio de la administración de la vacuna mediante vía sistémica o mucosa. En una realización, la presente divulgación proporciona un método de inducción de una respuesta inmunitaria a un conjugado de polisacárido capsular de *S. pneumoniae*, que comprende administrar a un ser humano una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunogénica de la presente invención. En otra realización, la presente divulgación proporciona un método de vacunación de a un ser humano contra una infección neumocócica, que comprende la etapa de administrar al ser humano una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunogénica de la presente invención.

Las cantidades óptimas de los componentes de una vacuna particular pueden determinarse mediante estudios convencionales que implican la observación de respuestas inmunitarias apropiadas en sujetos. Por ejemplo, en otra realización, la dosificación para la vacunación humana se determina mediante extrapolación de estudios en animales a datos de seres humanos. En otra realización, la dosificación se determina empíricamente.

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

Los métodos de la divulgación pueden usarse para la prevención y/o reducción de síndromes clínicos primarios provocados por microbios, por ejemplo, *S. pneumoniae*, incluyendo tanto infecciones invasivas (meningitis, neumonía y bacteriemia) como infecciones no invasivas (otitis media aguda y sinusitis).

La administración de las composiciones de la invención puede incluir uno o más de: inyección a través de las vías intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea; o la administración por vía mucosa al sistema oral/alimentario, los tractos respiratorio o genitourinario. En una realización, para el tratamiento de la neumonía u otitis media, se usa la administración intranasal (ya que puede evitarse de manera más eficaz el transporte nasofaríngeo de neumococos, atenuando de este modo la infección en su fase más temprana).

La cantidad de conjugado en cada dosis de vacuna se selecciona como una cantidad que induzca una respuesta inmunoprotectora sin efectos adversos significativos. Dicha cantidad puede variar dependiendo del serotipo neumocócico. En general, para conjugados a base de polisacáridos, cada dosis comprenderá de 0,1 a 100 µg de cada polisacárido, particularmente de 0,1 a 10 µg, y más particularmente de 1 a 5 µg. Por ejemplo, cada dosis puede comprender 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500 o 750 ng o 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7,5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 20, 22, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 µg de cada polisacárido.

Las cantidades óptimas de los componentes de una vacuna particular pueden determinarse mediante estudios convencionales que implican la observación de respuestas inmunitarias apropiadas en sujetos. Por ejemplo, en otra realización, la dosificación para la vacunación humana se determina mediante extrapolación de estudios en animales a datos de seres humanos. En otra realización, la dosificación se determina empíricamente.

En una realización, la dosis de la sal de aluminio es de 10, 15, 20, 25, 30, 50, 70, 100, 125, 150, 200, 300, 500 o 700 µg, o de 1, 1,2, 1,5, 2, 3, 5 mg o más. En otra realización más, la dosis de sal de aluminio descrita anteriormente es por µg de proteína recombinante.

- 5 En general, cada dosis de 0,5 ml se formula para contener: 2 µg de cada polisacárido de *S. pneumoniae*, excepto el polisacárido del serotipo 6B a 4 µg; aproximadamente 32 µg de proteína transportadora CRM197 (por ejemplo, 32 µg ± 5 µg, ± 3 µg, ± 2 µg o ± 1 µg); 0,125 mg de adyuvante de aluminio elemental (0,5 mg de fosfato de aluminio); y cloruro de sodio y tampón de L-histidina. La concentración de cloruro de sodio es de aproximadamente 150 mM (por ejemplo, 150 mM ± 25 mM, ± 20 mM, ± 15 mM, ± 10 mM o ± 5 mM) y tampón de L-histidina aproximadamente 20 mM (por ejemplo, 20 mM ± 5 mM, ± 2,5 mM, ± 2 mM, ± 1 mM o ± 0,5 mM).

- De acuerdo con cualquiera de los métodos de la presente divulgación y en una realización, el sujeto es humano. En determinadas realizaciones, el paciente humano es un lactante (menor de 1 año de edad), niño pequeño (de aproximadamente 12 a 24 meses) o niño de corta edad (aproximadamente de 2 a 5 años). En otras realizaciones, el
15 paciente humano es un paciente anciano (> 65 años). Las composiciones de la presente invención también son adecuadas para su uso con niños mayores, adolescentes y adultos (por ejemplo, de 18 a 45 años o de 18 a 65 años).

- En una realización de los métodos de la presente divulgación, una composición de la presente invención se
20 administra como una única inoculación. En otra realización, la composición se administra dos veces, tres veces o cuatro veces o más, separadas de forma adecuada. Por ejemplo, la composición puede administrarse a intervalos de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses o cualquier combinación de los mismos. Se puede seguir el calendario de inmunización designado para vacunas neumocócicas. Por ejemplo, el programa rutinario para bebés y niños pequeños contra la enfermedad invasiva provocada por *S. pneumoniae* es de 2, 4, 6 y 12-15 meses de edad. Por lo tanto, en una
25 realización preferida, la composición se administra en una serie de 4 dosis a los 2, 4, 6 y 12-15 meses de edad.

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

30 Formulaciones

- Las composiciones de la invención pueden administrarse a un sujeto mediante uno o más métodos conocidos por un experto en la materia, tal como por vía parenteral, por vía transmucosa, por vía transdérmica, por vía intramuscular,
35 por vía por vía intravenosa, por vía intradérmica, por vía intranasal, por vía subcutánea, por vía intraperitoneal y formularse en consecuencia.

- En una realización, las composiciones de la presente invención se administran a través de inyección epidérmica, inyección intramuscular, inyección intravenosa, intraarterial, subcutánea o inyección intrarrespiratoria en la mucosa
40 de una preparación líquida. Las formulaciones líquidas para inyección incluyen soluciones y similares.

La composición de la invención puede formularse como viales de dosis única, viales multidosis o como jeringas precargadas.

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

- 50 Los portadores farmacéuticamente aceptables para formulaciones líquidas son soluciones acuosas o no acuosas, suspensiones, emulsiones o aceites. Son ejemplos de disolventes no acuosos propilenglicol, polietilenglicol y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, incluyendo solución salina y medio tamponado. Son ejemplos de aceites aquellos de origen animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de cacahuate, aceite de soja, aceite de
55 oliva, aceite de girasol, aceite de hígado de pescado, otro aceite marino o un lípido de leche o huevos.

- La composición farmacéutica puede ser isotónica, hipotónica o hipertónica. Sin embargo, a menudo se prefiere que una composición farmacéutica para infusión o inyección sea esencialmente isotónica cuando se administra. Por lo tanto, para el almacenamiento, la composición farmacéutica puede ser preferentemente isotónica o hipertónica. Si la
60 composición farmacéutica es hipertónica para el almacenamiento, puede diluirse para convertirla 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 hidrato de carbono. Los ejemplos de agentes isotónicos iónicos incluyen, pero sin limitación, NaCl, CaCl₂, KCl y
65 MgCl₂. Los ejemplos de agentes isotónicos no iónicos incluyen, pero sin limitación, sacarosa, trehalosa, manitol, sorbitol y glicerol.

También se prefiere que al menos un aditivo farmacéuticamente aceptable sea un tampón. Para algunos fines, por ejemplo, cuando la composición farmacéutica está destinada a infusión o inyección, a menudo es deseable que la composición comprenda un tampón, que sea capaz de tamponar una solución a un pH en el intervalo de 4 a 10, tal como de 5 a 9, por ejemplo, de 6 a 8.

El tampón puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en tampón de Tris, acetato, glutamato, lactato, maleato, tartrato, fosfato, citrato, carbonato, glicinato, L-histidina, glicina, succinato y trietanolamina.

El tampón puede además seleccionarse, por ejemplo, de tampones compatibles con la USP para su uso parenteral, en particular, cuando la formulación farmacéutica es para su uso parenteral. Por ejemplo, el tampón puede seleccionarse del grupo que consiste en ácidos monobásicos tales como acético, benzoico, glucónico, glicérico y láctico; ácidos dibásicos tales como aconítico, adípico, ascórbico, carbónico, glutámico, málico, succínico y tartárico, ácidos polibásicos tales como cítrico y fosfórico; y bases tales como amoníaco, dietanolamina, glicina, trietanolamina y Tris.

Los vehículos parenterales (para inyección subcutánea, intravenosa, intraarterial o intramuscular) incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, Ringer lactado y aceites no volátiles. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de líquidos y nutrientes, reponedores de electrolitos tales como los basados en dextrosa de Ringer y similares. Los ejemplos son líquidos estériles tales como agua y aceites, con o sin la adición de un tensioactivo y otros adyuvantes farmacéuticamente aceptables. En general, son portadores líquidos preferidos agua, solución salina, dextrosa acuosa y soluciones de azúcar relacionadas, glicoles tales como propilenglicoles o polietilenglicol, Polisorbato 80 (PS-80), Polisorbato 20 (PS-20) y Poloxámero 188 (P188), particularmente para soluciones inyectables. Son ejemplos de aceites aquellos de origen animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite de oliva, aceite de girasol, aceite de hígado de pescado, otro aceite marino o un lípido de leche o huevos.

Las formulaciones también pueden contener un tensioactivo. Los tensioactivos preferidos incluyen, pero sin limitación: los tensioactivos de ésteres de polioxietilensorbitano (habitualmente denominados los Tweens), especialmente PS-20 y PS-80; copolímeros de óxido de etileno (OE), óxido de propileno (OP) y/u óxido de butileno (OB), comercializados con el nombre comercial DOWFAX™, tales como copolímeros de bloques de EO/PO lineales; octoxinóles, que pueden variar en el número de grupos etoxi (oxi-1,2-etanodiilo) repetidos, siendo de particular interés el octoxinol-9 (Triton X-100 o t-octilfenoxipolietoxietanol); (octilfenoxi)polietoxietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfolípidos tales como fosfatidilcolina (lecitina); etoxilatos de nonilfenol, tales como la serie Tergitol™ NP; éteres grasos de polioxietileno derivados de los alcoholes laurílico, cetílico, estearílico y oleílico (conocidos como tensioactivos Brij), tales como trietilenglicol monolauril éter (Brij 30); y ésteres de sorbitano (conocidos habitualmente como SPAN), tales como trioleato de sorbitano (Span 85) y monolaurato de sorbitano. Un tensioactivo preferido para incluir en la emulsión es PS-20 o PS-80.

Pueden usarse mezclas de tensioactivos, por ejemplo, mezclas de PS-80/Span 85. También es adecuada una combinación de un éster de polioxietilensorbitano tal como monooleato de polioxietilensorbitano (PS-80) y un octoxinol tal como t-octilfenoxipolietoxietanol (Triton X-100). Otra combinación útil comprende laureth 9 más un éster de polioxietilensorbitano y/o un octoxinol.

Son cantidades preferidas de tensioactivos: ésteres de polioxietilensorbitano (tales como PS-80) del 0,01 al 1 % p/v, en particular aproximadamente el 0,1 % p/v; octil o nonilfenoxipolioxietanoles (tales como Triton X-100 u otros detergentes de la serie Triton) del 0,001 al 0,1 % p/v, en particular del 0,005 al 0,02 % p/v; éteres de polioxietileno (tales como laureth 9) del 0,1 al 20 % p/v, preferentemente del 0,1 al 10 % p/v y en particular del 0,1 al 1 % p/v o aproximadamente del 0,5 % p/v.

Es posible que sea necesario optimizar la elección del tensioactivo para diferentes medicamentos y principios activos. Para vacunas multivalentes que contienen 15 o más serotipos de polisacáridos de *S. pneumoniae*, se prefieren PS-20 y P188. La elección de la química utilizada para preparar el conjugado también puede influir en la estabilización de la formulación. En particular, como se ejemplifica a continuación, los conjugados polisacárido neumocócico-proteína preparados en un disolvente acuoso o DMSO y combinados en una composición multivalente muestran diferencias significativas en la estabilidad dependiendo de los sistemas tensioactivos particulares utilizados para la formulación.

