

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 820 824**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/09** (2006.01)

**A61K 39/385** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61K 47/64** (2007.01)

**A61P 31/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.01.2015 PCT/IB2015/050315**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.07.2015 WO15110941**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.01.2015 E 15708580 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.09.2020 EP 3096785**

54 Título: **Composiciones inmunogénicas que comprenden antígenos sacáridos capsulares conjugados y usos de las mismas**

30 Prioridad:

**21.01.2014 US 201461929547 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**22.04.2021**

73 Titular/es:

**PFIZER INC. (100.0%)  
235 East 42nd Street  
New York, NY 10017, US**

72 Inventor/es:

**COOPER, DAVID;  
EMINI, EMILIO ANTHONY;  
GU, JIANXIN;  
HAN, MINGMING;  
JANSEN, KATHRIN UTE;  
KAINTHAN, RAJESH KUMAR;  
KIM, JIN-HWAN;  
PRASAD, AVVARI KRISHNA;  
PRIDE, MICHAEL WILLIAM;  
WATSON, WENDY JO y  
YANG, YU-YING**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

**ES 2 820 824 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 que comprenden antígenos sacáridos capsulares conjugados y usos de las mismas

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a nuevas composiciones inmunogénicas que comprenden antígenos sacáridos capsulares (glucoconjugados) y a usos de las mismas. Las composiciones inmunogénicas de la presente invención normalmente comprenderán glucoconjugados, en los que los sacáridos proceden de serotipos de *Streptococcus pneumoniae*.

**Antecedentes de la invención**

10 Las infecciones provocadas por neumococos son una causa importante de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. La neumonía, la bacteriemia oculta y la meningitis son las manifestaciones más comunes de la enfermedad neumocócica invasiva, mientras que la dispersión bacteriana en el tracto respiratorio puede dar como resultado infección del oído medio, sinusitis o bronquitis recurrente. En comparación con la enfermedad invasiva, las manifestaciones no invasivas son normalmente menos graves, pero considerablemente más comunes.

15 En Europa y los Estados Unidos, la neumonía neumocócica es la neumonía bacteriana extrahospitalaria más común, estimándose que afecta a aproximadamente 100 por cada 100.000 adultos cada año. Los números correspondientes para la bacteriemia febril y la meningitis son de 15-19 por cada 100.000 y de 1-2 por cada 100.000, respectivamente. El riesgo de mostrar una o más de estas manifestaciones es mucho mayor en niños y ancianos, así como en personas inmunocomprometidas de cualquier edad. Incluso en las regiones económicamente desarrolladas, la enfermedad neumocócica invasiva conlleva una alta mortalidad; para adultos con neumonía neumocócica, la tasa de mortalidad es de un 10 %-20 % de media, mientras que puede ser mayor del 50 % en los grupos de alto riesgo. La neumonía es con diferencia la causa más común de muerte neumocócica en todo el mundo.

20 El agente etiológico de las enfermedades neumocócicas, *Streptococcus pneumoniae* (neumococo), es un coco grampositivo encapsulado, rodeado por una cápsula de polisacárido. Las diferencias en la composición de esta cápsula permiten la diferenciación serológica entre aproximadamente 91 tipos capsulares, algunos de los cuales se asocian frecuentemente con la enfermedad neumocócica y otros rara vez. Las infecciones neumocócicas invasivas incluyen neumonía, meningitis y bacteriemia oculta; entre las manifestaciones no invasivas comunes se encuentran la otitis media, la sinusitis y la bronquitis.

25 Las vacunas antineumocócicas conjugadas (PCV, por sus siglas en inglés) son vacunas antineumocócicas usadas para proteger contra la enfermedad causada por *S. pneumoniae* (neumococo). En la actualidad hay tres vacunas PCV disponibles en todo el mundo: PREVNAR® (denominada Prevenar en algunos países) (vacuna heptavalente), SYNFLORIX® (una vacuna decavalente) y PREVNAR 13® (vacuna tridecavalente).

30 El reciente desarrollo de resistencia microbiana generalizada a los antibióticos esenciales y el número creciente de personas inmunocomprometidas resaltan la necesidad de vacunas antineumocócicas con una protección aún mayor.

35 En particular, existe la necesidad de abordar la necesidad aun no satisfecha de protección frente a la enfermedad neumocócica causada por serotipos no encontrados en PREVNAR 13® y el potencial de cambio de serotipo con el paso del tiempo. Los serotipos específicos que causan enfermedades más allá de los 13 en PREVNAR 13® varían según la región, la población y pueden cambiar con el paso del tiempo debido a la adquisición de resistencia a antibióticos, la introducción de vacunas antineumocócicas y tendencias seculares de origen desconocido. Existe la necesidad de composiciones inmunogénicas que puedan usarse para inducir una respuesta inmunitaria contra serotipos adicionales de *Streptococcus pneumoniae* en seres humanos y particularmente, en niños menores de 2 años.

40 Un objeto de las nuevas composiciones inmunogénicas de la presente invención es proporcionar una protección adecuada contra serotipos de *S. pneumoniae* no encontrados en PREVNAR 13®. En un aspecto, un objeto de las composiciones inmunogénicas de la presente invención es proporcionar una protección adecuada contra serotipos de *S. pneumoniae* no encontrados en PREVNAR® (vacuna heptavalente), SYNFLORIX® y/o PREVNAR 13® a la vez que se mantiene una respuesta inmunitaria contra los serotipos actualmente abarcados por dichas vacunas. El documento US2013/0273098 desvela una composición inmunogénica multivalente que tiene 15 conjugados de polisacárido-proteína diferentes y un poloxámero. Cada conjugado consiste en un polisacárido capsular preparado a partir de un serotipo diferente de *Streptococcus pneumoniae* (1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F o 33F) conjugado a una proteína portadora, preferentemente CRM<sub>197</sub>.

45 Skinner J y col. (Vaccine 29 (2011) 8870-8876) desvela la evaluación de la inmunogenicidad de vacunas en monos rhesus lactantes de una vacuna antineumocócica conjugada (PCV) 15-valente que contiene polisacáridos de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F conjugados a CRM<sub>197</sub> y formulados en adyuvante de fosfato de aluminio.

55 **Sumario de la invención**

La presente invención se refiere a una composición inmunogénica que comprende al menos un glucoconjugado del serotipo 22F de *S. pneumoniae*, en la que, dicho glucoconjugado del serotipo 22F tiene un peso molecular de entre 1000 kDa y 12.500 kDa, en el que la relación de sacárido a proteína portadora (p/p) es de entre 0,8 y 1,2 y en el que dicha proteína portadora es CRM<sub>197</sub>.

5 En un aspecto, la composición inmunogénica anterior comprende además glucoconjugados de los serotipos de *S. pneumoniae* 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F.

En otro aspecto, la composición inmunogénica anterior comprende además glucoconjugados de los serotipos de *S. pneumoniae* 1, 5 y 7F.

10 En otro aspecto, la composición inmunogénica anterior comprende además glucoconjugados de los serotipos de *S. pneumoniae* 6A y 19A.

En otro aspecto, la composición inmunogénica anterior comprende además glucoconjugados del serotipo 3 de *S. pneumoniae*.

En otro aspecto, la composición inmunogénica anterior comprende además glucoconjugados de los serotipos de *S. pneumoniae* 2, 9N, 17F, 20 y/o 15C.

15 En un aspecto, la composición inmunogénica anterior no comprende sacárido capsular del serotipo de *S. pneumoniae* 9N, 9A y/o 9L.

En un aspecto, la composición inmunogénica anterior es una composición antineumocócica conjugada 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20-valente. En un aspecto, la composición inmunogénica anterior es una composición antineumocócica conjugada 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25-valente.

## 20 Figuras

La **figura 1** muestra una estructura de polisacárido de repetición del polisacárido capsular de *S. pneumoniae* serotipo 8 (Pn-8).

La **figura 2** muestra una estructura de polisacárido de repetición del polisacárido capsular de *S. pneumoniae* serotipo 10A (Pn-10A).

25 La **figura 3** muestra una estructura de polisacárido de repetición del polisacárido capsular de *S. pneumoniae* serotipo 11A (Pn-11A).

La **figura 4** muestra una estructura de polisacárido de repetición del polisacárido capsular de *S. pneumoniae* serotipo 12F (Pn-12F).

30 La **figura 5** muestra una estructura de polisacárido de repetición del polisacárido capsular de *S. pneumoniae* serotipo 15B (Pn-15B).

La **figura 6** muestra una estructura de polisacárido de repetición del polisacárido capsular de *S. pneumoniae* serotipo 22F (Pn-22F).

La **figura 7** muestra una estructura de polisacárido de repetición del polisacárido capsular de *S. pneumoniae* serotipo 33F (Pn-33F).

35 La **figura 8** muestra un diagrama de flujo de un procedimiento representativo para los procedimientos de activación (A) y conjugación (B) que pueden usarse en la preparación del glucoconjugado de Pn-33F.

La **figura 9** muestra el efecto en el GO variando la cantidad de NCS en la reacción de oxidación de TEMPO/NCS.

La **figura 10** muestra la evaluación de la estabilidad de los glucoconjugados de Pn-12F.

40 **Figura 11** - Respuestas de OPA con funcionalidad cruzada. Se evaluó un subconjunto de 59 sueros de adultos vacunados con una vacuna antineumocócica conjugada 13-valente (estudio de los Estados Unidos 6115A1-004; identificador de ClinicalTrials.gov: NCT00427895) en OPA respecto de la presencia de anticuerpos funcionales contra los serotipos 9V, 9A, 9L y 9N. El porcentaje de muestras con título de OPA positivo (es decir,  $\geq 1:8$ ) se indica por encima de cada grupo. La media geométrica de los títulos (GMT) se lista en el eje x por debajo de cada grupo.

45 **Figura 12** - Respuestas de OPA con funcionalidad cruzada de sesenta y seis sueros pre/post emparejados. Se evaluó un subconjunto de un panel de 66 sueros de adultos antes y después de la vacunación vacunados con una vacuna antineumocócica conjugada 13-valente (estudio 6115A1-3005; identificador de ClinicalTrials.gov: NCT00546572) en OPA respecto de la presencia de anticuerpos funcionales contra los serotipos 9V, 9A, 9L y 9N. El porcentaje de muestras con título de OPA positivo (es decir,  $\geq 1:8$ ) se indica por encima de cada grupo. La media geométrica de los títulos (GMT) se lista en el eje x por debajo de cada grupo.

50 **Figura 13** - Curvas de distribución acumulativa inversa (CDAI) antes y después de la inmunización - serotipo neumocócico 9V (Pn9V).

55 Curvas de distribución acumulativa inversa de los títulos de OPA para el serotipo 9V de un panel de sueros antes y después de la vacunación emparejados (N = 66) vacunados con una vacuna antineumocócica conjugada 13-valente (estudio 6115A1-3005; Identificador de ClinicalTrials.gov: NCT00546572). Las gráficas representan el porcentaje de sueros con título positivo a OPA (es decir,  $\geq 1:8$ ).

**Figura 14** - Curvas de distribución acumulativa inversa (CDAI) antes y después de la inmunización - serotipo

neumocócico 9A (Pn9A).

Curvas de distribución acumulativa inversa de los títulos de OPA para el serotipo 9A de un panel de sueros antes y después de la vacunación emparejados (N = 66) vacunados con una vacuna antineumocócica conjugada 13-valente (estudio 6115A1-3005; Identificador de ClinicalTrials.gov: NCT00546572). Las gráficas representan el porcentaje de sueros con título positivo a OPA (es decir,  $\geq 1:8$ ).

**Figura 15** - Curvas de distribución acumulativa inversa (CDAI) antes y después de la inmunización - serotipo neumocócico 9L (Pn9L).

Curvas de distribución acumulativa inversa de los títulos de OPA para el serotipo 9L de un panel de sueros antes y después de la vacunación emparejados (N = 66) vacunados con una vacuna antineumocócica conjugada 13-valente (estudio 6115A1-3005; identificador de Clinical-Trials.gov: NCT00546572). Las gráficas representan el porcentaje de sueros con título positivo a OPA (es decir,  $\geq 1:8$ ).

**Figura 16** - Curvas de distribución acumulativa inversa (CDAI) antes y después de la inmunización - serotipo neumocócico 9N (Pn9N).

Curvas de distribución acumulativa inversa de los títulos de OPA para el serotipo 9N de un panel de sueros antes y después de la vacunación emparejados (N = 66) vacunados con una vacuna antineumocócica conjugada 13-valente (estudio 6115A1-3005; identificador de Clinical-Trials.gov: NCT00546572). Las gráficas representan el porcentaje de sueros con título positivo a OPA (es decir,  $\geq 1:8$ ).

## 1 Composiciones inmunogénicas de la invención

La invención se expone en el conjunto de reivindicaciones adjunto. Las realizaciones y/o ejemplos de la siguiente descripción que no están abarcados por las reivindicaciones adjuntas no se consideran parte de la presente invención.

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

Preferentemente, el número de sacáridos capsulares de *S. pneumoniae* puede variar de 8 serotipos diferentes (o "v", valencias) hasta 20 serotipos diferentes (20v). En una realización, hay 8 serotipos diferentes. En una realización, hay 9 serotipos diferentes. En una realización, hay 10 serotipos diferentes. En una realización, hay 11 serotipos diferentes. En una realización, hay 12 serotipos diferentes. 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. Los sacáridos capsulares se conjugan a una proteína portadora para formar glucoconjugados, como se describe más adelante en el presente documento.

En caso de que la proteína portadora sea igual para 2 o más sacáridos en la composición, los sacáridos pueden conjugarse con la misma molécula de la proteína portadora (moléculas portadoras que tienen 2 o más sacáridos diferentes conjugados a esta) [véase, por ejemplo, el documento WO2004/083251].

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

A efectos de la invención, el término "glucoconjugado" indica un sacárido capsular ligado covalentemente a una proteína portadora. En una realización, se enlaza directamente un sacárido capsular a una proteína portadora. En una segunda realización, se enlaza un sacárido bacteriano a una proteína a través de un espaciador/enlazador.

### 1.1 Proteína portadora de la invención

Un componente del glucoconjugado de la invención es una proteína portadora a la que se conjuga el sacárido. Las expresiones "portador proteico" o "proteína portadora" o "portador" pueden usarse indistintamente en el presente documento. Las proteínas portadoras deben ser susceptibles a los procedimientos de conjugación estándar.

En una realización preferida, la proteína portadora de los glucoconjugados se selecciona entre el grupo que consiste en: DT (toxina diftérica), TT (toxide tetánico) o fragmento C de TT, CRM<sub>197</sub> (una variante no tóxica pero antigénicamente idéntica de la toxina diftérica), otros mutantes de DT (tales como CRM176, CRM228, CRM45 (Uchida y col. (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); eliminación o mutación de Glu-148 a Asp, Gln o Ser y/o Ala 158 a Gly y otras mutaciones desveladas en las Patentes de los Estados Unidos n.º 4.709.017 y 4.950.740; la mutación de al menos uno o más restos de Lys 516, Lys 526, Phe 530 y/o Lys 534 y otras mutaciones desveladas en las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.917.017 y 6.455.673; o fragmentos desvelados en la Patente de los Estados Unidos n.º 5.843.711, neumolisina neumocócica (ply) (Kuo y col. (1995) Infect Immun 63:2706-2713) incluyendo ply detoxificada de algún modo, por ejemplo dPLY-GMBS (documentos WO 2004/081515, WO 2006/032499) o dPLY-formol, PhtX, incluyendo PhtA, PhtB, PhtD, PhtE (las

secuencias de PhtA, PhtB, PhtD o PhtE se desvelan en los documentos WO 00/37105 y WO 00/39299) y fusiones de proteínas Pht, por ejemplo, fusiones de PhtDE, fusiones de PhtBE, Pht A-E (documentos WO 01/98334, WO 03/054007, WO 2009/000826), OMPC (proteína de la membrana externa meningocócica), que normalmente se extrae de *Neisseria meningitidis* serogrupo B (documento EP0372501), PorB (de *N. meningitidis*), PD (proteína D de *Haemophilus influenzae*; véase, por ejemplo, el documento 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 tosferínicas (documentos WO 98/58668, EP0471177), citocinas, linfocinas, factores de crecimiento u hormonas (documento WO 91/01146), proteínas artificiales que comprenden múltiples epítomos de linfocitos T CD4+ humanos de diversos antígenos derivados de patógeno (Falugi y col. (2001) Eur J Immunol 31:3816-3824) tales como la proteína N19 (Baraldoi y col. (2004) Infect Immun 72:4884-4887), la proteína de la 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 de *Pseudomonas aeruginosa* recombinante (en particular, mutantes no tóxicos de la misma (tales como exotoxina A que porta una sustitución en el ácido glutámico 553 (Douglas y col. (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 portadoras. Otras proteínas portadoras adecuadas incluyen toxinas bacterianas inactivadas, tales como toxoide del cólera (por ejemplo, como se describe en el documento WO 2004/083251), LT de *Escherichia coli*, ST de *E. coli* y exotoxina A de *P. aeruginosa*.

En una realización preferida, la proteína portadora de los glucoconjugados se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en TT, DT, mutantes de DT (tales como CRM<sub>197</sub>), proteína D de *H. influenzae*, PhtX, PhtD, fusiones de PhtDE (en particular, las descritas en los documentos WO 01/98334 y WO 03/054007), neumolisina detoxificada, PorB, proteína N19, PspA, OMPC, toxina A o B de *C. difficile* y PsaA.

En una realización, la proteína portadora de los glucoconjugados de la invención es DT (toxoides diftérico). En otra realización, la proteína portadora de los glucoconjugados de la invención es TT (toxoides tetánico).

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

En una realización preferida, los sacáridos capsulares de la invención se conjugan con la proteína CRM<sub>197</sub>. La proteína CRM<sub>197</sub> es una forma no tóxica de la toxina diftérica, pero es inmunológicamente indistinguible de la toxina diftérica. CRM<sub>197</sub> se produce por *Corynebacterium diphtheriae* infectada por el fago no toxigénico β197<sup>tox</sup> creado mediante mutagénesis de nitrosoguanidina del corinfago toxigénico beta (Uchida y col. (1971) Nature New Biology 233:8-11). La proteína CRM<sub>197</sub> tiene el mismo peso molecular que la toxina diftérica, pero difiere de la misma por un solo cambio de bases (guanina a adenina) en el gen estructural. Este cambio de una sola base provoca la sustitución de un aminoácido (ácido glutámico por glicina) en la proteína madura y elimina las propiedades tóxicas de la toxina diftérica. La proteína CRM<sub>197</sub> es un portador dependiente de linfocitos T seguro y eficaz para sacáridos. Pueden encontrarse detalles adicionales acerca de CRM<sub>197</sub> y de la producción de la misma, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos n.º 5.614.382.

En una realización, los sacáridos capsulares de la invención se conjugan a la proteína CRM<sub>197</sub> o a la cadena A de CRM<sub>197</sub> (véase el documento CN103495161). En una realización, los sacáridos capsulares de la invención se conjugan a la cadena A de CRM<sub>197</sub> obtenida mediante expresión por *E. coli* genéticamente recombinante (véase el documento CN103495161). En una realización, los sacáridos capsulares de la invención están todos conjugados a CRM<sub>197</sub>. En una realización, los sacáridos capsulares de la invención están todos conjugados a la cadena A de CRM<sub>197</sub>.

Por consiguiente, en realizaciones frecuentes, los glucoconjugados de la invención comprenden CRM<sub>197</sub> como proteína portadora, en la que el polisacárido capsular está enlazado covalentemente a CRM<sub>197</sub>.

## 1.2 Sacárido capsular de la divulgación

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

Los polisacáridos capsulares se preparan mediante técnicas convencionales conocidas por los expertos habituales en la materia.

En la presente divulgación, los polisacáridos capsulares se pueden preparar, por ejemplo, a partir 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*. Los polisacáridos capsulares típicos se producen cultivando cada serotipo de *S. pneumoniae* en un medio (por ejemplo, en un medio a base de soja), posteriormente, los polisacáridos se preparan a partir del cultivo bacteriano. Las cepas bacterianas de *S. pneumoniae* usadas para producir los respectivos polisacáridos que se usan en los glucoconjugados de la invención pueden obtenerse de colecciones de cultivos establecidas o de especímenes clínicos.

- La población del organismo (cada serotipo de *S. pneumoniae*) normalmente se aumenta de escala de un vial de siembra a botellas de siembra y se pasa a través de uno o más fermentadores de siembra de volumen creciente hasta que se alcanzan volúmenes de fermentación a escala de producción. Al final del ciclo de crecimiento, se lisan las células y el caldo de lisado se recoge para su procesamiento corriente abajo (purificación) (véanse, por ejemplo, los documentos WO 2006/110381, WO 2008/118752 y las Publicaciones de Patente de los Estados Unidos n.º 2006/0228380, 2006/0228381, 2008/0102498 y 2008/0286838).
- Los polisacáridos individuales normalmente se purifican mediante centrifugación, precipitación, ultrafiltración y/o cromatografía en columna (véanse, por ejemplo, los documentos WO 2006/110352 y WO 2008/118752).
- Los polisacáridos purificados pueden activarse (por ejemplo, activarse químicamente) para hacer que sean capaces de reaccionar (por ejemplo, con el espaciador eTEC) y después incorporarse en glucoconjugados de la invención, como se describe adicionalmente en el presente documento.
- Los polisacáridos capsulares de *S. pneumoniae* comprenden unidades de oligosacárido repetitivas que pueden contener hasta 8 restos de azúcar.
- En una realización, el sacárido capsular de la divulgación puede ser una unidad de oligosacárido o una cadena de sacárido de unidades de oligosacáridos repetitivas con una longitud más corta que la nativa. En un caso, el oligosacárido capsular de la divulgación es una unidad de oligosacárido de repetición del serotipo relevante.
- En un caso, el oligosacárido capsular de la divulgación puede ser varios oligosacáridos. Los oligosacáridos tienen un bajo número de unidades repetidas (normalmente 5-15 unidades repetidas) y normalmente se derivan sintéticamente o mediante hidrólisis de polisacáridos.
- Sin embargo, preferentemente, todos los sacáridos capsulares de la presente divulgación y en las composiciones inmunogénicas de la presente invención son polisacáridos. Los polisacáridos capsulares de alto peso molecular tienen la capacidad de inducir ciertas respuestas inmunitarias de anticuerpos debido a los epítomos presentes en la superficie antigénica. Se contempla preferentemente el aislamiento y la purificación de los polisacáridos capsulares de alto peso molecular para su uso en los conjugados, las composiciones y los procedimientos de la presente invención.
- En algunas realizaciones, los polisacáridos purificados antes de la conjugación tienen un peso molecular de entre 10 kDa y 4.000 kDa. En otras realizaciones de este tipo, el polisacárido tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 3.500 kDa; entre 50 kDa y 3.000 kDa; entre 50 kDa y 2.500 kDa; entre 50 kDa y 2.000 kDa; entre 50 kDa y 1.750 kDa; entre 50 kDa y 1.500 kDa; entre 50 kDa y 1.250 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 3.500 kDa; entre 100 kDa y 3.000 kDa; entre 100 kDa y 2.500 kDa; entre 100 kDa y 2.000 kDa; entre 100 kDa y 1.750 kDa; entre 100 kDa y 1.500 kDa; entre 100 kDa y 1.250 kDa; entre 100 kDa y 1.000 kDa; entre 100 kDa y 750 kDa; entre 100 kDa y 500 kDa; entre 200 kDa y 4.000 kDa; entre 200 kDa y 3.500 kDa; entre 200 kDa y 3.000 kDa; entre 200 kDa y 2.500 kDa; entre 200 kDa y 2.000 kDa; entre 200 kDa y 1.750 kDa; entre 200 kDa y 1.500 kDa; entre 200 kDa y 1.250 kDa; entre 200 kDa y 1.000 kDa; entre 200 kDa y 750 kDa; o entre 200 kDa y 500 kDa. Se contempla como una realización de la divulgación cualquier número entero dentro de cualquiera de los intervalos anteriores.
- Puede reducirse ligeramente el tamaño de un polisacárido durante los procedimientos de purificación normales. De manera adicional, como se describe en el presente documento, el polisacárido puede someterse a técnicas de separación por tamaños antes de la conjugación. Puede emplearse separación por tamaños mecánica o química. La hidrólisis química puede llevarse a cabo usando ácido acético. La separación por tamaños mecánica puede llevarse a cabo usando cizalladura de homogeneización de alta presión. Los intervalos de peso molecular mencionados anteriormente se refieren a polisacáridos purificados antes de la conjugación (por ejemplo, antes de la activación).
- En una realización preferida, los polisacáridos purificados, son polisacáridos capsulares de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F o 33F de *S. pneumoniae*, en los que el polisacárido capsular tiene un peso molecular que se encuentra dentro de uno de los intervalos de peso molecular como se han descrito anteriormente en el presente documento.
- Como se usa en el presente documento, la expresión "peso molecular" de polisacárido o de conjugado de proteína portadora-polisacárido se refiere al peso molecular calculado por cromatografía de exclusión por tamaños (SEC) combinada con un detector de dispersión de luz láser multiángulo (MALLS).
- En algunas realizaciones, los polisacáridos neumocócicos de los serotipos 9V, 18C, 11A, 15B, 22F y/o 33F de la invención están O-acetilados. En algunas realizaciones, los polisacáridos neumocócicos de los serotipos 9V, 11A, 15B, 22F y/o 33F de la invención están O-acetilados.
- Los polisacáridos purificados descritos en el presente documento se activan químicamente para hacer 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 monodosis como se describe en el presente documento.

### 1.2.1 Polisacárido neumocócico de los serotipos de *S. pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F

5 Los sacáridos capsulares de los serotipos de *S. pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F pueden prepararse mediante técnicas convencionales conocidas por los expertos habituales en la materia (véase, por ejemplo, el documento WO 2006/110381). Pueden producirse polisacáridos capsulares cultivando cada serotipo de *S. pneumoniae* en un medio; al final del ciclo de crecimiento, se lisan las células y después se recoge el caldo de lisado para su procesamiento corriente abajo (purificación). Los polisacáridos individuales normalmente se purifican mediante centrifugación, precipitación, ultrafiltración y/o cromatografía en columna (véanse, por ejemplo, los documentos WO 2006/110352 y WO 2008/118752). Los polisacáridos purificados pueden procesarse adicionalmente como se describe en más detalle en el presente documento para preparar glucoconjugados de la invención.

15 En algunos casos, los polisacáridos purificados de los serotipos de *S. pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y/o 23F antes de la conjugación tienen un peso molecular de entre 10 kDa y 4.000 kDa. En otros casos de este tipo, el polisacárido tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 4.000 kDa; entre 50 kDa y 3.000 kDa o entre 50 kDa y 2.000 kDa. En casos adicionales de este tipo, el polisacárido tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 3.500 kDa; entre 50 kDa y 3.000 kDa; entre 50 kDa y 2.500 kDa; entre 50 kDa y 2.000 kDa; entre 50 kDa y 1.750 kDa; entre 50 kDa y 1.500 kDa; entre 50 kDa y 1.250 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 3.500 kDa; entre 100 kDa y 3.000 kDa; entre 100 kDa y 2.500 kDa; entre 100 kDa y 2.000 kDa; entre 100 kDa y 1.750 kDa; entre 100 kDa y 1.500 kDa; entre 100 kDa y 1.250 kDa; entre 100 kDa y 1.000 kDa; entre 100 kDa y 750 kDa; entre 100 kDa y 500 kDa; entre 200 kDa y 4.000 kDa; entre 200 kDa y 3.500 kDa; entre 200 kDa y 3.000 kDa; entre 200 kDa y 2.500 kDa; entre 200 kDa y 2.000 kDa; entre 200 kDa y 1.750 kDa; entre 200 kDa y 1.500 kDa; entre 200 kDa y 1.250 kDa; entre 200 kDa y 1.000 kDa; entre 200 kDa y 750 kDa; o entre 200 kDa y 500 kDa. Se contempla como un caso de la divulgación cualquier número entero dentro de cualquiera de los intervalos anteriores. Puede reducirse ligeramente el tamaño de un polisacárido durante los procedimientos de purificación normales. De manera adicional, como se describe en el presente documento, el polisacárido puede someterse a técnicas de separación por tamaños antes de la conjugación. Los intervalos de peso molecular mencionados anteriormente se refieren a polisacáridos purificados antes de la conjugación (por ejemplo, antes de la activación) después de una eventual etapa de separación por tamaños.

En algunos casos, los sacáridos neumocócicos de los serotipos 9V y/o 18C de la invención están O-acetilados. En algunas realizaciones, el sacárido neumocócico del serotipo 9V de la invención está O-acetilado y el sacárido neumocócico del serotipo 18C de la invención está des-O-acetilado.

### 35 1.2.2 Polisacárido neumocócico del serotipo 8

La unidad repetitiva de polisacárido del serotipo 8 consiste en una unidad de tetrasacárido lineal con un ácido glucurónico (Glc<sub>p</sub>A), dos glucopiranosas (Glc<sub>p</sub>) y una galactopiranososa (Gal<sub>p</sub>) (Jones y col. (1957) The Journal of the American Chemical Society. 79(11):2787-2793). Los cuatro monosacáridos están enlazados mediante enlaces 1,4 como se muestra en la figura 1. Los polisacáridos del serotipo 8 pueden obtenerse directamente de bacterias usando procedimientos de aislamiento conocidos por un experto habitual en la materia (véanse, por ejemplo, los procedimientos ilustrativos desvelados en las Publicaciones de Solicitud de Patente de los Estados Unidos n.º 2006/0228380, 2006/0228381, 2007/0184071, 2007/0184072, 2007/0231340 y 2008/0102498 y el documento WO 2008/118752). Además, pueden producirse usando protocolos sintéticos.

45 Las cepas del serotipo 8 de *S. pneumoniae* pueden obtenerse de colecciones de cultivos establecidas (tales como, por ejemplo, el Laboratorio de Referencia de Estreptococos (Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, Atlanta, GA)) o especímenes clínicos.

En algunos casos, los polisacáridos purificados del serotipo 8 de *S. pneumoniae* antes de la conjugación tienen un peso molecular de entre 10 kDa y 2.000 kDa. En un caso, el polisacárido capsular tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 1.000 kDa. En otro caso, el polisacárido capsular tiene un peso molecular de entre 70 kDa y 900 kDa. En otro caso, el polisacárido capsular tiene un peso molecular de entre 100 kDa y 800 kDa.

En casos adicionales, el polisacárido capsular tiene un peso molecular de 100 kDa a 600 kDa; de 100 kDa a 500 kDa; de 100 kDa a 400 kDa; de 150 kDa a 600 kDa; de 150 kDa a 500 kDa; de 150 kDa a 400 kDa; de 200 kDa a 600 kDa; de 200 kDa a 500 kDa; de 200 kDa a 400 kDa; de 250 kDa a 600; de 250 kDa a 500 kDa; de 250 kDa a 400 kDa; de 250 kDa a 350 kDa; de 300 kDa a 600 kDa; de 300 kDa a 500 kDa; de 300 kDa a 400 kDa; de 400 kDa a 600 kDa; de 500 kDa a 600 kDa; e intervalos de peso molecular similares deseados. Se contempla como un caso de la divulgación cualquier número entero dentro de cualquiera de los intervalos anteriores.

Puede reducirse ligeramente el tamaño de un polisacárido durante los procedimientos de purificación normales. De manera adicional, como se describe en el presente documento, el polisacárido puede someterse a técnicas de

separación por tamaños antes de la conjugación. Los intervalos de peso molecular mencionados anteriormente se refieren a polisacáridos purificados antes de la conjugación (por ejemplo, antes de la activación) después de una eventual etapa de separación por tamaños.

### 1.2.3 Polisacárido neumocócico del serotipo 10A

5 La unidad repetitiva de polisacárido del serotipo 10A consiste en una unidad repetida de hexasacárido ramificado con dos galactofuranosas (Gal<sub>f</sub>), tres galactopiranosas (Gal<sub>p</sub>), una N-acetilgalactosamina (Gal<sub>p</sub>NAC) y un fosforibitol de cadena principal (Jones, C. (2005) Carbohydrate Research 269(1):175-181). Hay dos monosacáridos ramificantes en el resto de β-Gal<sub>p</sub>NAC (un β-3-Gal<sub>p</sub> y un β-6-Gal<sub>f</sub>) como se muestra en la figura 2.

10 Los sacáridos del serotipo 10A pueden obtenerse directamente de bacterias usando procedimientos de aislamiento conocidos por un experto habitual en la materia (véanse, por ejemplo, los procedimientos ilustrativos desvelados en las Publicaciones de Solicitud de Patente de los Estados Unidos n.º 2006/0228380, 2006/0228381, 2007/0184071, 2007/0184072, 2007/0231340 y 2008/0102498 y el documento WO 2008/118752). Además, pueden producirse usando protocolos sintéticos.

15 Las cepas del serotipo 10A de *S. pneumoniae* pueden obtenerse de colecciones de cultivos establecidas (tales como, por ejemplo, el Laboratorio de Referencia de Estreptococos (Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, Atlanta, GA)) o especímenes clínicos.

20 En algunos casos, los polisacáridos purificados del serotipo 10A de *S. pneumoniae* antes de la conjugación tienen un peso molecular de entre 10 kDa y 2.000 kDa. En un caso, el polisacárido capsular tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 1.000 kDa. En otro caso, el polisacárido capsular tiene un peso molecular de entre 70 kDa y 900 kDa. En otro caso, el polisacárido capsular tiene un peso molecular de entre 100 kDa y 800 kDa.

25 En casos adicionales, el polisacárido capsular tiene un peso molecular de 100 kDa a 600 kDa; de 100 kDa a 500 kDa; de 100 kDa a 400 kDa; de 150 kDa a 600 kDa; de 150 kDa a 500 kDa; de 150 kDa a 400 kDa; de 200 kDa a 600 kDa; de 200 kDa a 500 kDa; de 200 kDa a 400 kDa; de 250 kDa a 600 kDa; de 250 kDa a 500 kDa; de 250 kDa a 400 kDa; de 250 kDa a 350 kDa; de 300 kDa a 600 kDa; de 300 kDa a 500 kDa; de 300 kDa a 400 kDa; de 400 kDa a 600 kDa; de 500 kDa a 600 kDa; e intervalos de peso molecular similares deseados. Se contempla como un caso de la divulgación cualquier número entero dentro de cualquiera de los intervalos anteriores.

30 Puede reducirse ligeramente el tamaño de un polisacárido durante los procedimientos de purificación normales. De manera adicional, como se describe en el presente documento, el polisacárido puede someterse a técnicas de separación por tamaños antes de la conjugación. Los intervalos de peso molecular mencionados anteriormente se refieren a polisacáridos purificados antes de la conjugación (por ejemplo, antes de la activación) después de una eventual etapa de separación por tamaños.

### 1.2.4 Polisacárido neumocócico del serotipo 11A

35 La unidad repetitiva de polisacárido del serotipo 11A consiste en una cadena principal lineal de tetrasacárido (Gal<sub>p</sub>) y dos glucopiranosas (Glc<sub>p</sub>) y un fosfoglicerol colgante (Richards y col. (1988) Adv. Exp. Med. Biol. 228:595-597), como se muestra en la figura 3. El polisacárido está O-acetilado en múltiples ubicaciones y, basándose en los datos comunicados en las referencias (Calix y col. (2011) J Bacteriol. 193(19):5271-5278), la cantidad total de O-acetilación en el polisacárido de 11A es de aproximadamente 2,6 grupos O-acetilo por unidad repetida de polisacárido.

40 Los polisacáridos del serotipo 11A pueden obtenerse directamente de bacterias usando procedimientos de aislamiento conocidos por un experto habitual en la materia (véanse, por ejemplo, los procedimientos ilustrativos desvelados en las Publicaciones de Solicitud de Patente de los Estados Unidos n.º 2006/0228380, 2006/0228381, 2007/0184071, 2007/0184072, 2007/0231340 y 2008/0102498 y el documento WO 2008/118752). Además, pueden producirse usando protocolos sintéticos.

45 Las cepas del serotipo 11A de *S. pneumoniae* pueden obtenerse de colecciones de cultivos establecidas (tales como, por ejemplo, el Laboratorio de Referencia de Estreptococos (Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, Atlanta, GA)) o especímenes clínicos.

50 El polisacárido capsular del serotipo 11A aislado obtenido mediante purificación de polisacárido del serotipo 11A del lisado de *S. pneumoniae* y opcionalmente separando por tamaños el polisacárido purificado puede caracterizarse por diferentes atributos que incluyen, por ejemplo, el peso molecular (PM) y los mM de acetato por mM de dicho polisacárido capsular de serotipo 11A.

En algunos casos, los polisacáridos purificados del serotipo 11A de *S. pneumoniae* antes de la conjugación tienen un peso molecular de entre 10 kDa y 2.000 kDa. En un caso, el polisacárido capsular tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 1.000 kDa. En otro caso, el polisacárido capsular tiene un peso molecular de entre 70 kDa y 900 kDa. En otro caso, el polisacárido capsular tiene un peso molecular de entre 100 kDa y 800 kDa.

En casos adicionales, el polisacárido capsular tiene un peso molecular de 100 kDa a 600 kDa; de 100 kDa a 500 kDa; de 100 kDa a 400 kDa; de 100 kDa a 300 kDa; de 100 kDa a 200 kDa; de 150 kDa a 600 kDa; de 150 kDa a 500 kDa; de 150 kDa a 400 kDa; de 150 kDa a 300 kDa; de 150 kDa a 200 kDa; de 200 kDa a 600 kDa; de 200 kDa a 500 kDa; de 200 kDa a 400 kDa; de 250 kDa a 600 kDa; de 250 kDa a 500 kDa; de 250 kDa a 400 kDa; de 250 kDa a 350 kDa; de 300 kDa a 600 kDa; de 300 kDa a 500 kDa; de 300 kDa a 400 kDa; de 400 kDa a 600 kDa; de 500 kDa a 600 kDa; e intervalos de peso molecular similares deseados. Se contempla como un caso de la divulgación cualquier número entero dentro de cualquiera de los intervalos anteriores.

Puede reducirse ligeramente el tamaño de un polisacárido durante los procedimientos de purificación normales. De manera adicional, como se describe en el presente documento, el polisacárido puede someterse a técnicas de separación por tamaños antes de la conjugación. Los intervalos de peso molecular mencionados anteriormente se refieren a polisacáridos purificados antes de la conjugación (por ejemplo, antes de la activación) después de una eventual etapa de separación por tamaños.

En un caso, se reduce el tamaño del polisacárido del serotipo 11A purificado mediante homogeneización de alta presión. La homogeneización de alta presión logra elevadas velocidades de cizalladura bombeando la corriente de procesado a través de un canal de flujo con dimensiones lo suficientemente pequeñas. La velocidad de cizalladura se aumenta usando una presión de homogeneización aplicada mayor y puede aumentarse el tiempo de exposición recirculando la corriente de alimentación a través del homogeneizador.

El procedimiento de homogeneización a alta presión es particularmente adecuado para reducir el tamaño del polisacárido del serotipo 11A purificado mientras que se conservan las características estructurales del polisacárido, tales como la presencia de grupos O-acetilo.

La presencia de O-acetilo en un polisacárido capsular del serotipo 11A purificado, aislado o activado o en un conjugado de polisacárido del serotipo 11A-proteína portadora se expresa como el número de mM de acetato por mM de dicho polisacárido o como el número de grupos O-acetilo por unidad repetitiva de polisacárido.

En un caso preferido, los polisacáridos purificados del serotipo 11A de *S. pneumoniae* tienen al menos 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 1,2, 1,4 o 1,6,  $\mu\text{mol}$  de acetato por  $\mu\text{mol}$  de dicho polisacárido capsular del serotipo 11A.

### 1.2.5 Polisacárido neumocócico del serotipo 12F

La unidad repetitiva de polisacárido del serotipo 12F consiste en una cadena principal de trisacárido lineal (una N-acetil-fucosamina ( $\text{Fuc}_p\text{NAC}$ ), una N-acetilgalactosamina ( $\text{Gal}_p\text{NAC}$ ) y un ácido N-acetilmanurónico ( $\text{Man}_p\text{NAC}$ )) con dos ramificaciones: una  $\alpha$ -galactopiranososa colgante ( $\text{Gal}_p$ ) enlazada en C3 de  $\text{Fuc}_p\text{NAC}$  y una ramificación de disacárido de  $\alpha\text{-Glc}_p\text{-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\text{-Glc}_p$  enlazada en C3 de  $\text{Man}_p\text{NAC}$  (Leontein y col. (1983) Carbohydrate Research 114(2):257-266.) como se muestra en la figura 4.

Las cepas del serotipo 12F de *Streptococcus pneumoniae* pueden obtenerse de colecciones de cultivos establecidas (tales como, por ejemplo, el Laboratorio de Referencia de Estreptococos (Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, Atlanta, GA)) o especímenes clínicos. Los sacáridos capsulares del serotipo 12F de *S. pneumoniae* se preparan mediante técnicas estándar conocidas por los expertos habituales en la materia. Los polisacáridos capsulares típicos se producen cultivando cada serotipo de *S. pneumoniae* en un medio (por ejemplo, en un medio a base de soja), posteriormente, los polisacáridos se preparan a partir del cultivo bacteriano. La población del organismo (serotipo 12F de *S. pneumoniae*) normalmente se aumenta de escala de un vial de siembra a botellas de siembra y se pasa a través de uno o más fermentadores de siembra de volumen creciente hasta que se alcanzan volúmenes de fermentación a escala de producción. Al final del ciclo de crecimiento, se lisan las células y el caldo de lisado se recoge para su procesado corriente abajo (purificación) (véanse, por ejemplo, los documentos WO 2006/110381 y WO 2008/118752 y las Publicaciones de Solicitud de Patente de los Estados Unidos n.º 2006/0228380, 2006/0228381, 2008/0102498 y US2008/0286838). Los polisacáridos normalmente se purifican mediante centrifugación, precipitación, ultrafiltración y/o cromatografía en columna (véanse, por ejemplo, los documentos WO 2006/110352 y WO 2008/118752).

Los polisacáridos purificados del serotipo 12F pueden activarse (por ejemplo, activarse químicamente) para hacer que sean capaces de reaccionar y después incorporarse en glucoconjugados de la invención, como se describe adicionalmente en el presente documento.

En algunos casos, los polisacáridos purificados del serotipo 12F de *S. pneumoniae* antes de la conjugación tienen un peso molecular de entre 10 kDa y 2.000 kDa. En un caso, el polisacárido capsular tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 1.000 kDa. En otro caso, el polisacárido capsular tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 300 kDa. En otro caso, el polisacárido capsular tiene un peso molecular de entre 70 kDa y 300 kDa. En casos adicionales, el polisacárido capsular tiene un peso molecular de 90 kDa a 250 kDa; de 90 kDa a 150 kDa; de 90 kDa a 120 kDa; de 80 kDa a 120 kDa; de 70 kDa a 100 kDa; de 70 kDa a 110 kDa; de 70 kDa a 120 kDa; de 70 kDa a 130 kDa; de 70 kDa a 140 kDa; de 70 kDa a 150 kDa; de 70 kDa a 160 kDa; de 80 kDa a 110 kDa; de 80 kDa a 120 kDa; de 80 kDa a 130 kDa; de 80 kDa a 140 kDa; de 80 kDa a 150 kDa; de 80 kDa a 160 kDa; de 90 kDa a 110 kDa; de 90 kDa a 120 kDa; de 90 kDa a 130 kDa; de 90 kDa a 140 kDa; de 90 kDa a 150 kDa; de 90 kDa a 160 kDa; de 100 kDa a 120 kDa; de 100 kDa a 130 kDa; de 100 kDa a 140 kDa; de 100 kDa a 150 kDa; de 100 kDa a 160 kDa; e intervalos de

peso molecular similares deseados. Se contempla como un caso de la divulgación cualquier número entero dentro de cualquiera de los intervalos anteriores.

5 Puede reducirse ligeramente el tamaño de un polisacárido durante los procedimientos de purificación normales. De manera adicional, como se describe en el presente documento, el polisacárido puede someterse a técnicas de separación por tamaños antes de la conjugación. Los intervalos de peso molecular mencionados anteriormente se refieren a polisacáridos purificados antes de la conjugación (por ejemplo, antes de la activación) después de una eventual etapa de separación por tamaños.

### 1.2.6 Polisacárido neumocócico del serotipo 15B

10 Como se muestra en la figura 5, la unidad de polisacárido repetitiva del serotipo 15B consiste en una cadena principal de trisacárido ramificada (una N-acetilglucosamina ( $\text{Glc}_p\text{NAc}$ ), una galactopiranososa ( $\text{Gal}_p$ ) y una glucopiranososa ( $\text{Glc}_p$ )) con una ramificación de disacárido de  $\alpha\text{Gal}_p\text{-}\beta\text{Gal}_p$  enlazada al grupo hidroxilo C4 de  $\text{Glc}_p\text{NAc}$ . El fosfoglicerol está enlazado al grupo hidroxilo C3 del resto de  $\beta\text{Gal}_p$  en la ramificación de disacárido (Jones y col. (2005) Carbohydrate Research 340(3):403-409). El polisacárido capsular del serotipo 15C tiene una estructura de cadena principal idéntica al serotipo 15B, pero carece de O-acetilación.

15 Los polisacáridos del serotipo 15B pueden obtenerse directamente de bacterias usando procedimientos de aislamiento conocidos por un experto habitual en la materia (véanse, por ejemplo, los procedimientos ilustrativos desvelados en las Publicaciones de Solicitud de Patente de los Estados Unidos n.º 2006/0228380, 2006/0228381, 2007/0184071, 2007/0184072, 2007/0231340 y 2008/0102498 y el documento WO 2008/118752). También pueden producirse usando protocolos sintéticos conocidos para el experto en la materia. Las cepas del serotipo 15B de *S. pneumoniae* pueden obtenerse de colecciones de cultivos establecidas (tales como, por ejemplo, la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Manassas, VA, EE. UU.) (por ejemplo, el n.º de depósito de cepa ATCC10354) o el Laboratorio de Referencia de Estreptococos (Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, Atlanta, GA, EE. UU.)) o de especímenes clínicos.

25 Las células bacterianas se cultivan en un medio, preferentemente en un medio a base de soja. Después de la fermentación de células bacterianas que producen polisacáridos capsulares del serotipo 15B de *S. pneumoniae*, las células bacterianas se lisan para producir un lisado celular. Después, el polisacárido del serotipo 15B puede aislarse del lisado celular usando técnicas de purificación conocidas en la técnica, incluyendo el uso de centrifugación, filtración de profundidad, precipitación, ultrafiltración, tratamiento con carbón activado, diafiltración y/o cromatografía en columna (véanse, por ejemplo, las Publicaciones de Solicitud de Patente de los Estados Unidos n.º 2006/0228380, 2006/0228381, 2007/0184071, 2007/0184072, 2007/0231340 y 2008/0102498 y el documento WO 2008/118752). El polisacárido capsular del serotipo 15B purificado puede usarse posteriormente para la preparación de conjugados inmunogénicos.

35 El polisacárido capsular del serotipo 15B aislado obtenido mediante purificación de polisacárido del serotipo 15B del lisado de *S. pneumoniae* y opcionalmente separando por tamaños el polisacárido purificado puede caracterizarse por diferentes parámetros que incluyen, por ejemplo, el peso molecular (PM), los mM de acetato por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B y los mM de glicerol por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B.

40 Preferentemente, para generar conjugados de 15B con características de filtrado y/o de rendimiento ventajosas, se lleva a cabo la separación por tamaños del polisacárido hasta un intervalo de peso molecular diana antes de la conjugación con una proteína portadora. Ventajosamente, el tamaño del polisacárido del serotipo 15B se reduce a la vez que se preservan características críticas de la estructura del polisacárido, tales como, por ejemplo, la presencia de grupos O-acetilo. Preferentemente, el tamaño del polisacárido purificado del serotipo 15B se reduce mediante homogeneización mecánica.

45 En un caso preferido, se reduce el tamaño del polisacárido del serotipo 15B purificado mediante homogeneización de alta presión. La homogeneización de alta presión logra elevadas velocidades de cizalladura bombeando la corriente de procesado a través de un canal de flujo con dimensiones lo suficientemente pequeñas. La velocidad de cizalladura se aumenta usando una presión de homogeneización aplicada mayor y puede aumentarse el tiempo de exposición recirculando la corriente de alimentación a través del homogeneizador.

50 El procedimiento de homogeneización a alta presión es particularmente adecuado para reducir el tamaño del polisacárido del serotipo 15B purificado mientras que se conservan las características estructurales del polisacárido, tales como la presencia de grupos O-acetilo.

55 En un caso preferido, el polisacárido capsular del serotipo 15B aislado tiene un peso molecular de entre 5 kDa y 500 kDa, entre 50 kDa y 500 kDa, entre 50 kDa y 450 kDa, entre 100 kDa y 400 kDa y entre 100 kDa y 350 kDa. En un caso preferido, el polisacárido capsular del serotipo 15B aislado tiene un peso molecular de entre 100 kDa y 350 kDa. En un caso preferido, el polisacárido capsular del serotipo 15B aislado tiene un peso molecular de entre 100 kDa y 300 kDa. En un caso preferido, el polisacárido capsular del serotipo 15B aislado tiene un peso molecular de entre 150 kDa y 300 kDa. En un caso preferido, el polisacárido capsular del serotipo 15B aislado tiene un peso molecular de 100 kDa a 500 kDa; de 100 kDa a 400 kDa; de 100 kDa a 300 kDa; de 100 kDa a 200 kDa; de 150 kDa

a 500 kDa; de 150 kDa a 400 kDa; de 150 kDa a 300 kDa; de 150 kDa a 200 kDa; de 200 kDa a 500 kDa; de 200 kDa a 400 kDa; de 250 kDa a 500 kDa; de 250 kDa a 400 kDa; de 250 kDa a 350 kDa; de 300 kDa a 500 kDa; de 300 kDa a 400 kDa; e intervalos de peso molecular similares deseados. Se contempla como un caso de la divulgación cualquier número entero dentro de cualquiera de los intervalos anteriores.

- 5 El polisacárido del serotipo 15B está O-acetilado y la cantidad total de O-acetilación es de aproximadamente 0,8-0,9 grupos O-acetilo por unidad repetitiva de polisacárido. El grado de O-acetilación del polisacárido se puede determinar mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, por ejemplo, mediante RMN de protones (véase, por ejemplo, Lemercinier y col. (1996) *Carbohydrate Research* 296:83-96; Jones y col. (2002) *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 30:1233-1247; documentos WO 2005/033148 y WO 00/56357). Otro procedimiento comúnmente usado se describe en Hestrin, S. (1949) *J. Biol. Chem.* 180:249-261. Preferentemente, se determina la presencia de grupos O-acetilo mediante análisis de HPLC de iones.

La presencia de O-acetilo en un polisacárido capsular del serotipo 15B purificado, aislado o activado o en un conjugado de polisacárido del serotipo 15B-proteína portadora se expresa como el número de mM de acetato por mM de dicho polisacárido o como el número de grupos O-acetilo por unidad repetitiva de polisacárido.

- 15 En un caso preferido, el polisacárido capsular del serotipo 15B aislado 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 dicho polisacárido capsular del serotipo 15B. En un caso preferido, el polisacárido capsular del serotipo 15B aislado comprende al menos 0,5, 0,6 o 0,7 mM de acetato por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B. En un caso preferido, el polisacárido capsular del serotipo 15B aislado comprende al menos 0,6 mM de acetato por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B. En un caso preferido, el polisacárido capsular del serotipo 15B aislado comprende al menos 0,7 mM de acetato por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B.

- 25 La presencia de cadenas laterales de glicerolfosfato se determina mediante medición del glicerol usando cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD) después de su liberación mediante tratamiento del polisacárido con ácido fluorhídrico (HF). La presencia de glicerol en un polisacárido del serotipo 15B purificado, aislado o activado o en un conjugado de polisacárido del serotipo 15B-proteína portadora se expresa como el número de mM de glicerol por mM de polisacárido del serotipo 15B.

- 30 En un caso preferido, el polisacárido capsular del serotipo 15B aislado 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 dicho polisacárido capsular del serotipo 15B. En un caso preferido, el polisacárido capsular del serotipo 15B aislado comprende al menos 0,5, 0,6 o 0,7 mM de glicerol por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B. En un caso preferido, el polisacárido capsular del serotipo 15B aislado comprende al menos 0,6 mM de glicerol por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B. En un caso preferido, el polisacárido capsular del serotipo 15B aislado comprende al menos 0,7 mM de glicerol por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B.

- 35 En un caso preferido, el polisacárido capsular del serotipo 15B aislado tiene un peso molecular de entre 100 kDa y 350 kDa y comprende al menos 0,6 mM de acetato por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B.

En un caso preferido, el polisacárido capsular del serotipo 15B aislado tiene un peso molecular de entre 100 kDa y 350 kDa y comprende al menos 0,6 mM de glicerol por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B.

En un caso preferido, el polisacárido capsular del serotipo 15B aislado tiene un peso molecular de entre 150 kDa y 300 kDa y comprende al menos 0,6 mM de acetato por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B.

- 40 En un caso preferido, el polisacárido capsular del serotipo 15B aislado tiene un peso molecular de entre 150 kDa y 300 kDa y comprende al menos 0,6 mM de glicerol por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B.

En un caso preferido, el polisacárido capsular del serotipo 15B aislado tiene un peso molecular de entre 150 kDa y 350 kDa y comprende al menos 0,6 mM de acetato por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B.

- 45 En un caso preferido, el polisacárido capsular del serotipo 15B aislado tiene un peso molecular de entre 150 kDa y 350 kDa y comprende al menos 0,6 mM de glicerol por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B.

En un caso preferido, el polisacárido capsular del serotipo 15B aislado comprende al menos 0,6 mM de acetato por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B y al menos 0,6 mM de glicerol por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B.

- 50 En un caso preferido, el polisacárido capsular del serotipo 15B aislado tiene un peso molecular de entre 100 kDa y 350 kDa y comprende al menos 0,6 mM de acetato por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B y al menos 0,6 mM de glicerol por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B.

En un caso preferido, el polisacárido capsular del serotipo 15B aislado tiene un peso molecular de entre 150 kDa y 300 kDa y comprende al menos 0,6 mM de acetato por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B y al menos 0,6 mM de glicerol por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B.

