

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 945 312**

51 Int. Cl.:

A61K 39/09 (2006.01)

A61K 39/385 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.01.2016 PCT/IB2016/050036**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.07.2016 WO16113644**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.01.2016 E 16702585 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2023 EP 3244917**

54 Título: **Composiciones inmunogénicas para su uso en vacunas antineumocócicas**

30 Prioridad:

15.01.2015 US 201562103630 P

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

30.06.2023

73 Titular/es:

**PFIZER INC. (100.0%)
66 Hudson Boulevard East
New York, NY 10001-2192, US**

72 Inventor/es:

**COOPER, DAVID;
JANSEN, KATHRIN UTE y
PRIDE, MICHAEL WILLIAM**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 945 312 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

Composiciones inmunogénicas para su uso en vacunas antineumocócicas

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a nuevas composiciones inmunogénicas para su uso en vacunas antineumocócicas. Las composiciones inmunogénicas de la presente invención comprenderán típicamente antígenos sacáridos capsulares conjugados (glucoconjugados), en los que los sacáridos se derivan de serotipos de *Streptococcus pneumoniae*. Un objeto de la presente invención es proporcionar composiciones inmunogénicas para la protección contra serogrupo 9 de *S. pneumoniae*.

Antecedentes de la invención

Las infecciones causadas por neumococos son una causa importante de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. La neumonía, la bacteriemia febril y la meningitis son las manifestaciones más frecuentes de la enfermedad neumocócica invasiva, mientras que la propagación bacteriana dentro de las vías respiratorias puede dar lugar a infección del oído medio, sinusitis o bronquitis recurrente. En comparación con la enfermedad invasiva, las manifestaciones no invasivas suelen ser menos graves, pero considerablemente más frecuentes.

El agente etiológico de las enfermedades neumocócicas, *Streptococcus pneumoniae* (neumococo), es un coco encapsulado Gram-positivo, rodeado por una cápsula de polisacáridos. Las diferencias en la composición de esta cápsula permiten la diferenciación serológica entre aproximadamente 91 tipos capsulares, algunos de los cuales se asocian frecuentemente a la enfermedad neumocócica, otros raramente. Las infecciones neumocócicas invasivas incluyen la neumonía, la meningitis y la bacteriemia febril; entre las manifestaciones no invasivas comunes se encuentran la otitis media, la sinusitis y la bronquitis. Las vacunas antineumocócicas conjugadas (PCV) son vacunas antineumocócicas utilizadas para proteger frente a la enfermedad causada por *S. pneumoniae* (neumococo). Actualmente hay tres vacunas PCV disponibles en el mercado mundial: PREVNAR® (llamada Prevenar en algunos países) (vacuna heptavalente), SYNFLORIX® (vacuna decavalente) y PREVNAR 13® (vacuna tridecavalente).

Los serotipos específicos que causan enfermedad más allá del 13 de PREVNAR 13® varían según la región, la población y pueden cambiar con el tiempo debido a la adquisición de resistencia a los antibióticos, la introducción de la vacuna antineumocócica y las tendencias seculares de origen desconocido.

La adición de conjugados a una composición inmunogénica no es un procedimiento sencillo, ya que la combinación de conjugados en una única inyección multivalente puede dar lugar a competencia entre los diferentes componentes y afectar negativamente a la inmunogenicidad de cualquier conjugado individual.

Este fenómeno de interferencia puede limitar el número de conjugados que pueden incluirse en una vacuna multivalente. Por lo tanto, la protección contra un número elevado de serotipos, limitando al mismo tiempo el número de conjugados en la composición, puede ser muy difícil de obtener a pesar de su valor significativo.

Un objeto de la presente invención es proporcionar composiciones inmunogénicas para una protección adecuada contra *S. pneumoniae*, en particular contra serogrupo 9 de *S. pneumoniae*, limitando al mismo tiempo el número de conjugados.

El serogrupo 9 de *Streptococcus pneumoniae* consiste en cuatro tipos diferentes, 9V, 9A, 9L y 9N, cada uno de los cuales produce su propio polisacárido capsular específico del tipo (Richards, J.C y M.B. Perry, 1988, en A.M. Wu (ed.), The molecular immunology complex carbohydrates. Plenum, Nueva York, pp. 593-594).

El documento CN101590224 divulga una composición conjugada neumocócica 14-valente donde los 14 serotipos neumocócicos son 1, 2, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9N, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, y 23F; la proteína portadora es CRM₁₉₇, proteína de Toxina Tetánica y proteína D de *Haemophilus influenzae*.

Es un objeto de la presente invención proporcionar composiciones inmunogénicas para una protección adecuada contra los serotipos 9V, 9A, 9L y 9N de *S. pneumoniae*, con un número limitado de conjugados.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a una composición inmunogénica que comprende al menos un glicoconjugado del serotipo 9V de *S. pneumoniae* y que comprende además glicoconjugados de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 14, 18C, 19A, 19F y 23F de *S. pneumoniae*, en la que dichos glicoconjugados se conjugan individualmente con CRM₁₉₇, en la que dicha composición comprende de 0,1 mg/ml a 1 mg/ml de aluminio elemental en forma de fosfato de aluminio como adyuvante y en la que dicha composición no comprende sacáridos capsulares de los serotipos 9N, 9A y 9L de *S. pneumoniae*, para su uso en un procedimiento para prevenir la infección por los serotipos 9N de *S. pneumoniae* en un sujeto humano.

- 5 En un aspecto, las composiciones inmunogénicas anteriores comprenden además al menos un glicoconjugado de los serotipos 15B, 22F, 33F, 12F, 10A, 11A y/o 8 *S. pneumoniae*.
- En otro aspecto, las composiciones inmunogénicas anteriores comprenden además al menos un glucoconjugado de los serotipos 2, 15C, 17F y/o 20 de *S. pneumoniae*.
- 10 En otro aspecto, la composición inmunogénica es una composición conjugada neumocócica 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24-valente.
- En otro aspecto, los glucoconjugados de las composiciones inmunogénicas se conjugan individualmente con CRM197.
- 15 En un aspecto, los glicoconjugados se preparan mediante química CDAP o mediante química de aminación reductora.
- La composición inmunogénica puede comprender además antígenos de otros patógenos, y/o al menos un adyuvante tal como fosfato de aluminio, sulfato de aluminio o hidróxido de aluminio.
- 20 En un aspecto, las composiciones inmunogénicas son capaces de provocar anticuerpos IgG en humanos que son capaces de unirse al polisacárido de los serotipos 9N, 9A y/o 9L de *S. pneumoniae* a una concentración de al menos 0,35 µg/ml de acuerdo con lo determinado por el ensayo ELISA. En un aspecto, las composiciones inmunogénicas son capaces de provocar un título de al menos 1:8 contra los serotipos 9N, 9A y/o 9L de *S. pneumoniae* en al menos el 50% de los sujetos, según lo determinado por el ensayo de destrucción opsonofagocítica in vitro (OPA).
- 25 En un aspecto, las composiciones inmunogénicas son capaces de aumentar significativamente la proporción de respondedores contra los serotipos 9N, 9A y/o 9L de *S. pneumoniae* en comparación con la población preinmunizada.
- 30 En un aspecto, las composiciones inmunogénicas son capaces de aumentar significativamente los títulos de OPA de sujetos humanos contra los serotipos 9N, 9L y/o 9A de *S. pneumoniae* en comparación con la población preinmunizada.
- En un aspecto, las composiciones inmunogénicas se usan en un procedimiento para prevenir, tratar o mejorar una infección, enfermedad o afección causada por *S. pneumoniae* serotipos 9N, 9A y/o 9L en un sujeto, para usar para prevenir la infección por los serotipos 9N, 9A y/o 9L de *S. pneumoniae* en un sujeto o para su uso en un procedimiento para proteger o tratar a un ser humano susceptible a la infección por los serotipos 9N, 9A y/o 9L de *S. pneumoniae*, mediante la administración de dichas composiciones inmunogénicas por vía sistémica o mucosal.
- 35 En un aspecto, la presente invención se refiere al uso de la composición inmunogénica divulgada en el presente documento para la fabricación de un medicamento para prevenir, tratar o mejorar una infección, enfermedad o afección causada por los serotipos 9N, 9A y/o 9L de *S. pneumoniae* en un sujeto, para su uso para prevenir la infección por *S. pneumoniae* serotipos 9N, 9A y/o 9L en un sujeto o para su uso en un procedimiento para proteger o tratar a un ser humano susceptible a la infección por los serotipos 9N, 9A y/o 9L de *S. pneumoniae*, mediante la administración de dichas composiciones inmunogénicas por vía sistémica o mucosa.
- 40 En un aspecto, la divulgación se refiere a un procedimiento para prevenir, tratar o mejorar una infección, enfermedad o afección asociada con los serotipos 9N, 9A y/o 9L de *S. pneumoniae* en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad inmunológicamente eficaz de la composición inmunogénica de la invención.
- 45 En un aspecto, la divulgación se refiere a un procedimiento de prevención de una infección por los serotipos 9N, 9A y/o 9L de *S. pneumoniae* en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad inmunológicamente eficaz de la composición inmunogénica de la invención.
- 50 La divulgación se refiere además a un kit que comprende una composición inmunogénica divulgada en el presente documento y un prospecto informativo, en el que dicho prospecto informativo menciona la capacidad de la composición para provocar anticuerpos funcionales contra los serotipos 9A, 9L y/o 9N de *S. pneumoniae* y el procedimiento para producir dicho kit.
- 55 El documento WO2013/191459 divulga una composición inmunogénica 15-valente que comprende glicoconjugados de ambos serotipos 9N y 9V de *S. pneumoniae*. Del mismo modo el documento WO2014/092377 y las solicitudes de patente chinas Nos. CN101590224 y CN 103656631 divulgan composiciones inmunogénicas que combinan glicoconjugados de ambos serotipos 9N y 9V de *S. pneumoniae*.
- 60 Sorprendentemente, se ha descubierto que el conjugado de polisacáridos del serotipo 9V, además de provocar anticuerpos reactivos funcionales contra el serogrupo 9V, puede provocar anticuerpos funcionales de reacción cruzada contra los demás serotipos del serogrupo 9: 9A, 9L y/o 9N.
- 65

Figuras

Figura 1 Respuestas interfuncionales del OPA. Un subconjunto de 59 sueros de adultos vacunados con una vacuna antineumocócica conjugada trecevalente (Estudio de EE. UU. 6115A1-004; ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00427895) se evaluó en los OPA la presencia de anticuerpos funcionales contra los serotipos 9V, 9A, 9L y 9N. Encima de cada grupo se indica el porcentaje de muestras con título OPA positivo (es decir, $\geq 1:8$). Los títulos medios geométricos (GMT) figuran en el eje x debajo de cada grupo.

Figura 2 Respuestas OPA interfuncionales de sesenta y seis sueros emparejados pre/post. Un subconjunto de 66 muestras de suero emparejadas de adultos vacunados con una vacuna antineumocócica conjugada trecevalente (estudio 6115A1-3005; ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00546572) se evaluó en OPA para detectar la presencia de anticuerpos funcionales contra los serotipos 9V, 9A, 9L y 9N. Encima de cada grupo se indica el porcentaje de muestras con título OPA positivo (es decir, $\geq 1:8$). Los títulos medios geométricos (GMT) figuran en el eje x debajo de cada grupo.

Figura 3 Curvas de distribución acumulativa inversa (RCDC) de pre y post inmunización - serotipo 9V neumocócico (Pn9V).

Curvas de distribución acumulativa inversa de los títulos de OPA frente al serotipo 9V de un panel de suero emparejado pre y post la vacunación (N = 66) vacunado con una vacuna antineumocócica conjugada 13 valente (estudio 6115A1-3005; ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00546572). Los gráficos representan el porcentaje de sueros con título OPA positivo (es decir, $\geq 1:8$).

Figura 4 Curvas de distribución acumulativa inversa (RCDC) de pre y post inmunización - serotipo 9A neumocócico (Pn9A).

Curvas de distribución acumulativa inversa de los títulos de OPA frente al serotipo 9A de un panel de suero emparejado pre y post la vacunación (N = 66) vacunado con una vacuna antineumocócica conjugada 13 valente (estudio 6115A1-3005; ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00546572). Los gráficos representan el porcentaje de sueros con título OPA positivo (es decir, $\geq 1:8$).

Figura 5 Curvas de distribución acumulativa inversa (RCDC) de pre y post inmunización - serotipo 9L neumocócico (Pn9L).

Curvas de distribución acumulativa inversa de los títulos de OPA frente al serotipo 9L de un panel de suero emparejado pre y post la vacunación (N = 66) vacunado con una vacuna antineumocócica conjugada 13 valente (estudio 6115A1-3005; ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00546572). Los gráficos representan el porcentaje de sueros con título OPA positivo (es decir, $\geq 1:8$).

Figura 6 Curvas de distribución acumulativa inversa (RCDC) de pre y post inmunización - serotipo 9N neumocócico (Pn9N).

Curvas de distribución acumulativa inversa de los títulos de OPA frente al serotipo 9N de un panel de suero emparejado pre y post la vacunación (N = 66) vacunado con una vacuna antineumocócica conjugada 13 valente (estudio 6115A1-3005; ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00546572). Los gráficos representan el porcentaje de sueros con título OPA positivo (es decir, $\geq 1:8$).

Figura 7 Respuestas OPA interfuncionales del serogrupo 9 de sueros emparejados pre y post vacunación del estudio B1851088 (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01646398) tras la inmunización con 13vPnC.

Un subconjunto de 91 paneles de suero emparejados pre y post la vacunación de adultos vacunados con 13vPnC (estudio B1851088) se evaluaron en OPA para detectar la presencia de anticuerpos funcionales contra los serotipos 9V, 9A, 9L y 9N. Encima de cada grupo se indica el porcentaje de muestras con título OPA positivo (es decir, $\geq 1:8$).

Figura 8 Respuestas OPA interfuncionales del serogrupo 9 de sueros emparejados pre/post vacunación del estudio B1851088 tras la inmunización con 23vPS.

Un subconjunto de 83 paneles de suero emparejados pre y post la vacunación de adultos vacunados con 23vPS (estudio B1851088) se evaluaron en OPA para detectar la presencia de anticuerpos funcionales contra los serotipos 9V, 9A, 9L y 9N. Encima de cada grupo se indica el porcentaje de muestras con título OPA positivo (es decir, $\geq 1:8$).

Figura 9 Títulos de OPA interfuncionales del serogrupo 9 de sueros pre y post vacunación emparejados del estudio B1851088 tras la inmunización con 13vPnC (13v) o 23vPS (23v).

Figura 10 Curvas de distribución acumulativa inversa (RCDC) de Pn9V y Pn9N 13vPnC del estudio B1851088.

Curvas de distribución acumulativa inversa de los títulos de OPA frente a los serotipos 9V y 9N de un panel de sueros emparejados pre y post la vacunación (N = 91) vacunados con 13vPnC (Estudio japonés B1851088).

Figura 11 Curvas de distribución acumulativa inversa (RCDC) de Pn9V y Pn9N 23vPS del estudio B1851088. Curvas de distribución acumulativa inversa de los títulos de OPA frente a los serotipos 9V y 9N de un panel de sueros emparejados pre y post la vacunación (N = 83) vacunados con 23vPS (Estudio japonés B1851088).

Figura 12 Curvas de distribución acumulativa inversa (RCDC) de Pn9V y Pn9A 13vPnC del estudio B1851088.

Curvas de distribución acumulativa inversa de los títulos de OPA frente a los serotipos 9V y 9A de un panel de sueros emparejados pre y post la vacunación (N = 91) vacunados con 13vPnC (Estudio japonés B1851088).

Figura 13 Curvas de distribución acumulativa inversa (RCDC) de Pn9V y Pn9A 23vPS del estudio B1851088. Curvas de distribución acumulativa inversa de los títulos de OPA frente a los serotipos 9V y 9A de un panel de sueros emparejados pre y post la vacunación (N = 83) vacunados con 23vPS (Estudio japonés B1851088).

Figura 14 Curvas de distribución acumulativa inversa (RCDC) de Pn9V y Pn9L 13vPnC del estudio B1851088.

Curvas de distribución acumulativa inversa de los títulos de OPA frente a los serotipos 9V y 9L de un panel de sueros emparejados pre y post la vacunación (N = 91) vacunados con 13vPnC (estudio japonés B1851088).

Figura 15 Curvas de distribución acumulativa inversa (RCDC) de Pn9V y Pn9L 23vPS del estudio B1851088.

Curvas de distribución acumulativa inversa de los títulos de OPA frente a los serotipos 9V y 9L de un panel de sueros emparejados pre y post la vacunación (N = 83) vacunados con 23vPS (estudio japonés B1851088).

1. Composiciones inmunógenas de la invención

Las composiciones inmunogénicas de la presente invención comprenderán típicamente antígenos sacáridos capsulares conjugados (también denominados glucoconjugados), en los que los sacáridos se derivan de serotipos de *S. pneumoniae*.

En una realización hay 13 serotipos diferentes. En una realización hay 14 serotipos diferentes. En una realización hay 15 serotipos diferentes. En una realización hay 16 serotipos diferentes. En una realización hay 17 serotipos diferentes. En una realización hay 18 serotipos diferentes. En una realización hay 19 serotipos diferentes. En una realización hay 20 serotipos diferentes. En una realización hay 21 serotipos diferentes. En una realización hay 22 serotipos diferentes. En una realización hay 23 serotipos diferentes. En una realización hay 24 serotipos diferentes. Los sacáridos capsulares se conjugan con una proteína portadora para formar glucoconjugados como se describe a continuación.

Si el soporte proteico es el mismo para 2 o más sacáridos en la composición, los sacáridos podrían estar conjugados a la misma molécula del portador proteico (moléculas portadoras que tienen 2 o más sacáridos diferentes conjugados a él) [véase por ejemplo el documento WO 2004/083251].

Sin embargo, en una realización preferida, los sacáridos se conjugan individualmente con diferentes moléculas de la proteína portadora (cada molécula de proteína portadora solo tiene un tipo de sacárido conjugado). En dicha realización, se dice que los sacáridos capsulares están conjugados individualmente con la proteína portadora.

Para los fines de la invención, el término "glucoconjugado" indica un sacárido capsular unido covalentemente a una proteína portadora. En una realización, un sacárido capsular está unido directamente a una proteína portadora. En una segunda realización, un sacárido bacteriano está ligado a una proteína a través de un espaciador/ligador.

1.1 Proteína portadora de la invención

Un componente del glucoconjugado de la invención es una proteína portadora a la que se conjugan el sacárido. Los términos "vehículo proteico" o "proteína de vehículo" o "vehículo" se pueden usar de manera intercambiable en el presente documento. Las proteínas portadoras deben ser susceptibles de procedimientos de conjugación estándar.

En una realización preferida, la proteína portadora de los glucoconjugados se selecciona del grupo que consiste en: DT (toxina diftérica), TT (toxina tetánica) o fragmento C de TT, CRM197 (una variante no tóxica pero antígenicamente idéntica de la toxina diftérica), la cadena A del mutante de la toxina diftérica CRM197 (CN103495161), otros mutantes DT (tales como CRM176, CRM228, CRM45 (Uchida et al. (1973) J. Biol. Chem. 218:3838-3844), CRM9, CRM102, CRM103 o CRM107; y otras mutaciones descritas por Nicholls y Youle en Genetically Engineered Toxins, Ed: Frankel, Maecel Dekker Inc. (1992); delección o mutación de Glu-148 a Asp, Gln o Ser y/o Ala 158 a Gly y otras mutaciones divulgadas en las Patentes de EE.UU. Nos. 4,709,017 y 4,950,740; mutación de al menos uno o más residuos Lys 516, Lys 526, Phe 530 y/o Lys 534 y otras mutaciones divulgadas en las Patentes de EE.UU. Nos. 5,917,017 y 6,455,673 o fragmento divulgado en la Patente de EE.UU. No. 5,843,711, neumolisina neumocócica (ply) (Kuo et al. (1995) Infect Immun 63:2706-2713) incluyendo ply detoxificado de alguna manera, por ejemplo dPLY-GMBS (documentos WO 2004/081515 y WO 2006/032499) o dPLY-formol, PhtX, incluyendo PhtA, PhtB, PhtD, PhtE (las

secuencias de PhtA, PhtB, PhtD o PhtE se divulgan en los documentos WO 00/37105 y WO 00/39299) y fusiones de proteínas Pht, por ejemplo fusiones PhtDE, fusiones PhtBE, Pht A-E (documentos WO 01/98334, WO 03/054007, WO 2009/000826), OMPC (proteína meningocócica de membrana externa - normalmente extraída de serogrupo B de *Neisseria meningitidis* (documento EP0372501), PorB (de *N. meningitidis*), PD (proteína D de *Haemophilus influenzae*; véase, por ejemplo, EP0594610 B), o equivalentes inmunológicamente funcionales de los mismos, péptidos sintéticos (documentos EP0378881, EP0427347), proteínas de choque térmico (documentos WO 93/17712, WO 94/03208), proteínas de la tos ferina (documentos WO 98/58668, EP0471177), citoquinas, linfoquinas, factores de crecimiento u hormonas (documento WO 91/01146), proteínas artificiales que comprenden múltiples epítomos de células T CD4+ humanas de diversos antígenos derivados de patógenos (Falugi et al. (2001) Eur J Immunol 31:3816-3824) tal como la proteína N19 (Baraldoi et al. (2004) Infect Immun 72:4884-4887) proteína de superficie neumocócica PspA (documento WO 02/091998), proteínas de captación de hierro (documento WO 01/72337), toxina A o B de *Clostridium difficile* (documento WO 00/61761), proteínas de unión a transferrina, proteína de adhesión neumocócica (PsaA), exotoxina A recombinante de *Pseudomonas aeruginosa* (en particular mutantes no tóxicos de la misma (tal como la exotoxina A con una sustitución en el ácido glutámico 553 (Douglas et al. (1987) J. Bacteriol. 169(11):4967-4971)). Otras proteínas, tales como ovoalbúmina, hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina de suero bovino (BSA) o derivado proteico purificado de tuberculina (PPD) también se pueden usar como proteínas de transporte. Otras proteínas portadoras adecuadas incluyen toxinas bacterianas inactivadas tal como el toxoide del cólera (por ejemplo, como se describe en el documento WO 2004/083251), *Escherichia coli* LT, *E. coli* ST y exotoxina A de *P. aeruginosa*.

En una realización preferida, la proteína portadora de los glicoconjugados se selecciona independientemente del grupo que consiste en mutantes TT, DT, DT (tal como CRM₁₉₇), proteína D de *H. influenzae*, fusiones PhtX, PhtD, PhtDE (particularmente las divulgadas en los documentos WO 01/98334 y WO 03/054007), neumolisina desintoxicada, PorB, proteína N19, PspA, OMPC, toxina A o B de *C. difficile* y PsaA.

En una realización, la proteína portadora de los glicoconjugados de la invención es DT (toxóide diftérico). En otra realización, la proteína de vehículo de los glucoconjugados de la invención es TT (toxóide de tétanos).

En otra realización, la proteína portadora de los glicoconjugados de la invención es PD (proteína D de *H. influenzae*; véase, por ejemplo, el documento EP0594610 B).

La proteína CRM₁₉₇ es una forma no tóxica de la toxina diftérica, pero es inmunológicamente indistinguible de la toxina diftérica. La CRM₁₉₇ es producido por *Corynebacterium diphtheriae* infectada por el fago no toxigénico β197^{tox-} creado por mutagénesis con nitrosoguanidina del corinefago toxigénico beta (Uchida et al. (1971) Nature New Biology 233:8-11). La proteína CRM₁₉₇ tiene el mismo peso molecular que la toxina diftérica, pero difiere de ella por un único cambio de base (guanina por adenina) en el gen estructural. Este único cambio de base provoca una sustitución de aminoácidos (ácido glutámico por glicina) en la proteína madura y elimina las propiedades tóxicas de la toxina diftérica. La proteína CRM₁₉₇ es una portadora segura y eficaz de sacáridos dependiente de las células T. Se pueden encontrar más detalles sobre la CRM₁₉₇ y su producción, por ejemplo, en la Patente de EE. UU. No. 5,614,382. En una realización, los sacáridos capsulares de la invención se conjugan con la proteína CRM₁₉₇ o la cadena A de CRM₁₉₇ (véase el documento CN103495161). En una realización, los sacáridos capsulares de la invención se conjugan con la cadena A de CRM₁₉₇ obtenida mediante expresión por *E. coli* genéticamente recombinante (véase el documento CN103495161). En una realización, los sacáridos capsulares de la invención están todos conjugados con CRM₁₉₇. En una realización, los sacáridos capsulares de la invención están todos conjugados con la cadena A de la CRM₁₉₇.

Por consiguiente, en realizaciones frecuentes, los glicoconjugados de la invención comprenden CRM₁₉₇ como la proteína portadora, en la que el polisacárido capsular está unido covalentemente a CRM₁₉₇.

1.2 Sacárido capsular de la invención

El término "sacárido" a lo largo de esta memoria descriptiva puede indicar polisacárido u oligosacárido e incluye ambos. En realizaciones frecuentes, el sacárido es un polisacárido, en particular un polisacárido capsular de *S. pneumoniae*.

Los polisacáridos capsulares se preparan mediante técnicas estándar conocidas por los expertos en la técnica.

En la presente invención, los polisacáridos capsulares se pueden preparar, por ejemplo, a partir de los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 15C, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F de *S. pneumoniae*. Típicamente, los polisacáridos capsulares se producen cultivando cada serotipo de *S. pneumoniae* en un medio (por ejemplo, en un medio a base de soja), los polisacáridos se preparan entonces a partir del cultivo bacteriano. Las cepas bacterianas de *S. pneumoniae* utilizadas para fabricar los respectivos polisacáridos que se emplean en los glucoconjugados de la invención pueden obtenerse a partir de colecciones de cultivos establecidas o de muestras clínicas.

La población del organismo (cada serotipo de *S. pneumoniae*) a menudo se escala de un vial semilla a frascos semilla y se pasa a través de uno o más fermentadores semilla de volumen creciente hasta que se alcanzan volúmenes de fermentación a escala de producción. Al final del ciclo de crecimiento, las células se lisan y el caldo lisado se recoge

para su procesamiento posterior (purificación) (véase, por ejemplo, el documento WO 2006/110381, el documento WO 2008/118752y las Publicaciones de Solicitud de Patente de EE. UU. Nos. 2006/0228380, 2006/0228381, 2008/0102498 y 2008/0286838).

5 Los polisacáridos individuales se purifican típicamente mediante centrifugación, precipitación, ultrafiltración y/o cromatografía en columna (véase por ejemplo los documentos WO 2006/110352 y WO 2008/118752).

10 Los polisacáridos purificados pueden activarse (p. ej., químicamente) para hacerlos capaces de reaccionar (por ejemplo, directamente a la proteína portadora o a través de un enlazador como un espaciador eTEC) y luego incorporarse a los glucoconjugados de la invención, como se describe más adelante en el presente documento.

Los polisacáridos capsulares de *S. pneumoniae* comprenden unidades oligosacáridas repetidas que pueden contener hasta 8 residuos de azúcar.

15 En una realización, el sacárido capsular de la invención puede ser una unidad de oligosacárido, o una cadena de sacárido de longitud más corta que la nativa de unidades de oligosacárido repetitivas. En una realización, el sacárido capsular de la invención es una unidad de oligosacárido repetitiva del serotipo pertinente.

20 En una realización, los sacáridos capsulares de la invención pueden ser oligosacáridos. Los oligosacáridos tienen un bajo número de unidades repetidas (típicamente de 5 a 15 unidades repetidas) y típicamente se derivan sintéticamente o por hidrólisis de polisacáridos.

25 Sin embargo, preferentemente, todos los sacáridos capsulares de la presente invención y en las composiciones inmunogénicas de la presente invención son polisacáridos. Los polisacáridos capsulares de alto peso molecular pueden inducir ciertas respuestas inmunitarias de anticuerpos debido a los epítomos presentes en la superficie antigénica. El aislamiento y la purificación de polisacáridos capsulares de alto peso molecular se contemplan preferentemente para su uso en los conjugados, composiciones y procedimientos de la presente invención.

30 En algunas realizaciones, los polisacáridos purificados antes de la conjugación tienen un peso molecular de entre 5 kDa y 4.000 kDa. En otras realizaciones de este tipo, el polisacárido tiene un peso molecular 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; 100 kDa y 2000 kDa; entre 100 kDa y 1500 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.

40 En otras realizaciones, el polisacárido capsular tiene un peso molecular comprendido entre 70 kDa y 150 kDa; 80 kDa y 160 kDa; 90 kDa y 250 kDa; 100 kDa y 1.000; 100 kDa y 500 kDa 100 kDa a 400 kDa; 100 kDa a 160 kDa; 150 kDa a 600 kDa; 200 kDa a 1.000 kDa; 200 kDa a 600 kDa; 200 kDa a 400 kDa; 300 kDa a 1.000 kDa; 300 kDa a 600 kDa; 300 kDa a 500 kDa o 500 kDa a 600 kDa. Cualquier número entero completo en cualquiera de los anteriores intervalos se contempla como una realización de la divulgación.