Para las formulaciones descritas en el presente documento, un poloxámero tiene generalmente un peso molecular en el intervalo de 1.100 Da a 17.400 Da, de 7.500 Da a 15.000 Da o de 7.500 Da a 10.000 Da. El poloxámero puede seleccionarse de poloxámero 188 o poloxámero 407. La concentración final del poloxámero en las formulaciones de la invención es de 0,001 al 5 % p/v o del 0,025 al 1 % p/v. Un sistema tensioactivo que comprende un poloxámero debe comprender además un poliol. En determinados aspectos, el poliol es propilenglicol y tiene una concentración final del 1 al 20 % p/v. En determinados aspectos, el poliol es polietilenglicol 400 y tiene una concentración final del 1 al 20 % p/v.

Son polioles adecuados para las formulaciones los polioles poliméricos, particularmente poliéter dioles incluyendo, pero sin limitación, propilenglicol y polietilenglicol, polietilenglicol monometil éteres. El propilenglicol está disponible en un intervalo de pesos moleculares del monómero de -425 Da a -2700 Da. El polietilenglicol y el polietilenglicol monometil éter también están disponibles en un intervalo de pesos moleculares que varían de ~200 Da a -35 000 Da, incluyendo, pero sin limitación, PEG200, PEG300, PEG400, PEG1000, PEG MME 550, PEG MME 600, PEG MME 2000, PEG MME 3350 y PEG MME 4000. Un polietilenglicol preferido es el polietilenglicol 400. La concentración final del poliol en las formulaciones puede ser del 1 al 20 % p/v o del 6 al 20 % p/v.

La formulación también contiene una solución salina de pH tamponado. El tampón, por ejemplo, puede seleccionarse del grupo que consiste en Tris, acetato, glutamato, lactato, maleato, tartrato, fosfato, citrato, carbonato, glicinato, L-histidina, glicina, succinato, HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetasulfónico), MOPS (ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico), MES (2-(N-morfolino)etanosulfónico) y tampón de trietanolamina. El tampón es capaz de tamponar una solución a un pH en el intervalo de 4 a 10, de 5,2 a 7,5 o de 5,8 a 7,0. En determinados aspectos, el tampón seleccionado del grupo que consiste en fosfato, succinato, L-histidina, MES, MOPS, HEPES, acetato o citrato. El buffer además, por ejemplo, puede seleccionarse de tampones compatibles con la USP para su uso parenteral, en particular, cuando la formulación farmacéutica es para su uso parenteral. Las concentraciones de tampón variarán de 1 mM a 50 mM o de 5 mM a 50 mM. En determinados aspectos, el tampón es L-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, la L-histidina está a una concentración final de 20 mM \pm 2 mM.

Aunque se prefiere la solución salina (es decir, una solución que contenga NaCl), otras sales adecuadas para la formulación incluyen, pero sin limitación, CaCl_2 , KCl y MgCl_2 y combinaciones de los mismos. Pueden usarse agentes isotónicos no iónicos incluyendo, pero sin limitación, sacarosa, trehalosa, manitol, sorbitol y glicerol en lugar de una sal. Los intervalos de sal adecuados incluyen, pero sin limitación, a 25 mM a 500 mM o de 40 mM a 170 mM. En un aspecto, la solución salina es NaCl, opcionalmente presente a una concentración de 20 mM a 170 mM.

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

En otra realización, la composición farmacéutica se administra en un sistema de liberación controlada. Por ejemplo, el agente puede administrarse usando infusión intravenosa, un parche transdérmico, liposomas u otros modos de administración. En otra realización, se usan materiales poliméricos; por ejemplo, en microesferas o en un implante.

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

Métodos analíticos

Análisis de peso molecular y concentración de conjugados usando un ensayo de HPSEC/UV/MALS/RI

Se inyectan muestras de conjugado y se separan mediante cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento (HPSEC). La detección se logra con detectores de ultravioleta (UV), dispersión de luz multiángulo (MALS) e índice de refracción (RI) en serie. La concentración de proteínas se calcula a partir de UV280 usando un coeficiente de inactivación. La concentración de polisacárido se desconvoluciona de la señal de RI (contribuida tanto por la proteína como por el polisacárido) usando los factores dn/dc que son el cambio en el índice de refracción de una solución con un cambio en la concentración de soluto publicado en ml/g. El peso molecular promedio de las muestras se calcula mediante el software Astra (Wyatt Technology Corporation, Santa Bárbara, CA) usando la concentración medida y la información de dispersión de la luz en todo el pico de la muestra. Existen múltiples 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, la expresión "peso molecular", como se usa en toda la memoria descriptiva, es el peso molecular promedio en peso.

Determinación del consumo de lisina en proteínas conjugadas como medida del número de uniones covalentes entre el polisacárido y la proteína transportadora

El análisis de aminoácidos (AAA) AccQ-Tag de Waters se usa para medir el grado de conjugación en muestras de conjugado. Las muestras se hidrolizan mediante hidrólisis ácida en fase de vapor en la estación de trabajo Eldex, para romper las proteínas transportadoras en los aminoácidos que las componen. Los aminoácidos libres se derivatizan usando carbamato de 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidilo (AQC). Después, las muestras derivatizadas se analizan usando UPLC con detección UV en una columna C18. La concentración promedio de proteína se obtiene usando aminoácidos representativos distintos de la lisina. El consumo de lisina durante la conjugación (es decir, la pérdida de lisina) está determinado por la diferencia entre la cantidad medida promedio de lisina en el conjugado y la cantidad esperada de lisina en la proteína de partida.

Ensayos de polisacáridos libres

El polisacárido libre (es decir, el polisacárido que no está conjugado con CRM197) en la muestra de conjugado se mide precipitando en primer lugar la proteína libre y los conjugados con desoxicolato (DOC) y ácido clorhídrico. Después, los precipitados se filtran y se analiza la concentración de polisacárido libre en los filtrados mediante HPSEC/UV/MALS/RI. El polisacárido libre se calcula como un porcentaje del polisacárido total medido por HPSEC/UV/MALS/RI.

Ensayos de proteínas libres

Se separan polisacárido libre, conjugado polisacárido-CRM197 y CRM197 libre en las muestras de conjugado mediante electroforesis capilar en modo de cromatografía electrocinética micelar (MEKC). Brevemente, las muestras se mezclan con tampón de ejecución de MEKC que contiene borato 25 mM, SDS 100 mM, pH 9,3 y se separan en un capilar de sílice fundida desnudo preacondicionado. La separación se controla a 200 nm y la CRM197 libre se cuantifica con una curva patrón de CRM197. Los resultados de proteína libre se publican como un porcentaje del contenido total de proteína determinado mediante el procedimiento HPSEC/UV/MALS/RI.

Los siguientes ejemplos ilustran pero no limitan la invención.

Ejemplos

EJEMPLO 1: Preparación de polisacáridos capsulares de *S. pneumoniae*

Son bien conocidos en la técnica métodos de cultivo de neumococos. Véase, por ejemplo, Chase, 1967, *Methods of Immunology and Immunochemistry* 1:52. También son conocidos en la técnica métodos para preparar polisacáridos capsulares neumocócicos. Véase, por ejemplo, la Patente europea N.º EP 0 497 524 B 1. El proceso que se describe a continuación sigue en general el método descrito en la patente europea n.º EP 0 497 524 B1 y es aplicable en general a todos los serotipos de neumococo, excepto cuando se modifique específicamente.

Se obtuvieron aislados del subtipo neumocócico 24F de la Colección de Cultivos Merck. Cuando es necesario, los subtipos pueden diferenciarse sobre la base de la reacción de Quelling usando antisueros específicos. Véase, por ejemplo, la Patente de los EE. UU. N.º 5.847.112. Los aislados obtenidos se aislaron clonalmente mediante la siembra en serie en dos etapas en placas de agar que consistían en un medio libre de componentes animales que contenía peptona de soja, extracto de levadura y glucosa sin hemina. Los aislados clonales de cada serotipo se expandieron posteriormente en cultivo líquido usando medios libres de componentes animales 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 premaestras.

La producción de cada serotipo de polisacárido neumocócico consistió en una fermentación de expansión celular y producción por lotes, seguida de una inactivación química previa a la purificación posterior. Se expandió un vial de banco de células descongelado de cada serotipo usando un matraz agitador o un frasco de cultivo que contenía un medio de crecimiento sin componentes animales 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 realizó en un matraz o frasco agitado sellado para minimizar el intercambio de gases con control de temperatura y agitación. Una vez alcanzada la densidad de cultivo especificada, medida por densidad óptica a 600 nm, una porción del cultivo de expansión celular se transfirió a un fermentador de producción que contenía un medio de cultivo preesterilizado sin componentes animales 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, ya que no se utilizó rociado.

La fermentación discontinua se interrumpió mediante la adición de un agente químico inactivador, fenol, cuando la glucosa estaba casi agotada. Se añadió fenol puro a una concentración final del 0,8 - 1,2 % para inactivar las células y liberar el polisacárido capsular de la pared celular. La inactivación primaria se produce durante un tiempo determinado dentro del fermentador, donde se siguen controlando la temperatura y la agitación. Después de la inactivación primaria, el lote se transfirió a otro recipiente donde se mantuvo durante un tiempo adicional especificado a temperatura y agitación controladas para su completa inactivación. Esto se confirmó mediante técnicas de recubrimiento microbiano o mediante la verificación de la concentración de fenol y el tiempo especificado. A continuación, se purificó el caldo inactivado.

Purificación de Ps

La purificación del polisacárido neumocócico consistió en varias operaciones de centrifugación, filtración en profundidad, concentración/diafiltración y etapas de precipitación. Todos los procedimientos se realizaron a temperatura ambiente, a menos que se especifique lo contrario.

El caldo inactivado de los cultivos fermentadores de *S. pneumoniae* se floculó con un polímero catiónico (como BPA-

1000, Petrolita "Tretolite" y "Spectrum 8160" y poli(etilenimina), "Millipore pDADMAC"). Los polímeros catiónicos se unieron a la proteína impureza, ácidos nucleicos y residuos celulares. Después de la etapa de floculación y un período de envejecimiento, los sólidos floculados se eliminaron mediante centrifugación y múltiples etapas de filtración en profundidad. El caldo clarificado se concentró y se diafiltró usando un filtro MWCO (punto de corte de peso molecular) de 100 kDa a 500 kDa. La diafiltración se realizó con Tris, tampón de $MgCl_2$ y tampón de fosfato de sodio. La diafiltración eliminó el ácido nucleico y las proteínas residuales.

La eliminación adicional de impurezas se logró mediante reprecipitación del polisacárido en acetato de sodio y fenol con alcohol desnaturizado y/o isopropanol. Durante la etapa de precipitación del fenol, se cargaron acetato de sodio en tampón salino de fosfato de sodio y fenol (fenoles licuados o fenoles sólidos) en el retenido diafiltrado. Después, se realizó el fraccionamiento alcohólico del polisacárido en dos etapas. En la primera etapa se añadió a la preparación un bajo porcentaje de alcohol para precipitar los residuos celulares y otras impurezas no deseadas, mientras que el polisacárido en bruto permanecía en solución. Las impurezas se eliminaron mediante centrifugación seguida de una etapa de filtración en profundidad. Después, se recuperó el polisacárido de la solución añadiendo isopropanol o alcohol desnaturizado al lote. El sedimento de polisacáridos precipitado se recuperó por centrifugación, se trituró y se secó en forma de polvo y se almacenó congelado a $-70^{\circ}C$.

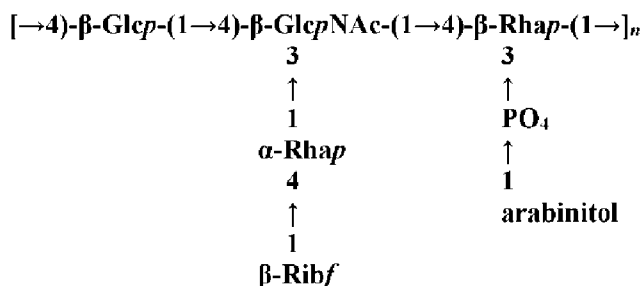
EJEMPLO 2: Análisis de estructura por RMN de los polisacáridos

La estrategia para determinar la estructura del polisacárido implicó un proceso de múltiples etapas realizado sustancialmente como se describe en Abeygunawardana *et al.*, *Determination of the Chemical Structure of Complex Polysaccharides by Heteronuclear NMR Spectroscopy in Advances in Biophysical Chemistry* 1993, Vol 3, páginas 199-249, JAI Press Inc. Los polisacáridos purificados se examinaron usando técnicas convencionales de RMN 1D y 2D. Por último, los polisacáridos se examinaron para detectar la presencia de fosfato usando RMN ^{31}P .