En un caso preferido, el polisacárido capsular del serotipo 15B aislado tiene un peso molecular de entre 150 kDa y 350 kDa y comprende al menos 0,6 mM de acetato por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B y al menos 0,6 mM de glicerol por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B.

### 1.2.7 Polisacárido neumocócico del serotipo 22F

- 5 Como se muestra en la figura 6, la unidad repetitiva de polisacárido del serotipo 22F consiste en una cadena principal de pentasacárido ramificada (un ácido glucurónico (Glc<sub>pA</sub>), una glucopiranososa (Glc<sub>p</sub>), una galactofuranosa (Gal<sub>f</sub>) y dos ramnopiranosas (Rha<sub>p</sub>)) con una ramificación de αGlc<sub>p</sub> enlazada al grupo hidroxilo C3 de βRha<sub>p</sub> (Richards y col. (1989) Canadian Journal of Chemistry 67(6):1038-1050). Aproximadamente un 80 % de los grupos hidroxilo C2 del resto de βRha<sub>p</sub> en la unidad repetitiva de polisacárido está O-acetilado.
- 10 Los polisacáridos del serotipo 22F pueden obtenerse directamente de bacterias usando procedimientos de aislamiento conocidos por un experto habitual en la materia (véanse, por ejemplo, los procedimientos ilustrativos desvelados en las Publicaciones de Solicitud de Patente de los Estados Unidos n.º 2006/0228380, 2006/0228381, 2007/0184071, 2007/0184072, 2007/0231340 y 2008/0102498 y el documento WO 2008/118752). Además, pueden producirse usando protocolos sintéticos.
- 15 Las cepas del serotipo 22F de *S. pneumoniae* pueden obtenerse de colecciones de cultivos establecidas (tales como, por ejemplo, el Laboratorio de Referencia de Estreptococos (Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, Atlanta, GA)) o especímenes clínicos.

20 El polisacárido capsular del serotipo 22F aislado obtenido mediante purificación de polisacárido del serotipo 22F del lisado de *S. pneumoniae* y opcionalmente separando por tamaños el polisacárido purificado puede caracterizarse por diferentes parámetros que incluyen, por ejemplo, el peso molecular (PM) y los mM de acetato por mM de dicho polisacárido capsular de serotipo 22F.

25 Preferentemente, para generar conjugados del serotipo 22F con características de filtrado y/o de rendimiento ventajosas, se lleva a cabo la separación por tamaños del polisacárido hasta un intervalo de peso molecular diana antes de la conjugación con una proteína portadora. Ventajosamente, el tamaño del polisacárido del serotipo 22F se reduce a la vez que se preservan características críticas de la estructura del polisacárido, tales como, por ejemplo, la presencia del grupo O-acetilo. Preferentemente, el tamaño del polisacárido purificado del serotipo 22F se reduce mediante homogeneización mecánica.

30 En un caso preferido, se reduce el tamaño del polisacárido purificado mediante homogeneización de alta presión. La homogeneización de alta presión logra elevadas velocidades de cizalladura bombeando la corriente de procesado a través de un canal de flujo con dimensiones lo suficientemente pequeñas. La velocidad de cizalladura se aumenta usando una presión de homogeneización aplicada mayor y puede aumentarse el tiempo de exposición recirculando la corriente de alimentación a través del homogeneizador.

35 El procedimiento de homogeneización a alta presión es particularmente adecuado para reducir el tamaño del polisacárido del serotipo 22F purificado mientras que se conservan las características estructurales del polisacárido, tales como la presencia de grupos O-acetilo.

40 En algunos casos, los polisacáridos purificados del serotipo 22F de *S. pneumoniae* antes de la conjugación tienen un peso molecular de entre 10 kDa y 2.000 kDa. En un caso, el polisacárido capsular tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 1.000 kDa. En otro caso, el polisacárido capsular tiene un peso molecular de entre 70 kDa a 900 kDa. En otro caso, el polisacárido capsular tiene un peso molecular de entre 100 kDa a 800 kDa. En otro caso, el polisacárido capsular tiene un peso molecular de entre 200 kDa a 600 kDa. En otro caso, el polisacárido capsular tiene un peso molecular de entre 400 kDa a 700 kDa.

45 En casos adicionales, el polisacárido capsular tiene un peso molecular de 100 kDa a 1.000 kDa; de 100 kDa a 900 kDa; de 100 kDa a 800 kDa; de 100 kDa a 700 kDa; de 100 kDa a 600 kDa; de 100 kDa a 500 kDa; de 100 kDa a 400 kDa; de 100 kDa a 300 kDa; de 150 kDa a 1.000 kDa; de 150 kDa a 900 kDa; de 150 kDa a 800 kDa; de 150 kDa a 700 kDa; de 150 kDa a 600 kDa; de 150 kDa a 500 kDa; de 150 kDa a 400 kDa; de 150 kDa a 300 kDa; de 200 kDa a 1.000 kDa; de 200 kDa a 900 kDa; de 200 kDa a 800 kDa; de 200 kDa a 700 kDa; de 200 kDa a 600 kDa; de 200 kDa a 500 kDa; de 200 kDa a 400 kDa; de 200 kDa a 300 kDa; de 250 kDa a 1.000 kDa; de 250 kDa a 900 kDa; de 250 kDa a 800 kDa; de 250 kDa a 700 kDa; de 250 kDa a 600 kDa; de 250 kDa a 500 kDa; de 250 kDa a 400 kDa; de 250 kDa a 350 kDa; de 300 kDa a 1.000 kDa; de 300 kDa a 900 kDa; de 300 kDa a 800 kDa; de 300 kDa a 700 kDa; de 300 kDa a 600 kDa; de 300 kDa a 500 kDa; de 300 kDa a 400 kDa; de 300 kDa a 300 kDa; de 400 kDa a 1.000 kDa; de 400 kDa a 900 kDa; de 400 kDa a 800 kDa; de 400 kDa a 700 kDa; de 400 kDa a 600 kDa; de 500 kDa a 600 kDa; e intervalos de peso molecular similares deseados. Se contempla como un caso de la divulgación cualquier número entero dentro de cualquiera de los intervalos anteriores.

55 Puede reducirse ligeramente el tamaño de un polisacárido durante los procedimientos de purificación normales. De manera adicional, como se ha descrito anteriormente en el presente documento, el polisacárido de 22F puede someterse a técnicas de separación por tamaños antes de la conjugación. Los intervalos de peso molecular mencionados anteriormente se refieren a polisacáridos purificados antes de la conjugación (por ejemplo, antes de la

activación) después de una eventual etapa de separación por tamaños.

El grado de O-acetilación del polisacárido se puede determinar mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, por ejemplo, mediante RMN de protones (Lemerminier y col. (1996) Carbohydrate Research 296:83-96; Jones y col. (2002) J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis 30:1233-1247; documentos WO 2005/033148 y WO 00/56357). Otro procedimiento comúnmente usado se describe en Hestrin, S. (1949) J. Biol. Chem. 180:249-261. Preferentemente, se determina la presencia de grupos O-acetilo mediante análisis de HPLC de iones.

La presencia de O-acetilo en un polisacárido capsular del serotipo 22F purificado, aislado o activado o en un conjugado de polisacárido del serotipo 22F-proteína portadora se expresa como el número de mM de acetato por mM de dicho polisacárido o como el número de grupos O-acetilo por unidad repetitiva de polisacárido.

- 10 En un caso preferido, los polisacáridos purificados del serotipo 22F de *S. pneumoniae* tienen al menos 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1, 1,2, 1,4 o 1,6,  $\mu\text{mol}$  de acetato por  $\mu\text{mol}$  de dicho polisacárido capsular del serotipo 22F.

### 1.2.8 Polisacárido neumocócico del serotipo 33F

- 15 Como se muestra en la figura 7, la unidad repetitiva de polisacárido del serotipo 33F consiste en una cadena principal de pentasacárido ramificada (dos galactopiranosas (Gal<sub>p</sub>), dos galactofuranosas (Gal<sub>f</sub>) y una glucopiranososa (Glc<sub>p</sub>) con una  $\alpha\text{Gal}_p$  terminal enlazada al grupo hidroxilo C2 del resto de  $\alpha\text{Gal}_p$  en la cadena principal (Lemerminier y col. (2006) Carbohydrate Research 341(1):68-74.). Se ha comunicado en las referencias que el grupo C2 hidroxilo del resto de 3- $\beta$ -Gal<sub>f</sub> de la cadena principal está O-acetilado.

- 20 Los polisacáridos del serotipo 33F pueden obtenerse directamente de bacterias usando procedimientos de aislamiento conocidos por un experto habitual en la materia (véanse, por ejemplo, los procedimientos ilustrativos desvelados en las Publicaciones de Solicitud de Patente de los Estados Unidos n.º 2006/0228380, 2006/0228381, 2007/0184071, 2007/0184072, 2007/0231340 y 2008/0102498 y el documento WO 2008/118752). Además, pueden producirse usando protocolos sintéticos.

- 25 Las cepas del serotipo 33F de *S. pneumoniae* pueden obtenerse de colecciones de cultivos establecidas (tales como, por ejemplo, el Laboratorio de Referencia de Estreptococos (Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, Atlanta, GA)) o especímenes clínicos.

Los polisacáridos purificados del serotipo 33F pueden activarse (por ejemplo, activarse químicamente) para hacer que sean capaces de reaccionar y después incorporarse en glucoconjugados de la invención, como se describe adicionalmente en el presente documento.

- 30 El polisacárido capsular del serotipo 33F aislado obtenido mediante purificación de polisacárido del serotipo 33F del lisado de *S. pneumoniae* y opcionalmente separando por tamaños el polisacárido purificado puede caracterizarse por diferentes parámetros que incluyen, por ejemplo, el peso molecular y los mM de acetato por mM de dicho polisacárido capsular de serotipo 33F.

- 35 En algunos casos, los polisacáridos purificados del serotipo 33F de *S. pneumoniae* antes de la conjugación tienen un peso molecular de entre 10 kDa y 2.000 kDa. En otros casos de este tipo, el sacárido tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 2.000 kDa. En casos adicionales de este tipo, el sacárido tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 1.750 kDa; entre 50 kDa y 1.500 kDa; entre 50 kDa y 1.250 kDa; entre 50 kDa y 1.000 kDa; entre 50 kDa y 750 kDa; entre 50 kDa y 500 kDa; entre 100 kDa y 2.000 kDa; entre 100 kDa y 1.750 kDa; entre 100 kDa y 1.500 kDa; entre 100 kDa y 1.250 kDa; entre 100 kDa y 1.000 kDa; entre 100 kDa y 750 kDa; entre 100 kDa y 500 kDa; entre 200 kDa y 2.000 kDa; entre 200 kDa y 1.750 kDa; entre 200 kDa y 1.500 kDa; entre 200 kDa y 1.250 kDa; entre 200 kDa y 1.000 kDa; entre 200 kDa y 750 kDa; o entre 200 kDa y 500 kDa. Se contempla como un caso de la divulgación cualquier número entero dentro de cualquiera de los intervalos anteriores. Puede reducirse ligeramente el tamaño de un polisacárido durante los procedimientos de purificación normales. De manera adicional, como se describe en el presente documento, el polisacárido puede someterse a técnicas de separación por tamaños antes de la conjugación. Los intervalos de peso molecular mencionados anteriormente se refieren a polisacáridos purificados antes de la conjugación (por ejemplo, antes de la activación) después de una eventual etapa de separación por tamaños.

La presencia de O-acetilo en un polisacárido capsular del serotipo 33F purificado, aislado o activado o en un conjugado de polisacárido del serotipo 33F-proteína portadora se expresa como el número de mM de acetato por mM de dicho polisacárido o como el número de grupos O-acetilo por unidad repetitiva de polisacárido.

- 50 En un caso preferido, los polisacáridos purificados del serotipo 33F de *S. pneumoniae* tienen al menos 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 1,2, 1,4 o 1,6,  $\mu\text{mol}$  de acetato por  $\mu\text{mol}$  de dicho polisacárido capsular del serotipo 33F.

### 1.3 Glucoconjugados de las composiciones inmunogénicas de la invención

Los sacáridos purificados se activan químicamente para producir los sacáridos (es decir, sacáridos activados) capaces de reaccionar con la proteína portadora. Una vez activados, cada sacárido capsular se conjuga por

separado a una proteína portadora para formar un glucoconjugado. En una realización, cada sacárido capsular se conjuga a la misma proteína portadora. La activación química de los sacáridos y la posterior conjugación a la proteína portadora puede lograrse mediante los procedimientos de activación y conjugación desvelados en el presente documento.

### 5 1.3.1 Glucoconjugados de los serotipos de *S. pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F de las composiciones inmunogénicas de la invención

Los polisacáridos capsulares de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F de *S. pneumoniae* se preparan mediante técnicas convencionales conocidas por los expertos habituales en la materia (véanse, por ejemplo, los documentos WO 2006/110381, WO 2008/118752, WO 2006/110352 y las Publicaciones de Patente de los Estados Unidos n.º 2006/0228380, 2006/0228381, 2008/0102498 y 2008/0286838).

En una realización, los polisacáridos se activan con tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino piridinio (CDAP) para formar un éster de cianato. El polisacárido activado se acopla después directamente o mediante un grupo espaciador (enlazador) a un grupo amino en la proteína portadora (preferentemente, CRM<sub>197</sub>). Por ejemplo, el espaciador puede ser cistamida o cisteamida 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 con maleimida (por ejemplo, usando éster de N-[γ-maleimidobutirilo]succinimida (GMBS)) o una proteína portadora haloacetilada (por ejemplo, usando yodoacetimida, bromoacetato de N-succinimidilo (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 (opcionalmente preparado mediante química de CDAP) se acopla con hexano diamina o dihidrazida del ácido adípico (ADH) y el sacárido derivatizado con amino se conjuga a la proteína portadora (por ejemplo, CRM<sub>197</sub>) usando química de carbodiimida (por ejemplo, EDAC o EDC) a través de un grupo carboxilo en la proteína portadora. Dichos conjugados se describen, por ejemplo, en los documentos WO 93/15760, WO 95/08348 y WO 96/129094.

Otras técnicas adecuadas para conjugación usan carbodiimidas, hidrazidas, ésteres activos, norborano, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S--NHS, EDC, TSTU. Muchas se describen en la Publicación de Solicitud Internacional de Patente n.º WO 98/42721. La conjugación puede implicar un enlazador de carbonilo que puede formarse mediante reacción de un grupo hidroxilo libre del sacárido con 1,1'-carbonyldiimidazol (CDI) (véase Bethell y col. (1979) J. Biol. Chem. 254:2572-2574; Hearn y col. (1981) J. Chromatogr. 218:509-518) seguido 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, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F de *S. pneumoniae* se conjuga a la proteína portadora mediante aminación reductora (tal como se describe en las Publicaciones de Solicitud de Patente de los Estados Unidos n.º 2006/0228380, 2007/0231340, 2007/0184071 y 2007/0184072, documentos WO 2006/110381, WO 2008/079653 y WO 2008/143709). En una realización preferida, los polisacáridos capsulares de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F de *S. pneumoniae* están todos conjugados a la proteína portadora mediante aminación reductora.

La aminación reductora implica dos etapas, (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 hidrólisis mecánica o química. La hidrólisis química puede llevarse a cabo usando ácido acético. La etapa de oxidación puede implicar la reacción con peryodato. A efectos de la presente invención, el término "peryodato" incluye tanto peryodato como ácido peryódico; el término también incluye tanto metaperyodato (IO<sub>4</sub><sup>-</sup>) como ortoperyodato (IO<sub>6</sub><sup>5-</sup>) y las diversas sales de peryodato (por ejemplo, peryodato de sodio y peryodato de potasio).

En una realización, el polisacárido capsular del serotipo 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F o 23F de *S. pneumoniae* se oxida en presencia de metaperyodato, preferentemente en presencia de peryodato de sodio (NaIO<sub>4</sub>). En otra realización, los polisacáridos capsulares de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F de *S. pneumoniae* se oxidan en presencia de ortoperyodato, preferentemente en presencia de ácido peryódico.

Después de la etapa de oxidación del polisacárido, se dice que el polisacárido está activado y se denomina a continuación en el presente documento "polisacárido activado". El polisacárido activado y la proteína portadora pueden liofilizarse (criodesecarse), ya sea de manera independiente (liofilización individual) o juntos (liofilización conjunta). En una realización, el polisacárido activado y la proteína portadora se liofilizan juntos. En otra realización, el polisacárido activado y la proteína portadora se liofilizan de manera independiente.

En una realización, la liofilización se produce en presencia de un azúcar no reductor, los posibles azúcares no reductores incluyen sacarosa, trehalosa, rafinosa, estaquiosa, melezitosa, dextrano, manitol, lactitol y Palatinin.

La segunda etapa del procedimiento de conjugación es la reducción del polisacárido activado y una proteína

portadora para formar un conjugado (la denominada aminación reductora), usando un agente reductor. Los agentes reductores que son adecuados incluyen los cianoborohidruros, tales como cianoborohidruro de sodio, borano-piridina o resina de intercambio de borohidruro. En una realización, el agente reductor es cianoborohidruro de sodio.

5 En una realización, la reacción de reducción se lleva a cabo en disolvente acuoso, en otra realización, la reacción se lleva a cabo en un disolvente aprótico. En una realización, la reacción de reducción se lleva a cabo en disolvente de DMSO (dimetilsulfóxido) o en DMF (dimetilformamida). El disolvente de DMSO o DMF puede usarse para reconstituir el polisacárido activado y la proteína portadora que se han liofilizado.

10 Al final de la reacción de reducción, pueden quedar grupos aldehído sin reaccionar en los conjugados, estos pueden protegerse usando un agente de protección adecuado. En una realización, este agente de protección es borohidruro de sodio (NaBH<sub>4</sub>). Después de la conjugación (la reacción de reducción y opcionalmente la protección), los glucoconjugados pueden purificarse. Los glucoconjugados pueden purificarse mediante diafiltración y/o cromatografía de intercambio iónico y/o cromatografía de exclusión por tamaños. En una realización, los glucoconjugados se purifican mediante diafiltración o cromatografía de intercambio iónico o cromatografía de exclusión por tamaños. En una realización, los glucoconjugados se esterilizan por filtración.

15 En algunas realizaciones, el glucoconjugado de los serotipos de *S. pneumoniae* 9V y/o 18C comprende un sacárido que tiene un grado de O-acetilación de entre el 10 % y el 100 %, entre el 20 % y el 100 %, entre el 30 % y el 100 %, entre el 40 % y el 100 %, entre el 50 % y el 100 %, entre el 60 % y el 100 %, entre el 70 % y el 100 %, entre el 75 % y el 100 %, entre el 80 % y el 100 %, entre el 90 % y el 100 %, entre el 50 % y el 90 %, entre el 60 % y el 90 %, entre el 70 % y el 90 % o entre el 80 % y el 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 %.

20 En algunas realizaciones, el glucoconjugado de los serotipos de *S. pneumoniae* 9V y/o 18C de la invención está O-acetilado. En algunas realizaciones, el glucoconjugado del serotipo de *S. pneumoniae* 9V está O-acetilado y el glucoconjugado del serotipo de *S. pneumoniae* 18C está des-O-acetilado.

### 25 1.3.2 Glucoconjugados del serotipo 22F de *S. pneumoniae* de las composiciones inmunogénicas de la invención

Los glucoconjugados del serotipo 22F de la invención tienen un peso molecular de entre 1000 kDa y 12.500 kDa, en el que la relación de sacárido a proteína portadora (p/p) es de entre 0,8 y 1,2 y en el que dicha proteína portadora es CRM<sub>197</sub>.

30 En una realización, los glucoconjugados del serotipo 22F se obtienen activando el polisacárido con tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino piridinio (CDAP) para formar un éster de cianato. El polisacárido activado puede acoplarse directamente o mediante un grupo espaciador (enlazador) a un grupo amino en la proteína portadora. Por ejemplo, el espaciador puede ser cistamida o cisteamida 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 con maleimida (por ejemplo, usando GMBS) o una proteína portadora haloacetilada (por ejemplo, usando yodoacetimida, SIB, SIAB, sulfo-SIAB, SIA o SBAP). Preferentemente, el éster de cianato (opcionalmente preparado mediante química de CDAP) se acopla con hexano diamina o dihidrazida del ácido adípico (ADH) y el sacárido derivatizado con amino se conjuga a la proteína portadora usando química de carbodiimida (por ejemplo, EDAC o EDC) a través de un grupo carboxilo en la proteína portadora. Dichos conjugados se describen, por ejemplo, en los documentos WO 93/15760, WO 95/08348 y WO 96/129094.

40 Otras técnicas adecuadas usan carbodiimidias, hidrazidas, ésteres activos, norborano, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S--NHS, EDC, TSTU. Muchas se describen en la Publicación de Solicitud Internacional de Patente n.º WO 98/42721. La conjugación puede implicar un enlazador de carbonilo que puede formarse mediante reacción de un grupo hidroxilo libre del sacárido con CDI (véase Bethell y col. (1979) J. Biol. Chem. 254:2572-2574; Hearn y col. (1981) J. Chromatogr. 218:509-518) seguido 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.

50 En realizaciones preferidas, los glucoconjugados del serotipo 22F de la invención se preparan usando aminación reductora. La aminación reductora implica dos etapas, (1) oxidación del polisacárido para generar funcionalidades aldehído a partir de los dioles vecinos en la unidad de hexasacárido individual, (2) reducción del polisacárido activado y una proteína portadora (por ejemplo, CRM<sub>197</sub>) para formar un conjugado.

55 Preferentemente, antes de la oxidación, se lleva a cabo la separación por tamaños del polisacárido del serotipo 22F hasta un peso molecular diana (PM). Ventajosamente, el tamaño del polisacárido del serotipo 22F se reduce a la vez que se preservan características críticas de la estructura del polisacárido, tales como, por ejemplo, la presencia de grupos O-acetilo. Preferentemente, el tamaño del polisacárido purificado del serotipo 22F se reduce mediante homogeneización mecánica (véase la sección 1.2.7 anterior).

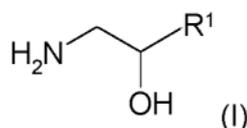
En una realización, el polisacárido del serotipo se activa (oxida) mediante un procedimiento que comprende las etapas de:

- (a) hacer reaccionar el polisacárido del serotipo 22F aislado con un agente oxidante;
- (b) inactivar la reacción de oxidación mediante la adición de un agente de inactivación, dando como resultado un polisacárido del serotipo 22F activado.

En una realización preferida, el agente oxidante es peryodato. A efectos de la presente invención, el término "periyodato" incluye tanto peryodato como ácido peryódico; el término también incluye tanto metaperyodato ( $\text{IO}_4^-$ ) como ortoperyodato ( $\text{IO}_6^{5-}$ ) y las diversas sales de peryodato (por ejemplo, peryodato de sodio y peryodato de potasio). En una realización preferida, el agente oxidante es peryodato de sodio. En una realización preferida, el peryodato usado para la oxidación del polisacárido del serotipo 22F es metaperyodato. En una realización preferida, el peryodato usado para la oxidación del polisacárido del serotipo 22F es metaperyodato de sodio.

En una realización, el agente inactivante se selecciona entre dioles próximos, 1,2-aminoalcoholes, aminoácidos, glutatión, sulfito, bisulfato, ditionita, metabisulfito, tiosulfato, fosfitos, hipofosfitos o ácido fosforoso.

En una realización, el agente inactivador es un 1,2-aminoalcohol de fórmula (I):



en la que  $\text{R}^1$  se selecciona entre H, metilo, etilo, propilo o isopropilo.

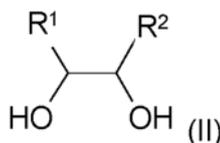
En una realización, el agente inactivante se selecciona entre sales sódicas y potásicas de sulfito, bisulfato, ditionita, metabisulfito, tiosulfato, fosfitos, hipofosfitos o ácido fosforoso.

En una realización, el agente inactivante es un aminoácido. En dichas realizaciones, dicho aminoácido puede seleccionarse entre serina, treonina, cisteína, cistina, metionina, prolina, hidroxiprolina, triptófano, tirosina e histidina.

En una realización, el agente inactivante es un sulfito, tal como bisulfato, ditionita, metabisulfito, tiosulfato.

En una realización, el agente inactivante es un compuesto que comprende dos grupos hidroxilo próximos (dioles próximos), es decir, dos grupos hidroxilo enlazados covalentemente a dos átomos de carbono adyacentes.

Preferentemente, el agente inactivante es un compuesto de fórmula (II):



en la que  $\text{R}^1$  y  $\text{R}^2$  se seleccionan cada uno independientemente entre H, metilo, etilo, propilo o isopropilo.

En una realización preferida, el agente inactivante es glicerol, etilenglicol, propan-1,2-diol, butan-1,2-diol o butan-2,3-diol o ácido ascórbico. En una realización preferida, el agente inactivante es butan-2,3-diol.

En una realización preferida, el polisacárido aislado del serotipo 22F se activa mediante un procedimiento que comprende las etapas de:

- (a) hacer reaccionar el polisacárido del serotipo 22F con peryodato;
- (b) inactivar la reacción de oxidación mediante la adición de butan-2,3-diol, dando como resultado un polisacárido del serotipo 22F activado.

Después de la etapa de oxidación del polisacárido, se dice que el polisacárido está activado y se denomina a continuación en el presente documento "polisacárido activado".

En una realización preferida, el polisacárido del serotipo 22F activado está purificado. El polisacárido del serotipo 22F se purifica de acuerdo con procedimientos conocidos por los expertos en la materia, tales como cromatografía de permeación en gel (GPC), diálisis o ultrafiltración/diafiltración. Por ejemplo, el polisacárido de 22F activado se purifica mediante concentración y diafiltración usando un dispositivo de ultrafiltración.

En una realización preferida, el grado de oxidación del polisacárido del serotipo 22F activado es de entre 2 y 30, entre 2 y 25, entre 2 y 20, entre 2 y 15, entre 2 y 10, entre 2 y 5, entre 5 y 30, entre 5 y 25, entre 5 y 20, entre 5 y 15, entre 5 y 10, entre 10 y 30, entre 10 y 25, entre 10 y 20, entre 10 y 15, entre 15 y 30, entre 15 y 25, entre 15 y 20, entre 20 a 30 entre 20 a 25. En una realización preferida, el grado de oxidación del polisacárido del serotipo 22F

## ES 2 820 824 T3

activado es de entre 2 y 10, entre 4 y 8, entre 4 y 6, entre 6 y 8, entre 6 y 12, entre 8 y 14, entre 9 y 11, entre 10 y 16, entre 12 y 16, entre 14 y 18, entre 16 y 20, entre 16 y 18, entre 18 y 22 o entre 18 y 20.

5 En una realización preferida, el polisacárido del serotipo 22F activado tiene un peso molecular de entre 25 kDa y 1.000 kDa, entre 100 kDa y 1.000 kDa, entre 300 kDa y 800 kDa, entre 300 kDa y 700 kDa, entre 300 kDa y 600 kDa, entre 400 kDa y 1.000 kDa, entre 400 kDa y 800 kDa, entre 400 kDa y 700 kDa o entre 400 kDa y 600 kDa. En una realización, el polisacárido del serotipo 22F activado tiene un peso molecular de entre 300 kDa y 800 kDa. En una realización, el polisacárido del serotipo 22F activado tiene un peso molecular de entre 400 kDa y 600 kDa. En una realización preferida, el polisacárido del serotipo 22F activado tiene un peso molecular de entre 400 kDa y 600 kDa y un grado de oxidación de entre 10 y 25, entre 10 y 20, entre 12 y 20 o entre 14 y 18. En una realización preferida, el polisacárido del serotipo 22F activado tiene un peso molecular de entre 400 kDa y 600 kDa y un grado de oxidación de entre 10 y 20.

10 En una realización preferida, el polisacárido del serotipo 22F activado 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 polisacárido del serotipo 22F activado 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 polisacárido del serotipo 22F activado comprende al menos 0,6 mM de acetato por mM de polisacárido del serotipo 22F. En una realización preferida, el polisacárido del serotipo 22F activado comprende al menos 0,7 mM de acetato por mM de polisacárido del serotipo 22F.

15 En una realización preferida, el polisacárido del serotipo 22F activado tiene un peso molecular de entre 400 kDa y 800 kDa y comprende al menos 0,6 mM de acetato por mM de polisacárido del serotipo 22F.

20 En una realización preferida, el polisacárido del serotipo 22F activado tiene un peso molecular de entre 400 kDa y 800 kDa, un grado de oxidación de entre 12 y 20 y comprende al menos 0,6 mM de acetato por mM de polisacárido del serotipo 22F.

El polisacárido activado y/o la proteína portadora pueden liofilizarse (criodesecarse), ya sea de manera independiente (liofilización individual) o juntos (liofilización conjunta).

25 En una realización, el polisacárido del serotipo 22F activado está liofilizado, opcionalmente en presencia de sacárido. En una realización preferida, el sacárido se selecciona entre sacarosa, trehalosa, rafinosa, estaquiosa, melezitosa, dextrano, manitol, lactitol y Palatinit. En una realización preferida, el sacárido es sacarosa. En una realización, el polisacárido activado liofilizado se combina posteriormente con una solución que comprende la proteína portadora.

30 En otra realización, el polisacárido activado y la proteína portadora se liofilizan juntos. En dichas realizaciones, el polisacárido activado del serotipo 22F se combina con la proteína portadora y se liofiliza opcionalmente en presencia de un sacárido. En una realización preferida, el sacárido se selecciona entre sacarosa, trehalosa, rafinosa, estaquiosa, melezitosa, dextrano, manitol, lactitol y Palatinit. En una realización preferida, el sacárido es sacarosa. El polisacárido y la proteína portadora liofilizados juntos pueden resuspenderse posteriormente en solución y se hacen reaccionar con un agente reductor.

35 La segunda etapa del procedimiento de conjugación es la reducción del polisacárido activado y una proteína portadora para formar un conjugado (aminación reductora), usando un agente reductor.

El polisacárido activado del serotipo 22F puede conjugarse a una proteína portadora mediante un procedimiento que comprende las etapas de:

40 (c) combinar el polisacárido activado del serotipo 22F con una proteína portadora; y  
(d) hacer reaccionar el polisacárido activado del serotipo 22F combinado y la proteína portadora con un agente reductor para formar un conjugado de polisacárido del serotipo 22F-proteína portadora. En una realización, la reacción de reducción se lleva a cabo en disolvente acuoso, en otra realización, la reacción se lleva a cabo en un disolvente aprótico. En una realización, la reacción de reducción se lleva a cabo en disolvente de DMSO (dimetilsulfóxido) o en DMF (dimetilformamida). El disolvente de DMSO o DMF puede usarse para reconstituir el polisacárido activado y la proteína portadora que se han liofilizado.

45 La conjugación del polisacárido activado del serotipo 22F con una proteína portadora mediante aminación reductora en dimetilsulfóxido (DMSO) es adecuada para conservar el contenido de O-acetilo del polisacárido en comparación, por ejemplo, con la aminación reductora en fase acuosa, en la que el nivel de O-acetilación del polisacárido puede reducirse significativamente. Por lo tanto, en una realización preferida, la etapa (c) y la etapa (d) se llevan a cabo en DMSO.

50 En una realización, el agente reductor es cianoborohidruro de sodio, triacetoxiborohidruro de sodio, borohidruro de sodio o de cinc en presencia de ácidos de Bronsted o Lewis, boranos de amina, tales como borano de piridina, borano de 2-picolina, 2,6-diborano-metanol, dimetilamina-borano, t-BuMePrN-BH<sub>3</sub>, bencilamina-BH<sub>3</sub> o borano de 5-etil-2-metilpiridina (PEMB). En una realización preferida, el agente reductor es cianoborohidruro de sodio.

55 Al final de la reacción de reducción, pueden quedar grupos aldehído sin reaccionar en los conjugados, estos pueden

protegerse usando un agente de protección adecuado. En una realización, este agente de protección es borohidruro de sodio (NaBH<sub>4</sub>).

5 Después de la conjugación del polisacárido del serotipo 22F con la proteína portadora, el glucoconjugado puede purificarse (enriquecerse con respecto a la cantidad de conjugado de polisacárido-proteína) mediante diversas técnicas conocidas por el experto. Estas técnicas incluyen diálisis, operaciones de concentración/diafiltración, precipitación/elución por filtración de flujo tangencial, cromatografía en columna (DEAE o cromatografía de interacción hidrófoba) y filtración de profundidad.

10 En algunas realizaciones, los glucoconjugados del serotipo 22F de la presente invención comprenden un sacárido que tiene un peso molecular de entre 10 kDa y 2.000 kDa. En otras realizaciones de este tipo, el sacárido tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 1.000 kDa. En otras realizaciones de este tipo, el sacárido tiene un peso molecular de entre 70 kDa y 900 kDa. En otras realizaciones de este tipo, el sacárido tiene un peso molecular de entre 100 kDa y 800 kDa. En otras realizaciones de este tipo, el sacárido tiene un peso molecular de entre 200 kDa y 600 kDa. En realizaciones adicionales de este tipo, el sacárido tiene un peso molecular de 100 kDa a 1.000 kDa; de 100 kDa a 900 kDa; de 100 kDa a 800 kDa; de 100 kDa a 700 kDa; de 100 kDa a 600 kDa; de 100 kDa a 500 kDa; de 100 kDa a 400 kDa; de 100 kDa a 300 kDa; de 150 kDa a 1.000 kDa; de 150 kDa a 900 kDa; de 150 kDa a 800 kDa; de 150 kDa a 700 kDa; de 150 kDa a 600 kDa; de 150 kDa a 500 kDa; de 150 kDa a 400 kDa; de 150 kDa a 300 kDa; de 200 kDa a 1.000 kDa; de 200 kDa a 900 kDa; de 200 kDa a 800 kDa; de 200 kDa a 700 kDa; de 200 kDa a 600 kDa; de 200 kDa a 500 kDa; de 200 kDa a 400 kDa; de 200 kDa a 300 kDa; de 250 kDa a 1.000 kDa; de 250 kDa a 900 kDa; de 250 kDa a 800 kDa; de 250 kDa a 700 kDa; de 250 kDa a 600 kDa; de 250 kDa a 500 kDa; de 250 kDa a 400 kDa; de 250 kDa a 350 kDa; de 300 kDa a 1000 kDa; de 300 kDa a 900 kDa; de 300 kDa a 800 kDa; de 300 kDa a 700 kDa; de 300 kDa a 600 kDa; de 300 kDa a 500 kDa; de 300 kDa a 400 kDa; de 400 kDa a 1.000 kDa; de 400 kDa a 900 kDa; de 400 kDa a 800 kDa; de 400 kDa a 700 kDa; de 400 kDa a 600 kDa; de 500 kDa a 600 kDa. Se contempla como una realización de la divulgación cualquier número entero dentro de cualquiera de los intervalos anteriores. En algunas realizaciones de este tipo, los glucoconjugados del serotipo 22F se preparan usando aminación reductora.

15 El glucoconjugado del serotipo 22F de la invención tiene un peso molecular de entre 1000 kDa y 12.500 kDa. En algunas realizaciones, el glucoconjugado del serotipo 22F tiene un peso molecular de entre 1000 kDa y 8.000 kDa. En otras realizaciones más, el glucoconjugado del serotipo 22F tiene un peso molecular de entre 2.000 kDa y 8.000 kDa o de entre 3.000 kDa y 7.000 kDa.

20 El peso molecular del glucoconjugado se mide mediante SEC-MALLS. Se contempla como una realización de la divulgación cualquier número entero dentro de cualquiera de los intervalos anteriores.

25 En una realización preferida, el glucoconjugado 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 glucoconjugado 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 glucoconjugado comprende al menos 0,6 mM de acetato por mM de polisacárido del serotipo 22F. En una realización preferida, el glucoconjugado comprende al menos 0,7 mM de acetato por mM de polisacárido del serotipo 22F.

30 En una realización preferida, la relación de mM de acetato por mM de polisacárido del serotipo 22F en el glucoconjugado a mM de acetato por mM de polisacárido del serotipo 22F en el polisacárido aislado es de al menos 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9 o 0,95. En una realización preferida, la relación de mM de acetato por mM de polisacárido del serotipo 22F en el glucoconjugado a mM de acetato por mM de polisacárido del serotipo 22F en el polisacárido aislado es de al menos 0,7. En una realización preferida, la relación de mM de acetato por mM de polisacárido del serotipo 22F en el glucoconjugado a mM de acetato por mM de polisacárido del serotipo 22F en el polisacárido aislado es de al menos 0,9.

35 En una realización preferida, la relación de mM de acetato por mM de polisacárido del serotipo 22F en el glucoconjugado a mM de acetato por mM de polisacárido del serotipo 22F en el polisacárido activado es de al menos 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9 o 0,95. En una realización preferida, a relación de mM de acetato por mM de polisacárido del serotipo 22F en el glucoconjugado a mM de acetato por mM de polisacárido del serotipo 22F en el polisacárido activado es de al menos 0,7. En una realización preferida, a relación de mM de acetato por mM de polisacárido del serotipo 22F en el glucoconjugado a mM de acetato por mM de polisacárido del serotipo 22F en el polisacárido activado es de al menos 0,9.

40 Otra forma de caracterizar los glucoconjugados del serotipo 22F de la invención es por el número de restos de lisina en la proteína portadora (es decir, CRM<sub>197</sub>) que se conjugan al sacárido que se puede caracterizar como un intervalo de lisinas conjugadas (grado de conjugación). La evidencia de la modificación con lisina de la proteína portadora, debido a los enlaces covalentes en los polisacáridos, puede obtenerse mediante análisis de aminoácidos usando procedimientos rutinarios conocidos por los expertos en la materia. La conjugación da como resultado una reducción en el número de restos de lisina abarcados en comparación con el material de partida de proteína CRM<sub>197</sub> usado para generar los materiales conjugados. En una realización preferida, el grado de conjugación del glucoconjugado del serotipo 22F de la invención es de entre 2 y 15, entre 2 y 13, entre 2 y 10, entre 2 y 8, entre 2 y 6, entre 2 y 5,

entre 2 y 4, entre 3 y 15, entre 3 y 13, entre 3 y 10, entre 3 y 8, entre 3 y 6, entre 3 y 5, entre 3 y 4, entre 5 y 15, entre 5 y 10, entre 8 y 15, entre 8 y 12, entre 10 y 15 o entre 10 y 12. En una realización, el grado de conjugación del glucoconjugado del serotipo 22F 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 glucoconjugado del serotipo 22F de la invención es de entre 4 y 7. Los glucoconjugados del serotipo 22F de la invención también pueden caracterizarse por la relación (peso/peso) de sacárido a proteína portadora. La relación del polisacárido del serotipo 22F a la proteína portadora en el glucoconjugado (p/p) es de entre 0,8 y 1,2. En una realización preferida, la relación del polisacárido capsular del serotipo 22F a la proteína portadora en el conjugado es de entre 0,9 y 1,1.

Los glucoconjugados del serotipo 22F y las composiciones inmunogénicas de la invención pueden contener sacárido libre que no está conjugado covalentemente a la proteína portadora, pero, sin embargo, está presente en la composición del glucoconjugado. El sacárido libre puede estar asociado no covalentemente con (es decir, unido no covalentemente a, adsorbido a o atrapado en o con) el glucoconjugado.

En una realización preferida, el glucoconjugado del serotipo 22F comprende menos de aproximadamente un 50 %, 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 % o 15 % de polisacárido del serotipo 22F en comparación con la cantidad total de polisacárido del serotipo 22F. En una realización, el glucoconjugado del serotipo 22F comprende menos de aproximadamente un 40 % de polisacárido del serotipo 22F libre en comparación con la cantidad total de polisacárido del serotipo 22F. En una realización, el glucoconjugado del serotipo 22F comprende menos de aproximadamente un 25 % de polisacárido del serotipo 22F libre en comparación con la cantidad total de polisacárido del serotipo 22F. En una realización, el glucoconjugado del serotipo 22F comprende menos de aproximadamente un 20 % de polisacárido del serotipo 22F libre en comparación con la cantidad total de polisacárido del serotipo 22F. En una realización, el glucoconjugado del serotipo 22F comprende menos de aproximadamente un 15 % de polisacárido del serotipo 22F libre en comparación con la cantidad total de polisacárido del serotipo 22F.

Los glucoconjugados del serotipo 22F también pueden caracterizarse por su distribución de tamaño molecular ( $K_d$ ). Pueden usarse medios de cromatografía de exclusión por tamaños (CL-4B) para determinar la distribución relativa de tamaños moleculares del conjugado. La cromatografía de exclusión por tamaños (SEC) se usa en columnas alimentadas por gravedad para elaborar perfiles de la distribución de tamaños moleculares de los conjugados. Las moléculas grandes excluidas de los poros en los medios se eluyen más rápidamente que las moléculas pequeñas. Se usan colectores de fracciones para recoger el eluato de la columna. Las fracciones se evalúan colorimétricamente mediante un ensayo de sacáridos. Para la determinación de la  $K_d$ , las columnas se calibran para establecer la fracción en la que las moléculas se excluyen por completo ( $V_0$ ), ( $K_d=0$ ) y la fracción que representa la máxima retención ( $V_i$ ), ( $K_d=1$ ). La fracción en la que se alcanza un atributo de la muestra especificado ( $V_e$ ), se relaciona con  $K_d$  mediante la expresión,  $K_d = (V_e - V_0) / (V_i - V_0)$ .

En una realización preferida, al menos un 30 % del glucoconjugado del serotipo 22F tiene una  $K_d$  menor o igual a 0,3 en una columna CL-4B. En una realización preferida, al menos un 40 % del glucoconjugado tiene una  $K_d$  menor o igual a 0,3 en una columna CL-4B. En una realización preferida, al menos un 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 % u 85 % del glucoconjugado del serotipo 22F tiene una  $K_d$  menor o igual a 0,3 en una columna CL-4B. En una realización preferida, al menos un 60 % del glucoconjugado del serotipo 22F tiene una  $K_d$  menor o igual a 0,3 en una columna CL-4B. En una realización preferida, entre un 50 % y un 80 % del glucoconjugado del serotipo 22F tiene una  $K_d$  menor o igual a 0,3 en una columna CL-4B. En una realización preferida, entre un 65 % y un 80 % del glucoconjugado del serotipo 22F tiene una  $K_d$  menor o igual a 0,3 en una columna CL-4B.

### 1.3.3 Glucoconjugados del serotipo 33F de *S. pneumoniae* de las composiciones inmunogénicas de la invención

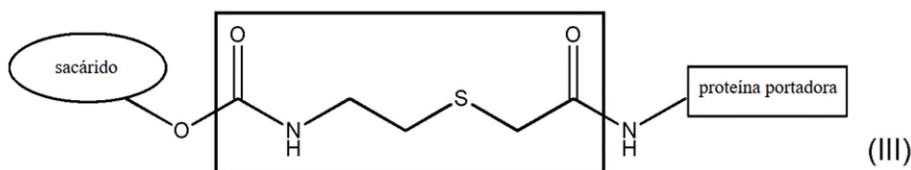
En una realización, los glucoconjugados del serotipo 33F se obtienen activando el polisacárido con tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino piridinio (CDAP) para formar un éster de cianato. El polisacárido activado puede acoplarse directamente o mediante un grupo espaciador (enlazador) a un grupo amino en la proteína portadora. Por ejemplo, el espaciador puede ser cistamida o cisteamida 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 con maleimida (por ejemplo, usando GMBS) o una proteína portadora haloacetilada (por ejemplo, usando yodoacetimida, SIB, SIAB, sulfo-SIAB, SIA o SBAP). Preferentemente, el éster de cianato (opcionalmente preparado mediante química de CDAP) se acopla con hexano diamina o dihidrazida del ácido adípico (ADH) y el sacárido derivatizado con amino se conjuga a la proteína portadora usando química de carbodiimida (por ejemplo, EDAC o EDC) a través de un grupo carboxilo en la proteína portadora. Dichos conjugados se describen, por ejemplo, en los documentos WO 93/15760, WO 95/08348 y WO 96/129094.

Otras técnicas adecuadas usan carbodiimidias, hidrazidas, ésteres activos, norborano, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S--NHS, EDC, TSTU. Muchas se describen en la Publicación de Solicitud Internacional de Patente n.º WO 98/42721. La conjugación puede implicar un enlazador de carbonilo que puede formarse mediante reacción de un grupo hidroxilo libre del sacárido con CDI (véase Bethell y col. (1979) J. Biol. Chem. 254:2572-2574;

Hearn y col. (1981) J. Chromatogr. 218:509-518) seguido 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 ciertas realizaciones, los glucoconjugados del serotipo 33F de la invención se preparan usando aminación reductora. En dicha realización, los glucoconjugados del serotipo 33F de la invención pueden prepararse usando aminación reductora en fase acuosa (RAC/acuoso). La aminación reductora en fase acuosa se ha aplicado exitosamente para producir vacuna antineumocócica conjugada (véase, por ejemplo, el documento WO 2006/110381). Sin embargo, preferentemente, cuando se usa aminación reductora, los glucoconjugados del serotipo 33F se preparan mediante aminación reductora en DMSO (RAC/DMSO). En vista de las dificultades asociadas con la conservación de la funcionalidad O-acetilo usando un procedimiento RAC/acuoso, se prefiere la aminación reductora en DMSO. Se ha aplicado con éxito RAC/DMSO para producir vacuna antineumocócica conjugada (véase, por ejemplo, el documento WO 2006/110381).

En realizaciones preferidas, los glucoconjugados del serotipo 33F de la invención se preparan usando conjugación de eTEC (en lo sucesivo en el presente documento, "glucoconjugados del serotipo 33F enlazados mediante eTEC"), tal como se describe en los ejemplos 1, 2 y 3 y en el documento WO 2014/027302. Dichos glucoconjugados de 33F comprenden un sacárido conjugado covalentemente a una proteína portadora mediante uno o más espaciadores de eTEC, en los que el sacárido se conjuga covalentemente al espaciador de eTEC mediante un enlace carbamato y en los que la proteína portadora se conjuga covalentemente al espaciador de eTEC mediante un enlace amida. Los glucoconjugados enlazados con eTEC de la invención pueden representarse mediante la fórmula general (III):



en la que los átomos que comprenden el espaciador de eTEC están contenidos en la caja central.

El espaciador de 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 glucoconjugado enlazado con 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 sal de las mismas, formando un enlace carbamato con el sacárido para proporcionar un sacárido tiolado. La generación de uno o más grupos sulfhidrilo libres se realiza mediante reacción con un agente reductor para proporcionar un sacárido tiolado activo. La reacción de los grupos sulfhidrilo libres del sacárido tiolado activo con una proteína portadora activa que tiene uno o más grupos  $\alpha$ -haloacetamida en restos que contienen amina genera un enlace tioéter para formar el conjugado, en el que la proteína portadora se une al espaciador de eTEC mediante un enlace de amida.

En los glucoconjugados del serotipo 33F de la invención, el sacárido puede ser un polisacárido o un oligosacárido. La proteína portadora puede seleccionarse entre cualquier portador adecuado descrito en el presente documento o conocido por los expertos en la materia. En realizaciones frecuentes, el sacárido es un polisacárido. En algunas realizaciones de este tipo, la proteína portadora es CRM<sub>197</sub>. En algunas realizaciones de este tipo, el glucoconjugado enlazado con eTEC comprende un polisacárido capsular del serotipo 33F de *S. pneumoniae*.

En realizaciones particularmente preferidas, el glucoconjugado enlazado con eTEC comprende un polisacárido capsular de Pn-33F, que está conjugado covalentemente a CRM<sub>197</sub> a través de un enlazador de eTEC (glucoconjugados del serotipo 33F enlazados con eTEC).

En algunas realizaciones, los glucoconjugados del serotipo 33F de la presente invención comprenden un sacárido que tiene un peso molecular de entre 10 kDa y 2.000 kDa. En otras realizaciones de este tipo, el sacárido tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 2.000 kDa. En realizaciones adicionales de este tipo, el sacárido tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 1.750 kDa; entre 50 kDa y 1.500 kDa; entre 50 kDa y 1.250 kDa; entre 50 kDa y 1.000 kDa; entre 50 kDa y 750 kDa; entre 50 kDa y 500 kDa; entre 100 kDa y 2.000 kDa; entre 100 kDa y 1.750 kDa; entre 100 kDa y 1.500 kDa; entre 100 kDa y 1.250 kDa; entre 100 kDa y 1.000 kDa; entre 100 kDa y 750 kDa; entre 100 kDa y 500 kDa; entre 200 kDa y 2.000 kDa; entre 200 kDa y 1.750 kDa; entre 200 kDa y 1.500 kDa; entre 200 kDa y 1.250 kDa; entre 200 kDa y 1.000 kDa; entre 200 kDa y 750 kDa; o entre 200 kDa y 500 kDa. Se contempla como una realización de la divulgación cualquier número entero dentro de cualquiera de los intervalos anteriores.

En algunas realizaciones, el glucoconjugado del serotipo 33F de la invención tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 20.000 kDa. En otras realizaciones, el glucoconjugado del serotipo 33F tiene un peso molecular de entre 500

kDa y 10.000 kDa. En otras realizaciones, el glucoconjugado del serotipo 33F tiene un peso molecular de entre 200 kDa y 10.000 kDa. En otras realizaciones más, el glucoconjugado del serotipo 33F tiene un peso molecular de entre 1000 kDa y 3.000 kDa.

5 En realizaciones adicionales, el glucoconjugado del serotipo 33F 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 7.500 kDa; entre 200 kDa y 5.000 kDa; entre 200 kDa y 3.000 kDa; entre 200 kDa y 1.000 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; entre 2.000 kDa y 3.000 kDa; entre 3.000 kDa y 20.000 kDa; entre 3.000 kDa y 15.000 kDa; entre 3.000 kDa y 12.500 kDa; entre 3.000 kDa y 10.000 kDa; entre 3.000 kDa y 9.000 kDa; entre 3.000 kDa y 8.000 kDa; entre 3.000 kDa y 7.000 kDa; entre 3.000 kDa y 6.000 kDa; entre 3.000 kDa y 5.000 kDa o entre 3.000 kDa y 4.000 kDa. Se contempla como una realización de la divulgación cualquier número entero dentro de cualquiera de los intervalos anteriores.

Otra forma de caracterizar los glucoconjugados del serotipo 33F de la invención es por el número de restos de lisina en la proteína portadora (por ejemplo, CRM<sub>197</sub>) que se conjugan al sacárido, que pueden caracterizarse como un intervalo de lisinas conjugadas (grado de conjugación).

25 En una realización preferida, el grado de conjugación del glucoconjugado del serotipo 33F de la invención es de entre 2 y 20, entre 4 y 16, 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 glucoconjugado del serotipo 33F 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, aproximadamente 15, aproximadamente 16, aproximadamente 17, aproximadamente 18, aproximadamente 19 o aproximadamente 20. En una realización preferida, el grado de conjugación del glucoconjugado del serotipo 33F de la invención es de entre 4 y 16. En algunas realizaciones de este tipo, la proteína portadora es CRM<sub>197</sub>.

35 En una realización preferida, la proteína portadora comprende CRM<sub>197</sub>, que contiene 39 restos de lisina. En algunas realizaciones de este tipo, la CRM<sub>197</sub> puede comprender de 4 a 16 restos de lisina de los 39 unidos covalentemente al sacárido. Otro modo de expresar este parámetro es que de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 41 % de las lisinas de CRM<sub>197</sub> están enlazadas covalentemente al sacárido. En otra realización de este tipo, la CRM<sub>197</sub> puede comprender de 2 a 20 restos de lisina de los 39 unidos covalentemente al sacárido. Otro modo de expresar este parámetro es que de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 50 % de las lisinas de CRM<sub>197</sub> están enlazadas covalentemente al sacárido. En algunas realizaciones, la CRM<sub>197</sub> puede comprender aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 11, aproximadamente 12, aproximadamente 13, aproximadamente 14, aproximadamente 15 o aproximadamente 16 restos de lisina de los 39 ligados covalentemente al sacárido.

45 En realizaciones frecuentes, la proteína portadora está conjugada covalentemente a un espaciador de eTEC a través de un enlace de amida a uno o más grupos ε-amino de los restos de lisina en la proteína portadora. En algunas realizaciones de este tipo, la proteína portadora comprende de 2 a 20 restos de lisina conjugados de manera covalente con el sacárido. En otras realizaciones de este tipo, la proteína portadora comprende de 4 a 16 restos de lisina conjugados de manera covalente con el sacárido.

50 Los glucoconjugados del serotipo 33F de la invención también pueden caracterizarse por la relación (peso/peso) de sacárido a proteína portadora. En algunas realizaciones, la relación de sacárido a proteína portadora (p/p) es de entre 0,2 y 4,0 (por ejemplo, aproximadamente 0,2, aproximadamente 0,3, aproximadamente 0,4, 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, aproximadamente 3,0, aproximadamente 3,1, aproximadamente 3,2, aproximadamente 3,3, aproximadamente 3,4, aproximadamente 3,5, aproximadamente 3,6, aproximadamente 3,7, aproximadamente 3,8, aproximadamente 3,9 o aproximadamente 4,0). En otras realizaciones, la relación de sacárido a proteína portadora (p/p) es de entre 1,0 y 2,5. En realizaciones adicionales, la relación de sacárido a proteína portadora (p/p) es de entre 0,4 y 1,7. En algunas realizaciones de este

tipo, la proteína portadora es CRM<sub>197</sub>.

La frecuencia de unión de la cadena de sacárido a una lisina en la proteína portadora es otro parámetro para caracterizar los glucoconjugados del serotipo 33F de la invención. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se produce al menos un enlace covalente entre la proteína portadora y el polisacárido por cada 4 unidades de repetición de sacárido del polisacárido. En otra realización, el enlace covalente entre la proteína portadora y el polisacárido se produce al menos una vez en cada 10 unidades de repetición de sacárido del polisacárido. En otra realización, el enlace covalente entre la proteína portadora y el polisacárido se produce al menos una vez en cada 15 unidades de repetición de sacárido del polisacárido. En una realización adicional, el enlace covalente entre la proteína portadora y el polisacárido se produce al menos una vez en cada 25 unidades de repetición de sacárido del polisacárido.

- 5
- 10 En realizaciones frecuentes, la proteína portadora es CRM<sub>197</sub> y el enlace covalente a través de un espaciador de eTEC entre la CRM<sub>197</sub> y el polisacárido se produce al menos una vez cada 4, 10, 15 o 25 unidades de repetición de sacárido del polisacárido.