45 Un polisacárido puede reducirse ligeramente de tamaño durante los procedimientos normales de purificación. Además, como se describe en el presente documento, el polisacárido puede someterse a técnicas de dimensionamiento antes de la conjugación. Puede emplearse un encolado mecánico o químico. La hidrólisis química puede realizarse con ácido acético. El calibrado mecánico puede realizarse mediante cizallamiento por homogeneización a alta presión. Los intervalos de pesos moleculares mencionados se refieren a polisacáridos purificados antes de la conjugación (por ejemplo, antes de la activación).

50 En una realización preferida, los polisacáridos purificados son polisacáridos capsulares de los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 15C, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F o 33F de *S. pneumoniae*, en los que el polisacárido capsular tiene un peso molecular comprendido en uno de los intervalos de peso molecular descritos anteriormente.

55 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "peso molecular" del polisacárido o del conjugado proteína portadora-polisacárido se refiere al peso molecular calculado por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) combinada con detector de dispersión de luz láser multiángulo (MALLS).

60 En algunas realizaciones, los sacáridos neumocócicos de los serotipos 9V, 18C, 11A, 15B, 22F y/o 33F de la invención son O-acetilados. En algunas realizaciones, los sacáridos neumocócicos de los serotipos 9V, 11A, 15B, 22F y/o 33F de la invención son O-acetilados.

65 El grado de O-acetilación del polisacárido puede determinarse por cualquier procedimiento conocido en la técnica, por ejemplo, por RMN de protones (véase por ejemplo Lemercinier et al. (1996) Carbohydrate Research 296:83-96, Jones et al. (2002) J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis 30:1233-1247, los documentos WO 2005/033148 y WO

00/56357). Otro procedimiento usado comúnmente se describe en Hestrin (1949) J. Biol. Chem. 180:249-261. Preferentemente, la presencia de grupos O-acetilo se determina mediante análisis ion-HPLC.

Los polisacáridos purificados descritos en el presente documento se activan químicamente para que los sacáridos sean capaces de reaccionar con la proteína portadora. Estos conjugados neumocócicos se preparan mediante procedimientos separados y se formulan en una formulación de dosis única como se describe a continuación.

1.3 Glicoconjugados de la invención

Los sacáridos purificados se activan químicamente para hacer que los sacáridos (es decir, sacáridos activados) puedan reaccionar con la proteína portadora, ya sea directamente o a través de un enlazador. Una vez activado, cada sacárido capsular se conjuga por separado con una proteína portadora para formar un glicoconjugado. En una realización, cada sacárido capsular se conjuga con la misma proteína portadora. La activación química de los sacáridos y la posterior conjugación con la proteína portadora se pueden lograr mediante los procedimientos de activación y conjugación divulgados en el presente documento.

Los polisacáridos capsulares de los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 15C, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y/o 33F de *S. pneumoniae* se preparan como se ha divulgado anteriormente.

En una realización, los polisacáridos se activan con 1-ciano-4-dimetilamino piridinio tetrafluoroborato (CDAP) para formar un éster de cianato. A continuación, el polisacárido activado se acopla directamente o a través de un grupo espaciador (enlazador) a un grupo amino en la proteína portadora (preferentemente CRM₁₉₇). Por ejemplo, el espaciador podría ser cistamina o cisteamina para dar un polisacárido tiolado que podría acoplarse al portador a través de un enlace tioéter obtenido después de la reacción con una proteína portadora activada por maleimida (por ejemplo, usando éster de N-[γ-maleimidobutirilo]succinimida (GMBS)) o una proteína portadora haloacetilada (por ejemplo, utilizando yodoacetimida, N-succinimidilbromoacetato (SBA; SIB), N-succinimidil(4-yodoacetil)aminobenzoato (SIAB), sulfosuccinimidil(4-yodoacetil)aminobenzoato (sulfo-SIAB), yodoacetato de N-succinimidilo (SIA) o 3-[bromoacetamido]propionato de succinimidilo (SBAP)). Preferentemente, el éster de cianato (preparado opcionalmente por química CDAP) se acopla con hexanodiamina o dihidrazida de ácido adípico (ADH) y el sacárido derivado de amino se conjuga con la proteína portadora (por ejemplo, CRM₁₉₇) usando carbodiimida (por ejemplo, EDAC o EDC) química a través de un grupo carboxilo en la proteína portadora. Tales conjugados se describen, por ejemplo, en los documentos WO 93/15760, WO 95/08348 y WO 96/129094.

En una realización de la presente invención, los glicoconjugados de los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 15C, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y/o 33F de *S. pneumoniae* se preparan utilizando la química CDAP. En una realización de la presente invención, los glicoconjugados de los serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 14, 18C, 19F y 23F de *S. pneumoniae* se preparan utilizando la química CDAP. En una realización de la presente invención, los glicoconjugados de los serotipos 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 14, 18C, 19F y 23F de *S. pneumoniae* se preparan utilizando la química CDAP. En una realización de la presente invención, los glicoconjugados de los serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F de *S. pneumoniae* se preparan utilizando la química CDAP. En una realización de la presente invención, los glicoconjugados de los serotipos 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F de *S. pneumoniae* se preparan mediante química CDAP. En una realización de la presente invención, los glicoconjugados de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F de *S. pneumoniae* se preparan utilizando la química CDAP.

Otras técnicas adecuadas para la conjugación usan carbodiimidas, hidrazidas, ésteres activos, norborano, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S-NHS, EDC, TSTU. Muchos de ellos se describen en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional No. WO 98/42721. La conjugación puede implicar un enlazador de carbonilo que puede formarse por reacción de un grupo hidroxilo libre del sacárido con CDI (véase Bethell et al. (1979) 1. Biol. Chem. 254:2572-2574; Hearn et al. (1981) J. Chromatogr. 218:509-518) seguida de reacción con una proteína para formar un enlace 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.

En una realización preferida, al menos uno de los polisacáridos capsulares de los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 15C, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F de *S. pneumoniae* se conjuga con la proteína portadora mediante aminación reductora (tal como se describe en las Publicaciones de Solicitud de Patente de EE. UU. Nos. 2006/0228380, 2007/184072, 2007/0231340 y 2007/0184071, los documentos WO 2006/110381, WO 2008/079653y WO 2008/143709).

En una realización de la presente invención, el glicoconjugado de serotipo 6A de *S. pneumoniae* se prepara por aminación reductora. En una realización de la presente invención, el glicoconjugado de serotipo 19A de *S. pneumoniae* se prepara por aminación reductora. En una realización de la presente invención, el glicoconjugado de serotipo 3 de *S. pneumoniae* se prepara mediante aminación reductora. En una realización de la presente invención, los glicoconjugados de los serotipos 6A y 19A de *S. pneumoniae* se preparan mediante aminación reductora. En una

realización de la presente invención, los glicoconjugados de los serotipos 3, 6A y 19A de *S. pneumoniae* se preparan mediante aminación reductora.

En una realización preferida de la presente invención, los glicoconjugados de los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F de *S. pneumoniae* se preparan mediante aminación reductora. En una realización de la presente invención, los glicoconjugados de los serotipos 1, 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F de *S. pneumoniae* se preparan mediante aminación reductora. En una realización de la presente invención, los glicoconjugados de los serotipos 1, 4, 5, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F de *S. pneumoniae* se preparan mediante aminación reductora. En una realización de la presente invención, los glicoconjugados de los serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F de *S. pneumoniae* se preparan mediante aminación reductora. En una realización de la presente invención, los glicoconjugados de los serotipos 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F de *S. pneumoniae* se preparan mediante aminación reductora. En una realización de la presente invención, los glicoconjugados de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F de *S. pneumoniae* se preparan por aminación reductora.

En otra realización preferida, los glicoconjugados de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F y 23F de *S. pneumoniae* se preparan por aminación reductora.

En otra realización preferida, los glicoconjugados de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F y 23F de *S. pneumoniae* se preparan por aminación reductora.

En otra realización preferida, los glicoconjugados de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F y 23F de *S. pneumoniae* se preparan por aminación reductora.

En otra realización preferida, los glicoconjugados de los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F de *S. pneumoniae* se preparan por aminación reductora.

En otra realización preferida, los glicoconjugados de los serotipos 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F de *S. pneumoniae* se preparan por aminación reductora.

En otra realización preferida, los glicoconjugados de los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 15C, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F de *S. pneumoniae* se preparan por aminación reductora.

La aminación reductora implica dos pasos, (1) oxidación del polisacárido, (2) reducción del polisacárido activado y una proteína portadora para formar un conjugado. Antes de la oxidación, el polisacárido se hidroliza opcionalmente. Puede emplearse la hidrólisis mecánica o química. La hidrólisis química puede realizarse con ácido acético. El paso de oxidación puede implicar la reacción con periodato. A efectos de la presente invención, el término "periodato" incluye tanto el periodato como el ácido periódico; el término también incluye tanto el metaperiodato (IO_4^-) como el ortoperiodato (IO_6^{5-}) e incluye las diversas sales de periodato (por ejemplo, periodato sódico y periodato potásico). En una realización, el polisacárido capsular se oxida en presencia de metaperiodato, preferentemente en presencia de periodato sódico (NaIO_4). En otra realización, el polisacárido capsular se oxida en presencia de ortoperiodato, preferentemente en presencia de ácido periódico.

En una realización, el agente oxidante es un compuesto radical nitroxilo o nitróxido estable, tal como los compuestos piperidina-N-oxi o pirrolidina-N-oxi, en presencia de un oxidante para oxidar selectivamente hidroxilos primarios (como se describe en el documento WO 2014/097099). En dicha reacción, el oxidante propiamente dicho es la sal de N-oxoamonio, en un ciclo catalítico. En un aspecto, dichos compuestos radicales nitroxilo o nitróxido estables son compuestos de piperidina-N-oxi o pirrolidina-N-oxi. En un aspecto, dicho compuesto radical nitroxilo o nitróxido estable lleva una fracción TEMPO (2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi) o PROXYL (2,2,5,5-tetrametil-1-pirrolidiniloxi). En un aspecto, dicho compuesto de radical nitroxilo estable es TEMPO o un derivado del mismo. En un aspecto, dicho oxidante es una molécula que lleva un resto N-halo. En un aspecto, dicho oxidante se selecciona entre el 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 diiodoisocianúrico y 1,3,5-triiodo-1,3,5-triazinano-2,4,6-triona. Preferentemente, dicho oxidante es N-Clorosuccinimida.

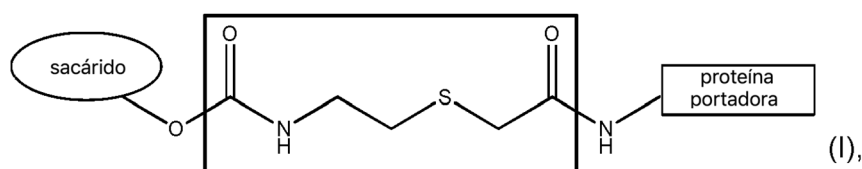
En una realización preferida, los polisacáridos capsulares de los serotipos 12F de *S. pneumoniae* se conjugan con la proteína portadora mediante aminación reductora, en la que el agente oxidante es el radical libre 2,2,6,6-Tetrametil-1-piperidiniloxi (TEMPO) y la N-clorosuccinimida (NCS) como cooxidante (como se describe en el documento WO 2014/097099). Por lo tanto, en un aspecto, los glicoconjugados de serotipo 12F de *S. pneumoniae* se pueden obtener mediante un procedimiento que comprende los pasos de: a) hacer reaccionar un sacárido 12F 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 portadora que comprende uno o más grupos amina (dicho procedimiento se denomina "aminación reductora TEMPO/NCS" en lo sucesivo).

- Opcionalmente, la reacción de oxidación se enfría mediante la adición de un agente de enfriamiento. El agente de enfriamiento puede seleccionarse entre dioles vicinales, 1,2-aminoalcoholes, aminoácidos, glutatión, sulfito, bisulfato, ditionito, metabisulfito, tiosulfato, fosfitos, hipofosfitos o ácido fosforoso (tal como glicerol, etilenglicol, propan-1,2-diol, butan-1,2-diol o butan-2,3-diol, ácido ascórbico).
- Tras el paso de oxidación del polisacárido, se dice que el polisacárido está activado y se denomina "polisacárido activado" en lo sucesivo. El polisacárido activado y la proteína portadora pueden liofilizarse (liofilizarse), ya sea de forma independiente (liofilización discreta) o conjunta (coliofilización). En una realización, el polisacárido activado y la proteína portadora están coliofilizados. En otra realización, el polisacárido activado y la proteína portadora se liofilizan independientemente.
- En una realización, la liofilización se lleva a cabo en presencia de un azúcar no reductor, los posibles azúcares no reductores incluyen sacarosa, trehalosa, rafinosa, estaquiosa, melezitosa, dextrano, manitol, lactitol y palatinit.
- El segundo paso del procedimiento de conjugación es la reducción del polisacárido activado y una proteína portadora para formar un conjugado (la llamada aminación reductora), utilizando un agente reductor. Entre los agentes reductores adecuados se encuentran los cianoborohidruros (tal como el cianoborohidruro sódico, el triacetoxiborohidruro sódico o el borohidruro sódico o de cinc en presencia de ácidos de Bronsted o de Lewis), boranos de aminas tales como borano de piridina, borano de 2-picolina, 2,6-diborano-metanol, borano de dimetilamina, t-BuMePrN-BH₃, borano de bencilamina-BH₃ o borano de 5-etil-2-metilpiridina (PEMB) o la resina de intercambio de borohidruros. En una realización, el agente reductor es cianoborohidruro de sodio.
- En una realización, la reacción de reducción se lleva a cabo en un disolvente acuoso (por ejemplo, seleccionado de PBS, MES, HEPES, Bis-tris, ADA, PIPES, MOPSO, BES, MOPS, DIPSO, MOBS, HEPPSO, POPSO, TEA, EPPS, Bicina o HEPB, a un pH comprendido entre 6,0 y 8,5, 7,0 y 8,0, o 7,0 y 7,5), en otra realización la reacción se lleva a cabo en disolvente aprótico. En una realización, la reacción de reducción se lleva a cabo en DMSO (dimetilsulfóxido) o en DMF (dimetilformamida). El disolvente DMSO o DMF puede utilizarse para reconstituir el polisacárido activado y la proteína portadora que se ha liofilizado.
- Al final de la reacción de reducción, pueden quedar grupos aldehídos sin reaccionar en los conjugados, que pueden taparse con un agente de tapado adecuado. En una realización, este agente taponador es borohidruro sódico (NaBH₄).
- Tras la conjugación (la reacción de reducción y, opcionalmente, el recubrimiento), los glucoconjugados pueden purificarse (enriquecerse con respecto a la cantidad de conjugado polisacárido-proteína) mediante diversas técnicas conocidas por el experto. Estas técnicas incluyen la diálisis, las operaciones de concentración/diafiltración, la precipitación/elución por filtración de flujo tangencial, la cromatografía en columna (DEAE o cromatografía de interacción hidrofóbica) y la filtración en profundidad. En una realización, los glicoconjugados se purifican mediante diafiltración o cromatografía de intercambio iónico o cromatografía de exclusión por tamaño.
- En una realización, los glicoconjugados son filtrados estérilmente.
- En una realización de la presente invención, los glicoconjugados de los serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 14, 18C, 19F y 23F de *S. pneumoniae* se preparan mediante química CDAP y el glicoconjugado del serotipo 6A de *S. pneumoniae* se prepara mediante aminación reductora.
- En una realización de la presente invención, los glicoconjugados de los serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 14, 18C, 19F y 23F de *S. pneumoniae* se preparan mediante química CDAP y el glicoconjugado del serotipo 19A de *S. pneumoniae* se prepara mediante aminación reductora.
- En una realización de la presente invención, los glicoconjugados de los serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 14, 18C, 19F y 23F de *S. pneumoniae* se preparan mediante química CDAP y los glicoconjugados de los serotipos 6A y 19A de *S. pneumoniae* se preparan mediante aminación reductora.
- En una realización de la presente invención, los glicoconjugados de los serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 14, 18C, 19F y 23F de *S. pneumoniae* se preparan mediante química CDAP y los glicoconjugados de los serotipos 3, 6A y 19A de *S. pneumoniae* se preparan mediante aminación reductora.
- En una realización de la presente invención, los glicoconjugados de los serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 14, 18C, 19F, 22F y 23F de *S. pneumoniae* se preparan mediante química CDAP y el glicoconjugado del serotipo 6A de *S. pneumoniae* se prepara mediante aminación reductora.
- En una realización de la presente invención, los glicoconjugados de los serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 14, 18C, 19F, 22F y 23F de *S. pneumoniae* se preparan mediante química CDAP y el glicoconjugado del serotipo 19A de *S. pneumoniae* se prepara mediante aminación reductora.

En una realización de la presente invención, los glicoconjugados de los serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 14, 18C, 19F, 22F y 23F de *S. pneumoniae* se preparan mediante química CDAP y los glicoconjugados de los serotipos 6A y 19A de *S. pneumoniae* se preparan mediante aminación reductora.

En una realización de la presente invención, los glicoconjugados de los serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 14, 18C, 19F, 22F y 23F de *S. pneumoniae* se preparan mediante química CDAP y los glicoconjugados de los serotipos 3, 6A y 19A de *S. pneumoniae* se preparan mediante aminación reductora.

En una realización, los glicoconjugados de la invención se preparan utilizando la conjugación eTEC, tal como se describe en el documento WO 2014/027302. Dichos glicoconjugados comprenden un sacárido conjugado covalentemente con una proteína portadora a través de uno o más espaciadores eTEC, donde el sacárido está conjugado covalentemente con el espaciador eTEC a través de un enlace carbamato, y en donde la proteína portadora está conjugada covalentemente con el espaciador eTEC a través de un enlace amida. Los glicoconjugados unidos a eTEC de la invención se pueden representar mediante la fórmula general (I):



donde los átomos que componen el espaciador eTEC están contenidos en la caja central.

El espaciador eTEC incluye siete átomos lineales (es decir, $-C(O)NH(CH_2)_2SCH_2C(O)-$) y proporciona enlaces tioéter y amida estables entre el sacárido y la proteína portadora. La síntesis del glicoconjugado unido a eTEC implica la reacción de un grupo hidroxilo activado del sacárido con el grupo amino de un reactivo de tioalquilamina, por ejemplo, cistamina o cisteinamina o una de sus sales, formando un enlazador carbamato con el sacárido para proporcionar un sacárido tiolado. La generación de uno o más grupos sulfhidrilo libres se logra por reacción con un agente reductor para proporcionar un sacárido tiolado activado. La reacción de los grupos sulfhidrilo libres del sacárido tiolado activado con una proteína portadora activada que tiene uno o más grupos α -haloacetamida en residuos que contienen amina genera un enlace tioéter para formar el conjugado, en donde la proteína portadora se une al espaciador eTEC a través de un enlace amida.

En dichos glicoconjugados de la invención, el sacárido puede ser un polisacárido o un oligosacárido. La proteína portadora puede seleccionarse de entre cualquier portador adecuado descrito en el presente documento o conocido por los expertos en la técnica. En realizaciones frecuentes, el sacárido es un polisacárido. En algunas de tales realizaciones, la proteína portadora es CRM₁₉₇. En algunas de estas realizaciones, el glicoconjugado enlazado con eTEC comprende un polisacárido capsular de serotipo 33F de *S. pneumoniae*.

En realizaciones particularmente preferidas, el glicoconjugado enlazado con eTEC comprende un polisacárido capsular neumocócico del serotipo 33F (Pn33F), que se conjuga covalentemente con CRM₁₉₇ a través de un espaciador eTEC (glicoconjugados enlazados con eTEC del serotipo 33F).

En algunas realizaciones, los glicoconjugados de los serotipos 1, 7F, 9V y/o 18C de *S. pneumoniae* de la invención son O-acetilados. En algunas realizaciones, el glicoconjugado de los serotipos 1, 7F y 9V de *S. pneumoniae* está O-acetilado y el glicoconjugado del serotipo 18C de *S. pneumoniae* está des-O-acetilado.

En algunas realizaciones, el glicoconjugado de serotipo 1 de *S. pneumoniae* comprende un sacárido que tiene un grado de O-acetilación de entre 10 y 100 %, entre 20 y 100 %, entre 30 y 100 %, entre 40 y 100 %, entre 50 y 100 %, entre 60 y 100 %, entre 70 y 100 %, entre 75 y 100 %, 80 y 100 %, 90 y 100 %, 50 y 90 %, 60 y 90 %, 70 y 90 % o 80 y 90 %. En otras realizaciones, el grado de O-acetilación es ≥ 10 %, ≥ 20 %, ≥ 30 %, ≥ 40 %, ≥ 50 %, ≥ 60 %, ≥ 70 %, ≥ 80 %, ≥ 90 %, o aproximadamente el 100 %.

En algunas realizaciones, el glicoconjugado de serotipo 7F de *S. pneumoniae* comprende un sacárido que tiene un grado de O-acetilación de entre 10 y 100 %, entre 20 y 100 %, entre 30 y 100 %, entre 40 y 100 %, entre 50 y 100 %, entre 60 y 100 %, entre 70 y 100 %, entre 75 y 100 %, 80 y 100 %, 90 y 100 %, 50 y 90 %, 60 y 90 %, 70 y 90 % o 80 y 90 %. En otras realizaciones, el grado de O-acetilación es ≥ 10 %, ≥ 20 %, ≥ 30 %, ≥ 40 %, ≥ 50 %, ≥ 60 %, ≥ 70 %, ≥ 80 %, ≥ 90 %, o aproximadamente el 100 %.

En algunas realizaciones, el glicoconjugado de serotipo 9V de *S. pneumoniae* comprende un sacárido que tiene un grado de O-acetilación de entre 10 y 100 %, entre 20 y 100 %, entre 30 y 100 %, entre 40 y 100 %, entre 50 y 100 %, entre 60 y 100 %, entre 70 y 100 %, entre 75 y 100 %, 80 y 100 %, 90 y 100 %, 50 y 90 %, 60 y 90 %, 70 y 90 % o 80 y 90 %. En otras realizaciones, el grado de O-acetilación es ≥ 10 %, ≥ 20 %, ≥ 30 %, ≥ 40 %, ≥ 50 %, ≥ 60 %, ≥ 70 %, ≥ 80 %, ≥ 90 %, o aproximadamente el 100 %.

entre 60 y 100%, entre 70 y 100%, entre 75 y 100%, 80 y 100%, 90 y 100%, 50 y 90%, 60 y 90%, 70 y 90% o 80 y 90%. En otras realizaciones, el grado de O-acetilación es $\geq 10\%$, $\geq 20\%$, $\geq 30\%$, $\geq 40\%$, $\geq 50\%$, $\geq 60\%$, $\geq 70\%$, $\geq 80\%$, o $\geq 90\%$, o aproximadamente el 100 %.

- 5 En algunas realizaciones, el glicoconjugado de serotipo 18C de *S. pneumoniae* comprende un sacárido que tiene un grado de O-acetilación de entre 10 y 100 %, entre 20 y 100 %, entre 30 y 100 %, entre 40 y 100 %, entre 50 y 100%, entre 60 y 100%, entre 70 y 100%, entre 75 y 100%, 80 y 100%, 90 y 100%, 50 y 90%, 60 y 90%, 70 y 90% o 80 y 90%. En otras realizaciones, el grado de O-acetilación es $\geq 10\%$, $\geq 20\%$, $\geq 30\%$, $\geq 40\%$, $\geq 50\%$, $\geq 60\%$, $\geq 70\%$, $\geq 80\%$, o $\geq 90\%$, o aproximadamente el 100 %. Sin embargo, es preferible que el glucoconjugado de serotipo 18C de *S. pneumoniae* esté desacetilado.
- 10 En algunas de dichas realizaciones, el glicoconjugado de serotipo 18C de *S. pneumoniae* comprende un sacárido que tiene un grado de O-acetilación de entre 0 y 50%, entre 0 y 40%, entre 0 y 30%, entre 0 y 20%, entre 0 y 10%, entre 0 y 5%, o entre 0 y 2%. En otras realizaciones, el grado de O-acetilación es $\leq 50\%$, $\leq 40\%$, $\leq 30\%$, $\leq 20\%$, $\leq 10\%$, $\leq 5\%$, $\leq 2\%$ o $\leq 1\%$.

- 15 Por % de O-acetilación se entiende el porcentaje de un sacárido dado con respecto al 100% (donde cada unidad de repetición está totalmente acetilada con respecto a su estructura acetilada).

- En algunas realizaciones, los glicoconjugados de la presente invención comprenden un sacárido que tiene un peso molecular de entre 10 kDa y 2.000 kDa. En otras de estas realizaciones, el sacárido tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 1.000 kDa. En otras de estas realizaciones, el sacárido tiene un peso molecular de entre 70 kDa y 900 kDa. En otras de estas realizaciones, el sacárido tiene un peso molecular de entre 100 kDa y 800 kDa. En otras de estas realizaciones, el sacárido tiene un peso molecular de entre 200 kDa y 600 kDa. En otras realizaciones, el sacárido tiene un peso molecular de 100 kDa a 1.000 kDa; 100 kDa a 900 kDa; 100 kDa a 800 kDa; 100 kDa a 700 kDa; 100 kDa a 600 kDa; 100 kDa a 500 kDa; 100 kDa a 400 kDa; 100 kDa a 300 kDa; 150 kDa a 1.000 kDa; 150 kDa a 900 kDa; 150 kDa a 800 kDa; 150 kDa a 700 kDa; 150 kDa a 600 kDa; 150 kDa a 500 kDa; 150 kDa a 400 kDa; 150 kDa a 300 kDa; 200 kDa a 1.000 kDa; 200 kDa a 900 kDa; 200 kDa a 800 kDa; 200 kDa a 700 kDa; 200 kDa a 600 kDa; 200 kDa a 500 kDa; 200 kDa a 400 kDa; 200 kDa a 300; 250 kDa a 1.000 kDa; 250 kDa a 900 kDa; 250 kDa a 800 kDa; 250 kDa a 700 kDa; 250 kDa a 600 kDa; 250 kDa a 500 kDa; 250 kDa a 400 kDa; 250 kDa a 350 kDa; 300 kDa a 1.000 kDa; 300 kDa a 900 kDa; 300 kDa a 800 kDa; 300 kDa a 700 kDa; 300 kDa a 600 kDa; 300 kDa a 500 kDa; 300 kDa a 400 kDa; 400 kDa a 1.000 kDa; 400 kDa a 900 kDa; 400 kDa a 800 kDa; 400 kDa a 700 kDa; 400 kDa a 600 kDa; 500 kDa a 600 kDa. Cualquier número entero completo en cualquiera de los anteriores intervalos se contempla como una realización de la divulgación. En algunas realizaciones, el glicoconjugado se prepara mediante aminación reductora.

- 35 En algunas realizaciones, el glicoconjugado de la invención tiene un peso molecular de entre 400 kDa y 15.000 kDa; entre 500 kDa y 10.000 kDa; entre 2.000 kDa y 10.000 kDa; entre 3.000 kDa y 8.000 kDa; o entre 3.000 kDa y 5.000 kDa. En otras realizaciones, el glucoconjugado tiene un peso molecular de entre 500 kDa y 10.000 kDa. En otras realizaciones, el glicoconjugado tiene un peso molecular de entre 1.000 kDa y 8.000 kDa. En aún otras realizaciones, el glicoconjugado tiene un peso molecular de entre 2.000 kDa y 8.000 kDa o entre 3.000 kDa y 7.000 kDa. En realizaciones adicionales, el glicoconjugado de la invención tiene un peso molecular de entre 200 kDa y 20.000 kDa; entre 200 kDa y 15.000 kDa; entre 200 kDa y 10.000 kDa; entre 200 kDa y 7500 kDa; entre 200 kDa y 5000 kDa; entre 200 kDa y 3000 kDa; entre 200 kDa y 1000 kDa; entre 500 kDa y 20.000 kDa; entre 500 kDa y 15.000 kDa; entre 500 kDa y 12.500 kDa; entre 500 kDa y 10.000 kDa; entre 500 kDa y 7.500 kDa; entre 500 kDa y 6.000 kDa; entre 500 kDa y 5.000 kDa; entre 500 kDa y 4.000 kDa; entre 500 kDa y 3.000 kDa; entre 500 kDa y 2.000 kDa; entre 500 kDa y 1.500 kDa; entre 500 kDa y 1.000 kDa; entre 750 kDa y 20.000 kDa; entre 750 kDa y 15.000 kDa; entre 750 kDa y 12.500 kDa; entre 750 kDa y 10.000 kDa; entre 750 kDa y 7.500 kDa; entre 750 kDa y 6.000 kDa; entre 750 kDa y 5.000 kDa; entre 750 kDa y 4.000 kDa; entre 750 kDa y 3.000 kDa; entre 750 kDa y 2.000 kDa; entre 750 kDa y 1.500 kDa; entre 1.000 kDa y 15.000 kDa; entre 1.000 kDa y 12.500 kDa; entre 1.000 kDa y 10.000 kDa; entre 1.000 kDa y 7.500 kDa; entre 1.000 kDa y 6.000 kDa; entre 1.000 kDa y 5.000 kDa; entre 1.000 kDa y 4.000 kDa; entre 1.000 kDa y 2.500 kDa; entre 2.000 kDa y 15.000 kDa; entre 2.000 kDa y 12.500 kDa; entre 2.000 kDa y 10.000 kDa; entre 2.000 kDa y 7.500 kDa; entre 2.000 kDa y 6.000 kDa; entre 2.000 kDa y 5.000 kDa; entre 2.000 kDa y 4.000 kDa; o entre 2.000 kDa y 3.000 kDa.