Las asignaciones de los restos de monosacáridos se realizaron mediante 1H - 1H COSY, COZY homonuclear de filtrado cuántico doble y espectroscopía de correlación total (TOCSY). Los desplazamientos químicos de ^{13}C se asignaron mediante espectroscopía de coherencia cuántica única heteronuclear (HSQC) y una combinación HSQC-TOCSY. Se usó HSQC editado por multiplicidad para distinguir los grupos metileno de metino. Las uniones entre restos se determinaron a través de una combinación de espectroscopía HMBC y NOESY. La configuración anomérica de los restos se determinó a partir de los valores de desplazamientos químicos anoméricos de protones y carbonos, $^3J_{H1,H2}$ y $^1J_{H1,C1}$. La configuración anomérica de los anillos de furanosa es difícil de evaluar a partir de valores de $^3J_{H1,H2}$ y $^1J_{H1,C1}$, por lo tanto, para esta determinación se usaron acoplamientos de largo alcance de protones del anillo del carbono anomérico.

La espectroscopía de RMN de fósforo 1D indicó que los polisacáridos del serotipo 24F contenían fósforo en la estructura. La asignación del sitio de unión del fósforo se realizó a través de espectroscopía HMBC P^1H - ^{31}P sobre polisacárido purificado (Fig. 5A) y peryodato oxidado (Fig. 5B).

Basándose en los datos de RMN de las Fig. 2-5, se determinó que la estructura para el polisacárido de *S. pneumoniae* serotipo 24F era el siguiente:



en donde n representa el número de unidades de repetición que constituyen el polisacárido. Véase también la Fig. 1A.

Los restos de azúcar incluyen ramnosa (Rha), ribosa (Rib), glucosa (Glc) y arabinitol. Uno de los restos de glucosa está N-acetilado. La ribosa se encuentra en forma de furanosa.

Las letras en cursiva (*p* y *f*) se refieren a piranosa (un anillo cerrado que consiste en seis átomos) y furanosa (un anillo cerrado que consiste en cinco átomos).

α y β se refieren a la configuración del protón unido al carbono anomérico de la unidad de azúcar. El carbono anomérico siempre es el número 1 cuando se marca el átomo de carbono en una unidad de azúcar (por lo general del 1 al 6). α significa que el protón anomérico está en la posición ecuatorial en la estructura 3D. β significa que el protón anomérico está en posición axial.

Los números asociados a las flechas se refieren a cómo están conectadas entre sí las unidades de azúcar individuales. Por ejemplo, la nomenclatura α -Rhap-(1→3)- α -Glc β - significa que el carbono número 1 de la ramnosa está unido al carbono número 3 de la glucosa (β significa que ambos son anillos de piranosa).

Identificación del sitio de activación principal del polisacárido de *S. pneumoniae* serotipo 24F

Se encontró que el sitio de activación principal en *S. pneumoniae* serotipo 24F estaba en el segundo carbono de la cadena lateral de arabinitol.

El polisacárido oxidado del serotipo 24F se liofilizó y después se redisolvió con óxido de deuterio para el análisis por RMN. Los experimentos de RMN se realizaron a 600 MHz a una temperatura de la sonda de 37 °C usando una sonda enfriada criogénicamente. Se adquirió un espectro de protones unidimensional (1D) usando un pulso de 90 grados con 16 transitorios y un retraso de 10 segundos entre pulsos (incluyendo 3 segundos de tiempo de obtención). Los datos de gradiente COZY y TOCSY se adquirieron con 4 y 16 transitorios (respectivamente) en la primera dimensión y 512 incrementos en la segunda dimensión. Se obtuvo 1D TOCSY, centrado en el triplete a 5,19 ppm, con 1024 transitorios con un tiempo de reciclaje de 10 segundos (incluyendo 3 segundos de tiempo de obtención) y un tiempo de mezcla de 90 ms. Se adquirió un gHSQCAD editado por multiplicidad con 64 transitorios y 512 incrementos.

En comparación con el polisacárido no activado, el espectro de protones 1D mostró una señal adicional (triplete) en la región anomérica a 5,19 ppm. Los datos de gCOSY y TOCSY mostraron un pico cruzado desde la señal de 5,19 ppm a una señal de 3,86 ppm. El 1D TOCSY con banda selectiva centrada en 5,19 ppm mostró solamente una correlación única con un triplete en 3,86 ppm (Figura 6). Los datos de gHSQCAD proporcionaron desplazamientos químicos de carbono de 91,13 ppm (señal a 5,19 ppm) y 70,79 ppm (señal a 3,86 ppm). El desplazamiento químico de carbono a 91,13 ppm está ligeramente hacia arriba de donde normalmente se observan señales anoméricas que indican que se trata de un aldehído hidratado. La otra señal a 70,69 ppm se identificó como metileno (los carbonos de metileno tienen una fase opuesta a los carbonos de metino y metilo en el experimento gHSQCAD editado por multiplicidad; Figura 7). Estos datos indican que el protón en 5,19 ppm (del aldehído hidratado) es adyacente al grupo metileno (3,86 ppm de protón y 70,69 ppm de carbono). El único lugar donde esto podría ocurrir, basándose en la estructura del polisacárido 24F, es en la cadena lateral de arabinitol en el carbono 2.

La formación de un aldehído predominantemente en el segundo carbono fue sorprendente porque requiere una escisión selectiva de los carbonos 2,3 con dioles vecinales o series continuas preferidas de oxidación en carbonos de mayor número con dioles vecinales (o aldehído) hasta la oxidación final en el 2.º carbono del azúcar arabinitol.

EJEMPLO 3: Conjugación del polisacárido de *S. pneumoniae* serotipo 24F con CRM197 usando aminación reductora en dimetilsulfóxido

El polisacárido se disolvió, se dimensionó a una masa molecular diana, se activó químicamente y se intercambió el tampón por ultrafiltración. El polisacárido activado y la CRM197 purificada se liofilizaron individualmente y se redisolviaron en dimetilsulfóxido (DMSO). Después, las soluciones disueltas de nuevo de polisacárido y CRM197 se combinaron y se conjugaron como se describe a continuación. El conjugado resultante se purificó mediante ultrafiltración antes de una filtración final de 0,2 micrómetros. Se controlaron varios parámetros de proceso dentro de cada etapa, tales como pH, temperatura, concentración y tiempo para producir conjugados con los atributos deseados.

Reducción del tamaño de los polisacáridos y oxidación

El polvo de Ps capsular neumocócico purificado se disolvió en agua y se filtró a 0,45 micrómetros. El tamaño del polisacárido disuelto se redujo mediante hidrólisis ácida añadiendo ácido acético hasta 200 mM, incubando a 92 °C durante 50 minutos, después neutralizando mediante la adición de tampón fosfato de potasio frío a pH 7 hasta 400 mM.

El polisacárido de tamaño reducido se concentró y se diafiltró frente a agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial de NMWCO de 5.

Después, la solución de polisacáridos se ajustó a 22 °C y pH 5 con un tampón de acetato de sodio para minimizar la reducción del tamaño de los polisacáridos debida a la activación. La activación del polisacárido se inició con la adición de una solución 100 mM de metaperyodato de sodio. El metaperyodato de sodio añadido fue 0,18-0,21 moles de metaperyodato de sodio por mol de unidad de repetición de polisacárido para conseguir un nivel diana de activación de polisacárido (moles de aldehído por mol de unidad de repetición de polisacárido). La reacción de oxidación transcurrió durante 2 horas a 22 °C.

El producto activado se diafiltró frente a fosfato de potasio 10 mM, pH 6,4 seguido de diafiltración frente a agua usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial de NMWCO de 5 kDa. La ultrafiltración se realizó a 2-

8 °C.

Conjugación de polisacáridos con CRM197

- 5 La CRM197 purificada, obtenida a través de la expresión en *Pseudomonas fluorescens* como se ha descrito previamente (documento WO 2012/173876 A1), se diafiltró frente a fosfato 2 mM, tampón de pH 7,0 usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial de NMWCO de 5 kDa y filtrado de 0,2 micrómetros.

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

- 15 Las soluciones formuladas de Ps y CRM197 se liofilizaron individualmente. Los materiales liofilizados de Ps y CRM197 se redisolviéron individualmente en volúmenes iguales de DMSO. La solución de polisacáridos se adicionó con cloruro de sodio a una concentración final de 20-50 mM. Las soluciones de polisacárido y CRM197 se combinaron para conseguir una concentración de polisacárido de 1,4-1,5 g de Ps/l (gramos de polisacárido/litro) y una relación en masa de polisacárido a CRM197 de 1,5. La relación en masa se seleccionó para controlar la relación de polisacárido con respecto a CRM197 en el conjugado resultante. Se añadió cianoborohidruro de sodio (1 mol por mol de unidad de repetición de polisacárido) y la conjugación transcurrió durante 2 horas a 22 °C.

- 20 *Reducción con borohidruro de sodio*

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

Filtración final y almacenamiento de producto

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

- 35 El lote retenido se filtró a 0,2 micrómetros y después se diluyó con histidina 10 mM adicional en cloruro de sodio 150 mM, pH 7,0 con polisorbato 20 al 0,015 % (p/v), se dispensó en alícuotas y se congeló a ≤ -60 °C.

La Tabla 1 muestra los atributos para conjugado de polisacárido de *S. pneumoniae* serotipo 24F preparado en DMSO.

- 40 Tabla 1. Atributos de conjugado de polisacárido de *S. pneumoniae* serotipo 24F procedente de conjugación con DMSO

Mw de Ps oxidado	Mw del conjugado	Ps:Pr	Consumo de lisina (mol/mol de CRM197)	Ps libre / Ps total	Proteína libre / Proteína total
100 kD	4875 kD	0,94	7,3	4,4 %	1,4 %
101 kD	3970 kD	0,81	7,9	5,8 %	4,6 %

EJEMPLO 4: Formulación de conjugados monovalentes

- 45 Se prepararon conjugados polisacárido neumocócico-CRM197 como se describe en el Ejemplo 3. El volumen requerido de conjugados en masa necesario para obtener la concentración objetivo de serotipos individuales se calculó basándose en el volumen del lote y la concentración de las concentraciones individuales de polisacáridos en masa. Se combinó conjugado en masa de *S. pneumoniae* serotipo 24F con excipientes, se filtró de forma estéril y se
- 50 añadió a APA en condiciones de mezcla. La concentración final de la vacuna conjugada monovalente de *S. pneumoniae* serotipo 24F fue de 4 µg/ml (p/v de PnP) con histidina 20 mM, NaCl 150 mM, PS-20 al 0,2 % (p/v) y 0,250 mg/ml (p/v de PA) en forma de APA.