- 15 En otras realizaciones, el conjugado comprende al menos un enlace covalente entre la proteína portadora y el polisacárido por cada 5 o 10 unidades de repetición; 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; cada 4 a 25 unidades de repetición de sacárido o cada 2 a 25 unidades de repetición de sacárido. En realizaciones frecuentes, la proteína portadora es CRM<sub>197</sub>.

- 20
- 25 En otra realización, se produce al menos un enlace entre la proteína portadora 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 CRM<sub>197</sub>. Se contempla como una realización de la divulgación cualquier número entero dentro de cualquiera de los intervalos anteriores.

- 30 Una consideración importante durante la conjugación es el desarrollo de condiciones que permitan la conservación de grupos funcionales de sustituyentes no sacáridos potencialmente sensibles de los componentes individuales, tales como cadenas laterales de O-acilo, fosfato o glicerol fosfato que pueden formar parte del epítipo del sacárido.

- 35 En una realización, los glucoconjugados del serotipo 33F de la invención comprenden un sacárido que tiene un grado de O-acetilación de entre un 10 % y un 100 %. En algunas realizaciones de este tipo, el sacárido tiene un grado de O-acetilación de entre un 50 % y un 100 %. En otras realizaciones de este tipo, el sacárido tiene un grado de O-acetilación de entre un 75 % y un 100 %. En realizaciones adicionales, el sacárido tiene un grado de O-acetilación mayor que o igual a un 70 % ( $\geq 70\%$ ).

- 40 En una realización preferida, el glucoconjugado 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 glucoconjugado 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 glucoconjugado comprende al menos 0,6 mM de acetato por mM de polisacárido capsular del serotipo 33F. En una realización preferida, el glucoconjugado comprende al menos 0,7 mM de acetato por mM de polisacárido capsular del serotipo 33F. En una realización preferida, se determina la presencia de grupos O-acetilo mediante análisis de HPLC de iones.

- 45 En una realización preferida, la relación de mM de acetato por mM de polisacárido del serotipo 33F en el glucoconjugado a mM de acetato por mM de polisacárido del serotipo 33F en el polisacárido aislado es de al menos 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9 o 0,95. En una realización preferida, la relación de mM de acetato por mM de polisacárido del serotipo 33F en el glucoconjugado a mM de acetato por mM de polisacárido del serotipo 33F en el polisacárido aislado es de al menos 0,7. En una realización preferida, la relación de mM de acetato por mM de polisacárido del serotipo 33F en el glucoconjugado a mM de acetato por mM de polisacárido del serotipo 33F en el polisacárido aislado es de al menos 0,9.

- 50 En una realización preferida, la relación de mM de acetato por mM de polisacárido del serotipo 33F en el glucoconjugado a mM de acetato por mM de polisacárido del serotipo 33F en el polisacárido activado es de al menos 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9 o 0,95. En una realización preferida, a relación de mM de acetato por mM de polisacárido del serotipo 33F en el glucoconjugado a mM de acetato por mM de polisacárido del serotipo 33F en el polisacárido activado es de al menos 0,7. En una realización preferida, a relación de mM de acetato por mM de polisacárido del serotipo 33F en el glucoconjugado a mM de acetato por mM de polisacárido del serotipo 33F en el polisacárido activado es de al menos 0,9.

Los glucoconjugados del serotipo 33F y las composiciones inmunogénicas de la invención pueden contener sacárido libre que no está conjugado covalentemente a la proteína portadora, pero, sin embargo, está presente en la

composición del glucoconjugado. El sacárido libre puede estar asociado no covalentemente con (es decir, unido no covalentemente a, adsorbido a o atrapado en o con) el glucoconjugado.

En algunas realizaciones, los glucoconjugados del serotipo 33F de la invención comprenden menos de aproximadamente un 50 %, 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o 5 % de polisacárido del serotipo 33F en comparación con la cantidad total de polisacárido del serotipo 33F. Preferentemente, el glucoconjugado del serotipo 33F comprende menos de un 15 % de sacárido libre, más preferentemente, menos de un 10 % de sacárido libre y aún más preferentemente, menos de un 5 % de sacárido libre. En una realización, el glucoconjugado del serotipo 33F comprende menos de aproximadamente un 25 % de polisacárido del serotipo 33F libre en comparación con la cantidad total de polisacárido del serotipo 33F. En una realización, el glucoconjugado del serotipo 33F comprende menos de aproximadamente un 20 % de polisacárido del serotipo 33F libre en comparación con la cantidad total de polisacárido del serotipo 33F. En una realización, el glucoconjugado del serotipo 33F comprende menos de aproximadamente un 15 % de polisacárido del serotipo 33F libre en comparación con la cantidad total de polisacárido del serotipo 33F.

En ciertas realizaciones preferidas, la invención proporciona un glucoconjugado del serotipo 33F que tiene una o más de las siguientes características solas o en combinación: el polisacárido tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 2.000 kDa; el glucoconjugado tiene un peso molecular de entre 500 kDa y 10.000 kDa; la proteína portadora comprende de 2 a 20 restos de lisina enlazados de manera covalente al sacárido; la relación de sacárido a proteína portadora (p/p) es de entre 0,2 y 4,0; el glucoconjugado comprende al menos un enlace covalente entre la proteína portadora y el polisacárido por cada 4, 10, 15 o 25 unidades de repetición de sacárido del polisacárido; el sacárido tiene un grado de O-acetilación de entre un 75 % y un 100 %; el conjugado comprende menos de aproximadamente un 15 % de polisacárido libre en relación con el polisacárido total; la proteína portadora es CRM197.

Los glucoconjugados del serotipo 33F también pueden caracterizarse por su distribución de tamaño molecular ( $K_d$ ). Pueden usarse medios de cromatografía de exclusión por tamaños (CL-4B) para determinar la distribución relativa de tamaños moleculares del conjugado, como se ha mencionado anteriormente.

En una realización, al menos un 15 % de los glucoconjugados del serotipo 33F de la invención tiene una  $K_d$  menor o igual a 0,3 en una columna CL-4B. En una realización, al menos un 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % de los glucoconjugados del serotipo 33F de la invención tiene una  $K_d$  menor o igual a 0,3 en una columna CL-4B.

En una realización preferida, al menos un 35 % de los glucoconjugados del serotipo 33F de la invención tiene una  $K_d$  menor o igual a 0,3 en una columna CL-4B. En realizaciones preferidas, al menos un 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 % u 85 % de los glucoconjugados del serotipo 33F de la invención tiene una  $K_d$  menor o igual a 0,3 en una columna CL-4B. En una realización preferida, al menos un 60 % de los glucoconjugados del serotipo 33F de la invención tiene una  $K_d$  menor o igual a 0,3 en una columna CL-4B. En una realización preferida, al menos un 70 % de los glucoconjugados del serotipo 33F de la invención tiene una  $K_d$  menor o igual a 0,3 en una columna CL-4B.

En una realización preferida, entre un 40 % y un 90 % de los glucoconjugados del serotipo 33F tiene una  $K_d$  menor o igual a 0,3 en una columna CL-4B. En una realización preferida, entre un 50 % y un 90 % de los glucoconjugados del serotipo 33F tiene una  $K_d$  menor o igual a 0,3 en una columna CL-4B. En una realización preferida, entre un 65 % y un 80 % de los glucoconjugados del serotipo 33F tiene una  $K_d$  menor o igual a 0,3 en una columna CL-4B.

#### 1.3.4 Glucoconjugados del serotipo 15B de *S. pneumoniae* de las composiciones inmunogénicas de la invención

En una realización, los glucoconjugados del serotipo 15B se obtienen activando el polisacárido con tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino piridinio (CDAP) para formar un éster de cianato. El polisacárido activado puede acoplarse directamente o mediante un grupo espaciador (enlazador) a un grupo amino en la proteína portadora. Por ejemplo, el espaciador puede ser cistamida o cisteamida 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 con maleimida (por ejemplo, usando GMBS) o una proteína portadora haloacetilada (por ejemplo, usando yodoacetimida, SIB, SIAB, sulfo-SIAB, SIA o SBAP). Preferentemente, el éster de cianato (opcionalmente preparado mediante química de CDAP) se acopla con hexano diamina o dihidrazida del ácido adípico (ADH) y el sacárido derivatizado con amino se conjuga a la proteína portadora usando química de carbodiimida (por ejemplo, EDAC o EDC) a través de un grupo carboxilo en la proteína portadora. Dichos conjugados se describen, por ejemplo, en los documentos WO 93/15760, WO 95/08348 y WO 96/129094.

Otras técnicas adecuadas usan carbodiimidias, hidrazidas, ésteres activos, norborano, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S--NHS, EDC, TSTU. Muchas se describen en la Publicación de Solicitud Internacional de Patente n.º WO 98/42721. La conjugación puede implicar un enlazador de carbonilo que puede formarse mediante reacción de un grupo hidroxilo libre del sacárido con CDI (véase Bethell y col. (1979) J. Biol. Chem. 254:2572-2574; Hearn y col. (1981) J. Chromatogr. 218:509-518) seguido 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.

5 En realizaciones preferidas, los glucoconjugados del serotipo 15B de la invención se preparan usando aminación reductora. La aminación reductora implica dos etapas, (1) oxidación del polisacárido para generar funcionalidades aldehído a partir de los dioles vecinos en la unidad de hexasacárido individual, (2) reducción del polisacárido activado y una proteína portadora para formar un conjugado.

10 Preferentemente, antes de la oxidación, se lleva a cabo la separación por tamaños del polisacárido del serotipo 15B hasta un peso molecular diana (PM). Ventajosamente, el tamaño del polisacárido del serotipo 15B se reduce a la vez que se preservan características críticas de la estructura del polisacárido, tales como, por ejemplo, la presencia de grupos O-acetilo. Preferentemente, el tamaño del polisacárido purificado del serotipo 15B se reduce mediante homogeneización mecánica (véase la sección 1.2.6 anterior).

15 La etapa de oxidación puede implicar la reacción con peryodato. A efectos de la presente invención, el término "peryodato" incluye tanto peryodato como ácido peryódico; el término también incluye tanto metaperyodato ( $\text{IO}_4^-$ ) como ortoperyodato ( $\text{IO}_6^{5-}$ ) y las diversas sales de peryodato (por ejemplo, peryodato de sodio y peryodato de potasio). En una realización preferida, el peryodato usado para la oxidación del polisacárido capsular del serotipo 15B es metaperyodato. En una realización preferida, el peryodato usado para la oxidación del polisacárido capsular del serotipo 15B es metaperyodato de sodio.

20 En una realización preferida, el polisacárido se ha reaccionar con de 0,01 a 10,0, de 0,05 a 5,0, de 0,1 a 1,0, de 0,5 a 1,0, de 0,7 a 0,8, de 0,05 a 0,5, de 0,1 a 0,3 equivalentes molares de agente oxidante. En una realización preferida, se hace reaccionar el polisacárido con aproximadamente 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,35, 0,4, 0,45, 0,5, 0,55, 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9, 0,95 equivalentes molares de agente oxidante. En una realización preferida, se hace reaccionar el polisacárido con aproximadamente 0,15 equivalentes molares de agente oxidante. En una realización preferida, se hace reaccionar el polisacárido con aproximadamente 0,25 equivalentes molares de agente oxidante. En una realización preferida, se hace reaccionar el polisacárido con aproximadamente 0,5 equivalentes molares de agente oxidante. En una realización preferida, se hace reaccionar el polisacárido con aproximadamente 0,6 equivalentes molares de agente oxidante. En una realización preferida, se hace reaccionar el polisacárido con aproximadamente 0,7 equivalentes molares de agente oxidante.

30 En una realización preferida, la duración de la reacción es de entre 1 hora y 50 horas, entre 10 horas y 30 horas, entre 15 horas y 20 horas, entre 15 horas y 17 horas o aproximadamente 16 horas.

En una realización preferida, la temperatura de la reacción se mantiene entre 15 °C y 45 °C, entre 15 °C y 30 °C, entre 20 °C y 25 °C. En una realización preferida, la temperatura de la reacción se mantiene a aproximadamente 23 °C.

35 En una realización preferida, la reacción de oxidación se lleva a cabo en un tampón seleccionado entre fosfato de sodio, fosfato de potasio, ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES) o Bis-Tris. En una realización preferida, el tampón es fosfato de potasio.

En una realización preferida, el tampón tiene una concentración entre 1 mM y 500 mM, entre 1 mM y 300 mM o entre 50 mM y 200 mM. En una realización preferida, el tampón tiene una concentración de aproximadamente 100 mM.

40 En una realización preferida, la reacción de oxidación se lleva a cabo a un pH de entre 4,0 y 8,0, entre 5,0 y 7,0 o entre 5,5 y 6,5. En una realización preferida, el pH es de aproximadamente 6,0.

En una realización preferida, el polisacárido capsular activado del serotipo 15B se obtiene haciendo reaccionar de 0,5 mg/ml a 5 mg/ml de polisacárido capsular del serotipo 15B aislado con de 0,2 a 0,3 equivalentes molares de peryodato a una temperatura entre 20 °C y 25 °C.

45 En una realización preferida, el polisacárido capsular activado del serotipo 15B activado está purificado. El polisacárido capsular del serotipo 15B activado se purifica de acuerdo con procedimientos conocidos por el experto en la materia, tales como cromatografía de permeación en gel (GPC), diálisis o ultrafiltración/diafiltración. Por ejemplo, el polisacárido capsular activado se purifica mediante concentración y diafiltración usando un dispositivo de ultrafiltración.

50 En una realización preferida, el grado de oxidación del polisacárido capsular del serotipo 15B activado es de entre 2 y 20, entre 2 y 15, entre 2 y 10, entre 2 y 5, entre 5 y 20, entre 5 y 15, entre 5 y 10, entre 10 y 20, entre 10 y 15 o entre 15 y 20. En una realización preferida, el grado de oxidación del polisacárido capsular del serotipo 15B activado es de entre 2 y 10, entre 4 y 8, entre 4 y 6, entre 6 y 8, entre 6 y 12, entre 8 y 12, entre 9 y 11, entre 10 y 16, entre 12 y 16, entre 14 y 18, entre 16 y 20, entre 16 y 18 o entre 18 y 20.

55 En una realización preferida, el polisacárido capsular del serotipo 15B activado tiene un peso molecular de entre 5 kDa y 500 kDa, entre 50 kDa y 500 kDa, entre 50 kDa y 450 kDa, entre 100 kDa y 400 kDa, entre 100 kDa y 350

kDa. En una realización preferida, el polisacárido capsular del serotipo 15B activado tiene un peso molecular de entre 100 kDa y 350 kDa. En una realización preferida, el polisacárido capsular del serotipo 15B activado tiene un peso molecular de entre 100 kDa y 300 kDa. En una realización preferida, el polisacárido capsular del serotipo 15B activado tiene un peso molecular de entre 100 kDa y 250 kDa.

5 En una realización preferida, el polisacárido capsular del serotipo 15B activado 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 dicho polisacárido capsular del serotipo 15B. En una realización preferida, el polisacárido capsular del serotipo 15B activado comprende al menos 0,5, 0,6 o 0,7 mM de acetato por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B. En una realización preferida, el polisacárido capsular del serotipo 15B activado comprende al menos 0,6 mM de acetato por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B. En una realización preferida, el polisacárido capsular del serotipo 15B activado comprende al menos 0,7 mM de acetato por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B.

15 En una realización preferida, el polisacárido capsular del serotipo 15B activado 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 dicho polisacárido capsular del serotipo 15B. En una realización preferida, el polisacárido capsular del serotipo 15B activado comprende al menos 0,5, 0,6 o 0,7 mM de glicerol por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B. En una realización preferida, el polisacárido capsular del serotipo 15B activado comprende al menos 0,6 mM de glicerol por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B. En una realización preferida, el polisacárido capsular del serotipo 15B activado comprende al menos 0,7 mM de glicerol por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B.

20 En una realización preferida, el polisacárido capsular del serotipo 15B activado tiene un peso molecular de entre 100 kDa y 250 kDa y comprende al menos 0,6 mM de acetato por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B.

En una realización preferida, el polisacárido capsular del serotipo 15B activado tiene un peso molecular de entre 100 kDa y 250 kDa y comprende al menos 0,6 mM de glicerol por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B.

25 En una realización preferida, el polisacárido capsular del serotipo 15B activado comprende al menos 0,6 mM de acetato por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B y al menos 0,6 mM de glicerol por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B.

En una realización preferida, el polisacárido capsular del serotipo 15B activado tiene un peso molecular de entre 100 kDa and 250 kDa y comprende al menos 0,6 mM de acetato por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B y al menos 0,6 mM de glicerol por mM de dicho polisacárido capsular del serotipo 15B.

30 En una realización, el polisacárido capsular del serotipo 15B activado está liofilizado, opcionalmente en presencia de sacárido. En una realización preferida, el sacárido se selecciona entre sacarosa, trehalosa, rafinosa, estaquiosa, melezitosa, dextrano, manitol, lactitol y Palatinit. En una realización preferida, el sacárido es sacarosa. El polisacárido capsular activado liofilizado puede combinarse posteriormente con una solución que comprende la proteína portadora.

35 En otra realización, el polisacárido capsular del serotipo 15B activado se combina con la proteína portadora y se liofiliza opcionalmente en presencia de un sacárido. En una realización preferida, el sacárido se selecciona entre sacarosa, trehalosa, rafinosa, estaquiosa, melezitosa, dextrano, manitol, lactitol y Palatinit. En una realización preferida, el sacárido es sacarosa. El polisacárido y la proteína portadora liofilizados juntos pueden resuspenderse posteriormente en solución y se hacen reaccionar con un agente reductor.

40 El polisacárido capsular del serotipo 15B activado puede conjugarse a una proteína portadora mediante un procedimiento que comprende la etapa de:

- (a) combinar el polisacárido capsular del serotipo 15B activado con una proteína portadora y
- (b) hacer reaccionar el polisacárido capsular del serotipo 15B activado combinado y la proteína portadora con un agente reductor para formar un conjugado de polisacárido capsular del serotipo 15B-proteína portadora.

45 La conjugación del polisacárido capsular del serotipo 15B activado con una proteína portadora mediante aminación reductora en dimetilsulfóxido (DMSO) es adecuada para conservar el contenido de O-acetilo del polisacárido en comparación, por ejemplo, con la aminación reductora en solución acuosa, en la que se reduce significativamente el nivel de O-acetilación del polisacárido. En una realización preferida, la etapa (a) y la etapa (b) se llevan a cabo en DMSO.

50 En una realización preferida, la etapa (a) comprende disolver el polisacárido capsular del serotipo 15B liofilizado en una solución que comprende una proteína portadora y DMSO. En una realización preferida, la etapa (a) comprende disolver el polisacárido capsular del serotipo 15B y la proteína portadora liofilizados juntos en DMSO.

55 Cuando las etapas (a) y (b) se llevan a cabo en solución acuosa, las etapas (a) y (b) se llevan a cabo en un tampón, seleccionado preferentemente entre PBS, MES, HEPES, Bis-tris, ADA, PIPES, MOPSO, BES, MOPS, DIPSO, MOBS, HEPPSO, POPSO, TEA, EPPS, Bicina o HEPB, a un pH entre 6,0 y 8,5, entre 7,0 y 8,0 o entre 7,0 y 7,5. En una realización preferida, el tampón es PBS. En una realización preferida, el pH es aproximadamente 7,3. En una

- 5 realización preferida, la concentración de polisacárido capsular del serotipo 15B activado en la etapa (b) es de entre 0,1 mg/ml y 10 mg/ml, entre 0,5 mg/ml y 5 mg/ml o entre 0,5 mg/ml y 2 mg/ml. En una realización preferida, la concentración del polisacárido capsular del serotipo 15B activado en la etapa (b) es aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9 o 3,0 mg/ml.
- En una realización preferida la relación de entrada inicial (en peso) de polisacárido capsular del serotipo 15B activado a proteína portadora es de entre 5:1 y 0,1:1, entre 2:1 y 0,1:1, entre 2:1 y 1:1, entre 1,5:1 y 1:1, entre 0,1:1 y 1:1, entre 0,3:1 y 1:1 o entre 0,6:1 y 1:1.
- 10 En una realización preferida la relación de entrada inicial de polisacárido capsular del serotipo 15B activado a proteína portadora es de aproximadamente 0,6:1 a 1:1. En otra realización preferida, la relación de entrada inicial de polisacárido capsular del serotipo 15B activado a proteína portadora es de aproximadamente 0,6:1 a 1,5:1. Dicha relación de entrada inicial es particularmente adecuada para obtener bajos niveles de polisacárido libre en el glucoconjugado.
- 15 En una realización preferida la relación de entrada inicial de polisacárido capsular del serotipo 15B activado a proteína portadora es aproximadamente 0,4:1, 0,5:1, 0,6:1, 0,7:1, 0,8:1, 0,9:1, 1:1, 1,1:1, 1,2:1, 1,3:1, 1,4:1, 1,5:1, 1,6:1, 1,7:1, 1,8:1, 1,9:1 o 2:1.
- 20 En una realización, el agente reductor es cianoborohidruro de sodio, triacetoxiborohidruro de sodio, borohidruro de sodio o de cinc en presencia de ácidos de Bronsted o Lewis, boranos de amina, tales como borano de piridina, borano de 2-picolina, 2,6-diborano-metanol, dimetilamina-borano, t-BuMeiPrN-BH<sub>3</sub>, bencilamina-BH<sub>3</sub> o borano de 5-etil-2-metilpiridina (PEMB). En una realización preferida, el agente reductor es cianoborohidruro de sodio. En una realización preferida, el agente reductor es 2-Picolina borano de sodio.
- 25 En una realización preferida, la cantidad de agente reductor usado en la etapa (b) es entre aproximadamente 0,1 y 10,0 equivalentes molares, entre 0,5 y 5,0 equivalentes molares o entre 1,0 y 2,0 equivalentes molares. En una realización preferida, la cantidad de agente reductor usado en la etapa (b) es aproximadamente 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 o 2,0 equivalentes molares.
- En una realización preferida, la duración de la etapa (b) es entre 1 hora y 60 horas, entre 10 horas y 50 horas, entre 40 horas y 50 horas o entre 42 horas y 46 horas. En una realización preferida, la duración de la etapa (b) es aproximadamente 44 horas.
- 30 En una realización preferida, la temperatura de la reacción en la etapa (b) se mantiene entre 10 °C y 40 °C, entre 15 °C y 30 °C o entre 20 °C y 26 °C. En una realización preferida, la temperatura de la reacción en la etapa (b) se mantiene a aproximadamente 23 °C.
- 35 En una realización preferida, el procedimiento para la preparación de un glucoconjugado que comprende polisacárido capsular del serotipo 15B de *S. pneumoniae* enlazado covalentemente a una proteína portadora comprende además una etapa (etapa (c)) de proteger el aldehído no reaccionado (inactivar) mediante la adición de NaBH<sub>4</sub>.
- En una realización preferida, la cantidad de NaBH<sub>4</sub> usada en la etapa (c) es entre 0,1 y 10 equivalentes molares, entre 0,5 y 5,0 equivalentes molares o entre 1,0 y 3,0 equivalentes molares. En una realización preferida, la cantidad de NaBH<sub>4</sub> usada en la etapa (c) es de aproximadamente 2 equivalentes molares.
- 40 En una realización preferida, la duración de la etapa (c) es entre 0,1 horas y 10 horas, 0,5 horas y 5 horas o entre 2 horas y 4 horas. En una realización preferida, la duración de la etapa (c) es aproximadamente 3 horas.
- En una realización preferida, la temperatura de la reacción en la etapa (c) se mantiene entre 15 °C y 45 °C, entre 15 °C y 30 °C o entre 20 °C y 26 °C. En una realización preferida, la temperatura de la reacción en la etapa (c) se mantiene a aproximadamente 23 °C.
- 45 En una realización preferida el rendimiento de la etapa de conjugación es mayor de un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 % o 90 %. En una realización preferida el rendimiento de la etapa de conjugación (etapa b) es mayor de un 60 %. En una realización preferida el rendimiento de la etapa de conjugación (etapa b) es mayor de un 70 %. El rendimiento es (la cantidad de polisacárido del serotipo 15B en el conjugado x100) / cantidad de polisacárido activado usado en la etapa de conjugación.
- 50 En una realización preferida, el procedimiento para la preparación de un glucoconjugado que comprende polisacárido capsular del serotipo 15B de *S. pneumoniae* enlazado covalentemente a una proteína portadora comprende las etapas de:
- (a) separar por tamaños el polisacárido del serotipo 15B purificado mediante homogeneización de alta presión;
  - (b) hacer reaccionar el polisacárido del serotipo 15B separado por tamaños con un agente oxidante;
  - (c) combinar el polisacárido activado del serotipo 15B con una proteína portadora;

- (d) hacer reaccionar el polisacárido activado del serotipo 15B combinado y la proteína portadora con un agente reductor para formar un conjugado de polisacárido del serotipo 15B-proteína portadora; y  
 (e) proteger el aldehído sin reaccionar (inactivar) mediante la adición de NaBH<sub>4</sub>.

5 En una realización preferida, el rendimiento de la etapa de conjugación (etapa d) del procedimiento anterior es mayor de un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 % o 90 %. En una realización preferida el rendimiento de la etapa de conjugación (step d) es mayor de un 60 %. En una realización preferida el rendimiento de la etapa de conjugación (step d) es mayor de un 70 %. El rendimiento es (la cantidad de polisacárido del serotipo 15B en el conjugado x100) / cantidad de polisacárido activado usado en la etapa de conjugación.

10 Después de la conjugación del polisacárido capsular del serotipo 15B a la proteína portadora, el conjugado de polisacárido-proteína puede purificarse (enriquecerse con respecto a la cantidad de conjugado de polisacárido-proteína) mediante diversas técnicas conocidas por el experto. Estas técnicas incluyen diálisis, operaciones de concentración/diafiltración, filtración de flujo tangencial, precipitación/elución, cromatografía en columna (DEAE o cromatografía de interacción hidrófoba) y filtración de profundidad.

15 En una realización, la proteína portadora es como se ha definido en la sección 1.1. En una realización, la proteína portadora se selecciona entre el grupo que consiste en: DT (toxina diftérica), TT (toxide tetánico), CRM<sub>197</sub>, otros mutantes de DT, PD (proteína D de *Haemophilus influenzae*) o equivalentes inmunológicamente funcionales de las mismas. En una realización, la proteína portadora es CRM<sub>197</sub>.

20 En algunas realizaciones, los glucoconjugados del serotipo 15B de la presente invención se conjugan a la proteína portadora (por ejemplo, CRM<sub>197</sub>) y comprenden un sacárido que tiene un peso molecular de entre 5 kDa y 1.500 kDa. En otras realizaciones de este tipo, el sacárido tiene un peso molecular de entre 10 kDa y 1.500 kDa. En realizaciones adicionales de este tipo, el sacárido tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 1.500 kDa; entre 50 kDa y 1.250 kDa; entre 50 kDa y 1.000 kDa; entre 50 kDa y 750 kDa; entre 50 kDa y 500 kDa; entre 50 kDa y 250 kDa; entre 100 kDa y 1.500 kDa; entre 100 kDa y 1.250 kDa; entre 100 kDa y 1.000 kDa; entre 100 kDa y 750 kDa; entre 100 kDa y 500 kDa; entre 100 kDa y 250 kDa; entre 200 kDa y 1.500 kDa; entre 200 kDa y 1.250 kDa; entre 200 kDa y 1.000 kDa; entre 200 kDa y 750 kDa; o entre 200 kDa y 500 kDa; o entre 200 kDa y 400 kDa. Se contempla como una realización de la divulgación cualquier número entero dentro de cualquiera de los intervalos anteriores. En algunas realizaciones, el glucoconjugado del serotipo 15B de la invención tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 20.000 kDa. En algunas realizaciones, el glucoconjugado del serotipo 15B de la invención tiene un peso molecular de entre 1.000 kDa y 20.000 kDa. En una realización preferida, el glucoconjugado del serotipo 15B de la invención tiene un peso molecular de entre 3.000 kDa y 20.000 kDa, entre 5.000 kDa y 10.000 kDa, entre 5.000 kDa y 20.000 kDa, entre 8.000 kDa y 20.000 kDa, entre 8.000 kDa y 16.000 kDa o entre 10.000 kDa y 16.000 kDa.

30 En realizaciones adicionales, el glucoconjugado del serotipo 15B de la invención tiene un peso molecular de aproximadamente 1.000 kDa, aproximadamente 1.500 kDa, aproximadamente 2.000 kDa, aproximadamente 2.500 kDa, aproximadamente 3.000 kDa, aproximadamente 3.500 kDa, aproximadamente 4.000 kDa, aproximadamente 4.500 kDa, aproximadamente 5.000 kDa, aproximadamente 5.500 kDa, aproximadamente 6.000 kDa, aproximadamente 6.500 kDa, aproximadamente 7.000 kDa, aproximadamente 7.500 kDa, aproximadamente 8.000 kDa, aproximadamente 8.500 kDa, aproximadamente 9.000 kDa, aproximadamente 9.500 kDa, aproximadamente 10.000 kDa, aproximadamente 10.500 kDa, aproximadamente 11.000 kDa, aproximadamente 11.500 kDa, aproximadamente 12.000 kDa, aproximadamente 12.500 kDa, aproximadamente 13.000 kDa, aproximadamente 13.500 kDa, aproximadamente 14.000 kDa, aproximadamente 14.500 kDa, aproximadamente 15.000 kDa, aproximadamente 15.500 kDa, aproximadamente 16.000 kDa, aproximadamente 16.500 kDa, aproximadamente 17.000 kDa, aproximadamente 17.500 kDa, aproximadamente 18.000 kDa, aproximadamente 18.500 kDa, aproximadamente 19.000 kDa, aproximadamente 19.500 kDa o aproximadamente 20.000 kDa.

45 En realizaciones adicionales, el glucoconjugado del serotipo 15B de la invención tiene un peso molecular de entre 1.000 kDa y 20.000 kDa; entre 1.000 kDa y 15.000 kDa; entre 1.000 kDa y 10.000 kDa; entre 1.000 kDa y 7.500 kDa; entre 1.000 kDa y 5.000 kDa; entre 1.000 kDa y 4.000 kDa; entre 1.000 kDa y 3.000 kDa; entre 2.000 kDa y 20.000 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.

50 En realizaciones adicionales, el glucoconjugado del serotipo 15B 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 3.000 kDa y 4.000 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. En realizaciones adicionales, el glucoconjugado del serotipo 15B 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 glucoconjugado se mide mediante SEC-MALLS. Se contempla como una realización de la divulgación cualquier número entero dentro de cualquiera de los intervalos anteriores. En una realización, dichos

glucoconjugados del serotipo 15B se preparan usando aminación reductora.

Los glucoconjugados del serotipo 15B de la invención también pueden caracterizarse por la relación (peso/peso) de sacárido a proteína portadora. En una realización preferida, la relación (en peso) del polisacárido capsular del serotipo 15B a la proteína portadora en el conjugado es de entre 0,5 y 3,0 (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 una realización preferida, la relación del polisacárido capsular del serotipo 15B a la proteína portadora en el conjugado es de entre 0,4 y 2. En una realización preferida, la relación de polisacárido capsular del serotipo 15B a proteína portadora en el conjugado es entre 0,5 y 2,0, 0,5 y 1,5, 0,5 y 1,0, 1,0 y 1,5, 1,0 y 2,0. En una realización preferida, la relación del polisacárido capsular del serotipo 15B a la proteína portadora en el conjugado es de entre 0,7 y 0,9. Los glucoconjugados del serotipo 15B y las composiciones inmunogénicas de la invención pueden contener sacárido libre que no está conjugado covalentemente a la proteína portadora, pero, sin embargo, está presente en la composición del glucoconjugado. El sacárido libre puede estar asociado no covalentemente con (es decir, unido no covalentemente a, adsorbido a o atrapado en o con) el glucoconjugado.

En una realización preferida, el glucoconjugado del serotipo 15B de la invención comprende menos de aproximadamente un 50 %, 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 % o 15 % de polisacárido capsular del serotipo 15B libre en comparación con la cantidad total de polisacárido capsular del serotipo 15B. En una realización preferida, el glucoconjugado del serotipo 15B de la invención comprende menos de aproximadamente un 25 % de polisacárido capsular del serotipo 15B libre en comparación con la cantidad total de polisacárido capsular del serotipo 15B. En una realización preferida, el glucoconjugado del serotipo 15B de la invención comprende menos de aproximadamente un 20 % de polisacárido capsular del serotipo 15B libre en comparación con la cantidad total de polisacárido capsular del serotipo 15B. En una realización preferida, los glucoconjugados del serotipo 15B de la invención comprende menos de aproximadamente un 15 % de polisacárido capsular del serotipo 15B libre en comparación con la cantidad total de polisacárido capsular del serotipo 15B.

Los glucoconjugados del serotipo 15B también pueden caracterizarse por su distribución de tamaño molecular ( $K_d$ ). Pueden usarse medios de cromatografía de exclusión por tamaños (CL-4B) para determinar la distribución relativa de tamaños moleculares del conjugado, como se ha mencionado anteriormente. En una realización preferida, al menos un 20 % de los glucoconjugados del serotipo 15B de la invención tiene una  $K_d$  menor o igual a 0,3 en una columna CL-4B. En una realización preferida, al menos un 30 % del conjugado inmunogénico tiene una  $K_d$  menor o igual a 0,3 en una columna CL-4B. En una realización preferida, al menos un 40 % de los glucoconjugados del serotipo 15B de la invención tiene una  $K_d$  menor o igual a 0,3 en una columna CL-4B. En una realización preferida, al menos un 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 % u 85 % de los glucoconjugados del serotipo 15 de la invención tiene una  $K_d$  menor o igual a 0,3 en una columna CL-4B. En una realización preferida, al menos un 60 % de los glucoconjugados del serotipo 15B de la invención tiene una  $K_d$  menor o igual a 0,3 en una columna CL-4B. En una realización preferida, al menos un 70 % de los glucoconjugados del serotipo 15B de la invención tiene una  $K_d$  menor o igual a 0,3 en una columna CL-4B.

En una realización preferida, entre un 40 % y un 90 % de los glucoconjugados del serotipo 15B tiene una  $K_d$  menor o igual a 0,3 en una columna CL-4B. En una realización preferida, entre un 50 % y un 90 % de los glucoconjugados del serotipo 15B tiene una  $K_d$  menor o igual a 0,3 en una columna CL-4B. En una realización preferida, entre un 65 % y un 80 % de los glucoconjugados del serotipo 15B tiene una  $K_d$  menor o igual a 0,3 en una columna CL-4B.

En una realización preferida, el glucoconjugado 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 glucoconjugado 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 glucoconjugado comprende al menos 0,6 mM de acetato por mM de polisacárido capsular del serotipo 15B. En una realización preferida, el glucoconjugado comprende al menos 0,7 mM de acetato por mM de polisacárido capsular del serotipo 15B. En una realización preferida, se determina la presencia de grupos O-acetilo mediante análisis de HPLC de iones.

En una realización preferida, la relación de mM de acetato por mM de polisacárido capsular del serotipo 15B en el glucoconjugado del serotipo 15B a los mM de acetato por mM de polisacárido capsular del serotipo 15B en el polisacárido aislado es de al menos 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9 o 0,95. En una realización preferida, la relación de mM de acetato por mM de polisacárido capsular del serotipo 15B en el glucoconjugado del serotipo 15B a los mM de acetato por mM de polisacárido capsular del serotipo 15B en el polisacárido aislado es de al menos 0,7. En una realización preferida, la relación de mM de acetato por mM de polisacárido capsular del serotipo 15B en el glucoconjugado del serotipo 15B a los mM de acetato por mM de polisacárido capsular del serotipo 15B en el polisacárido aislado es de al menos 0,9. En una realización preferida, se determina la presencia de grupos O-acetilo mediante análisis de HPLC de iones.

En una realización preferida, la relación de mM de acetato por mM de polisacárido capsular del serotipo 15B en el

glucoconjugado del serotipo 15B a los mM de acetato por mM de polisacárido capsular del serotipo 15B en el polisacárido activado es de al menos 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9 o 0,95. En una realización preferida, la relación de mM de acetato por mM de polisacárido capsular del serotipo 15B en el glucoconjugado del serotipo 15B a los mM de acetato por mM de polisacárido capsular del serotipo 15B en el polisacárido activado es de al menos 0,7. En una realización preferida, la relación de mM de acetato por mM de polisacárido capsular del serotipo 15B en el glucoconjugado del serotipo 15B a los mM de acetato por mM de polisacárido capsular del serotipo 15B en el polisacárido activado es de al menos 0,9. En una realización preferida, se determina la presencia de grupos O-acetilo mediante análisis de HPLC de iones.

En una realización preferida, el glucoconjugado 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 glucoconjugado 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 glucoconjugado del serotipo 15B de la invención comprende al menos 0,7 mM de glicerol por mM de polisacárido capsular del serotipo 15B.

Otra forma de caracterizar los glucoconjugados del serotipo 15B de la invención es por el número de restos de lisina en la proteína portadora (por ejemplo, CRM<sub>197</sub>) que se conjugan al sacárido que se puede caracterizar como un intervalo de lisinas conjugadas (grado de conjugación). La evidencia de la modificación con lisina de la proteína portadora, debido a los enlaces covalentes en los polisacáridos, puede obtenerse mediante análisis de aminoácidos usando procedimientos rutinarios conocidos por los expertos en la materia. La conjugación da como resultado una reducción en el número de restos de lisina abarcados en comparación con el material de partida de proteína CRM<sub>197</sub> usado para generar los materiales conjugados.

En una realización preferida, el grado de conjugación del glucoconjugado del serotipo 15B de la invención es entre 2 y 15, entre 2 y 13, entre 2 y 10, entre 2 y 8, entre 2 y 6, entre 2 y 5, entre 2 y 4, entre 3 y 15, entre 3 y 13, entre 3 y 10, entre 3 y 8, entre 3 y 6, entre 3 y 5, entre 3 y 4, entre 5 y 15, entre 5 y 10, entre 8 y 15, entre 8 y 12, entre 10 y 15 o entre 10 y 12. En una realización, el grado de conjugación del glucoconjugado del serotipo 15B de la invención es 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 glucoconjugado del serotipo 15B de la invención es entre 2 y 5.

### 1.3.5 Glucoconjugados del serotipo 12F de *S. pneumoniae* de las composiciones inmunogénicas de la invención

En los glucoconjugados del serotipo 12F de *S. pneumoniae* de la presente invención, el sacárido se selecciona entre el grupo que consiste en un polisacárido y un oligosacárido y la proteína portadora se selecciona entre cualquier portador adecuado, como se describe en el presente documento o es conocido por los expertos en la materia. En algunas realizaciones preferidas, el sacárido es un polisacárido del serotipo 12F de *S. pneumoniae*.

En una realización, los glucoconjugados del serotipo 12F de *S. pneumoniae* se preparan usando CDAP. Los polisacáridos se activan con tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino piridinio (CDAP) para formar un éster de cianato. El polisacárido activado se acopla después directamente o mediante un grupo espaciador (enlazador) a un grupo amino en la proteína portadora (preferentemente, CRM<sub>197</sub>). Por ejemplo, el espaciador puede ser cistamida o cisteamida 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 con maleimida (por ejemplo, usando GMBS) o una proteína portadora haloacetilada (por ejemplo, usando yodoacetimida, SIB, SIAB, sulfo-SIAB, SIA o SBAP). Preferentemente, el éster de cianato (opcionalmente preparado mediante química de CDAP) se acopla con hexano diamina o dihidrazida del ácido adipico (ADH) y el sacárido derivatizado con amino se conjuga a la proteína portadora (por ejemplo, CRM<sub>197</sub>) usando química de carbodiimida (por ejemplo, EDAC o EDC) a través de un grupo carboxilo en la proteína portadora.

Otras técnicas para conjugación usan carbodiimidias, hidrazidas, ésteres activos, norborano, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S--NHS, EDC, TSTU. Muchas se describen en la Publicación de Solicitud Internacional de Patente n.º WO 98/42721. La conjugación puede implicar un enlazador de carbonilo que puede formarse mediante reacción de un grupo hidroxilo libre del sacárido con CDI (véase Bethell y col. (1979) J. Biol. Chem. 254:2572-2574; Hearn y col. (1981) J. Chromatogr. 218:509-518) seguido 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, los polisacáridos capsulares del serotipo 12F de *S. pneumoniae* se conjugan a la proteína portadora mediante aminación reductora. La aminación reductora implica dos etapas, (1) oxidación del polisacárido para generar funcionalidades aldehído a partir de los dioles vecinos en la unidad de hexasacárido individual, (2)

reducción del polisacárido activado y una proteína portadora para formar un conjugado.

Antes de la oxidación, el polisacárido del serotipo 12F opcionalmente se hidroliza (separa por tamaños). Puede emplearse hidrólisis mecánica o química. La hidrólisis química puede llevarse a cabo usando ácido acético.

5 En una realización, el agente oxidante es peryodato. El término "peryodato" incluye tanto peryodato como ácido peryódico (véase más adelante).

10 En una realización preferida, el agente oxidante es radical libre de 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi (TEMPO) y N-clorosuccinimida (NCS) como cooxidante. En dicha realización, los glucoconjugados del serotipo 12F de *S. pneumoniae* se preparan usando radical libre de 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi (TEMPO) para oxidar alcoholes primarios del sacárido a aldehídos usando N-clorosuccinimida (NCS) como cooxidante (en lo sucesivo "oxidación por TEMPO/NCS"), tal como se describe en el ejemplo 7 y en el documento WO 2014/097099. Por tanto, en un aspecto, los glucoconjugados del serotipo 12F de *S. pneumoniae* pueden obtenerse mediante un procedimiento que comprende las etapas de: a) hacer reaccionar un sacárido de 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 amino (en lo sucesivo "TEMPO/NSC-aminación reductora"). En un aspecto, los glucoconjugados del serotipo 12F de *S. pneumoniae* se obtienen mediante dicho procedimiento. En una realización, el grado de oxidación del sacárido de 12F activado varía de 1 a 50, de 1 a 40, de 1 a 30, de 1 a 20, de 1 a 10, de 1 a 5, de 3 a 40, de 3 a 30, de 3 a 20, de 3 a 10, de 4 a 40, de 4 a 30, de 4 a 20, de 4 a 10, de 5 a 30, de 5 a 25, de 5 a 20, de 5 a 10, de 6 a 50, de 6 a 40, de 6 a 30, de 6 a 20, de 6 a 15, de 6 a 14, de 6 a 13, de 6 a 12, de 6 a 11, de 6 a 10, de 7 a 40, de 7 a 30, de 7 a 20, de 7 a 15, de 7 a 14, de 7 a 13, de 7 a 12, de 7 a 11, de 7 a 10, de 8 a 40, de 8 a 30, de 8 a 20, de 8 a 15, de 8 a 14, de 8 a 13, de 8 a 12, de 8 a 11, de 8 a 10, de 9 a 40, de 9 a 30, de 9 a 20, de 9 a 15, de 10 a 40, de 10 a 30, de 10 a 20 o de 10 a 15. En un aspecto adicional, el grado de oxidación del sacárido activado es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40. Preferentemente, la proteína portadora es CRM<sub>197</sub>.

25 En una realización, antes de la etapa a), el sacárido de 12F se hidroliza hasta un peso molecular en el intervalo de 100 kDa a 400 kDa. Por ejemplo, en un aspecto, el peso molecular se encuentra en el intervalo de 100 kDa a 350 kDa, de 100 kDa a 300 kDa, de 100 kDa a 250 kDa, de 100 kDa a 200 kDa, de 100 kDa a 150 kDa, de 200 kDa a 400 kDa, de 200 kDa a 350 kDa, de 200 kDa a 300 kDa, de 200 kDa a 250 kDa, de 300 kDa a 400 kDa o de 300 kDa a 350 kDa.

30 En un aspecto adicional, el procedimiento comprende además la etapa de purificar el polisacárido activado antes de la etapa b). En un aspecto adicional, los procedimientos comprenden además la etapa de añadir un agente reductor después de la etapa b). En un aspecto, el agente reductor es NaCNBH<sub>3</sub>. En un aspecto adicional, los procedimientos comprenden además la etapa de añadir NaBH<sub>4</sub> después de la adición de NaCNBH<sub>3</sub>. En un aspecto adicional, el procedimiento comprende una etapa de purificación después de la adición de NaBH<sub>4</sub>.

35 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un glucoconjugado del serotipo 12F de *S. pneumoniae* producido u obtenible mediante cualquiera de los procedimientos desvelados anteriormente en el presente documento. Por ejemplo, en un aspecto, la presente divulgación proporciona un glucoconjugado del serotipo 12F de *S. pneumoniae* que comprende un sacárido conjugado a una proteína portadora que se produce o puede obtenerse mediante el procedimiento que comprende las etapas de: a) hacer reaccionar un sacárido con 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi (TEMPO) y N-clorosuccinimida (NCS) en un disolvente acuoso para producir un sacárido activado; y b) hacer reaccionar el sacárido activado con una proteína portadora que comprende uno o más grupos amino.

45 En una realización, el glucoconjugado del serotipo 12F de *S. pneumoniae* de la presente invención tiene un peso molecular de entre aproximadamente 50 kDa y aproximadamente 20.000 kDa. En otra realización, el glucoconjugado tiene un peso molecular de entre aproximadamente 200 kDa y aproximadamente 10.000 kDa. En otra realización, el glucoconjugado del serotipo 12F de *S. pneumoniae* tiene un peso molecular de entre aproximadamente 500 kDa y aproximadamente 5.000 kDa. En una realización, el glucoconjugado del serotipo 12F de *S. pneumoniae* tiene un peso molecular de entre aproximadamente 1.000 kDa y aproximadamente 3.000 kDa. En otras realizaciones, el glucoconjugado del serotipo 12F de *S. pneumoniae* tiene un peso molecular de entre aproximadamente 600 kDa y aproximadamente 2.800 kDa; entre aproximadamente 700 kDa y aproximadamente 2.700 kDa; entre aproximadamente 1.000 kDa y aproximadamente 2.000 kDa; entre aproximadamente 1.800 kDa y aproximadamente 2.500 kDa; entre aproximadamente 1.100 kDa y aproximadamente 2.200 kDa; entre aproximadamente 1.900 kDa y aproximadamente 2.700 kDa; entre aproximadamente 1.200 kDa y aproximadamente 2.400 kDa; entre aproximadamente 1.700 kDa y aproximadamente 2.600 kDa; entre aproximadamente 1.300 kDa y aproximadamente 2.600 kDa; entre aproximadamente 1.600 kDa y aproximadamente 3.000 kDa.

55 En realizaciones adicionales, el glucoconjugado del serotipo 12F de la invención tiene un peso molecular de entre 1.000 kDa y 20.000 kDa; entre 1.000 kDa y 15.000 kDa; entre 1.000 kDa y 10.000 kDa; entre 1.000 kDa y 7.500 kDa; entre 1.000 kDa y 5.000 kDa; entre 1.000 kDa y 4.000 kDa; entre 1.000 kDa y 3.000 kDa; entre 2.000 kDa y 20.000 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. Se contempla como una realización de la divulgación cualquier número entero dentro de cualquiera de los intervalos anteriores. En algunas realizaciones de este tipo, la proteína portadora es CRM<sub>197</sub>. En algunas realizaciones de este tipo, el glucoconjugado del serotipo 12F se conjuga a la proteína portadora mediante TEMPO/NCS-aminación reductora.

- 5 Otra forma de caracterizar los glucoconjugados del serotipo 12F de la invención es por el número de restos de lisina en la proteína portadora (por ejemplo, CRM<sub>197</sub>) que se conjugan al sacárido, que pueden caracterizarse como un intervalo de lisinas conjugadas (grado de conjugación).

En una realización preferida, el grado de conjugación del glucoconjugado del serotipo 12F de la invención es de entre 2 y 20, entre 4 y 16, entre 4 y 15, 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 glucoconjugado del serotipo 12F 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, aproximadamente 15, aproximadamente 16, aproximadamente 17, aproximadamente 18, aproximadamente 19 o aproximadamente 20.

El número de restos de lisina en la proteína portadora conjugados al sacárido también puede expresarse como una relación molar. Por ejemplo, en un glucoconjugado en el que se enlazan covalentemente de 4 a 15 restos de lisina de CRM<sub>197</sub> al sacárido, la relación molar de lisinas conjugadas a CRM<sub>197</sub> en el glucoconjugado es de entre aproximadamente 10:1 a aproximadamente 40:1. En una composición inmunogénica en la que se enlazan covalentemente de 2 a 20 restos de lisina de CRM<sub>197</sub> al sacárido, la relación molar de lisinas conjugadas a CRM<sub>197</sub> en el glucoconjugado es de entre aproximadamente 5:1 y aproximadamente 50:1. En una realización, en el glucoconjugado del serotipo 12F de *S. pneumoniae* de la presente invención, la relación molar de lisinas conjugadas a proteína portadora es de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 25:1. En algunas realizaciones de este tipo, la proteína portadora es CRM<sub>197</sub>. En algunas realizaciones, la CRM<sub>197</sub> puede comprender aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 restos de lisina de los 39 enlazados covalentemente al sacárido. En algunas realizaciones de este tipo, el glucoconjugado del serotipo 12F se conjuga a la proteína portadora mediante TEMPO/NCS-aminación reductora. En una realización, la relación de sacárido a proteína portadora (p/p) es de entre 0,2 y 4 en el glucoconjugado del serotipo 12F de *S. pneumoniae* (por ejemplo, aproximadamente 0,2, aproximadamente 0,3, aproximadamente 0,4, 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, aproximadamente 3,0, aproximadamente 3,1, aproximadamente 3,2, aproximadamente 3,3, aproximadamente 3,4, aproximadamente 3,5, aproximadamente 3,6, aproximadamente 3,7, aproximadamente 3,8, aproximadamente 3,9 o aproximadamente 4,0). En otra realización, la relación de sacárido a proteína portadora (p/p) es de entre 1,1 y 1,7 en el glucoconjugado del serotipo 12F de *S. pneumoniae*. En otras realizaciones, la relación de sacárido a proteína portadora (p/p) es de entre 0,8 y 1,8 (por ejemplo, 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 o aproximadamente 1,8). En algunas realizaciones de este tipo, la proteína portadora es CRM<sub>197</sub>. En algunas realizaciones de este tipo, la proteína portadora es CRM<sub>197</sub>. En algunas realizaciones de este tipo, el glucoconjugado del serotipo 12F se conjuga a la proteína portadora mediante TEMPO/NCS-aminación reductora.

La frecuencia de unión de la cadena de sacárido a una lisina en la proteína portadora es otro parámetro para caracterizar los glucoconjugados del serotipo 12F de la divulgación. Por ejemplo, en una realización, hay al menos un enlace covalente entre la proteína portadora y el polisacárido por cada 100 unidades de repetición de sacárido del polisacárido. En una realización, hay al menos un enlace covalente entre la proteína portadora y el polisacárido por cada 50 unidades de repetición de sacárido del polisacárido. En una realización, hay al menos un enlace covalente entre la proteína portadora y el polisacárido por cada 25 unidades de repetición de sacárido del polisacárido. En otra realización, el enlace covalente entre la proteína portadora y el polisacárido se produce al menos una vez en cada 4 unidades de repetición de sacárido del polisacárido. En otra realización, el enlace covalente entre la proteína portadora y el polisacárido se produce al menos una vez en cada 10 unidades de repetición de sacárido del polisacárido. En una realización adicional, el enlace covalente entre la proteína portadora y el polisacárido se produce al menos una vez en cada 15 unidades de repetición de sacárido del polisacárido. En realizaciones frecuentes, la proteína portadora es CRM<sub>197</sub> y el enlace covalente entre la CRM<sub>197</sub> y el polisacárido se produce al menos una vez en 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 polisacárido por cada 5 o 10 unidades de repetición; 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; cada 4 a 25 unidades de repetición de sacárido o cada 2 a 25 unidades de repetición de sacárido. En realizaciones frecuentes, la proteína portadora es CRM<sub>197</sub>.
- En otra realización, se produce al menos un enlace entre la CRM<sub>197</sub> 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 algunas realizaciones de este tipo, el glucoconjugado del serotipo 12F se conjuga a la proteína portadora mediante TEMPO/NCS-aminación reductora.
- En una realización, el glucoconjugado del serotipo 12F de *S. pneumoniae* de la invención comprende al menos un enlace covalente entre la proteína portadora y el polisacárido por cada 25 unidades de repetición de sacárido del polisacárido. En otra realización, el enlace covalente entre la proteína portadora y el polisacárido se produce al menos una vez en cada 4 unidades de repetición de sacárido del polisacárido. En otra realización, el enlace covalente entre la proteína portadora y el polisacárido se produce al menos una vez en cada 10 unidades de repetición de sacárido del polisacárido. En una realización adicional, el enlace covalente entre la proteína portadora y el polisacárido se produce al menos una vez en cada 15 unidades de repetición de sacárido del polisacárido. En algunas realizaciones de este tipo, el glucoconjugado del serotipo 12F se conjuga a la proteína portadora mediante TEMPO/NCS-aminación reductora.
- Los glucoconjugados del serotipo 12F y las composiciones inmunogénicas de la invención pueden contener sacárido libre que no está conjugado covalentemente a la proteína portadora, pero, sin embargo, está presente en la composición del glucoconjugado. El sacárido libre puede estar asociado no covalentemente con (es decir, unido no covalentemente a, adsorbido a o atrapado en o con) el glucoconjugado.
- En algunas realizaciones, los glucoconjugados del serotipo 12F de la invención comprenden menos de aproximadamente un 50 %, 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o 5 % de polisacárido del serotipo 12F en comparación con la cantidad total de polisacárido del serotipo 12F. En una realización, el glucoconjugado del serotipo 12F de *S. pneumoniae* comprende menos de aproximadamente un 50 % de polisacárido del serotipo 12F libre en comparación con la cantidad total de polisacárido del serotipo 12F. En una realización, el glucoconjugado del serotipo 12F de *S. pneumoniae* comprende menos de aproximadamente un 45 % de polisacárido del serotipo 12F libre en comparación con la cantidad total de polisacárido del serotipo 12F. En otra realización, el glucoconjugado comprende menos de aproximadamente un 30 % de polisacárido del serotipo 12F libre en comparación con la cantidad total de polisacárido del serotipo 12F. En otra realización, el glucoconjugado del serotipo 12F de *S. pneumoniae* comprende menos de aproximadamente un 20 % de polisacárido del serotipo 12F libre en comparación con la cantidad total de polisacárido del serotipo 12F. En una realización adicional, el glucoconjugado comprende menos de aproximadamente un 10 % de polisacárido del serotipo 12F libre en comparación con la cantidad total de polisacárido del serotipo 12F. En otra realización, el glucoconjugado del serotipo 12F de *S. pneumoniae* comprende menos de aproximadamente un 5 % de polisacárido del serotipo 12F libre en comparación con la cantidad total de polisacárido del serotipo 12F. En algunas realizaciones de este tipo, el glucoconjugado del serotipo 12F se conjuga a la proteína portadora mediante TEMPO/NCS-aminación reductora.
- En algunas realizaciones, el glucoconjugado del serotipo 12F de la presente invención comprende un sacárido que tiene un peso molecular de entre 10 kDa y 2.000 kDa. En otras realizaciones de este tipo, el sacárido tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 2.000 kDa. En realizaciones adicionales de este tipo, el sacárido tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 1.750 kDa; entre 50 kDa y 1.500 kDa; entre 50 kDa y 1.250 kDa; entre 50 kDa y 1.000 kDa; entre 50 kDa y 750 kDa; entre 50 kDa y 500 kDa; entre 100 kDa y 2.000 kDa; entre 100 kDa y 1.750 kDa; entre 100 kDa y 1.500 kDa; entre 100 kDa y 1.250 kDa; entre 100 kDa y 1.000 kDa; entre 100 kDa y 750 kDa; entre 100 kDa y 500 kDa; entre 200 kDa y 2.000 kDa; entre 200 kDa y 1.750 kDa; entre 200 kDa y 1.500 kDa; entre 200 kDa y 1.250 kDa; entre 200 kDa y 1.000 kDa; entre 200 kDa y 750 kDa; o entre 200 kDa y 500 kDa; o entre 200 kDa y 400 kDa. En algunas realizaciones de este tipo, el glucoconjugado del serotipo 12F se conjuga a la proteína portadora mediante TEMPO/NCS-aminación reductora.
- Los glucoconjugados del serotipo 12F también pueden caracterizarse por su distribución de tamaño molecular ( $K_d$ ). Pueden usarse medios de cromatografía de exclusión por tamaños (CL-4B) para determinar la distribución relativa de tamaños moleculares del conjugado, como se ha mencionado anteriormente. En una realización preferida, al menos un 35 % de los glucoconjugados del serotipo 12F de la invención tiene una  $K_d$  menor o igual a 0,3 en una columna CL-4B. En una realización preferida, al menos un 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 % u 85 % de los glucoconjugados del serotipo 12F de la invención tiene una  $K_d$  menor o igual a 0,3 en una columna CL-4B. En una realización preferida, al menos un 60 % de los glucoconjugados del serotipo 12F de la invención tiene una  $K_d$  menor o igual a 0,3 en una columna CL-4B. En una realización preferida, al menos un 70 % de los glucoconjugados del serotipo 12F de la invención tiene una  $K_d$  menor o igual a 0,3 en una columna CL-4B.
- En una realización preferida, entre un 40 % y un 90 % de los glucoconjugados del serotipo 12F tiene una  $K_d$  menor o igual a 0,3 en una columna CL-4B. En una realización preferida, entre un 50 % y un 90 % de los glucoconjugados del

serotipo 12F tiene una  $K_d$  menor o igual a 0,3 en una columna CL-4B. En una realización preferida, entre un 65 % y un 80 % de los glucoconjugados del serotipo 12F tiene una  $K_d$  menor o igual a 0,3 en una columna CL-4B.