- 55 En otras realizaciones, el glucoconjugado de la invención tiene un peso molecular de entre 3.000 kDa y 20.000 kDa; entre 3.000 kDa y 15.000 kDa; entre 3.000 kDa y 10.000 kDa; entre 3.000 kDa y 7.500 kDa; entre 3.000 kDa y 5.000 kDa; entre 4.000 kDa y 20.000 kDa; entre 4.000 kDa y 15.000 kDa; entre 4.000 kDa y 12.500 kDa; entre 4.000 kDa y 10.000 kDa; entre 4.000 kDa y 7.500 kDa; entre 4.000 kDa y 6.000 kDa; o entre 4.000 kDa y 5.000 kDa.

- 60 En realizaciones adicionales, el glicoconjugado de la invención tiene un peso molecular de entre 5.000 kDa y 20.000 kDa; entre 5.000 kDa y 15.000 kDa; entre 5.000 kDa y 10.000 kDa; entre 5.000 kDa y 7.500 kDa; entre 6.000 kDa y 20.000 kDa; entre 6.000 kDa y 15.000 kDa; entre 6.000 kDa y 12.500 kDa; entre 6.000 kDa y 10.000 kDa o entre 6.000 kDa y 7.500 kDa.

El peso molecular del glicoconjugado se mide por SEC-MALLS. Cualquier número entero completo en cualquiera de los anteriores intervalos se contempla como una realización de la divulgación.

5 En una realización preferida, el glicoconjugado del serotipo 22F de la invención comprende al menos 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6 o 0,7 o aproximadamente 0,8 mM de acetato por mM de polisacárido del serotipo 22F. En una realización preferida, el glicoconjugado comprende al menos 0,5, 0,6 o 0,7 mM de acetato por mM de polisacárido del serotipo 22F. En una realización preferida, el glicoconjugado comprende al menos 0,6 mM de acetato por mM de polisacárido del serotipo 22F. En una realización preferida, el glicoconjugado comprende al menos 0,7 mM de acetato por mM de polisacárido del serotipo 22F.

10 En una realización preferida, el glicoconjugado del serotipo 33F de la invención comprende al menos 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 o 0,8 mM de acetato por mM de polisacárido capsular del serotipo 33F. En una realización preferida, el glicoconjugado comprende al menos 0,5, 0,6 o 0,7 mM de acetato por mM de polisacárido capsular del serotipo 33F. En una realización preferida, el glicoconjugado comprende al menos 0,6 mM de acetato por mM de polisacárido capsular del serotipo 33F. En una realización preferida, el glicoconjugado comprende al menos 0,7 mM de acetato por mM de polisacárido capsular del serotipo 33F. En una realización preferida, la presencia de grupos O-acetilo se determina mediante análisis ion-HPLC.

15 En una realización preferida, el glicoconjugado del serotipo 15B de la invención comprende al menos 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 o 0,8 mM de acetato por mM de polisacárido capsular del serotipo 15B. En una realización preferida, el glicoconjugado comprende al menos 0,5, 0,6 o 0,7 mM de acetato por mM de polisacárido capsular del serotipo 15B. En una realización preferida, el glicoconjugado comprende al menos 0,6 mM de acetato por mM de polisacárido capsular del serotipo 15B. En una realización preferida, el glicoconjugado comprende al menos 0,7 mM de acetato por mM de polisacárido capsular del serotipo 15B. En una realización preferida, la presencia de grupos O-acetilo se determina mediante análisis ion-HPLC.

20 En una realización preferida, el glicoconjugado del serotipo 15B de la invención comprende al menos 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 o 0,8 mM de glicerol por mM de polisacárido capsular del serotipo 15B. En una realización preferida, el glucoconjugado del serotipo 15B de la invención comprende al menos 0,5, 0,6 o 0,7 mM de glicerol por mM de polisacárido capsular del serotipo 15B. En una realización preferida, el glicoconjugado del serotipo 15B de la invención comprende al menos 0,6 mM de glicerol por mM de polisacárido capsular del serotipo 15B. En una realización preferida, el glicoconjugado del serotipo 15B de la invención comprende al menos 0,7 mM de glicerol por mM de polisacárido capsular del serotipo 15B.

25 En una realización preferida, el glicoconjugado del serotipo 11A de la invención comprende al menos 0,3, 0,5, 0,6, 1,0, 1,4, 1,8, 2,2, 2,6, 3,0, 3,4, 3,8, 4,2, 4,6 o aproximadamente 5,0 mM de acetato por mM de polisacárido del serotipo 11A. En una realización preferida, el glicoconjugado del serotipo 11A comprende al menos 1,8, 2,2 o 2,6 mM de acetato por mM de polisacárido del serotipo 11A. En una realización, el glicoconjugado comprende al menos 0,6 mM de acetato por mM de polisacárido del serotipo 11A. En una realización preferida, el glicoconjugado del serotipo 11A de la invención comprende al menos 0,6, 1,0, 1,4, 1,8, 2,2, 2,6, 3,0, 3,4, 3,8, 4,2 o aproximadamente 4,6 mM de acetato por mM de polisacárido del serotipo 11A y menos de aproximadamente 5,0 mM de acetato por mM de polisacárido del serotipo 11A. En una realización, el glicoconjugado del serotipo 11A de la invención comprende al menos 0,6, 1,0, 1,4, 1,8, 2,2, 2,6, o aproximadamente 3,0 mM de acetato por mM de polisacárido del serotipo 11A y menos de aproximadamente 3,4 mM de acetato por mM de polisacárido del serotipo 11A. En una realización, el glicoconjugado del serotipo 11A de la invención comprende al menos 0,6, 1,0, 1,4, 1,8, 2,2, 2,6, o aproximadamente 3,0 mM de acetato por mM de polisacárido del serotipo 11A y menos de aproximadamente 3,3 mM de acetato por mM de polisacárido del serotipo 11A. Cualquiera de los números anteriores se contempla como una realización de la divulgación.

30 En una realización preferida, el glicoconjugado del serotipo 11A de la invención comprende al menos 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 o aproximadamente 1,0 mM de glicerol por mM de polisacárido del serotipo 11A. En una realización preferida, el glicoconjugado del serotipo 11A comprende al menos 0,2, 0,3 o 0,4 mM de glicerol por mM de polisacárido del serotipo 11A. En una realización preferida, el glicoconjugado del serotipo 11A de la invención comprende al menos 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 o aproximadamente 0,9 mM de glicerol por mM de polisacárido del serotipo 11A y menos de aproximadamente 1,0 mM de glicerol por mM de polisacárido del serotipo 11A. En una realización preferida, el glicoconjugado del serotipo 11A de la invención comprende al menos 0,3, 0,4, 0,5, 0,6 o aproximadamente 0,7 mM de glicerol por mM de polisacárido del serotipo 11A y menos de aproximadamente 0,8 mM de glicerol por mM de polisacárido del serotipo 11A. Cualquiera de los números anteriores se contempla como una realización de la divulgación.

35 Otra forma de caracterizar los glicoconjugados de la invención es por la cantidad de residuos de lisina en la proteína transportadora (por ejemplo, CRM197) que se conjugan con el sacárido que se puede caracterizar como una gama de lisinas conjugadas (grado de conjugación). La evidencia de la modificación de la lisina de la proteína portadora, debida a enlaces covalentes con los polisacáridos, puede obtenerse mediante análisis de aminoácidos utilizando procedimientos rutinarios conocidos por los expertos en la técnica. La conjugación da lugar a una reducción del número de residuos de lisina recuperados, en comparación con el material de partida de proteína portadora utilizado para

generar los materiales conjugados. En una realización preferida, el grado de conjugación del glicoconjugado de la invención está 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 está comprendido entre 4 y 7. En algunas de tales realizaciones, la proteína portadora es CRM₁₉₇.

Los glicoconjugados de la invención también se pueden caracterizar por la relación (peso/peso) de sacárido a proteína portadora. En algunas realizaciones, la relación de polisacárido a la proteína portadora en el glicoconjugado (p/p) está entre 0,5 y 3 (por ejemplo, aproximadamente 0,5, aproximadamente 0,6, aproximadamente 0,7, aproximadamente 0,8, aproximadamente 0,9, aproximadamente 1,0, aproximadamente 1,1, aproximadamente 1,2, aproximadamente 1,3, aproximadamente 1,4, aproximadamente 1,5, aproximadamente 1,6, aproximadamente 1,7, aproximadamente 1,8, aproximadamente 1,9, aproximadamente 2,0, aproximadamente 2,1, aproximadamente 2,2, aproximadamente 2,3, aproximadamente 2,4, aproximadamente 2,5, aproximadamente 2,6, aproximadamente 2,7, aproximadamente 2,8, aproximadamente 2,9 o aproximadamente 3,0). En otras realizaciones, la relación sacárido a proteína portadora (p/p) está entre 0,5 y 2,0, entre 0,5 y 1,5, entre 0,8 y 1,2, entre 0,5 y 1,0, entre 1,0 y 1,5 o entre 1,0 y 2,0. En realizaciones adicionales, la relación de sacárido a proteína portadora (p/p) está entre 0,8 y 1,2. En una realización preferida, la relación del polisacárido capsular a la proteína portadora en el conjugado está entre 0,9 y 1,1. En algunas de tales realizaciones, la proteína portadora es CRM₁₉₇.

Los glicoconjugados y las composiciones inmunogénicas de la invención pueden contener sacárido libre que no está conjugado covalentemente con la proteína portadora, pero que, sin embargo, está presente en la composición de glicoconjugado. El sacárido libre puede estar asociado de manera no covalente con (es decir, unido de manera no covalente a, adsorbido a, o atrapado en o con) el glicoconjugado.

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

Los glicoconjugados también se pueden caracterizar por su distribución de tamaño molecular (K_d). Puede utilizarse un medio de cromatografía de exclusión por tamaño (CL-4B) para determinar la distribución del tamaño molecular relativo del conjugado. La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) se utiliza en columnas alimentadas por gravedad para perfilar la distribución del tamaño molecular de los conjugados. Las moléculas grandes excluidas de los poros del medio eluden más rápidamente que las moléculas pequeñas. Se utilizan colectores de fracciones para recoger el eluido de la columna. Las fracciones se analizan colorimétricamente mediante ensayo de sacáridos. Para la determinación de K_d , las columnas se calibran para establecer la fracción en la que las moléculas están totalmente excluidas (V_0), ($K_d=0$), y la fracción que representa la retención máxima (V_i), ($K_d=1$). La fracción a la que se alcanza un determinado atributo de la muestra (V_e), se relaciona con K_d mediante la expresión, $K_d = (V_e - V_0) / (V_i - V_0)$.

En una realización preferida, al menos 30% del glicoconjugado tiene una K_d inferior o igual a 0,3 en una columna CL-4B. En una realización preferida, al menos 40% del glicoconjugado tiene una K_d inferior o igual a 0,3 en una columna CL-4B. En una realización preferida, al menos 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% u 85% del glicoconjugado tiene una K_d inferior o igual a 0,3 en una columna CL-4B. En una realización preferida, al menos 60% del glicoconjugado tiene una K_d inferior o igual a 0,3 en una columna CL-4B. En una realización preferida, entre 50% y 80% del glicoconjugado tiene una K_d inferior o igual a 0,3 en una columna CL-4B. En una realización preferida, entre 65% y 80% del glicoconjugado tiene una K_d inferior o igual a 0,3 en una columna CL-4B. La frecuencia de unión de la cadena de sacárido a una lisina en la proteína portadora es otro parámetro para caracterizar los glicoconjugados de la invención. Por ejemplo, en algunas realizaciones, hay al menos un enlace covalente entre la proteína portadora y el polisacárido por cada 4 unidades de repetición de sacárido del polisacárido. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se produce al menos un enlace covalente entre la proteína portadora y el polisacárido por cada 10 unidades repetidas de sacárido del polisacárido. En otra realización, el enlace covalente entre la proteína del vehículo y el polisacárido tiene lugar al menos una vez cada 15 unidades de repetición de sacárido del polisacárido. En una realización adicional, el enlace covalente entre la proteína del vehículo y el polisacárido tiene lugar al menos una vez cada 25 unidades de repetición de sacárido del polisacárido.

En realizaciones frecuentes, la proteína de vehículo es CRM₁₉₇ y el enlace covalente a través de un espaciador eTEC entre la CRM₁₉₇ y el polisacárido tiene lugar al menos una vez cada 4, 10, 15 o 25 unidades de repetición de sacárido del polisacárido.

En otras realizaciones, el conjugado comprende al menos un enlace covalente entre la proteína portadora y el sacárido por cada 5 o 10 unidades de repetición de sacárido; cada 2 a 7 unidades de repetición de sacárido; cada 3 a 8 unidades de repetición de sacárido; cada 4 a 9 unidades de repetición de sacárido; cada 6 a 11 unidades de repetición de sacárido; cada 7 a 12 unidades de repetición de sacárido; cada 8 a 13 unidades de repetición de sacárido; cada 9 a 14 unidades de repetición de sacárido; cada 10 a 15 unidades de repetición de sacárido; cada 2 a 6 unidades de repetición de sacárido, cada 3 a 7 unidades de repetición de sacárido; cada 4 a 8 unidades de repetición de sacárido; cada 6 a 10 unidades de repetición de sacárido; cada 7 a 11 unidades de repetición de sacárido; cada 8 a 12 unidades de repetición de sacárido; cada 9 a 13 unidades de repetición de sacárido; cada 10 a 14 unidades de repetición de sacárido; cada 10 a 20 unidades de repetición de sacárido; o cada 4 a 25 unidades de repetición de sacárido. En realizaciones frecuentes, la proteína portadora es CRM₁₉₇.

En otra realización, aparece al menos un enlace entre la proteína de transporte y el sacárido por cada 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 unidades de repetición de sacárido del polisacárido. En una realización, la proteína portadora es CRM₁₉₇. Cualquier número entero completo en cualquiera de los anteriores intervalos se contempla como una realización de la divulgación.

1.4 Combinación de glicoconjugados de la invención

1.4.1 Combinaciones de glucoconjugados

La composición inmunogénica de la invención comprende al menos un glicoconjugado de cada uno de los trece serotipos de *S. pneumoniae* siguientes: 9V, 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 14, 18C, 19A, 19F y 23F.

1.4.2 Combinaciones adicionales de glucoconjugados

En una realización, cualquiera de las composiciones inmunogénicas definidas en el apartado 1.4.1 anterior comprende además al menos un glicoconjugado de serotipo 15B de *S. pneumoniae*.

En una realización, cualquiera de las composiciones inmunogénicas definidas en el apartado 1.4.1 anterior comprende además al menos un glicoconjugado de serotipo 22F de *S. pneumoniae*.

En una realización, cualquiera de las composiciones inmunogénicas definidas en el apartado 1.4.1 anterior comprende además al menos un glicoconjugado de serotipo 33F de *S. pneumoniae*.

En una realización, cualquiera de las composiciones inmunogénicas definidas en el apartado 1.4.1 anterior comprende además al menos un glicoconjugado de serotipo 8 de *S. pneumoniae*.

En una realización, cualquiera de las composiciones inmunogénicas definidas en el apartado 1.4.1 anterior comprende además al menos un glicoconjugado de serotipo 10A de *S. pneumoniae*.

En una realización, cualquiera de las composiciones inmunogénicas definidas en el apartado 1.4.1 anterior comprende además al menos un glicoconjugado de serotipo 11A de *S. pneumoniae*.

En una realización, cualquiera de las composiciones inmunogénicas definidas en el apartado 1.4.1 anterior comprende además al menos un glicoconjugado de serotipo 12F de *S. pneumoniae*.

En una realización, cualquiera de las composiciones inmunogénicas definidas en el apartado 1.4.1 anterior comprende además al menos un glicoconjugado de cada uno de los dos serotipos de *S. pneumoniae* siguientes:

15B y 22F,
15B y 33F,
15B y 12F,
15B y 10A,
15B y 11A,
15B y 8,
22F y 33F,
22F y 12F,
22F y 10A,
22F y 11A,
22F y 8,
33F y 12F,
33F y 10A,
33F y 11A,
33F y 8,
12F y 10A,

- 5 12F y 11A,
 12F y 8,
 10A y 11A,
 10A y 8, o
 11A y 8.

En una realización, cualquiera de las composiciones inmunogénicas definidas en el apartado 1.4.1 anterior comprende además al menos un glicoconjugado de cada uno de los tres serotipos de *S. pneumoniae* siguientes:

- 10 15B y 22F y 33F,
 15B y 22F y 12F,
 15B y 22F y 10A,
 15B y 22F y 11A,
 15B y 22F y 8,
15 15B y 33F y 12F,
 15B y 33F y 10A,
 15B y 33F y 11A,
 15B y 33F y 8,
 15B y 12F y 10A,
20 15B y 12F y 11A,
 15B y 12F y 8,
 15B y 10A y 11A,
 15B y 10A y 8,
 15B y 11A y 8,
25 22F y 33F y 12F,
 22F y 33F y 10A,
 22F y 33F y 11A,
 22F y 33F y 8,
 22F y 12F y 10A,
30 22F y 12F y 11A,
 22F y 12F y 8,
 22F y 10A y 11A,
 22F y 10A y 8,
 22F y 11A y 8,
35 33F y 12F y 10A,
 33F y 12F y 11A,
 33F y 12F y 8,
 33F y 10A y 11A,
 33F y 10A y 8,
40 33F y 11A y 8,
 12F y 10A y 11A,
 12F y 10A y 8,
 12F y 11A y 8, o
 10A y 11A y 8.

- 45 En una realización, cualquiera de las composiciones inmunogénicas definidas en el apartado 1.4.1 anterior comprende además al menos un glicoconjugado de cada uno de los cuatro serotipos de *S. pneumoniae* siguientes:

- 50 15B y 22F y 33F y 12F,
 15B y 22F y 33F y 10A,
 15B y 22F y 33F y 11A,
 15B y 22F y 33F y 8,
 15B y 22F y 12F y 10A,
 15B y 22F y 12F y 11A,
55 15B y 22F y 12F y 8,
 15B y 22F y 10A y 11A,
 15B y 22F y 10A y 8,
 15B y 22F y 11A y 8,
 15B y 33F y 12F y 10A,
60 15B y 33F y 12F y 11A,
 15B y 33F y 12F y 8,
 15B y 33F y 10A y 11A,
 15B y 33F y 10A y 8,
 15B y 33F y 11A y 8,
65 15B y 12F y 10A y 11A,
 15B y 12F y 10A y 8,

- 5 15B y 12F y 11A y 8,
15B y 10A y 11A y 8,
22F y 33F y 12F y 10A,
22F y 33F y 12F y 11A,
22F y 33F y 12F y 8,
22F y 33F y 10A y 11A,
22F y 33F y 10A y 8,
22F y 33F y 11A y 8,
10 22F y 12F y 10A y 11A,
22F y 12F y 10A y 8,
22F y 12F y 11A y 8,
22F y 10A y 11A y 8,
33F y 12F y 10A y 11A,
33F y 12F y 10A y 8,
15 33F y 12F y 11A y 8,
33F y 10A y 11A y 8 o
12F y 10A y 11A y 8.

20 En una realización, cualquiera de las composiciones inmunogénicas definidas en el apartado 1.4.1 anterior comprende además al menos un glicoconjugado de cada uno de los cinco serotipos de *S. pneumoniae* siguientes:

- 25 15B y 22F y 33F y 12F y 10A,
15B y 22F y 33F y 12F y 11A,
15B y 22F y 33F y 12F y 8,
15B y 22F y 33F y 10A y 11A,
15B y 22F y 33F y 10A y 8,
15B y 22F y 33F y 11A y 8,
15B y 22F y 12F y 10A y 11A,
15B y 22F y 12F y 10A y 8,
30 15B y 22F y 12F y 11A y 8,
15B y 22F y 10A y 11A y 8,
15B y 33F y 12F y 10A y 11A,
15B y 33F y 12F y 10A y 8,
15B y 33F y 12F y 11A y 8,
35 15B y 33F y 10A y 11A y 8,
15B y 12F y 10A y 11A y 8,
22F y 33F y 12F y 10A y 11A,
22F y 33F y 12F y 10A y 8,
22F y 33F y 12F y 11A y 8,
40 22F y 33F y 10A y 11A y 8,
22F y 12F y 10A y 11A y 8 o
33F y 12F y 10A y 11A y 8.

45 En una realización cualquiera de la composición inmunogénica definida en 1.4.1 anterior comprende además al menos un glicoconjugado de cada uno de los seis serotipos de *S. pneumoniae* siguientes:

- 50 15B y 22F y 33F y 12F y 10A y 11A,
15B y 22F y 33F y 12F y 10A y 8,
15B y 22F y 33F y 12F y 11A y 8,
15B y 22F y 33F y 10A y 11A y 8,
15B y 22F y 12F y 10A y 11A y 8,
15B y 33F y 12F y 10A y 11A y 8 o
22F y 33F y 12F y 10A y 11A y 8.

55 En una realización, cualquiera de las composiciones inmunogénicas definidas en el apartado 1.4.1 anterior comprende además al menos un glicoconjugado de cada uno de los siete serotipos de *S. pneumoniae* siguientes: 15B y 22F y 33F y 12F y 10A y 11A y 8.

60 En una realización, cualquiera de las composiciones inmunogénicas anteriores comprende además glucoconjugados del serotipo 2 de *S. pneumoniae*.

En una realización, cualquiera de las composiciones inmunogénicas anteriores comprende además glucoconjugados de serotipo 17F de *S. pneumoniae*.

En una realización, cualquiera de las composiciones inmunogénicas anteriores comprende además glucoconjugados del serotipo 20 de *S. pneumoniae*.

- 5 En una realización, cualquiera de las composiciones inmunogénicas anteriores comprende además glucoconjugados de serotipo 15C de *S. pneumoniae*.

Preferentemente, todos los glucoconjugados de la composición inmunogénica anterior se conjugan individualmente con la proteína portadora.

- 10 En una realización de cualquiera de las composiciones inmunogénicas anteriores, el glicoconjugado de serotipo 9V de *S. pneumoniae* se conjuga con CRM₁₉₇. En una realización de cualquiera de las composiciones inmunogénicas anteriores, el glicoconjugado de serotipo 22F de *S. pneumoniae* se conjuga con CRM₁₉₇. En una realización de cualquiera de las composiciones inmunogénicas anteriores, el glicoconjugado de serotipo 33F de *S. pneumoniae* se conjuga con CRM₁₉₇. En una realización de cualquiera de las composiciones inmunogénicas anteriores, el glicoconjugado de serotipo 15B de *S. pneumoniae* se conjuga con CRM₁₉₇. En una realización de cualquiera de las composiciones inmunogénicas anteriores, el glicoconjugado de serotipo 12F de *S. pneumoniae* se conjuga con CRM₁₉₇. En una realización de cualquiera de las composiciones inmunogénicas anteriores, el glicoconjugado de serotipo 10A de *S. pneumoniae* se conjuga con CRM₁₉₇. En una realización de cualquiera de las composiciones inmunogénicas anteriores, el glicoconjugado de serotipo 11A de *S. pneumoniae* se conjuga con CRM₁₉₇. En una realización de cualquiera de las composiciones inmunogénicas anteriores, el glicoconjugado de serotipo 8 de *S. pneumoniae* se conjuga con CRM₁₉₇. En una realización de cualquiera de las composiciones inmunogénicas anteriores, los glicoconjugados de los serotipos 4, 6B, 14, 18C, 19F y 23F de *S. pneumoniae* se conjugan con CRM₁₉₇. En una realización de cualquiera de las composiciones inmunogénicas anteriores, los glicoconjugados de los serotipos 1, 5 y 7F de *S. pneumoniae* se conjugan con CRM₁₉₇. En una realización de cualquiera de las composiciones inmunogénicas anteriores, los glicoconjugados de los serotipos 6A y 19A de *S. pneumoniae* se conjugan con CRM₁₉₇. En una realización de cualquiera de las composiciones inmunogénicas anteriores, el glicoconjugado de serotipo 3 de *S. pneumoniae* se conjuga con CRM₁₉₇. En una realización de cualquiera de las composiciones inmunogénicas anteriores, el glicoconjugado de serotipo 2 de *S. pneumoniae* se conjuga con CRM₁₉₇. En una realización de cualquiera de las composiciones inmunogénicas anteriores, el glicoconjugado de serotipo 17F de *S. pneumoniae* se conjuga con CRM₁₉₇. En una realización de cualquiera de las composiciones inmunogénicas anteriores, el glicoconjugado de serotipo 20 de *S. pneumoniae* se conjuga con CRM₁₉₇. En una realización de cualquiera de las composiciones inmunogénicas anteriores, el glicoconjugado de serotipo 15C de *S. pneumoniae* se conjuga con CRM₁₉₇.

- 35 En una realización, los glicoconjugados de las composiciones inmunogénicas anteriores están todos conjugados individualmente con CRM₁₉₇.

En una realización, la composición inmunogénica anterior comprende glicoconjugados de 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 serotipos diferentes.

- 40 En una realización, la composición inmunogénica anterior comprende glicoconjugados de 16 o 20 serotipos diferentes.

En una realización, la composición inmunogénica anterior es una composición conjugada antineumocócica de 14, 15, 16, 17, 18 o 19 valentes. En una realización, la composición inmunogénica anterior es una composición conjugada neumocócica 16-valente. En una realización, la composición inmunogénica anterior es una composición conjugada neumocócica 19-valente. En una realización, la composición inmunogénica anterior es una composición conjugada neumocócica 20-valente.

- 45 En una realización, la composición inmunogénica anterior es una composición conjugada neumocócica 16-valente. En una realización, la composición inmunogénica anterior es una composición conjugada neumocócica 19-valente. En una realización, la composición inmunogénica anterior es una composición conjugada neumocócica 20-valente.

En una realización, la composición inmunogénica de la invención comprende glicoconjugados de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F de *S. pneumoniae*.

- 50 En una realización, la composición inmunogénica de la invención comprende glicoconjugados de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F de *S. pneumoniae*.

En una realización, la composición inmunogénica de la invención comprende sacáridos conjugados de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F de *S. pneumoniae*.

- 55 En una realización, los glicoconjugados de la composición inmunogénica de la invención consisten en glicoconjugados de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F de *S. pneumoniae*. En una realización, los glicoconjugados de la composición inmunogénica de la invención consisten en glicoconjugados de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F.

- 60 Preferentemente, todos los glicoconjugados de la composición inmunogénica de la invención se conjugan individualmente con la proteína portadora. En una realización, los glicoconjugados de la composición inmunogénica anterior se conjugan individualmente con CRM₁₉₇.

Cualquiera de las composiciones inmunogénicas definidas en los apartados 1.4.1 o 1.4.2 anteriores no comprende sacárido capsular de los serotipos 9N, 9A y 9L de *S. pneumoniae*.

- 65 Cualquiera de las composiciones inmunogénicas definidas en los apartados 1.4.1 o 1.4.2 anteriores no comprende sacárido capsular de los serotipos 9N, 9A y 9L de *S. pneumoniae*.

Tras la conjugación del polisacárido capsular con la proteína portadora, los glicoconjugados se purifican (se enriquecen con respecto a la cantidad de conjugado polisacárido-proteína) mediante diversas técnicas. Estas técnicas incluyen operaciones de concentración/diafiltración, precipitación/elución, cromatografía en columna y filtración en profundidad. Véase, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de EE. UU. No. 2007/0184072 y WO 2008/079653. Una vez purificados los glucoconjugados individuales, se mezclan para formular la composición inmunogénica de la presente invención.

2. Dosificación de las composiciones inmunogénicas

2.1 Cantidad de polisacáridos

La cantidad de glicoconjugados en cada dosis se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin efectos secundarios adversos significativos en los vacunados típicos. Dicha cantidad variará en función del inmunógeno específico que se emplee y de cómo se presente.

La cantidad de un glicoconjugado particular en una composición inmunogénica se puede calcular con base en el polisacárido total para ese conjugado (conjugado y no conjugado). Por ejemplo, un glicoconjugado con 20 % de polisacárido libre tendrá aproximadamente 80 µg de polisacárido conjugado y aproximadamente 20 µg de polisacárido no conjugado en una dosis de 100 µg de polisacárido. La cantidad de glicoconjugado puede variar según el serotipo estreptocócico. La concentración de sacáridos puede determinarse mediante el ensayo del ácido urónico.