EJEMPLO 5: Estudio de inmunogenicidad con conejo blanco de Nueva Zelanda del conjugado monovalente

- 55 La inmunogenicidad de los conjugados monovalentes se evaluó en un modelo de Conejo Blanco de Nueva Zelanda (NZWR, por sus siglas en inglés). Se inmunizaron conejos blancos de Nueva Zelanda adultos (NZWR, n = 3/grupo) por vía intramuscular (IM) con 0,25 ml de la vacuna conjugada monovalente respectiva el día 0 y el día 14 (alternando lados). La vacuna neumocócica monovalente se dosificó a 1 µg de PnP (polisacárido de *S. pneumoniae* serotipo 24F conjugado con CRM197) con 62,5 µg de adyuvante de fosfato de aluminio (APA) por inmunización. Los
- 60 sueros se recolectaron antes del inicio del estudio (preinmunitario) y los días 14 (postdosis 1, PD1) y 28 (postdosis 2, PD2). Los NZWR fueron observados al menos a diario por personal capacitado en el cuidado de animales para

detectar cualquier signo de enfermedad o angustia. Se consideró que las formulaciones de vacunas contenidas en los NZWR eran seguras y bien toleradas. Todos los experimentos con animales se realizaron en estricta conformidad con las recomendaciones de la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud. El protocolo experimental de NZWR fue aprobado por los Comités Institucionales de Cuidado y

Uso de Animales de Merck & Co., Inc (Kenilworth, Nueva Jersey) y Covance (Denver, PA).
Los sueros de NZWR se analizaron en ensayos ELISA para evaluar la inmunogenicidad de IgG usando una concentración de recubrimiento de PnP respectiva de 1-2 mg/ml. El anticuerpo funcional se determinó mediante ensayos de opsonofagocitosis (OPA) basados en protocolos descritos previamente. Véase, por ejemplo, Caro-Aguilar *et al.*, 2017, *Vaccine* 35:865-72 y Burton *et al.*, 2006, *Clin Vaccine Immunol* 13(9): 1004-9.

Se descubrió que las vacunas neumocócicas conjugadas monovalentes de *S. pneumoniae* serotipo 24F eran inmunogénicas en conejos (Figura 8) y generaban anticuerpos funcionales que destruían la cepa bacteriana respectiva (Figura 9).

EJEMPLO 6: Estudio de exposición de ratón a conjugado monovalente

Para verificar la inmunogenicidad de glicoconjugados de *S. pneumoniae* serotipo 24, se sometieron a ensayo en un modelo de exposición de ratones. Se inmunizaron ratones jóvenes (de 6 a 8 semanas de edad) con 0,1 ml de vacuna conjugada monovalente 24F-CRM197 el día 0, el día 14 y el día 28 (n = 10/grupo). Se inmunizaron por vía intraperitoneal (IP) ratones C57BL/6 y ratones Swiss Webster con 0,1 ml inyectados en un sitio. Se inmunizaron ratones CD-1 por vía intramuscular (IM) con 0,05 ml inyectados en dos sitios. La vacuna neumocócica monovalente se dosificó a 0,4 µg de PnP (polisacárido de 24F conjugado con CRM197) con 25 µg de adyuvante de fosfato de aluminio (APA) por inmunización. Los ratones fueron observados al menos a diario por personal capacitado en el

cuidado de animales para detectar cualquier signo de enfermedad o angustia. Se consideró que las formulaciones de vacunas contenidas en los ratones eran seguras y bien toleradas.
El día 52, los ratones se expusieron por vía intratraqueal a *S. pneumoniae* serotipo 24F. Se centrifugaron cultivos de fase exponencial de *S. pneumoniae* se lavaron y se suspendieron en PBS estéril. Los ratones se anestesiaron con isoflurano antes de la exposición. Se colocaron 10⁶ ufc de *S. pneumoniae* en 0,1 ml de PBS en la garganta de ratones colgados en posición vertical por sus incisivos. La aspiración de las bacterias se indujo tirando suavemente de la lengua hacia afuera y tapando las fosas nasales. Los ratones se pesaron a diario y se sacrificaron si la pérdida de peso excedía el 20 % del peso inicial. Se extrajo sangre a las 24 horas, 48 horas y 72 horas para evaluar la bacteriemia. Los ratones fueron observados al menos dos veces al día por personal capacitado en el cuidado de

animales para detectar cualquier signo de enfermedad o angustia. Todos los experimentos con animales se realizaron en estricta conformidad con las recomendaciones de la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud. El protocolo experimental de ratón fue aprobado por el Comité Institucional de Uso y Cuidado de Animales de Merck & Co., Inc.

EJEMPLO 7: Formulación de vacunas neumocócicas conjugadas para estudio polivalente en conejos

Se descubrió que la vacuna neumocócica conjugada monovalente 24F-CRM197 tenía un efecto protector en las tres cepas de ratones después de la exposición a *S. pneumoniae* 24F. Véanse las Figuras 10-12.
Una vacuna neumocócica conjugada multivalente que consiste en diferentes preparaciones de combinación en masa de conjugados (incluyendo las de *S. pneumoniae* serotipos 16F, 23A, 23B, 24F y 31) se preparó usando conjugados polisacárido neumocócico-CRM197 y se formuló en histidina 20 mM, pH 5,8 y cloruro de sodio 150 mM y polisorbato-20 (PS-20) al 0,1 % p/v a 4 µg/ml de cada serotipo para una concentración total de polisacárido de 84 µg/ml. Los conjugados se prepararon conjugando individualmente la proteína CRM197 con tipos de polisacáridos neumocócicos (PnP) (incluyendo los de *S. pneumoniae* serotipos 16F, 23A, 23B, 24F y 31). El volumen requerido de conjugados en masa necesario para obtener la concentración objetivo de serotipos individuales se calculó basándose en el volumen del lote y la concentración de las concentraciones individuales de polisacáridos en masa. Los conjugados individuales se añadieron a una solución de histidina, cloruro de sodio y polisorbato-20 (PS-20) para crear la combinación de conjugados. El recipiente de formulación que contenía la combinación de conjugados se mezcló usando una barra agitadora magnética y se esterilizó por filtración en otro recipiente. Después, las formulaciones se cargaron en jeringas de plástico, jeringas de vidrio o viales y se almacenaron a 2-8 °C.

EJEMPLO 8: Inmunogenicidad de una vacuna neumocócica conjugada multivalente en conejos blancos de Nueva Zelanda

Se inmunizaron por vía intramuscular (IM) conejos blancos de Nueva Zelanda adultos (NZWR, n = 5/grupo) con 0,5 ml de la vacuna neumocócica conjugada 21-valente descrita en el Ejemplo 7 el día 0 y el día 14 (alternando lados). La vacuna neumocócica PCV21 se dosificó a 2 µg de cada conjugado de PnPs por inmunización. Los sueros se recolectaron antes del inicio del estudio (preinmunitario) y los días 14 (postdosis 1, PD1) y 28 (postdosis 2, PD2). Los NZWR fueron observados al menos a diario por personal capacitado en el cuidado de animales para detectar cualquier signo de enfermedad o angustia. Se consideró que las formulaciones de vacunas contenidas en los NZWR

eran seguras y bien toleradas. Todos los experimentos con animales se realizaron en estricta conformidad con las recomendaciones de la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud. El protocolo experimental de NZWR fue aprobado por los Comités Institucionales de Cuidado y Uso de Animales de Merck & Co., Inc y Covance (Denver, PA).

5

Se evaluó la inmunogenicidad IgG de los sueros de NZWR usando un ensayo multiplexado de electroquimioluminiscencia (ECL). Este ensayo se desarrolló para su uso con suero de conejo basándose en el ensayo humano descrito por Marchese *et al.* (*Optimization and validation of a multiplex, electrochemiluminescence-based detection assay for the quantitation of immunoglobulin G serotype-specific antipneumococcal antibodies in human serum. Clin Vaccine Immunol.* 16(3): 387-96 (2009)) usando tecnología desarrollada por MesoScale Discovery (una división de MesoScale Diagnostics, LLC, Gaithersburg, MD) que utiliza un marcador SULFO-TAG™ que emite luz tras la estimulación electroquímica. Se usó anticuerpo anti-IgG de conejo marcado con SULFO-TAG™ como anticuerpo secundario para analizar muestras de suero de NZWR. El anticuerpo funcional se determinó mediante ensayos opsonofagocíticos multiplexados (MOPA) basados en protocolos descritos previamente disponibles en línea en el Laboratorio de Referencia de Patógenos Respiratorios Bacterianos de la Universidad de Alabama en Birmingham usando el software Opsotiter® 3 (Fundación de Investigación UAB, Caro-Aguilar *et al.*, 2017, citado anteriormente, Burton *et al.*, 2006, citado anteriormente).

10

15

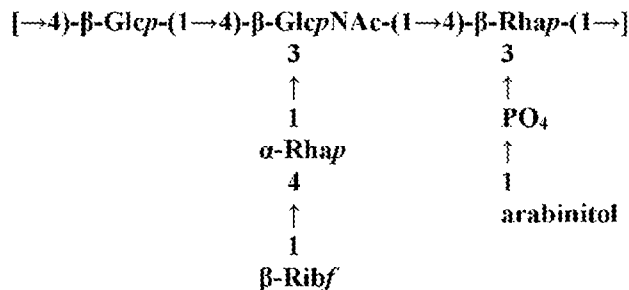
20

25

Se descubrió que los conjugados polisacárido-proteína preparados a partir de *S. pneumoniae* serotipos 16F, 23A, 23B, 24F y 31 en vacunas neumocócicas conjugadas multivalentes eran inmunogénicos tanto para la postdosis 1 (PD1) como para la postdosis 2 (PD2) en conejos (Figura 13). También generaron anticuerpos funcionales que destruyeron cepas bacterianas de tipo vacunal (Figura 14). Los conejos inmunizados con la vacuna neumocócica conjugada multivalente a una dosis de 2 µg tuvieron títulos de MOPA PD1 significativamente más altos para cuatro serotipos en comparación con los sueros de conejo preinmunitarios (Figura 14). Los conejos inmunizados con PCV21 a la dosis de 2 µg tuvieron títulos de MOPA PD2 significativamente más altos para los cinco serotipos en comparación con los sueros de conejo preinmunitarios (Figura 14). Los datos transformados logarítmicamente se analizaron mediante ANOVA unidireccional con el ensayo de Dunnett para determinar la significancia.

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado polisacárido-proteína transportadora con un polisacárido que tiene una unidad de repetición de la siguiente estructura:



conjugado con una proteína transportadora.

2. El conjugado polisacárido-proteína transportadora de la reivindicación 1, en donde la proteína transportadora es CRM197, fragmento B de la toxina diftérica (DTFB, por sus siglas en inglés), DTFB C8, toxoide diftérico (DT, por sus siglas en inglés), toxoide tetánico (TT, por sus siglas en inglés), fragmento C del TT, toxoide pertúsico, toxoide colérico, *E. coli* LT, *E. coli* ST o exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*.
3. El conjugado polisacárido-proteína transportadora de la reivindicación 2, en donde la proteína transportadora es CRM197.
4. El conjugado polisacárido-proteína transportadora de la reivindicación 3, en donde el conjugado polisacárido-proteína transportadora tiene un peso molecular de 1.000 kDa a 10.000 kDa.
5. El conjugado polisacárido-proteína transportadora de la reivindicación 3, en donde el conjugado polisacárido-proteína transportadora tiene una relación de polisacárido a proteína transportadora de 0,4 a 2,0.
6. El conjugado polisacárido-proteína transportadora de la reivindicación 5, en donde la proteína transportadora está conjugada con el polisacárido a través del 2º carbono del azúcar arabinitol.