### 1.3.6 Glucoconjugados del serotipo 10A de *S. pneumoniae* de las composiciones inmunogénicas de la invención

5 En una realización, los glucoconjugados del serotipo 10A se obtienen activando el polisacárido con tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino piridinio (CDAP) para formar un éster de cianato. El polisacárido activado puede acoplarse directamente o mediante un grupo espaciador (enlazador) a un grupo amino en la proteína portadora. Por ejemplo, el espaciador puede ser cistamida o cisteamida 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 con maleimida (por ejemplo, usando GMBS) o una proteína portadora haloacetilada (por ejemplo, usando yodoacetimida, SIB, SIAB, sulfo-SIAB, SIA o SBAP). Preferentemente, el éster de cianato (opcionalmente preparado mediante química de CDAP) se acopla con hexano diamina o dihidrazida del ácido adípico (ADH) y el sacárido derivatizado con amino se conjuga a la proteína portadora usando química de carbodiimida (por ejemplo, EDAC o EDC) a través de un grupo carboxilo en la proteína portadora. Dichos conjugados se describen, por ejemplo, en los documentos WO 93/15760, WO 95/08348 y WO 96/129094.

Otras técnicas adecuadas usan carbodiimidias, hidrazidas, ésteres activos, norborano, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S--NHS, EDC, TSTU. Muchas se describen en la Publicación de Solicitud Internacional de Patente n.º WO 98/42721. La conjugación puede implicar un enlazador de carbonilo que puede formarse mediante reacción de un grupo hidroxilo libre del sacárido con CDI (véase Bethell y col. (1979) J. Biol. Chem. 254:2572-2574; Hearn y col. (1981) J. Chromatogr. 218:509-518) seguido 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.

25 En realizaciones preferidas, los glucoconjugados del serotipo 10A de la invención se preparan usando aminación reductora. La aminación reductora implica dos etapas, (1) oxidación del polisacárido para generar funcionalidades aldehído a partir de los dioles vecinos en la unidad de hexasacárido individual, (2) reducción del polisacárido activado y una proteína portadora para formar un conjugado.

Antes de la oxidación, el polisacárido del serotipo 10A opcionalmente se hidroliza (separa por tamaños). Puede emplearse hidrólisis mecánica o química. La hidrólisis química puede llevarse a cabo usando ácido acético.

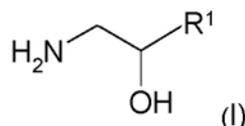
En una realización, el polisacárido del serotipo se activa (oxida) mediante un procedimiento que comprende las etapas de:

- (a) hacer reaccionar el polisacárido del serotipo 10A aislado con un agente oxidante;  
 (b) inactivar la reacción de oxidación mediante la adición de un agente de inactivación, dando como resultado un polisacárido del serotipo 10A activado.

En una realización preferida, el agente oxidante es peryodato. A efectos de la presente invención, el término "periyodato" incluye tanto peryodato como ácido peryódico, el término también incluye tanto metaperyodato ( $\text{IO}_4^-$ ) como ortoperyodato ( $\text{IO}_6^{5-}$ ) y las diversas sales de peryodato (por ejemplo, peryodato de sodio y peryodato de potasio). En una realización preferida, el agente oxidante es peryodato de sodio. En una realización preferida, el peryodato usado para la oxidación del polisacárido del serotipo 10A es metaperyodato. En una realización preferida, el peryodato usado para la oxidación del polisacárido del serotipo 10A es metaperyodato de sodio.

En una realización, el agente inactivante se selecciona entre dioles próximos, 1,2-aminoalcoholes, aminoácidos, glutatión, sulfito, bisulfato, ditionita, metabisulfito, tiosulfato, fosfitos, hipofosfitos o ácido fosforoso.

En una realización, el agente inactivador es un 1,2-aminoalcohol de fórmula (I):



45 en la que  $\text{R}^1$  se selecciona entre H, metilo, etilo, propilo o isopropilo.

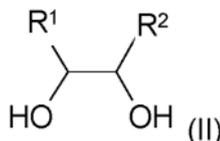
En una realización, el agente inactivante se selecciona entre sales sódicas y potásicas de sulfito, bisulfato, ditionita, metabisulfito, tiosulfato, fosfitos, hipofosfitos o ácido fosforoso.

50 En una realización, el agente inactivante es un aminoácido. En dichas realizaciones, dicho aminoácido puede seleccionarse entre serina, treonina, cisteína, cistina, metionina, prolina, hidroxiprolina, triptófano, tirosina e histidina.

En una realización, el agente inactivante es un sulfito, tal como bisulfato, ditionita, metabisulfito, tiosulfato.

En una realización, el agente inactivante es un compuesto que comprende dos grupos hidroxilo próximos (dioles próximos), es decir, dos grupos hidroxilo enlazados covalentemente a dos átomos de carbono adyacentes.

Preferentemente, el agente inactivante es un compuesto de fórmula (II):



5

en la que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> se seleccionan cada uno independientemente entre H, metilo, etilo, propilo o isopropilo.

En una realización preferida, el agente inactivante es glicerol, etilenglicol, propan-1,2-diol, butan-1,2-diol o butan-2,3-diol, ácido ascórbico. En una realización preferida, el agente inactivante es butan-2,3-diol.

10

En una realización preferida, el polisacárido aislado del serotipo 10A se activa mediante un procedimiento que comprende las etapas de:

- (a) hacer reaccionar el polisacárido del serotipo 10A con peryodato;
- (b) inactivar la reacción de oxidación mediante la adición de butan-2,3-diol, dando como resultado un polisacárido del serotipo 10A activado.

15

Después de la etapa de oxidación del polisacárido, se dice que el polisacárido está activado y en lo sucesivo en el presente documento se denomina "polisacárido activado".

En una realización preferida, el polisacárido del serotipo 10A activado está purificado. El polisacárido del serotipo 10A activado se purifica de acuerdo con procedimientos conocidos por el experto en la materia, tales como cromatografía de permeación en gel (GPC), diálisis o ultrafiltración/diafiltración. Por ejemplo, el polisacárido de 10A activado se purifica mediante concentración y diafiltración usando un dispositivo de ultrafiltración.

20

En una realización preferida, el grado de oxidación del polisacárido del serotipo 10A activado es de entre 2 y 30, entre 2 y 25, entre 2 y 20, entre 2 y 15, entre 2 y 10, entre 2 y 5, entre 5 y 30, entre 5 y 25, entre 5 y 20, entre 5 y 15, entre 5 y 10, entre 10 y 30, entre 10 y 25, entre 10 y 20, entre 10 y 15, entre 15 y 30, entre 15 y 25, entre 15 y 20, entre 20 a 30 entre 20 a 25. En una realización preferida, el grado de oxidación del polisacárido del serotipo 10A activado es de entre 2 y 10, entre 4 y 8, entre 4 y 6, entre 6 y 8, entre 6 y 12, entre 8 y 14, entre 9 y 11, entre 10 y 16, entre 12 y 16, entre 14 y 18, entre 16 y 20, entre 16 y 18, entre 18 y 22 o entre 18 y 20.

25

En una realización preferida, el polisacárido del serotipo 10A activado tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 400 kDa, entre 50 kDa y 350 kDa, entre 50 kDa y 300 kDa, entre 50 kDa y 250 kDa, entre 50 kDa y 200 kDa, entre 100 kDa y 300 kDa, entre 100 kDa y 250 kDa o entre 100 kDa y 200 kDa. En una realización preferida, el polisacárido del serotipo 10A activado tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 300 kDa. En una realización preferida, el polisacárido del serotipo 10A activado tiene un peso molecular de entre 100 kDa y 200 kDa. En una realización preferida, el polisacárido del serotipo 10A activado tiene un peso molecular de entre 100 kDa y 200 kDa y un grado de oxidación de entre 5 y 20, entre 5 y 15, entre 8 y 14, entre 8 y 12 o entre 9 y 11. En una realización preferida, el polisacárido del serotipo 10A activado tiene un peso molecular de entre 100 kDa y 200 kDa y un grado de oxidación de entre 9 y 11. El polisacárido activado y/o la proteína portadora pueden liofilizarse (criodesecarse), ya sea de manera independiente (liofilización individual) o juntos (liofilización conjunta).

30

En una realización, el polisacárido del serotipo 10A activado está liofilizado, opcionalmente en presencia de sacárido. En una realización preferida, el sacárido se selecciona entre sacarosa, trehalosa, rafinosa, estaquiosa, melezitosa, dextrano, manitol, lactitol y Palatinit. En una realización preferida, el sacárido es sacarosa. En una realización, el polisacárido activado liofilizado se combina posteriormente con una solución que comprende la proteína portadora.

40

En otra realización, el polisacárido activado y la proteína portadora se liofilizan juntos. En dichas realizaciones, el polisacárido activado del serotipo 10A se combina con la proteína portadora y se liofiliza opcionalmente en presencia de un sacárido. En una realización preferida, el sacárido se selecciona entre sacarosa, trehalosa, rafinosa, estaquiosa, melezitosa, dextrano, manitol, lactitol y Palatinit. En una realización preferida, el sacárido es sacarosa. El polisacárido y la proteína portadora liofilizados juntos pueden resuspenderse posteriormente en solución y se hacen reaccionar con un agente reductor.

45

La segunda etapa del procedimiento de conjugación es la reducción del polisacárido activado y una proteína portadora para formar un conjugado (aminación reductora), usando un agente reductor.

El polisacárido activado del serotipo 10A puede conjugarse a una proteína portadora mediante un procedimiento que

comprende las etapas de:

- (c) combinar el polisacárido activado del serotipo 10A con una proteína portadora; y  
 (d) hacer reaccionar el polisacárido activado del serotipo 10A combinado y la proteína portadora con un agente reductor para formar un conjugado de polisacárido del serotipo 10A-proteína portadora. En una realización, la reacción de reducción se lleva a cabo en disolvente acuoso, en otra realización, la reacción se lleva a cabo en un disolvente aprótico. En una realización, la reacción de reducción se lleva a cabo en disolvente de DMSO (dimetilsulfóxido) o en DMF (dimetilformamida). El disolvente de DMSO o DMF puede usarse para reconstituir el polisacárido activado y la proteína portadora que se han liofilizado.

En una realización, el agente reductor es cianoborohidruro de sodio, triacetoxiborohidruro de sodio, borohidruro de sodio o de cinc en presencia de ácidos de Bronsted o Lewis, boranos de amina, tales como borano de piridina, borano de 2-picolina, 2,6-diborano-metanol, dimetilamina-borano, t-BuMeiPrN-BH<sub>3</sub>, bencilamina-BH<sub>3</sub> o borano de 5-etil-2-metilpiridina (PEMB). En una realización preferida, el agente reductor es cianoborohidruro de sodio.

Al final de la reacción de reducción, pueden quedar grupos aldehído sin reaccionar en los conjugados, estos pueden protegerse usando un agente de protección adecuado. En una realización, este agente de protección es borohidruro de sodio (NaBH<sub>4</sub>).

Después de la conjugación del polisacárido del serotipo 10A con la proteína portadora, el glucoconjugado puede purificarse (enriquecerse con respecto a la cantidad de conjugado de polisacárido-proteína) mediante diversas técnicas conocidas por el experto. Estas técnicas incluyen diálisis, operaciones de concentración/diafiltración, precipitación/elución por filtración de flujo tangencial, cromatografía en columna (DEAE o cromatografía de interacción hidrófoba) y filtración de profundidad.

En algunas realizaciones, los glucoconjugados del serotipo 10A de la presente invención comprenden un sacárido que tiene un peso molecular de entre 10 kDa y 2.000 kDa. En otras realizaciones de este tipo, el sacárido tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 2.000 kDa. En realizaciones adicionales de este tipo, el sacárido tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 1.750 kDa; entre 50 kDa y 1.500 kDa; entre 50 kDa y 1.250 kDa; entre 50 kDa y 1.000 kDa; entre 50 kDa y 750 kDa; entre 50 kDa y 500 kDa; entre 100 kDa y 2.000 kDa; entre 100 kDa y 1.750 kDa; entre 100 kDa y 1.500 kDa; entre 100 kDa y 1.250 kDa; entre 100 kDa y 1.000 kDa; entre 100 kDa y 750 kDa; entre 100 kDa y 500 kDa; entre 200 kDa y 2.000 kDa; entre 200 kDa y 1.750 kDa; entre 200 kDa y 1.500 kDa; entre 200 kDa y 1.250 kDa; entre 200 kDa y 1.000 kDa; entre 200 kDa y 750 kDa; o entre 200 kDa y 500 kDa; o entre 200 kDa y 400 kDa. En algunas realizaciones de este tipo, los glucoconjugados del serotipo 10A se preparan usando aminación reductora.

En algunas realizaciones, el glucoconjugado del serotipo 10A de la invención tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 20.000 kDa. En otras realizaciones, el glucoconjugado del serotipo 10A tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 15.000 kDa. En otras realizaciones, el glucoconjugado del serotipo 10A tiene un peso molecular de entre 500 kDa y 15.000 kDa, entre 500 kDa y 10.000 kDa; entre 2.000 kDa y 10.000 kDa; o entre 3.000 kDa y 8.000 kDa. En otras realizaciones, el glucoconjugado del serotipo 10A tiene un peso molecular de entre 1000 kDa y 10.000 kDa. En otras realizaciones, el glucoconjugado del serotipo 10A tiene un peso molecular de entre 1000 kDa y 8.000 kDa. En otras realizaciones más, el glucoconjugado del serotipo 10A tiene un peso molecular de entre 2.000 kDa y 8.000 kDa o de entre 3.000 kDa y 7.000 kDa. En realizaciones adicionales, el glucoconjugado del serotipo 10A 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 7.500 kDa; entre 200 kDa y 5.000 kDa; entre 200 kDa y 3.000 kDa; entre 200 kDa y 1.000 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.

En realizaciones adicionales, el glucoconjugado del serotipo 10A 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. En realizaciones adicionales, el glucoconjugado del serotipo 10A 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 o entre 5.000 kDa y 7.500 kDa. En realizaciones adicionales, el glucoconjugado del serotipo 10A de la invención tiene un peso molecular de entre 6.000 kDa y 20.000 kDa; entre 6.000 kDa y 15.000 kDa; entre 6.000 kDa y 10.000 kDa o entre 6.000 kDa y 7.500 kDa. En realizaciones adicionales, el glucoconjugado del serotipo 10A de la invención tiene un peso molecular de entre 7.000 kDa y 20.000 kDa; entre 7.000 kDa y 15.000 kDa; entre 7.000 kDa y 10.000 kDa o

entre 7.000 kDa y 8.000 kDa. En realizaciones adicionales, el glucoconjugado del serotipo 10A de la invención tiene un peso molecular de entre 8.000 kDa y 20.000 kDa; entre 8.000 kDa y 15.000 kDa; o entre 8.000 kDa y 10.000 kDa.

Se contempla como una realización de la divulgación cualquier número entero dentro de cualquiera de los intervalos anteriores. El peso molecular del glucoconjugado se mide mediante SEC-MALLS.

- 5 Otra forma de caracterizar los glucoconjugados del serotipo 10A de la invención es por el número de restos de lisina en la proteína portadora (por ejemplo, CRM<sub>197</sub>) que se conjugan al sacárido que se puede caracterizar como un intervalo de lisinas conjugadas (grado de conjugación). La evidencia de la modificación con lisina de la proteína portadora, debido a los enlaces covalentes en los polisacáridos, puede obtenerse mediante análisis de aminoácidos usando procedimientos rutinarios conocidos por los expertos en la materia. La conjugación da como resultado una  
10 reducción en el número de restos de lisina abarcados en comparación con el material de partida de proteína CRM<sub>197</sub> usado para generar los materiales conjugados.

- 15 En una realización preferida, el grado de conjugación del glucoconjugado del serotipo 10A es de entre 2 y 15, entre 2 y 13, entre 2 y 10, entre 2 y 8, entre 2 y 6, entre 2 y 5, entre 2 y 4, entre 3 y 15, entre 3 y 13, entre 3 y 10, entre 3 y 8, entre 3 y 6, entre 3 y 5, entre 3 y 4, entre 5 y 15, entre 5 y 10, entre 8 y 15, entre 8 y 12, entre 10 y 15 o entre 10 y 12. En una realización preferida, el grado de conjugación del glucoconjugado del serotipo 10A es de entre 6 y 8. En una realización preferida, la proteína portadora es CRM<sub>197</sub>.

- Los glucoconjugados del serotipo 10A de la invención también pueden caracterizarse por la relación (peso/peso) de sacárido a proteína portadora. En algunas realizaciones, la relación de sacárido a proteína portadora (p/p) es de  
20 entre 0,5 y 3,0 (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 una realización preferida, la relación de sacárido del serotipo  
25 10A a proteína portadora en el conjugado es entre 0,5 y 2,0, 0,5 y 1,5, 0,5 y 1,0, 1,0 y 1,5 o 1,0 y 2,0. En una realización preferida, la relación del polisacárido del serotipo 10A a la proteína portadora en el conjugado es de entre 0,8 y 1,4. En una realización preferida, la relación del polisacárido capsular del serotipo 10A a la proteína portadora en el conjugado es de entre 0,8 y 1,2 (por ejemplo, aproximadamente 0,8, aproximadamente 0,9, aproximadamente 1,0, aproximadamente 1,1 o aproximadamente 1,2). En algunas realizaciones de este tipo, la proteína portadora es  
30 CRM<sub>197</sub>.

Los glucoconjugados del serotipo 10A y las composiciones inmunogénicas de la invención pueden contener sacárido libre que no está conjugado covalentemente a la proteína portadora, pero, sin embargo, está presente en la composición del glucoconjugado. El sacárido libre puede estar asociado no covalentemente con (es decir, unido no covalentemente a, adsorbido a o atrapado en o con) el glucoconjugado.

- 35 En algunas realizaciones, los glucoconjugados del serotipo 10A de la invención comprenden menos de aproximadamente un 50 % de sacárido libre, menos de aproximadamente un 45 % de sacárido libre, menos de aproximadamente un 40 % de sacárido libre, menos de aproximadamente un 35 % de sacárido libre, menos de aproximadamente un 30 % de sacárido libre, menos de aproximadamente un 25 % de sacárido libre, menos de aproximadamente un 20 % de sacárido libre, menos de aproximadamente un 15 % de sacárido libre, menos de  
40 aproximadamente un 10 % de sacárido libre o menos de aproximadamente un 5 % de sacárido libre en relación con la cantidad total de sacárido de 10A. Preferentemente, el glucoconjugado del serotipo 10A comprende menos de un 15 % de sacárido libre, más preferentemente, menos de un 10 % de sacárido libre y aún más preferentemente, menos de un 5 % de sacárido libre.

- Los glucoconjugados del serotipo 10A también pueden caracterizarse por su distribución de tamaño molecular ( $K_d$ ).  
45 Pueden usarse medios de cromatografía de exclusión por tamaños (CL-4B) para determinar la distribución relativa de tamaños moleculares del conjugado, como se ha mencionado anteriormente. En una realización preferida, al menos un 30 % de los glucoconjugados del serotipo 10A de la invención tiene una  $K_d$  menor o igual a 0,3 en una columna CL-4B. En una realización preferida, al menos un 40 % de los glucoconjugados del serotipo 10A de la invención tiene una  $K_d$  menor o igual a 0,3 en una columna CL-4B. En una realización preferida, al menos un 45 %  
50 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 % u 85 % de los glucoconjugados del serotipo 10A de la invención tiene una  $K_d$  menor o igual a 0,3 en una columna CL-4B. En una realización preferida, al menos un 60 % de los glucoconjugados del serotipo 10A tiene una  $K_d$  menor o igual a 0,3 en una columna CL-4B. En una realización preferida, entre un 50 % y un 80 % de los glucoconjugados del serotipo 10A de la invención tiene una  $K_d$  menor o igual a 0,3 en una columna CL-4B.

- 55 **1.3.7 Glucoconjugados del serotipo 11A de *S. pneumoniae* de las composiciones inmunogénicas de la invención**

En una realización, los glucoconjugados del serotipo 11A se obtienen activando el polisacárido con tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino piridinio (CDAP) para formar un éster de cianato. El polisacárido activado puede acoplarse

- directamente o mediante un grupo espaciador (enlazador) a un grupo amino en la proteína portadora. Por ejemplo, el espaciador puede ser cistamida o cisteamida 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 con maleimida (por ejemplo, usando GMBS) o una proteína portadora haloacetilada (por ejemplo, usando yodoacetimida, SIB, SIAB, sulfo-SIAB, SIA o SBAP). Preferentemente, el éster de cianato (opcionalmente preparado mediante química de CDAP) se acopla con hexano diamina o dihidrazida del ácido adípico (ADH) y el sacárido derivatizado con amino se conjuga a la proteína portadora usando química de carbodiimida (por ejemplo, EDAC o EDC) a través de un grupo carboxilo en la proteína portadora. Dichos conjugados se describen, por ejemplo, en los documentos WO 93/15760, WO 95/08348 y WO 96/129094.
- Otras técnicas adecuadas usan carbodiimidias, hidrazidas, ésteres activos, norborano, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S--NHS, EDC, TSTU. Muchas se describen en la Publicación de Solicitud Internacional de Patente n.º WO 98/42721. La conjugación puede implicar un enlazador de carbonilo que puede formarse mediante reacción de un grupo hidroxilo libre del sacárido con CDI (véase Bethell y col. (1979). *Biol. Chem.* 254:2572-2574; Hearn y col. (1981) *J. Chromatogr.* 218:509-518) seguido 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 realizaciones preferidas, los glucoconjugados del serotipo 11A de la invención se preparan usando aminación reductora. La aminación reductora implica dos etapas, (1) oxidación del polisacárido para generar funcionalidades aldehído a partir de los dioles vecinos en la unidad de hexasacárido individual, (2) reducción del polisacárido activado y una proteína portadora para formar un conjugado.
- Antes de la oxidación, el polisacárido del serotipo 11A opcionalmente se hidroliza para reducir su viscosidad. Puede emplearse hidrólisis mecánica o química. La hidrólisis química puede llevarse a cabo usando ácido acético. La separación por tamaños mecánica puede llevarse a cabo usando cizalladura de homogeneización de alta presión.
- La etapa de oxidación puede implicar la reacción con peryodato. A efectos de la presente invención, el término "periyodato" incluye tanto peryodato como ácido peryódico; el término también incluye tanto metaperyodato ( $\text{IO}_4^-$ ) como ortoperyodato ( $\text{IO}_6^{5-}$ ) y las diversas sales de peryodato (por ejemplo, peryodato de sodio y peryodato de potasio). En una realización el polisacárido capsular del serotipo 11A de *S. pneumoniae* se oxida en presencia de metaperyodato, preferentemente en presencia de peryodato de sodio ( $\text{NaIO}_4$ ). En otra realización, el polisacárido capsular del serotipo 11A se oxida en presencia de ortoperyodato, preferentemente en presencia de ácido peryódico.
- Después de la etapa de oxidación del polisacárido, se dice que el polisacárido está activado y se denomina a continuación en el presente documento "polisacárido activado". El polisacárido activado puede purificarse y liofilizarse (criodesecarse).
- El polisacárido activado y la proteína portadora pueden liofilizarse (criodesecarse), ya sea de manera independiente (liofilización individual) o juntos (liofilización conjunta). En una realización, el polisacárido activado y la proteína portadora se liofilizan juntos. En otra realización, el polisacárido activado y la proteína portadora se liofilizan de manera independiente.
- En una realización, la liofilización se produce en presencia de un azúcar no reductor, los posibles azúcares no reductores incluyen sacarosa, trehalosa, rafinosa, estaquiosa, melezitosa, dextrano, manitol, lactitol y Palatinit.
- La segunda etapa del procedimiento de conjugación es la reducción del polisacárido activado y una proteína portadora para formar un conjugado (aminación reductora), usando un agente reductor. Los agentes reductores que son adecuados incluyen los cianoborohidruros, tales como cianoborohidruro de sodio, borano-piridina o resina de intercambio de borohidruro. En una realización, el agente reductor es cianoborohidruro de sodio.
- En una realización, la reacción de reducción se lleva a cabo en disolvente acuoso, en otra realización, la reacción se lleva a cabo en un disolvente aprótico. En una realización, la reacción de reducción se lleva a cabo en disolvente de DMSO (dimetilsulfóxido) o en DMF (dimetilformamida). El disolvente de DMSO o DMF puede usarse para reconstituir el polisacárido activado y la proteína portadora que se han liofilizado.
- En una realización, se usan entre 0,1 y 3,0, entre 0,15 y 2,0, entre 0,2 y 2,0 o entre 0,5 y 1,5 equivalentes molares de cianoborohidruro de sodio en la reacción de reducción. En una realización, se usan 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,9 o 3,0 equivalentes molares de cianoborohidruro de sodio en la reacción de reducción.
- En una realización, el agente reductor es triacetoxiborohidruro de sodio, en una realización adicional, se usan entre 1,0 y 6,0 equivalentes molares, entre 2,0 y 5,0 equivalentes molares o aproximadamente 3,0 equivalentes molares de triacetoxiborohidruro de sodio en la reacción de reducción.
- Al final de la reacción de reducción, pueden quedar grupos aldehído sin reaccionar en los conjugados, estos pueden

protegerse usando un agente de protección adecuado. En una realización, este agente de protección es borohidruro de sodio (NaBH<sub>4</sub>). En una realización, la protección se logra mezclando la reacción de reducción con entre 0,5 y 5,0 equivalentes molares de NaBH<sub>4</sub>, por ejemplo, aproximadamente 1, 1,5, 2, 2,5 o 3 equivalentes molares de NaBH<sub>4</sub>.

5 Después de la conjugación (la reacción de reducción y opcionalmente la protección), los glucoconjugados pueden purificarse. Los glucoconjugados pueden purificarse mediante diafiltración y/o cromatografía de intercambio iónico y/o cromatografía de exclusión por tamaños. En una realización, los glucoconjugados se purifican mediante diafiltración o cromatografía de intercambio iónico o cromatografía de exclusión por tamaños.

En una realización, los glucoconjugados se esterilizan por filtración.

10 En algunas realizaciones, los glucoconjugados del serotipo 11A de la presente invención se conjugan a la proteína portadora (por ejemplo, CRM<sub>197</sub>) y comprenden un sacárido que tiene un peso molecular de entre 10 kDa y 2.000 kDa. En otras realizaciones de este tipo, el sacárido tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 2.000 kDa. En realizaciones adicionales de este tipo, el sacárido tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 1.750 kDa; entre 50 kDa y 1.500 kDa; entre 50 kDa y 1.250 kDa; entre 50 kDa y 1.000 kDa; entre 50 kDa y 750 kDa; entre 50 kDa y 500 kDa; entre 50 kDa y 400 kDa; entre 50 kDa y 300 kDa; entre 50 kDa y 200 kDa; entre 50 kDa y 100 kDa; entre 100 kDa y 2.000 kDa; entre 100 kDa y 1.750 kDa; entre 100 kDa y 1.500 kDa; entre 100 kDa y 1.250 kDa; entre 100 kDa y 1.000 kDa; entre 100 kDa y 750 kDa; entre 100 kDa y 500 kDa; entre 100 kDa y 400 kDa; entre 100 kDa y 300 kDa; entre 100 kDa y 200 kDa; entre 200 kDa y 2.000 kDa; entre 200 kDa y 1.750 kDa; entre 200 kDa y 1.500 kDa; entre 200 kDa y 1.250 kDa; entre 200 kDa y 1.000 kDa; entre 200 kDa y 750 kDa; o entre 200 kDa y 500 kDa; entre 200 kDa y 400 kDa o entre 200 kDa y 300 kDa.

20 En algunas realizaciones, el glucoconjugado del serotipo 11A de la invención tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 20.000 kDa. En otras realizaciones, el glucoconjugado del serotipo 11A tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 15.000 kDa. En otras realizaciones, el glucoconjugado del serotipo 11A tiene un peso molecular de entre 500 kDa y 10.000 kDa. En otras realizaciones, el glucoconjugado del serotipo 11A tiene un peso molecular de entre 200 kDa y 10.000 kDa. En otras realizaciones más, el glucoconjugado del serotipo 11A tiene un peso molecular de entre 25 1.000 kDa y 8.000 kDa o de entre 2.000 kDa y 8.000 kDa.

En realizaciones adicionales, el glucoconjugado del serotipo 11A de la invención tiene un peso molecular de entre 200 kDa y 20.000 kDa; entre 200 kDa y 17.500 kDa; entre 200 kDa y 15.000 kDa; entre 200 kDa y 10.000 kDa; entre 200 kDa y 7.500 kDa; entre 200 kDa y 5.000 kDa; entre 200 kDa y 3.000 kDa; entre 200 kDa y 2.000 kDa; entre 200 kDa y 1.000 kDa; entre 500 kDa y 20.000 kDa; entre 500 kDa y 17.500 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 700 kDa y 12.500 kDa; entre 700 kDa y 10.000 kDa; entre 700 kDa y 7.500 kDa; entre 700 kDa y 6.000 kDa; entre 700 kDa y 5.000 kDa; entre 700 kDa y 4.500 kDa; entre 700 kDa y 4.000 kDa; entre 700 kDa y 3.500 kDa; entre 700 kDa y 3.000 kDa; entre 700 kDa y 2.000 kDa; entre 700 kDa y 1.500 kDa; entre 1.000 kDa y 20.000 kDa; entre 1.000 kDa y 17.500 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 20.000 kDa; entre 2.000 kDa y 17.500 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.

En realizaciones adicionales, el glucoconjugado del serotipo 11A de la invención tiene un peso molecular de entre 3.000 kDa y 20.000 kDa; entre 3.000 kDa y 17.500 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 17.500 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. En realizaciones adicionales, el glucoconjugado del serotipo 11A de la invención tiene un peso molecular de entre 5.000 kDa y 20.000 kDa; entre 5.000 kDa y 17.500 kDa; entre 5.000 kDa y 15.000 kDa; entre 5.000 kDa y 10.000 kDa o entre 5.000 kDa y 7.500 kDa.

50 En una realización, dichos glucoconjugados del serotipo 11A se preparan usando aminación reductora.

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

- 5 En una realización preferida, la relación de mM de acetato por mM de polisacárido capsular del serotipo 11A en el glucoconjugado del serotipo 11A a los mM de acetato por mM de polisacárido capsular del serotipo 11A en el polisacárido aislado es de al menos 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9 o 0,95. En una realización preferida, la relación de mM de acetato por mM de polisacárido capsular del serotipo 11A en el glucoconjugado del serotipo 11A a los mM de acetato por mM de polisacárido capsular del serotipo 11A en el polisacárido aislado es de al menos 0,7.
- 10 En una realización preferida, la relación de mM de acetato por mM de polisacárido capsular del serotipo 11A en el glucoconjugado del serotipo 11A a los mM de acetato por mM de polisacárido capsular del serotipo 11A en el polisacárido aislado es de al menos 0,9. En una realización preferida, se determina la presencia de grupos O-acetilo mediante análisis de HPLC de iones.

- 15 En una realización preferida, la relación de mM de acetato por mM de polisacárido capsular del serotipo 11A en el glucoconjugado del serotipo 11A a los mM de acetato por mM de polisacárido capsular del serotipo 11A en el polisacárido activado es de al menos 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9 o 0,95. En una realización preferida, la relación de mM de acetato por mM de polisacárido capsular del serotipo 11A en el glucoconjugado del serotipo 11A a los mM de acetato por mM de polisacárido capsular del serotipo 11A en el polisacárido activado es de al menos 0,7. En una realización preferida, la relación de mM de acetato por mM de polisacárido capsular del serotipo 11A en el glucoconjugado del serotipo 11A a los mM de acetato por mM de polisacárido capsular del serotipo 11A en el polisacárido activado es de al menos 0,9. En una realización preferida, se determina la presencia de grupos O-acetilo mediante análisis de HPLC de iones.
- 20

- 25 En una realización preferida, el glucoconjugado 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 1,0 mM de glicerol por mM de polisacárido del serotipo 11A. En una realización preferida, el glucoconjugado 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 glucoconjugado 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 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 glucoconjugado del serotipo 11A de la invención comprende al menos 0,3, 0,4, 0,5, 0,6 o 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. Se contempla como una realización de la divulgación cualquiera de los números anteriores.
- 30

Otra forma de caracterizar los glucoconjugados del serotipo 11A de la invención es por el número de restos de lisina en la proteína portadora (por ejemplo, CRM<sub>197</sub>) que se conjugan al sacárido que se puede caracterizar como un intervalo de lisinas conjugadas (grado de conjugación).

- 35 La evidencia de la modificación con lisina de la proteína portadora, debido a los enlaces covalentes en los polisacáridos, puede obtenerse mediante análisis de aminoácidos usando procedimientos rutinarios conocidos por los expertos en la materia. La conjugación da como resultado una reducción en el número de restos de lisina abarcados en comparación con el material de partida de proteína CRM<sub>197</sub> usado para generar los materiales conjugados.
- 40 En una realización preferida, el grado de conjugación del glucoconjugado del serotipo 11A de la invención es de entre 1 y 15, entre 1 y 13, entre 1 y 10, entre 1 y 8, entre 1 y 6, entre 1 y 5, entre 1 y 4, 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 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 glucoconjugado del serotipo 11A de la invención es de aproximadamente 1, 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 glucoconjugado del serotipo 11A de la invención es de entre 1 y 6 o entre 2 y 5. En algunas realizaciones de este tipo, la proteína portadora es CRM<sub>197</sub>.
- 45

- 50 Los glucoconjugados del serotipo 11A de la invención también pueden caracterizarse por la relación (peso/peso) de sacárido a proteína portadora. En algunas realizaciones, la relación de sacárido a proteína portadora (p/p) es de entre 0,2 y 4 (por ejemplo, aproximadamente 0,2, aproximadamente 0,3, aproximadamente 0,4, 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, aproximadamente 3,0, aproximadamente 3,1, aproximadamente 3,2, aproximadamente 3,3, aproximadamente 3,4, aproximadamente 3,5, aproximadamente 3,6, aproximadamente 3,7, aproximadamente 3,8, aproximadamente 3,9 o aproximadamente 4,0). En otras realizaciones, la relación de sacárido a proteína portadora (p/p) es de entre 0,7 y 2,5, entre 0,8 y 2,0, entre 0,7 y 2,0, entre 0,8 y 1,5, entre 0,7 y 1,5, entre 0,7 y 1,4, entre 0,8 y 1,4, entre 0,7 y 1,45 o entre 0,8 y 1,45. En
- 60

realizaciones adicionales, la relación de sacárido a proteína portadora (p/p) es de entre 0,8 y 1,6 (por ejemplo, aproximadamente 0,8, aproximadamente 0,9, aproximadamente 1,0, aproximadamente 1,1, aproximadamente 1,2, aproximadamente 1,3, aproximadamente 1,4, aproximadamente 1,5 o aproximadamente 1,6). En algunas realizaciones de este tipo, la proteína portadora es CRM<sub>197</sub>. En una realización, dichos glucoconjugados del serotipo 11A se preparan usando aminación reductora.

Los glucoconjugados del serotipo 11A y las composiciones inmunogénicas de la invención pueden contener sacárido libre que no está conjugado covalentemente a la proteína portadora, pero, sin embargo, está presente en la composición del glucoconjugado. El sacárido libre puede estar asociado no covalentemente con (es decir, unido no covalentemente a, adsorbido a o atrapado en o con) el glucoconjugado.

En algunas realizaciones, los glucoconjugados del serotipo 11A de la invención comprenden menos de aproximadamente un 50 % de polisacárido capsular del serotipo 11A libre en comparación con la cantidad total de polisacárido capsular del serotipo 11A, menos de aproximadamente un 45 % de sacárido libre, menos de aproximadamente un 40 % de sacárido libre, menos de aproximadamente un 35 % de sacárido libre, menos de aproximadamente un 30 % de sacárido libre, menos de aproximadamente un 25 % de sacárido libre, menos de aproximadamente un 20 % de sacárido libre, menos de aproximadamente un 15 % de sacárido libre, menos de aproximadamente un 10 % de sacárido libre o menos de aproximadamente un 5 % de polisacárido capsular del serotipo 11A en comparación con la cantidad total de polisacárido capsular del serotipo 11A. Preferentemente, el glucoconjugado del serotipo 11A comprende menos de un 15 % de sacárido libre, más preferentemente, menos de un 10 % de sacárido libre y aún más preferentemente, menos de un 5 % de sacárido libre.

Los glucoconjugados del serotipo 11A también pueden caracterizarse por su distribución de tamaño molecular ( $K_d$ ). Pueden usarse medios de cromatografía de exclusión por tamaños (CL-4B) para determinar la distribución relativa de tamaños moleculares del conjugado, como se ha mencionado anteriormente. En una realización preferida, al menos un 30 % de los glucoconjugados del serotipo 11A de la invención tiene una  $K_d$  menor o igual a 0,3 en una columna CL-4B. En una realización preferida, al menos un 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 % u 85 % de los glucoconjugados del serotipo 11A de la invención tiene una  $K_d$  menor o igual a 0,3 en una columna CL-4B. En una realización preferida, al menos un 60 % de los glucoconjugados del serotipo 11A de la invención tiene una  $K_d$  menor o igual a 0,3 en una columna CL-4B. En una realización preferida, al menos un 65 % de los glucoconjugados del serotipo 11A de la invención tiene una  $K_d$  menor o igual a 0,3 en una columna CL-4B.

### 1.3.8 Glucoconjugados del serotipo 8 de *S. pneumoniae* de las composiciones inmunogénicas de la invención

En una realización, los glucoconjugados del serotipo 8 se obtienen activando el polisacárido con tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino piridinio (CDAP) para formar un éster de cianato. El polisacárido activado puede acoplarse directamente o mediante un grupo espaciador (enlazador) a un grupo amino en la proteína portadora. Por ejemplo, el espaciador puede ser cistamida o cisteamida 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 con maleimida (por ejemplo, usando GMBS) o una proteína portadora haloacetilada (por ejemplo, usando yodoacetimida, SIB, SIAB, sulfo-SIAB, SIA o SBAP). Preferentemente, el éster de cianato (opcionalmente preparado mediante química de CDAP) se acopla con hexano diamina o dihidrazida del ácido adípico (ADH) y el sacárido derivatizado con amino se conjuga a la proteína portadora usando química de carbodiimida (por ejemplo, EDAC o EDC) a través de un grupo carboxilo en la proteína portadora. Dichos conjugados se describen, por ejemplo, en los documentos WO 93/15760, WO 95/08348 y WO 96/129094.

Otras técnicas adecuadas usan carbodiimidias, hidrazidas, ésteres activos, norborano, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S--NHS, EDC, TSTU. Muchas se describen en la Publicación de Solicitud Internacional de Patente n.º WO 98/42721. La conjugación puede implicar un enlazador de carbonilo que puede formarse mediante reacción de un grupo hidroxilo libre del sacárido con CDI (véase Bethell y col. (1979) J. Biol. Chem. 254:2572-2574; Hearn y col. (1981) J. Chromatogr. 218:509-518) seguido de la 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 realizaciones preferidas, los glucoconjugados del serotipo 8 de la invención se preparan usando aminación reductora. La aminación reductora implica dos etapas, (1) oxidación del polisacárido para generar funcionalidades aldehído a partir de los dioles vecinos en la unidad de hexasacárido individual, (2) reducción del polisacárido activado y una proteína portadora para formar un conjugado.

Antes de la oxidación, el polisacárido del serotipo 8 opcionalmente se hidroliza para reducir su viscosidad. Puede emplearse hidrólisis mecánica o química. La hidrólisis química puede llevarse a cabo usando ácido acético.

La etapa de oxidación puede implicar la reacción con peryodato. A efectos de la presente invención, el término "peryodato" incluye tanto peryodato como ácido peryódico; el término también incluye tanto metaperyodato ( $IO_4^-$ )

como ortoperyodato ( $\text{IO}_6^{5-}$ ) y las diversas sales de peryodato (por ejemplo, peryodato de sodio y peryodato de potasio). En una realización el polisacárido capsular del serotipo 8 de *S. pneumoniae* se oxida en presencia de metaperyodato, preferentemente en presencia de peryodato de sodio ( $\text{NaIO}_4$ ). En otra realización, el polisacárido capsular del serotipo 8 se oxida en presencia de ortoperyodato, preferentemente en presencia de ácido peryódico.

5 Después de la etapa de oxidación del polisacárido, se dice que el polisacárido está activado y se denomina a continuación en el presente documento "polisacárido activado". El polisacárido activado puede purificarse y liofilizarse (criodesecarse).

10 El polisacárido activado y la proteína portadora pueden liofilizarse (criodesecarse), ya sea de manera independiente (liofilización individual) o juntos (liofilización conjunta). En una realización, el polisacárido activado y la proteína portadora se liofilizan juntos. En otra realización, el polisacárido activado y la proteína portadora se liofilizan de manera independiente.

En una realización, la liofilización se produce en presencia de un azúcar no reductor, los posibles azúcares no reductores incluyen sacarosa, trehalosa, rafinosa, estaquiosa, melezitosa, dextrano, manitol, lactitol y Palatinit.

15 La segunda etapa del procedimiento de conjugación es la reducción del polisacárido activado y una proteína portadora para formar un conjugado (aminación reductora), usando un agente reductor. Los agentes reductores que son adecuados incluyen los cianoborohidruros, tales como cianoborohidruro de sodio, borano-piridina o resina de intercambio de borohidruro. En una realización, el agente reductor es cianoborohidruro de sodio.

20 En una realización, la reacción de reducción se lleva a cabo en disolvente acuoso, en otra realización, la reacción se lleva a cabo en un disolvente aprótico. En una realización, la reacción de reducción se lleva a cabo en disolvente de DMSO (dimetilsulfóxido) o en DMF (dimetilformamida). El disolvente de DMSO o DMF puede usarse para reconstituir el polisacárido activado y la proteína portadora que se han liofilizado.

25 En una realización, entre 0,1 y 3,0, entre 0,15 y 2,0, entre 0,2 y 1,0 o entre 0,25 y 0,5 equivalentes molares de cianoborohidruro de sodio se usan en la reacción de reducción. En una realización, se usan 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,9 o 3,0 equivalentes molares de cianoborohidruro de sodio en la reacción de reducción.

En una realización, el agente reductor es triacetoxiborohidruro de sodio. En una realización adicional, se usan entre 1,0 y 6,0 equivalentes molares, entre 2,0 y 5,0 equivalentes molares o aproximadamente 3,0 equivalentes molares de triacetoxiborohidruro de sodio en la reacción de reducción.

30 Al final de la reacción de reducción, pueden quedar grupos aldehído sin reaccionar en los conjugados, estos pueden protegerse usando un agente de protección adecuado. En una realización, este agente de protección es borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ). En una realización, la protección se logra mezclando la reacción de reducción con entre 0,5 y 5,0 equivalentes molares de  $\text{NaBH}_4$ , por ejemplo, aproximadamente 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 o 3,0 equivalentes molares de  $\text{NaBH}_4$ .

35 Después de la conjugación (la reacción de reducción y opcionalmente la protección), los glucoconjugados pueden purificarse. Los glucoconjugados pueden purificarse mediante diafiltración y/o cromatografía de intercambio iónico y/o cromatografía de exclusión por tamaños. En una realización, los glucoconjugados se purifican mediante diafiltración o cromatografía de intercambio iónico o cromatografía de exclusión por tamaños.

En una realización, los glucoconjugados se esterilizan por filtración.

40 En algunas realizaciones, los glucoconjugados del serotipo 8 de la presente invención se conjugan a la proteína portadora (por ejemplo, CRM<sub>197</sub>) y comprenden un sacárido que tiene un peso molecular de entre 10 kDa y 2.000 kDa. En otras realizaciones de este tipo, el sacárido tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 2.000 kDa. En realizaciones adicionales de este tipo, el sacárido tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 1.750 kDa; entre 50 kDa y 1.500 kDa; entre 50 kDa y 1.250 kDa; entre 50 kDa y 1.000 kDa; entre 50 kDa y 750 kDa; entre 50 kDa y 500 kDa; entre 100 kDa y 2.000 kDa; entre 100 kDa y 1.750 kDa; entre 100 kDa y 1.500 kDa; entre 100 kDa y 1.250 kDa; entre 100 kDa y 1.000 kDa; entre 100 kDa y 750 kDa; entre 100 kDa y 500 kDa; entre 200 kDa y 2.000 kDa; entre 200 kDa y 1.750 kDa; entre 200 kDa y 1.500 kDa; entre 200 kDa y 1.250 kDa; entre 200 kDa y 1.000 kDa; entre 200 kDa y 750 kDa; o entre 200 kDa y 500 kDa; o entre 200 kDa y 400 kDa. En una realización, dichos glucoconjugados del serotipo 8 se preparan usando aminación reductora.

50 En algunas realizaciones, el glucoconjugado del serotipo 8 de la invención tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 20.000 kDa. En otras realizaciones, el glucoconjugado del serotipo 8 tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 15.000 kDa. En otras realizaciones, el glucoconjugado del serotipo 8 tiene un peso molecular de entre 500 kDa y 10.000 kDa. En otras realizaciones, el glucoconjugado del serotipo 8 tiene un peso molecular de entre 200 kDa y 10.000 kDa. En otras realizaciones más, el glucoconjugado del serotipo 8 tiene un peso molecular de entre 1.000 kDa y 8.000 kDa o de entre 2.000 kDa y 8.000 kDa.

55 En realizaciones adicionales, el glucoconjugado del serotipo 8 de la invención tiene un peso molecular de entre 200

5 kDa y 20.000 kDa; entre 200 kDa y 15.000 kDa; entre 200 kDa y 10.000 kDa; entre 200 kDa y 7.500 kDa; entre 200 kDa y 5.000 kDa; entre 200 kDa y 3.000 kDa; entre 200 kDa y 1.000 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.

15 En realizaciones adicionales, el glucoconjugado del serotipo 8 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. En realizaciones adicionales, el glucoconjugado del serotipo 8 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 o entre 5.000 kDa y 7.500 kDa. En realizaciones adicionales, el glucoconjugado del serotipo 8 de la invención tiene un peso molecular de entre 6.000 kDa y 20.000 kDa; entre 6.000 kDa y 15.000 kDa; entre 6.000 kDa y 10.000 kDa o entre 6.000 kDa y 7.500 kDa. En realizaciones adicionales, el glucoconjugado del serotipo 8 de la invención tiene un peso molecular de entre 7.000 kDa y 20.000 kDa; entre 7.000 kDa y 15.000 kDa; entre 7.000 kDa y 10.000 kDa o entre 7.000 kDa y 8.000 kDa. En realizaciones adicionales, el glucoconjugado del serotipo 8 de la invención tiene un peso molecular de entre 8.000 kDa y 20.000 kDa; entre 8.000 kDa y 15.000 kDa; o entre 8.000 kDa y 10.000 kDa.

25 En una realización, dichos glucoconjugados del serotipo 8 se preparan usando aminación reductora.

Otra forma de caracterizar los glucoconjugados del serotipo 8 de la invención es por el número de restos de lisina en la proteína portadora (por ejemplo, CRM<sub>197</sub>) que se conjugan al sacárido que se puede caracterizar como un intervalo de lisinas conjugadas (grado de conjugación).

30 La evidencia de la modificación con lisina de la proteína portadora, debido a los enlaces covalentes en los polisacáridos, puede obtenerse mediante análisis de aminoácidos usando procedimientos rutinarios conocidos por los expertos en la materia. En realizaciones frecuentes, la proteína portadora se conjuga covalentemente al polisacárido activado a través de un enlace de amina a uno o más grupos ε-amino de los restos de lisina en la proteína portadora. En algunas realizaciones de este tipo, la proteína portadora comprende de 2 a 20 restos de lisina conjugados de manera covalente con el sacárido. En otras realizaciones de este tipo, la proteína portadora comprende de 4 a 16 o de 6 a 14 restos de lisina conjugados covalentemente al sacárido.

40 En una realización preferida, el grado de conjugación del glucoconjugado del serotipo 8 de la invención es entre 2 y 20, 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 glucoconjugado del serotipo 8 de la invención es 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 glucoconjugado del serotipo 8 de la invención es de entre 4 y 16 o entre 6 y 14. En algunas realizaciones de este tipo, la proteína portadora es CRM<sub>197</sub>.

45 En una realización preferida, la proteína portadora comprende CRM<sub>197</sub>, que contiene 39 restos de lisina. En algunas realizaciones de este tipo, la CRM<sub>197</sub> puede comprender entre 4 y 16 o entre 6 y 14 restos de lisina de los 39 unidos covalentemente al sacárido. Otro modo de expresar este parámetro es que de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 41 % o de aproximadamente un 15 % a aproximadamente un 36 % de las lisinas de CRM<sub>197</sub> están enlazadas covalentemente al sacárido. En otra realización de este tipo, la CRM<sub>197</sub> puede comprender de 2 a 20 restos de lisina de los 39 unidos covalentemente al sacárido. Otro modo de expresar este parámetro es que de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 50 % de las lisinas de CRM<sub>197</sub> están enlazadas covalentemente al sacárido. En algunas realizaciones de este tipo, la CRM<sub>197</sub> puede comprender aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 restos de lisina de los 39 enlazados covalentemente al sacárido.

55 Los glucoconjugados del serotipo 8 de la invención también pueden caracterizarse por la relación (peso/peso) de sacárido a proteína portadora. En algunas realizaciones, la relación de sacárido a proteína portadora (p/p) es de entre 0,2 y 4,0 (por ejemplo, aproximadamente 0,2, aproximadamente 0,3, aproximadamente 0,4, 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, aproximadamente 3,0, aproximadamente 3,1, aproximadamente 3,2, aproximadamente 3,3, aproximadamente 3,4, aproximadamente 3,5, aproximadamente 3,6, aproximadamente 3,7, aproximadamente 3,8, aproximadamente 3,9 o aproximadamente 4,0). En otras realizaciones, la relación de sacárido a proteína portadora (p/p) es de entre 0,7 y 2,5. En realizaciones adicionales, la relación de sacárido a proteína portadora (p/p) es de entre 0,8 y 1,5 (por ejemplo, aproximadamente 0,8, aproximadamente 0,9, aproximadamente 1,0, aproximadamente 1,1, aproximadamente 1,2, aproximadamente 1,3, aproximadamente 1,4 o aproximadamente 1,5). En algunas realizaciones de este tipo, la proteína portadora es CRM<sub>197</sub>. En una realización, dichos glucoconjugados del serotipo 8 se preparan usando aminación reductora.

Los glucoconjugados del serotipo 8 y las composiciones inmunogénicas de la invención pueden contener sacárido libre que no está conjugado covalentemente a la proteína portadora, pero, sin embargo, está presente en la composición del glucoconjugado. El sacárido libre puede estar asociado no covalentemente con (es decir, unido no covalentemente a, adsorbido a o atrapado en o con) el glucoconjugado.