La "cantidad inmunogénica" de los diferentes componentes polisacáridos en la composición inmunogénica puede divergir y cada uno puede comprender aproximadamente 1,0 µg, aproximadamente 2,0 µg, aproximadamente 3,0 µg, aproximadamente 4,0 µg, aproximadamente 5,0 µg, aproximadamente 6,0 µg, aproximadamente 7,0 µg, aproximadamente 8,0 µg, aproximadamente 9,0 µg, aproximadamente 10,0 µg, aproximadamente 15,0 µg, aproximadamente 20,0 µg, aproximadamente 30,0 µg, aproximadamente 40,0 µg, aproximadamente 50,0 µg, aproximadamente 60,0 µg, aproximadamente 70,0 µg, aproximadamente 80,0 µg, aproximadamente 90,0 µg, o aproximadamente 100,0 µg de cualquier antígeno de polisacárido particular.

Generalmente, cada dosis comprenderá de 0,1 µg a 100 µg de polisacárido para un serotipo dado, particularmente de 0,5 µg a 20 µg, más particularmente de 1 µg a 10 µg, y aún más particularmente de 2 µg a 5 µg. Cualquier número entero completo en cualquiera de los anteriores intervalos se contempla como una realización de la divulgación.

En una realización, cada dosis comprenderá 1 µg, 2 µg, 3 µg, 4 µg, 5 µg, 6 µg, 7 µg, 8 µg, 9 µg, 10 µg, 15 µg o 20 µg de polisacárido para un serotipo dado.

2.2 Importe del portador

Generalmente, cada dosis comprenderá de 5 µg a 150 µg de proteína portadora, particularmente de 10 µg a 100 µg de proteína portadora, más particularmente de 15 µg a 100 µg de proteína portadora, más particularmente de 25 a 75 µg de proteína portadora, más particularmente de 30 µg a 70 µg de proteína portadora, más particularmente de 30 a 60 µg de proteína portadora, más particularmente de 30 µg a 50 µg de proteína portadora y aún más particularmente de 40 a 60 µg de proteína portadora. En realizaciones particulares, la proteína de portadora es CRM₁₉₇.

En una realización, cada dosis comprenderá aproximadamente 25 µg, aproximadamente 26 µg, aproximadamente 27 µg, aproximadamente 28 µg, aproximadamente 29 µg, aproximadamente 30 µg, aproximadamente 31 µg, aproximadamente 32 µg, aproximadamente 33 µg, aproximadamente 34 µg, aproximadamente 35 µg, aproximadamente 36 µg, aproximadamente 37 µg, aproximadamente 38 µg, aproximadamente 39 µg, aproximadamente 40 µg, aproximadamente 41 µg, aproximadamente 42 µg, aproximadamente 43 µg, aproximadamente 44 µg, aproximadamente 45 µg, aproximadamente 46 µg, aproximadamente 47 µg, aproximadamente 48 µg, aproximadamente 49 µg, aproximadamente 50 µg, aproximadamente 51 µg, aproximadamente 52 µg, aproximadamente 53 µg, aproximadamente 54 µg, aproximadamente 55 µg, aproximadamente 56 µg, aproximadamente 57 µg, aproximadamente 58 µg, aproximadamente 59 µg, aproximadamente 60 µg, aproximadamente 61 µg, aproximadamente 62 µg, aproximadamente 63 µg, aproximadamente 64 µg, aproximadamente 65 µg, aproximadamente 66 µg, aproximadamente 67 µg, 68 µg, aproximadamente 69 µg, aproximadamente 70 µg, aproximadamente 71 µg, aproximadamente 72 µg, aproximadamente 73 µg, aproximadamente 74 µg o aproximadamente 75 µg de proteína portadora. En realizaciones particulares, la proteína de portadora es CRM₁₉₇.

3. Otros antígenos

Las composiciones inmunogénicas de la invención comprenden antígenos sacáridos conjugados de *S. pneumoniae* (glucoconjugados). También pueden incluir antígenos de otros patógenos, en particular de bacterias y/o virus. Otros antígenos preferidos se seleccionan entre: un toxoide diftérico (D), un toxoide tetánico (T), un antígeno de tos ferina (P), que suele ser acelular (Pa), un antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (VHB) (HBsAg), un antígeno del

virus de la hepatitis A (VHA), un sacárido capsular conjugado de *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), una vacuna con poliovirus inactivado (IPV).

En una realización, las composiciones inmunogénicas de la invención comprenden D-T-Pa. En una realización, las composiciones inmunogénicas de la invención comprenden D-T-Pa-Hib, D-T-Pa-IPV o D-T-Pa-HBsAg. En una realización, las composiciones inmunogénicas de la invención comprenden D-T-Pa-HBsAg-IPV o D-T-Pa-HBsAg-Hib. En una realización, las composiciones inmunogénicas de la invención comprenden D-T-Pa-HBsAg-IPV-Hib. Antígenos de la tos ferina: La *Bordetella pertussis* causa la tos ferina. Los antígenos de la tos ferina en las vacunas son celulares (células enteras, en forma de células de *B. pertussis* inactivadas) o acelulares. La preparación de antígenos celulares de pertussis está bien documentada (por ejemplo, puede obtenerse por inactivación térmica de un cultivo de fase I de *B. pertussis*). Sin embargo, la invención utiliza preferentemente antígenos acelulares. Cuando se utilizan antígenos acelulares, se prefiere utilizar uno, dos o (preferentemente) tres de los siguientes antígenos: (1) toxina pertussis detoxificada (toxóide pertussis, o PT); (2) hemaglutinina filamentosa (FHA); (3) pertactina (también conocida como proteína de membrana externa de 69 kiloDalton). La FHA y la pertactina pueden tratarse con formaldehído antes de su uso de acuerdo con la invención. El PT se desintoxica preferentemente mediante tratamiento con formaldehído y/o glutaraldehído. Los antígenos de la tos ferina acelular se adsorben preferentemente en uno o más adyuvantes de sal de aluminio. Como alternativa, pueden añadirse en estado no adsorbido. Si se añade pertactina, es preferible que ya esté adsorbida en un adyuvante de hidróxido de aluminio. PT y FHA pueden adsorberse sobre un adyuvante de hidróxido de aluminio o un fosfato de aluminio. Se prefiere la adsorción de todos los PT, FHA y pertactina al hidróxido de aluminio.

Vacuna de poliovirus inactivado: El poliovirus causa la poliomielitis. En lugar de utilizar la vacuna oral contra el poliovirus, las realizaciones preferidas de la invención utilizan la IPV. Antes de su administración a los pacientes, los poliovirus deben inactivarse, lo que puede conseguirse mediante tratamiento con formaldehído. La poliomielitis puede estar causada por uno de los tres tipos de poliovirus. Los tres tipos son similares y causan síntomas idénticos, pero son antigénicamente diferentes y la infección por un tipo no protege contra la infección por otros. Por lo tanto, se prefiere utilizar tres antígenos de poliovirus en la invención: poliovirus de Tipo 1 (por ejemplo, cepa Mahoney), poliovirus de Tipo 2 (por ejemplo, cepa MEF-1) y poliovirus de Tipo 3 (por ejemplo, cepa Saukett). Preferentemente, los virus se cultivan, purifican e inactivan individualmente y, a continuación, se combinan para obtener una mezcla trivalente a granel para su uso con la invención.

Toxóide diftérico: *Corynebacterium diphtheriae* causa la difteria. La toxina diftérica puede tratarse (por ejemplo, con formalina o formaldehído) para eliminar su toxicidad y conservar al mismo tiempo la capacidad de inducir anticuerpos específicos contra la toxina tras la inyección. Estos toxóides diftéricos se utilizan en las vacunas contra la difteria. Los toxóides diftéricos preferidos son los preparados mediante tratamiento con formaldehído. El toxóide diftérico puede obtenerse cultivando *C. diphtheriae* en medio de crecimiento, seguido de tratamiento con formaldehído, ultrafiltración y precipitación. A continuación, el material toxóide puede tratarse mediante un procedimiento que incluya filtración estéril y/o diálisis. El toxóide diftérico se adsorbe preferentemente en un adyuvante de hidróxido de aluminio.

Toxóide tetánico: *Clostridium tetani* causa el tétanos. La toxina tetánica puede tratarse para administrar un toxóide protector. Los toxóides se utilizan en las vacunas antitetánicas. Los toxóides tetánicos preferidos son los preparados mediante tratamiento con formaldehído. El toxóide tetánico puede obtenerse cultivando *C. tetani* en medio de crecimiento, seguido de tratamiento con formaldehído, ultrafiltración y precipitación. A continuación, el material puede tratarse mediante un procedimiento que incluya filtración estéril y/o diálisis.

Antígenos del virus de la hepatitis A: El virus de la hepatitis A (HAV) es uno de los agentes conocidos causantes de la hepatitis vírica. Un componente preferido del HAV se basa en virus inactivados, y la inactivación puede lograrse mediante tratamiento con formol.

El virus de la hepatitis B (HBV) es uno de los agentes conocidos causantes de hepatitis vírica. El principal componente de la cápside es una proteína conocida como antígeno de superficie del HBV o, más comúnmente, HBsAg, que suele ser un polipéptido de 226 aminoácidos con un peso molecular de ~24 kDa. Todas las vacunas existentes contra la hepatitis B contienen HBsAg, y cuando este antígeno se administra a un vacunado normal estimula la producción de anticuerpos anti-HBsAg que protegen contra la infección por HBV.

Para la fabricación de vacunas, el HBsAg se ha obtenido de dos maneras: purificación del antígeno en forma de partículas a partir del plasma de portadores de hepatitis B crónica o expresión de la proteína mediante procedimientos de ADN recombinante (por ejemplo, expresión recombinante en células de levadura). A diferencia del HBsAg nativo (es decir, como en el producto purificado con plasma), el HBsAg expresado con levadura generalmente no está glicosilado, y ésta es la forma más preferida de HBsAg para su uso con la invención.

Antígenos conjugados de *Haemophilus influenzae* tipo b: *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) causa meningitis bacteriana. Las vacunas contra la Hib suelen basarse en el antígeno sacárido capsular, cuya preparación está bien documentada. El sacárido Hib puede conjugarse con una proteína portadora para aumentar su inmunogenicidad, especialmente en niños. Las proteínas portadoras típicas son el toxóide tetánico, el toxóide diftérico, la CRM197, la proteína D de *H. influenzae* y un complejo proteico de membrana externa del meningococo del serogrupo B. La fracción

de sacárido del conjugado puede comprender polirribosilribitol fosfato (PRP) de longitud completa preparado a partir de bacterias Hib, y/o fragmentos de PRP de longitud completa. Los conjugados Hib pueden o no adsorberse a un adyuvante de sal de aluminio.

5 En una realización, las composiciones inmunogénicas de la invención incluyen además un sacárido capsular conjugado de *N. meningitidis* del serogrupo Y (MenY), y/o un sacárido capsular conjugado de *N. meningitidis* del serogrupo C (MenC).

10 En una realización, las composiciones inmunogénicas de la invención incluyen además un sacárido capsular conjugado de *N. meningitidis* del serogrupo A (MenA), un sacárido capsular conjugado de *N. meningitidis* del serogrupo W135 (MenW135), un sacárido capsular conjugado de *N. meningitidis* del serogrupo Y (MenY), y/o un sacárido capsular conjugado de *N. meningitidis* del serogrupo C (MenC).

15 En una realización, las composiciones inmunogénicas de la invención incluyen además un sacárido capsular conjugado de *N. meningitidis* serogrupo W135 (MenW135), un sacárido capsular conjugado de *N. meningitidis* serogrupo Y (MenY), y/o un sacárido capsular conjugado de *N. meningitidis* serogrupo C (MenC).

4. Adyuvantes

20 Las composiciones inmunogénicas divulgadas en el presente documento comprenden al menos un adyuvante (por ejemplo, uno, dos o tres adyuvantes). El término "adyuvante" se refiere a un compuesto o mezcla que potencia la respuesta inmunitaria a un antígeno. Los antígenos pueden actuar principalmente como un sistema de administración, principalmente como un modulador inmunológico o tener fuertes características de ambos. Entre los adyuvantes adecuados se encuentran los aptos para su uso en mamíferos, incluyendo los seres humanos.

25 Ejemplos de adyuvantes de tipo sistema de administración adecuados conocidos que pueden usarse en humanos incluyen, pero no se limitan a, alumbre (por ejemplo, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio o hidróxido de aluminio), fosfato de calcio, liposomas, emulsiones de aceite en agua como MF59 (4,3% p/v de escualeno, 0,5% p/v de polisorbato 80 (Tween 80), 0,5% p/v de trioleato de sorbitán (Span 85)), emulsiones de agua en aceite como Montanide, y micropartículas o nanopartículas de poli(D,L-lactida-co-glicolida) (PLG).

30 En una realización, las composiciones inmunogénicas divulgadas en el presente documento comprenden sales de aluminio (alumbre) como adyuvante (por ejemplo, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio o hidróxido de aluminio). En una realización preferida, las composiciones inmunogénicas divulgadas en el presente documento comprenden fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio como adyuvante. En una realización, las composiciones inmunogénicas divulgadas en el presente documento comprenden de 0,1 mg/ml a 1 mg/ml o de 0,2 mg/ml a 0,3 mg/ml de aluminio elemental en forma de fosfato de aluminio. En una realización, las composiciones inmunogénicas divulgadas en el presente documento comprenden aproximadamente 0,25 mg/ml de aluminio elemental en forma de fosfato de aluminio. Ejemplos de adyuvantes de tipo inmunomodulador adecuados conocidos que pueden utilizarse en humanos incluyen, pero no se limitan a, extractos de saponina de la corteza del árbol de Aquilla (QS21, Quil A), agonistas TLR4 tales como MPL (Lípido Monofosforil A), 3DMPL (MPL 3-O-deacilado) o GLA-AQ, mutantes LT/CT, citoquinas tal como las diversas interleuquinas (por ejemplo, IL-2, IL-12) o GM-CSF, y similares.

45 Entre los ejemplos de adyuvantes de tipo inmunomodulador adecuados conocidos con características tanto de administración como inmunomoduladoras que pueden utilizarse en seres humanos se incluyen, pero no se limitan a, los ISCOMS (véase, por ejemplo, Sjölander et al. (1998) J. Leukocyte Biol. 64:713; los documentos WO 90/03184, WO 96/11711, WO 00/48630, WO 98/36772, WO 00/41720, WO 2006/134423 y WO 2007/026190) o GLA-EM, que es una combinación de un agonista de TLR4 y una emulsión de aceite en agua.

50 Para aplicaciones veterinarias, incluyendo pero no limitándose a la experimentación animal, se puede utilizar el Adyuvante Completo de Freund (CFA), el Adyuvante Incompleto de Freund (IFA), Emulsigen, N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (CGP 11637, denominado nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforilo)-etilamina (CGP 19835A, denominada MTP-PE), y RIBI, que contiene tres componentes extraídos de bacterias, el lípido monofosforil A, el dimicolato de trehalosa y el esqueleto de la pared celular (MPL+TDM+CWS) en una emulsión de escualeno/Tween 80 al 2%.

60 Otros adyuvantes ejemplares para mejorar la eficacia de las vacunas antineumocócicas divulgadas en el presente documento incluyen, pero no se limitan a: (1) formulaciones de emulsión de aceite en agua (con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos, tal como péptidos muramil (véase más adelante) o componentes de la pared celular bacteriana), tal como por ejemplo (a) SAF, que contiene 10% de escualeno, 0,4% de Tween 80, 5% de polímero plurónico bloqueado L121, y thr-MDP microfluidizado en una emulsión submicrónica o agitado en vórtex para generar una emulsión de mayor tamaño de partícula, y (b) el sistema adyuvante RIBI™ (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT) que contiene 2% de escualeno, 0,2% de Tween 80, y uno o más componentes de la pared celular bacteriana tal como monofosforil A (MPL), trehalosa dimicolato (TDM), y esqueleto de la pared celular (CWS), preferentemente MPL + CWS (DETOX™); (2) pueden utilizarse adyuvantes de saponina, tal como QS21, STIMULON™ (Cambridge

Bioscience, Worcester, MA), Abisco® (Isconova, Suecia), o Iscomatrix® (Commonwealth Serum Laboratories, Australia), o partículas generadas a partir de ellos, tales como ISCOMs (complejos inmunoestimulantes), cuyos ISCOMs pueden estar desprovistos de detergente adicional (por ejemplo, el documento WO 00/07621); (3) adyuvante de Freund completo (CFA) y adyuvante de Freund incompleto (IFA); (4) citoquinas, tales como interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 (el documento WO 99/44636)), interferones (por ejemplo, interferón gamma), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF), etc.; (5) lípido monofosforilo A (MPL) o MPL 3-O-deacilado (3dMPL) (véase, por ejemplo, los documentos GB-2220221, EP0689454), opcionalmente en ausencia sustancial de alumbre cuando se utiliza con sacáridos neumocócicos (véase, por ejemplo, el documento WO 00/56358); (6) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite en agua (véase, por ejemplo, los documentos EP0835318, EP0735898, EP0761231); (7) un éter de polioxietileno o un éster de polioxietileno (véase, por ejemplo, el documento WO99/52549); (8) un tensioactivo de éster de sorbitán polioxietilenado en combinación con un octoxinol (documento WO 01/21207) o un tensioactivo polioxietileno alquil éter o éster en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional, tal como un octoxinol (el documento WO 01/21152); (9) una saponina y un oligonucleótido inmunoestimulador (por ejemplo, un oligonucleótido CpG) (por ejemplo WO 00/62800); (10) un inmunoestimulante y una partícula de sal metálica (véase por ejemplo el documento WO00/23105); (11) una saponina y una emulsión de aceite en agua, por ejemplo, el documento WO 99/11241; (12) una saponina (por ejemplo, QS21) + 3dMPL + IM2 (opcionalmente + un esteroide) por ejemplo, el documentos WO 98/57659; (13) otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimulantes para aumentar la eficacia de la composición. Los péptidos muramyl incluyen N-acetil-muramyl-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-25 acetil-normuramyl-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramyl-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina MTP-PE), etc.

En una realización de la presente invención, las composiciones inmunogénicas divulgadas en el presente documento comprenden un oligonucleótido CpG como adyuvante. Un oligonucleótido CpG, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un oligodesoxinucleótido CpG inmunoestimulador (ODN CpG) y, en consecuencia, estos términos se utilizan indistintamente a menos que se indique lo contrario. Los oligodesoxinucleótidos CpG inmunoestimuladores contienen uno o más motivos CpG inmunoestimuladores que son dinucleótidos de citosina-guanina no metilados, opcionalmente dentro de ciertos contextos de bases preferidos. El estado de metilación del motivo inmunoestimulador CpG se refiere generalmente al residuo de citosina en el dinucleótido. Un oligonucleótido inmunoestimulador que contiene al menos un dinucleótido CpG no metilado es un oligonucleótido que contiene una citosina 5' no metilada unida por un enlace fosfato a una guanina 3', y que activa el sistema inmunitario mediante la unión al receptor tipo Toll 9 (TLR-9). En otra realización, el oligonucleótido inmunoestimulador puede contener uno o más dinucleótidos CpG metilados, que activarán el sistema inmunitario a través de TLR9, pero no con tanta fuerza como si los motivos CpG no estuvieran metilados. Los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG pueden comprender uno o más palíndromos que a su vez pueden englobar el dinucleótido CpG. Los oligonucleótidos CpG se han descrito en una serie de patentes emitidas, solicitudes de patentes publicadas y otras publicaciones, incluyendo las Patentes de EE. UU. Nos. 6,194,388; 6,207,646; 6,214,806; 6,218,371; 6,239,116 y 6,339,068.

En una realización de la presente invención, las composiciones inmunogénicas divulgadas en el presente documento comprenden cualquiera de los oligonucleótidos CpG descritos en las páginas 3, líneas 22, a la página 12, línea 36, del documento WO 2010/125480.

Se han identificado diferentes clases de oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG. Se denominan clase A, B, C y P, y se describen con mayor detalle en las páginas 3, líneas 22, a la página 12, línea 36, del documento WO 2010/125480. Los procedimientos de la invención abarcan el uso de estas diferentes clases de oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG. En una realización de la presente invención, las composiciones inmunogénicas divulgadas en el presente documento comprenden un oligonucleótido CpG de clase A. En una realización de la presente invención, las composiciones inmunogénicas tal como se divulgan en el presente documento comprenden un oligonucleótido CpG de clase B.

Las secuencias de oligonucleótidos CpG de clase B de la invención son las descritas anteriormente en términos generales, así como las divulgadas en los documentos WO 96/02555, WO 98/18810 y en las Patentes de EE. UU. Nos. 6,194,388; 6,207,646; 6,214,806; 6,218,371; 6,239,116 y 6,339,068. Las secuencias ejemplares incluyen, pero no se limitan a, las divulgadas en estas últimas solicitudes y patentes.

En una realización, el oligonucleótido CpG de "clase B" de la invención tiene la siguiente secuencia de ácido nucleico:

5' TCGTCGTTTTTCGGTGCTTTT 3' (SEQ ID NO: 1), o
 5' TCGTCGTTTTTCGGTCGTTTT 3' (SEQ ID NO: 2), o
 5' TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT 3' (SEQ ID NO: 3), o
 5' TCGTCGTTTCGTCGTTTTGTCGTT 3' (SEQ ID NO: 4), o
 5' TCGTCGTTTTGTCGTTTTTTTCGA 3' (SEQ ID NO: 5).

En cualquiera de estas secuencias, todos los enlaces pueden ser enlaces fosforotioato. En otra realización, en cualquiera de estas secuencias, uno o más de los enlaces pueden ser fosfodiéster, preferentemente entre la "C" y la "G" del motivo CpG haciendo un oligonucleótido CpG semiblando. En cualquiera de estas secuencias, una etil-uridina

o un halógeno pueden sustituir a la 5' T; ejemplos de sustituciones halógenas incluyen, pero no se limitan a sustituciones de bromo-uridina o yodo-uridina.

Algunos ejemplos no limitantes de oligonucleótidos de Clase B incluyen:

5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*T*G*C*T*T*T 3' (SEQ ID NO: 6), o
 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*C*G*G*T*C*G*T*T*T 3' (SEQ ID NO: 7), o
 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T*G*T*C*G*T*T 3' (SEQ ID NO: 8), o
 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*T*C*G*T*T*T*G*T*C*G*T*T 3' (SEQ ID NO: 9), o
 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T*T*T*T*C*G*A 3' (SEQ ID NO: 10).
 en donde "*" se refiere a un enlace fosforotioato.

En una realización de la presente invención, las composiciones inmunogénicas divulgadas en el presente documento comprenden un oligonucleótido CpG de clase C.

En una realización de la presente invención, las composiciones inmunogénicas tal y como se divulgan en la presente invención comprenden un oligonucleótido CpG de clase P.

En una realización, el oligonucleótido incluye al menos un enlace fosforotioato. En otra realización, todos los enlaces internucleotídicos del oligonucleótido son enlaces fosforotioato. En otra realización, el oligonucleótido incluye al menos un enlace de tipo fosfodiéster. En otra realización, el enlace fosfodiéster es un enlace fosfodiéster. En otra realización, se conjuga un grupo lipofílico con el oligonucleótido. En una realización, el grupo lipofílico es el colesterol.

En una realización, todos los enlaces internucleotídicos de los oligonucleótidos CpG divulgados en el presente documento son enlaces fosfodiéster ("suaves" oligonucleótidos, como se describe en el documento WO 2007/026190). En otra realización, los oligonucleótidos CpG de la invención se hacen resistentes a la degradación (por ejemplo, se estabilizan). Un "oligonucleótido estabilizado" se refiere a un oligonucleótido que es relativamente resistente a la degradación *in vivo* (por ejemplo, a través de una exo- o endo-nucleasa). La estabilización del ácido nucleico puede lograrse mediante modificaciones de la columna vertebral. Los oligonucleótidos con enlaces fosforotioato proporcionan la máxima actividad y protegen al oligonucleótido de la degradación por exo- y endonucleasas intracelulares.

Los oligonucleótidos inmunoestimuladores pueden tener un esqueleto quimérico, que tiene combinaciones de enlaces fosfodiéster y fosforotioato. Para los fines de la presente invención, una columna vertebral quimérica se refiere a una columna vertebral parcialmente estabilizada, en la que al menos un enlace internucleotídico es fosfodiéster o similar a fosfodiéster, y en donde al menos otro enlace internucleotídico es un enlace internucleotídico estabilizado, en donde el al menos un enlace fosfodiéster o similar a fosfodiéster y el al menos un enlace estabilizado son diferentes. Cuando el enlace fosfodiéster se localiza preferentemente dentro del motivo CpG, tales moléculas se denominan "semiblandas", como se describe en el documento WO 2007/026190.

Otros oligonucleótidos modificados incluyen combinaciones de enlaces fosfodiéster, fosforotioato, metilfosfonato, metilfosforotioato, fosforoditioato y/o p-etoxi.

Los ODN modificados de espina dorsal mixta pueden sintetizarse como se describe en el documento WO 2007/026190.

El tamaño del oligonucleótido CpG (es decir, el número de residuos de nucleótidos a lo largo de la longitud del oligonucleótido) también puede contribuir a la actividad estimuladora del oligonucleótido. Para facilitar la captación en las células, los oligonucleótidos CpG de la invención tienen preferentemente una longitud mínima de 6 residuos nucleotídicos. Los oligonucleótidos de cualquier tamaño superior a 6 nucleótidos (incluso de muchos kb de longitud) son capaces de inducir una respuesta inmunitaria si están presentes suficientes motivos inmunoestimuladores, porque los oligonucleótidos más grandes se degradan dentro de las células. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos CpG tienen una longitud de 6 a 100 nucleótidos, preferentemente de 8 a 30 nucleótidos. En realizaciones importantes, los ácidos nucleicos y oligonucleótidos de la invención no son plásmidos ni vectores de expresión.

En una realización, el oligonucleótido CpG divulgado en el presente documento comprende sustituciones o modificaciones, tales como en las bases y/o azúcares como se describe en los párrafos 134 a 147 del documento WO 2007/026190.

En una realización, el oligonucleótido CpG de la presente invención se modifica químicamente. El experto conoce ejemplos de modificaciones químicas que se describen, por ejemplo, en Uhlmann et al. (1990) Chem. Rev. 90:543; S. Agrawal, Ed., Humana Press, Totowa, EE. UU. 1993; Crooke, et al. (1996) Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 36:107-129; y Hunziker et al., (1995) Mod. Synth. Methods 7:331-417. Un oligonucleótido de acuerdo con la invención puede tener una o más modificaciones, en donde cada modificación se localiza en un puente fosfodiéster internucleósido particular y/o en una unidad β-D-ribosa particular y/o en una posición de base nucleósida natural particular en comparación con un oligonucleótido de la misma secuencia que está compuesto de ADN o ARN natural.

En algunas realizaciones de la invención, los ácidos nucleicos que contienen CpG pueden mezclarse simplemente con portadores inmunogénicos de acuerdo con procedimientos conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, el documento WO 03/024480).

En una realización particular de la presente invención, cualquiera de las composiciones inmunogénicas divulgadas en el presente documento comprende de 2 µg a 100 mg de oligonucleótido CpG, preferentemente de 0,1 mg a 50 mg de oligonucleótido CpG, preferentemente de 0,2 mg a 10 mg de oligonucleótido CpG, preferentemente de 0,3 mg a 5 mg de oligonucleótido CpG, preferentemente de 0,3 mg a 5 mg de oligonucleótido CpG, incluso preferentemente de 0,5 mg a 2 mg de oligonucleótido CpG, incluso preferentemente de 0,75 mg a 1,5 mg de oligonucleótido CpG. En una realización preferida, cualquiera de las composiciones inmunogénicas divulgadas en el presente documento comprende aproximadamente 1 mg de oligonucleótido CpG.

5. Formulación

Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden formularse en forma líquida (es decir, soluciones o suspensiones) o en forma liofilizada. Las formulaciones líquidas pueden administrarse de forma ventajosa directamente desde su forma envasada y, por tanto, son ideales para la inyección sin necesidad de su reconstitución en medio acuoso como sería necesario por otra parte para las composiciones liofilizadas de la divulgación.

La formulación de la composición inmunogénica de la presente invención puede lograrse utilizando procedimientos reconocidos en la técnica. Por ejemplo, los conjugados neumocócicos individuales pueden formularse con un vehículo fisiológicamente aceptable para preparar la composición. Ejemplos de tales vehículos incluyen, pero no se limitan a, agua, solución salina tamponada, polioles (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido) y soluciones de dextrosa.

La presente divulgación proporciona una composición inmunogénica que comprende cualquiera de las combinaciones de glicoconjugados divulgadas en el presente documento y un excipiente, portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En una realización, la composición inmunogénica de la invención está en forma líquida, preferentemente en forma líquida acuosa.

Las composiciones inmunogénicas de la divulgación pueden comprender uno o más de un tampón, una sal, un catión divalente, un detergente no iónico, un crioprotector tal como un azúcar y un antioxidante tal como un eliminador de radicales libres o un agente quelante, o cualquier combinación múltiple de los mismos.