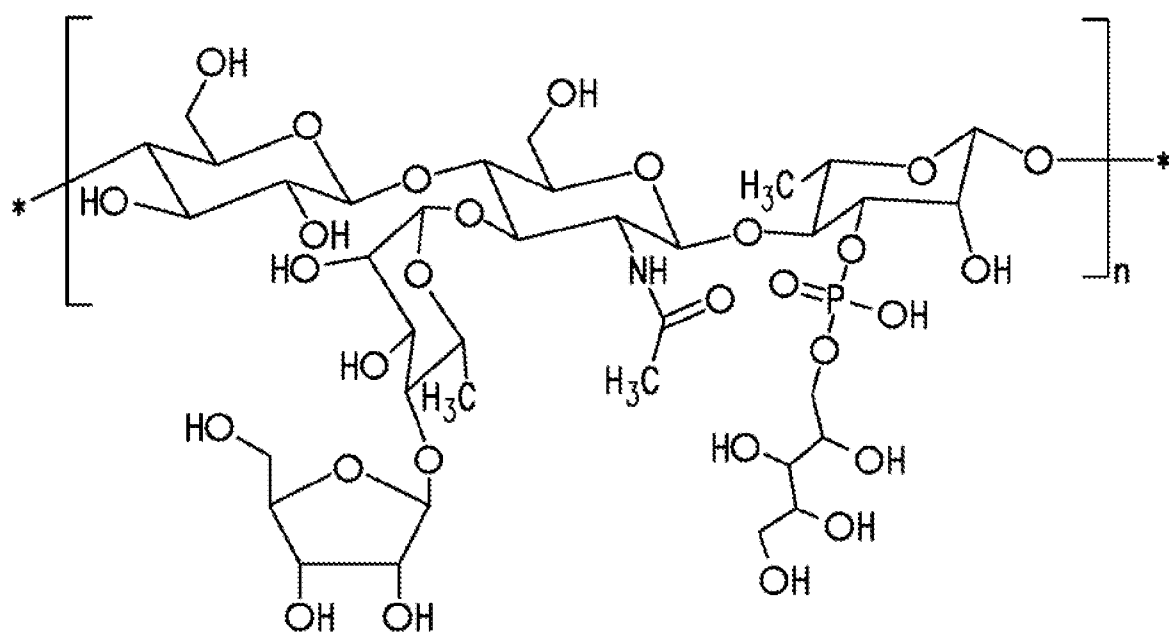


FIG. 1A

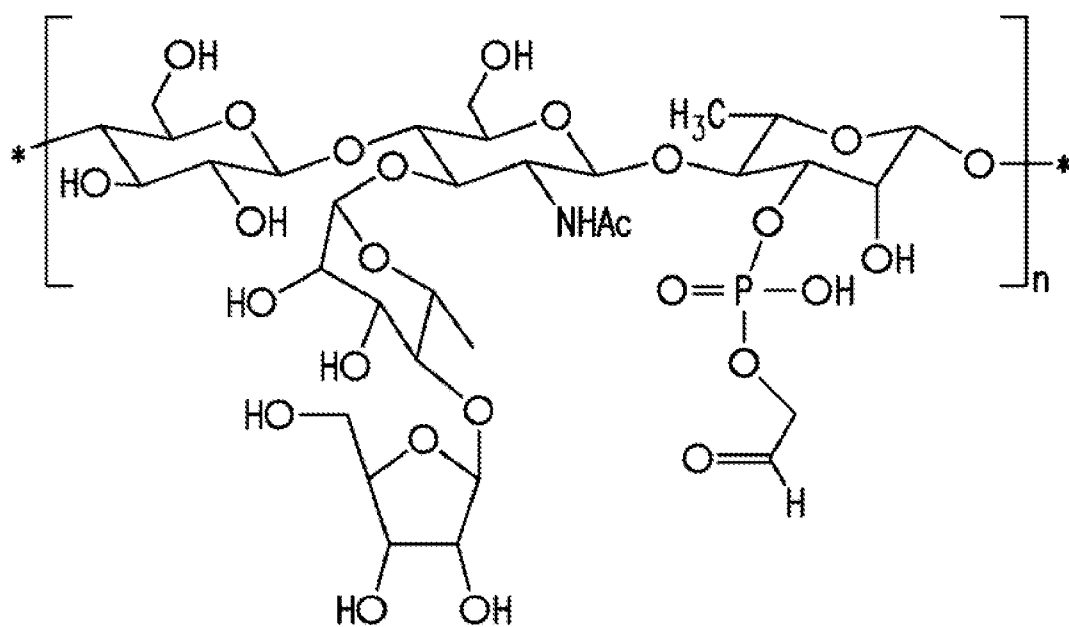


FIG. 1B

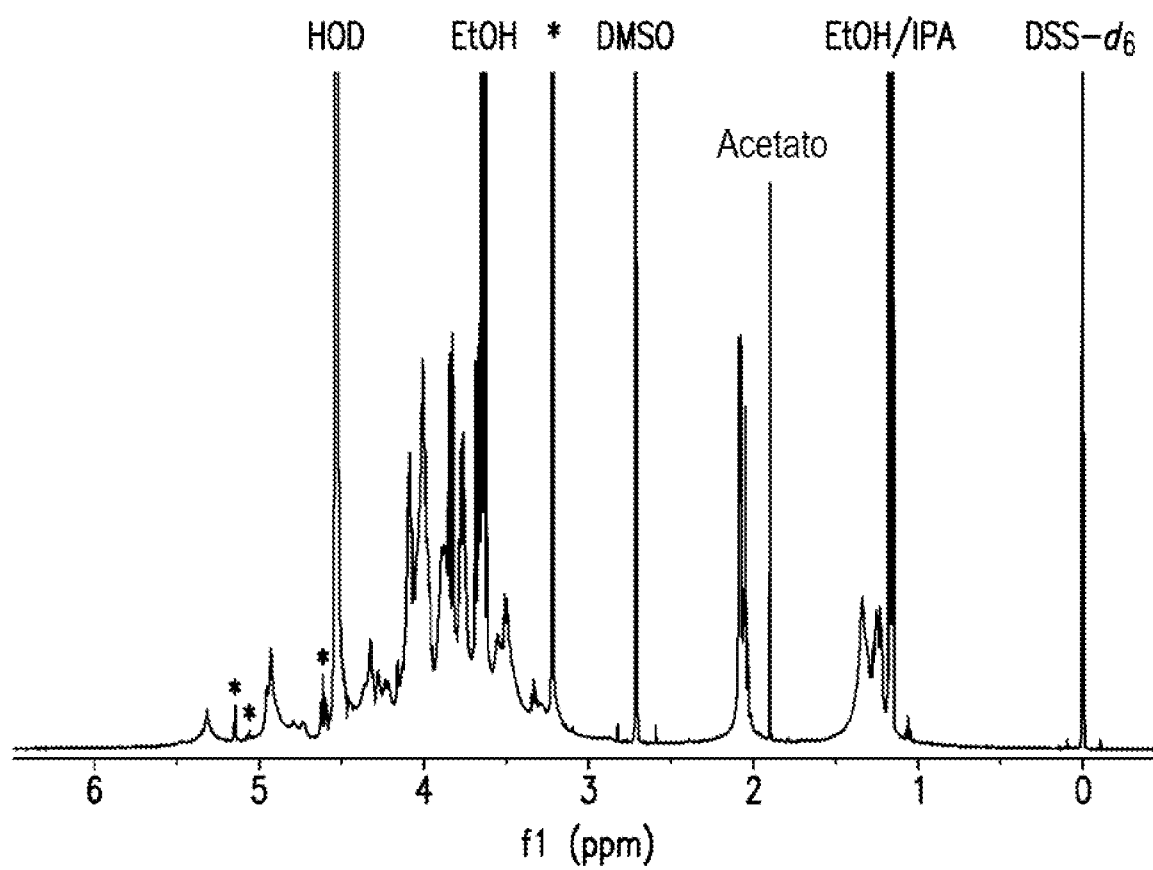


FIG.2