En algunas realizaciones, los glucoconjugados del serotipo 8 de la invención comprenden menos de aproximadamente un 50 % de sacárido libre, menos de aproximadamente un 45 % de sacárido libre, menos de aproximadamente un 40 % de sacárido libre, menos de aproximadamente un 35 % de sacárido libre, menos de aproximadamente un 30 % de sacárido libre, menos de aproximadamente un 25 % de sacárido libre, menos de aproximadamente un 20 % de sacárido libre, menos de aproximadamente un 15 % de sacárido libre, menos de aproximadamente el 10 % de sacáridos libres, o menos de aproximadamente el 5 % de sacáridos libres en relación con la cantidad total de sacárido del serotipo 8. Preferentemente, el glucoconjugado del serotipo 8 comprende menos de un 15 % de sacárido libre, más preferentemente, menos de un 10 % de sacárido libre y aún más preferentemente, menos de un 5 % de sacárido libre.

Los glucoconjugados del serotipo 8 también pueden caracterizarse por su distribución de tamaño molecular ( $K_d$ ). Pueden usarse medios de cromatografía de exclusión por tamaños (CL-4B) para determinar la distribución relativa de tamaños moleculares del conjugado. La cromatografía de exclusión por tamaños (SEC) se usa en columnas alimentadas por gravedad para elaborar perfiles de la distribución de tamaños moleculares de los conjugados. Las moléculas grandes excluidas de los poros en los medios se eluyen más rápidamente que las moléculas pequeñas. Se usan colectores de fracciones para recoger el eluato de la columna. Las fracciones se evalúan colorimétricamente mediante un ensayo de sacáridos. Para la determinación de la  $K_d$ , las columnas se calibran para establecer la fracción en la que las moléculas se excluyen por completo ( $V_0$ ), ( $K_d=0$ ) y la fracción que representa la máxima retención ( $V_i$ ), ( $K_d=1$ ). La fracción en la que se alcanza un atributo de la muestra especificado ( $V_e$ ), se relaciona con  $K_d$  mediante la expresión,  $K_d = (V_e - V_0) / (V_i - V_0)$ .

En una realización preferida, al menos un 40 % de los glucoconjugados del serotipo 8 de la invención tiene una  $K_d$  menor o igual a 0,3 en una columna CL-4B. En una realización preferida, al menos un 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 % u 85 % de los glucoconjugados del serotipo 8 de la invención tiene una  $K_d$  menor o igual a 0,3 en una columna CL-4B. En una realización preferida, al menos un 60 % de los glucoconjugados del serotipo 8 de la invención tiene una  $K_d$  menor o igual a 0,3 en una columna CL-4B. En una realización preferida, al menos un 70 % de los glucoconjugados del serotipo 8 de la invención tiene una  $K_d$  menor o igual a 0,3 en una columna CL-4B.

En una realización preferida, entre un 40 % y un 90 % de los glucoconjugados del serotipo 8 tiene una  $K_d$  menor o igual a 0,3 en una columna CL-4B. En una realización preferida, entre un 50 % y un 90 % de los glucoconjugados del serotipo 8 tiene una  $K_d$  menor o igual a 0,3 en una columna CL-4B. En una realización preferida, entre un 65 % y un 80 % de los glucoconjugados del serotipo 8 tiene una  $K_d$  menor o igual a 0,3 en una columna CL-4B.

#### 1.4 Combinaciones de glucoconjugados de la invención

La composición inmunogénica de la invención comprende al menos un glucoconjugado del serotipo 22F de *S. pneumoniae*, en la que, dicho glucoconjugado del serotipo 22F tiene un peso molecular de entre 1000 kDa y 12.500 kDa, en el que la relación de sacárido a proteína portadora (p/p) es de entre 0,8 y 1,2 y en el que dicha proteína portadora es CRM<sub>197</sub>.

En una realización, la composición inmunogénica de la invención comprende al menos un glucoconjugado de cada uno de los siete serotipos a continuación de *S. pneumoniae*: 15B y 22F y 33F y 12F y 10A y 11A y 8.

En una realización, los glucoconjugados de los serotipos de *S. pneumoniae* 15B, 22F, 33F, 12F, 10A, 11A y/u 8 de cualquiera de las composiciones inmunogénicas definidas en esta sección son como se desvelan en las secciones 1.3.2 a 1.3.8 anteriores.

En una realización, cualquiera de las composiciones inmunogénicas anteriores comprende además glucoconjugados de los serotipos de *S. pneumoniae* 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F (tales como los glucoconjugados de la sección 1.3.1 anterior).

En una realización cualquiera de las composiciones inmunogénicas anteriores comprende además glucoconjugados de los serotipos de *S. pneumoniae* 1, 5 y 7F (tales como los glucoconjugados de la sección 1.3.1 anterior).

En una realización cualquiera de las composiciones inmunogénicas anteriores comprende además glucoconjugados de los serotipos de *S. pneumoniae* 6A y 19A (tales como los glucoconjugados de la sección 1.3.1 anterior).

En una realización cualquiera de las composiciones inmunogénicas anteriores comprende además glucoconjugados del serotipo 3 de *S. pneumoniae* (tales como los glucoconjugados de la sección 1.3.1 anterior).

- 5 Preferentemente, todos los glucoconjugados de las composiciones inmunogénicas anteriores se conjugan individualmente a la proteína portadora.

Los glucoconjugados del serotipo 22F de *S. pneumoniae* se conjugan a CRM<sub>197</sub>. En una realización de cualquiera de las composiciones inmunogénicas anteriores, los glucoconjugados del serotipo 33F de *S. pneumoniae* se conjugan a CRM<sub>197</sub>. En una realización de cualquiera de las composiciones inmunogénicas anteriores, los glucoconjugados del serotipo 15B de *S. pneumoniae* se conjugan a CRM<sub>197</sub>. En una realización de cualquiera de las composiciones inmunogénicas anteriores, los glucoconjugados del serotipo 12F de *S. pneumoniae* se conjugan a CRM<sub>197</sub>. En una realización de cualquiera de las composiciones inmunogénicas anteriores, los glucoconjugados del serotipo 10A de *S. pneumoniae* se conjugan a CRM<sub>197</sub>. En una realización de cualquiera de las composiciones inmunogénicas anteriores, los glucoconjugados del serotipo 11A de *S. pneumoniae* se conjugan a CRM<sub>197</sub>. En una realización de cualquiera de las composiciones inmunogénicas anteriores, los glucoconjugados del serotipo 8 de *S. pneumoniae* se conjugan a CRM<sub>197</sub>. En una realización de cualquiera de las composiciones inmunogénicas anteriores, los glucoconjugados de los serotipos de *S. pneumoniae* 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F se conjugan a CRM<sub>197</sub>. En una realización de cualquiera de las composiciones inmunogénicas anteriores, los glucoconjugados de los serotipos de *S. pneumoniae* 1, 5 y 7F se conjugan a CRM<sub>197</sub>. En una realización de cualquiera de las composiciones inmunogénicas anteriores, los glucoconjugados de los serotipos de *S. pneumoniae* 6A y 19A se conjugan a CRM<sub>197</sub>. En una realización de cualquiera de las composiciones inmunogénicas anteriores, los glucoconjugados del serotipo 3 de *S. pneumoniae* se conjugan a CRM<sub>197</sub>.

En una realización, los glucoconjugados de cualquiera de las composiciones inmunogénicas anteriores se conjugan individualmente a CRM<sub>197</sub>.

- 25 En una realización, los glucoconjugados de los serotipos de *S. pneumoniae* 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 y/o 23F de cualquiera de las composiciones inmunogénicas anteriores se conjugan a PD.

En una realización, el glucoconjugado del serotipo 18C de *S. pneumoniae* de cualquiera de las composiciones inmunogénicas anteriores se conjuga a TT.

- 30 En una realización, el glucoconjugado del serotipo 19F de *S. pneumoniae* de cualquiera de las composiciones inmunogénicas anteriores se conjuga a DT.

En una realización, los glucoconjugados de los serotipos de *S. pneumoniae* 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 y/o 23F de cualquiera de las composiciones inmunogénicas anteriores se conjugan individualmente a PD, el glucoconjugado del serotipo 18C de *S. pneumoniae* se conjuga a TT y el glucoconjugado del serotipo 19F de *S. pneumoniae* se conjuga a DT.

- 35 En una realización, las composiciones inmunogénicas anteriores comprenden de 8 a 20 serotipos diferentes de *S. pneumoniae*. En una realización, las composiciones inmunogénicas anteriores comprenden glucoconjugados de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 serotipos diferentes. En una realización, las composiciones inmunogénicas anteriores comprenden glucoconjugados de 16 o 20 serotipos diferentes.

- 40 En una realización, las composiciones inmunogénicas anteriores son composiciones antineumocócicas conjugadas 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20-valentes. En una realización, las composiciones inmunogénicas anteriores son composiciones antineumocócicas conjugadas 14, 15, 16, 17, 18 o 19-valentes. En una realización, las composiciones inmunogénicas anteriores son composiciones antineumocócicas conjugadas 16-valentes. En una realización, las composiciones inmunogénicas anteriores son composiciones antineumocócicas conjugadas 19-valentes.

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

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

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

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

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

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

Preferentemente, todos los glucoconjugados de la composición inmunogénica de la invención están conjugados individualmente a la proteína portadora.

En una realización, la composición inmunogénica de la invención comprende de 12 a 20 serotipos diferentes de *S. pneumoniae*. En una realización, la composición inmunogénica de la invención comprende glucoconjugados de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 serotipos diferentes. En una realización, la composición inmunogénica de la invención comprende glucoconjugados de 16 o 20 serotipos diferentes.

Después de la conjugación del polisacárido capsular a la proteína portadora, se purifican los glucoconjugados (enriquecen respecto de la cantidad de conjugado de polisacárido-proteína) mediante diversas técnicas. Estas técnicas incluyen operaciones de concentración/diafiltración, precipitación/elución, cromatografía en columna y filtración de profundidad (véanse, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos n.º 2007/0184072 o el documento WO 2008/079653). Después de purificarse los glucoconjugados individuales, se combinan para formular la composición inmunogénica de la presente invención.

### 1.5 Combinaciones adicionales de glucoconjugados de la invención

En una realización, cualquiera de las composiciones inmunogénicas definidas en la sección 1.4 anterior comprende además, al menos un glucoconjugado del serotipo 9V de *S. pneumoniae*.

En una realización, cualquiera de las composiciones inmunogénicas definidas en la sección 1.4 anterior comprende además, al menos un glucoconjugado de cada uno de los dos serotipos de *S. pneumoniae* seleccionados entre el grupo que consiste en: 9V y 4, 9V y 6B, 9V y 14, 9V y 18C, 9V y 19F, 9V y 23F.

En una realización, cualquiera de las composiciones inmunogénicas definidas en la sección 1.4 anterior comprende además, al menos un glucoconjugado de cada uno de los siete serotipos a continuación de *S. pneumoniae*: 9V, 4, 6B, 14, 18C, 19F y 23F.

En una realización, cualquiera de las composiciones inmunogénicas definidas en la sección 1.4 anterior comprende además, al menos un glucoconjugado de cada uno de los ocho serotipos a continuación de *S. pneumoniae*:

9V y 1 y 4 y 6B y 14 y 18C y 19F y 23F,  
9V y 4 y 5 y 6B y 14 y 18C y 19F y 23F o  
9V y 4 y 6B y 7F y 14 y 18C y 19F y 23F.

En una realización, cualquiera de las composiciones inmunogénicas definidas en la sección 1.4 anterior comprende además, al menos un glucoconjugado de cada uno de los diez serotipos a continuación de *S. pneumoniae*: 9V, 1, 5, 4, 6B, 7F, 14, 18C, 19F y 23F.

En una realización, cualquiera de las composiciones inmunogénicas definidas en la sección 1.4 anterior comprende además, al menos un glucoconjugado de cada uno de los once serotipos a continuación de *S. pneumoniae*:

9V y 1 y 4 y 5 y 6A y 6B y 7F y 14 y 18C y 19F y 23F o  
9V y 1 y 4 y 5 y 6B y 7F y 14 y 18C y 19A y 19F y 23F.

En una realización, cualquiera de las composiciones inmunogénicas definidas en la sección 1.4 anterior comprende además, al menos un glucoconjugado de cada uno de los doce serotipos a continuación de *S. pneumoniae*: 9V, 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 14, 18C, 19A, 19F y 23F.

En una realización, cualquiera de las composiciones inmunogénicas definidas en la sección 1.4 anterior comprende además, al menos un glucoconjugado de cada uno de los trece serotipos a continuación de *S. pneumoniae*: 9V, 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 14, 18C, 19A, 19F y 23F.

En una realización, cualquiera de las composiciones inmunogénicas definidas en la sección 1.4 anterior comprende además al menos un glucoconjugado del serotipo 2 de *S. pneumoniae*.

En una realización, cualquiera de las composiciones inmunogénicas definidas en la sección 1.4 anterior comprende además al menos un glucoconjugado del serotipo 17F de *S. pneumoniae*.

En una realización, cualquiera de las composiciones inmunogénicas definidas en la sección 1.4 anterior comprende además al menos un glucoconjugado del serotipo 20 de *S. pneumoniae*.

En una realización, cualquiera de las composiciones inmunogénicas definidas en la sección 1.4 anterior comprende además al menos un glucoconjugado del serotipo 15C de *S. pneumoniae*.

5 En una realización, cualquiera de las composiciones inmunogénicas definidas en la sección 1.4 anterior comprende además al menos un glucoconjugado del serotipo 9N de *S. pneumoniae*. Preferentemente, todos los glucoconjugados de las composiciones inmunogénicas anteriores se conjugan individualmente a la proteína portadora.

10 En una realización de cualquiera de las composiciones inmunogénicas anteriores, el glucoconjugado del serotipo 9V de *S. pneumoniae* se conjugan a CRM<sub>197</sub>. En una realización de cualquiera de las composiciones inmunogénicas anteriores, los glucoconjugados de los serotipos de *S. pneumoniae* 4, 6B, 14, 18C, 19F y 23F se conjugan a CRM<sub>197</sub>. En una realización de cualquiera de las composiciones inmunogénicas anteriores, los glucoconjugados de los serotipos de *S. pneumoniae* 1, 5 y 7F se conjugan a CRM<sub>197</sub>. En una realización de cualquiera de las composiciones inmunogénicas anteriores, los glucoconjugados de los serotipos de *S. pneumoniae* 6A y 19A se conjugan a CRM<sub>197</sub>. En una realización de cualquiera de las composiciones inmunogénicas anteriores, el glucoconjugado del serotipo 3 de *S. pneumoniae* se conjugan a CRM<sub>197</sub>. En una realización de cualquiera de las composiciones inmunogénicas anteriores, el glucoconjugado del serotipo 2 de *S. pneumoniae* se conjugan a CRM<sub>197</sub>. En una realización de cualquiera de las composiciones inmunogénicas anteriores, el glucoconjugado del serotipo 17F de *S. pneumoniae* se conjugan a CRM<sub>197</sub>. En una realización de cualquiera de las composiciones inmunogénicas anteriores, el glucoconjugado del serotipo 20 de *S. pneumoniae* se conjugan a CRM<sub>197</sub>. En una realización de cualquiera de las composiciones inmunogénicas anteriores, el glucoconjugado del serotipo 15C de *S. pneumoniae* se conjugan a CRM<sub>197</sub>. En una realización de cualquiera de las composiciones inmunogénicas anteriores, el glucoconjugado del serotipo 9N de *S. pneumoniae* se conjugan a CRM<sub>197</sub>.

15 En una realización, los glucoconjugados de las composiciones inmunogénicas anteriores se conjugan individualmente a CRM<sub>197</sub>.

25 En otra realización, el glucoconjugado del serotipo 9V de *S. pneumoniae* de cualquiera de las composiciones inmunogénicas anteriores se conjugan individualmente a PD.

En una realización, los glucoconjugados de los serotipos de *S. pneumoniae* 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 y/o 23F de cualquiera de las composiciones inmunogénicas anteriores se conjugan a PD.

En una realización, el glucoconjugado del serotipo 18C de *S. pneumoniae* de cualquiera de las composiciones inmunogénicas anteriores se conjugan a TT.

30 En una realización, el glucoconjugado del serotipo 19F de *S. pneumoniae* de cualquiera de las composiciones inmunogénicas anteriores se conjugan a DT.

35 En una realización, los glucoconjugados de los serotipos de *S. pneumoniae* 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 y/o 23F de cualquiera de las composiciones inmunogénicas anteriores se conjugan individualmente a PD, el glucoconjugado del serotipo 18C de *S. pneumoniae* se conjugan a TT y el glucoconjugado del serotipo 19F de *S. pneumoniae* se conjugan a DT.

40 En una realización, las composiciones inmunogénicas anteriores comprenden de 7 a 25 serotipos diferentes de *S. pneumoniae*. En una realización, las composiciones inmunogénicas anteriores comprenden glucoconjugados de 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 serotipos diferentes. En una realización, las composiciones inmunogénicas anteriores comprenden glucoconjugados de 16 o 20 serotipos diferentes. En una realización, las composiciones inmunogénicas anteriores son composiciones antineumocócicas conjugadas 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20-valentes. En una realización, las composiciones inmunogénicas anteriores son composiciones antineumocócicas conjugadas 14, 15, 16, 17, 18 o 19-valentes. En una realización, las composiciones inmunogénicas anteriores son composiciones antineumocócicas conjugadas 16-valentes. En una realización, las composiciones inmunogénicas anteriores son composiciones antineumocócicas conjugadas 19-valentes. En una realización, las composiciones inmunogénicas anteriores son composiciones antineumocócicas conjugadas 20-valentes.

45 Después de la conjugación del polisacárido capsular a la proteína portadora, se purifican los glucoconjugados (enriquecen respecto de la cantidad de conjugado de polisacárido-proteína) mediante diversas técnicas. Estas técnicas incluyen operaciones de concentración/diafiltración, precipitación/elución, cromatografía en columna y filtración de profundidad (véanse, por ejemplo, la Publicación de Patente de los Estados Unidos n.º 2007/0184072 o el documento WO 2008/079653). Después de purificarse los glucoconjugados individuales, se combinan para formular la composición inmunogénica de la presente invención.

### 1.6 Combinaciones particulares de glucoconjugados de la invención

55 En una realización, cualquiera de las composiciones inmunogénicas definidas en la sección 1.4 o 1.5 anterior no comprende sacárido capsular del serotipo 9N de *S. pneumoniae*.

En una realización, cualquiera de las composiciones inmunogénicas definida en la sección 1.4 o 1.5 anterior no comprende sacárido capsular del serotipo 9A de *S. pneumoniae*.

En una realización, cualquiera de las composiciones inmunogénicas definida en la sección 1.4 o 1.5 anterior no comprende sacárido capsular del serotipo 9L de *S. pneumoniae*.

- 5 En una realización, cualquiera de las composiciones inmunogénicas definida en la sección 1.4 o 1.5 anterior no comprende sacárido capsular de los serotipos 9N y 9A de *S. pneumoniae*. En una realización, cualquiera de las composiciones inmunogénicas definida en la sección 1.4 o 1.5 anterior no comprende sacárido capsular de los serotipos 9N y 9L de *S. pneumoniae*. En una realización, cualquiera de las composiciones inmunogénicas definida en la sección 1.4 o 1.5 anterior no comprende sacárido capsular de los serotipos 9A y 9L de *S. pneumoniae*. En una realización, cualquiera de las composiciones inmunogénicas definida en la sección 1.4 o 1.5 anterior no comprende sacárido capsular de los serotipos 9N, 9A y 9L de *S. pneumoniae*.

## 2 Dosis de las composiciones inmunogénicas

- 15 La cantidad de los uno o más glucoconjugados en cada dosis se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin efectos secundarios significativos en las vacunas típicas. Dicha cantidad variará dependiendo de qué inmunógeno específico se emplee y de cómo se presente.

### 2.1 Cantidad de glucoconjugado

- 20 La cantidad de un glucoconjugado particular en una composición inmunogénica puede calcularse basándose en el polisacárido total (conjugado y no conjugado) para dicho conjugado. Por ejemplo, un glucoconjugado con un 20 % de polisacárido libre tendrá aproximadamente 80 µg de polisacárido conjugado y aproximadamente 20 µg de polisacárido no conjugado en una dosis de polisacárido de 100 µg. La cantidad de glucoconjugado puede variar dependiendo del serotipo neumocócico. La concentración de sacárido puede determinarse mediante el ensayo de ácido urónico.

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

- 30 En general, cada dosis comprenderá de 0,1 µg a 100 µg de polisacárido para un serotipo dado, en particular, de 0,5 µg a 20 µg, más particularmente, de 1,0 µg a 10 µg y aún más particularmente, de 2,0 µg a 5,0 µg. Se contempla como una realización de la divulgación cualquier número entero dentro de cualquiera de los intervalos anteriores.

- 35 En una realización, cada dosis comprenderá aproximadamente 1,0 µg, aproximadamente 1,2 µg, aproximadamente 1,4 µg, aproximadamente 1,6 µg, aproximadamente 1,8 µg, aproximadamente 2,0 µg, aproximadamente 2,2 µg, aproximadamente 2,4 µg, aproximadamente 2,6 µg, aproximadamente 2,8 µg, aproximadamente 3,0 µg, aproximadamente 3,2 µg, aproximadamente 3,4 µg, aproximadamente 3,6 µg, aproximadamente 3,8 µg, aproximadamente 4,0 µg, aproximadamente 4,2 µg, aproximadamente 4,4 µg, aproximadamente 4,6 µg, aproximadamente 4,8 µg, aproximadamente 5,0 µg, aproximadamente 5,2 µg, aproximadamente 5,4 µg, aproximadamente 5,6 µg, aproximadamente 5,8 µg o aproximadamente 6,0 µg de polisacárido para cada glucoconjugado particular.

- 45 En una realización, cada dosis comprenderá aproximadamente 1,1 µg, aproximadamente 1,2 µg, aproximadamente 1,3 µg, aproximadamente 1,4 µg, aproximadamente 1,5 µg, aproximadamente 1,6 µg, aproximadamente 1,7 µg, aproximadamente 1,8 µg, aproximadamente 1,9 µg, aproximadamente 2,0 µg, aproximadamente 2,1 µg, aproximadamente 2,2 µg, aproximadamente 2,3 µg, aproximadamente 2,4 µg, aproximadamente 2,5 µg, aproximadamente 2,6 µg, aproximadamente 2,7 µg, aproximadamente 2,8 µg, aproximadamente 2,9 µg o aproximadamente 3,0 µg de polisacárido para los glucoconjugados de los serotipos de *S. pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y/o 33F.

- 50 En una realización, cada dosis comprenderá aproximadamente 1,1 µg, aproximadamente 1,2 µg, aproximadamente 1,3 µg, aproximadamente 1,4 µg, aproximadamente 1,5 µg, aproximadamente 1,6 µg, aproximadamente 1,7 µg, aproximadamente 1,8 µg, aproximadamente 1,9 µg, aproximadamente 2,0 µg, aproximadamente 2,1 µg, aproximadamente 2,2 µg, aproximadamente 2,3 µg, aproximadamente 2,4 µg, aproximadamente 2,5 µg, aproximadamente 2,6 µg, aproximadamente 2,7 µg, aproximadamente 2,8 µg, aproximadamente 2,9 µg o aproximadamente 3,0 µg de polisacárido para los glucoconjugados de los serotipos de *S. pneumoniae* 1, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y/o 33F.

- 55 En una realización, cada dosis comprenderá aproximadamente 2,0 µg, aproximadamente 2,2 µg, aproximadamente 2,4 µg, aproximadamente 2,6 µg, aproximadamente 2,8 µg, aproximadamente 3,0 µg, aproximadamente 3,2 µg,

- aproximadamente 3,4 µg, aproximadamente 3,6 µg, aproximadamente 3,8 µg, aproximadamente 4,0 µg, aproximadamente 4,2 µg, aproximadamente 4,4 µg, aproximadamente 4,6 µg, aproximadamente 4,8 µg, aproximadamente 5,0, aproximadamente 5,2 µg, aproximadamente 5,4 µg, aproximadamente 5,6 µg, aproximadamente 5,8 µg o aproximadamente 6,0 µg de polisacárido para los glucoconjugados del serotipo 6B de *S. pneumoniae*.
- 5
- En una realización, cada dosis comprenderá de aproximadamente 1,5 µg a aproximadamente 3,0 µg de polisacárido para cada glucoconjugado de los serotipos de *S. pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F y de aproximadamente 3,0 µg a aproximadamente 6,0 µg de polisacárido para el glucoconjugado del serotipo 6B de *S. pneumoniae*.
- 10
- En una realización, cada dosis comprenderá de aproximadamente 2,0 µg a aproximadamente 2,5 µg de polisacárido para cada glucoconjugado de los serotipos de *S. pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F y de aproximadamente 4,0 µg a aproximadamente 4,8 µg de polisacárido para el glucoconjugado del serotipo 6B de *S. pneumoniae*.
- 15
- En una realización, cada dosis comprenderá aproximadamente 2,2 µg de polisacárido de cada glucoconjugado de los serotipos de *S. pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F y aproximadamente 4,4 µg de polisacárido para el glucoconjugado del serotipo 6B de *S. pneumoniae*.
- 20
- En una realización, cada dosis comprenderá de aproximadamente 1,5 µg a aproximadamente 3,0 µg de polisacárido para cada glucoconjugado de los serotipos de *S. pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F y de aproximadamente 3 µg a aproximadamente 6 µg de polisacárido para el glucoconjugado del serotipo 6B de *S. pneumoniae*.
- 25
- En una realización, cada dosis comprenderá de aproximadamente 2,0 µg a aproximadamente 2,5 µg de polisacárido para cada glucoconjugado de los serotipos de *S. pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F y de aproximadamente 4,0 µg a aproximadamente 4,8 µg de polisacárido para el glucoconjugado del serotipo 6B de *S. pneumoniae*.
- 30
- En una realización, cada dosis comprenderá de aproximadamente 1,5 µg a aproximadamente 3,0 µg de polisacárido para cada glucoconjugado de los serotipos de *S. pneumoniae* 1, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F y de aproximadamente 3,0 µg a aproximadamente 6,0 µg de polisacárido para el glucoconjugado del serotipo 6B de *S. pneumoniae*.
- 35
- En una realización, cada dosis comprenderá de aproximadamente 2,0 µg a aproximadamente 2,5 µg de polisacárido para cada glucoconjugado de los serotipos de *S. pneumoniae* 1, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F y de aproximadamente 4,0 µg a aproximadamente 4,8 µg de polisacárido para el glucoconjugado del serotipo 6B de *S. pneumoniae*.
- 40
- En una realización, cada dosis comprenderá aproximadamente 2,2 µg de polisacárido de cada glucoconjugado de los serotipos de *S. pneumoniae* 1, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F y aproximadamente 4,4 µg de polisacárido para el glucoconjugado del serotipo 6B de *S. pneumoniae*.
- 45
- En una realización, cada dosis comprenderá de aproximadamente 1,5 µg a aproximadamente 3,0 µg de polisacárido para cada glucoconjugado de los serotipos de *S. pneumoniae* 1, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F y de aproximadamente 3,0 µg a aproximadamente 6,0 µg de polisacárido para el glucoconjugado del serotipo 6B de *S. pneumoniae*.
- 50
- En una realización, cada dosis comprenderá de aproximadamente 2,0 µg a aproximadamente 2,5 µg de polisacárido para cada glucoconjugado de los serotipos de *S. pneumoniae* 1, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F y de aproximadamente 4,0 µg a aproximadamente 4,8 µg de polisacárido para el glucoconjugado del serotipo 6B de *S. pneumoniae*.
- En una realización, cada dosis comprenderá aproximadamente 2,2 µg de polisacárido de cada glucoconjugado de los serotipos de *S. pneumoniae* 1, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F y aproximadamente 4,4 µg de polisacárido para el glucoconjugado del serotipo 6B de *S. pneumoniae*.
- 2.2 Cantidad de portador**
- En general, cada dosis comprenderá de 10 µg a 150 µg de proteína portadora, en particular, de 15 µg a 100 µg de proteína portadora, más particularmente, de 25 µg a 75 µg de proteína portadora y aún más particularmente, de 40 µg a 60 µg de proteína portadora. En una realización, dicha proteína portadora es CRM<sub>197</sub>.
- 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, 5 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, 10 aproximadamente 64 µg, aproximadamente 65 µg, aproximadamente 66 µg, aproximadamente 67 µg, aproximadamente 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 una realización, dicha proteína portadora es CRM<sub>197</sub>.

### 3 Antígenos adicionales

15 Las composiciones inmunogénicas de la invención comprenden antígenos de sacárido conjugados (glucoconjugados) de *S. pneumoniae*. También pueden incluir adicionalmente antígenos de otros patógenos, en particular, de bacterias y/o virus. Los antígenos adicionales preferidos se seleccionan entre: un toxoide diftérico (D), un toxoide tetánico (T), un antígeno tosferínico (P), que es normalmente 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* de tipo b (Hib), vacuna de poliovirus inactivada (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.

25 Antígenos tosferínicos: La *Bordetella pertussis* provoca la tosferina. Los antígenos tosferínicos en las vacunas son o bien celulares (célula completa, en forma de células de *B. pertussis* inactivadas) o acelulares. La preparación de antígenos tosferínicos celulares está bien documentada (por ejemplo, pueden obtenerse mediante inactivación por calor de un cultivo de fase I de *B. pertussis*). Preferentemente, sin embargo, la invención usa antígenos acelulares. Cuando se usan antígenos acelulares, se prefiere usar uno, dos o (preferentemente) tres de los siguientes

30 antígenos: (1) toxina tosferínica detoxificada (toxoide tosferínico o PT); (2) hemaglutinina filamentososa (FHA); (3) pertactina (también conocida como la proteína de la membrana externa de 69 kiloDalton). La FHA y la pertactina pueden tratarse con formaldehído antes de su uso de acuerdo con la invención. La PT se detoxifica preferentemente mediante tratamiento con formaldehído y/o glutaraldehído. Los antígenos tosferínicos acelulares se adsorben preferentemente en uno o más adyuvantes de sal de aluminio. Como alternativa, pueden añadirse en un estado no

35 adsorbido. Cuando se añade pertactina, esta se encuentra preferentemente ya adsorbida en un adyuvante de hidróxido de aluminio. La PT y la FHA pueden adsorberse en un adyuvante de hidróxido de aluminio o un fosfato de aluminio. Lo más preferido es la adsorción de todas de PT, FHA y pertactina en hidróxido de aluminio.

Vacuna del poliovirus inactivada: El virus de la polio causa la poliomielitis. EN lugar de usar vacuna oral contra la polio, las realizaciones preferidas de la invención usan IPV. Antes de su administración a los pacientes, los poliovirus han de inactivarse y esto puede lograrse mediante tratamiento con formaldehído. La poliomielitis puede estar provocada por uno de los tres tipos de poliovirus. Los tres tipos son similares y provocan síntomas idénticos, pero son antígenicamente diferente y la infección por un tipo no protege frente a la infección por los otros. Por lo tanto, se prefiere usar 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). Los virus preferentemente se cultivan, purifican e inactivan individualmente y después se combinan para dar una mezcla

40 trivalente en bruto para su uso con la invención.

Toxoide diftérico: La *Corynebacterium diphtheriae* causa la difteria. La toxina diftérica puede tratarse (por ejemplo, usando formalina o formaldehído) para eliminar la toxicidad a la vez que se conserva la capacidad para inducir anticuerpos anti-toxina específicos después de la inyección. Estos toxoides diftéricos se usan en las vacunas contra la difteria. Los toxoides diftéricos preferidos son aquellos preparados mediante tratamiento con formaldehído. El toxoide diftérico puede obtenerse cultivando *C. diphtheriae* en medio de crecimiento, seguido de tratamiento con formaldehído, ultrafiltración y precipitación. El material convertido en toxoide puede tratarse posteriormente mediante un procedimiento que comprende esterilización por filtración y/o diálisis. El toxoide diftérico se adsorbe preferentemente en un adyuvante de hidróxido de aluminio.

50

Toxoide tetánico: La *Clostridium tetani* provoca el tétanos. La toxina tetánica puede tratarse para obtener un toxoide protector. Los toxoides se usan en las vacunas contra el tétanos. Los toxoides tetánicos preferidos son aquellos preparados mediante tratamiento con formaldehído. El toxoide tetánico puede obtenerse cultivando *C. tetani* en medio de crecimiento, seguido de tratamiento con formaldehído, ultrafiltración y precipitación. El material puede tratarse posteriormente mediante un procedimiento que comprende esterilización por filtración y/o diálisis.

60 Antígenos del virus de la hepatitis A: El virus de la hepatitis A (VHA) es uno de los agentes conocidos que provoca

hepatitis vírica. Un componente preferido del VHA está basado en virus inactivados y la inactivación puede lograrse mediante tratamiento con formalina.

5 El virus de la hepatitis B (VHB) es uno de los agentes conocidos que provoca hepatitis vírica. El principal componente de la cápsida es una proteína conocida como antígeno de superficie del VHB o, más comúnmente, HBsAg, que normalmente es 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 una vacuna normal, estimula la producción de anticuerpos anti-HBsAg que protegen frente a la infección por VHB.

10 Para la fabricación de la vacuna, el HBsAg se ha preparado de dos maneras: purificación del antígeno en forma de partícula del plasma de los portadores crónicos del virus de la hepatitis B o expresión de la proteína mediante procedimientos de ADN recombinante (por ejemplo, expresión recombinante en células de levadura). A diferencia del HBsAg (es decir, como en el producto purificado del plasma), el HBsAg expresado en levadura normalmente no está glucosilado y esta es la forma de HBsAg más preferida para su uso con la invención.

15 Antígenos conjugados de *Haemophilus influenzae* de tipo b: La *Haemophilus influenzae* de tipo b (Hib) provoca la meningitis bacteriana. Las vacunas contra Hib normalmente están basadas en el antígeno de sacárido capsular, cuya preparación está bien documentada. El sacárido de Hib puede conjugarse a una proteína portadora para potenciar su inmunogenicidad, especialmente en niños. Las proteínas portadoras típicas son toxoide tetánico, toxoide diftérico, CRM<sub>197</sub>, proteína D de *H. influenzae* y un complejo de proteína de la membrana externa del meningococo del serogrupo B. El resto de sacárido del conjugado puede comprender polirribositol fosfato (PRP) de longitud completa preparado a partir de bacterias de Hib y/o fragmentos de PRP de longitud completa. Los conjugados de Hib pueden estar o no adsorbidos a un adyuvante de sal de aluminio.

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

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

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

#### 4 Adyuvantes

35 En algunas realizaciones, las composiciones inmunogénicas desveladas en el presente documento pueden comprender al menos 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 inmunomodulador o pueden tener fuertes características de ambos. Los adyuvantes adecuados incluyen aquellos adecuados para su uso en mamíferos, incluyendo seres humanos.

40 Los ejemplos de adyuvantes de tipo sistema de administración adecuados conocidos que pueden usarse en seres humanos incluyen, pero sin limitación, alumbre (por ejemplo, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio o hidróxido de aluminio), fosfato cálcico, liposomas, emulsiones de aceite en agua, tales como MF59 (escualeno al 4,3 % p/v, polisorbato 80 (Tween 80) al 0,5 % p/v, trioleato de sorbitán (Span 85) al 0,5 % p/v), emulsiones de agua en aceite, tales como Montanide y micropartículas o nanopartículas de poli(D,L-lactida-co-glicólido) (PLG).

45 En una realización, las composiciones inmunogénicas desveladas 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 desveladas en el presente documento comprenden fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio como adyuvante. En una realización, las composiciones inmunogénicas desveladas 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 desveladas en el presente documento comprenden aproximadamente 0,25 mg/ml de aluminio elemental en forma de fosfato de aluminio. Los ejemplos de adyuvantes de tipo inmunomodulador adecuados conocidos que pueden usarse en seres humanos incluyen, pero sin limitación, extractos de saponina de la corteza de la quillaja (QS21, Quil A), agonistas de TLR4, tales como MPL (lípid A de monofosforilo), 3DMPL (MLP 3-O-desacetilado) o GLA-AQ, mutantes de LT/CT, citocinas, tales como las diversas interleucinas (por ejemplo, IL-2, IL-12) o GM-CSF y similares.

50 Los ejemplos de adyuvantes de tipo inmunomoduladores adecuados conocidos con características tanto de administración como inmunomoduladoras que pueden usarse en seres humanos incluyen, pero sin limitación, ISCOM (véase, por ejemplo, Sjolander y col. (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.

Para aplicaciones veterinarias que incluyen, pero sin limitación, para experimentación con animales, se puede usar adyuvante completo de Freund (ACF), adyuvante incompleto de Freund (AIF), Emulsigen, N-acetil-muramil-L-treoniil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (CGP 11637, denominada nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (CGP 19835A, denominada MTP-PE) y RIBI, que contiene tres componentes extraídos de bacterias, lípido A de monofosforilo, dimicolato de trehalosa y esqueleto de la pared celular (MPL+TDM+CWS) en una emulsión de escualeno al 2 %/Tween 80.

Los adyuvantes ejemplares adicionales para potenciar la eficacia de las vacunas antineumocócicas como se desvelan en el presente documento incluyen, pero sin limitación: (1) formulaciones en emulsión de aceite en agua (con o sin otros agentes inmunoestimuladores específicos, tales como péptidos de muramilo (véase más adelante) o componentes de la pared celular bacteriana), tales como, por ejemplo (a) SAF, que contiene escualeno al 10 %, Tween 80 al 0,4 %, polímero L121 bloqueado con Pluronic al 5 % y thr-MDP o bien microfluidizado en una emulsión submicrométrica o agitado vorticialmente para generar una emulsión de mayor tamaño de partícula y (b) sistema adyuvante RIBI™ (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT) que contiene escualeno al 2 %, Tween 80 al 0,2 % y uno o más componentes de la pared celular bacteriana, tales como lípido A de monofosforilo (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM) y estructura de pared celular (CWS, del inglés *Cell Wall Skeleton*), preferentemente MPL + CWS (DETOX™); (2) adyuvantes de saponina, tales como QS21, STIMULON™ (Cambridge Bioscience, Worcester, MA), ABISCO® (Isconova, Suecia) o ISCOMATRIX® (Commonwealth Serum Laboratories, Australia), pueden usarse o pueden generarse partículas de los mismos, tales como ISCOM (complejos inmunoestimulantes), pudiendo carecer dichos ISCOM de detergente adicional (por ejemplo, el documento WO 00/07621); (3) Adyuvante completo de Freund (ACF) y adyuvante incompleto de Freund (AIF); (4) citocinas, tales como interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 (por ejemplo, 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 A de monofosforilo (MPL) o MPL 3-O-desacetilado (3dMPL) (véanse, por ejemplo, los documentos GB-2220221, EP0689454), opcionalmente en ausencia sustancial de alumbre cuando se usa 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 (véanse, por ejemplo, los documentos EP0835318, EP0735898, EP0761231); (7) un éter de polioxietileno o un éster de polioxietileno (véase, por ejemplo, el documento WO 99/52549); (8) un tensioactivo de éster de polioxietileno sorbitán en combinación con un octoxinol (por ejemplo, el documento WO 01/21207) o un tensioactivo de alquil éter o éster de polioxietileno en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional, tal como octoxinol (por ejemplo, el documento WO 01/21152); (9) una saponina y un oligonucleótido inmunoestimulante (por ejemplo, un oligonucleótido de CpG) (por ejemplo, el documento WO 00/62800); (10) un inmunoestimulante y una partícula de sal de metal (véase, por ejemplo, el documento WO 00/23105); (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 esteroil) (por ejemplo, el documento WO 98/57659); (13) otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimulantes para potenciar la eficacia de la composición. Los péptidos de muramilo incluyen N-acetil-muramil-L-treoniil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-25 acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutarninil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), etc.

En una realización de la presente invención, las composiciones inmunogénicas como se desvelan en el presente documento comprenden como adyuvante un oligonucleótido de CpG. Un oligonucleótido de CpG como se usa en el presente documento se refiere a un oligodesoxinucleótido de CpG inmunoestimulante (CpG ODN) y por consiguiente, estos términos se usan indistintamente a menos que se indique otra cosa. Los oligodesoxinucleótidos de CpG inmunoestimulantes contienen uno o más motivos de CpG inmunoestimulantes que son nucleótidos de citosina-guanina no metilados, opcionalmente en ciertos contextos de bases preferidos. El estado de metilación del motivo inmunoestimulante de CpG se refiere en general al resto de citosina en el dinucleótido. Un oligonucleótido inmunoestimulante que contiene al menos un dinucleótido de CpG no metilado es un oligonucleótido que contiene una citosina 5' no metilada enlazada mediante un enlace de fosfato a una guanina 3' y que activa el sistema inmunitario mediante la unión al receptor de tipo Toll 9 (TLR-9). En otra realización, el oligonucleótido inmunoestimulante puede contener uno o más dinucleótidos de CpG metilados, que pueden activar el sistema inmunitario a través de TLR9, pero no tan fuertemente como si los uno o más motivos de CpG estuviesen no metilados. Los oligonucleótidos de CpG inmunoestimuladores pueden comprender uno o más palíndromos que a su vez pueden abarcar el dinucleótido de CpG. Los oligonucleótidos de CpG se han descrito en diversas patentes concedidas, solicitudes de patentes publicadas y otras publicaciones, incluyendo las Patentes de los Estados Unidos n.º 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 como se desvelan en el presente documento comprenden cualquiera de los oligonucleótidos de CpG descritos de la página 3, línea 22, a la página 12, línea 36, del documento WO 2010/125480.

Se han identificado diferentes clases de oligonucleótidos inmunoestimuladores de CpG. Estos se denominan como de clase A, B, C y P y se describen con más detalle de la página 3, línea 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 de CpG.

En una realización de la presente invención, las composiciones inmunogénicas como se desvelan en el presente documento comprenden un oligonucleótido de CpG de clase A. Preferentemente, el oligonucleótido de CpG de "clase A" de la invención tiene la siguiente secuencia de ácido nucleico: 5' GGGGACGACGTCGTGGGGGGG 3' (SEQ ID NO: 1). Algunos ejemplos no limitantes de oligonucleótidos de clase A incluyen: 5' G\*G\*G\_G\_A\_C\_G\_A\_C\_G\_T\_C\_G\_T\_G\_G\*G\*G\*G\*G\*G 3' (SEQ ID NO: 2); en la que "\*" se refiere a un enlace de fosforotioato y "-" se refiere a un enlace fosfodiéster.

En una realización de la presente invención, las composiciones inmunogénicas como se desvelan en el presente documento comprenden un oligonucleótido de CpG de clase B. En una realización, el oligonucleótido de CpG para su uso en la presente invención es un oligonucleótido de CpG de clase B representado al menos por la fórmula: 5' X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>CGX<sub>3</sub>X<sub>4</sub> 3', en la que X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub> y X<sub>4</sub> son nucleótidos. En una realización, X<sub>2</sub> es adenina, guanina o timina. En otra realización, X<sub>3</sub> es citosina, adenina o timina.

Las secuencias de oligonucleótidos de CpG de clase B de la invención son aquellas ampliamente descritas anteriormente, así como las desveladas en los documentos WO 96/02555, WO 98/18810 y las Patentes de los Estados Unidos n.º 6.194.388; 6.207.646; 6.214.806; 6.218.371; 6.239.116 y 6.339.068. Las secuencias ejemplares incluyen, pero sin limitación, las desveladas en estas últimas solicitudes y patentes.

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

- 5' TCGTCGTTTTTCGGTGCTTTT 3' (SEQ ID NO: 3) o
- 5' TCGTCGTTTTTCGGTCGTTTT 3' (SEQ ID NO: 4) o
- 5' TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT 3' (SEQ ID NO: 5) o
- 5' TCGTCGTTTCGTCGTTTTGTCGTT 3' (SEQ ID NO: 6) o
- 5' TCGTCGTTTTGTCGTTTTTTTCGA 3' (SEQ ID NO: 7).

En cualquiera de estas secuencias, todos los enlaces pueden ser todos enlaces de fosforotioato. En otra realización, en cualquiera de estas secuencias, uno o más de los enlaces puede ser de fosfodiéster, preferentemente entre la "C" y la "G" del motivo de CpG que forma un oligonucleótido de CpG semiblando. En cualquiera de estas secuencias, la 5' T puede estar sustituida por una etil uridina o un halógeno; los ejemplos de sustituciones de halógenos incluyen, pero sin limitación, sustituciones de bromouridina o yodouridina.

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: 8) o
- 5' T\*C\*G\*T\*C\*G\*T\*T\*T\*T\*C\*G\*G\*T\*G\*C\*T\*T\*T 3' (SEQ ID NO: 9) o
- 5' T\*C\*G\*T\*C\*G\*T\*T\*T\*G\*T\*C\*G\*T\*T\*T\*G\*T\*C\*G\*T\*T 3' (SEQ ID NO: 10) o
- 5' T\*C\*G\*T\*C\*G\*T\*T\*T\*C\*G\*T\*G\*T\*T\*T\*G\*T\*C\*G\*T\*T 3' (SEQ ID NO: 11) o
- 5' T\*C\*G\*T\*C\*G\*T\*T\*T\*G\*T\*C\*G\*T\*T\*T\*T\*T\*C\*G\*A 3' (SEQ ID NO: 12).

en las que "\*" se refiere a un enlace fosforotioato.

En una realización de la presente invención, las composiciones inmunogénicas como se desvelan en el presente documento comprenden un oligonucleótido de CpG de clase C. En una realización, los oligonucleótidos de CpG de "clase C" de la invención tienen la siguiente secuencia de ácido nucleico:

- 5' TCGCGTCGTTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 13) o
- 5' TCGTCGACGTTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 14) o
- 5' TCGGACGTTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 15) o
- 5' TCGGACGTTTCGGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 16) o
- 5' TCGCGTCGTTTCGGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 17) o
- 5' TCGACGTTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 18) o
- 5' TCGACGTTTCGGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 19) o
- 5' TCGCGTCGTTTCGGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 20) o
- 5' TCGCGACGTTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 21) o
- 5' TCGTCGTTTTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 22) o
- 5' TCGTCGTTTTTCGGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 23) o
- 5' TCGTCGTTTTACGGCGCCGTGCCG 3' (SEQ ID NO: 24) o
- 5' TCGTCGTTTTTCGGCGCGCGCCGT 3' (SEQ ID NO: 25).

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

Algunos ejemplos no limitantes de oligonucleótidos de clase C incluyen:

- 5' T\*C\_G\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*C\_G\*G\*C\*G\*C\_G\*C\*G\*C\*C\*G 3' (SEQ ID NO: 26) o

5' T\*C\_G\*T\*C\_G\*A\*C\_G\*T\*T\*C\_G\*G\*C\*G\*C\_G\*C\*G\*C\*C\*G 3' (SEQ ID NO: 27) o  
 5' T\*C\_G\*G\*A\*C\_G\*T\*T\*C\_G\*G\*C\*G\*C\_G\*C\*G\*C\*C\*G 3' (SEQ ID NO: 28) o  
 5' T\*C\_G\*G\*A\*C\_G\*T\*T\*C\_G\*G\*C\*G\*C\*G\*C\*C\*G 3' (SEQ ID NO: 29) o  
 5' T\*C\_G\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*C\_G\*G\*C\*G\*C\*G\*C\*C\*G 3' (SEQ ID NO: 30) o  
 5 5' T\*C\_G\*A\*C\_G\*T\*T\*C\_G\*G\*C\*G\*C\_G\*C\*G\*C\*C\*G 3' (SEQ ID NO: 31) o  
 5' T\*C\_G\*A\*C\_G\*T\*T\*C\_G\*G\*C\*G\*C\*G\*C\*C\*G 3' (SEQ ID NO: 32) o  
 5' T\*C\_G\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*C\_G\*G\*C\*G\*C\*G 3' (SEQ ID NO: 33) o  
 5' T\*C\_G\*C\_G\*A\*C\_G\*T\*T\*C\_G\*G\*C\*G\*C\_G\*C\*G\*C\*C\*G 3' (SEQ ID NO: 34) o  
 5' T\*C\*G\*T\*C\*G\*T\*T\*T\*C\*G\*G\*C\*G\*C\*G\*C\*G 3' (SEQ ID NO: 35) o  
 10 5' T\*C\*G\*T\*C\*G\*T\*T\*T\*C\*G\*G\*C\*G\*C\*G\*C\*G 3' (SEQ ID NO: 36) o  
 5' T\*C\*G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*A\*C\_G\*G\*C\*G\*C\_C\_G\*T\*G\*C\*C\*G 3' (SEQ ID NO: 37) o  
 5' T\*C\_G\*T\*C\*G\*T\*T\*T\*C\*G\*G\*C\*G\*C\*G\*C\*G\*T 3' (SEQ ID NO: 38)

en las que "\*" se refiere a un enlace fosforotioato y "-" se refiere a un enlace fosfodiéster. En cualquiera de estas secuencias, la 5' T puede estar sustituida por una etil uridina o un halógeno; los ejemplos de sustituciones de halógenos incluyen, pero sin limitación, sustituciones de bromouridina o yodouridina.

En una realización de la presente invención, las composiciones inmunogénicas como se desvelan en el presente documento comprenden un oligonucleótido de CpG de clase P. En una realización, el oligonucleótido de CpG para su uso en la presente invención es un oligonucleótido de CpG de clase P que contiene un dominio de activación de TLR 5' y al menos dos regiones palindrómicas, siendo una región palindrómica una región palindrómica 5' de al menos 6 nucleótidos de longitud y conectada a una región palindrómica 3' de al menos 8 nucleótidos de longitud ya sea directamente o a través de un enlazador, en la que el oligonucleótido incluye al menos un dinucleótido de YpR. En una realización, dicho oligonucleótido no es T\*C\_G\*T\*C\_G\*A\*C\_G\*T\*T\*C\_G\*G\*C\*G\*C\_G\*C\*G\*C\*C\*G (SEQ ID NO: 27). En una realización, el oligonucleótido de CpG de clase P incluye al menos un dinucleótido de CpG no metilado. En otra realización, el dominio de activación de TLR es TCG, TTCG, TTTCG, TYpR, TTYpR, TTTYpR, UCG, UUCG, UUUCG, TTT o TTTT. En otra realización más, el dominio de activación de TLR se encuentra dentro de la región palindrómica 5'. En otra realización, el dominio de activación de TLR se encuentra inmediatamente en 5' respecto de la región palindrómica 5'.

En una realización, los oligonucleótidos de CpG de "clase P" de la invención tienen la siguiente secuencia de ácido nucleico: 5' TCGTCGACGATCGGCGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 39).

En dichas secuencias, todos los enlaces pueden ser todos enlaces de fosforotioato. En otra realización, uno o más de los enlaces puede ser de fosfodiéster, preferentemente entre la "C" y la "G" del motivo de CpG que forma un oligonucleótido de CpG semiblando. En cualquiera de estas secuencias, la 5' T puede estar sustituida por una etil uridina o un halógeno; los ejemplos de sustituciones de halógenos incluyen, pero sin limitación, sustituciones de bromouridina o yodouridina.

Un ejemplo no limitante de los oligonucleótidos de clase P incluye:  
 5' T\*C\_G\*T\*C\_G\*A\*C\_G\*A\*T\*C\_G\*G\*C\*G\*C\_G\*C\*G\*C\*C\*G 3' (SEQ ID NO: 40) en la que "\*" se refiere a un enlace fosforotioato y "-" se refiere a un enlace fosfodiéster. En una realización, el oligonucleótido incluye al menos un enlace fosforotioato. En otra realización, todos los enlaces internucleotídicos del oligonucleótido son enlaces de fosforotioato. En otra realización, el oligonucleótido incluye al menos un enlace similar a fosfodiéster. En otra realización, el enlace similar a fosfodiéster es un enlace fosfodiéster. En otra realización, se conjuga un grupo lipófilo al oligonucleótido. En una realización, el grupo lipófilo es colesterol.

En una realización, todos los enlaces internucleotídicos de los oligonucleótidos de CpG desvelados en el presente documento son enlaces fosfodiéster (oligonucleótidos "blandos", como se describe en el documento WO 2007/026190). En otra realización, los oligonucleótidos de 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, mediante una exo o endonucleasa). La estabilización del ácido nucleico puede lograrse mediante modificaciones de la cadena principal. Los oligonucleótidos que tienen enlaces fosforotioato proporcionan actividad máxima y protegen al oligonucleótido frente a la degradación por exo y endonucleasas intracelulares.

Los oligonucleótidos inmunoestimuladores pueden tener una cadena principal química, que tiene combinaciones de enlaces fosfodiéster y fosforotioato. A efectos de la presente invención, una cadena principal química se refiere a una cadena principal parcialmente estabilizada, en la que al menos un enlace internucleotídico es fosfodiéster o similar a fosfodiéster y en la que al menos otro enlace internucleotídico es un enlace internucleotídico estabilizado, en la que el al menos un enlace fosfodiéster o similar a fosfodiéster y el al menos un enlace estabilizado son diferentes. Cuando el enlace fosfodiéster está ubicado preferencialmente en el motivo CpG, dichas 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.

Puede sintetizarse ODN con cadena principal mixta como se describe en el documento WO 2007/026190. El tamaño del oligonucleótido de CpG (es decir, el número de restos de nucleótido a lo largo de la longitud del oligonucleótido) también puede contribuir a la actividad estimulante del oligonucleótido. Para facilitar la captación en las células, el oligonucleótido de CpG de la invención tiene preferentemente una longitud mínima de 6 restos de nucleótido. Los oligonucleótidos de cualquier tamaño mayor de 6 nucleótidos (incluso de muchas kb de longitud) son capaces de inducir una respuesta inmunitaria en caso de que haya presencia de suficientes motivos inmunoestimuladores, debido a que los oligonucleótidos más grandes se degradan dentro de las células. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos de CpG tienen de 6 a 100 nucleótidos de longitud, preferencialmente, de 8 a 30 nucleótidos de longitud. En realizaciones importantes, los ácidos nucleicos y oligonucleótidos de la invención no son plásmidos o vectores de expresión.