En una realización, la composición inmunogénica de la invención comprende un tampón. En una realización, dicho tampón tiene un pKa de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 7,5. En algunas realizaciones, el tampón es fosfato, succinato, histidina o citrato. En ciertas realizaciones, el tampón es succinato a una concentración final de 1 mM a 10 mM. En una realización particular, la concentración final del tampón de succinato es de aproximadamente 5 mM.

En una realización, la composición inmunogénica de la invención comprende una sal. En algunas realizaciones, la sal se selecciona de los grupos que consisten en cloruro de magnesio, cloruro de potasio, cloruro de sodio y una combinación de los mismos. En una realización particular, la sal es cloruro de sodio. En una realización particular, la composición inmunogénica de la invención comprende cloruro de sodio a 150 mM.

En una realización, las composiciones inmunogénicas de la invención comprenden un tensioactivo. En una realización, el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en polisorbato 20 (TWEEN™20), polisorbato 40 (TWEEN™40), polisorbato 60 (TWEEN™60), polisorbato 65 (TWEEN™65), polisorbato 80 (TWEEN™80), polisorbato 85 (TWEEN™85), TRITON™ N-1 01, TRITON™ X-100, octoxinol 40, nonoxinol-9, trietanolamina, oleato polipeptídico de trietanolamina, hidroxistearato de polioxietileno-660 (PEG-15, Solutol H 15), polioxietileno-35-ricinoleato (CREMOPHOR® EL), lecitina de soja y un poloxámero. En una realización particular, el tensioactivo es polisorbato 80. En alguna de dichas realizaciones, la concentración final de polisorbato 80 en la formulación es de al menos 0,0001% a 10% de polisorbato 80 peso a peso (p/p). En algunas de dichas realizaciones, la concentración final de polisorbato 80 en la formulación es de al menos 0,001% a 1% de polisorbato 80 peso a peso (p/p). En algunas de dichas realizaciones, la concentración final de polisorbato 80 en la formulación es de al menos 0,01% a 1% de polisorbato 80 peso a peso (p/p). En otras realizaciones, la concentración final de polisorbato 80 en la formulación es del 0,01%, 0,02%, 0,03%, 0,04%, 0,05%, 0,06%, 0,07%, 0,08%, 0,09% o 0,1% de polisorbato 80 (p/p). En otra realización, la concentración final del polisorbato 80 en la formulación es del 1% de polisorbato 80 (p/p).

En ciertas realizaciones, la composición inmunogénica de la invención tiene un pH de 5,5 a 7,5, más preferentemente un pH de 5,6 a 7,0, incluso más preferentemente un pH de 5,8 a 6,0.

En una realización, la presente invención proporciona un recipiente lleno con cualquiera de las composiciones inmunogénicas divulgadas en el presente documento. En una realización, el recipiente se selecciona del grupo que consiste en un vial, una jeringa, un matraz, un fermentador, un biorreactor, una bolsa, un frasco, una ampolla, un

cartucho y una pluma desechable. En ciertas realizaciones, el recipiente está siliconizado.

En una realización, el recipiente de la presente invención está hecho de vidrio, metales (por ejemplo, acero, acero inoxidable, aluminio, etc.) y/o polímeros (por ejemplo, termoplásticos, elastómeros, termoplásticos-elastómeros). En una realización, el recipiente de la presente invención es de vidrio.

En una realización, la presente invención proporciona una jeringa llena con cualquiera de las composiciones inmunogénicas divulgadas en el presente documento. En ciertas realizaciones, la jeringa está siliconada y/o es de vidrio.

Una dosis típica de la composición inmunogénica de la invención para inyección tiene un volumen de 0,1 ml a 2 ml, más preferentemente de 0,2 ml a 1 ml, incluso más preferentemente un volumen de aproximadamente 0,5 ml.

Por lo tanto, el recipiente o jeringa como se define anteriormente se presenta con un volumen de 0,1 ml a 2 ml, más preferentemente de 0,2 ml a 1 ml, incluso más preferentemente un volumen de aproximadamente 0,5 ml de cualquiera de la composición inmunogénica definida en el presente documento.

6. Capacidad de las composiciones inmunógenas de la invención para provocar anticuerpos de reacción cruzada

En una realización, la composición inmunogénica de la invención es capaz de provocar anticuerpos IgG en humanos que son capaces de unirse al polisacárido de los serotipos 9N, 9A y/o 9L de *S. pneumoniae* según se determina mediante ensayo ELISA.

En el procedimiento ELISA (Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Anzimas), los anticuerpos del suero de sujetos vacunados se incuban con polisacáridos que se han adsorbido a un soporte sólido. Los anticuerpos unidos se detectan utilizando anticuerpos secundarios de detección conjugados con enzimas.

En una realización, dicho ensayo ELISA es el ensayo ELISA estandarizado definido por la OMS en el "Training Manual For Enzyme Linked Immunosorbent Assay For The Quantitation Of Streptococcus Pneumoniae Serotype Specific IgG (Pn PS ELISA)" (disponible en http://www.vaccine.uab.edu/ELISA_protocol.pdf, consultado el 31 de marzo de 2014).

El ELISA mide el tipo específico de anticuerpos IgG anti-*S. pneumoniae* polisacárido capsular (PS) presentes en el suero humano. Cuando se añaden diluciones de suero humano a placas de microtitulación recubiertas de PS capsular de tipo específico, los anticuerpos específicos para esa PS capsular se unen a las placas de microtitulación. Los anticuerpos unidos a las placas se detectan utilizando un anticuerpo anti-IgG humana de cabra marcado con fosfatasa alcalina seguido de un sustrato de p-nitrofenil fosfato. La densidad óptica del producto final coloreado es proporcional a la cantidad de anticuerpo PS anticapsular presente en el suero.

En una realización, la composición inmunogénica de la invención es capaz de provocar anticuerpos IgG en humanos que son capaces de unirse al polisacárido 9N de serotipos de *S. pneumoniae* a una concentración de al menos 0,05 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,2 µg/ml, 0,3 µg/ml, 0,35 µg/ml, 0,4 µg/ml o 0,5 µg/ml según se determine mediante ensayo ELISA.

En una realización, la composición inmunogénica de la invención es capaz de provocar anticuerpos IgG en humanos que son capaces de unirse al polisacárido del serotipo 9A de *S. pneumoniae* a una concentración de al menos 0,05 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,2 µg/ml, 0,3 µg/ml, 0,35 µg/ml, 0,4 µg/ml o 0,5 µg/ml según se determine mediante ensayo ELISA.

En una realización, la composición inmunogénica de la invención es capaz de provocar anticuerpos IgG en humanos que son capaces de unirse al polisacárido del serotipo 9L de *S. pneumoniae* a una concentración de al menos 0,05 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,2 µg/ml, 0,3 µg/ml, 0,35 µg/ml, 0,4 µg/ml o 0,5 µg/ml según se determine mediante ensayo ELISA.

En una realización, la composición inmunogénica de la invención es capaz de provocar anticuerpos funcionales en humanos que son capaces de destruir los serotipos 9N, 9A y/o 9L de *S. pneumoniae* según lo determinado por el ensayo opsonofagocítico *in vitro* (OPA) (véase Ejemplo 1). En una realización, la composición inmunogénica de la invención es capaz de provocar anticuerpos funcionales en humanos que son capaces de destruir el serotipo 9N de *S. pneumoniae* según lo determinado por el ensayo opsonofagocítico *in vitro* (OPA). En una realización, la composición inmunogénica de la invención es capaz de provocar anticuerpos funcionales en humanos que son capaces de destruir el serotipo 9A de *S. pneumoniae* según lo determinado por el ensayo opsonofagocítico *in vitro* (OPA). En una realización, la composición inmunogénica de la invención es capaz de provocar anticuerpos funcionales en humanos que son capaces de destruir el serotipo 9L de *S. pneumoniae* según lo determinado por el ensayo opsonofagocítico *in vitro* (OPA). En una realización, la composición inmunogénica de la invención es capaz de provocar anticuerpos funcionales en humanos que son capaces de destruir los serotipo 9N y 9A de *S. pneumoniae* según lo determinado por el ensayo opsonofagocítico *in vitro* (OPA). En una realización, la composición inmunogénica de la invención es capaz de provocar anticuerpos funcionales en humanos que son capaces de destruir los serotipos 9N y 9L de *S. pneumoniae* según lo determinado por el ensayo opsonofagocítico *in vitro* (OPA). En una realización, la composición inmunogénica de la invención es capaz de provocar anticuerpos funcionales en humanos

que son capaces de destruir los serotipos 9A y 9L de *S. pneumoniae* según lo determinado por el ensayo opsonofagocítico *in vitro* (OPA).

El ensayo neumocócico opsonofagocítico (OPA), que mide la destrucción de células de *S. pneumoniae* por células efectoras fagocíticas en presencia de anticuerpos funcionales y complemento, se considera un sustituto importante para evaluar la eficacia de las vacunas neumocócicas.

El ensayo opsonofagocítico *in vitro* (OPA) puede realizarse incubando juntos una mezcla de células de *Streptococcus pneumoniae*, un suero humano inactivado por calor que se va a ensayar, células HL-60 diferenciadas (fagocitos) y una fuente de complemento exógeno (por ejemplo, complemento de conejo bebé). La opsonofagocitosis se produce durante la incubación y las células bacterianas recubiertas con anticuerpos y complemento mueren tras la opsonofagocitosis. Las unidades formadoras de colonias (ufc) de bacterias supervivientes que escapan a la opsonofagocitosis se determinan mediante la siembra en placas de la mezcla de ensayo. El título OPA se define como la dilución recíproca que da lugar a una reducción del 50% del recuento bacteriano con respecto a los pocillos de control sin suero problema. El título de OPA se interpola a partir de las dos diluciones que abarcan este límite de destrucción del 50%.

Un título de punto final de 1:8 o mayor se considera un resultado positivo en estos OPA de tipo destrucción.

En una realización, la composición inmunogénica de la invención es capaz de provocar un título de al menos 1:8 contra serotipo 9N de *S. pneumoniae* en al menos 50% de los sujetos según lo determinado por el ensayo de destrucción opsonofagocítica *in vitro* (OPA). En una realización, la composición inmunogénica de la invención es capaz de provocar un título de al menos 1:8 contra serotipo 9N de *S. pneumoniae* en al menos 60%, 70%, 80%, 90%, o al menos 93% de los sujetos según lo determinado por el ensayo de destrucción opsonofagocítica *in vitro* (OPA).

En una realización, la composición inmunogénica de la invención es capaz de provocar un título de al menos 1:8 contra serotipo 9A de *S. pneumoniae* en al menos 50% de los sujetos según lo determinado por el ensayo de destrucción opsonofagocítica *in vitro* (OPA). En una realización, la composición inmunogénica de la invención es capaz de provocar un título de al menos 1:8 contra serotipo 9A de *S. pneumoniae* en al menos 60%, 70%, 80%, 90%, o al menos 95% de los sujetos según lo determinado por el ensayo de destrucción opsonofagocítica *in vitro* (OPA).

En una realización, la composición inmunogénica de la invención es capaz de provocar un título de al menos 1:8 contra serotipo 9L de *S. pneumoniae* en al menos 50% de los sujetos según lo determinado por el ensayo de destrucción opsonofagocítica *in vitro* (OPA). En una realización, la composición inmunogénica de la invención es capaz de provocar un título de al menos 1:8 contra serotipo 9L de *S. pneumoniae* en al menos 60%, 70%, 80%, 90%, o al menos 95% de los sujetos según lo determinado por el ensayo de destrucción opsonofagocítica *in vitro* (OPA).

En algunas realizaciones, los sujetos pueden tener títulos de OPA específicos del serotipo antes de la vacunación antineumocócica debido, por ejemplo, a exposiciones naturales a *S. pneumoniae* (por ejemplo, en el caso de sujetos adultos).

Por lo tanto, se puede realizar una comparación de la actividad OPA del suero antes y después de la inmunización con la composición inmunogénica de la invención y comparar su respuesta a los serotipos 9A, 9L y 9N para evaluar el aumento potencial de respondedores (véase el Ejemplo 1).

En una realización, la composición inmunogénica de la invención aumenta significativamente la proporción de respondedores (es decir, el individuo con un suero que tiene un título de al menos 1:8 según lo determinado por OPA *in vitro*) en comparación con la población preinmunizada.

Por lo tanto, en una realización, la composición inmunogénica de la invención es capaz de aumentar significativamente la proporción de respondedores contra serotipo 9N de *S. pneumoniae* (es decir, individuo con un suero que tiene un título de al menos 1:8 según lo determinado por OPA *in vitro*) en comparación con la población preinmunizada.

En una realización, la composición inmunogénica de la invención es capaz de aumentar significativamente la proporción de respondedores contra serotipo 9A de *S. pneumoniae* (es decir, individuo con un suero que tiene un título de al menos 1:8 según lo determinado por OPA *in vitro*) en comparación con la población preinmunizada.

En una realización, la composición inmunogénica de la invención es capaz de aumentar significativamente la proporción de respondedores contra serotipo 9L de *S. pneumoniae* (es decir, individuo con un suero que tiene un título de al menos 1:8 según lo determinado por OPA *in vitro*) en comparación con la población preinmunizada.

En una realización, la composición inmunogénica de la invención es capaz de aumentar significativamente la proporción de respondedores contra los serotipos 9N y 9A de *S. pneumoniae* (es decir, el individuo con un suero que tiene un título de al menos 1:8 según lo determinado por OPA *in vitro*) en comparación con la población preinmunizada.

En una realización, la composición inmunogénica de la invención es capaz de aumentar significativamente la

proporción de respondedores contra los serotipos 9N y 9L de *S. pneumoniae* (es decir, individuos con un suero que tiene un título de al menos 1:8 según lo determinado por OPA *in vitro*) en comparación con la población preinmunizada.

5 En una realización, la composición inmunogénica de la invención es capaz de aumentar significativamente la proporción de respondedores contra los serotipos 9A y 9L de *S. pneumoniae* (es decir, individuos con un suero que tiene un título de al menos 1:8 según lo determinado por OPA *in vitro*) en comparación con la población preinmunizada.

10 En una realización, la composición inmunogénica de la invención es capaz de aumentar significativamente la proporción de respondedores contra los serotipos 9N, 9A y 9L de *S. pneumoniae* (es decir, individuos con un suero que tiene un título de al menos 1:8 determinado por OPA *in vitro*) en comparación con la población preinmunizada.

La comparación de la actividad OPA del suero antes y después de la inmunización con la composición inmunogénica de la invención también puede hacerse comparando el aumento potencial de los títulos de OPA.

15 Por lo tanto, la comparación de la actividad OPA del suero antes y después de la inmunización con la composición inmunogénica de la invención puede llevarse a cabo y compararse para su respuesta a los serotipos 9A, 9L y 9N para evaluar el potencial de aumento de los títulos OPA (ver Ejemplo 1).

20 En una realización, las composiciones inmunogénicas de la invención son capaces de aumentar significativamente el título de OPA de sujetos humanos en comparación con la población preinmunizada.

25 Por lo tanto, en una realización, la composición inmunogénica de la invención es capaz de aumentar significativamente los títulos de OPA de sujetos humanos contra serotipo 9N de *S. pneumoniae* en comparación con la población preinmunizada. En una realización, el aumento del título de OPA frente al serotipo 9N de *S. pneumoniae* es de al menos 1,2, 1,5, 1,75, 2,0 o 2,1.

30 En una realización, la composición inmunogénica de la invención es capaz de aumentar significativamente los títulos de OPA de sujetos humanos contra el serotipo 9A de *S. pneumoniae* en comparación con la población preinmunizada. En una realización, el aumento del título de OPA frente al serotipo 9A de *S. pneumoniae* es de al menos 1,5, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 6,5, 7,0 o 7,5. En una realización, la composición inmunogénica de la invención es capaz de aumentar significativamente los títulos de OPA de sujetos humanos contra el serotipo 9L de *S. pneumoniae* en comparación con la población preinmunizada. En una realización, el aumento del título de OPA frente al serotipo 9L de *S. pneumoniae* es de al menos 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0 o 4,2.

35 En una realización, la composición inmunogénica de la invención es capaz de aumentar significativamente los títulos de OPA de sujetos humanos contra los serotipos 9N y 9A de *S. pneumoniae* en comparación con la población preinmunizada. En una realización, el aumento del título de OPA contra el serotipo 9N de *S. pneumoniae* es de al menos 1,2, 1,5, 1,75, 2,0 o 2,1 y el aumento del título de OPA contra el serotipo 9A de *S. pneumoniae* es de al menos 1,5, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 6,5, 7,0 o 7,5.

40 En una realización, la composición inmunogénica de la invención es capaz de aumentar significativamente los títulos de OPA de sujetos humanos contra los serotipos 9N y 9L de *S. pneumoniae* en comparación con la población preinmunizada. En una realización, el aumento del título de OPA contra el serotipo 9N de *S. pneumoniae* es de al menos 1,2, 1,5, 1,75, 2,0 o 2,1 y el aumento del título de OPA contra el serotipo 9L de *S. pneumoniae* es al menos 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0 o 4,2.

45 En una realización, la composición inmunogénica de la invención es capaz de aumentar significativamente los títulos de OPA de sujetos humanos contra los serotipos 9A y 9L de *S. pneumoniae* en comparación con la población preinmunizada. En una realización, el aumento del título de OPA contra el serotipo 9A de *S. pneumoniae* es de al menos 1,5, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 6,5, 7,0 o 7,5, y el aumento del título de OPA contra el serotipo 9L de *S. pneumoniae* es de al menos 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0 o 4,2.

50 En una realización, la composición inmunogénica de la invención es capaz de aumentar significativamente los títulos de OPA de sujetos humanos contra los serotipos 9N, 9A y 9L de *S. pneumoniae* en comparación con la población preinmunizada. En una realización, el aumento del título de OPA contra el serotipo 9N de *S. pneumoniae* es de al menos 1,2, 1,5, 1,75, 2,0 o 2,1, el aumento del título de OPA contra el serotipo 9A de *S. pneumoniae* es de al menos 1,5, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 6,5, 7,0 o 7,5 y el aumento del título OPA contra el serotipo 9L de *S. pneumoniae* es de al menos 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0 o 4,2.

60 7. Usos de las composiciones inmunogénicas de la invención

Cualquier referencia en la descripción a procedimientos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para diagnóstico).

65

En una realización, las composiciones inmunogénicas divulgadas en el presente documento son para uso como medicamento.

Las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento se pueden usar en diversos procedimientos terapéuticos o profilácticos para prevenir, tratar o mejorar una infección, enfermedad o afección bacteriana en un sujeto. En particular, las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento pueden utilizarse para prevenir, tratar o mejorar una infección, enfermedad o afección *por S. pneumoniae* en un sujeto.

Así, en un aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para prevenir, tratar o mejorar una infección, enfermedad o afección asociada con *S. pneumoniae* en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunogénica de la divulgación.

En un aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para prevenir, tratar o mejorar una infección, enfermedad o afección asociada con los serotipos 9N, 9A y 9L de *S. pneumoniae* en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunogénica de la divulgación.

En un aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para prevenir, tratar o mejorar una infección, enfermedad o afección asociada con serotipo 9N de *S. pneumoniae* en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunogénica de la divulgación.

En un aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para prevenir, tratar o mejorar una infección, enfermedad o afección asociada con serotipo 9A de *S. pneumoniae* en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunogénica de la divulgación.

En un aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para prevenir, tratar o mejorar una infección, enfermedad o afección asociada con serotipo 9L de *S. pneumoniae* en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunogénica de la divulgación.

En un aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para prevenir, tratar o mejorar una infección, enfermedad o afección asociada con serotipo 9N y 9A de *S. pneumoniae* en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunogénica de la divulgación.

En un aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para prevenir, tratar o mejorar una infección, enfermedad o afección asociada con serotipo 9N y 9L de *S. pneumoniae* en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunogénica de la divulgación.

En un aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para prevenir, tratar o mejorar una infección, enfermedad o afección asociada con los serotipo 9A y 9L de *S. pneumoniae* en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunogénica de la divulgación.

En un aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria a los serotipos 9N, 9A y/o 9L de *S. pneumoniae* en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunogénica de la divulgación.

En un aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para inducir una respuesta inmune a serotipos 9N de *S. pneumoniae* en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunogénica de la divulgación.

En un aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para inducir una respuesta inmune a serotipos 9A de *S. pneumoniae* en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunogénica de la divulgación.

En un aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para inducir una respuesta inmune a serotipos 9L de *S. pneumoniae* en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunogénica de la divulgación.

En un aspecto, las composiciones inmunogénicas de la presente divulgación se usan en un procedimiento para prevenir, tratar o mejorar una infección, enfermedad o afección causada por los serotipos 9N, 9A y/o 9L de *S. pneumoniae* en un sujeto.

En un aspecto, las composiciones inmunogénicas de la presente divulgación son para uso en un procedimiento para prevenir, tratar o mejorar una infección, enfermedad o afección causada por el serotipo 9N de *S. pneumoniae* en un sujeto. En un aspecto, las composiciones inmunogénicas de la presente divulgación se utilizan en un procedimiento para prevenir, tratar o mejorar una infección, enfermedad o afección causada por serotipo 9A de *S. pneumoniae* en un sujeto. En un aspecto, las composiciones inmunogénicas de la presente divulgación se utilizan en un procedimiento

para prevenir, tratar o mejorar una infección, enfermedad o afección causada por serotipo 9L de *S. pneumoniae* en un sujeto.

En un aspecto, las composiciones inmunogénicas de la presente divulgación se usan en un procedimiento para prevenir, tratar o mejorar una infección, enfermedad o afección causada por los serotipos 9N y 9A de *S. pneumoniae* en un sujeto. En un aspecto, las composiciones inmunogénicas de la presente divulgación se utilizan en un procedimiento para prevenir, tratar o mejorar una infección, enfermedad o afección causada por los serotipos 9N y 9L de *S. pneumoniae* en un sujeto. En un aspecto, las composiciones inmunogénicas de la presente divulgación se utilizan en un procedimiento para prevenir, tratar o mejorar una infección, enfermedad o afección causada por los serotipos 9A y 9L de *S. pneumoniae* en un sujeto.

En un aspecto, la presente divulgación se dirige al uso de la composición inmunogénica divulgada en el presente documento para la fabricación de un medicamento para prevenir, tratar o mejorar una infección, enfermedad o afección causada por los serotipos 9N, 9A y/o 9L de *S. pneumoniae* en un sujeto.

En un aspecto, la presente divulgación se dirige al uso de la composición inmunogénica divulgada en el presente documento para la fabricación de un medicamento para prevenir, tratar o mejorar una infección, enfermedad o afección causada por los serotipos 9N y 9A de *S. pneumoniae* en un sujeto. En un aspecto, la presente divulgación se dirige al uso de la composición inmunogénica divulgada en el presente documento para la fabricación de un medicamento para prevenir, tratar o mejorar una infección, enfermedad o afección causada por los serotipo 9N y 9L de *S. pneumoniae* en un sujeto. En un aspecto, la presente divulgación se dirige al uso de la composición inmunogénica divulgada en el presente documento para la fabricación de un medicamento para prevenir, tratar o mejorar una infección, enfermedad o afección causada por los serotipos 9A y 9L de *S. pneumoniae* en un sujeto.

En una realización, la presente divulgación está dirigida al uso de la composición inmunogénica divulgada en el presente documento para la fabricación de un medicamento para inmunizar a un sujeto contra la infección por los serotipos 9N, 9A y/o 9L de *S. pneumoniae*.

En una realización, la presente divulgación está dirigida al uso de la composición inmunogénica divulgada en el presente documento para la fabricación de un medicamento para inmunizar a un sujeto contra la infección por el serotipo 9N de *S. pneumoniae*. En una realización, la presente divulgación se dirige al uso de la composición inmunogénica divulgada en el presente documento para la fabricación de un medicamento para inmunizar a un sujeto contra la infección por el serotipo 9A de *S. pneumoniae*. En una realización, la presente divulgación se dirige al uso de la composición inmunogénica divulgada en el presente documento para la fabricación de un medicamento para inmunizar a un sujeto contra la infección por serotipo 9L de *S. pneumoniae*.

En una realización, las composiciones inmunogénicas divulgadas en el presente documento son para uso como vacuna. Más concretamente, las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento pueden utilizarse para prevenir infecciones por *S. pneumoniae* de los serotipos 9N, 9A y/o 9L en un sujeto. Por lo tanto, en un aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para prevenir, una infección por los serotipos 9N, 9A y/o 9L *S. pneumoniae* en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad inmunológicamente efectiva de una composición inmunogénica de la divulgación. En algunas de estas realizaciones, la infección se selecciona del grupo que consiste en neumonía, sinusitis, otitis media, otitis medias agudas, meningitis, bacteriemia, sepsis, empiema pleural, conjuntivitis, osteomielitis, artritis séptica, endocarditis, peritonitis, pericarditis, mastoiditis, celulitis, infección de tejidos blandos y absceso cerebral. En un aspecto, el sujeto que se va a vacunar es un mamífero, como un ser humano, un gato, una oveja, un cerdo, un caballo, un bovino o un perro.

En un aspecto, las composiciones inmunogénicas divulgadas en el presente documento son para uso en un procedimiento de prevención, tratamiento o mejora de una infección, enfermedad o condición asociada a *S. pneumoniae* con serotipos 9N, 9A y/o 9L en un sujeto. En algunas de tales realizaciones, la infección, enfermedad o afección se selecciona del grupo que consiste en neumonía, sinusitis, otitis media, otitis media aguda, meningitis, bacteriemia, sepsis, empiema pleural, conjuntivitis, osteomielitis, artritis séptica, endocarditis, peritonitis, pericarditis, mastoiditis, celulitis, infección de tejidos blandos y absceso cerebral.

En un aspecto, la composición inmunogénica divulgada en el presente documento es para uso en un procedimiento de prevención, una infección por serotipos 9N, 9A y/o 9L de *S. pneumoniae* en un sujeto. En algunas de estas realizaciones, la infección se selecciona del grupo que consiste en neumonía, sinusitis, otitis media, otitis medias agudas, meningitis, bacteriemia, sepsis, empiema pleural, conjuntivitis, osteomielitis, artritis séptica, endocarditis, peritonitis, pericarditis, mastoiditis, celulitis, infección de tejidos blandos y absceso cerebral. En un aspecto, el sujeto que se va a vacunar es un mamífero, como un ser humano, un gato, una oveja, un cerdo, un caballo, un bovino o un perro.

En un aspecto, la presente divulgación se dirige al uso de la composición inmunogénica divulgada en el presente documento para la fabricación de un medicamento para prevenir, tratar o mejorar una infección, enfermedad o afección asociada a *S. pneumoniae* con los serotipos 9N, 9A y/o 9L en un sujeto. En algunas de tales realizaciones, la infección, enfermedad o afección se selecciona del grupo que consiste en neumonía, sinusitis, otitis media, otitis media aguda,

meningitis, bacteriemia, sepsis, empiema pleural, conjuntivitis, osteomielitis, artritis séptica, endocarditis, peritonitis, pericarditis, mastoiditis, celulitis, infección de tejidos blandos y absceso cerebral.

En un aspecto, la presente divulgación está dirigida al uso de la composición inmunogénica divulgada en el presente documento para la fabricación de un medicamento para prevenir una infección por los serotipos 9N, 9A y/o 9L de *S. pneumoniae* en un sujeto. En algunas de estas realizaciones, la infección se selecciona del grupo que consiste en neumonía, sinusitis, otitis media, otitis medias agudas, meningitis, bacteriemia, sepsis, empiema pleural, conjuntivitis, osteomielitis, artritis séptica, endocarditis, peritonitis, pericarditis, mastoiditis, celulitis, infección de tejidos blandos y absceso cerebral. En un aspecto, el sujeto que se va a vacunar es un mamífero, como un ser humano, un gato, una oveja, un cerdo, un caballo, un bovino o un perro.

Las composiciones inmunogénicas de la presente divulgación pueden utilizarse para proteger o tratar a un ser humano susceptible a la infección por los serotipos 9N, 9A y/o 9L de *S. pneumoniae*, mediante la administración de las composiciones inmunogénicas por vía sistémica o mucosa. En una realización, las composiciones inmunogénicas divulgadas en el presente documento se administran por vía intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea. En una realización, las composiciones inmunogénicas divulgadas en el presente documento se administran mediante inyección intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea. En una realización, las composiciones inmunogénicas divulgadas en el presente documento se administran mediante inyección intramuscular o subcutánea.

En una realización, las composiciones inmunogénicas de la presente divulgación comprenden al menos un glucoconjugado de *S. pneumoniae* 9V (tal como los glucoconjugados del párrafo 1.3 anterior).

8. Sujeto que se va a tratar con las composiciones inmunógenas de la invención

Como se describe en el presente documento, las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento se pueden usar en diversos procedimientos terapéuticos o profilácticos para prevenir, tratar o mejorar una infección, enfermedad o afección bacteriana en un sujeto.

En una realización preferida, dicho sujeto es un ser humano. En una realización más preferida, dicho sujeto es un recién nacido (es decir, menos de tres meses de edad), un lactante (es decir, de tres meses a un año de edad) o un niño pequeño (es decir, de un año a cuatro años de edad).