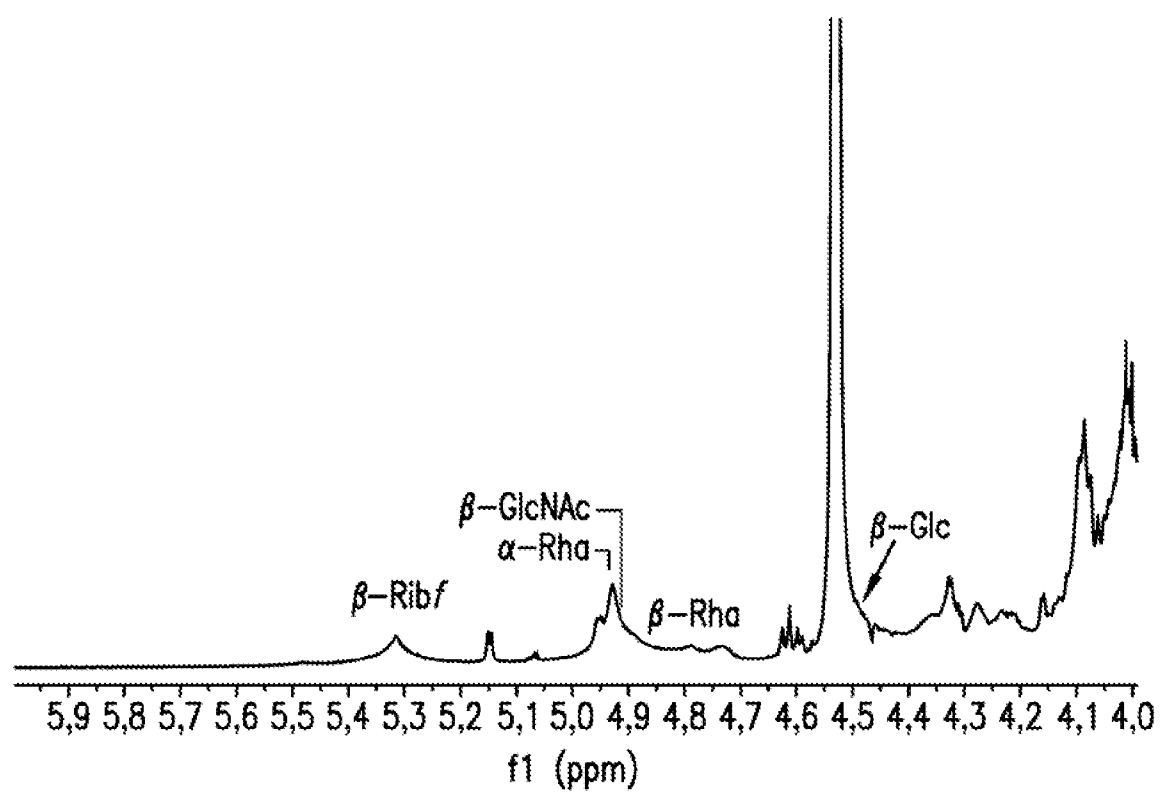


FIG.3

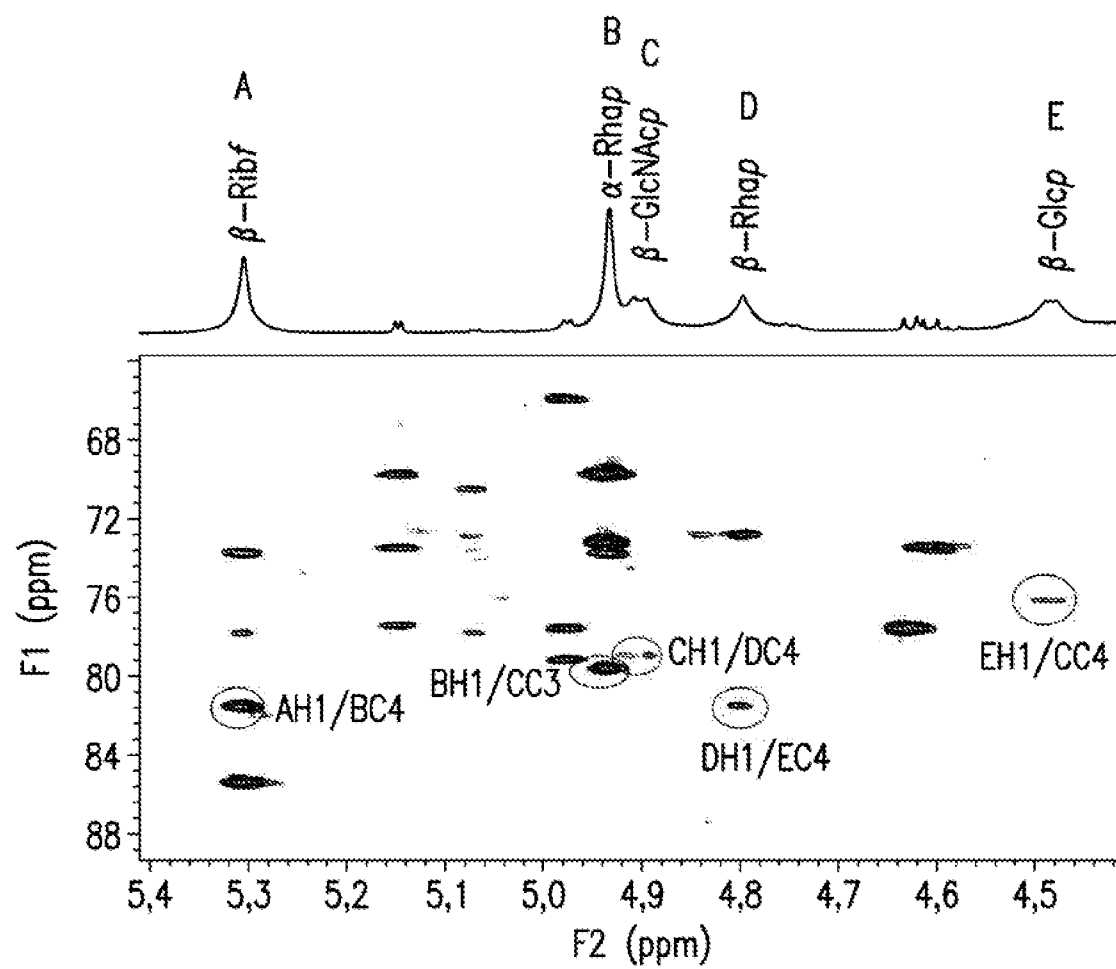
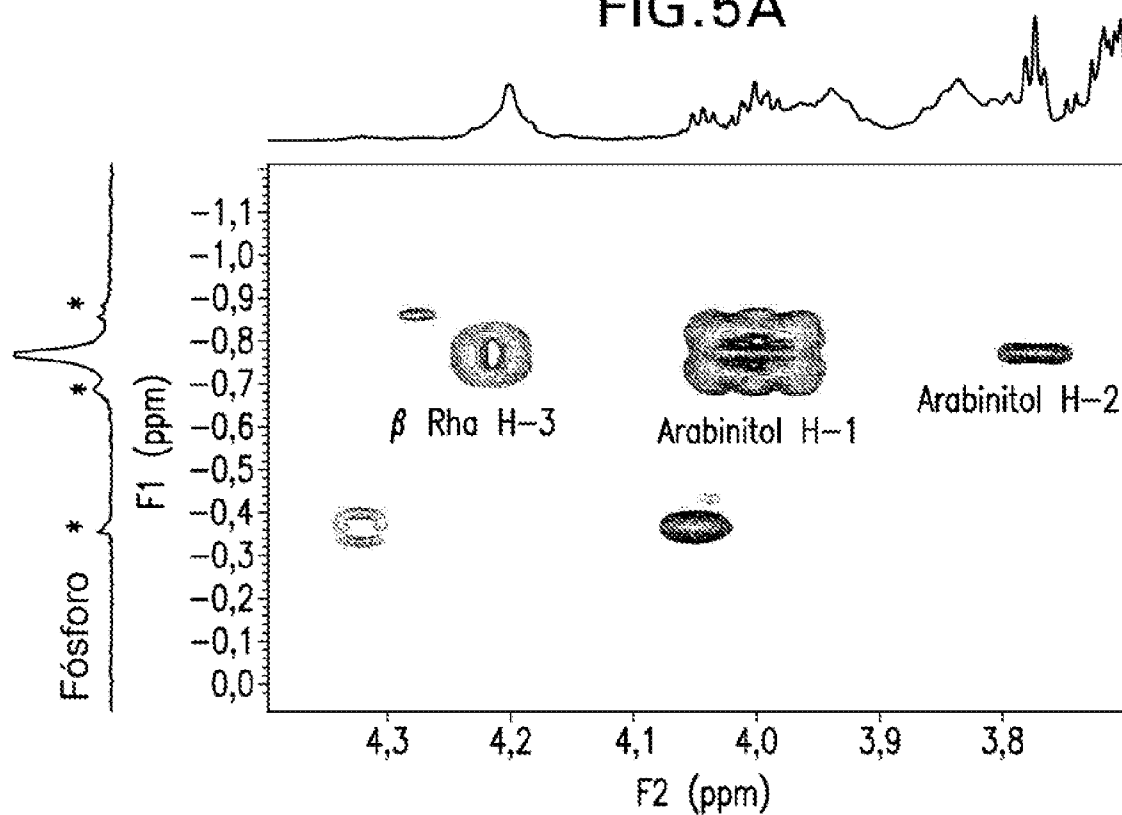
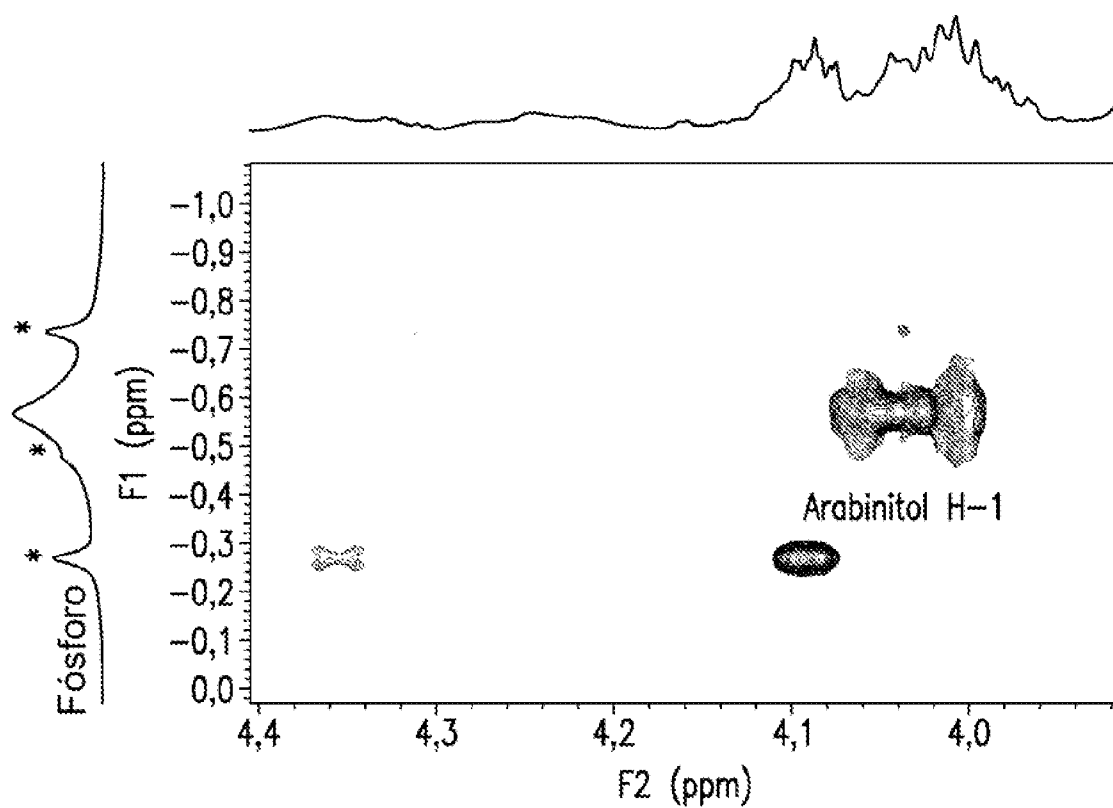