En una realización, el oligonucleótido de CpG desvelado en el presente documento comprende sustituciones o modificaciones, tal 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 de CpG de la presente invención está químicamente modificado. Los expertos en la materia conocen ejemplos de modificaciones químicas y se describen, por ejemplo, en Uhlmann y col. (1990) Chem. Rev. 90:543; S. Agrawal, Ed., Humana Press, Totowa, EE. UU. 1993; Crooke y col. (1996) Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 36:107-129; y Hunziker y col. (1995) Mod. Synth. Methods 7:331-417. Un oligonucleótido de acuerdo con la invención puede tener una o más modificaciones, en el que cada modificación se ubica en un puente internucleosídico de fosfodiéster particular y/o en una unidad particular de β-D-ribosa y/o en una posición de base del nucleósido natural particular en comparación con un oligonucleótido de la misma secuencia que está formado por 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 materia (véase, por ejemplo, el documento WO 03/024480).

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

## 5 Formulación

Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden formularse en forma líquida (es decir, soluciones o suspensiones) o en una forma liofilizada. Las formulaciones líquidas pueden administrarse ventajosamente directamente a partir de su forma envasada y por tanto, son ideales para inyección si necesidad de reconstituirlas en medio acuoso, como normalmente se necesita para las composiciones liofilizadas de la invención.

La formulación de la composición inmunogénica de la presente invención puede lograrse usando procedimientos reconocidos en la técnica. Por ejemplo, los conjugados neumocócicos individuales pueden formularse con un vehículo fisiológicamente aceptable para preparar la composición. Los ejemplos de dichos vehículos incluyen, pero sin limitación, agua, suero salino tamponado, polioles (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido) y soluciones de dextrosa.

La presente divulgación proporciona una composición inmunogénica que comprende cualquiera de la combinación de glucoconjugados desvelados en el presente documento y un excipiente, portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En una realización, la composición inmunogénica de la invención se encuentra 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 depurador de radicales libres o un agente quelante o cualquiera de múltiples combinaciones de los mismos.

En una realización, las composiciones inmunogénicas de la invención comprenden 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 succinato es de aproximadamente 5 mM.

En una realización, las composiciones inmunogénicas de la invención comprenden una sal. En algunas realizaciones, la sal se selecciona entre 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, las composiciones inmunogénicas de la invención comprenden cloruro de sodio a 150 mM.

5 En una realización, las composiciones inmunogénicas de la invención comprenden un tensioactivo. En una realización, el tensioactivo se selecciona entre el 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-101, TRITON™ X-100, oxtoxinol 40, nonoxinol-9, trietanolamina, trietanolamina polipéptido oleato, hidroxiestearato 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 un 0,0001 % a un 10 % de polisorbato 80 en peso (p/p). En algunas de dichas realizaciones, la concentración final de polisorbato 80 en la formulación es de al menos un 0,001 % a un 1 % de polisorbato 80 en peso (p/p). En algunas de dichas realizaciones, la concentración final de polisorbato 80 en la formulación es de al menos un 0,01 % a un 1 % de polisorbato 80 en 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 un 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, aún más preferentemente, un pH de 5,8 a 6,0.

20 En una realización, la presente invención proporciona un envase relleno con cualquiera de las composiciones inmunogénicas desveladas en el presente documento. En una realización, el envase se selecciona entre el grupo que consiste en un vial, una jeringa, un matraz, un fermentador, un biorreactor, una bolsa, un tarro, una ampolla, un cartucho y un bolígrafo desechable. En ciertas realizaciones, el envase está siliconizado.

25 En una realización, el envase 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 envase de la presente invención está hecho de vidrio.

En una realización, la presente invención proporciona una jeringa rellena con cualquiera de las composiciones inmunogénicas desveladas en el presente documento. En ciertas realizaciones, la jeringa está siliconizada y/o está hecha de vidrio.

30 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, aún más preferentemente un volumen de aproximadamente 0,5 ml.

Por tanto, el envase o la jeringa como se ha definido anteriormente se rellena con un volumen de 0,1 ml a 2 ml, más preferentemente de 0,2 ml a 1 ml, aún más preferentemente un volumen de aproximadamente 0,5 ml de cualquiera de las composiciones inmunogénicas definidas en el presente documento.

## 6 Usos de las composiciones inmunogénicas de la invención

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

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

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

45 En algunos casos de este tipo, la infección, enfermedad o afección se selecciona entre el grupo que consiste en neumonía, sinusitis, otitis media, otitis media aguda, meningitis, bacteriemia, septicemia, empiema pleural, conjuntivitis, osteomielitis, artritis séptica, endocarditis, peritonitis, pericarditis, mastoiditis, celulitis, infección de tejidos blandos y absceso cerebral.

50 En un caso, la divulgación proporciona un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria contra *S. pneumoniae* en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunogénica de la divulgación.

En una realización, las composiciones inmunogénicas desveladas en el presente documento son para su uso como vacuna. En dichas realizaciones, las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento pueden usarse para prevenir una infección por *S. pneumoniae* en un sujeto. Por tanto, en un aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para prevenir una infección por *S. pneumoniae* en un sujeto que comprende

administrar al sujeto una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunogénica de la divulgación. En algunos casos de este tipo, la infección se selecciona entre el grupo que consiste en neumonía, sinusitis, otitis media, otitis media aguda, meningitis, bacteriemia, septicemia, 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, tal como un ser humano, gato, oveja, cerdo, caballo, bóvido o perro.

En un aspecto, las composiciones inmunogénicas desveladas en el presente documento son para su uso en un procedimiento para prevenir, tratar o aliviar una infección, enfermedad o afección asociada con *S. pneumoniae* en un sujeto. En algunas realizaciones de este tipo, la infección, enfermedad o afección se selecciona entre el grupo que consiste en neumonía, sinusitis, otitis media, otitis media aguda, meningitis, bacteriemia, septicemia, empiema pleural, conjuntivitis, osteomielitis, artritis séptica, endocarditis, peritonitis, pericarditis, mastoiditis, celulitis, infección de tejidos blandos y absceso cerebral.

En una realización, las composiciones inmunogénicas desveladas en el presente documento son para su uso como vacuna. En dichos casos, las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento pueden usarse para prevenir una infección por *S. pneumoniae* en un sujeto. Por tanto, en un aspecto, las composiciones inmunogénicas desveladas en el presente documento son para su uso en un procedimiento para prevenir, una infección por *S. pneumoniae* en un sujeto. En algunas realizaciones de este tipo, la infección se selecciona entre el grupo que consiste en neumonía, sinusitis, otitis media, otitis media aguda, meningitis, bacteriemia, septicemia, 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, tal como un ser humano, gato, oveja, cerdo, caballo, bóvido o perro.

Las composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden usarse para proteger o tratar a un ser humano susceptible a una infección neumocócica, mediante la administración de las composiciones inmunogénicas por una vía sistémica o mucosa. En una realización, las composiciones inmunogénicas desveladas en el presente documento se administran por vía intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea. En una realización, las composiciones inmunogénicas desveladas en el presente documento se administran mediante inyección intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea. En una realización, las composiciones inmunogénicas desveladas en el presente documento se administran mediante inyección intramuscular o subcutánea.

En una realización, la composición inmunogénica de la presente divulgación que comprende al menos un glucoconjugado del serotipo 15B de *S. pneumoniae* (tales como los glucoconjugados de la sección 1.3.4 anterior), cuando se administra a un sujeto, es capaz de inducir la formación de anticuerpos capaces de unirse a los serotipos 15B, 15A y/o 15C de *S. pneumoniae*, como se mide mediante un ensayo ELISA convencional. En una realización, la composición inmunogénica de la presente divulgación que comprende al menos un glucoconjugado del serotipo 15B de *S. pneumoniae* (tales como los glucoconjugados de la sección 1.3.4 anterior), cuando se administra a un sujeto, es capaz de inducir la formación de anticuerpos capaces de unirse a los serotipos 15B y 15C de *S. pneumoniae*, como se mide mediante un ensayo ELISA convencional.

En el procedimiento ELISA (ensayo inmunosorbente ligado a enzimas), se incuban anticuerpos de los sueros de sujetos vacunados con polisacáridos que se han adsorbido a un soporte sólido. Los anticuerpos unidos se detectan usando anticuerpos de detección secundarios conjugados a una enzima.

En una realización, dicho ensayo ELISA convencional es el ensayo ELISA estandarizado (OMS) definido por la OMS en "Training manual for Enzyme linked immunosorbent assay for the quantitation of Streptococcus pneumoniae serotype specific IgG (Pn PS ELISA)" (que puede consultarse en <http://www.vaccine.uab.edu/ELISA%20protocol.pdf>; consultado el 31 de marzo de 2014).

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

En una realización, la composición inmunogénica de la presente divulgación que comprende al menos un glucoconjugado del serotipo 15B de *S. pneumoniae* (tal como los glucoconjugados de la sección 1.3.4 anterior) es capaz de provocar anticuerpos IgG en seres humanos que son capaces de unirse al polisacárido del serotipo 15B de *S. pneumoniae* a una concentración de al menos 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,35, 0,4 o 0,5 µg/ml determinada mediante un ensayo ELISA.

En una realización, la composición inmunogénica de la presente divulgación que comprende al menos un glucoconjugado del serotipo 15B de *S. pneumoniae* (tal como los glucoconjugados de la sección 1.3.4 anterior) es capaz de provocar anticuerpos IgG en seres humanos que son capaces de unirse al polisacárido del serotipo 15C de *S. pneumoniae* a una concentración de al menos 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,35, 0,4 o 0,5 µg/ml determinada mediante un

ensayo ELISA.

5 En una realización, la composición inmunogénica de la presente divulgación que comprende al menos un glucoconjugado del serotipo 15B de *S. pneumoniae* (tal como los glucoconjugados de la sección 1.3.4 anterior) es capaz de provocar anticuerpos IgG en seres humanos que son capaces de unirse al polisacárido de los serotipos 15B y 15C de *S. pneumoniae* a una concentración de al menos 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,35, 0,4 o 0,5 µg/ml determinada mediante un ensayo ELISA.

10 En una realización, la composición inmunogénica de la presente divulgación que comprende al menos un glucoconjugado del serotipo 15B de *S. pneumoniae* (tales como los glucoconjugados de la sección 1.3.4 anterior), cuando se administra a un sujeto, es capaz de inducir la formación de anticuerpos capaces de eliminar al serotipo 15B de *S. pneumoniae* en un ensayo de opsonofagocitosis como se desvela en el presente documento (tal como el ensayo de OPA del ejemplo 12).

15 En una realización, la composición inmunogénica de la presente divulgación que comprende al menos un glucoconjugado del serotipo 15B de *S. pneumoniae* (tal como los glucoconjugados de la sección 1.3.4 anterior), cuando se evalúa en un ensayo de OPA como se desvela en el presente documento (tal como el ensayo de OPA del ejemplo 12), tiene un título de OPA mayor que el título de OPA obtenido con un polisacárido capsular del serotipo 15B de *S. pneumoniae* no conjugado.

20 En una realización, la composición inmunogénica de la presente divulgación que comprende al menos un glucoconjugado del serotipo 15B de *S. pneumoniae* (tales como los glucoconjugados de la sección 1.3.4 anterior), cuando se administra a un sujeto, es capaz de inducir la formación de anticuerpos capaces de eliminar al serotipo 15C de *S. pneumoniae* en un ensayo de opsonofagocitosis como se desvela en el presente documento (tal como el ensayo de OPA del ejemplo 12). En una realización, la composición inmunogénica de la presente divulgación que comprende al menos un glucoconjugado del serotipo 15B de *S. pneumoniae* (tal como los glucoconjugados de la sección 1.3.4 anterior), cuando se evalúa en un ensayo de OPA como se desvela en el presente documento (tal como el ensayo de OPA del ejemplo 12), tiene un título de OPA mayor que el título de OPA obtenido con un polisacárido capsular del serotipo 15B de *S. pneumoniae* no conjugado.

El ensayo opsonofagocítico neumocócico (OPA, por sus siglas en inglés), que mide la eliminación de células de *S. pneumoniae* por células efectoras fagocíticas en presencia de anticuerpo funcional y de complemento, se considera una alternativa importante para evaluar la eficacia de las vacunas antineumocócicas.

30 El ensayo opsonofagocítico (OPA) puede llevarse a cabo incubando juntos una mezcla de células de *Streptococcus pneumoniae*, un suero humano inactivado por calor que se vaya a analizar, células HL-60 diferenciadas (fagocitos) y una fuente de complemento exógena (por ejemplo, complemento de cría de conejo). La opsonofagocitosis se produce durante la incubación y las células bacterianas que se recubren con anticuerpo y complemento son eliminadas tras la opsonofagocitosis. Se determinan las unidades formadoras de colonias (ufc) de bacterias supervivientes que escapan de la opsonofagocitosis sembrando la mezcla de ensayo. El título de OPA se define como la dilución recíproca que da como resultado una reducción del 50 % en el recuento bacteriano frente a los pocillos de control sin suero de ensayo. El título de OPA se interpola a partir de las dos diluciones que abarcan este valor de corte de eliminación del 50 %.

Se considera que un título final de 1:8 o más es un resultado positivo en este OPA de tipo eliminación.

40 En una realización, la composición inmunogénica de la presente divulgación que comprende al menos un glucoconjugado del serotipo 15B de *S. pneumoniae* (tal como los glucoconjugados de la sección 1.3.4 anterior), es capaz de provocar un título de al menos 1:8 frente al serotipo 15B de *S. pneumoniae* en al menos un 50 % de los sujetos, determinado mediante un ensayo de eliminación opsonofagocítica (OPA). En una realización, la composición inmunogénica de la presente divulgación que comprende al menos un glucoconjugado del serotipo 15B de *S. pneumoniae* (tales como los glucoconjugados de la sección 1.3.4 anterior) es capaz de provocar un título de al menos 1:8 contra el serotipo 15B de *S. pneumoniae* en al menos un 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o al menos un 93 % de los sujetos, determinado mediante el ensayo de eliminación opsonofagocítica (OPA).

50 En una realización, la composición inmunogénica de la presente divulgación que comprende al menos un glucoconjugado del serotipo 15B de *S. pneumoniae* (tal como los glucoconjugados de la sección 1.3.4 anterior) es capaz de provocar un título de al menos 1:8 frente al serotipo 15C de *S. pneumoniae* en al menos un 50 % de los sujetos, determinado mediante un ensayo de eliminación opsonofagocítica (OPA). En una realización, la composición inmunogénica de la presente divulgación que comprende al menos un glucoconjugado del serotipo 15B de *S. pneumoniae* (tales como los glucoconjugados de la sección 1.3.4 anterior) es capaz de provocar un título de al menos 1:8 contra el serotipo 15C de *S. pneumoniae* en al menos un 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o al menos un 95 % de los sujetos, determinado mediante el ensayo de eliminación opsonofagocítica (OPA).

55 En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un procedimiento para tratar o prevenir una infección, enfermedad o afección por *S. pneumoniae* asociada con el serotipo 15A, 15B y/o 15C de *S. pneumoniae* en un sujeto, comprendiendo el procedimiento la etapa de administrar una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de cualquiera de las composiciones inmunogénicas de la presente divulgación que comprenden al menos un

5 glucoconjugado del serotipo 15B de *S. pneumoniae* (tal como los glucoconjugados de la sección 1.3.4 anterior). En una realización, la composición inmunogénica de la presente divulgación que comprende al menos un glucoconjugado del serotipo 15B de *S. pneumoniae* (tales como los glucoconjugados de la sección 1.3.4 anterior), cuando se administra a un sujeto, induce la formación de anticuerpos capaces de unirse a los serotipos 15B, 15A y/o 15C de *S. pneumoniae*. En una realización, la composición inmunogénica de la presente divulgación que comprende al menos un glucoconjugado del serotipo 15B de *S. pneumoniae* (tales como los glucoconjugados de la sección 1.3.4 anterior), cuando se administra a un sujeto, induce la formación de anticuerpos capaces de eliminar al serotipo 15B, 15C y/o 15A de *S. pneumoniae* en un ensayo de opsonofagocitosis como se desvela en el presente documento (tal como el ensayo de OPA del ejemplo 12).

10 Una realización de la divulgación proporciona un procedimiento para proteger a un sujeto frente a una infección por el serotipo 15C de *S. pneumoniae* o un procedimiento para prevenir una infección con el serotipo 15C de *S. pneumoniae* o un procedimiento para reducir la gravedad o retrasar la aparición de al menos un síntoma asociado con una infección causada por el serotipo 15C de *S. pneumoniae*, comprendiendo los procedimientos administrar a un sujeto una cantidad inmunogénica de cualquiera de las composiciones inmunogénicas de la presente divulgación que comprenden al menos un glucoconjugado del serotipo 15B de *S. pneumoniae* (tal como los glucoconjugados de la sección 1.3.4 anterior). Una realización de la divulgación proporciona un procedimiento para tratar o prevenir una infección, enfermedad o afección por *S. pneumoniae* asociada con el serotipo 15A, 15B y/o 15C de *S. pneumoniae* (preferentemente, 15B y/o 15C, más preferentemente 15B) en un sujeto, comprendiendo el procedimiento la etapa de administrar una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de cualquiera de las composiciones inmunogénicas de la presente divulgación que comprenden al menos un glucoconjugado del serotipo 15B de *S. pneumoniae* (tal como los glucoconjugados de la sección 1.3.4 anterior) al sujeto. Otra realización proporciona un procedimiento para tratar o prevenir una infección, enfermedad o afección por *S. pneumoniae* asociada con el serotipo 15A, 15B y/o 15C de *S. pneumoniae* (preferentemente, 15B y/o 15C, más preferentemente 15B) en un sujeto, comprendiendo el procedimiento generar una preparación de anticuerpos policlonales o monoclonales a partir de cualquiera de las composiciones inmunogénicas de la presente divulgación que comprenden al menos un glucoconjugado del serotipo 15B de *S. pneumoniae* (tal como los glucoconjugados de la sección 1.3.4 anterior) y usar dicha preparación de anticuerpos para conferir inmunidad pasiva al sujeto.

En una realización, la divulgación se refiere al uso de cualquiera de las composiciones inmunogénicas de la presente divulgación que comprenden al menos un glucoconjugado del serotipo 15B de *S. pneumoniae* (tal como los glucoconjugados de la sección 1.3.4 anterior) para la fabricación de un medicamento para proteger a un sujeto frente a una infección con *S. pneumoniae* y/o prevenir la infección por *S. pneumoniae* y/o reducir la gravedad o retrasar la aparición de al menos un síntoma asociado con una infección provocada por *S. pneumoniae* y/o proteger a un sujeto frente a una infección por el serotipo 15A, 15B y/o 15C de *S. pneumoniae* (preferentemente 15B y/o 15C, más preferentemente 15B) y/o prevenir la infección por el serotipo 15A, 15B y/o 15C de *S. pneumoniae* (preferentemente 15B y/o 15C, más preferentemente 15B) y/o reducir la gravedad o retrasar la aparición de al menos un síntoma asociado con una infección causada por el serotipo 15A, 15B y/o 15C de *S. pneumoniae* (preferentemente 15B y/o 15C, más preferentemente 15B).

En una realización, la divulgación se refiere al uso de cualquiera de las composiciones inmunogénicas de la presente divulgación que comprenden al menos un glucoconjugado del serotipo 15B de *S. pneumoniae* (tal como los glucoconjugados de la sección 1.3.4 anterior) para proteger a un sujeto frente a una infección con *S. pneumoniae* y/o prevenir la infección por *S. pneumoniae* y/o reducir la gravedad o retrasar la aparición de al menos un síntoma asociado con una infección provocada por *S. pneumoniae* y/o proteger a un sujeto frente a una infección por el serotipo 15A, 15B y/o 15C de *S. pneumoniae* (preferentemente 15B y/o 15C, más preferentemente 15B) y/o prevenir la infección por el serotipo 15A, 15B y/o 15C de *S. pneumoniae* (preferentemente 15B y/o 15C, más preferentemente 15B) y/o reducir la gravedad o retrasar la aparición de al menos un síntoma asociado con una infección causada por el serotipo 15A, 15B y/o 15C de *S. pneumoniae* (preferentemente 15B y/o 15C, más preferentemente 15B).

## 7 Sujeto a tratar con las composiciones inmunogénicas de la invención

Como se desvela en el presente documento, las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento pueden usarse en diversos procedimientos terapéuticos o profilácticos para prevenir, tratar o aliviar 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, menor de tres meses de edad), un bebé (es decir, de 3 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 desveladas en el presente documento son para su uso como vacuna.

En dicha realización, el sujeto que se va a vacunar puede tener menos 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

- 5 se va a vacunar tiene aproximadamente 2, aproximadamente 4 o aproximadamente 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 de aproximadamente 12 a aproximadamente 15 meses de edad. En algunos casos, se necesita tan poco como 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 8 más adelante).
- En una realización de la presente invención, el sujeto que se va a vacunar es un adulto humano de 50 años o más, más preferentemente, un humano adulto de 55 años o más. En una realización, el sujeto que se va a vacunar es un adulto humano de 65 años o más, 70 años o más, 75 años o más u 80 años o más.
- 10 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 armar una defensa humoral o celular normal frente a la exposición a 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 como resultado una respuesta de anticuerpos que es insuficiente para proteger contra o tratar la enfermedad neumocócica.
- 15 En una realización, dicha enfermedad es un trastorno de inmunodeficiencia primaria. Preferentemente, dicho trastorno de inmunodeficiencia primaria se selecciona entre el grupo que consiste en: inmunodeficiencias de linfocitos T y B combinadas, deficiencias de anticuerpos, síndromes bien definidos, enfermedad de desregulación inmunitaria, trastornos de fagocitos, deficiencias inmunitarias innatas, trastornos autoinflamatorios y deficiencias del complemento. En una realización, dicho trastorno de inmunodeficiencia primaria se selecciona entre los desvelados de la página 24, línea 11, a la página 25, línea 19, del documento WO 2010/125480.
- 20 En una realización particular de la presente invención, el sujeto inmunocomprometido que se va a vacunar padece una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en: infección por VIH, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), cáncer, trastornos cardíacos o pulmonares congénitos, insuficiencia cardíaca congestiva, diabetes mellitus, enfermedad hepática crónica, alcoholismo, cirrosis, filtraciones de fluido espinal, cardiomiopatía, bronquitis crónica, enfisema, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), disfunción del bazo (tal como enfermedad de células falciformes), falta de función del bazo (asplenia), neoplasia maligna sanguínea, 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 padece malnutrición.
- 30 En una realización particular de la presente invención, el sujeto inmunocomprometido que se va a vacunar toma un fármaco o tratamiento que reduce la resistencia del organismo a la infección. En una realización, dicho fármaco se selecciona entre uno desvelado de 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.
- 35 En una realización particular de la presente invención, el sujeto inmunocomprometido que se va a vacunar tiene un recuento de glóbulos blancos (recuento leucocitario) inferior a  $5 \times 10^9$  células por litro o inferior a  $4 \times 10^9$  células por litro o inferior a  $3 \times 10^9$  células por litro o inferior a  $2 \times 10^9$  células por litro o inferior a  $1 \times 10^9$  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.
- 40 Recuento de glóbulos blancos (recuento leucocitario): El número de glóbulos blancos (WBC, por sus siglas en inglés) en la sangre. El WBC se mide normalmente como parte del CBC (recuento hematológico completo). Los glóbulos blancos son las células que combaten las infecciones en la sangre y son distintos de los glóbulos rojos (portadores de oxígeno), conocidos como eritrocitos. Hay diferentes tipos de glóbulos blancos, incluyendo neutrófilos (leucocitos polimorfonucleares; PMN), cayados (neutrófilos ligeramente inmaduros), linfocitos de tipo T (linfocitos T), linfocitos de tipo B (linfocitos B), monocitos, eosinófilos y basófilos. Todos los tipos de glóbulos blancos se reflejan en el recuento de glóbulos blancos. El intervalo normal para el recuento de glóbulos blancos es normalmente de entre 4.300 y 10.800 células por milímetro cúbico de sangre. Este también puede denominarse recuento leucocitario y puede expresarse en unidades internacionales como  $4,3 - 10,8 \times 10^9$  células por litro.
- 45 En una realización particular de la presente invención, el sujeto inmunocomprometido que se va a vacunar padece neutropenia. En una realización particular de la presente invención, el sujeto inmunocomprometido que se va a vacunar tiene un recuento de neutrófilos inferior a  $2 \times 10^9$  células por litro o inferior a  $1 \times 10^9$  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.
- 50 Un bajo recuento de glóbulos blancos o "neutropenia" es una afección caracterizada por niveles anormalmente bajos de neutrófilos en sangre. Los neutrófilos son un tipo específico de glóbulo blanco que ayuda a prevenir y combatir infecciones. El motivo más frecuente por el que los pacientes de cáncer experimentan neutropenia es como efecto secundario de la quimioterapia. La neutropenia inducida por quimioterapia aumenta el riesgo de infección en un
- 55 paciente y altera el tratamiento del cáncer.

En una realización particular de la presente invención, el sujeto inmunocomprometido que se va a vacunar tiene recuento de células CD4+ inferior a 500/mm<sup>3</sup> o un recuento de células CD4+ inferior a 300/mm<sup>3</sup>, o un recuento de células CD4+ inferior a 200/mm<sup>3</sup>, un recuento de células CD4+ inferior a 100/mm<sup>3</sup>, un recuento de células CD4+ inferior a 75/mm<sup>3</sup> o un recuento de células CD4+ inferior a 50/mm<sup>3</sup>.

- 5 Los resultados de las pruebas de células CD4 normalmente son el número de células por mm<sup>3</sup>. Los recuentos normales de CD4 son de entre 500 y 1.600 y los recuentos de CD8 son de entre 375 y 1.100. Los recuentos de CD4 se reducen drásticamente en las personas con VIH.

En una realización de la invención, cualquiera de los sujetos inmunocomprometidos desvelados en el presente documento es un hombre o una mujer.

10 **8 Régimen**

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

- 15 En una realización, la pauta de vacunación de la composición inmunogénica de acuerdo con la invención es una sola dosis. En una realización particular, dicha pauta de dosis única es para personas sanas que tienen al menos 2 años de edad.

En una realización, la pauta de vacunación de la composición inmunogénica de acuerdo con la invención es una pauta multidosis. En una realización particular, dicha pauta multidosis consiste en una serie de 2 dosis separadas por un intervalo de aproximadamente 1 mes a aproximadamente 2 meses. En una realización particular, dicha pauta multidosis 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, dicha pauta multidosis consiste en una serie de 3 dosis separadas por un intervalo de aproximadamente 1 mes a aproximadamente 2 meses. En otra realización, dicha pauta multidosis 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, dicha pauta multidosis consiste en una serie de 3 dosis separadas por un intervalo de aproximadamente 1 mes a aproximadamente 2 meses, seguida de una cuarta dosis de aproximadamente 10 meses a aproximadamente 13 meses después de la primera dosis. En otra realización, dicha pauta multidosis consiste en una serie de 3 dosis separadas por un intervalo de aproximadamente 1 mes seguida 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 seguida de una cuarta dosis de aproximadamente 10 meses a aproximadamente 13 meses después de la primera dosis.

En una realización, la pauta multidosis consiste en al menos una dosis (por ejemplo, 1, 2 o 3 dosis) en el primer año de vida, seguida de al menos una dosis en los dos primeros años de vida.

En una realización, la pauta multidosis 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 seguida de una dosis en los dos primeros años de vida a los 12-18 meses de edad. En una realización, dicha pauta multidosis consiste en una serie de 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 seguida de una dosis en los dos primeros años de vida a los 12-15 meses de edad. En otra realización, dicha pauta multidosis consiste en una serie de 2 dosis separadas por un intervalo de aproximadamente 2 meses, comenzando a los 2 meses de edad y seguida de una dosis en los dos primeros años de vida a los 12-18 meses de edad.

En una realización, la pauta multidosis 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 de primovacunación en el día 0 y se administran uno o más refuerzos a intervalos que oscilan de aproximadamente 2 a aproximadamente 24 semanas, preferentemente con un intervalo entre dosis de 4-8 semanas.

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

Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" significa dentro de un intervalo estadísticamente significativo de un valor, tal como un intervalo de concentración, marco temporal, peso molecular, temperatura o pH establecido. Dicho intervalo puede estar dentro de un orden de magnitud, normalmente en un 20 %, más típicamente en un 10 % y aún más típicamente en un 5 % o en un 1 % de un valor o intervalo dado. En

ocasiones, dicho intervalo puede encontrarse dentro del error experimental típico de los procedimientos convencionales usados para la medición y/o determinación de un valor o intervalo dado. La variación permisible abarcada por el término "aproximadamente" dependerá del sistema particular en estudio y puede apreciarse fácilmente por un experto en la materia. Cuando se indique un intervalo en la presente solicitud, también se contempla como una realización de la divulgación cada número entero dentro del intervalo.

5

Los presentes inventores pretenden que las expresiones "que comprende", "comprenden" y "comprende" en el presente documento sean opcionalmente sustituibles por las expresiones "que consiste esencialmente en", "consisten esencialmente en", "consiste esencialmente en", "que consiste en", "consisten en" y "consiste en", respectivamente, en cada caso.

10 La invención se ilustra por medio de los ejemplos adjuntos. Los ejemplos a continuación se llevan a cabo usando técnicas convencionales, que son bien conocidas y rutinarias para los expertos en la materia, excepto cuando se describe en detalle otra cosa. Estos ejemplos son ilustrativos, pero no limitan la invención.

### Ejemplo

#### Ejemplo 1. Procedimiento general para la preparación de glucoconjugados enlazados a eTEC

##### 15 Activación de sacárido y tiolación con diclorhidrato de cistamina

El sacárido se reconstituye en dimetilsulfóxido (DMSO) anhidro. El contenido de humedad de la solución se determina mediante análisis de Karl Fischer (KF) y se ajusta hasta alcanzar un contenido de humedad de entre un 0,1 % y un 0,4 %, típicamente un 0,2 %.

20 Para iniciar la activación, se prepara una solución reciente de 1,1'-carbonil-di-1,2,4-triazol (CDT) o 1,1'-carbonildiimidazol (CDI) a una concentración de 100 mg/ml en DMSO. El sacárido se activa con diversas cantidades de CDT/CDI (1 - 10 equivalentes molares) y se deja que avance la reacción durante 1 hora a  $23 \pm 2$  °C. El nivel de activación se puede determinar mediante HPLC. El diclorhidrato de cistamina se prepara reciente en DMSO anhidro a una concentración de 50 mg/ml. Se hace reaccionar el sacárido activado con 1 equivalente molar (eq. mol.) de diclorhidrato de cistamina. Como alternativa, se hace reaccionar el sacárido activado con 1 eq. mol. de clorhidrato de cisteamina. Se deja que avance la reacción durante  $21 \pm 2$  horas a  $23 \pm 2$  °C, para producir un sacárido tiolado. El nivel de tiolación se determina mediante la cantidad añadida de CDT/CDI.

25

El CDT/CDI residual en la solución de reacción de activación se inactiva mediante la adición de solución de tetraborato de sodio 100 mM, a pH 9,0. Se realizan los cálculos para determinar la cantidad añadida de tetraborato y para ajustar el contenido de humedad final para que sea de hasta el 1-2 % del total acuoso.

##### 30 Reducción y purificación del sacárido tiolado activado

La mezcla de reacción de sacárido tiolado se diluye 10 veces mediante la adición a succinato de sodio 5 mM previamente enfriado en solución salina al 0,9 %, a pH 6,0 y se filtró a través de un filtro de 5 µm. La diafiltración del sacárido tiolado se realiza frente a un diavolumen de API (agua para inyección) de 40 veces. A la fracción retenida se le añade una solución de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), 1 - 5 eq. mol., después de la dilución de un 10 % en volumen de tampón de fosfato de sodio 0,1 M, pH 6,0. Se deja que esta reacción de reducción avance durante  $20 \pm 2$  horas a  $5 \pm 3$  °C. La purificación del sacárido tiolado activado se realiza preferentemente mediante ultrafiltración/diafiltración de fosfato monobásico de sodio 10 mM previamente enfriado, pH 4,3. Como alternativa, el sacárido tiolado se purifica mediante procedimientos de cromatografía de exclusión por tamaños (SEC) convencionales o procedimientos de cromatografía de intercambio iónico. Se extrae una alícuota la fracción retenida de sacárido tiolado activado para determinar la concentración de sacárido y el contenido de tiol (Ellman).

35

40

##### Reducción y purificación alternativa del sacárido tiolado activado

Como alternativa al procedimiento de purificación descrito anteriormente, también se purificó el sacárido tiolado activado como se indica a continuación.

45 A la mezcla de reacción de sacárido tiolado se le añadió una solución de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), 5 - 10 eq. mol., y se dejó que avanzase durante  $3 \pm 1$  horas a  $23 \pm 2$  °C. La mezcla de reacción se diluyó después 5 veces mediante la adición de succinato de sodio 5 mM previamente enfriado en solución salina al 0,9 %, a pH 6,0 y se filtró a través de un filtro de 5 µm. La diafiltración de sacárido tiolado se realizó usando un diavolumen de 40 veces de fosfato monobásico de sodio 10 mM previamente enfriado, pH 4,3. Se extrajo una alícuota de la fracción retenida de sacárido tiolado activado para determinar la concentración de sacárido y el contenido de tiol (Ellman).

##### 50 Activación y purificación de proteína portadora bromoacetilada

Los grupos amino libres de la proteína portadora se bromoacetilan mediante reacción con un agente de bromoacetilación, tal como éster de N-hidroxisuccinimida del ácido bromoacético (BAANS), bromoacetilbromuro u otro reactivo adecuado.

La proteína portadora (en fosfato de sodio 0,1 M, a pH 8,0 ± 0,2) se mantiene primero a 8 ± 3 °C, aproximadamente a pH 7 antes de la activación. A la solución de proteína, se le añade el éster de N-hidroxisuccinimida del ácido bromoacético (BAANS) en forma de una solución madre en dimetilsulfóxido (DMSO) (20 mg/ml) a una relación de BAANS:proteína de 0,25 - 0,5 (p/p). La reacción se mezcla suavemente a 5 ± 3 °C durante 30 - 60 minutos. La proteína bromoacetilada resultante (activada) se purifica, por ejemplo, mediante ultrafiltración/diafiltración usando una membrana con un CPM de 10 kDa usando tampón fosfato 10 mM (a pH 7,0). Tras la purificación, se estima la concentración de proteína de la proteína portadora bromoacetilada mediante ensayo de proteínas de Lowry.

El grado de activación se determina mediante ensayo de bromuro total mediante cromatografía líquida de intercambio iónico acoplada con detección de conductividad suprimida (cromatografía iónica). El bromuro unido a la proteína bromoacetilada activada se escinde de la proteína en la preparación de la muestra de ensayo y se cuantifica junto con cualquier bromuro libre que pueda estar presente. Cualquier bromo restante unido de manera covalente a la proteína se libera mediante la conversión a ion bromuro mediante calentamiento de la muestra en 2-mercaptoetanol alcalino.

#### Activación y purificación de CRM<sub>197</sub> bromoacetilada

Se diluyó CRM<sub>197</sub> a 5 mg/ml con solución de NaCl al 0,9 % tamponada con fosfato 10 mM (PBS) a pH 7 y después se preparó NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M, pH 7,0, usando una solución madre 1 M. Se añadió BAANS a una relación de CRM<sub>197</sub>:BAANS de 1:0,35 (p:p) usando una solución madre de BAANS de 20 mg/ml de DMSO. La mezcla de reacción se incubó a entre 3 °C y 11 °C durante 30 minutos-1 hora, después se purificó mediante ultrafiltración/diafiltración usando una membrana con un CPM de 10K y fosfato de sodio 10 mM/NaCl al 0,9 %, pH 7,0. La CRM<sub>197</sub> activada purificada se analizó mediante ensayo de Lowry para determinar la concentración de proteína y después se diluyó con PBS a 5 mg/ml. Se añadió sacarosa al 5 % p/vol como crioprotector y la proteína activada se congeló y se almacenó a -25 °C hasta que se necesitó para la conjugación. La bromoacetilación de los restos de lisina de CRM<sub>197</sub> fue muy consistente, dando como resultado la activación de 15 a 25 lisinas de las 39 lisinas disponibles. La reacción produjo altos rendimientos de proteína activada.

#### Conjugación de sacárido tiolado activado con proteína portadora bromoacetilada

Antes de comenzar la reacción de conjugación, los recipientes de reacción se enfrían previamente a 5 °C. La proteína portadora bromoacetilada y el sacárido tiolado activado se añaden posteriormente y se mezclan a una velocidad de agitación de 150-200 rpm. La relación de entrada de sacárido/proteína es 0,9 ± 0,1. El pH de la reacción se ajusta a 8,0 ± 0,1 con solución de NaOH 1 M. Se deja que la reacción de conjugación avance a 5 °C durante 20 ± 2 horas.

#### Protección de grupos funcionales reactivos residuales

Los restos bromoacetilados sin reaccionar de la proteína portadora se inactivan haciendo reaccionar con 2 eq. mol. de N-acetil-L-cisteína como reactivo de protección durante 3 horas a 5 °C. Los grupos sulfhidrilo libres residuales se protegen con 4 eq. mol. de yodoacetamida durante 20 horas a 5 °C.

#### Purificación de glucoconjugado enlazado a eTEC

La mezcla de reacción de conjugación (protegida con post-IAA) se filtra a través de un filtro de 0,45 µm. La ultrafiltración/diafiltración del glucoconjugado se realiza frente a succinato 5 mM-solución salina al 0,9 %, pH 6,0. La fracción retenida de glucoconjugado se filtra posteriormente a través de un filtro de 0,2 µm. Se extrae una alícuota de glucoconjugado para los ensayos. El glucoconjugado restante se almacena a 5 °C.

#### Ejemplo 2. Preparación de conjugados de Pn-33F-eTEC

##### Procedimiento de activación

##### Activación del polisacárido de Pn33F

El polisacárido de Pn-33F se combinó con 1,2,4-triazol 500 mM (en API) para obtener 10 gramos de triazol por gramo de polisacárido. La mezcla se congeló por capas en un baño de nieve carbónica-etanol y después se liofilizó a sequedad. El polisacárido de 33F liofilizado se reconstituyó en dimetilsulfóxido (DMSO) anhidro. El contenido de humedad de la solución de 33F liofilizado/DMSO se determinó mediante análisis de Karl Fischer (KF). El contenido de humedad se ajustó añadiendo API a la solución de 33F/DMSO hasta alcanzar un contenido de humedad del 0,2 %.

Para iniciar la activación, se preparó reciente 1,1'-carbonil-di-1,2,4-triazol (CDT) a 100 mg/ml en solución de DMSO. El polisacárido de Pn33F se activó con diversas cantidades de CDT antes de la etapa de tiolación. La activación con CDT se llevó a cabo a 23 ± 2 °C durante 1 hora. El nivel de activación se determinó mediante HPLC (A220/A205). Se añadió una solución de tetraborato de sodio 100 mM a pH 9,0 para inactivar cualquier CDT residual en la solución de reacción de activación. Se realizan los cálculos para determinar la cantidad añadida de tetraborato y para permitir que el contenido de humedad final sea del 1,2 % del total acuoso. Se dejó que avanzase la reacción

durante 1 hora a  $23 \pm 2$  °C.

#### Tiolación de polisacárido de Pn-33F activado

5 Se preparó reciente diclorhidrato de cistamina en DMSO anhidro y se añadió 1 eq. mol. de diclorhidrato de cistamina a la solución de reacción de polisacárido activado. Se dejó que avanzase la reacción durante  $21 \pm 3$  horas a  $23 \pm 2$  °C. La solución de sacárido tiolado se diluyó 10 veces mediante la adición de succinato de sodio 5 mM previamente enfriado en solución salina al 0,9 %, pH 6,0. La solución de reacción diluida se filtró a través de un filtro de 5 µm. La diafiltración del polisacárido Pn-33F tiolado se llevó a cabo con casetes de membrana de ultrafiltración con un CPM de 100K, usando agua para inyección (API).

#### Reducción y purificación del polisacárido de Pn-33F tiolado activado

10 A la fracción retenida se le añade una solución de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), 5 eq. mol., después de la dilución de un 10 % en volumen de tampón de fosfato de sodio 0,1 M, pH 6,0. Se dejó que avanzase esta reacción de reducción durante  $2 \pm 1$  horas a  $23 \pm 2$  °C. La diafiltración del polisacárido de 33F tiolado se llevó a cabo con casetes de membrana de ultrafiltración con un CPM de 100K. La diafiltración se realizó frente a fosfato de sodio 10 mM previamente enfriado, pH 4,3. La fracción retenida de polisacárido de 33F tiolado se extrajo para los ensayos tanto de concentración de sacárido como de tiol (Ellman).

#### Reducción y purificación alternativa del polisacárido de Pn-33F tiolado activado

Como alternativa al procedimiento de purificación descrito anteriormente, el sacárido de 33F tiolado activado también se purificó como sigue.

20 A la mezcla de reacción de sacárido tiolado se le añadió una solución de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), 5 eq. mol., y se dejó que avanzase durante  $3 \pm 1$  horas a  $23 \pm 2$  °C. La mezcla de reacción se diluyó después 5 veces mediante la adición de succinato de sodio 5 mM previamente enfriado en solución salina al 0,9 %, a pH 6,0 y se filtró a través de un filtro de 5 µm. La diafiltración de sacárido tiolado se realizó usando un diavolumen de 40 veces de fosfato monobásico de sodio 10 mM previamente enfriado, a pH 4,3 con casetes de membrana de ultrafiltración con un CPM de 100K. La fracción retenida de polisacárido de 33F tiolado se extrajo para los ensayos tanto de concentración de sacárido como de tiol (Ellman). En la figura 8(A) se proporciona un diagrama de flujo del procedimiento de activación.

#### Procedimiento de conjugación

##### Conjugación del polisacárido de Pn33F tiolado con CRM<sub>197</sub> bromoacetilada

30 La proteína portadora CRM<sub>197</sub> se activó por separado mediante bromoacetilación, tal como se describe en el ejemplo 1 y después se hizo reaccionar con el polisacárido de Pn-33F activado para la reacción de conjugación. Antes de comenzar la reacción de conjugación, el recipiente de reacción se enfrió previamente a 5 °C. La CRM<sub>197</sub> bromoacetilada y el polisacárido de 33F tiolado se mezclaron juntos en un recipiente de reacción a una velocidad de agitación de 150-200 rpm. La relación de entrada de sacárido/proteína fue de  $0,9 \pm 0,1$ . El pH de la reacción se ajustó a 8,0 - 9,0. Se dejó que avanzase la reacción de conjugación a 5 °C durante  $20 \pm 2$  horas.

##### Protección de los grupos reactivos en CRM<sub>197</sub> bromoacetilada y en el polisacárido de Pn33F tiolado

Se protegieron los restos bromoacetilados sin reaccionar de las proteínas CRM<sub>197</sub> mediante reacción con 2 eq. mol. de N-acetil-L-cisteína durante 3 horas a 5 °C, seguido de la protección de cualquier grupo sulfhidrilo libre del polisacárido de 33F tiolado con 4 eq. mol. de yodoacetamida (IAA) durante 20 horas a 5 °C.

#### Purificación del glucoconjugado de Pn-33F enlazado a eTEC

40 La solución de conjugación se filtró a través de un filtro de 0,45 µm o de 5 µm. La diafiltración del glucoconjugado 33F se llevó a cabo con casetes de membrana de ultrafiltración con un CPM de 300K. La diafiltración se realizó frente a succinato 5 mM - solución salina al 0,9 %, pH 6,0. Después, se filtró la fracción retenida de 300K del glucoconjugado de Pn-33F a través de 0,22 µm y se almacenó a 5 °C. En la figura 8(B) se proporciona un diagrama de flujo del procedimiento de conjugación.

#### Resultados

Los parámetros de reacción y los datos de caracterización para varios lotes de glucoconjugados de Pn-33F-eTEC se muestran en la tabla 1. La activación-tiolación de CDT con diclorhidrato de cistamina generó glucoconjugados que tienen un rendimiento de sacárido del 63 % al 90 % y <1 % a 13 % de sacáridos libres.

**Tabla 1. Parámetros experimentales y datos de caracterización de conjugados de Pn33F-eTEC**

Lote del conjugado	33F-1A	33F-2B	33F-3C	33F-4D	33F-5E	33F-6F	33F-7G
Nivel de activación (mol de tiol/mol de polisacárido)	0,21	0,13	0,164	0,103	0,183	0,22	0,19
Nivel de activación (% de tiol)	21	13	16,4	10,3	18,3	22	19
Relación de sacárido/proteína (entrada)	0,75	1,0	0,75	1,0	1,0	0,75	0,80
Rendimiento de sacárido (%)	69 %	63 %	71 %	63 %	69 %	82 %	90 %
Relación de sacárido/proteína	1,3	1,7	1,2	1,9	1,6	1,1	1,5
Sacárido libre	12,9 %	7,7 %	4,4 %	7,2 %	7,3 %	< 4 %	< 4 %
PM mediante SEC-MALLS (kDa)	2627	2561	4351	2981	3227	3719	5527
CMCA/CMC	14,4/0	13,4/0	6,8/1,9	2,7/0,6	5,9/0,6	8,2/0	11,4/0,6
%K <sub>d</sub> (≤ 0,3)	N/D	85 %	88 %	75 %	68 %	67 %	76 %
Nivel de acetilación (mol de acetato/mol de polisacárido)	0,89	1,16	0,99	0,85	0,81	0,85	1,01
N/D= no disponible							

Títulos de OPA de glucoconjugados de Pn-33F eTEC con CRM<sub>197</sub>

- 5 Se determinaron los títulos de OPA de Pn-33F en ratones en condiciones convencionales (similares a los procedimientos de OPA descritos más adelante para los conjugados de 10A y 22F). Los títulos de OPA (GMT con IC de 95 %) a las cuatro y siete semanas se muestran en la tabla 2, demostrando que el glucoconjugado del serotipo 33F de Pn generó títulos de OPA en un modelo de inmunogenicidad murino.

**Tabla 2. Títulos de OPA de Pn-33F (GMT con IC del 95%)**

Conjugado de Pn 33F	0,001 µg	0,01 µg	0,1 µg
semana 4	4 (4, 5)	37 (17, 82)	414 (234, 734)
semana 7	8 (5, 13)	131 (54, 314)	17567 (9469, 32593)

### Ejemplo 3. Preparación de conjugados de Pn-33F eTEC adicionales

- 10 Se generaron conjugados de Pn-33F-eTEC adicionales usando el procedimiento descrito en el ejemplo 2. Los parámetros de reacción y los datos de caracterización para estos lotes adicionales de glucoconjugados de Pn-33F-eTEC se muestran en la tabla 3.

**Tabla 3. Parámetros experimentales y datos de caracterización de conjugados adicionales de Pn33F eTEC**

Lote del conjugado	33F-8H	33F-9I	33F-10J	33F-11K	33F-12L	33F-13M	33F-14N	33F-15O	33F-16P
Nivel de activación (mol de tiol/mol de polisacárido)	0,22	0,11	0,11	0,13	0,14	0,13	0,06	0,13	0,11
Relación de sacárido/proteína (entrada)	0,75	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
Rendimiento de sacárido (%)	78 %	88 %	89 %	67 %	69 %	86 %	81 %	91 %	88 %
Relación de sacárido/proteína	1,0	2,2	2,1	1,4	1,4	1,4	2,2	1,9	1,9
Sacárido libre	< 1 %	6,8 %	5,9 %	2,3 %	3,6 %	LDC	8,2 %	3,6 %	6,6 %
PM mediante SEC-MALLS (kDa)	4729	3293	3295	2246	2498	5539	3070	6009	3789
CMCA/CMC	6,6/ LDC	14,2/ 2,1	15,4/ 2,1	5,5/1	5,4/1,1	ND/ LDC	1,7/ 1,2	4,1/ 2,2	2,2/ 1,2

(continuación)

Lote del conjugado	33F-8H	33F-9I	33F-10J	33F-11K	33F-12L	33F-13M	33F-14N	33F-15O	33F-16P
%K <sub>d</sub> (≤ 0,3)	69 %	N/D	N/D	N/D	N/D	88 %	87 %	87 %	85 %
Nivel de acetilación (mol de acetato/mol de polisacárido)	0,86	0,93	0,87	1,01	0,99	0,71	0,78	0,8	0,82

LDC=límite de cuantificación; N/D= no disponible.

- 15 Como se ha mostrado anteriormente y en la tabla 3, se obtuvieron diversos conjugados de Pn-33F usando la conjugación con eTEC anterior. La química de eTEC permitió la preparación de conjugados con alto rendimiento,

bajo % de sacárido libre y alto grado de conjugación (lisinas conjugadas). De manera adicional, fue posible conservar más de un 80 % de la funcionalidad acetilo usando el procedimiento de conjugación de eTEC.

**Ejemplo 4. Evaluación de la estabilidad de glucoconjugados de Pn-33F-eTEC: tendencias de % de sacárido libre**

- 5 En tubos de polipropileno se dispensaron alícuotas del lote del conjugado 33F-2B (véase la tabla 1) y se almacenaron a 4 °C, 25 °C y 37 °C, respectivamente y se observaron las tendencias en el % de sacáridos libres. Los datos (% de sacárido libre) se muestran en la tabla 4. Tal como se muestra en esta tabla, no hubo cambios significativos en el % de sacárido libre.

**Tabla 4. Estabilidad del % de sacárido libre para el glucoconjugado de Pn-33F eTEC a 4 °C, 25 °C y 37 °C**

N.º de lote	Sacárido libre (%)						
	Tiempo						
33F-2B	0	1 sem	3 sem	1M	2M	3M	6M
	4 °C						
	7,7	N/D	8,3	N/D	9,7	11,2	13
	25 °C						
	7,7	N/D	10,8	N/D	11,8	N/D	N/D
	37 °C						
	7,7	12,1	N/D	13,4	N/D	N/D	N/D

sem= semana; M=mes; N/D= no disponible.

- 10 La estabilidad acelerada de otro lote de conjugado (lote 33F-3C) también se llevó a cabo a 37 °C hasta 1 mes. Como se muestra en la tabla 5, no hubo cambios significativos en el % de sacárido libre a 37 °C, hasta 1 mes.

**Tabla 5. Estabilidad del % de sacárido libre para el glucoconjugado de Pn-33F eTEC a 37 °C**

N.º de lote	Sacárido libre (%)				
	Tiempo				
33F-3C	0	1day	1 sem	2wks	1M
	37 °C				
	4,4	5,9	6,4	7,1	7,2

- 15 Para confirmar adicionalmente la estabilidad de conjugados de eTEC, los lotes de conjugados adicionales (33F-3C y 33F-5E (véase la Tabla 1)) almacenados a 4 °C se observaron hasta aproximadamente un año, respecto de sus posibles tendencias en % de sacáridos libres. Como se muestra en la tabla 6, no hubo cambios significativos en los niveles de % de sacáridos libres para los conjugados almacenados a 4 °C durante un período extendido de hasta aproximadamente un año.

**Tabla 6. Estabilidad del % de sacárido libre para los glucoconjugados de Pn-33F eTEC a 4 °C**

N.º de lote	Sacárido libre (%)				
	Tiempo				
	0	3M	4M	12M	14M
	4 °C				
33F-3C	4,4	N/D	5,3	N/D	7,6
33F-5E	7,3	6,3	N/D	7,4	N/D

M=mes; N/D= no disponible

- 20 Los conjugados del serotipo 33F generados mediante la química de 33F eTEC demostraron ser estables sin degradación destacable, observada mediante las tendencias de los sacáridos a diversas temperaturas (tiempo real y acelerado).

**Ejemplo 5. Preparación de conjugados de Pn-8 a CRM<sub>197</sub>**

Preparación de glucoconjugados de Pn-8 RAC/DMSO

- 25 Se descongeló el polisacárido congelado y se transfirió al vaso de reacción. Se añadieron ácido acético 2 M y API (agua para inyección) a la solución de polisacárido hasta lograr una concentración final de polisacárido de aproximadamente 2,5 g/l y una concentración final de ácido acético de 0,2 M.

Hidrólisis del polisacárido

El polisacárido natural se hidrolizó químicamente antes de la activación. La solución de polisacárido diluido se calentó a 70 °C y después se mantuvo a esta temperatura durante 3,5 horas.

- 30 Oxidación del polisacárido

La oxidación del polisacárido se inició mediante la adición de solución de peryodato de sodio y la reacción se mantuvo para que avanzase durante 20 h a 23 °C.

Purificación del polisacárido activado

5 El polisacárido activado se concentró usando casetes de ultrafiltración. La diafiltración se llevó a cabo frente a un diavolumen de 20 veces de API.

Liofilización

El polisacárido activado se combina con sacarosa a una relación de 25 gramos de sacarosa por gramo de polisacárido activado. Las botellas que contienen el sacárido activado y la sacarosa se congelan por capas en baños de etanol y se liofilizan.

10 Conjugación del polisacárido activado a CRM<sub>197</sub> y protección

El polisacárido activado liofilizado se reconstituye a 2 mg/ml en DMSO. Se añadió DMSO a la CRM<sub>197</sub> liofilizada para la reconstitución. Se añadió CRM<sub>197</sub> reconstituida al polisacárido activado reconstituido. Después, se inició la conjugación añadiendo cianoborohidruro de sodio a la mezcla de reacción y se incubó a 23 °C durante 24 h. La terminación de la reacción de conjugación se efectúa añadiendo 2 MEq de borohidruro de sodio. Esta reacción de protección continuó durante 3 h a 23 °C.

15

Purificación del conjugado

Después, la solución de conjugado se diluyó en succinato 5 mM - solución salina al 0,9 % enfríado (pH 6,0), se filtró, se concentró a 2 - 4 g/l usando membranas de celulosa de 300K y se llevó a una primera etapa de diafiltración frente a succinato 5 mM - solución salina al 0,9 % (pH 6,0). Se efectuó una etapa de purificación final mediante diafiltración con tampón succinato 5 mM-solución salina al 0,9 %, pH 6,0. Tras completarse la diafiltración, el conjugado purificado se transfirió a un tanque de recogida a través de un filtro de 0,22 µm.

20

Dilución del conjugado en bruto monovalente

El conjugado se diluyó adicionalmente con succinato 5 mM / solución salina al 0,9 % (pH 6) hasta una concentración de sacárido diana de 0,5 mg/ml. La etapa de filtración final de 0,22 µm se completó para preparar el producto de conjugado en bruto monovalente (MBC) para su formulación.

25

Se obtuvieron varios conjugados usando el procedimiento anteriormente descrito variando diferentes parámetros (por ejemplo, relación de entrada de sacárido-proteína, concentración de la reacción y MEq de cianoborohidruro de sodio). En la tabla 7 se proporciona la caracterización de glucoconjugados de Pn-8 representativos a CRM<sub>197</sub>.