En una realización, las composiciones inmunogénicas divulgadas en el presente documento son para uso como vacuna.

En dicha realización, el sujeto que se va a vacunar puede ser menor de 1 año de edad. Por ejemplo, el sujeto que se va a vacunar puede tener aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 11 o aproximadamente 12 meses de edad. En una realización, el sujeto que se va a vacunar tiene aproximadamente 2, 4 o 6 meses de edad. En otra realización, el sujeto que se va a vacunar tiene menos de 2 años de edad. Por ejemplo, el sujeto que se va a vacunar puede tener aproximadamente 12 a aproximadamente 15 meses de edad. En algunos casos, se necesita tan sólo una dosis de la composición inmunogénica de acuerdo con la invención, pero en algunas circunstancias, puede administrarse una segunda, tercera o cuarta dosis (véase la sección 9 más adelante).

En una realización de la presente invención, el sujeto que se va a vacunar es un adulto humano de 50 años de edad o más, más preferentemente un adulto humano de 55 años de edad o más. En una realización, el sujeto que se va a vacunar es un adulto humano de 65 años o más, de 70 años o más, de 75 años o más o de 80 años o más.

En una realización, el sujeto que se va a vacunar es un individuo inmunocomprometido, en particular un ser humano. Un individuo inmunocomprometido se define generalmente como una persona que muestra una capacidad atenuada o reducida para montar una defensa humoral o celular normal ante el desafío de agentes infecciosos.

En una realización de la presente invención, el sujeto inmunocomprometido que se va a vacunar padece una enfermedad o afección que deteriora el sistema inmunitario y da lugar a una respuesta de anticuerpos insuficiente para proteger contra la enfermedad neumocócica o tratarla.

En una realización, dicha enfermedad es un trastorno de inmunodeficiencia primaria. Preferentemente, dicho trastorno de inmunodeficiencia primaria se selecciona del grupo que consiste en: inmunodeficiencias combinadas de células T y B, deficiencias de anticuerpos, síndromes bien definidos, enfermedades de desregulación inmunitaria, trastornos fagocíticos, deficiencias de la inmunidad innata, trastornos autoinflamatorios y deficiencias del complemento. En una realización, dicho trastorno de inmunodeficiencia primaria se selecciona del descrito en la página 24, línea 11, a la página 25, línea 19, del documento WO 2010/125480.

En una realización particular de la presente invención, el sujeto inmunocomprometido que se va a vacunar padece una enfermedad seleccionada de entre los grupos que consisten en: infección por VIH, síndrome de inmunodeficiencia

adquirida (SIDA), cáncer, trastornos cardíacos o pulmonares crónicos, insuficiencia cardíaca congestiva, diabetes mellitus, enfermedad hepática crónica, alcoholismo, cirrosis, fugas de líquido cefalorraquídeo, cardiomiopatía, bronquitis crónica, enfisema, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), disfunción del bazo (tal como la anemia falciforme), falta de función del bazo (asplenia), neoplasia maligna de la sangre, leucemia, mieloma múltiple, enfermedad de Hodgkin, linfoma, insuficiencia renal, síndrome nefrótico y asma.

En una realización de la presente invención, el sujeto inmunocomprometido que se va a vacunar sufre desnutrición.

En una realización particular de la presente invención, el sujeto inmunocomprometido que se va a vacunar está tomando un medicamento o tratamiento que disminuye la resistencia del cuerpo a la infección. En una realización, dicho fármaco se selecciona del divulgado en la página 26, línea 33, a la página 26, línea 4, del documento WO 2010/125480.

En una realización particular de la presente invención, el sujeto inmunocomprometido que se va a vacunar es un fumador.

En una realización particular de la presente invención, el sujeto inmunocomprometido que se va a vacunar tiene un recuento de glóbulos blancos (recuento de leucocitos) inferior a 5×10^9 células por litro, o inferior a 4×10^9 células por litro, o inferior a 3×10^9 células por litro, o inferior a 2×10^9 células por litro, o inferior a 1×10^9 células por litro, o inferior a $0,5 \times 10^9$ células por litro, o inferior a $0,3 \times 10^9$ células por litro, o inferior a $0,1 \times 10^9$ células por litro.

Recuento de glóbulos blancos (recuento de leucocitos): Número de glóbulos blancos (GB) en la sangre. Los glóbulos blancos suelen medirse como parte del hemograma (recuento sanguíneo completo). Los glóbulos blancos son las células que combaten las infecciones en la sangre y son distintos de los glóbulos rojos (que transportan oxígeno) conocidos como eritrocitos. Existen distintos tipos de glóbulos blancos, tal como los neutrófilos (leucocitos polimorfonucleares; PMN), las células en banda (neutrófilos ligeramente inmaduros), los linfocitos de tipo T (células T), los linfocitos de tipo B (células B), los monocitos, los eosinófilos y los basófilos. Todos los tipos de glóbulos blancos se reflejan en el recuento de glóbulos blancos. El intervalo normal para el recuento de glóbulos blancos suele situarse entre 4.300 y 10.800 células por milímetro cúbico de sangre. También puede denominarse recuento de leucocitos y puede expresarse en unidades internacionales como $4,3 - 10,8 \times 10^9$ células por litro.

En una realización particular de la presente invención, el sujeto inmunocomprometido que se va a vacunar sufre de neutropenia. En una realización particular de la presente invención, el sujeto inmunocomprometido que se va a vacunar tiene un recuento de neutrófilos inferior a 2×10^9 células por litro, o inferior a 1×10^9 células por litro, o inferior a $0,5 \times 10^9$ células por litro, o inferior a $0,1 \times 10^9$ células por litro, o inferior a $0,05 \times 10^9$ células por litro.

Un recuento bajo de glóbulos blancos o "neutropenia" es una afección caracterizada por niveles anormalmente bajos de neutrófilos en la sangre circulante. Los neutrófilos son un tipo específico de glóbulos blancos que ayudan a prevenir y combatir las infecciones. La razón más común por la que los pacientes con cáncer experimentan neutropenia es como efecto secundario de la quimioterapia. La neutropenia inducida por la quimioterapia aumenta el riesgo de infección del paciente e interrumpe el tratamiento del cáncer.

En una realización particular de la presente invención, el sujeto inmunocomprometido que se va a vacunar tiene un recuento de células CD4+ inferior a 500/mm³, o un recuento de células CD4+ inferior a 300/mm³, o un recuento de células CD4+ inferior a 200/mm³, un recuento de células CD4+ inferior a 100/mm³, un recuento de células CD4+ inferior a 75/mm³, o un recuento de células CD4+ inferior a 50/mm³.

Las pruebas de células CD4 se informan normalmente como el número de células en mm³. Los recuentos normales de CD4 se sitúan entre 500 y 1600, y los de CD8 entre 375 y 1100. Los recuentos de CD4 descienden drásticamente en las personas con VIH.

En una realización de la invención, cualquiera de los sujetos inmunocomprometidos divulgados en el presente documento es un varón humano o una hembra humana.

9. Régimen

En algunos casos, se necesita tan sólo una dosis de la composición inmunogénica de acuerdo con la invención, pero en algunas circunstancias, tal como condiciones de mayor inmunodeficiencia, puede administrarse una segunda, tercera o cuarta dosis. Tras una vacunación inicial, los individuos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo separadas de forma adecuada.

En una realización, el esquema de vacunación de la composición inmunogénica de acuerdo con la invención es una dosis única. En una realización particular, dicho esquema de dosis única es para personas sanas de al menos 2 años de edad.

En una realización, el programa de vacunación de la composición inmunogénica de acuerdo con la invención es un

programa de dosis múltiples. En una realización particular, dicho programa de dosis múltiples consiste en una serie de 2 dosis separadas por un intervalo de aproximadamente 1 mes a aproximadamente 2 meses. En una realización particular, dicho programa de dosis múltiples consiste en una serie de 2 dosis separadas por un intervalo de aproximadamente 1 mes, o una serie de 2 dosis separadas por un intervalo de aproximadamente 2 meses.

En otra realización, dicho programa de dosis múltiples consiste en una serie de 3 dosis separadas por un intervalo de aproximadamente 1 mes a aproximadamente 2 meses. En otra realización, dicho programa de dosis múltiples consiste en una serie de 3 dosis separadas por un intervalo de aproximadamente 1 mes, o una serie de 3 dosis separadas por un intervalo de aproximadamente 2 meses.

En otra realización, dicho programa de dosis múltiples consiste en una serie de 3 dosis separadas por un intervalo de aproximadamente 1 mes a aproximadamente 2 meses, seguidas por una cuarta dosis de aproximadamente 10 meses a aproximadamente 13 meses después de la primera dosis. En otra realización, dicho programa de dosis múltiples consiste en una serie de 3 dosis separadas por un intervalo de aproximadamente 1 mes seguido de una cuarta dosis de aproximadamente 10 meses a aproximadamente 13 meses después de la primera dosis, o una serie de 3 dosis separadas por un intervalo de aproximadamente 2 meses seguido de una cuarta dosis de aproximadamente 10 meses a aproximadamente 13 meses después de la primera dosis.

En una realización, el programa de dosis múltiples consiste en al menos una dosis (por ejemplo, 1, 2 o 3 dosis) en el primer año de edad seguida de al menos una dosis para niños pequeños.

En una realización, el esquema de dosis múltiples consiste en una serie de 2 o 3 dosis separadas por un intervalo de aproximadamente 1 mes a aproximadamente 2 meses (por ejemplo 28-56 días entre dosis), comenzando a los 2 meses de edad, y seguido por una dosis de niño pequeño a los 12-18 meses de edad. En una realización, dicho programa de dosis múltiples consiste en una serie de 3 dosis separadas por un intervalo de aproximadamente 1 a 2 meses (por ejemplo 28-56 días entre las dosis), comenzando a los 2 meses de edad, y seguido por una dosis de niño pequeño a los 12-15 meses de edad. En otra realización, dicho programa de dosis múltiples consiste en una serie de 2 dosis separadas por un intervalo de unos 2 meses, comenzando a los 2 meses de edad, y seguidas de una dosis para niños pequeños a los 12-18 meses de edad.

En una realización, el esquema de dosis múltiples consiste en una serie de 4 dosis de vacuna a los 2, 4, 6 y 12-15 meses de edad.

En una realización, se administra una dosis inicial en el día 0 y uno o más refuerzos a intervalos que van desde aproximadamente 2 a aproximadamente 24 semanas, preferentemente con un intervalo de dosificación de 4-8 semanas.

En una realización, se administra una dosis inicial en el día 0 y un refuerzo aproximadamente 3 meses después.

10. Kit y procedimiento

En una realización, la divulgación se dirige a un kit que comprende una composición inmunogénica divulgada en el presente documento y un prospecto informativo.

En una realización, dicho prospecto informativo menciona la capacidad de la composición para provocar anticuerpos funcionales contra los serotipos 9A, 9L y/o 9N de *S. pneumoniae*.

En una realización, dicho prospecto informativo menciona la capacidad de la composición para provocar anticuerpos funcionales contra el serotipo 9N de *S. pneumoniae*.

En una realización, dicho prospecto informativo menciona la capacidad de la composición para provocar anticuerpos anticapsulares contra los serotipos 9A, 9L y/o 9N de *S. pneumoniae* a una concentración $\geq 0,35$ µg/ml en una población humana.

En una realización, dicho prospecto informativo menciona la capacidad de la composición para provocar anticuerpos anticapsulares contra el serotipo 9N de *S. pneumoniae* a una concentración $\geq 0,35$ µg/ml en una población humana.

En una realización, dicho prospecto informativo menciona la capacidad de la composición para provocar títulos de OPA contra los serotipos 9A, 9L y/o 9N de *S. pneumoniae* en una población humana. En una realización, dicho prospecto informativo menciona la capacidad de la composición para provocar títulos de OPA contra los serotipos 9N de *S. pneumoniae* en una población humana.

En una realización, la divulgación se dirige a un procedimiento para producir un kit que comprende una composición inmunogénica y un prospecto informativo, comprendiendo dicho procedimiento el paso de:

- producir una composición inmunogénica de la presente divulgación y
- combinar en el mismo kit dicha composición inmunogénica y prospecto informativo, en el que dicho prospecto informativo menciona la capacidad de dicha composición para provocar anticuerpos funcionales contra los serotipos 9A, 9L y/o 9N de *S. pneumoniae*.

5 En una realización, la divulgación se dirige a un procedimiento para producir un kit que comprende una composición inmunogénica y un prospecto informativo, comprendiendo dicho procedimiento el paso de:

- producir una composición inmunogénica de la presente divulgación y
- combinar en el mismo kit dicha composición inmunogénica y prospecto informativo, en donde dicho prospecto informativo menciona la capacidad de la composición para provocar anticuerpos anticapsulares contra los serotipos 9A, 9L y/o 9N de *S. pneumoniae* a una concentración $\geq 0,35$ $\mu\text{g/ml}$ en una población humana.

10

En una realización, la divulgación se dirige a un procedimiento para producir un kit que comprende una composición inmunogénica y un prospecto informativo, comprendiendo dicho procedimiento el paso de:

- producir una composición inmunogénica de la presente divulgación y
- combinar en el mismo kit dicha composición inmunogénica y prospecto informativo, en el que dicho prospecto informativo menciona la capacidad de la composición para provocar títulos de OPA frente a los serotipos 9A, 9L y/o 9N de *S. pneumoniae* en una población humana.

15

20 En una realización, la divulgación se dirige a un procedimiento para producir un kit que comprende una composición inmunogénica y un prospecto informativo, comprendiendo dicho procedimiento el paso de:

- producir una composición inmunogénica de la presente divulgación;
- imprimir un prospecto informativo en donde se mencione la capacidad de dicha composición para provocar anticuerpos funcionales contra los serotipos 9A, 9L y/o 9N de *S. pneumoniae*;
- combinar en el mismo kit dicha composición inmunogénica y dicho prospecto informativo.

25

En una realización, la divulgación se dirige a un procedimiento para producir un kit que comprende una composición inmunogénica y un prospecto informativo, comprendiendo dicho procedimiento el paso de:

- producir una composición inmunogénica de la presente divulgación;
- imprimir un prospecto informativo en donde dicho prospecto mencione la capacidad de la composición para provocar anticuerpos anticapsulares contra los serotipos 9A, 9L y/o 9N de *S. pneumoniae* a una concentración $\geq 0,35$ $\mu\text{g/ml}$ en una población humana;
- combinar en el mismo kit dicha composición inmunogénica y dicho prospecto informativo.

30

35

En una realización, la divulgación se dirige a un procedimiento para producir un kit que comprende una composición inmunogénica y un prospecto informativo, comprendiendo dicho procedimiento el paso de:

- producir una composición inmunogénica de la presente divulgación;
- imprimir un prospecto informativo en donde se mencione la capacidad de la composición para provocar títulos de OPA frente a los serotipos 9A, 9L y/o 9N de *S. pneumoniae* en una población humana;
- combinar en el mismo kit dicha composición inmunogénica y dicho prospecto informativo.

40

11. Procedimientos

45 En una realización, la divulgación se dirige a un procedimiento que comprende el paso de:

- inyectar a un sujeto una cantidad inmunológicamente eficaz de cualquiera de las composiciones inmunogénicas definidas en el presente documento;
- recoger una muestra de suero de dicho sujeto;
- comprobar la actividad opsonofagocítica de dicha muestra de suero contra el serotipo 9N de *S. pneumoniae* mediante un ensayo in vitro de destrucción opsonofagocítica (OPA).

50

En una realización, la divulgación se dirige a un procedimiento que comprende el paso de:

- inyectar a un sujeto una cantidad inmunológicamente eficaz de cualquiera de las composiciones inmunogénicas definidas en el presente documento;
- recoger una muestra de suero de dicho sujeto;
- comprobar la actividad opsonofagocítica de dicha muestra de suero contra el serotipo 9A de *S. pneumoniae* mediante un ensayo in vitro de destrucción opsonofagocítica (OPA).

55

En una realización, la divulgación se dirige a un procedimiento que comprende el paso de:

- inyectar a un sujeto una cantidad inmunológicamente eficaz de cualquiera de las composiciones inmunogénicas definidas en el presente documento;
- recoger una muestra de suero de dicho sujeto;
- comprobar la actividad opsonofagocítica de dicha muestra de suero contra el serotipo 9L de *S. pneumoniae* mediante un ensayo in vitro de destrucción opsonofagocítica (OPA).

En una realización, la divulgación se dirige a un procedimiento que comprende el paso de:

- inyectar a un sujeto una cantidad inmunológicamente eficaz de cualquiera de las composiciones inmunogénicas definidas en el presente documento;
- recoger una muestra de suero de dicho sujeto;
- comprobar la actividad opsonofagocítica de dicha muestra de suero frente a los serotipos 9N, 9A y/o 9L de *S. pneumoniae* mediante un ensayo in vitro de destrucción opsonofagocítica (OPA).

Como se usa en la presente memoria, el término "aproximadamente" significa dentro de un intervalo estadísticamente significativo de un valor, tal como un intervalo de concentración establecido, marco temporal, peso molecular, temperatura o pH. Dicho intervalo puede estar dentro de un orden de magnitud, típicamente en el 20 %, más normalmente en un 10% e incluso más normalmente en un 5% o en un 1% de un valor o intervalo dado. A menudo, dicho intervalo puede estar dentro del error experimental típico de los procedimientos convencionales usados para la medición y/o para la determinación de un valor o intervalo dado. La variación permisible abarcada por el término "aproximadamente" dependerá del sistema particular bajo estudio, y la puede apreciar fácilmente un experto en la materia. Cuando se indique un intervalo en la presente solicitud, cada número entero completo en el intervalo también se contempla como una realización de la divulgación.

Los inventores pretenden que los términos "que comprende", "comprenden" y "comprende" sean opcionalmente sustituibles por los términos "que consiste en", "consisten en" y "consiste en", respectivamente, en todos los casos.

La invención se ilustra en los ejemplos adjuntos. Los ejemplos que se presentan a continuación se llevan a cabo por medio de técnicas estándar, que son muy conocidas y rutinarias para los expertos en la técnica, salvo que se describa en detalle lo contrario. Los ejemplos son ilustrativos, pero no limitan la invención.

EJEMPLO

Ejemplo 1. Evaluación de las respuestas inmunitarias opsonofagocíticas reactivas cruzadas dentro del serogrupo 9 de *Streptococcus pneumoniae*

El ensayo neumocócico opsonofagocítico (OPA), que mide la eliminación de células de *S. pneumoniae* por células efectoras fagocíticas en presencia de anticuerpos funcionales y complemento, se considera un sustituto importante para evaluar la eficacia de las vacunas neumocócicas.

Materiales y procedimientos

Dos subconjuntos seleccionados aleatoriamente de sueros inmunes de adultos vacunados con una vacuna neumocócica conjugada 13-valente (13vPnC) se probaron en ensayos OPA para los serotipos 9V, 9A, 9L y 9N. Los sueros se recogieron de los ensayos clínicos estadounidenses 6115A1-004 (N=59, post-vacunación) y 6115A1-3005 (N=66, emparejados pre y post-vacunación), respectivamente.

Estudio 6115A1-3005 (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00546572) fue un ensayo de fase 3, aleatorizado, activo-controlado, doble ciego modificado que evaluó la seguridad, tolerabilidad e inmunogenicidad de PREVNAR^{13®} en comparación con una vacuna antineumocócica polisacárida 23-valente (23vPS) en ancianos ambulatorios de 70 años o más que recibieron 1 dosis de 23vPS al menos 5 años antes de la inscripción en el estudio (véase <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00546572>, consultado el 31 de marzo de 2014).

Estudio 6115A1-004 (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00427895) fue un ensayo de fase 3, aleatorizado, activo-controlado, doble ciego modificado que evaluó la seguridad, tolerabilidad e inmunogenicidad de una vacuna antineumocócica conjugada 13-valente (13vPnC) en comparación con una vacuna antineumocócica polisacárida 23-valente (23vPS) en adultos de 60 a 64 años de edad que no han recibido 23vPS y la seguridad, tolerabilidad e inmunogenicidad de 13vPnC en adultos de 18 a 59 años de edad que no han recibido 23vPS (véase: <http://clinicaltrials.gov/show/NCT00427895>, consultado el 31 de marzo de 2014).

La vacuna antineumocócica conjugada 13-valente (13vPnC) probada en estos estudios contenía conjugados de los serotipos antineumocócicos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F, conjugados individualmente con la proteína portadora material 197 de reacción cruzada diftérica (CRM₁₉₇).

Los OPA se utilizan para medir anticuerpos funcionales en suero humano contra los serotipos 9V, 9N, 9A y/o 9L de *S. pneumoniae*. El suero de prueba se prepara en reacciones de ensayo que miden la capacidad de la inmunoglobulina específica del polisacárido capsular para opsonizar bacterias, desencadenar la deposición de complemento, facilitando así la fagocitosis y la eliminación de las bacterias por los fagocitos. El título OPA se define como la dilución recíproca que da lugar a una reducción del 50% del recuento bacteriano con respecto a los pocillos de control sin suero problema. El título de OPA se interpola a partir de las dos diluciones que abarcan este límite de destrucción del 50%.

Los procedimientos de OPA se basaron en los procedimientos descritos en Hu et al., (2005) Clin Diagn Lab Immunol 12:287-295. El suero inactivado por calor se diluyó en serie 2,5 veces y se añadió junto con las bacterias objetivo en placas de ensayo y se incubó durante 30 minutos con agitación. A continuación, se añadieron a los pocillos células HL-60 diferenciadas (fagocitos) y suero de conejo bebé (de 3 a 4 semanas de edad, PEL-FREEZ®, Arkansas, 12,5% de concentración final), en una proporción aproximada de efector a objetivo de 200:1, y se incubaron a 37°C con agitación. Para terminar la reacción, se añadieron 80 µl de NaCl al 0,9 % a todos los pocillos, se mezcló y se transfirió una alícuota de 10 µl a los pocillos de las placas de filtro MULTISCREEN® HTS HV (MILLIPORE®) que contenían 200 µl de agua. El líquido se filtró a través de las placas al vacío y se añadieron 150 µl de medio HYSOY® a cada pocillo y se filtraron. Luego, las placas de filtro se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 % durante la noche y luego se fijaron con Destain Solution (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA). Las placas se tiñeron después con azul de Coomassie y se decoloraron una vez. Se tomaron imágenes de las colonias y se enumeraron en un analizador IMMUNOSPOT® de Cellular Technology Limited (CTL) (Shaker Heights, OH). El título de anticuerpos OPA se determinó como el recíproco de la dilución de suero más baja que resultó en una reducción del 50 % en el número de colonias bacterianas en comparación con los pocillos de control del complemento de células efectoras de bacterias que no contenían suero.

Análisis Estadístico: Se calcularon las correlaciones de Pearson de dos colas.

Resultados - Respuestas OPA en 9V, 9A, 9L y 9N

La respuesta funcional cruzada de sueros inmunes de adultos inmunizados con 13vPnC contra los serotipos 9A, 9L y 9N, se evaluó en los respectivos Ensayos Opsonofagocíticos de Microcolonias (mcOPAs), junto con la respuesta funcional homóloga al serotipo 9V. Se analizaron dos subconjuntos seleccionados al azar de sueros inmunes de adultos vacunados con 13vPnC. Los sueros se recogieron de los ensayos clínicos estadounidenses 6115A1-004 (N=59, post-vacunación) y 6115A1-3005 (N=66, emparejados pre y post-vacunación), respectivamente.

Los sujetos del estudio 6115A1-004 no habían recibido previamente ninguna vacuna antineumocócica y recibieron una dosis única de 13vPnC como parte del protocolo del estudio. Los sueros inmunes del estudio 6115A1-004 muestran un porcentaje similar de respondedores para todos los serogrupos con valores de 98,3%, 98,3%, 100% y 93,2% para 9V, 9A, 9L y 9N respectivamente (Figura 1), lo que apoya los resultados de 6115A1-3005 (Figura 2). Se observaron correlaciones relativamente buenas entre los títulos de OPA de los serotipos 9V y 9A (correlación de Pearson $p = 0,5456$, $p < 0,0001$) o 9L ($p = 0,7353$, $p < 0,0001$), pero no con 9N ($p = 0,1217$, $p < 0,3627$).

Los sujetos del estudio 6115A1-3005 habían recibido previamente 1 dosis de 23vPS al menos 5 años antes de la inscripción en el estudio y recibieron una dosis única de 13vPnC como parte del protocolo del estudio. Se evaluó en OPA un panel de suero emparejado pre y post la vacunación (N = 66) de adultos inmunizados con 13vPnC (estudio 6115A1-3005) para determinar la respuesta homóloga al serotipo 9V y la reactividad cruzada de los anticuerpos anti-9V a los serotipos 9A, 9L y 9N. Como se muestra en la Figura 2, se detectó una inmunidad relativamente alta (porcentaje de respondedores) a 9A (84%), 9A (66%), 9L (82%) y 9N (86%) en el ensayo OPA, probablemente debido a su inmunización previa con 23vPS, que incluye polisacáridos no conjugados de los serotipos 9V y 9N. Sin embargo, el porcentaje de respondedores aumentó hasta 95% o más para los cuatro serotipos tras la vacunación con 13vPnC, que sólo contiene conjugado del serotipo 9V del serogrupo 9. En la Tabla 1 se muestran los valores de los títulos multiplicados por dos, que son similares entre los serotipos, lo que también sugiere una reactividad cruzada.

Tabla 1. Aumento de los títulos de OPA antes y después de la vacunación, 13vPnC

GMT Aumentado	Títulos OPA							
	9 V		9A		9L		9N	
	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
	221	1323	41	308	165	706	322	693
	5,9		7,5		4,2		2,1	

Un análisis más completo de la distribución de títulos de OPA se muestra en las curvas de distribución acumulativa inversa (RCDC) en las Figuras 3-6. Los RCDC muestran un aumento de la respuesta inmunitaria específica del serotipo tras la vacunación para los serotipos 9V, 9A, 9L y, en menor medida, 9N. También se analizó la correlación del aumento del título en pliegues de muestras/parejas individuales entre 9V 9A, 9V/9L y 9V/9N mediante la correlación de Pearson. Se observaron correlaciones relativamente buenas de los aumentos de los títulos entre los serotipos 9V

y 9A (correlación de Pearson $p = 0,8720$, $p < 0,0001$) o 9N ($p = 0,5801$, $p < 0,0001$), pero en menor medida con 9L ($p = 0,1804$, $p < 0,1640$).

Conclusión

Basándose en estos datos, es probable que la vacuna 13vPnC proporcione una cobertura de serotipos más amplia al proporcionar protección adicional contra los serotipos 9A, 9L y 9N.

Ejemplo 2. Evaluación adicional de las respuestas inmunitarias opsonofagocíticas reactivas cruzadas dentro del serogrupo 9 de *Streptococcus pneumoniae*

La capacidad de los anticuerpos específicos del serotipo 9V inducidos por 13vPnC para reaccionar funcionalmente de forma cruzada con bacterias de los serotipos 9A, 9L y 9N (es decir, matar bacterias en los OPA de los serotipos 9A, 9L y 9N) se evaluó además en suero de un tercer estudio clínico.

Materiales y procedimientos

Se analizaron subconjuntos seleccionados aleatoriamente de sueros inmunes de adultos vacunados con una vacuna neumocócica conjugada 13-valente (13vPnC) en ensayos OPA para los serotipos 9V, 9A, 9L y 9N. Los sueros se recogieron del suero previo y posterior a la vacunación del estudio clínico japonés para adultos B1851088 (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01646398)

El estudio B1851088 fue un ensayo de fase 3, aleatorizado, modificado, doble ciego y controlado activamente que evaluó la seguridad, la tolerabilidad y la inmunogenicidad de una vacuna antineumocócica conjugada 13-valente, en adultos mayores japoneses de 65 años o más que no habían recibido nunca la vacuna antineumocócica (véase <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01646398>, consultado el 30 de noviembre de 2015).

La vacuna antineumocócica conjugada 13-valente (13vPnC) probada en estos estudios contenía conjugados de los serotipos antineumocócicos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F, conjugados individualmente con la proteína portadora material 197 de reacción cruzada diftérica (CRM₁₉₇).

Los OPA y el análisis estadístico se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 1.

Resultados - Respuestas OPA en 9V, 9A, 9L y 9N

Los sujetos del estudio B1851088 no se vacunaron previamente con vacunas antineumocócicas y recibieron una dosis única de 13vPnC o 23vPS (una vacuna antineumocócica polisacárida 23-valente que consiste en una mezcla de polisacáridos capsulares purificados de los tipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F y 33F) como parte del protocolo del estudio. Se evaluó la respuesta cruzada a los serotipos 9A, 9L y 9N en sueros inmunes de adultos japoneses inmunizados con 13vPnC o 23vPS en las respectivas OPA del serogrupo 9.