FIG.4



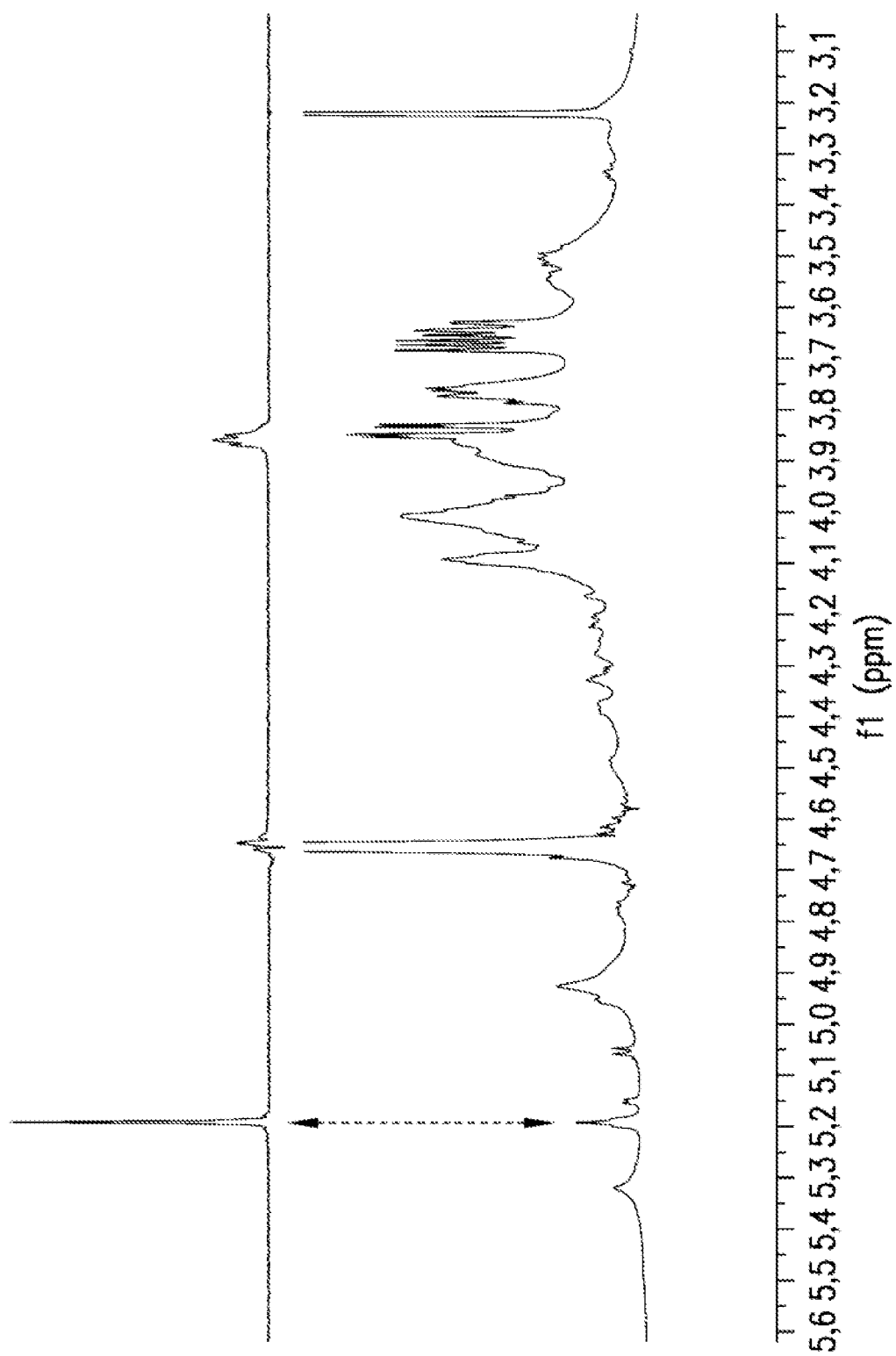


FIG.6

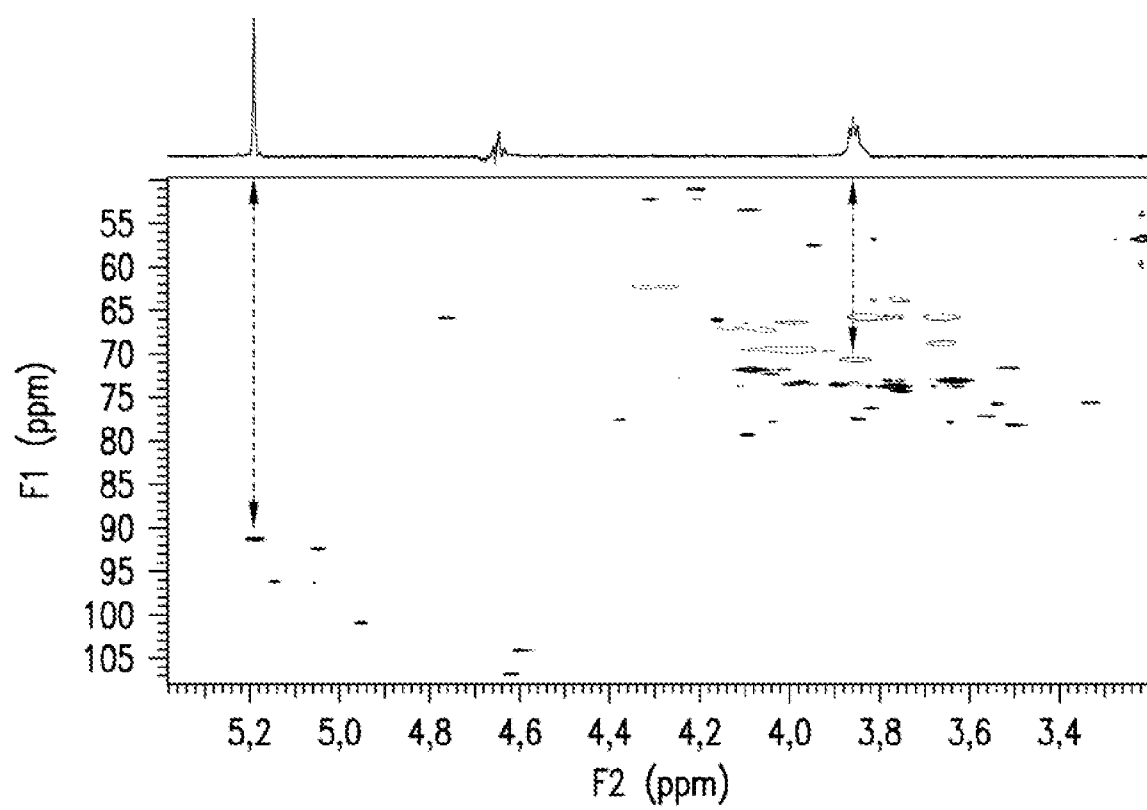


FIG. 7

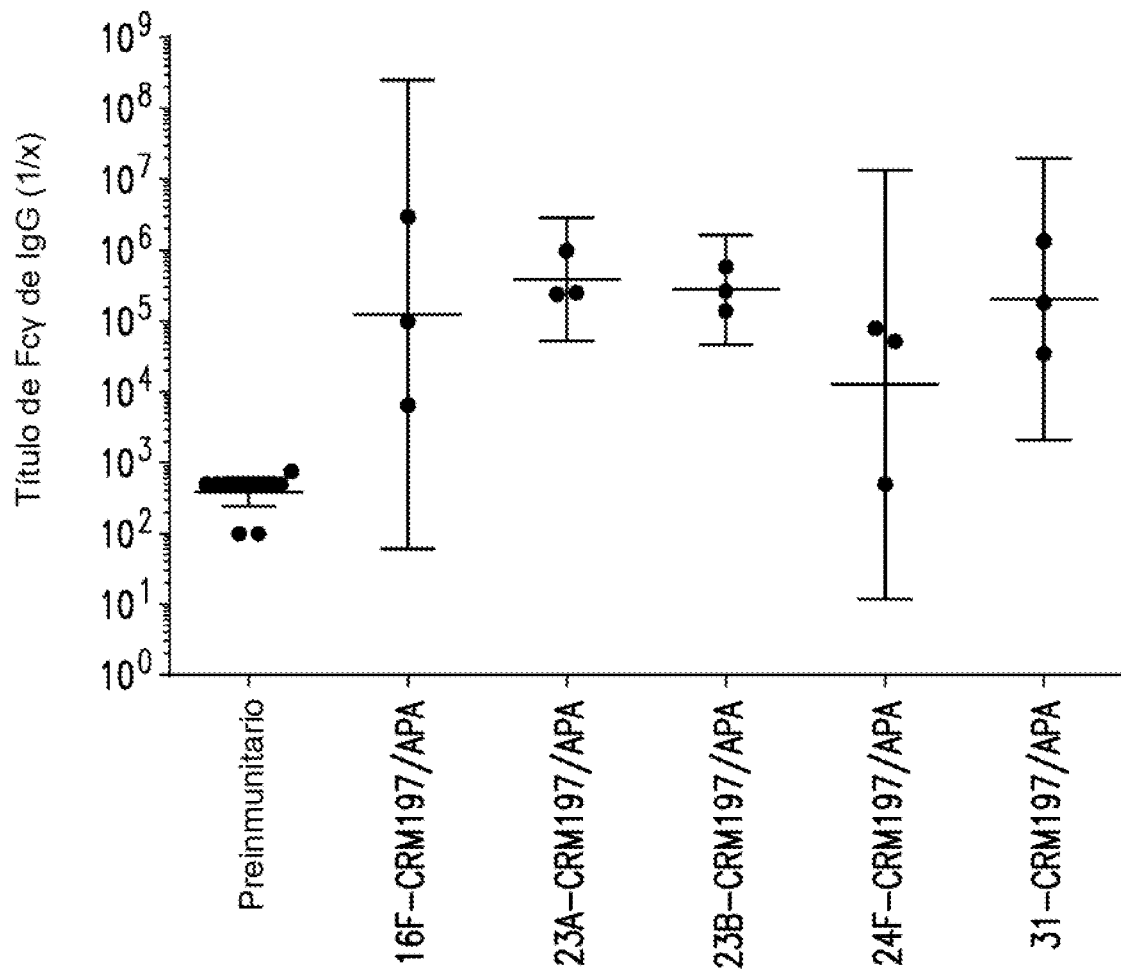


FIG.8

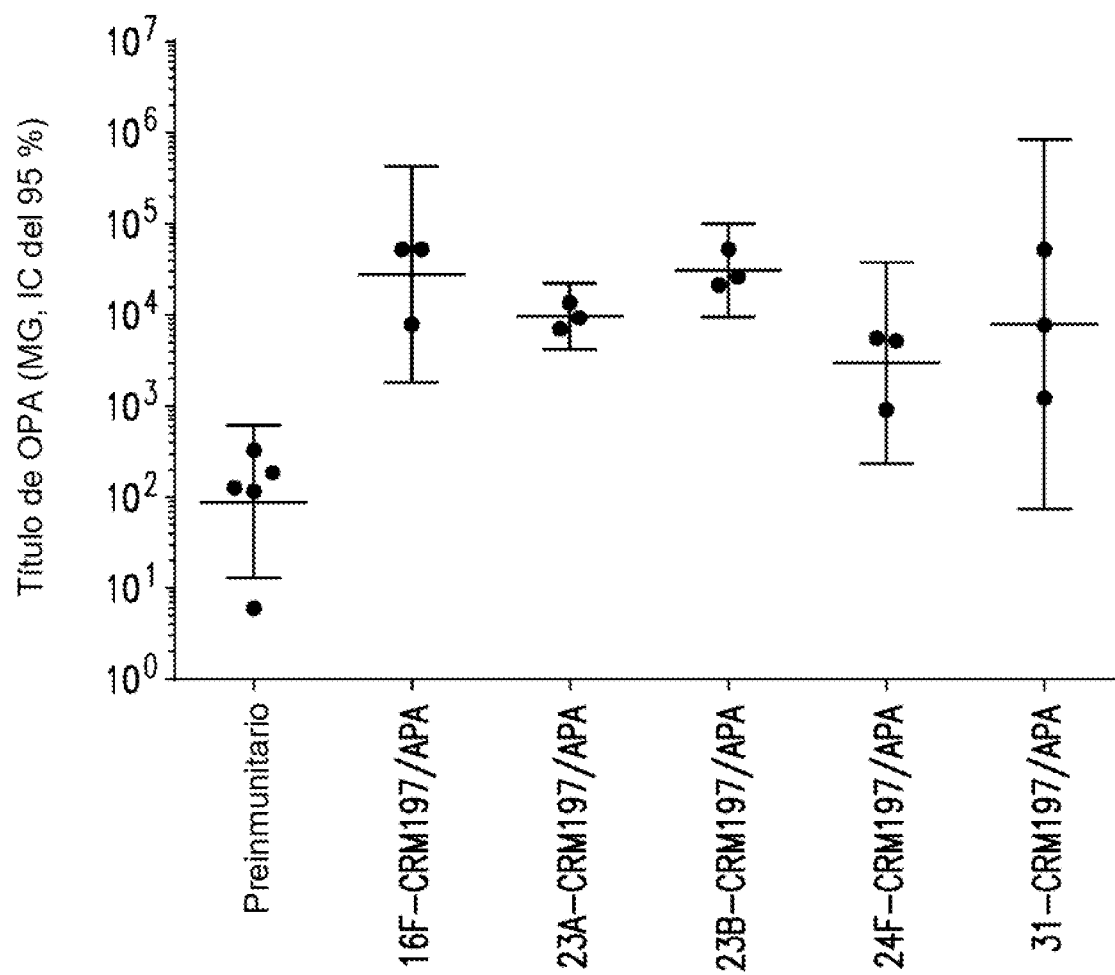


FIG.9