**Tabla 7. Caracterización de conjugados de Pn8-CRM<sub>197</sub>**

N.º de muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>PM del sacárido activado mediante MALLS (kDa)</b>	267	270	352	65	233	340	113	250	230
<b>Relación de sacárido/proteína</b>	0,81	0,84	0,5	2,7	1,15	1,0	0,81	0,64	0,42
<b>PM mediante SEC-MALLS (kDa)</b>	12200	8670	3460	3379	4748	4255	5470	9924	6787

30 Se determinaron los títulos de actividad opsonofagocítica (OPA) para conjugados de Serotipo 8-CRM<sub>197</sub> en ratones en condiciones convencionales (similares a los procedimientos de OPA descritos más adelante para los conjugados de 10A y 22F). Los títulos de OPA (título de media geométrica (GMT) con un intervalo de confianza (IC) del 95 %) a las cuatro semanas a diferentes dosis se muestran en las tablas 8 y 9 (dos experimentos separados), demostrando que el conjugado del serotipo 8 (muestras 1-9; véase también la tabla 7 para los datos de caracterización de estos conjugados) generaron títulos de OPA en un modelo de inmunogenicidad murino.

35

Como se muestra en la tabla 8, se demostró que los conjugados del serotipo 8 tienen títulos de anticuerpo significativamente mayores, en comparación con el polisacárido no conjugado de control, que tuvo escasos títulos de anticuerpos.

**Tabla 8. Inmunogenicidad de los conjugados del serotipo 8-CRM<sub>197</sub>**

N.º de muestra	GMT de OPA (IC del 95 %)		
	0,001 µg	0,01 µg	0,1 µg
1	17 (10, 30)	88 (47, 165)	1344 (896, 2016)
2	7 (4, 11)	184 (87, 387)	1934 (1313, 2847)
3	4 (4, 4)	17 (9, 30)	779 (345, 1757)
4	5 (4, 7)	74 (41, 136)	558 (311, 1001)
<b>PS no conjugado</b>			13 (3, 55)

40

Tabla 9. Inmunogenicidad de los conjugados del serotipo 8-CRM<sub>197</sub>

N.º de muestra	GMT de OPA (IC del 95 %)	
	0,001 µg	0,01 µg
5	8 (5, 12)	322 (208, 498)
6	12 (8, 19)	264 (129, 537)
7	12 (7, 21)	521 (366, 743)
8	19 (10, 38)	404 (238, 687)
9	33 (14, 80)	686 (380, 1237)
2	13 (7, 23)	177 (94, 336)

Los datos generales generados a partir de conjugados preparados mediante el procedimiento de aminación reductora anterior demostraron que se podían preparar conjugados con un buen rendimiento de conjugación, bajo % de sacárido libre y con buena estabilidad. De manera adicional, los conjugados preparados generaron buenos títulos de OPA en un modelo de inmunogenicidad murino.

#### **Ejemplo 6. Preparación del conjugado de polisacárido del serotipo 10A - CRM<sub>197</sub>**

Preparación de polisacárido del serotipo 10A de *S. pneumoniae* aislado

Los polisacáridos capsulares del serotipo 10A pueden obtenerse directamente de bacterias usando procedimientos de aislamiento conocidos por un experto habitual en la materia (véanse, por ejemplo, los procedimientos ilustrativos desvelados en las Publicaciones de Solicitud de Patente de los Estados Unidos n.º 2006/0228380, 2006/0228381, 2007/0184071, 2007/0184072, 2007/0231340 y 2008/0102498 y el documento WO 2008/118752). Se cultivaron *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 10A en un segundo matraz y después se transfirieron a un fermentador de siembra. Una vez que se alcanzó la densidad óptica diana, se transfirieron las células a un fermentador de producción. El caldo de fermentación se inactivó mediante la adición de N-lauroil sarcosina y se purificaron mediante ultrafiltración y diafiltración.

Oxidación del polisacárido capsular del serotipo 10A de *Streptococcus pneumoniae* aislado

Se añadió un volumen calculado de tampón de fosfato de potasio 0,1 M (pH 6,0) y agua para inyección (API) a la solución de polisacárido para lograr una concentración final de polisacárido de 2,5 g/l y una concentración final de tampón de fosfato de potasio 25 mM, en caso necesario, el pH se ajustó a aproximadamente 6,0. Después, se enfrió el polisacárido diluido a 5 °C. La oxidación se inició mediante la adición de 0,25 equivalentes molares (MEq) de solución de peryodato de sodio. El tiempo de la reacción de oxidación fue de aproximadamente 4 h a 5 °C. La reacción de oxidación se inactivó con 1 MEq de 2,3-butanodiol con agitación continua a 5 °C durante 1-2 h.

Tras alcanzar el tiempo de reacción diana, se concentró el polisacárido activado usando casetes de ultrafiltración Millipore con un CPM de 30K. Posteriormente, la diafiltración se llevó a cabo frente a un diavolumen de 20 veces de API. El polisacárido activado purificado se almacenó a 5 °C. El sacárido activado purificado se caracteriza, entre otras cosas, por (i) su peso molecular mediante SEC-MALLS y (ii) su grado de oxidación.

Conjugación de polisacárido del serotipo 10A de *S. pneumoniae* activado con CRM<sub>197</sub>

El procedimiento de conjugación consistió en las siguientes etapas:

- a. Combinación con excipiente de sacarosa y liofilización;
- b. Reconstitución del polisacárido liofilizado y CRM<sub>197</sub>;
- c. Conjugación del polisacárido activado a CRM<sub>197</sub> y protección; y
- d. Purificación del conjugado

El polisacárido activado se combina con sacarosa a una relación de 25 g de sacarosa por gramo de polisacárido activado. Después, se liofilizó la botella de mezcla combinada. Después de la liofilización, las botellas que contenían polisacárido activado liofilizado se almacenaron a -20 °C.

b. Reconstitución del polisacárido activado liofilizado y la proteína CRM<sub>197</sub>

El polisacárido activado liofilizado se reconstituyó en dimetilsulfóxido (DMSO) anhidro. Tras la completa disolución del polisacárido, se añadió la misma cantidad de DMSO a la CRM<sub>197</sub> calculada para la reconstitución.

c. Conjugación del polisacárido activado a CRM<sub>197</sub> y protección

Se añadió CRM<sub>197</sub> reconstituida (en DMSO) al polisacárido activado reconstituido en el reactor de conjugación. La concentración final de polisacárido es de 1 g/l. La conjugación se llevó a cabo añadiendo 1,2 MEq de cianoborohidruro de sodio a la mezcla de reacción. La reacción se incubó a 23 °C durante 24 h. La terminación de la reacción de conjugación se efectúa añadiendo 2 MEq de borohidruro de sodio. La reacción de protección se incubó a 23 °C durante 3 h.

La terminación de la reacción de conjugación se efectúa añadiendo 2 MEq de borohidruro de sodio. Esta reacción de protección continuó durante 3 h a 23 °C.

d. Purificación del conjugado

5 Después, se diluyó la solución de conjugado en 5x (en volumen) de succinato 5 mM-solución salina al 0,9 % enfríada (pH 6,0) y se llevó a cabo una diafiltración 20X usando succinato 5 mM-solución salina al 0,9 % (pH 6,0). Tras completarse la diafiltración inicial, la fracción retenida de conjugado se transfirió a través de un filtro de 0,22 µm. El conjugado se diluyó adicionalmente con succinato 5 mM/solución salina al 0,9 % (pH 6) y después de la etapa final de filtración de 0,22 µm, se almacenó a 2-8 °C.

10 Se obtuvieron varios conjugados usando el procedimiento anteriormente descrito variando diferentes parámetros (por ejemplo, relación de entrada de sacárido-proteína, concentración de la reacción y MEq de cianoborohidruro de sodio). La química anterior permitió generar conjugados del serotipo 10A que se demostró que eran estables sin degradación perceptible observada por las tendencias de sacárido libre a diversas temperaturas (tiempo real y acelerado). En la tabla 10 se proporciona la caracterización de glucoconjugados de Pn-10A representativos a CRM<sub>197</sub>.

15

**Tabla 10. Caracterización de conjugados de Pn-10A-CRM<sub>197</sub>**

N.º de conjugado	1	2	3	4	5	6
<b>GO</b>	12,2	19,5	5,2	10,3	10,8	10,5
<b>PM de sacárido activado, kDa</b>	191	240	80	170	170	170
<b>Relación de entrada</b>	1,0	1,0	1,0	1,1	1,1	1,1
<b>% de rendimiento</b>	56	28,5	65	82	73	66
<b>% de sacárido libre</b>	6,8	10,0	6,7	6,8	6,4	9,7
<b>PM del conjugado, kDa</b>	3838	5810	4630	4034	3463	5540
<b>Relación de sacárido/proteína</b>	0,82	0,88	0,85	1,1	1,2	1,0
<b>Modificación de Lys AAA</b>	7,4	3,7	13,1	6,9	6,7	6,1

20 Se determinaron los títulos de actividad opsonofagocítica (OPA) para los conjugados del serotipo 10A-CRM<sub>197</sub> en ratones en condiciones estándar. Se inmunizó a grupos de treinta ratones Swiss Webster hembra de 6-7 semanas de edad con 0,001 µg, 0,01 µg o 0,1 µg de conjugados de ensayo por vía subcutánea en la semana 0. Se revacunó a los ratones con la misma dosis de conjugado en la semana 3 y después se extrajo sangre en la semana 4. Los OPA específicos de serotipo se llevaron a cabo en muestras de suero de la semana 4.

25 Los ensayos de actividad opsonofagocítica (OPA) se usan para medir los anticuerpos funcionales en sueros murinos específicos para el serotipo 10A de *S. pneumoniae*. El suero de ensayo se prepara en reacciones de ensayo que miden la capacidad de las inmunoglobulinas específicas para el polisacárido capsular para opsonizar las bacterias, causar la deposición del complemento, y de este modo facilitar la fagocitosis y la eliminación de las bacterias por fagocitos. El título de OPA se define como la dilución recíproca que da como resultado una reducción del 50 % en el recuento bacteriano frente a los pocillos de control sin suero de ensayo. El título de OPA se interpola a partir de las dos diluciones que abarcan este valor de corte de eliminación del 50 %. Los procedimientos de OPA se basaron en los procedimientos descritos en Hu y col. (2005) Clin Diagn Lab Immunol 12 (2):287-295 con las siguientes modificaciones. El suero de ensayo se diluyó en serie 2,5 veces y se añadió a placas de ensayo de microtitulación.

30 Se añadieron cepas bacterianas diana del serotipo 10A a los pocillos y las placas se agitaron a 37 °C durante 30 minutos. Se añadieron células HL-60 diferenciadas (fagocitos) y suero de cría de conejo (3 a 4 semanas de edad, PEL-FREEZ®, concentración final al 12,5 %) a los pocillos y las placas se agitaron a 37 °C durante 60 minutos. Para finalizar la reacción, se añadieron 80 µl de NaCl al 0,9 % a los pocillos, se mezclaron y se transfirió una alícuota de 10 µl a los pocillos de placas de filtro MULTISCREEN® HTS HV (MILLIPORE®) que contenían 200 µl de agua. Se filtró el líquido de las placas al vacío y se añadieron 150 µl de medio HYSOY® a cada pocillo y se filtró. Después se incubaron las placas de filtro a 37 °C, con CO<sub>2</sub> al 5 % durante toda la noche y después se fijaron con solución de decoloración (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA). Las placas se tiñeron después con azul de Coomassie y se decoloraron una vez. Se obtuvieron imágenes de las colonias y se numeraron en un analizador Cellular Technology Limited (CTL) (Shaker Heights, OH) IMMUNOSPOT®. Los recuentos de colonias en bruto se usaron para

35 40 representar las curvas de eliminación y calcular los títulos de OPA.

45 Los títulos de OPA (título de media geométrica (GMT) con un intervalo de confianza (IC) del 95 %) a las cuatro semanas a diferentes dosis se muestran en la tabla 11, demostrando que los conjugados del serotipo 10A (muestras 1-3; véase también la tabla 10 para los datos de caracterización de estos conjugados) generaron títulos de OPA en un modelo de inmunogenicidad murino. Como se muestra en la tabla 11, se demostró que los conjugados del serotipo 10A tenían títulos de OPA significativamente mayores, en comparación con el polisacárido no conjugado de control, que tenía una escasa respuesta de OPA.

Tabla 11. Inmunogenicidad de los conjugados del serotipo 10A-CRM<sub>197</sub>

N.º de muestra	GMT de OPA (IC del 95 %)		
	0,001 µg	0,01 µg	0,1 µg
1	858 (556, 1324)	1015 (610, 1691)	4461 (3065, 6494)
2	1411 (737, 2703)	796 (460, 1378)	2873 (1768, 4842)
3	322 (180, 574)	1062 (528, 2135)	2618 (1415, 4842)
PS no conjugado			602 (193, 1882)

**Ejemplo 7. Conjugación de Pn serotipo-12F usando TEMPO/NCS**

Para mejorar la estabilidad de los glucoconjugados del serotipo 12F-CRM<sub>197</sub>, se exploraron químicas alternativas usando radical libre de 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi (TEMPO) y N-clorosuccinimida (NCS) como cooxidante para oxidar los alcoholes primarios en grupos aldehído. El análisis de CG/EM demostró que los sitios de oxidación eran diferentes a los de la oxidación mediada por peryodato. En el caso de la oxidación con TEMPO-NCS, se oxidaron α-D-Glcp y 2-Glcp, mientras que α-D-Galp fue el principal sitio de oxidación cuando se usó peryodato (véase la figura 4). Como se describe en más detalle en el presente documento, se usó TEMPO en cantidades catalíticas (≤ 0,1 equivalentes molares) y se logró el grado de oxidación (GO) deseado variando las cantidades de NCS usado. Posteriormente, se sintetizaron y caracterizaron varios conjugados. En general, la producción de los glucoconjugados del serotipo 12F se llevó a cabo en varias fases, de la siguiente manera:

- Hidrólisis del polisacárido del serotipo 12F hasta pesos moleculares de 50 kDa a 500 kDa
- Activación del polisacárido del serotipo 12F con TEMPO/NCS;
- Purificación del polisacárido activado;
- Conjugación del serotipo 12F a la proteína CRM<sub>197</sub>; y
- Purificación de los conjugados de serotipo 12F - CRM<sub>197</sub>.

**Hidrólisis y oxidación del serotipo 12F**

La hidrólisis del polisacárido se llevó a cabo normalmente en condiciones ácidas con calentamiento para obtener un peso molecular medio en el intervalo deseado de 100 kDa a 350 kDa. A continuación se describe un experimento típico.

**Hidrólisis**

Se añadió la solución de polisacárido del serotipo 12F a un vaso de reacción con camisa. A este, se añadió el volumen necesario de ácido acético 0,30 M y agua para inyección (API) para mantener una concentración de ácido acético ~ 0,1 M. El pH de la solución se ajustó a  $3,2 \pm 0,3$  usando NaOH 1 N o ácido acético glacial. Se aumentó la temperatura de la mezcla de reacción a  $70 \pm 5$  °C. La mezcla de reacción se agitó a  $70 \pm 5$  °C durante 90 -120 minutos. La mezcla de reacción se enfrió a  $23 \pm 2$  °C y se neutralizó (pH 7,0) añadiendo solución de NaOH 1 M. El polisacárido hidrolizado se purificó mediante ultrafiltración/diafiltración frente a API usando membranas con un CPM de 30K. La solución se filtró a través de un filtro de 0,22 µm y se almacenó a de 2 a 8 °C hasta su oxidación. El peso molecular del polisacárido hidrolizado se analizó mediante SEC-MALLS para garantizar que el peso molecular se encontraba en el intervalo diana de 100 kDa a 350 kDa.

**Oxidación parcial**

En un experimento, se separó mecánicamente por tamaños el polisacárido del serotipo 12F usando homogeneización a presión usando un microfluidificador para reducir el peso molecular a de aproximadamente 100 kDa a 500 kDa. Se añadió el polisacárido separado por tamaños a un recipiente de reacción a una concentración de 4,0 mg/ml y se mezcló con tampón bicarbonato/carbonato (tampón de NaHCO<sub>3</sub> 0,5 M/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,05 M, a pH 8,6) a una relación de 1:1 v/v. A la mezcla agitada se le añadieron ≤ 0,1 equivalentes molares de TEMPO. La reacción se inició mediante la adición de 0,6 a 1,0 equivalentes molares de NCS. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, tras lo cual se purificó el polisacárido mediante diafiltración, con API usando una membrana de ultrafiltración de 30K. Se recogió el polisacárido purificado y se determinó el grado de oxidación (GO) mediante mediciones cuantitativas de aldehído (usando un ensayo de 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona (MBTH)) y polisacárido (usando un ensayo de antrona).

En otro experimento, se hidrolizó el polisacárido del serotipo 12F para reducir el peso molecular hasta un peso molecular de aproximadamente 100 kDa a 500 kDa. El polisacárido del serotipo 12F se añadió a un vaso de reacción y se mezcló con tampón de NaHCO<sub>3</sub> 0,5 M/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,05 M (pH 8,6) a una relación de 1:1 v/v. A la mezcla en agitación se le añadió de 0,6 a 1,0 equivalentes molares de NCS disueltos en API. La activación se inició mediante la adición de aproximadamente 0,1 equivalentes molares de TEMPO disuelto en API. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, tras lo cual se purificó el polisacárido mediante diafiltración con API usando una membrana de ultrafiltración de 30K. El polisacárido activado purificado se filtró a través de un filtro de 0,2 µm y se almacenó a 4 °C antes de su uso.

Las oxidaciones mediadas por TEMPO/NCS también se llevaron a cabo con éxito en tampones de fosfato de sodio a un pH de 6,5, 7,0, 7,5 y 8,0. En algunos experimentos de activación se usó un alcohol primario tal como n-propanol

para inactivar los reactivos con el fin de evitar la sobreoxidación del sacárido. En otro conjunto de experimentos, se sometió directamente a oxidación el polisacárido hidrolizado químicamente, sin la etapa de purificación por ultrafiltración/diafiltración.

Conjugación del polisacárido del serotipo 12F oxidado

5 En un experimento, el polisacárido del serotipo 12F oxidado purificado se añadió a un vaso de reacción, seguido de la adición de tampón de fosfato de sodio 0,5 M (pH 6,5) a una concentración final del tampón de 0,1 M. A esta solución, se le añadió CRM<sub>197</sub> previamente liofilizada y se mezcló exhaustivamente para obtener una solución homogénea. El pH se ajustó a 6,8 usando HCl diluido o solución de NaOH 1 N. Esto fue seguido de la adición de 1,5 equivalentes molares de NaCNBH<sub>3</sub>. La mezcla de reacción se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente (23 °C) y durante 2,5 días a 37 °C. Después, se diluyó la mezcla de reacción con solución salina al 0,9 % 1X y se "protegieron" los grupos aldehído sin reaccionar con 2 equivalentes molares de borohidruro de sodio. El tiempo de la reacción de protección fue de 3 horas.

15 En otro experimento, el serotipo 12F activado purificado se añadió a un vaso de reacción, seguido de la adición de tampón de fosfato de sodio 0,5 M (pH 6,5) a una concentración final del tampón de 0,1 M. A esta solución, se le añadió CRM<sub>197</sub> previamente liofilizada y se mezcló exhaustivamente para obtener una solución homogénea. El pH se ajustó a 6,8 usando HCl diluido o solución de NaOH 1 N. Esto fue seguido de la adición de 3 equivalentes molares de NaCNBH<sub>3</sub>. La mezcla de reacción se agitó durante 24 horas a 23 °C y durante 48 horas a 37 °C. Después, se diluyó la mezcla de reacción con solución salina al 0,9 % 1X y con agitación, los grupos aldehído sin reaccionar se "protegieron" con 1 equivalente molar de borohidruro de sodio, NaBH<sub>4</sub>. El tiempo de la reacción de protección fue de 3 horas.

20 En otro experimento, el serotipo 12F activado purificado se añadió a un vaso de reacción y se mezcló con solución de CRM<sub>197</sub>. La mezcla se liofilizó y el polvo se disolvió en tampón de fosfato de sodio 0,1 M (pH 6,8) a una concentración final de sacárido de 5 mg/ml. En caso necesario, se ajustó el pH a 6,8 usando HCl diluido o solución de NaOH 1N. Esto fue seguido de la adición de 3 equivalentes molares de NaCNBH<sub>3</sub>. La mezcla de reacción se agitó durante 24 horas a 23 °C y durante 48 horas a 37 °C. Después, se diluyó la mezcla de reacción con solución salina al 0,9 % 1X, los grupos aldehído sin reaccionar se "protegieron" con 1 equivalente molar de borohidruro de sodio, NaBH<sub>4</sub>. El tiempo de la reacción de protección fue de 3 horas.

Purificación del conjugado

30 La mezcla de reacción protegida se filtró usando un filtro de 5 µm y después se purificó usando membranas de ultrafiltración con un CPM de 100K. En primer lugar, se diafiltró el conjugado usando tampón de succinato 10 mM/solución salina al 0,9 % a pH 6,0. El conjugado purificado se filtró después a través de filtros de 0,45/0,22 µm para obtener el conjugado en bruto.

Grado de oxidación

35 La oxidación con éxito de los alcoholes primarios en el polisacárido del serotipo 12F se logró usando el sistema TEMPO/NCS. Los polisacáridos del serotipo 12F hidrolizados se oxidaron hasta grados de oxidación (GO) variables mediante el ajuste de la cantidad de cooxidante de NCS. En la figura 9 se muestra el efecto en el GO mediante diversas cantidades de NCS usando diferentes lotes y pesos moleculares de polisacárido. Normalmente, la reacción de oxidación se completa en 2 horas, ya que no se observó un cambio significativo en el GO después de 2 horas.

40 Se generaron diversos conjugados del serotipo 12F y se caracterizaron usando el polisacárido oxidado mediante TEMPO/NCS. Los resultados se resumen en la tabla 12.

**Tabla 12. Conjugados del serotipo 12F neumocócico-CRM<sub>197</sub>**

Lote del conjugado	12F-84A	12F-97B	12F-147C	12F-171D	12F-177-6E	12F-181F
Tiempo de oxidación (h)	2	2	4	2	2	2
Grado de oxidación (GO)	12,0	6,0	9,6	12,0	11,5	11,5
% de rendimiento de sacárido activado	80	71	70	89	86	86
PM del sacárido activado mediante MALLS (kDa)	137	155	170	190	240	240
Procedimiento de conjugación	Lio-CRM	Lio-CRM	Lio-CRM	Lio-CRM	Lio-CRM	Co-Lio
Resultados del conjugado						
Rendimiento de sacárido (%)	51,6	76,8	53,6	76,3	65,8	40,7

(continuación)

Lote del conjugado	12F-84A	12F-97B	12F-147C	12F-171D	12F-177-6E	12F-181F
Relación de sacárido/proteína	1,2	0,9	1,0	1,1	1,4	0,9
% de sacárido libre	24	10	17	20	23	14
PM mediante SEC-MALLS (kDa)	2050	3000	3600	1500	2400	2100

**Ejemplo 8. Inmunogenicidad de los conjugados de Pn-serotipo 12F-CRM<sub>197</sub> usando el procedimiento de oxidación de TEMPO/NCS**

Se determinaron los títulos de actividad opsonofagocítica (OPA) para los conjugados del serotipo 12F-CRM<sub>197</sub> en ratones en condiciones estándar. Los títulos de OPA (título de media geométrica (GMT) con un intervalo de confianza (IC) del 95 %) a las cuatro y siete semanas se muestran en la tabla 13, demostrando que el conjugado del serotipo 12F-CRM<sub>197</sub> (lote 12F-97B; véase también la tabla 12 para los datos de caracterización de este conjugado) generaron títulos de OPA en un modelo de inmunogenicidad murino. El conjugado generado mediante TEMPO-NCS fue más inmunogénico que el conjugado de control (171B) generado a partir de la oxidación con peryodato.

**Tabla 13. Inmunogenicidad de los conjugados del serotipo 12F-CRM<sub>197</sub>**

Muestra/dosis de conjugado	0,001 µg	0,01 µg	0,1 µg
Control de oxidación de peryodato (171B)	4	16	172
Oxidación con TEMPO/NCS (12F-97B)	40	417	880

**Ejemplo 9. Evaluación de la estabilidad del glucoconjugado de Pn-12F**

La comparación de la estabilidad (a 25 °C) de los conjugados generados mediante oxidación con peryodato frente a la oxidación con TEMPO/NCS (véase la figura 10) demostró que el conjugado generado mediante la oxidación de los polisacáridos de Pn-12F era relativamente más estable. Como se muestra en la figura 10, se observó un aumento en el sacárido libre con el paso del tiempo para el glucoconjugado generado mediante la oxidación con peryodato del polisacárido de Pn-12F a 25 °C. Por el contrario, el glucoconjugado preparado usando la oxidación con TEMPO/NCS del polisacárido de Pn-12F no mostró tendencias significativas para el sacárido libre en condiciones similares.

**Ejemplo 10. Preparación de conjugado de polisacárido del serotipo 15B- CRM<sub>197</sub>**

Preparación de polisacárido del serotipo 15B de *Streptococcus pneumoniae* aislados. Los polisacáridos capsulares 15B se pueden obtener directamente de bacterias usando procedimientos de aislamiento conocidos por el experto en la materia. Se cultivaron *S. pneumoniae* del serotipo 15B en un segundo matraz y después se transfirieron a un fermentador de siembra. Una vez que se alcanzó la densidad óptica diana, se transfirieron las células a un fermentador de producción. El caldo de fermentación se inactivó mediante la adición de N-lauroil sarcosina y se purificaron mediante ultrafiltración y diafiltración.

Después, se separó por tamaños el polisacárido del serotipo 15B de *S. pneumoniae* mediante homogeneización de alta presión usando un homogeneizador PANDA 2K® (GEA Niro Soavi, Parma, Italia) para producir el polisacárido del serotipo 15B de *S. pneumoniae* aislado.

Preferentemente, el polisacárido capsular del serotipo 15B de *S. pneumoniae* aislado obtenido mediante el procedimiento anterior comprende al menos 0,6 mM de acetato por mM de polisacárido capsular del serotipo 15B y tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 500 kDa, preferentemente de 150 kDa a 350 kDa.

Oxidación del polisacárido capsular del serotipo 15B de *Streptococcus pneumoniae* aislado

La oxidación del polisacárido se llevó a cabo en tampón de fosfato de potasio 100 mM (pH 6,0) mediante la adición secuencial de una cantidad calculada de tampón de fosfato de potasio 500 mM (pH 6,0) y API para dar una concentración final de polisacárido de 2,0 g/l. En caso necesario, se ajustó el pH de la reacción a pH 6,0, aproximadamente. Después del ajuste del pH, se ajustó la temperatura de la reacción a 23 °C. La oxidación se inició mediante la adición de aproximadamente 0,25 equivalentes molares de peryodato de sodio. La reacción de oxidación se llevó a cabo a 23 °C durante 16 h, aproximadamente.

La concentración y diafiltración del polisacárido activado se llevó a cabo usando casetes de ultrafiltración con un CPM de 10K. La diafiltración se llevó a cabo frente a diavolúmenes de 20 veces de API. El polisacárido activado purificado se almacenó entonces a 5 °C. El sacárido activado purificado se caracterizó, entre otras cosas, mediante (i) concentración de sacárido mediante ensayo colorimétrico; (ii) concentración de aldehído mediante ensayo colorimétrico; (iii) grado de oxidación; (iv) peso molecular mediante SEC-MALLS y (v) presencia de O-acetilo y glicerol.

La SEC-MALLS se usa para la determinación del peso molecular de los polisacáridos y los conjugados de polisacárido-proteína. La SEC se usa para separar los polisacáridos por su volumen hidrodinámico. Se usan detectores del índice de refracción (IR) y de dispersión de luz láser multiángulo (MALLS) para la determinación del peso molecular. Cuando la luz interactúa con la materia, se dispersa y la cantidad de luz dispersada está relacionada con la concentración, el cuadrado de dn/dc (los incrementos específicos del índice de refracción) y la masa molar de la materia. La medición del peso molecular se calcula basándose en las lecturas de la señal de luz dispersada del detector de MALLS y la señal de concentración del detector de IR.

El grado de oxidación (GO = moles de unidad repetida de azúcar / moles de aldehído) del polisacárido activado se

determinó como se indica a continuación:

Los moles de unidades repetidas de azúcar se determinan mediante diversos procedimientos colorimétricos, por ejemplo, usando el procedimiento de antrona. En primer lugar, el polisacárido se degrada hasta monosacáridos mediante la acción de ácido sulfúrico y calor. El reactivo de antrona reacciona con las hexosas para formar un complejo de color amarillo verdoso cuya absorbancia se lee espectrofotométricamente a 625 nm. Dentro del intervalo del ensayo, la absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de hexosa presente.

Simultáneamente, también se determinan los moles de aldehído, usando el procedimiento colorimétrico de MBTH. El ensayo de MBTH implica la formación de un compuesto de azina haciendo reaccionar grupos aldehído (de una muestra dada) con una 3-metil-2-benzotiazolona hidrazona (reactivo del ensayo de MBTH). El exceso de 3-metil-2-benzotiazolona hidrazona se oxida para formar un catión reactivo. El catión reactivo y la azina reaccionan para formar un cromóforo de color azul. El cromóforo formado se lee después espectroscópicamente a 650 nm. Preferentemente, el polisacárido capsular del serotipo 15B de *S. pneumoniae* activado obtenido mediante el procedimiento anterior comprende al menos 0,6 mM de acetato por mM de polisacárido capsular del serotipo 15B y tiene un peso molecular de entre 50 kDa y 500 kDa, preferentemente de 150 kDa a 350 kDa.

15 Conjugación de polisacárido capsular del serotipo 15B de *S. pneumoniae* activado con CRM<sub>197</sub>

El procedimiento de conjugación consistió en las siguientes etapas:

- a) Combinación con excipiente de sacarosa y liofilización;
- b) Reconstitución del polisacárido liofilizado activado y CRM<sub>197</sub>;
- c) Conjugación del polisacárido activado a CRM<sub>197</sub> y protección; y
- d) Purificación del conjugado

a) Combinación con excipiente de sacarosa y liofilización

El polisacárido activado se combinó con sacarosa a una relación de 25 gramos de sacarosa por gramo de polisacárido activado. Después, se liofilizó la botella de mezcla combinada. Después de la liofilización, las botellas que contenían polisacárido activado liofilizado se almacenaron a -20 °C. Se congeló por capas la cantidad calculada de CRM<sub>197</sub> y se liofilizó por separado. La CRM<sub>197</sub> liofilizada se almacenó a -20 °C.

b) Reconstitución del polisacárido activado liofilizado y la proteína CRM<sub>197</sub>

El polisacárido activado liofilizado se reconstituyó en dimetilsulfóxido (DMSO) anhidro. Tras la completa disolución del polisacárido, se añadió una cantidad igual de DMSO anhidro a la CRM<sub>197</sub> liofilizada para la reconstitución.

c) Conjugación y protección

El polisacárido activado reconstituido se combinó con CRM<sub>197</sub> reconstituida en el vaso de reacción (relación de entrada: 0,8:1), seguido de mezclado exhaustivo para obtener una solución transparente antes de iniciar la conjugación con cianoborohidruro de sodio. La concentración final del polisacárido en la solución de reacción es de aproximadamente 1 g/l. La conjugación se inició añadiendo 1,0 - 1,5 MEq de cianoborohidruro de sodio a la mezcla de reacción y se incubó a 23 °C durante 40-48 h. La reacción de conjugación se terminó añadiendo 2 MEq de borohidruro de sodio (NaBH<sub>4</sub>) para proteger los aldehídos sin reaccionar. Esta reacción de protección continuó a 23 °C durante 3 h.

d) Purificación del conjugado

La solución de conjugado se diluyó a 1:10 con succinato 5 mM-solución salina al 0,9 % (pH 6,0) enfriado en la preparación para la purificación mediante filtración de flujo tangencial usando membranas con un CPM de 100-300K. La solución de conjugado diluida se hizo pasar a través de un filtro de 5 µm y se llevó a cabo la diafiltración usando como medio succinato 5 mM-solución salina al 0,9 % (pH 6,0). Tras completarse la diafiltración, la fracción retenida de conjugado se transfirió a través de un filtro de 0,22 µm.

El conjugado se diluyó adicionalmente con succinato 5 mM / solución salina al 0,9 % (pH 6) hasta una concentración de sacárido diana de aproximadamente 0,5 mg/ml. La etapa de filtración de 0,22 µm final se completó para obtener el glucoconjugado.

Preferentemente, el conjugado obtenido mediante el procedimiento anterior comprende al menos 0,6 mM de acetato por mM de polisacárido capsular del serotipo 15B, tiene un peso molecular de entre 3.000 kDa y 20.000 kDa y tiene un grado de conjugación de entre 2 y 6.

**Ejemplo 11. Caracterización del glucoconjugado que comprende polisacárido capsular del serotipo 15B de *S. pneumoniae* enlazado covalentemente a CRM<sub>197</sub>**

El conjugado 1 se preparó mediante el procedimiento del ejemplo 10. Los conjugados 2 y 3 se prepararon mediante un procedimiento similar, usando una cantidad diferente de agente oxidante. El conjugado 4 se preparó mediante un procedimiento similar, excepto por que el polisacárido capsular del serotipo 15B no se separó por tamaños y se

activó hasta un GO menor (mayor nivel de oxidación) y la conjugación se llevó a cabo en medio acuoso. El conjugado 5 se preparó mediante un procedimiento similar, excepto por que el polisacárido capsular del serotipo 15B se separó por tamaños mediante hidrólisis química y la conjugación se llevó a cabo en medio acuoso. Los conjugados 6 y 7 se prepararon mediante un procedimiento similar, excepto por que el polisacárido capsular del serotipo 15B no se separó por tamaños.

Los conjugados obtenidos se caracterizaron y los resultados se resumen en la tabla 14.

**Tabla 14. Conjugados de polisacárido capsular del serotipo 15B de *Streptococcus pneumoniae*-CRM<sub>197</sub>**

Conjugado	1	2	3	4	5	6	7
<b>Polisacárido</b>	Separado por tamaños	Separado por tamaños	Separado por tamaños	Nativo	Hidrolizado	Nativo	Nativo
<b>O-acetilo; polisacárido activado (<math>\mu\text{mol}</math> de acetato/<math>\mu\text{mol}</math> poli)</b>	0,69	0,69	0,69	1,01	0,66	0,76	N/D
<b>Medio disolvente</b>	DMSO	DMSO	DMSO	Acuoso	Acuoso	DMSO	DMSO
<b>GO del polisacárido activado</b>	11,4	5,8	9,7	4,8	8,8	5	12
<b>PM del polisacárido activado</b>	196 kDa	218 kDa	235 kDa	435 kDa	270 kDa	431 kDa	460 kDa
<b>Rendimiento (%)</b>	87,2	64	63,7	96,2	78,8	24,2	26,2
<b>Relación de sacárido-proteína</b>	0,68	0,65	0,71	1,22	1,29	0,9	1,5
<b>Sacárido libre (%)</b>	< 5	< 5	6,1	18,1	14,2	8,8	18
<b>PM del conjugado, SEC-MALLS (kDa)</b>	6190	7090	7937	1766	1029	6293	4466
<b>O-acetilación, conjugado (<math>\mu\text{mol}</math> de acetato/<math>\mu\text{mol}</math> poli)</b>	0,68	0,7	0,68	0,61	0,44	0,85	N/D
<b>&lt; 0,3 K<sub>d</sub> (%), SEC</b>	N/D	73	N/D	N/D	62	N/D	N/D
<b>Grado de conj. (AAA); Lys modificada</b>	3,7	3,9	4,1	N/D	3,4	N/D	N/D
<b>% O-acetilo conservado en el conjugado</b>	99 %	100 %	99,5 %	60 %	67 %	100 %	N/D

N/D= no disponible

El porcentaje de polisacárido libre se mide mediante un procedimiento que utiliza gel de hidróxido de aluminio para unirse a la proteína y el sacárido unido covalentemente para su retirada mediante centrifugación. Las muestras se mezclan con gel de hidróxido de aluminio tamponado con fosfato y se centrifugan. El sacárido unido se sedimenta con el gel y el sacárido libre permanece en el sobrenadante. El sobrenadante resultante y las muestras de control se cuantifican mediante ensayos colorimétricos adecuados para determinar el porcentaje de sacárido libre y para confirmar la eliminación suficiente de proteína y la recuperación del sacárido.

Para el análisis de aminoácidos, en primer lugar se hidroliza la muestra de polisacárido-proteína en sus componentes individuales como aminoácidos libres, usando hidrólisis con ácido clorhídrico (HCl) 6 N al vacío y calor (160 °C durante 15 minutos). Después de la hidrólisis, las muestras se analizan usando un analizador de aminoácidos. Los aminoácidos individuales se separan mediante cromatografía de intercambio iónico usando una etapa de gradiente de tampón de citrato de sodio con cambios de temperatura y caudal. Después de la separación, se determina cuantitativamente la cantidad de cada resto de aminoácido usando un sistema de detección de acoplamiento a ninhidrina después de la columna. En este sistema, se mezcla la ninhidrina con el eluato de la columna en el sistema de reacción después de la columna y se hace pasar la mezcla al fotómetro. La reacción de la ninhidrina con aminoácidos eluidos da un compuesto de color púrpura con una absorción máxima a 570 nm. Esta absorbancia es una respuesta (función) lineal de la cantidad de grupos  $\alpha$ -amino presentes y esta reacción proporciona un ensayo colorimétrico cuantitativo para todos los compuestos orgánicos con grupos  $\alpha$ -amino. En la reacción con iminoácidos, tales como prolina e hidroxiprolina, que no tienen un grupo amino libre, se genera un compuesto de color amarillo brillante y se monitoriza a 440 nm. Las áreas de pico para cada aminoácido se calculan usando las salidas a una longitud de onda tanto de 570 nm como de 440 nm.

El rendimiento se calcula como se indica a continuación: (cantidad de polisacárido en el conjugado x100) / cantidad de polisacárido activado.

Los conjugados (4 y 5) generados usando un medio acuoso demostraron una pérdida significativa en los niveles de O-acetilo. Los conjugados generados en disolvente de DMSO, usando el polisacárido nativo sin separación por tamaños de PM (6 y 7) no demostraron pérdida en los niveles de O-acetilo. Sin embargo, los rendimientos de conjugado fueron escasos y además tenían malas características de filtrado. Los conjugados generados en DMSO usando polisacáridos que se separaron por tamaños mediante homogeneización de alta presión (1, 2 y 3) tuvieron

un alto rendimiento y mejores características de filtrado, con una conservación significativa de los niveles de O-acetilo. Estos conjugados también tuvieron muy bajos niveles de polisacáridos libres.

#### **Ejemplo 12. Ensayo de actividad opsonofagocítica usando conjugados de Pn-serotipo 15B-CRM<sub>197</sub>**

5 Puede evaluarse la inmunogenicidad de los conjugados del serotipo 15B de *S. pneumoniae* de la invención usando el ensayo de OPA descrito a continuación.

Se inmunizó a grupos de 30 ratones Swiss Webster hembra de 6-7 semanas de edad con 0,001 µg, 0,01 µg o 0,1 µg de conjugados de ensayo por vía subcutánea en la semana 0. Se revacunó a los ratones con la misma dosis de conjugado en la semana 3 y después se extrajo sangre en la semana 4. Los OPA específicos de serotipo se llevaron a cabo en muestras de suero de la semana 4.

10 Los OPA se usan para medir los anticuerpos funcionales en sueros murinos específicos para el serotipo 15B de *S. pneumoniae*. El suero de ensayo se prepara en reacciones de ensayo que miden la capacidad de las inmunoglobulinas específicas para el polisacárido capsular para opsonizar las bacterias, causar la deposición del complemento, y de este modo facilitar la fagocitosis y la eliminación de las bacterias por fagocitos. El título de OPA se define como la dilución recíproca que da como resultado una reducción del 50 % en el recuento bacteriano frente a los pocillos de control sin suero de ensayo. El título de OPA se interpola a partir de las dos diluciones que abarcan este valor de corte de eliminación del 50 %.

20 Los procedimientos de OPA se basaron en los procedimientos descritos en Hu y col. (2005) Clin Diagn Lab Immunol 12 (2):287-295 con las siguientes modificaciones. El suero de ensayo se diluyó en serie 2,5 veces y se añadió a placas de ensayo de microtitulación. Se añadieron bacterias diana del serotipo 15B a los pocillos y las placas se agitaron a 37 °C durante 30 minutos. Se añadieron células HL-60 diferenciadas (fagocitos) y suero de cría de conejo (3 a 4 semanas de edad, PEL-FREEZ®, concentración final al 6,25 %) a los pocillos y las placas se agitaron a 37 °C durante 45 minutos. Para finalizar la reacción, se añadieron 80 µl de NaCl al 0,9 % a los pocillos, se mezclaron y se transfirió una alícuota de 10 µl a los pocillos de placas de filtro MULTISCREEN® HTS HV (MILLIPORE®) que contenían 200 µl de agua. Se filtró el líquido de las placas al vacío y se añadieron 150 µl de medio HYSOY® a cada pocillo y se filtró. Después se incubaron las placas de filtro a 37 °C, con CO<sub>2</sub> al 5 % durante toda la noche y después se fijaron con solución de decoloración (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA). Las placas se tiñeron después con azul de Coomassie y se decoloraron una vez. Se obtuvieron imágenes de las colonias y se numeraron en un analizador Cellular Technology Limited (CTL) (Shaker Heights, OH) IMMUNOSPOT®. Los recuentos de colonias en bruto se usaron para representar las curvas de eliminación y calcular los títulos de OPA.

30 La inmunogenicidad de los conjugados 1 y 2 se ha evaluado de acuerdo con el ensayo anteriormente mencionado. También se evaluaron en el mismo ensayo un conjugado adicional y un polisacárido del serotipo 15B de *S. pneumoniae* nativo no conjugado (PS no conjugado): El conjugado 9 se preparó mediante conjugación de polisacárido capsular del serotipo 15B nativo (es decir, no separado por tamaños) a CRM<sub>197</sub> mediante aminación reductora en solución acuosa.

35 Los resultados se muestran en la tabla 15.

**Tabla 15. Títulos de OPA de ensayos en animales usando conjugados del serotipo 15B-CRM<sub>197</sub>**

	GMT de OPA (IC del 95 %)		
	0,001 µg	0,01 µg	0,1 µg
<b>Conjugado 1</b>	485 (413, 569)	804 (565, 1145)	1563 (1048, 2330)
<b>Conjugado 2</b>	556 (438, 707)	871 (609, 1247)	1672 (1054, 2651)
<b>Conjugado 9</b>	395 (329, 475)	856 (627, 1168)	1802 (1108, 2930)
<b>PS no conjugado</b>	-	-	698 (466, 1045)

40 Como se muestra en la tabla 15 anterior, los conjugados 1 y 2, cuando se administraron a ratones, generaron anticuerpos capaces de opsonizar al serotipo 15B de *S. pneumoniae*, provocando la deposición completa, y de este modo facilitar la fagocitosis y la eliminación de las bacterias por fagocitos. Además, a pesar de su bajo peso molecular, también mostraron un nivel similar de inmunogenicidad en comparación con el conjugado 9, que no se había separado por tamaños.

#### **Ejemplo 13. Preparación del conjugado de polisacárido del serotipo 22F - CRM<sub>197</sub>**

Preparación de polisacárido del serotipo 22F de *S. pneumoniae* aislado

45 Se cultivaron *S. pneumoniae* del serotipo 22F en un segundo matraz y después se transfirieron a un fermentador de siembra. Una vez que se alcanzó la densidad óptica diana, se transfirieron las células a un fermentador de producción. El caldo de fermentación se inactivó mediante la adición de N-lauroil sarcosina y se purificaron mediante ultrafiltración y diafiltración.

Se separó por tamaños el polisacárido del serotipo 22F de *S. pneumoniae* mediante homogeneización de alta presión usando un homogeneizador PANDA 2K® (GEA Niro Soavi, Parma, Italia) para producir el polisacárido del

serotipo 22F de *S. pneumoniae* aislado.

Oxidación del polisacárido capsular del serotipo 22F de *S. pneumoniae* aislado

5 La oxidación del polisacárido se llevó a cabo en tampón de fosfato de potasio 100 mM (pH 5,8) obtenido mediante la adición secuencial de una cantidad calculada de tampón de fosfato de potasio 500 mM (pH 5,8) y API para dar una concentración final de polisacárido de 2,0 g/l. En caso necesario, se ajustó el pH de la reacción a 5,8, aproximadamente. Después del ajuste del pH, se redujo la temperatura de la reacción a 5 °C. La oxidación se inició mediante la adición de 0,10 equivalentes molares (MEq) de peryodato de sodio. El tiempo diana de la reacción de oxidación es de 16 h a 5 °C.

La reacción de oxidación se inactivó con 2 MEq de 2,3-butanodiol con agitación continua a 5 °C durante 1-2 h.

10 La concentración y diafiltración del polisacárido activado se llevó a cabo usando casetes de ultrafiltración con un CPM de 100K. La diafiltración se llevó a cabo frente a un diavolumen de 35 veces de API. El polisacárido activado purificado se almacenó a 5 °C. El sacárido activado purificado se caracteriza, entre otras cosas, por (i) su peso molecular mediante SEC-MALLS (ii) presencia de O-acetilo y (iii) su grado de oxidación.

15 La SEC-MALLS se usa para la determinación del peso molecular de los polisacáridos y los conjugados de polisacárido-proteína. La SEC se usa para separar los polisacáridos por su volumen hidrodinámico. Se usan detectores del índice de refracción (IR) y de dispersión de luz láser multiángulo (MALLS) para la determinación del peso molecular. Cuando la luz interactúa con la materia, se dispersa y la cantidad de luz dispersada está relacionada con la concentración, el cuadrado de  $dn/dc$  (los incrementos específicos del índice de refracción) y la masa molar de la materia. La medición del peso molecular se calcula basándose en las lecturas de la señal de luz dispersada del detector de MALLS y la señal de concentración del detector de IR.

20 El grado de oxidación (GO = moles de unidad repetida de azúcar / moles de aldehído) del polisacárido activado se determinó como se indica a continuación:

25 Los moles de unidades repetidas de azúcar se determinan mediante diversos procedimientos colorimétricos, por ejemplo, usando el procedimiento de antrona. En primer lugar, el polisacárido se degrada hasta monosacáridos mediante la acción de ácido sulfúrico y calor. El reactivo de antrona reacciona con las hexosas para formar un complejo de color amarillo verdoso cuya absorbancia se lee espectrofotométricamente a 625 nm. Dentro del intervalo del ensayo, la absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de hexosa presente. Simultáneamente, también se determinan los moles de aldehído, usando el procedimiento colorimétrico de MBTH. El ensayo de MBTH implica la formación de un compuesto de azina haciendo reaccionar grupos aldehído (de una muestra dada) con una 3-metil-2-benzotiazolona hidrazona (reactivo del ensayo de MBTH). El exceso de 3-metil-2-benzotiazolona hidrazona se oxida para formar un catión reactivo. El catión reactivo y la azina reaccionan para formar un cromóforo de color azul. El cromóforo formado se lee después espectroscópicamente a 650 nm.

Conjugación de polisacárido del serotipo 22F de *S. pneumoniae* activado con CRM<sub>197</sub>

35 El procedimiento de conjugación consistió en las siguientes etapas:

- a. Combinación con excipiente de sacarosa y liofilización;
- b. Reconstitución del polisacárido liofilizado y CRM<sub>197</sub>;
- c. Conjugación del polisacárido activado a CRM<sub>197</sub> y protección; y
- d. Purificación del conjugado

40 a. Combinación con sacarosa y liofilización

45 El polisacárido activado se combinó con sacarosa (al 50 % p/v en API) a una relación de 25 gramos de sacarosa por gramo de polisacárido activado. Después, se liofilizó la botella de mezcla combinada. Después de la liofilización, las botellas que contenían polisacárido activado liofilizado se almacenaron a -20 °C. La cantidad calculada de proteína CRM<sub>197</sub> (relación de entrada de S/P = 1) se congeló por capas y se liofilizó por separado. La CRM<sub>197</sub> liofilizada se almacenó a -20 °C.

b. Reconstitución del polisacárido activado liofilizado y la proteína CRM<sub>197</sub>

El polisacárido activado liofilizado se reconstituyó en dimetilsulfóxido (DMSO) anhidro. Tras la completa disolución del polisacárido, se añadió una cantidad igual de DMSO anhidro a la CRM<sub>197</sub> liofilizada para la reconstitución.

c. Conjugación del polisacárido activado a CRM<sub>197</sub> y protección

50 Se combinó CRM<sub>197</sub> reconstituida (en DMSO) en el vaso de reacción de conjugación con el polisacárido activado reconstituido. La concentración final de polisacárido en la solución de reacción es de 1 g/l. La conjugación se inició añadiendo 1,5 MEq de cianoborohidruro de sodio a la mezcla de reacción y la reacción se incubó a 23 °C durante 20 h. La terminación de la reacción de conjugación se efectúa añadiendo 2 MEq de borohidruro de sodio. La reacción

de protección se incubó a 23 °C durante 3 h.

d. Purificación del conjugado

5 La solución de conjugado se diluyó a 1:5 con succinato 5 mM-solución salina al 0,9 % (pH 6,0) enfriado en preparación para la purificación mediante filtración de flujo tangencial usando membranas con un CPM de 100K y se llevó a cabo una diafiltración 20X usando como medio succinato 5 mM-solución salina al 0,9 % (pH 6,0). Tras completarse la diafiltración, la fracción retenida de conjugado se diluyó adicionalmente, se filtró a través de un filtro de 0,22 µm y se almacenó a 2-8 °C.

10 Se obtuvieron varios conjugados usando el procedimiento anteriormente descrito variando diferentes parámetros (por ejemplo, relación de entrada de sacárido-proteína, concentración de la reacción y MEq de cianoborohidruro de sodio). En la tabla 16 se proporciona la caracterización de glucoconjugados de Pn-22F representativos a CRM<sub>197</sub>.

**Tabla 16. Conjugados del serotipo 22F neumocócico-CRM<sub>197</sub>**

Lote	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>Grado de oxidación (G.O.)</b>	12,6	19,5	17,2	14,0	12,4	14,9	11,1	14,6	14,4	13,7
<b>PM del sacárido activado mediante MALLS (kDa)</b>	540	697	864	92	866	631	614	639	709	416
<b>Resultados del conjugado</b>										
<b>Relación de sacárido/proteína</b>	0,75	0,87	2	0,8	0,8	0,4	1,9	0,8	0,65	1,0
<b>O-Ac (%)</b>	105	100	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
<b>% de sacárido libre</b>	<5	2	15,5	35	<5	<5	33	<5	<5	8
<b>PM mediante SEC-MALLS (kDa)</b>	2787	1668	2194	1419	5039	10450	1577	3911	3734	4453
N/D= no disponible										

15 Se calculó el % de O-acetilo (conservado) en el conjugado final a partir de la relación del contenido de O-acetilo del conjugado (µmol de O-acetilo por µmol de la unidad repetitiva de sacárido del serotipo 22F) en relación con el contenido de O-acetilo del polisacárido (µmol de O-acetilo por µmol de la unidad repetitiva de sacárido del serotipo 22F).

La inmunogenicidad de los conjugados obtenidos anteriores se ha evaluado usando el ensayo opsonofagocítico (OPA) descrito a continuación.

20 Se inmunizó a grupos de treinta ratones Swiss Webster hembra de 6-7 semanas de edad con 0,001 µg, 0,005 µg o 0,01 µg de conjugados de ensayo por vía subcutánea en la semana 0. Se revacunó a los ratones con la misma dosis de conjugado en la semana 3 y después se extrajo sangre en la semana 4. Los OPA específicos de serotipo se llevaron a cabo en muestras de suero de la semana 4.

25 Los ensayos de actividad opsonofagocítica (OPA) se usan para medir los anticuerpos funcionales en sueros murinos específicos para el serotipo 22F de *S. pneumoniae*. El suero de ensayo se prepara en reacciones de ensayo que miden la capacidad de las inmunoglobulinas específicas para el polisacárido capsular para opsonizar las bacterias, causar la deposición del complemento, y de este modo facilitar la fagocitosis y la eliminación de las bacterias por fagocitos. El título de OPA se define como la dilución recíproca que da como resultado una reducción del 50 % en el recuento bacteriano frente a los pocillos de control sin suero de ensayo. El título de OPA se interpola a partir de las dos diluciones que abarcan este valor de corte de eliminación del 50 %. Los procedimientos de OPA se basaron en los procedimientos descritos en Hu y col. (2005) Clin Diagn Lab Immunol 12 (2):287-295 con las siguientes modificaciones. El suero de ensayo se diluyó en serie 2,5 veces y se añadió a placas de ensayo de microtitulación. Se añadieron cepas bacterianas diana del serotipo 22F a los pocillos y las placas se agitaron a 25 °C durante 30 minutos. Se añadieron células HL-60 diferenciadas (fagocitos) y suero de cría de conejo (3 a 4 semanas de edad, PEL-FREEZ®, concentración final al 12,5 %) a los pocillos y las placas se agitaron a 37 °C durante 45 minutos. Para finalizar la reacción, se añadieron 80 µl de NaCl al 0,9 % a los pocillos, se mezclaron y se transfirió una alícuota de 35 10 µl a los pocillos de placas de filtro MULTISCREEN® HTS HV (MILLIPORE®) que contenían 200 µl de agua. Se filtró el líquido de las placas al vacío y se añadieron 150 µl de medio HYSOY® a cada pocillo y se filtró. Después se incubaron las placas de filtro a 37 °C, con CO<sub>2</sub> al 5 % durante toda la noche y después se fijaron con solución de decoloración (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA). Las placas se tiñeron después con azul de Coomassie y se decoloraron una vez. Se obtuvieron imágenes de las colonias y se numeraron en un analizador Cellular Technology Limited (CTL) (Shaker Heights, OH) IMMUNOSPOT®. Los recuentos de colonias en bruto se usaron para 40 representar las curvas de eliminación y calcular los títulos de OPA.