Un subconjunto de sueros pre y posinmunes de adultos vacunados con 13vPnC o 23vPS se analizaron en ensayos OPA para los serotipos 9A, 9L y 9N. los títulos de OPA de 9V se obtuvieron a partir de los datos clínicos comunicados. Los sueros se seleccionaron del brazo 13vPnC del ensayo clínico japonés B1851088 (N = 91, emparejados pre y post la vacunación) y del brazo 23vPS (N = 83, emparejados antes y después de la vacunación). Los sueros se eligieron de los sujetos cuyos títulos de OPA previos a la vacunación eran bajos o negativos frente al 9V según los datos clínicos comunicados. Todos los sujetos de B1851088 no fueron preexpuestos a la vacuna 23vPS.

Se observó un título basal relativamente bajo de OPA del serogrupo 9 en los sujetos antes de la vacunación. Tras la vacunación con 13vPnC o 23vPS, las respuestas al OPA del serogrupo 9 aumentaron hasta alcanzar altas tasas de respuesta: 100%, 98%, 92%, y 96% para 9V, 9A, 9L, y 9N respectivamente de sujetos 13vPnC y 100%, 88%, 94%, y 100% para 9V, 9A, 9L, y 9N respectivamente de sujetos 23vPS (Figura 7 y Figura 8).

Mientras que 13vPnC sólo contiene polisacáridos del serotipo 9V del serogrupo 9, 23vPS contiene polisacáridos tanto del 9V como del 9N. Por lo tanto, las respuestas del serotipo 9N son homólogas tras la vacunación 23vPS y heterólogas (reacción cruzada del serotipo 9V) tras la vacunación 13vPnC.

Las GMT de OPA del serogrupo 9 tras la vacunación son elevadas para todos los serotipos del serogrupo 9, independientemente de la vacuna recibida (Figura 9). De la Figura 10 a la Figura 15 se muestran las curvas de distribución acumulativa inversa de las respuestas OPA del serogrupo 9 a la vacunación con 13vPnC o 23vPS.

Se evaluaron respuestas OPA funcionales de reactividad cruzada del serogrupo 9 en muestras de suero de tres estudios de vacunas neumocócicas (6115A1-004, 6155A1-3005 (ejemplo 1) y B1851088 (ejemplo 2)). Sorprendentemente, la respuesta inmunitaria inducida por 13vPnC frente al serotipo 9V reaccionó de forma cruzada con todos los serotipos heterólogos del serogrupo 9 (9A, 9L y 9N) en diversos grados. Con base en estos datos, la

vacuna 13vPnC debería proporcionar protección adicional contra los serotipos 9A, 9L y 9N, además de la protección esperada contra el serotipo 9V.

5 Todas las publicaciones y solicitudes de patentes mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas del nivel de los expertos en la técnica a la que pertenece la presente invención.

Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo con fines de claridad de comprensión, ciertos cambios y modificaciones se pueden practicar dentro del ámbito de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición inmunogénica que comprende al menos un glicoconjugado del serotipo 9V de *S. pneumoniae* y que comprende además glicoconjugados de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 14, 18C, 19A, 19F y 23F de *S. pneumoniae*, en la que dichos glicoconjugados están conjugados individualmente con CRM₁₉₇, en la que dicha composición comprende de 0,1 mg/ml a 1 mg/ml de aluminio elemental en forma de fosfato de aluminio como adyuvante y en la que dicha composición no comprende sacáridos capsulares de los serotipos 9V de *S. pneumoniae*, para su uso en un procedimiento para prevenir la infección por *S. pneumoniae* de serotipo 9N en un sujeto humano.
- 10 2. La composición inmunogénica para uso de la reivindicación 1 comprende además glicoconjugados de los serotipos 22F y 33F de *S. pneumoniae*.
3. La composición inmunogénica para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 que es una composición de conjugado neumocócico 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 valente.
- 15 4. La composición inmunogénica para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 que es capaz de provocar anticuerpos IgG en humanos que son capaces de unirse al polisacárido de serotipos 9N de *S. pneumoniae* a una concentración de al menos 0,35 µg/ml según lo determinado por ensayo ELISA.
- 20 5. La composición inmunogénica para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 que es capaz de provocar anticuerpos funcionales en humanos que son capaces de destruir serotipo 9N de *S. pneumoniae* según lo determinado por el ensayo opsonofagocítico *in vitro* (OPA).
- 25 6. La composición inmunogénica para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 que es capaz de provocar un título de al menos 1:8 contra serotipo 9N de *S. pneumoniae* en al menos 50% de los sujetos según lo determinado por el ensayo de destrucción opsonofagocítica *in vitro* (OPA).
- 30 7. Un kit que comprende una composición inmunogénica que comprende al menos un glicoconjugado del serotipo 9V de *S. pneumoniae* y que comprende además glicoconjugados de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 14, 18C, 19A, 19F y 23F de *S. pneumoniae*, en el que dichos glicoconjugados están conjugados individualmente con CRM₁₉₇, en el que dicha composición comprende de 0,1 mg/ml a 1 mg/ml de aluminio elemental en forma de fosfato de aluminio como adyuvante y en el que dicha composición no comprende sacáridos capsulares de los serotipos 9N, 9A y 9L de *S. pneumoniae* y un prospecto informativo en el que dicho prospecto informativo menciona la capacidad de la composición para provocar títulos de OPA contra serotipos 9N de *S. pneumoniae* en una población humana.
- 35 8. Un procedimiento para producir un kit que comprende una composición inmunogénica y un prospecto informativo, dicho procedimiento comprende el paso de:
 - 40 - producir una composición inmunogénica que comprenda al menos un glicoconjugado de *S. pneumoniae* serotipo 9V y que comprenda además glicoconjugados de *S. pneumoniae* serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 14, 18C, 19A, 19F y 23F, en la que dichos glicoconjugados estén conjugados individualmente con CRM₁₉₇, en la que dicha composición comprenda de 0.1 mg/ml a 1 mg/ml de aluminio elemental en forma de fosfato de aluminio como adyuvante y en la que dicha composición no comprende sacáridos capsulares de los serotipos 9N, 9A y 9L de *S. pneumoniae* y
 - 45 - combinar en el mismo kit dicha composición inmunogénica y prospecto informativo en el que dicho prospecto informativo menciona la capacidad de la composición para provocar títulos de OPA frente a *S. pneumoniae* serotipos 9N en una población humana.