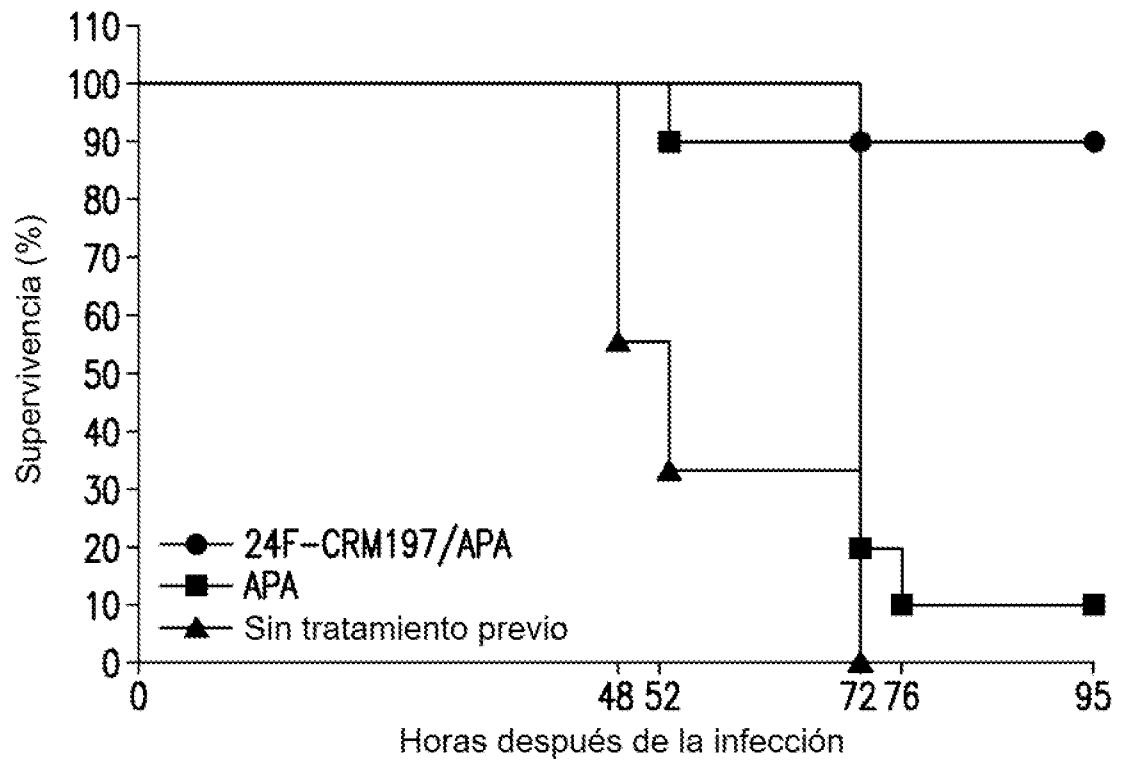


FIG.10

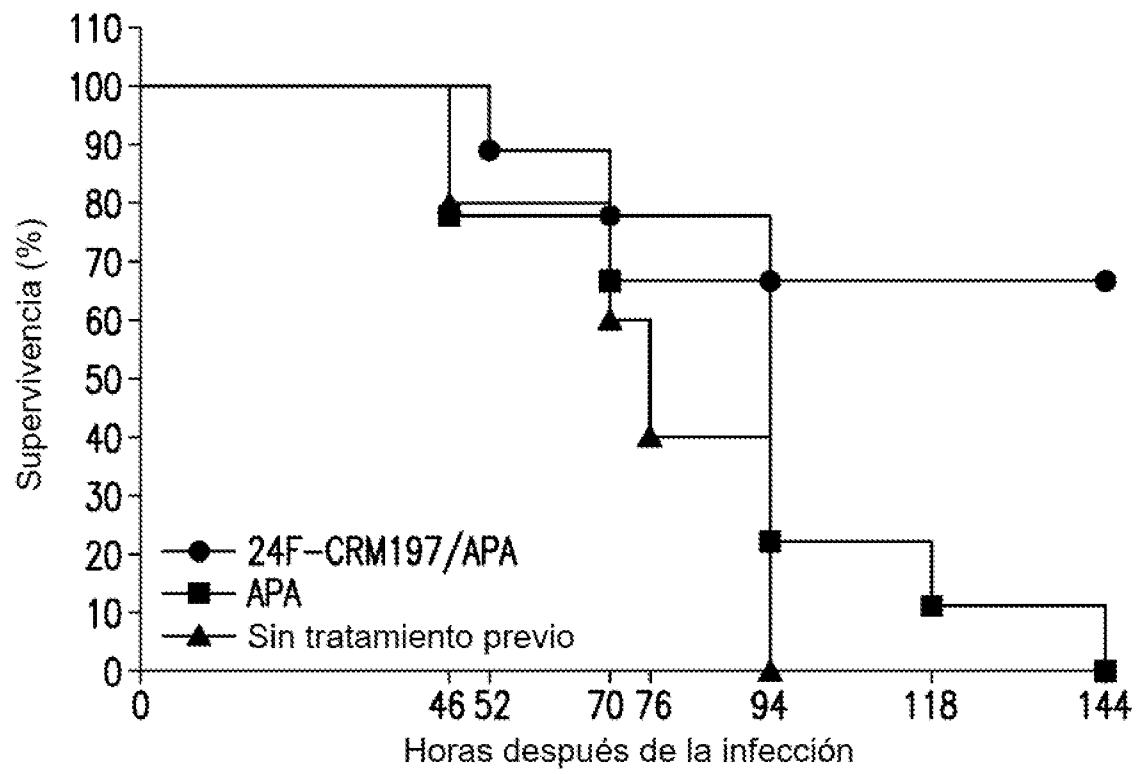


FIG.11

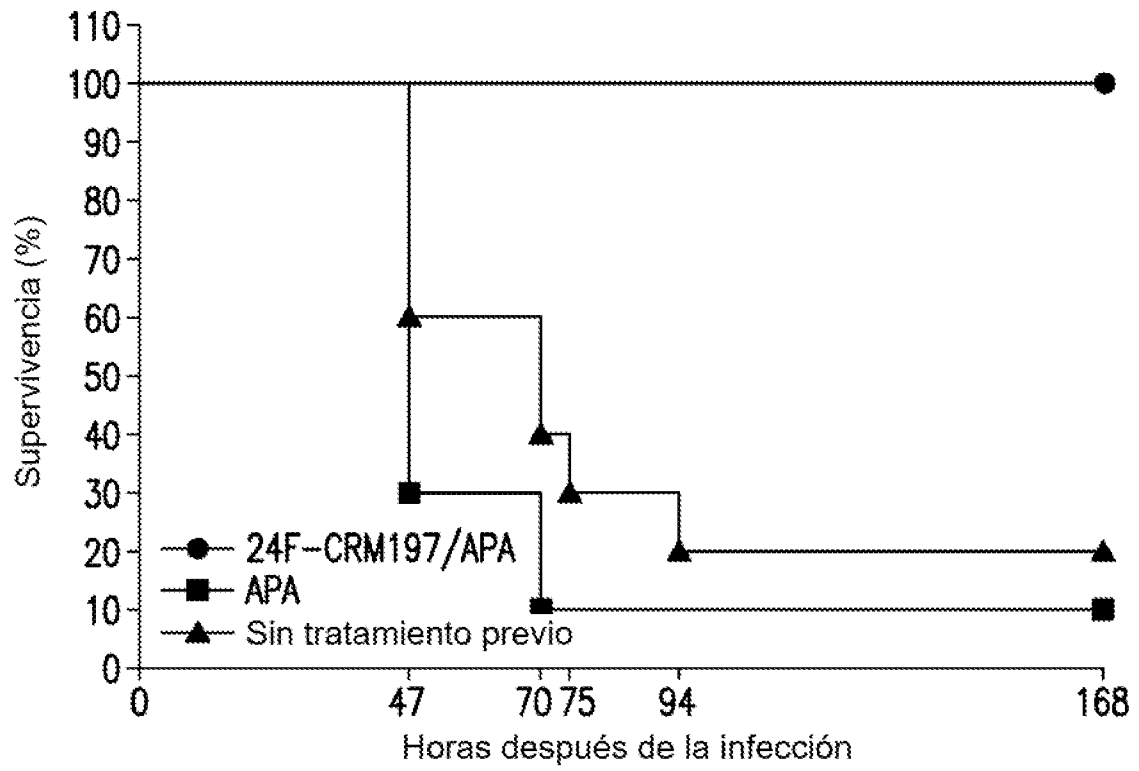


FIG.12

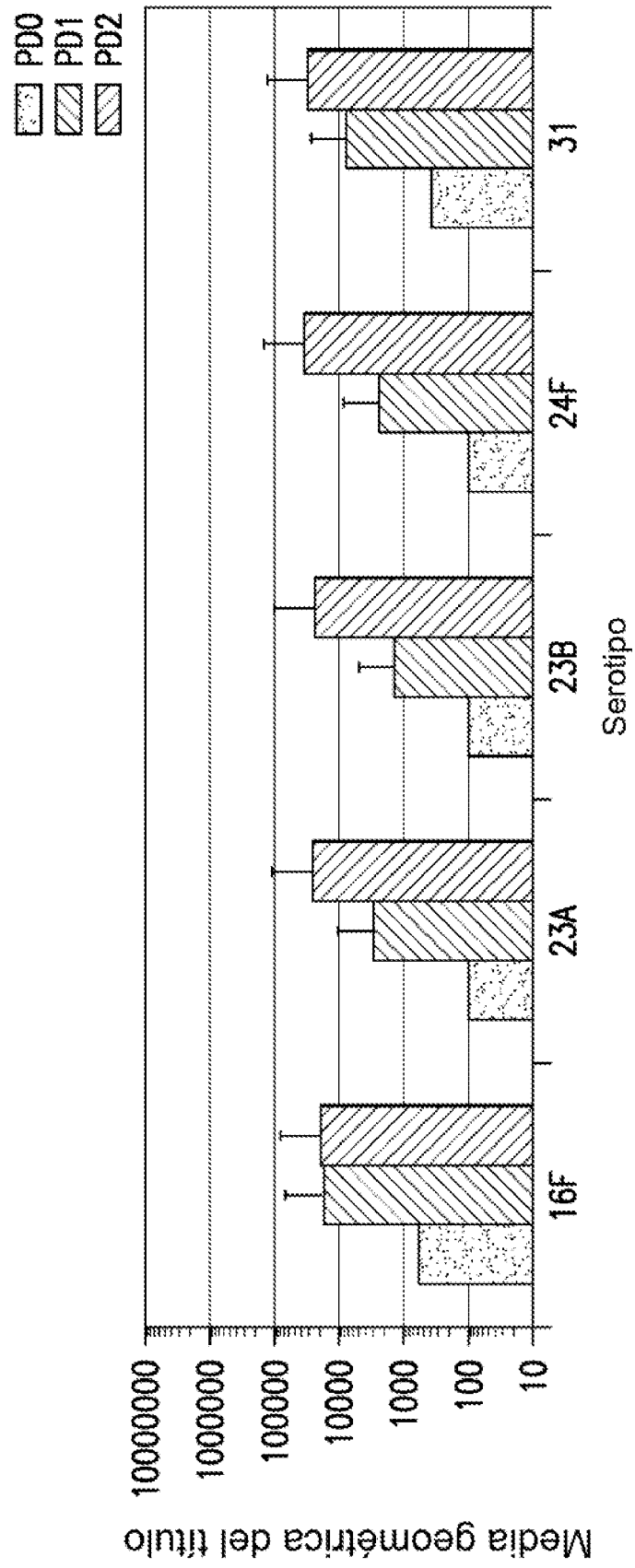


FIG.13

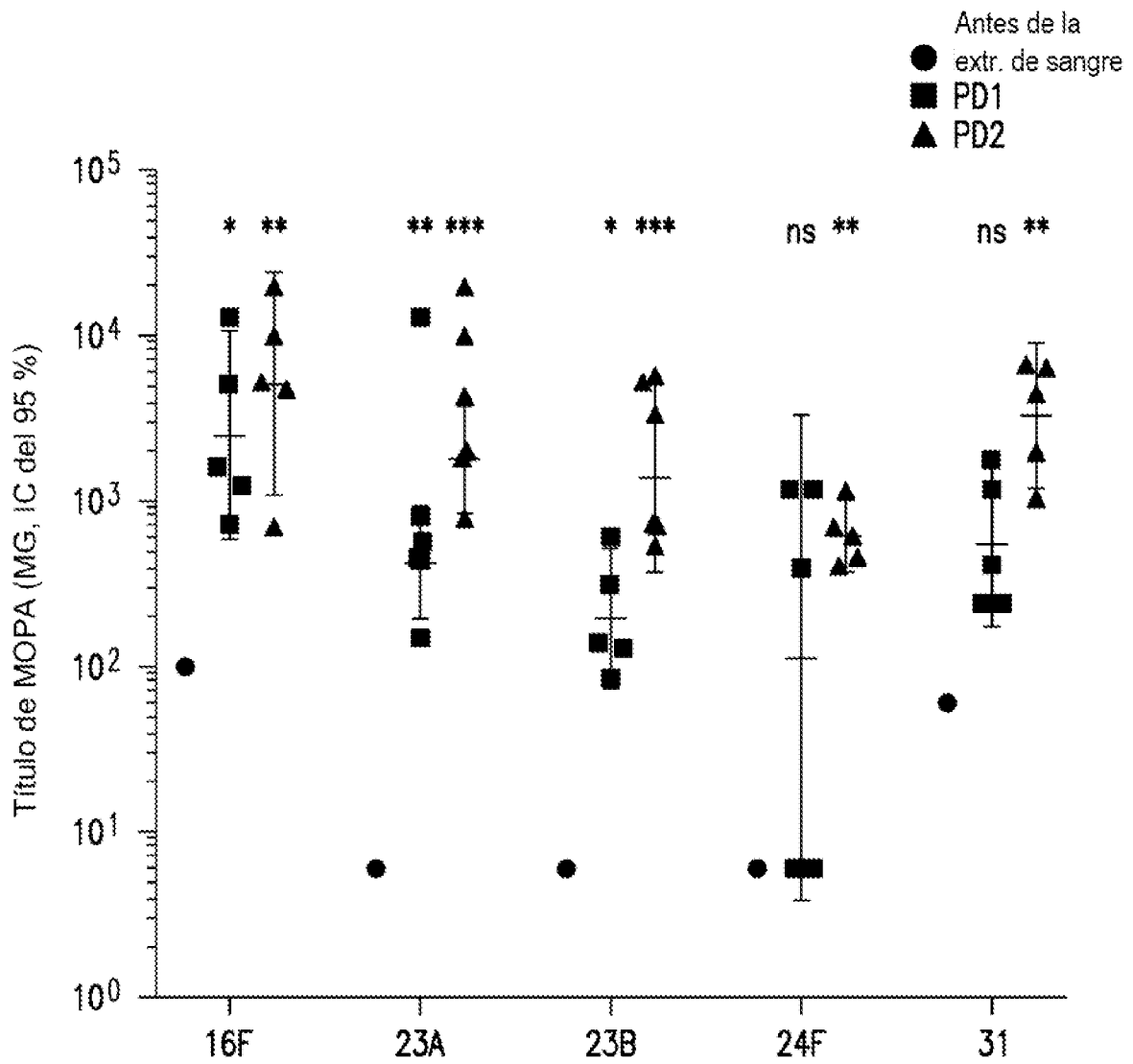


FIG.14