FIG. 1

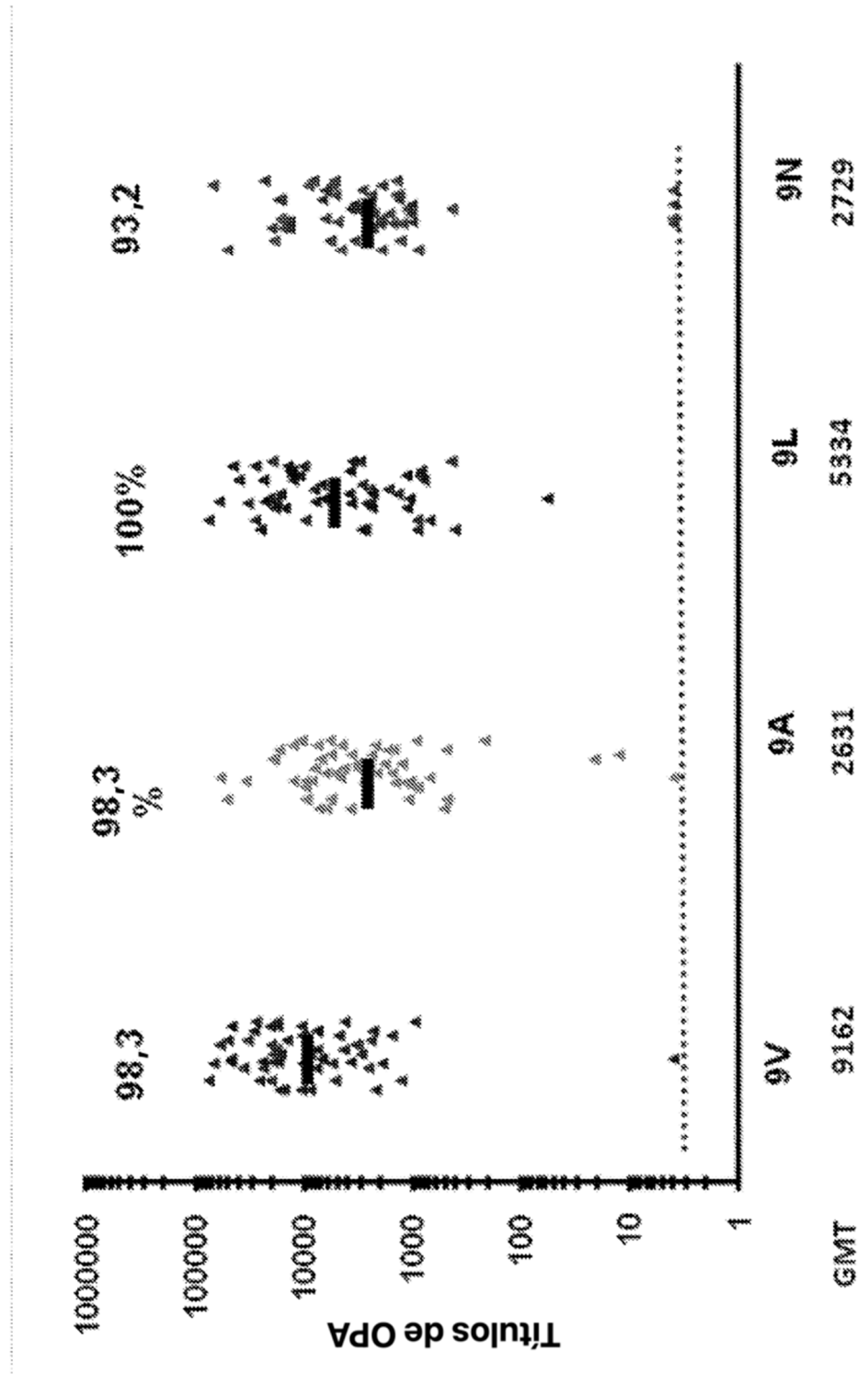


FIG. 2

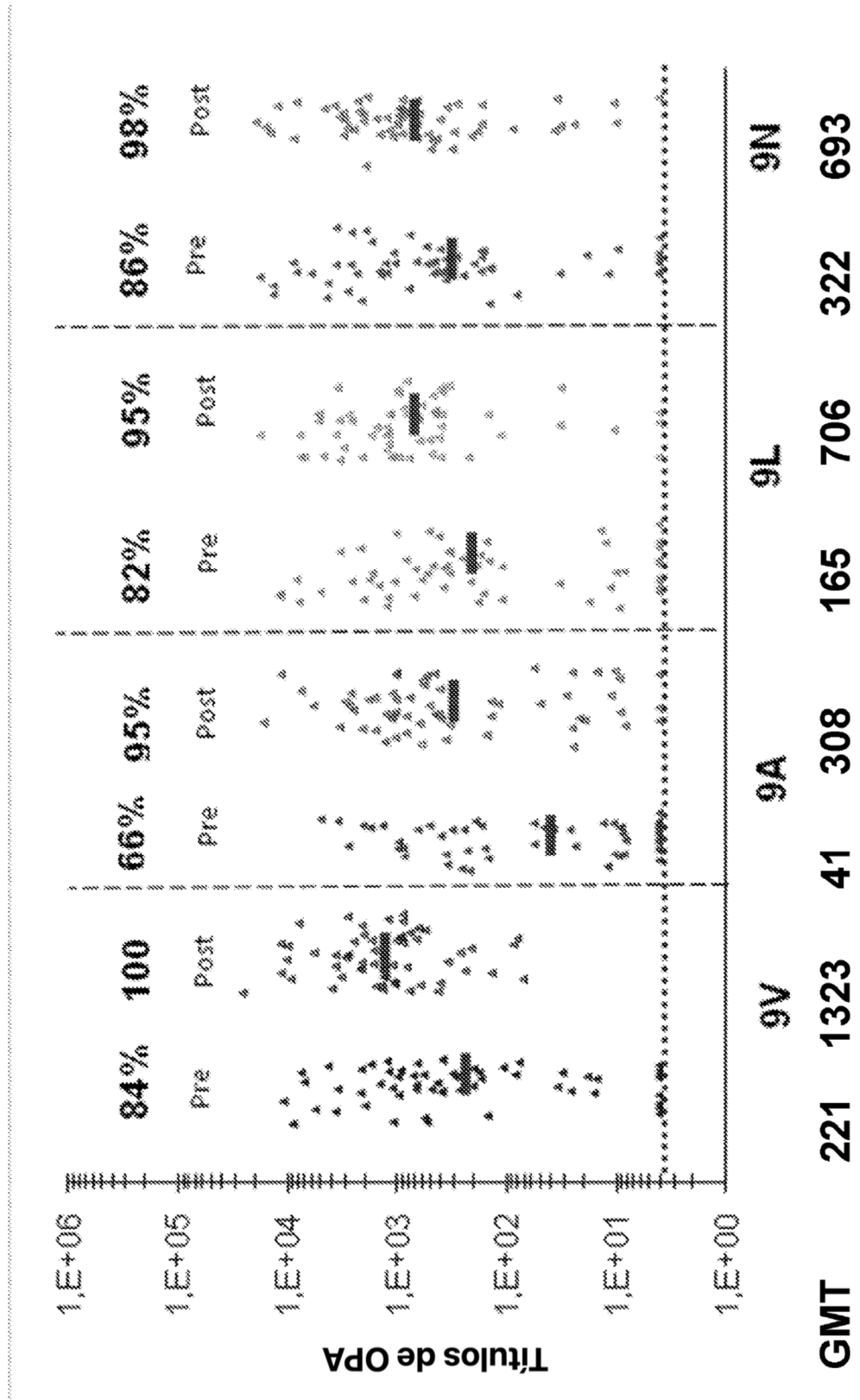


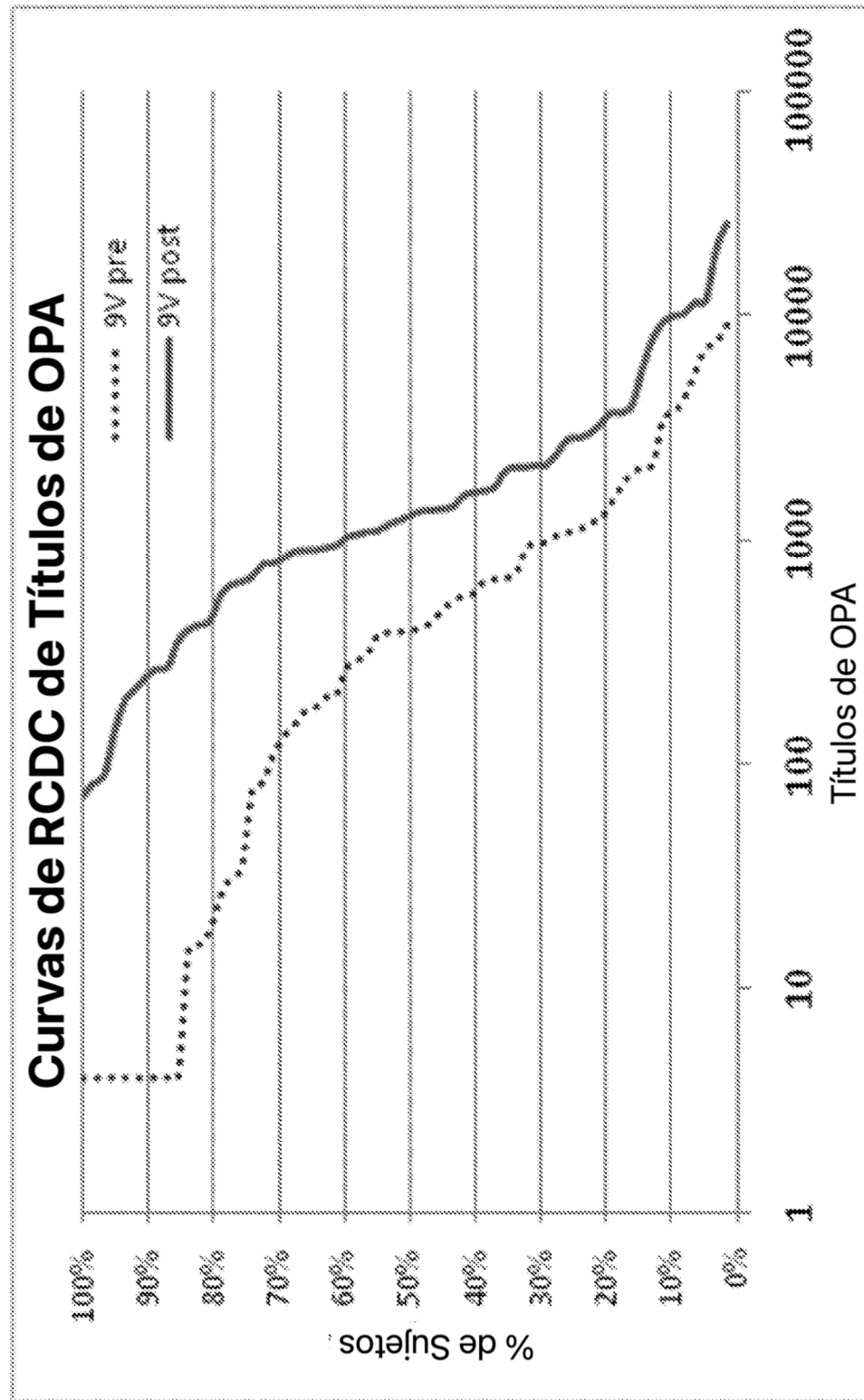
FIG. 3

FIG. 4

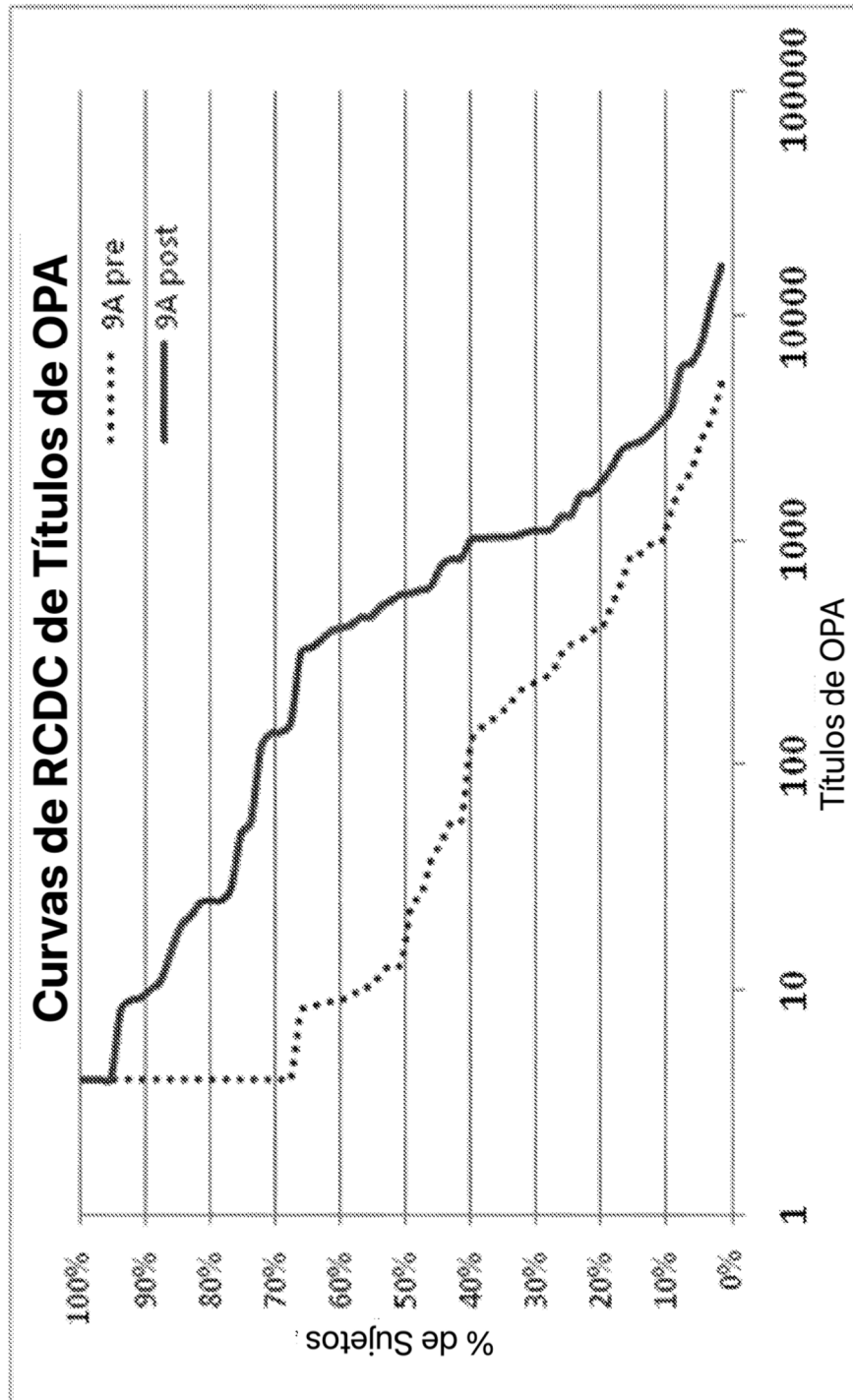


FIG. 5

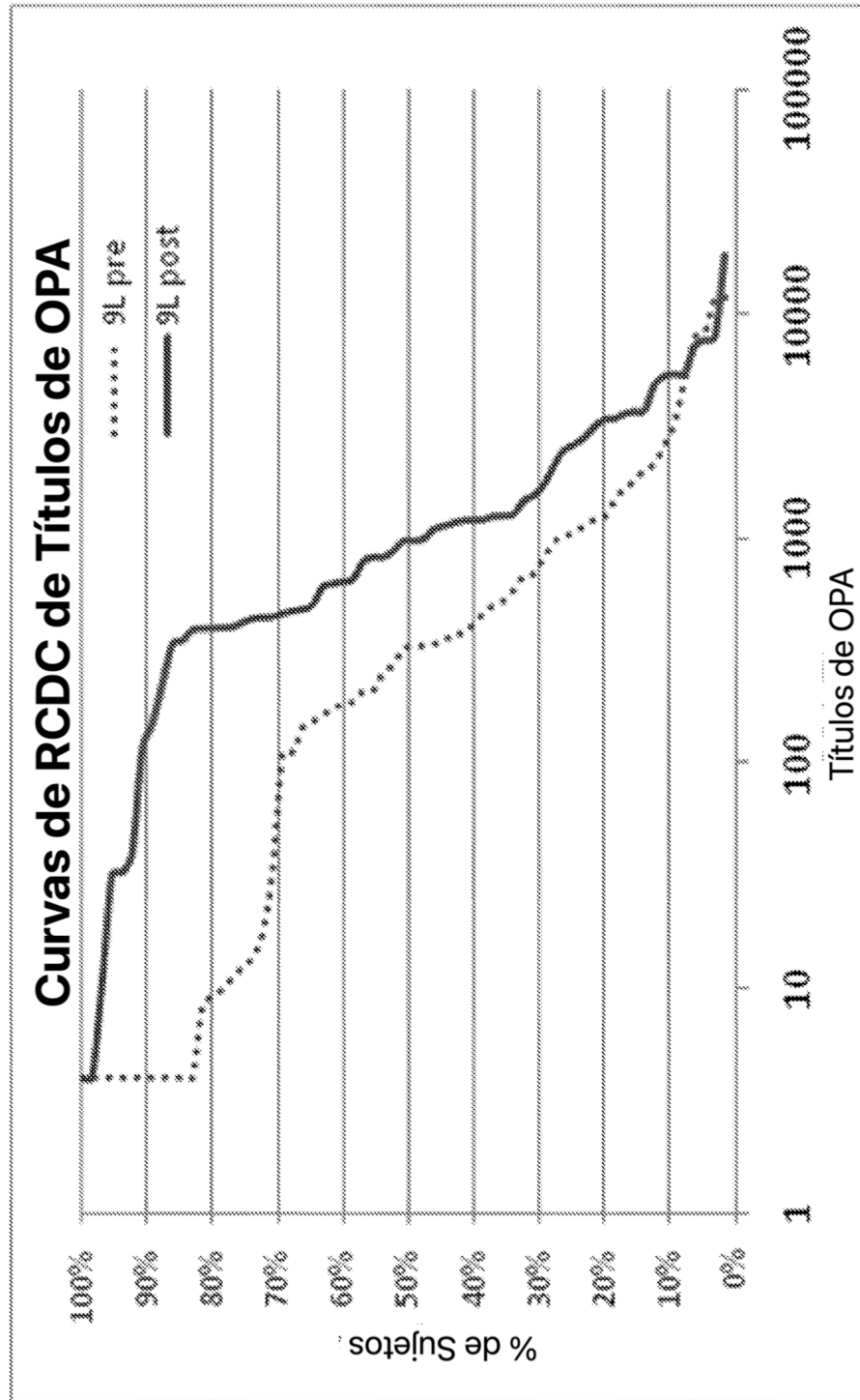


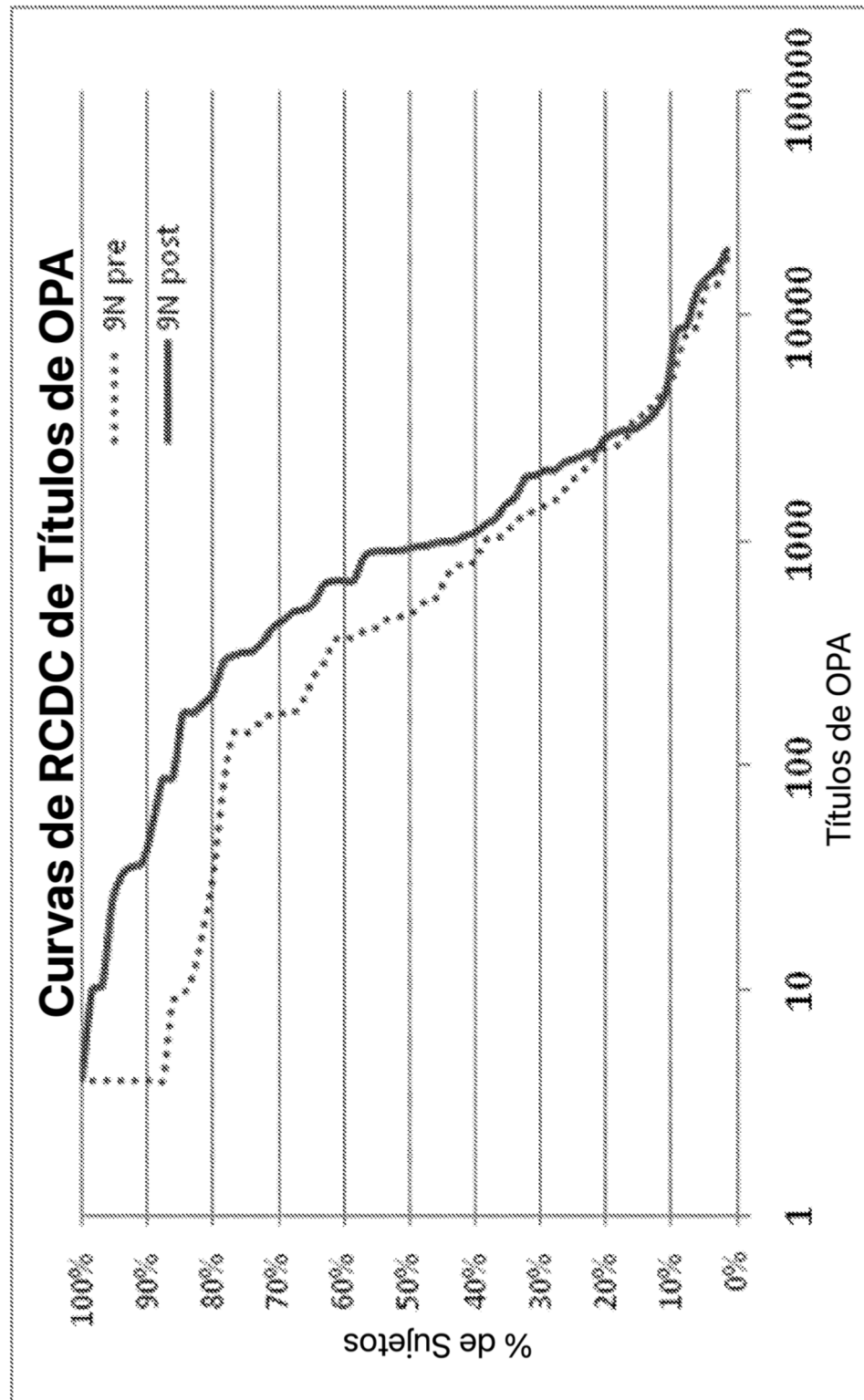
FIG. 6

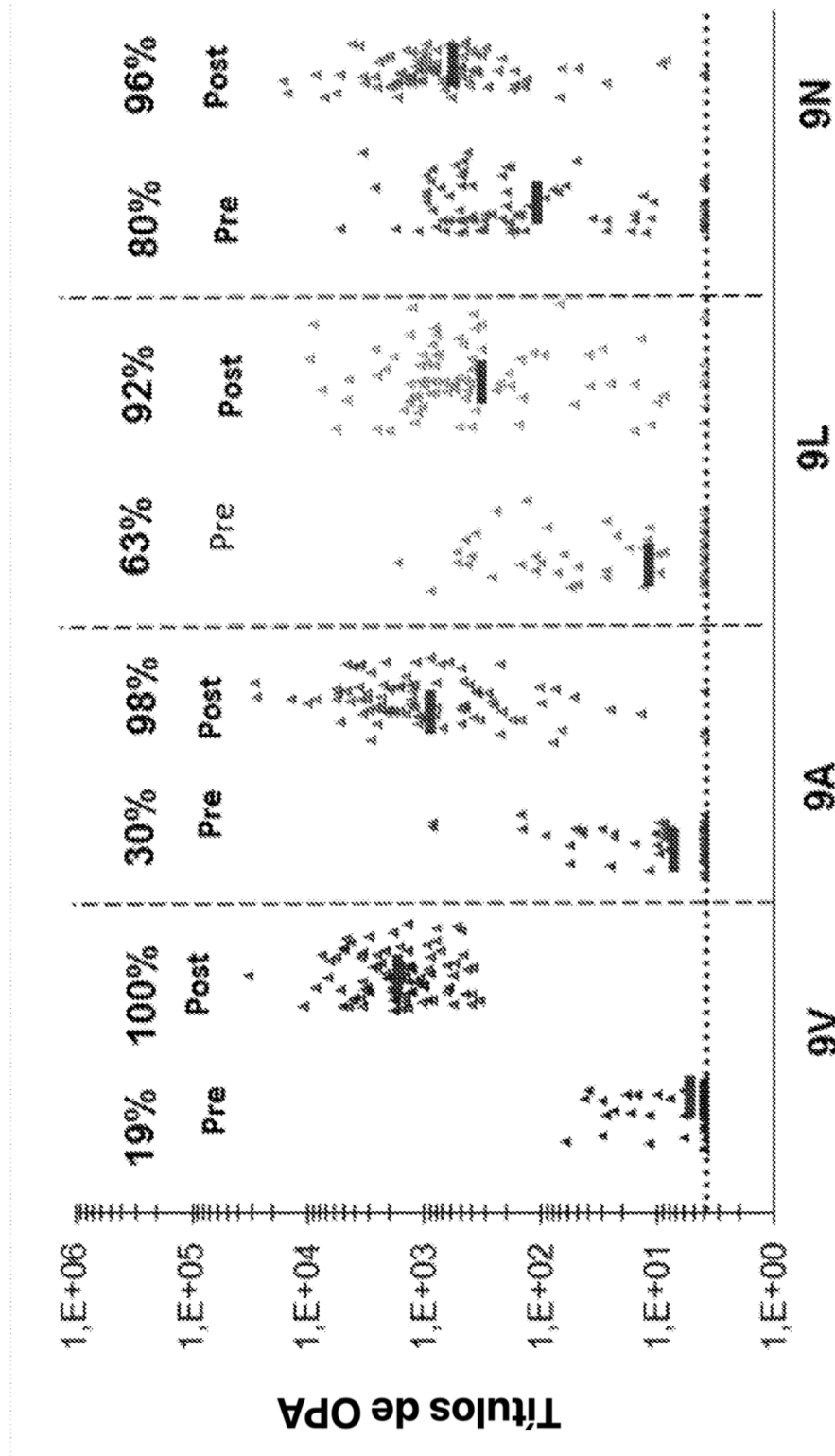
FIG. 7

FIG. 8

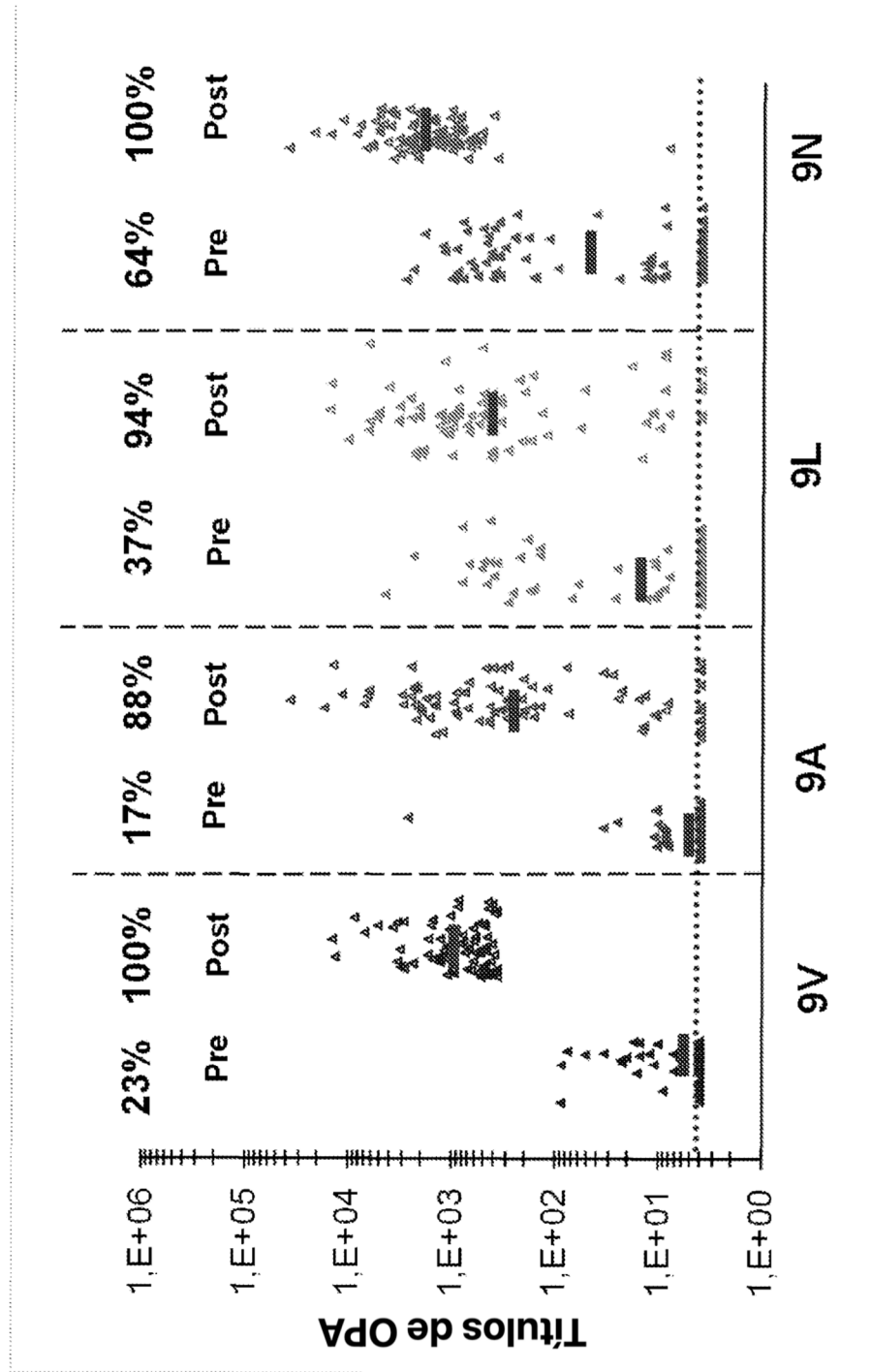


FIG. 9

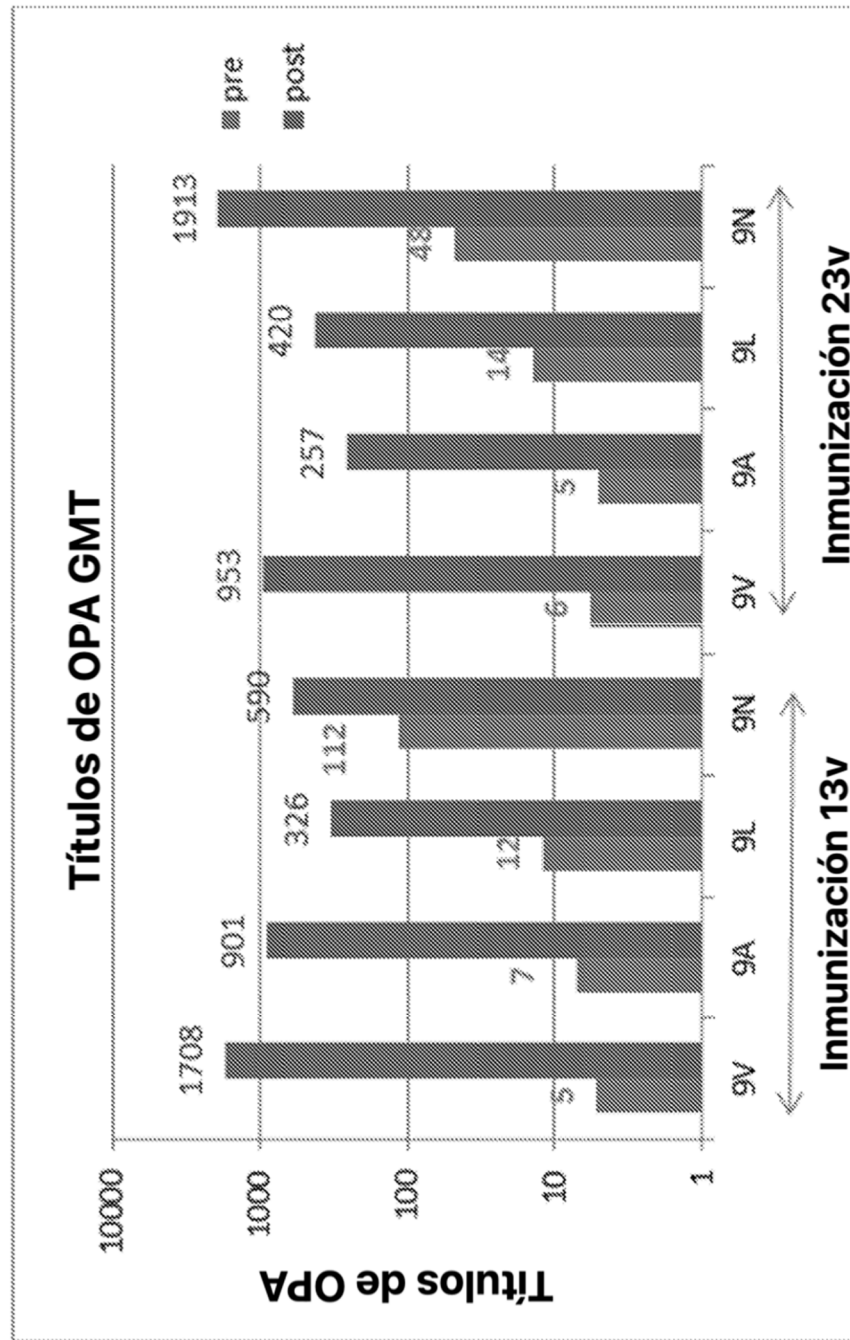


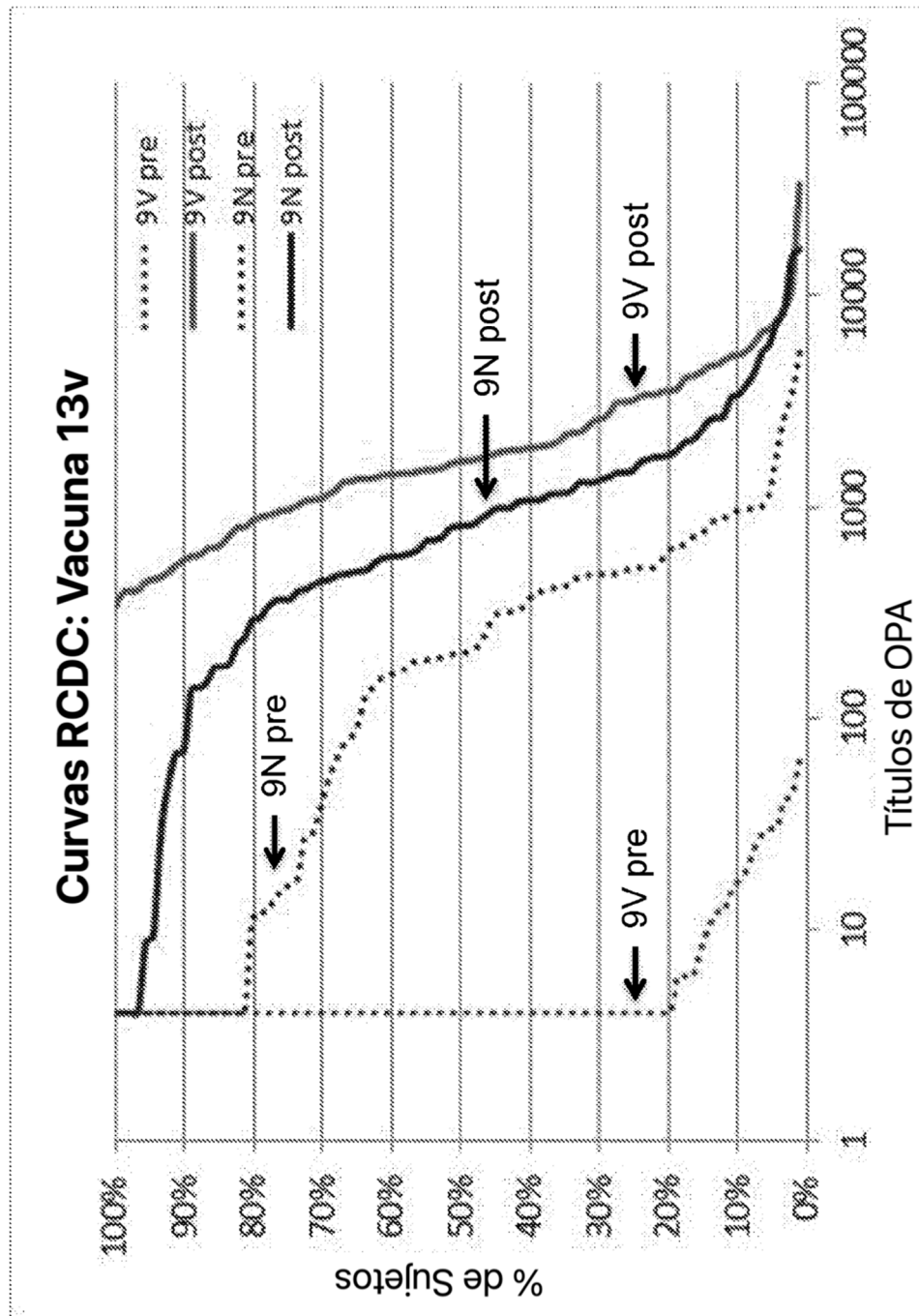
FIG. 10

FIG. 11

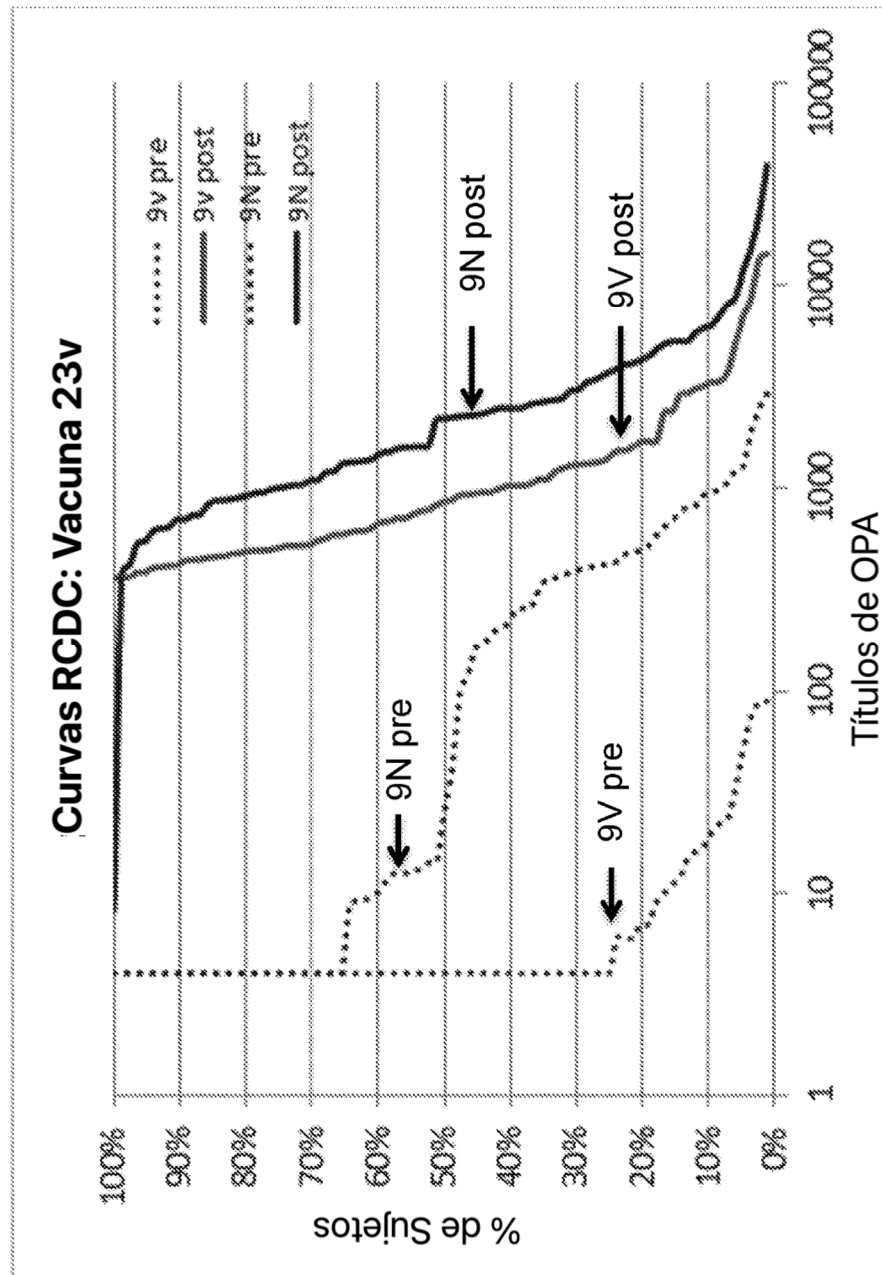


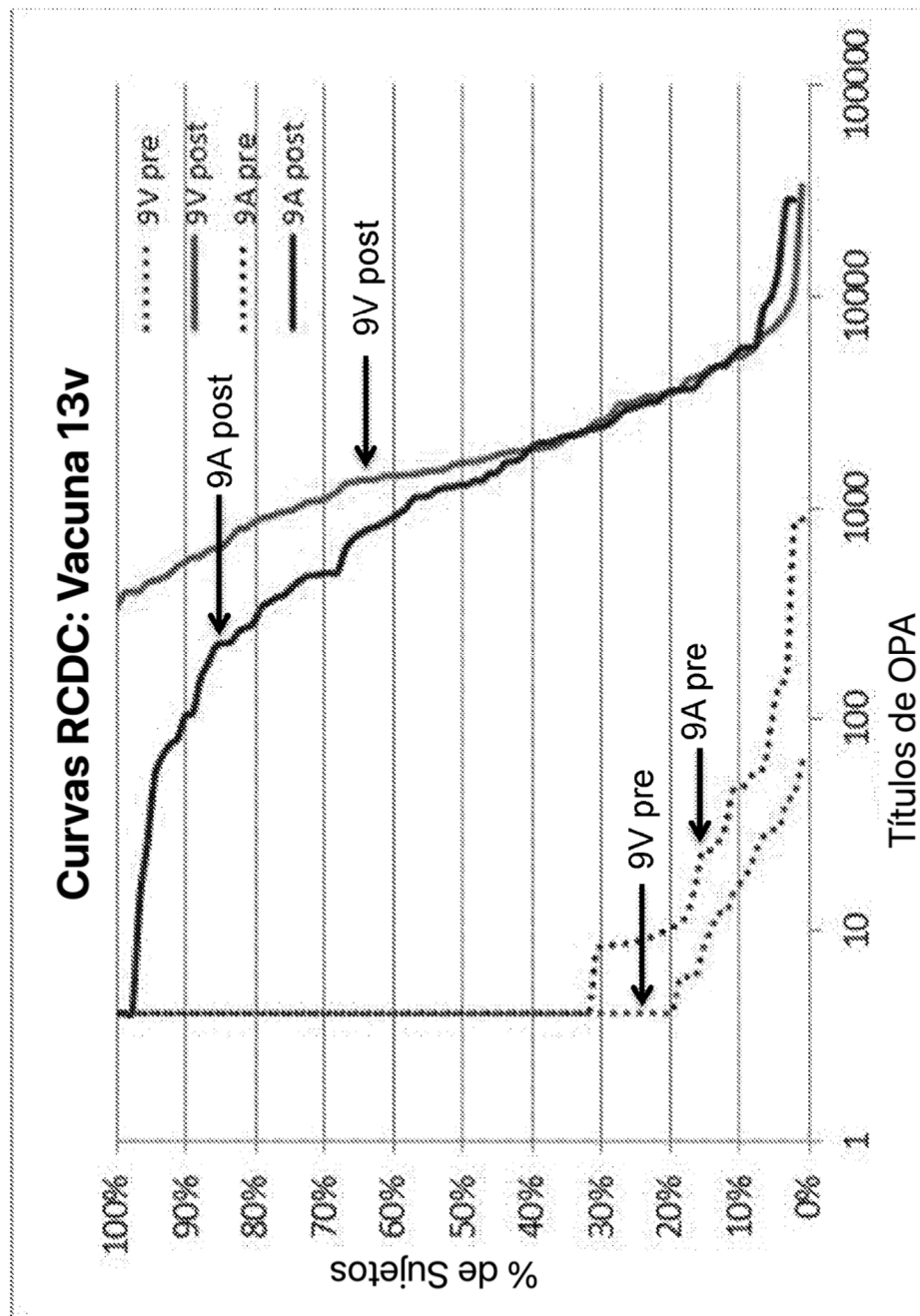
FIG. 12

FIG. 13

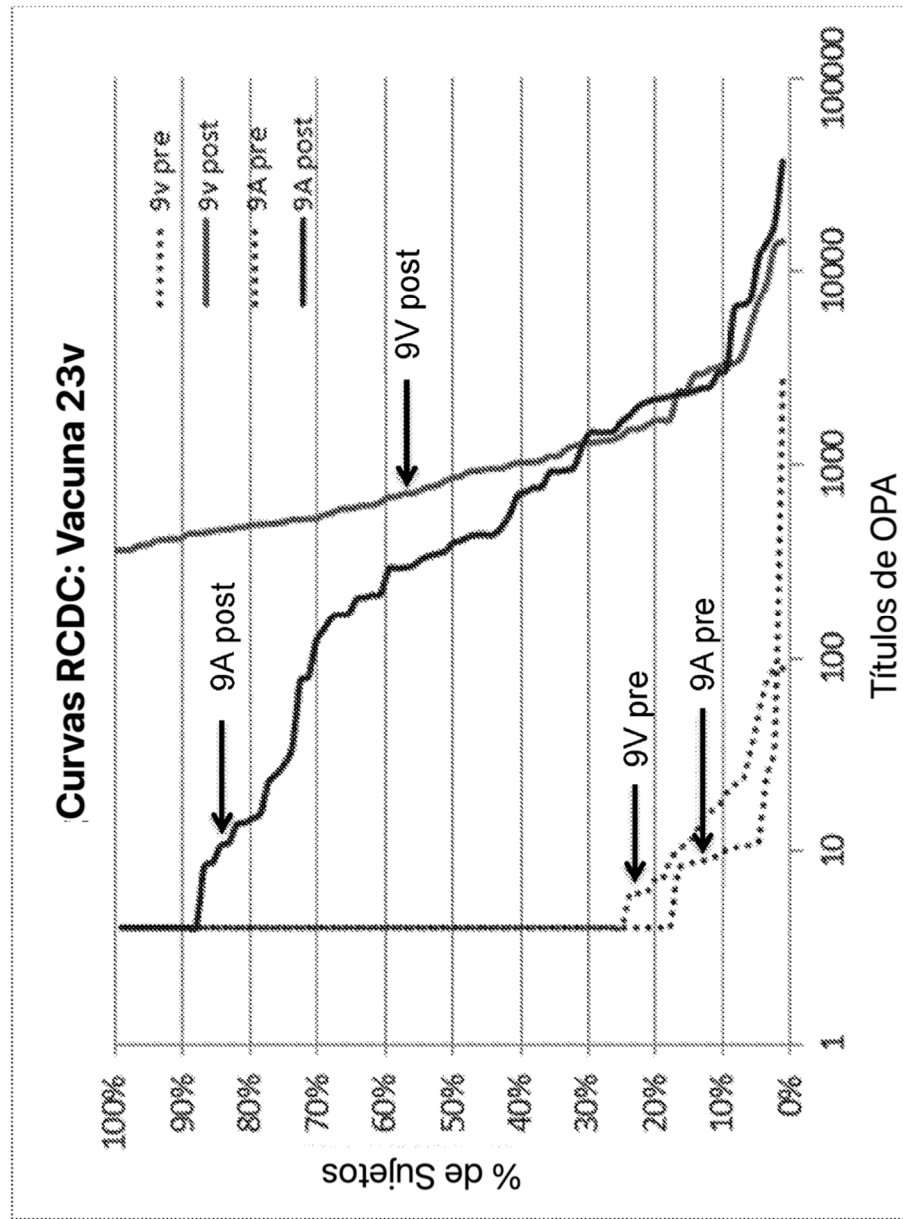


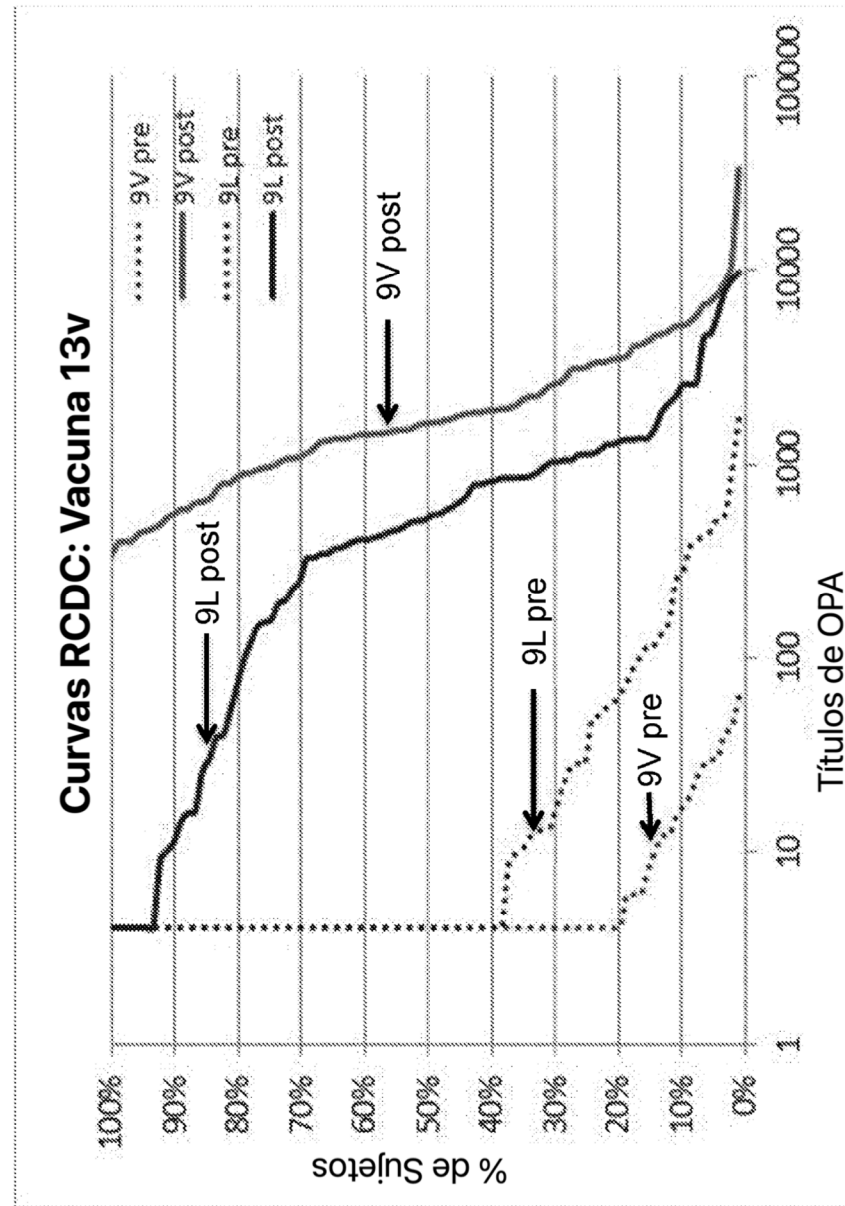
FIG. 14

FIG. 15