Se determinaron los títulos de actividad opsonofagocítica (OPA) para los conjugados del serotipo 22F-CRM<sub>197</sub> como se ha mencionado anteriormente. Los títulos de OPA (título de media geométrica (GMT) con un intervalo de

confianza (IC) del 95 %) a las cuatro semanas a diferentes dosis se muestran en las tablas 17 y 18, (dos experimentos separados) que demuestran que el conjugado del serotipo 22F (lotes 1-7; véase también la tabla 16 para los datos de caracterización de estos conjugados) generaron títulos de OPA en un modelo de inmunogenicidad murino.

5

**Tabla 17. Inmunogenicidad de los conjugados del serotipo 22F-CRM<sub>197</sub>**

N.º de muestra	GMT de OPA (IC del 95 %)		
	0,001 µg	0,005 µg	0,01 µg
1	86 (45, 165)	597 (285, 1252)	2519 (1409, 4504)
2	98 (51, 191)	782 (410, 1492)	2236 (1319, 3790)
3	35 (18, 69)	250 (122, 512)	509 (273, 950)

**Tabla 18. Inmunogenicidad de los conjugados del serotipo 22F-CRM<sub>197</sub>**

N.º de muestra	GMT de OPA (IC del 95 %)	
	0,001 µg	0,01 µg
4	37 (18, 76)	3383 (1911, 5987)
5	45 (20, 103)	1773 (1072, 2931)
6	235 (108, 513)	4335 (3018, 6226)
7	10 (7, 13)	252 (138, 457)

**Ejemplo 14. Preparación de conjugados de Pn-11A con CRM<sub>197</sub>**

Preparación de glucoconjugados de Pn-11A RAC

10 El polisacárido separado por tamaños congelado almacenado en agua desionizada o tampón de fosfato de potasio 25 mM (pH 6,0) se descongeló a 5 °C.

Oxidación del polisacárido

15 La oxidación del polisacárido se llevó a cabo en tampón de fosfato de potasio 100 mM (pH 6,0) mediante la adición de tampón de fosfato de potasio 500 mM (pH 6,0) y API para dar una concentración final de polisacárido de 2,0 g/l. La reacción de oxidación se llevó a cabo a 23 °C. La oxidación se inició mediante la adición de peryodato de sodio. La velocidad de agitación se encuentra en el intervalo de 100 - 140 rpm.

Purificación de polisacárido de 11A activado

20 La concentración y diafiltración del polisacárido activado se llevó a cabo usando casetes de ultrafiltración. La diafiltración se llevó a cabo frente a un diavolumen de 20 veces de API. Después de la filtración a través de 0,22 µm, el polisacárido activado purificado se almacenó a 5 °C.

20 Descripción del procedimiento de conjugación

El procedimiento de conjugación consistió en las siguientes etapas:

- a. Congelación por capas y liofilización de la proteína CRM<sub>197</sub>;
- b. Reconstitución del polisacárido activado y CRM<sub>197</sub>;
- c. Conjugación del polisacárido activado a CRM<sub>197</sub>; y
- 25 d. Purificación y dilución del conjugado

a. Congelación por capas y liofilización de la proteína CRM<sub>197</sub>

La proteína CRM<sub>197</sub> se congeló por capas y se liofilizó.

b. Reconstitución del polisacárido activado y la proteína CRM<sub>197</sub>

30 Se cargó la solución de polisacárido activado (~10 g/l) en el reactor, seguido de la adición de la cantidad calculada de tampón de fosfato de sodio 0,5 N (pH 7,2). Con agitación, se añadió CRM<sub>197</sub> liofilizada y la mezcla de reacción se agitó durante 2 - 4 horas para alcanzar la disolución completa de CRM<sub>197</sub>.

c. Conjugación y protección

35 La conjugación se inició añadiendo cianoborohidruro. La mezcla de reacción se incubó a 23 °C durante 72 - 96 h. La terminación de la reacción de conjugación se efectuó añadiendo done API 0,5 X seguida de 2 MEq de borohidruro de sodio. Esta reacción de protección se mantuvo a 23 °C durante 3 - 4 h.

d. Dilución y purificación inicial del conjugado

La solución de conjugado se diluyó a 1:5 (volumen de reacción) con tampón de fosfato de sodio 0,15 N (pH 8,0) en

la preparación para la purificación por filtración de flujo tangencial (TFF). El conjugado diluido se mezcló en el vaso de reacción y después se hizo pasar a través de un filtro de 5 µm. La solución de conjugado filtrada se concentró después hasta 1 - 2 g/l. Se llevó a cabo un procedimiento de diafiltración en dos etapas. En la primera etapa, se llevó a cabo la TFF usando 30X (volumen de diafiltración) de tampón de fosfato de sodio 0,15 N (pH 8,0), seguido de 20X de succinato 5 mM-NaCl al 0,9 % (pH 6,0). Tras completarse la diafiltración inicial, la fracción retenida de conjugado se transfirió a través de un filtro de 0,45 µm a un tanque de recogida.

Diafiltración final del conjugado

La etapa de purificación final fue una diafiltración 20X con medio de succinato 5 mM-NaCl al 0,9 %, pH 6,0 usando membranas de celulosa regeneradas.

10 Dilución del conjugado en bruto monovalente (MBC)

El conjugado se diluyó adicionalmente con succinato 5 mM/NaCl al 0,9 %, pH 6, hasta una concentración diana de sacárido de 0,5 mg/ml. La etapa de filtración final de 0,22 µm se completó para preparar el producto de conjugado en bruto monovalente (MBC) para su formulación.

15 Se obtuvieron varios conjugados usando el procedimiento anteriormente descrito variando diferentes parámetros (por ejemplo, relación de entrada de sacárido-proteína, concentración de la reacción y MEq de cianoborohidruro de sodio). En la tabla 19 se proporciona la caracterización de glucoconjugados de Pn-11A representativos a CRM<sub>197</sub> (lotes 1 a 5).

Preparación de glucoconjugados de Pn-11A usando RAC/DMSO

20 El polisacárido oxidado se preparó y purificó como se ha descrito anteriormente (véase la preparación de glucoconjugados de Pn-11A RAC).

Conjugación mediante aminación reductora en DMSO (RAC/DMSO)

La conjugación de 11A mediante RAC/DMSO consistió en las siguientes etapas:

- 25 a. Combinación con sacarosa, congelación por capas y liofilización;
- b. Reconstitución del polisacárido liofilizado y CRM<sub>197</sub>;
- c. Conjugación del polisacárido activado a CRM<sub>197</sub>; y
- d. Purificación y dilución del conjugado.

a. Combinación con sacarosa, congelación por capas y liofilización

30 El polisacárido activado preparado a partir de polisacárido separado por tamaños se combinó con sacarosa (al 50 % p/v en API) a una relación de 25 gramos de sacarosa por gramo de polisacárido activado. Los componentes se mezclaron, se congelaron por capas en el frasco y la mezcla combinada después se liofilizó. La proteína CRM<sub>197</sub> se congeló por capas y se liofilizó por separado.

b. Reconstitución del polisacárido activado liofilizado y la proteína CRM<sub>197</sub>

El polisacárido activado liofilizado se reconstituyó en DMSO a una concentración de 2 mg/ml. Tras la disolución completa del polisacárido, se añadió DMSO a la CRM<sub>197</sub> liofilizada para la reconstitución

35 c. Conjugación y protección

40 Se combinó CRM<sub>197</sub> reconstituida (en DMSO) en el vaso de reacción de conjugación con el polisacárido activado reconstituido. La concentración final de polisacárido en la solución de reacción es de 1 g/l. La conjugación se inició añadiendo cianoborohidruro a la mezcla de reacción y se incubó a 23 °C durante 22 horas. La terminación de la reacción de conjugación se efectúa añadiendo 2 MEq de borohidruro de sodio. Esta reacción de protección se mantuvo a 23 °C durante 3 - 4 h.

d. Purificación y dilución del conjugado

La solución de conjugado se purificó y diluyó usando un procedimiento similar al descrito anteriormente.

45 Se obtuvieron varios conjugados usando el procedimiento anteriormente descrito variando diferentes parámetros (por ejemplo, relación de entrada de sacárido-proteína, concentración de la reacción y MEq de cianoborohidruro de sodio). En la tabla 19 se proporciona la caracterización de glucoconjugados de Pn-11A con CRM<sub>197</sub> representativos obtenidos mediante el procedimiento anterior (lotes 6 a 8).

Tabla 19. Conjugados del serotipo 11A neumocócico-CRM<sub>197</sub>

Lote	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>PM del sacárido activado mediante MALLS (kDa)</b>	207	129	103	199	183	232	113	113
(continuación)								
Lote	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>Resultados del conjugado</b>								
<b>Relación de sacárido/proteína</b>	1,24	1,09	1,32	1,47	1,31	1	0,78	0,68
<b>Acetato (mol/mol de PS)</b>	2,72	2,89	2,72	3,2	3,13	N/D	N/D	N/D
<b>Glicerol (mol/mol de PS)*</b>	0,62	0,68	0,75	0,51	0,41	N/D	N/D	N/D
<b>PM mediante SEC-MALLS (kDa)</b>	3224	837	623	827	994	12200	6543	15730
N/D= no disponible								
*El glicerol se cuantificó mediante cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD) después de su liberación del polisacárido con ácido fluorhídrico (HF).								

Los datos generales generados a partir de conjugados preparados mediante los procedimientos de aminación reductora anteriores demostraron que se podían preparar conjugados con un buen rendimiento de conjugación, bajo % de sacárido libre y con buena estabilidad.

La inmunogenicidad de los conjugados obtenidos anteriores se ha evaluado usando el ensayo opsonofagocítico (OPA) descrito a continuación.

Se inmunizó a grupos de treinta ratones Swiss Webster hembra de 6-7 semanas de edad con 0,001 µg, 0,005 µg, 0,01 µg o 0,1 µg de conjugados de ensayo por vía subcutánea en la semana 0. Se revacunó a los ratones con la misma dosis de conjugado en la semana 3 y después se extrajo sangre en la semana 4. Los OPA específicos de serotipo se llevaron a cabo en muestras de suero de la semana 4. Los ensayos de actividad opsonofagocítica (OPA) se usan para medir los anticuerpos funcionales en sueros murinos específicos para el serotipo 11A de *S. pneumoniae*. El suero de ensayo se prepara en reacciones de ensayo que miden la capacidad de las inmunoglobulinas específicas para el polisacárido capsular para opsonizar las bacterias, causar la deposición del complemento, y de este modo facilitar la fagocitosis y la eliminación de las bacterias por fagocitos. El título de OPA se define como la dilución recíproca que da como resultado una reducción del 50 % en el recuento bacteriano frente a los pocillos de control sin suero de ensayo. El título de OPA se interpola a partir de las dos diluciones que abarcan este valor de corte de eliminación del 50 %. Los procedimientos de OPA se basaron en los procedimientos descritos en Hu y col. (2005) Clin Diagn Lab Immunol 12 (2):287-295 con las siguientes modificaciones. El suero de ensayo se diluyó en serie 2,5 veces y se añadió a placas de ensayo de microtitulación. Se añadieron cepas bacterianas diana del serotipo 22F a los pocillos y las placas se agitaron a 25 °C durante 30 minutos. Se añadieron células HL-60 diferenciadas (fagocitos) y suero de cría de conejo (3 a 4 semanas de edad, PEL-FREEZ®, concentración final al 12,5 %) a los pocillos y las placas se agitaron a 37 °C durante 60 minutos. Para finalizar la reacción, se añadieron 80 µl de NaCl al 0,9 % a los pocillos, se mezclaron y se transfirió una alícuota de 10 µl a los pocillos de placas de filtro MULTISCREEN® HTS HV (MILLIPORE®) que contenían 200 µl de agua. Se filtró el líquido de las placas al vacío y se añadieron 150 µl de medio HYSOY® a cada pocillo y se filtró. Después se incubaron las placas de filtro a 37 °C, con CO<sub>2</sub> al 5 % durante toda la noche y después se fijaron con solución de decoloración (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA). Las placas se tiñeron después con azul de Coomassie y se decoloraron una vez. Se obtuvieron imágenes de las colonias y se numeraron en un analizador Cellular Technology Limited (CTL) (Shaker Heights, OH) IMMUNOSPOT®. Los recuentos de colonias en bruto se usaron para representar las curvas de eliminación y calcular los títulos de OPA.

Se determinaron los títulos de actividad opsonofagocítica (OPA) en ratones para los conjugados del serotipo 11A-CRM<sub>197</sub> como se ha mencionado anteriormente. Los títulos de OPA (título de media geométrica (GMT) con un intervalo de confianza (IC) del 95 %) a las cuatro semanas a diferentes dosis se muestran en la tabla 20, demostrando que los conjugados del serotipo 11A (lotes 2-4 y 8; véase también la tabla 19 para los datos de caracterización de estos conjugados) generaron títulos de OPA en un modelo de inmunogenicidad murino.

Tabla 20. Inmunogenicidad de los conjugados del serotipo 11A-CRM<sub>197</sub>

N.º de lote	GMT de OPA (IC del 95 %)		
	0,001 µg	0,01 µg	0,1 µg
<b>2</b>	326 (260, 408)	1391 (794, 2437)	4366 (3063, 6223)
<b>3</b>	389 (316, 478)	1113 (690, 1795)	5527 (3698, 8260)
<b>4</b>	192 (149, 248)	926 (661, 1298)	2800 (1975, 3970)
<b>8</b>	303 (224, 411)	1099 (624, 1935)	3861 (2629, 5669)

#### **Ejemplo 15. Formulación de una vacuna antineumocócica conjugada 16-valente**

Se formuló una composición de conjugados 16-valente que comprendía glucoconjugados de los serotipos de *S. pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F (16vPnC) todos conjugados individualmente a CRM<sub>197</sub>.

Los glucoconjugados de los serotipos de *S. pneumoniae* 15B, 22F y 33F se produjeron como se ha desvelado anteriormente y los glucoconjugados de los serotipos de *S. pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F se produjeron como se desvela en el documento WO 2006/110381.

5 Se calcularon los volúmenes necesarios de concentrados en bruto basándose en el volumen del lote y las concentraciones de sacárido en bruto. La vacuna formulada en bruto se preparó añadiendo el volumen necesario de tampón de NaCl/succinato (pH 5,8) para obtener una concentración diana de tampón de succinato 5,0 mM y NaCl 150 mM. Se añadieron polisorbato 80 a una concentración final del 0,02 % y los 16 conjugados neumocócicos. La preparación se filtró a través de una membrana de PES Millipore de 0,2 µm, seguido de la adición de AlPO<sub>4</sub>. La formulación se mezcló para permitir la unión y para lograr homogeneidad.

10 Después, la formulación se filtró en jeringas de vidrio para suministrar un volumen de dosis de 0,5 ml.

La forma de dosificación final consistió en 2,2 µg de cada uno de los glucoconjugados de los serotipos de *S. pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F conjugados individualmente a CRM<sub>197</sub>, 44 µg de glucoconjugado del serotipo 6B de *S. pneumoniae*, tampón succinato 5 mM a pH 5,8, PS80 0,02, NaCl 150 mM y 0,25 mg/ml de aluminio en forma de AlPO<sub>4</sub> para una dosis de 0,5 ml. El contenido de CRM<sub>197</sub> fue de aproximadamente 38 µg para una dosis de 0,5 ml.

#### **Ejemplo 16. Formulación de una vacuna antineumocócica conjugada 20-valente**

Se formuló una composición de conjugados 20-valente que comprendía glucoconjugados de los serotipos de *S. pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F (20vPnC) todos conjugados individualmente a CRM<sub>197</sub>. Los glucoconjugados de los serotipos de *S. pneumoniae* 8, 10A, 11A, 12F, 15B, 22F y 33F se produjeron como se ha desvelado anteriormente y los glucoconjugados de los serotipos de *S. pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F se produjeron como se desvela en el documento WO 2006/110381.

25 Se calcularon los volúmenes necesarios de concentrados en bruto basándose en el volumen del lote y las concentraciones de sacárido en bruto. La vacuna formulada en bruto se preparó añadiendo el volumen necesario de tampón de NaCl/succinato (pH 5,8) para obtener una concentración diana de tampón de succinato 5,0 mM y NaCl 150 mM. Se añadieron polisorbato 80 a una concentración final del 0,02 % y los 20 conjugados neumocócicos. La preparación se filtró a través de una membrana de PES Millipore de 0,2 µm, seguido de la adición de AlPO<sub>4</sub>. La formulación se mezcló bien para obtener una unión máxima de los conjugados al aluminio.

30 Después, la formulación se filtra en jeringas de vidrio para suministrar un volumen de dosis de 0,5 ml. La forma de dosificación final consistió en 2,2 µg de cada uno de los glucoconjugados de los serotipos de *S. pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F conjugados individualmente a CRM<sub>197</sub>, 4,4 µg de glucoconjugado del serotipo 6B de *S. pneumoniae*, tampón succinato 5 mM a pH 5,8, PS80 0,02, NaCl 150 mM y 0,25 mg/ml de aluminio en forma de AlPO<sub>4</sub> para una dosis de 0,5 ml. El contenido de CRM<sub>197</sub> fue de aproximadamente 46 µg para una dosis de 0,5 ml.

#### **Ejemplo 17. Inmunogenicidad de una composición inmunogénica 16-valente**

Se evaluó la inmunogenicidad de la composición inmunogénica 16-valente (véase el ejemplo 15) en conejos usando inmunoensayos Luminex directos multiplexados (dIIA) para medir las concentraciones de IgG específicas de serotipo en los sueros y OPA específicos de serotipo. Se inmunizaron grupos de diez conejos New Zealand hembra de 2,5 kg a 3,5 kg con la dosis clínica propuesta para humanos (2,2 µg de conjugado, excepto para el serotipo 6B, que fue de 4,4 µg; más 0,1 mg de aluminio en forma de AlPO<sub>4</sub>) por vía intramuscular en la semana 0. Se revacunó a los conejos con la misma dosis de vacuna de conjugado en la semana 2 y después se extrajo sangre en la semana 4. Se llevaron a cabo dIIA y OPA específicos de serotipo en muestras de sueros de la semana 0 y la semana 4.

45 Para cuantificar el anticuerpo de unión a polisacárido (IgG) total específico para cada polisacárido neumocócico (PnPS), los sueros de conejo se evaluaron en dos inmunoensayos Luminex directos (dIIA; dIIA 13-plexado, serotipos de PREVNAR 13® y dIIA 7-plexado, serotipos adicionales). El ensayo 13-plexado mide los anticuerpos anti-PnPS específicos para los 13 serotipos incluidos en la vacuna antineumocócica conjugada 13-valente (PnC) (1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F) y el ensayo 7-plexado mide los anticuerpos anti-PnPS para los serotipos adicionales (15B, 22F, 33F). Cada ensayo contiene una combinación de 13 o 7 microesferas espectralmente distintas acopladas a conjugados de PnPS (conjugados de PnPS-PLL: PnPS conjugado a poli-L-lisina).

50 En resumen, los sueros de patrón de referencia, de control y de ensayo se preadsorbieron inicialmente con dos absorbentes de Pn; CWPS1 (polisacárido de la pared celular de PnA que contiene polisacárido C) y CWPS2 (CWP del serotipo 2 acapsular de *S. pneumoniae*) para bloquear la unión de los anticuerpos no específicos al antígeno de recubrimiento de PnPS. Después de la preadsorción, se incubaron las microesferas acopladas a PnPS con suero de patrón de referencia diluido de manera adecuada, controles o sueros de ensayo de conejo. Después de la incubación, se lavó cada mezcla y se añadió un anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de conejo conjugado a R-ficoeritrina. Las señales fluorescentes (expresadas como mediana de intensidad de fluorescencia (IMF)) se midieron usando un lector Bio-Plex y se correlacionaron con la cantidad de IgG específica para PnPS unida. Los valores para

los sueros de ensayo se comunican como (Unidades/ml, U/ml).

Los OPA específicos de serotipo se llevaron a cabo como se ha descrito anteriormente. El título de OPA es la función recíproca de la máxima dilución de suero que da como resultado una reducción del 50 % en el número de unidades formadoras de colonias (UFC) bacterianas cuando se compara con el control sin suero (definido como UFC de fondo). El título se interpola a partir de las dos diluciones que abarcan este valor de corte de eliminación del 50 %.

**Tabla 21. Concentraciones de IgG total para 16vPnC y títulos de OPA**

Serotipo	IgG total (Pn dIIA)				Anticuerpo opsonofagocítico (OPA)			
	Sem 0 GMC (µg/ml)	Sem 4 GMC (µg/ml)	Sem 4, IC del 95 % (ICI - ICS)	Relación de IgG GMC Sem 4: Sem 0	Sem 0 GMT	Sem 4 GMT	Sem 4 IC del 95 % (ICI - ICS)	Relación de OPA GMT Sem 4: Sem 0
1	0,08	28	17 - 44	369	4	87	55 - 139	22
3	0,08	88	60 - 128	1062	4	214	151 - 304	54
4	0,08	30	14 - 67	402	4	934	551 - 1583	233
5	0,08	34	18 - 64	449	4	368	232 - 584	87
6A	0,03	46	15 - 142	1835	4	3026	1607 - 5696	756
6B	0,08	89	33 - 241	1182	4	6156	3043 - 12453	1539
7F	0,01	50	31 - 78	3969	6	2917	2013 - 4227	528
9V	0,03	24	15 - 38	881	5	613	426 - 883	112
14	0,08	28	20 - 39	368	19	449	331 - 610	24
18C	0,05	79	45 - 139	1587	4	1847	1003 - 3401	462
19A	0,08	120	71 - 205	1605	4	1410	851 - 2336	352
19F	0,08	156	96 - 255	2083	4	3207	1783 - 5771	802
23F	0,05	33	13 - 84	668	4	997	487 - 2042	249
15B	0,05	54	40 - 71	1073	6	741	514 - 1069	116
22F	0,08	158	95 - 262	2103	5	1078	661 - 1756	211
33F	0,10	11	6 - 20	115	49	1337	829 - 2154	27

Abreviaturas: GMC, media geométrica de la concentración; IC, intervalo de confianza; ICI, intervalo de confianza inferior; ICS, intervalo de confianza superior.

Los resultados mostraron un aumento significativo en la IgG específica de serotipo y respuestas de anticuerpo de OPA funcionales después de dos inmunizaciones con 16vPnC (tabla 21). Los niveles séricos de IgG aumentaron más de 2-log por encima del valor de referencia. De forma similar, se generó una robusta respuesta de anticuerpo de OPA funcional con un mínimo de un aumento de 22 veces en OPA GMT por encima del valor de referencia. Los sueros preinmunes (Sem 0) mostraron niveles no detectables de IgG específica para PnPS y anticuerpo OPA funcional para la mayoría de los 16v serotipos de Pn, con la excepción de los serotipos 14 y 33F. Había presencia títulos de OPA de bajo nivel para estos serotipos, pero estas respuestas iniciales no afectaron adversamente a la respuesta de anticuerpos después de la vacunación.

#### **Ejemplo 18. Inmunogenicidad de una composición inmunogénica 20-valente**

Se evaluó la inmunogenicidad de la composición inmunogénica 20-valente (preparada como en el ejemplo 16) en conejos usando inmunoensayos Luminex directos multiplexados (dIIA) para medir las concentraciones de IgG específicas de serotipo en los sueros y OPA específicos de serotipo.

Se inmunizaron grupos de diez conejos New Zealand hembra de 2,5 kg a 3,5 kg con la dosis clínica propuesta para humanos (2,2 µg de conjugado, excepto para el serotipo 6B, que fue de 4,4 µg; más 0,1 mg de aluminio en forma de AlPO<sub>4</sub>) por vía intramuscular en la semana 0. Se revacunó a los conejos con la misma dosis de vacuna de conjugado en la semana 2 y después se extrajo sangre en la semana 4. Se llevaron a cabo dIIA y OPA específicos de serotipo en muestras de sueros de la semana 0 y la semana 4.

Para cuantificar el anticuerpo de unión a polisacárido (IgG) total específico para cada polisacárido neumocócico (PnPS), los sueros de conejo se evaluaron en dos inmunoensayos Luminex directos (dIIA; dIIA 13-plexado, serotipos de PREVNAR 13® y dIIA 7-plexado, serotipos adicionales). El ensayo 13-plexado mide los anticuerpos anti-PnPS específicos para los 13 serotipos incluidos en la vacuna antineumocócica conjugada 13-valente (PnC) (1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F) y el ensayo 7-plexado mide los anticuerpos anti-PnPS para los serotipos adicionales (15B, 22F, 33F). Cada ensayo contiene una combinación de 13 o 7 microesferas espectralmente distintas acopladas a conjugados de PnPS (conjugados de PnPS-PLL: PnPS conjugado a poli-L-lisina).

En resumen, los sueros de patrón de referencia, de control y de ensayo se preadsorbieron inicialmente con dos absorbentes de Pn; CWPS1 (polisacárido de la pared celular de PnA que contiene polisacárido C) y CWPS2 (CWP del serotipo 2 acapsular de *S. pneumoniae*) para bloquear la unión de los anticuerpos no específicos al antígeno de recubrimiento de PnPS. Después de la preadsorción, se incubaron las microesferas acopladas a PnPS con suero de

patrón de referencia diluido de manera adecuada, controles o sueros de ensayo de conejo. Después de la incubación, se lavó cada mezcla y se añadió un anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de conejo conjugado a R-ficoeritrina. Las señales fluorescentes (expresadas como mediana de intensidad de fluorescencia (IMF)) se midieron usando un lector Bio-Plex y se correlacionaron con la cantidad de IgG específica para PnPS unida. Los valores para los sueros de ensayo se comunican como (Unidades/ml, U/ml).

Los OPA específicos de serotipo se llevaron a cabo como se ha descrito anteriormente. El título de OPA es la función recíproca de la máxima dilución de suero que da como resultado una reducción del 50 % en el número de unidades formadoras de colonias (UFC) bacterianas cuando se compara con el control sin suero (definido como UFC de fondo). El título se interpola a partir de las dos diluciones que abarcan este valor de corte de eliminación del 50 %.

Los conejos inmunizados con la 20vPnC también demostraron aumentos significativos en la IgG total y los títulos de anticuerpo de OPA funcionales frente a los serotipos comunes a las formulaciones 16v y 20v, así como los cuatro serotipos adicionales (8, 10A, 11A y 12F) (tabla 22). Se indujo un aumento 2-log en los niveles séricos de IgG entre los 20 serotipos después de dos inmunizaciones. Los OPA GMT generados con la vacuna fueron al menos 27 veces por encima del valor de referencia. De manera similar, se observaron títulos de OPA de bajo nivel para los serotipos 14 y 33F después de la vacunación con 20vPnC, pero nuevamente, no alteraron la robustez de las respuestas de anticuerpo después de la vacunación.

Las formulaciones 16vPnC y 20vPnC provocaron una robusta respuesta humoral que era específica para polisacáridos neumocócicos y estaba asociada con la eliminación funcional de la bacteria (véanse las tablas 21 y 22). En conclusión, los estudios mostrados en los ejemplos 17 y 18 demostraron buena inmunogenicidad de las formulaciones tanto 16vPnC como 20vPnC.

**Tabla 22. Concentraciones de IgG total para 20vPnC y títulos de OPA**

Serotipo	IgG total (Pn dIIA)				Anticuerpo opsonofagocítico (OPA)			
	Sem 0 GMC (µg/ml)	Sem 4 GMC (µg/ml)	Sem 4 IC del 95 % (ICI - ICS)	Relación de IgG GMC Sem 4: Sem 0	Sem 0 GMT	Sem 4 GMT	Sem 4 IC del 95 % (ICI - ICS)	Relación de OPA GMT Sem 4: Sem 0
1	0,08	28	19-43	379	4	106	69 - 164	27
3	0,08	116	76 - 176	1542	4	286	193 - 425	72
4	0,08	62	39 - 97	821	4	1477	954 - 2287	369
5	0,08	49	33 - 71	648	4	509	350 - 742	127
6A	0,03	30	14 - 66	1209	4	3682	2743 - 4944	849
6B	0,08	58	36 - 94	775	4	4469	3002 - 6653	1117
7F	0,02	62	39 - 101	3681	6	3226	2226 - 4675	500
9V	0,05	30	19 - 48	644	6	956	634 - 1442	150
14	0,08	34	20 - 60	457	12	506	348 - 736	42
18C	0,05	106	67 - 166	2115	4	1942	1263 - 2986	485
19A	0,08	112	73 - 171	1493	4	1580	1071 - 2332	395
19F	0,08	178	119 - 266	2372	4	3392	2085 - 5519	848
23F	0,05	48	23 - 103	960	4	1514	889 - 2577	378
15B	0,05	70	51 - 98	1410	6	1332	949 - 1869	210
22F	0,10	172	118 - 250	1811	5	1304	1000 - 1700	279
33F	0,12	14	10 - 20	120	54	1490	1117 - 1989	28
8	0,13	144	100 - 207	1149	4	1388	988 - 1949	333
10A	0,13	54	31 - 94	433	5	1129	732 - 1741	236
11A	0,13	178	125 - 254	1423	7	10483	6373 - 17241	1434
12F	0,08	31	15 - 63	408	4	828	608 - 1127	191

Abreviaturas: GMC, media geométrica de la concentración; IC, intervalo de confianza; ICI, intervalo de confianza inferior; ICS, intervalo de confianza superior.

**Ejemplo 19. Evaluación de las respuestas inmunitarias opsonofagocíticas de reacción cruzada en el serogrupo 9 de *Streptococcus pneumoniae***

El ensayo opsonofagocítico neumocócico (OPA, por sus siglas en inglés), que mide la eliminación de células de *S. pneumoniae* por células efectoras fagocíticas en presencia de anticuerpo funcional y de complemento, se considera una alternativa importante para evaluar la eficacia de las vacunas antineumocócicas.

Materiales y procedimientos

Se evaluaron dos subconjuntos seleccionados aleatoriamente de sueros inmunitarios de adultos vacunados con una vacuna antineumocócica conjugada 13-valente (13v PnC) en ensayos de OPA para los serotipos 9V, 9A, 9L y 9N. Los sueros se recogieron de los ensayos clínicos de los Estados Unidos 6115A1-004 (N=59, después de la vacunación) y 6115A1-3005 (N=66, antes y después de la vacunación emparejados), respectivamente.

El estudio 6115A1-3005 (Identificador de ClinicalTrials.gov: NCT00546572) fue un ensayo de fase 3 aleatorizado controlado con compuesto activo con doble enmascaramiento modificado que evaluó la seguridad, tolerabilidad e inmunogenicidad de Plevnar 13 en comparación con una vacuna de polisacárido neumocócico 23-valente (23vPS) en individuos ancianos ambulatorios con edades de 70 años o más que recibieron 1 dosis de 23vPS al menos 5 años antes del reclutamiento en el estudio (véase: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00546572>; consultado el 31 de marzo de 2014).

El estudio 6115A1-004 (Identificador de ClinicalTrials.gov: NCT00427895) fue un ensayo de fase 3 aleatorizado controlado con compuesto activo con doble enmascaramiento modificado que evaluó la seguridad, la tolerabilidad y la inmunogenicidad de una vacuna antineumocócica conjugada 13-valente (13vPnC) en comparación con una vacuna de polisacárido neumocócico 23-valente (23vPS) en adultos de 60 a 64 años de edad sin exposición previa a 23vPS y la seguridad, tolerabilidad e inmunogenicidad de 13vPnC en adultos de 18 a 59 años de edad sin exposición previa a 23vPS (véase: <http://clinicaltrials.gov/show/NCT00427895>; consultado el 31 de marzo de 2014).

La vacuna antineumocócica conjugada 13-valente (13vPnC) evaluada en estos estudios contenía conjugados de los serotipos neumocócicos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F, conjugados individualmente a proteína portadora de material 197 con reactividad cruzada con difteria (CRM<sub>197</sub>).

Los OPA se usan para medir anticuerpos funcionales en sueros humanos contra los serotipos de *S. pneumoniae* 9V, 9N, 9A y/o 9L. El suero de ensayo se prepara en reacciones de ensayo que miden la capacidad de las inmunoglobulinas específicas para el polisacárido capsular para opsonizar las bacterias, causar la deposición del complemento, y de este modo facilitar la fagocitosis y la eliminación de las bacterias por fagocitos. El título de OPA se define como la dilución recíproca que da como resultado una reducción del 50 % en el recuento bacteriano frente a los pocillos de control sin suero de ensayo. El título de OPA se interpola a partir de las dos diluciones que abarcan este valor de corte de eliminación del 50 %.

Los procedimientos de OPA se basaron en los procedimientos descritos en Hu y col. (2005) Clin Diagn Lab Immunol(122):287-295. Se diluyó en serie 2,5 veces suero de ensayo inactivado por calor y se añadió junto con las bacterias de ensayo en placas de ensayo y se incubaron durante 30 minutos con agitación. Después, se añadieron a los pocillos células HL-60 diferenciadas (fagocitos) y suero de cría de conejo (3 a 4 semanas de edad, PEL-FREEZE®, Arkansas, concentración final del 12,5 %), a una relación aproximada de efector a diana de 200:1 y se incubaron a 37 °C con agitación. Para finalizar la reacción, se añadieron 80 µl de NaCl al 0,9 % a los pocillos, se mezclaron y se transfirió una alícuota de 10 µl a los pocillos de placas de filtro MULTISCREEN® HTS HV (MILLIPORE®) que contenían 200 µl de agua. Se filtró el líquido de las placas al vacío y se añadieron 150 µl de medio HYSOY® a cada pocillo y se filtró. Después se incubaron las placas de filtro a 37 °C, con CO<sub>2</sub> al 5 % durante toda la noche y después se fijaron con solución de decoloración (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA). Las placas se tiñeron después con azul de Coomassie y se decoloraron una vez. Se obtuvieron imágenes de las colonias y se numeraron en un analizador Cellular Technology Limited (CTL) (Shaker Heights, OH) IMMUNOSPOT®.

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

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

La respuesta de funcionalidad cruzada de los sueros inmunitarios de adultos inmunizados con 13vPnC frente a los serotipos 9A, 9L y 9N, se evaluó en los respectivos ensayos opsonofagocíticos de microcolonias (mcOPA), junto con la respuesta funcional homóloga al serotipo 9V. Se evaluaron dos subconjuntos seleccionados aleatoriamente de sueros inmunitarios de adultos vacunados con 13vPnC. Los sueros se recogieron de los ensayos clínicos de los Estados Unidos 6115A1-004 (N=59, después de la vacunación) y 6115A1-3005 (N=66, antes y después de la vacunación emparejados), respectivamente.

Los sujetos en el estudio 6115A1-004 no habían sido expuestos previamente a ninguna vacunación antineumocócica y recibieron una sola dosis de 13vPnC como parte del protocolo del estudio. Los sueros inmunitarios del estudio 6115A1-004 muestran un porcentaje similar de pacientes sensibles para todos los serogrupos con valores del 98,3 %, 98,3 %, 100 % y 93,2 % para 9V, 9A, 9L y 9N, respectivamente (figura 11), que respalda los resultados de 6115A1-3005 (figura 12). Se observaron buenas correlaciones del título de OPA entre 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 en el estudio 6115A1-3005 habían recibido previamente 1 dosis de 23vPS al menos 5 años antes del reclutamiento del estudio y recibieron una sola dosis de 13vPnC como parte del protocolo del estudio. Se evaluó un panel de sueros emparejados antes y después de la vacunación (N = 66) de adultos inmunizados con 13vPnC (estudio 6115A1-3005) en OPA para la respuesta homóloga al serotipo 9V y para la reactividad cruzada de los anticuerpos anti-9V a los serotipos 9A, 9L y 9N. Como se muestra en la figura 12, se detectó una inmunidad relativamente elevada (porcentaje de respondedores) a 9V (84 %), 9A (66 %), 9L (82 %) y 9N (86 %) en el ensayo de OPA, posiblemente debido a su inmunización anterior con 23vPS, que incluye polisacáridos no conjugados de los serotipos 9V y 9N. Sin embargo, el porcentaje de respondedores aumentó hasta el 95 % o más para los cuatro serotipos después de la vacunación con 13vPnC, que contiene únicamente conjugado del serotipo 9V del serogrupo 9. El factor de aumento en los valores del título se muestra en la tabla 23 y son similares entre los serotipos,

sugiriendo también reactividad cruzada.

**Tabla 23. Factor de aumento del título de OPA emparejado con antes y después de la vacunación, 13vPnC**

	Títulos de OPA							
	9V		9A		9L		9N	
	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
<b>GMT</b>	221	1323	41	308	165	706	322	693
<b>Factor de aumento</b>	5,9		7,5		4,2		2,1	

Se muestra un análisis más exhaustivo de la distribución del título de OPA en las curvas de distribución acumulativa inversa (CDAI) en las figuras 13-16. Las CDAI muestran un aumento en la respuesta inmunitaria específica de serotipo después de la vacunación para los serotipos 9V, 9A, 9L y en menor medida 9N. La correlación del factor de aumento del título de muestras individuales emparejadas entre 9V/9A, 9V/9L y 9V/9N también se analizó usando la correlación de Pearson. Se observaron correlaciones relativamente buenas de los factores de aumento entre los serotipos 9V y 9A (correlación de Pearson  $\rho = 0,8720$ ,  $p < 0,0001$ ) o 9N ( $\rho = 0,5801$ ,  $p < 0,0001$ ) pero en menor medida con 9L ( $\rho = 0,1804$ ,  $p < 0,1640$ ).

**10 Conclusión**

Según estos datos, la vacuna 13vPnC tiene probabilidad de proporcionar mayor cobertura de serotipo proporcionando protección adicional contra los serotipos 9A, 9L y 9N.

**Ejemplo 20: Respuestas de OPA con funcionalidad cruzada entre el serotipo 15B y el serotipo 15C**

El serogrupo 15 neumocócico incluye cuatro serotipos estructuralmente relacionados: 15A, 15B, 15C y 15F. Los serotipos 15B y 15C son indistinguibles mediante técnicas de genotipado y tienen una composición similar de polisacárido capsular (PS), salvo por que el 15B-PS es la variante O-acetilada de 15C-PS. Para entender si los anticuerpos anti-PS capsular para el serotipo 15B tienen reactividad cruzada funcional con el serotipo 15C, se inmunizó a 10 conejos con las vacunas 16vPnC (véase el ejemplo 15) y 20vPnC (véase el ejemplo 16) que contenían en ambos casos un conjugado inmunogénico que comprendía polisacárido capsular del serotipo 15B de *S. pneumoniae* enlazado covalentemente a CRM<sub>197</sub> como se desvela en el presente documento como parte de su formulación. Se evaluaron sueros de antes y después de la vacunación en ensayos de OPA contra cepas neumocócicas diana de los serotipos 15B y 15C.

De los 10 conejos de cada grupo, un 100 % tuvo respuesta de OPA contra el serotipo 15B después de la inmunización con un conjugado del serotipo 15B. De estas mismas muestras, un 100 % también tuvo respuesta de OPA frente al serotipo 15C (tabla 24 y tabla 25). Se observaron bajos títulos de OPA en los sueros prevacunación en OPA de 15C. Sin embargo, un aumento del título de GMT OPA de más de 10 veces con los sueros postvacunación en comparación con los de prevacunación demostró que los conjugados inmunogénicos de la invención inducen la formación de anticuerpos capaces de eliminar *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 15B y 15C en un OPA.

**Tabla 24. Títulos de OPA frente a cepas de los serotipos 15B y 15C en sueros de conejo antes y después de la vacunación con 16vPnC**

Animal	OPA de 15B		OPA de 15C	
	sem 0	sem 4	sem 0	sem 4
1	4	4129	50	2524
2	4	1645	182	472
3	4	1131	126	818
4	4	3199	50	1189
5	4	2664	36	727
6	4	4589	68	2492
7	11	3601	169	1137
8	4	1838	165	672
9	4	1334	98	528
10	4	1108	204	2425
<b>GMT</b>	<b>4</b>	<b>2222</b>	<b>98</b>	<b>1075</b>

**Tabla 25. Títulos de OPA frente a cepas de los serotipos 15B y 15C en sueros de conejo antes y después de la vacunación con 20vPnC**

Animal	OPA de 15B		OPA de 15C	
	sem 0	sem 4	sem 0	sem 4
1	4	3784	indeterminable*	2353
2	4	862	480	938
3	4	3056	69	1497
4	4	1948	indeterminable*	1316

(continuación)

Animal	OPA de 15B		OPA de 15C	
	sem 0	sem 4	sem 0	sem 4
5	4	2360	4	4665
6	4	1594	indeterminable*	1835
7	4	4943	172	4085
8	4	2419	117	1458
9	4	1245	indeterminable*	527
10	4	616	indeterminable*	545
<b>GMT</b>	<b>4</b>	<b>1917</b>	<b>77</b>	<b>1515</b>

\* El título no pudo determinarse debido a malas curvas de eliminación

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

5 Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto grado de detalle a modo ilustrativo y de ejemplo por claridad y comprensión, pueden efectuarse ciertos cambios y modificaciones dentro del ámbito de las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Pfizer Inc.

<120> Composiciones inmunogénicas que comprenden antígenos sacáridos capsulares y usos de las mismas

10 <130> PC72040A

<150> US 61/929.547

<151> 21/01/2014

<160> 40

<170> PatentIn versión 3.5

15 <210> 1

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Oligonucleótido de CpG de "clase A"

<400> 1

ggggacgacg tcgtgggggg g

21

<210> 2

<211> 21

25 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido de CpG de "clase A"

<400> 2

30 ggggacgacg tcgtgggggg g

21

<210> 3

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Oligonucleótido de CpG de "clase B"

<400> 3

tcgtcgttt tcggtgctt t

21

<210> 4

40 <211> 21

# ES 2 820 824 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de CpG de "clase B"	
5	<400> 4 tcgtcgttt tcggtcgtt t	21
	<210> 5	
	<211> 24	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de CpG de "clase B"	
	<400> 5 tcgtcgttt gtcgtttgt cgtt	24
15	<210> 6	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Oligonucleótido de CpG de "clase B"	
	<400> 6 tcgtcgttc gtcgtttgt cgtt	24
	<210> 7	
	<211> 24	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de CpG de "clase B"	
30	<400> 7 tcgtcgttt gtcgttttt tcga	24
	<210> 8	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Oligonucleótido de clase B	
	<400> 8 tcgtcgttt tcggtcgtt t	21
	<210> 9	
40	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de clase B	
45	<400> 9 tcgtcgttt tcggtcgtt t	21
	<210> 10	
	<211> 24	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	

# ES 2 820 824 T3

	<220>	
	<223> Oligonucleótido de clase B	
	<400> 10	
	tcgtcgtttt gtcgtttgt cggt	24
5	<210> 11	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> Oligonucleótido de clase B	
	<400> 11	
	tcgtcgtttc gtcgtttgt cggt	24
	<210> 12	
	<211> 24	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de clase B	
	<400> 12	
20	tcgtcgtttt gtcgtttttt tcga	24
	<210> 13	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido de CpG de clase C	
	<400> 13	
	tcgcgtcgtt cggcgcgcgc cg	22
	<210> 14	
30	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de CpG de clase C	
35	<400> 14	
	tcgtcgcgacgt tcggcgcgcgc cgg	23
	<210> 15	
	<211> 21	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de CpG de clase C	
	<400> 15	
	tcggacgttc ggccgcgcgcc g	21
45	<210> 16	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Oligonucleótido de CpG de clase C	

## ES 2 820 824 T3

	<400> 16 tcggacgttc ggcgcgccg	19
5	<210> 17 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido de CpG de clase C	
10	<400> 17 tcgcgtcgtt cggcgcgccg	20
	<210> 18 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Oligonucleótido de CpG de clase C	
	<400> 18 tcgacgttcg gcgcgcgccg	20
20	<210> 19 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido de CpG de clase C	
25	<400> 19 tcgacgttcg gcgcgcgccg	18
	<210> 20 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido de CpG de clase C	
	<400> 20 tcgcgtcgtt cggcgcgccg	18
35	<210> 21 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido de CpG de clase C	
40	<400> 21 tcgcgacgtt cggcgcgcgc cg	22
	<210> 22 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Oligonucleótido de CpG de clase C	
	<400> 22 tcgtcgtttt cggcgcgcgc cg	22
50		

# ES 2 820 824 T3

	<210> 23	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Oligonucleótido de CpG de clase C	
	<400> 23	
	tcgtcgtttt cggcggccgc cg	22
10	<210> 24	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de CpG de clase C	
15	<400> 24	
	tcgtcgtttt acggcgccgt gccg	24
20	<210> 25	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de CpG de clase C	
	<400> 25	
	tcgtcgtttt cggcgcgcgc cgt	23
25	<210> 26	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Oligonucleótidos de clase C	
	<400> 26	
	tcgcgtcgtt cggcgcgcgc cg	22
35	<210> 27	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de clase C	
	<400> 27	
40	tcgtcgacgt tcggcgcgcg ccg	23
45	<210> 28	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de clase C	
	<400> 28	
	tcggacgttc ggcgcgcc g	21
50	<210> 29	
	<211> 19	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de clase C	
5	<400> 29 tcggacgttc ggcgcgccg	19
	<210> 30	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Oligonucleótido de clase C	
	<400> 30 tcgcgtcgtt cggcgcgccg	20
	<210> 31	
15	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de clase C	
20	<400> 31 tcgacgttcg gcgcgcgccg	20
	<210> 32	
	<211> 18	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de clase C	
	<400> 32 tcgacgttcg gcgcgcgccg	18
30	<210> 33	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Oligonucleótido de clase C	
	<400> 33 tcgcgtcgtt cggcgcgccg	18
	<210> 34	
40	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de clase C	
45	<400> 34 tcgcgacgtt cggcgcgcgc cg	22
	<210> 35	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	

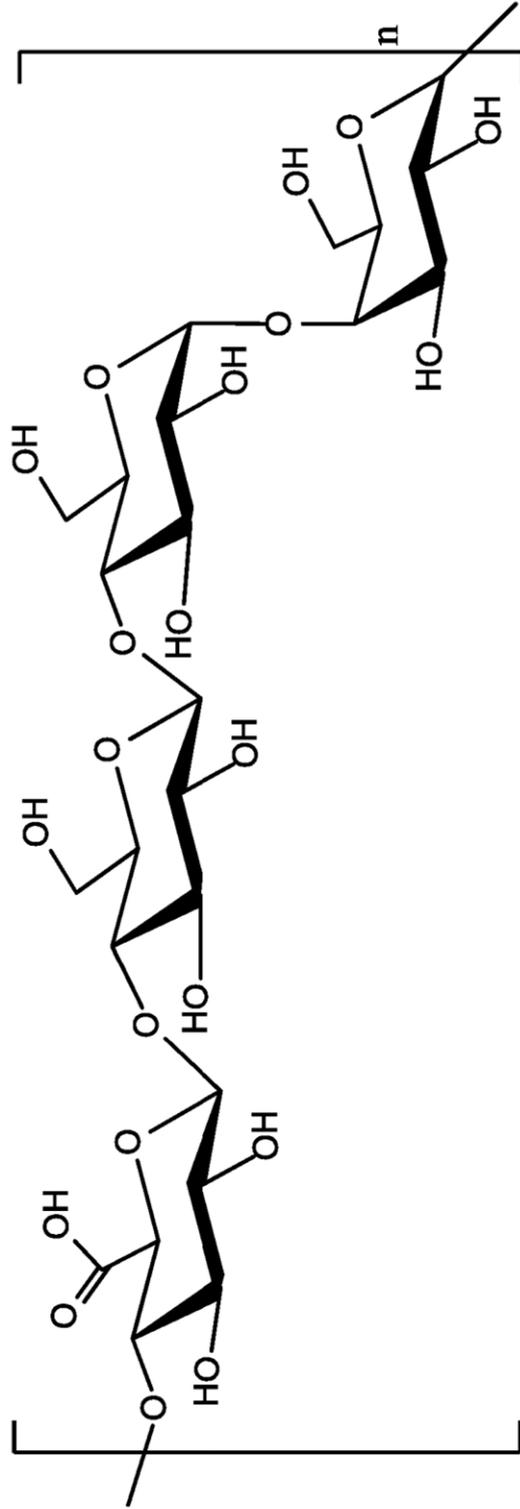
	<223> Oligonucleótido de clase C	
	<400> 35	
	tcgtcgtttt cggcgcgcg cg	22
5	<210> 36	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de clase C	
10	<400> 36	
	tcgtcgtttt cggcggccgc cg	22
	<210> 37	
	<211> 24	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de clase C	
	<400> 37	
	tcgtcgtttt acggcgccgt gccg	24
20	<210> 38	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Oligonucleótido de clase C	
	<400> 38	
	tcgtcgtttt cggcgcgcg cg	23
	<210> 39	
30	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de CpG de clase P	
	<400> 39	
35	tcgtcgacga tcggcgcgcg ccg	23
	<210> 40	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Oligonucleótido de CpG de clase P	
	<400> 40	
	tcgtcgacga tcggcgcgcg ccg	23

**REIVINDICACIONES**

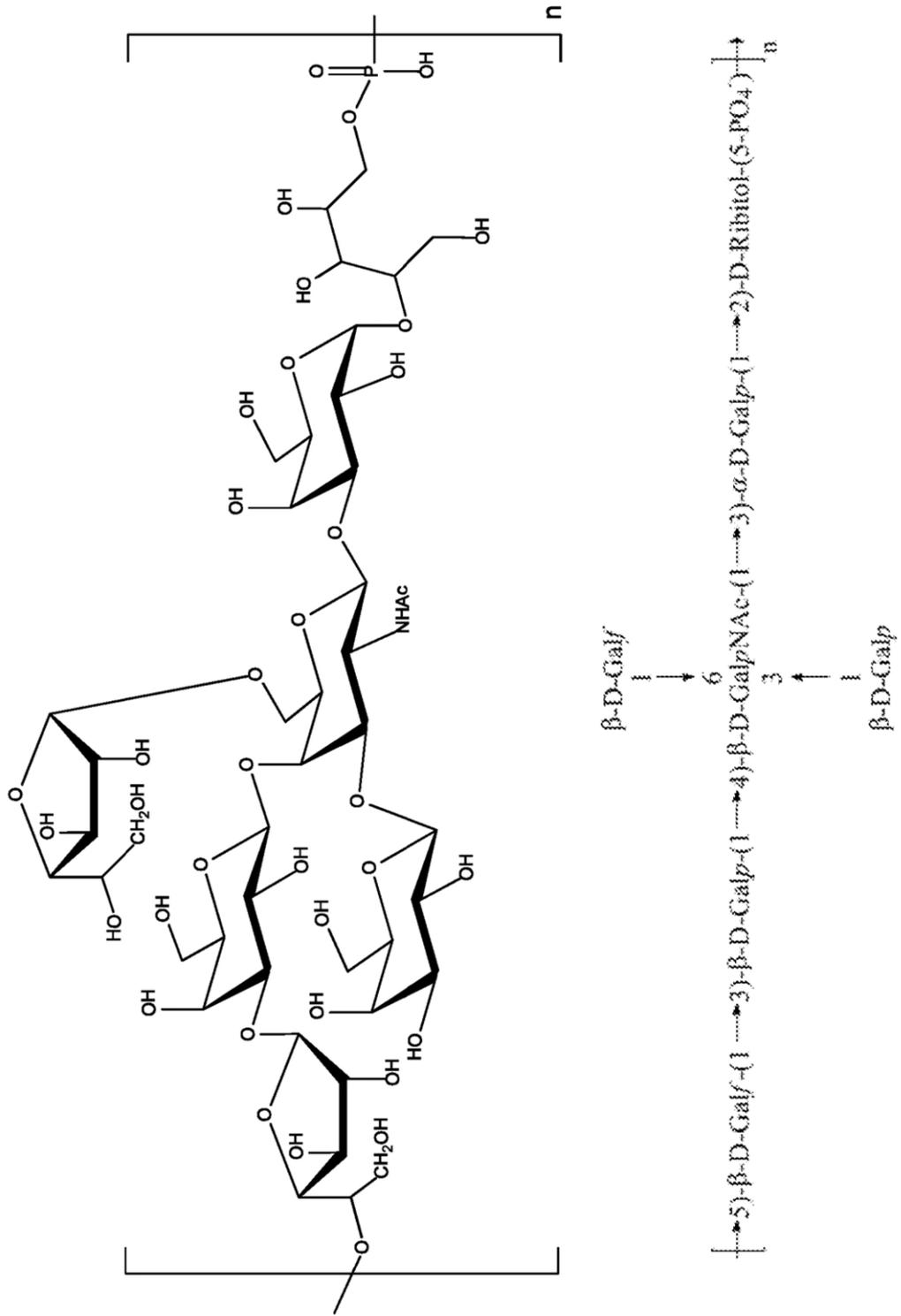
- 5 1. Una composición inmunogénica que comprende al menos un glucoconjugado del serotipo 22F de *S. pneumoniae*, en la que, dicho glucoconjugado del serotipo 22F tiene un peso molecular de entre 1000 kDa y 12.500 kDa, en el que la relación de sacárido a proteína portadora (p/p) es de entre 0,8 y 1,2 y en el que dicha proteína portadora es CRM<sub>197</sub>.
2. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, en la que dicho glucoconjugado del serotipo 22F comprende menos de un 50 % de polisacárido capsular del serotipo 22F libre en comparación con la cantidad total de polisacárido capsular del serotipo 22F.
- 10 3. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que al menos un 30 % de los glucoconjugados del serotipo 22F tiene una K<sub>d</sub> menor o igual a 0,3 en una columna CL-4B.
4. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el grado de conjugación de dicho glucoconjugado del serotipo 22F es de entre 2 y 15.
- 15 5. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que además comprende al menos un glucoconjugado del serotipo 15B de *S. pneumoniae* y al menos un glucoconjugado del serotipo 33F de *S. pneumoniae*.
- 20 6. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 que además comprende al menos un glucoconjugado del serotipo 15B de *S. pneumoniae*, al menos un glucoconjugado del serotipo 33F de *S. pneumoniae*, al menos un glucoconjugado del serotipo 12F de *S. pneumoniae*, al menos un glucoconjugado del serotipo 10A de *S. pneumoniae*, al menos un glucoconjugado del serotipo 11A de *S. pneumoniae* y al menos un glucoconjugado del serotipo 8 de *S. pneumoniae*.
7. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que además comprende glucoconjugados de los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F de *S. pneumoniae*.
8. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que además comprende glucoconjugados de los serotipos 1, 5 y 7F de *S. pneumoniae*.
- 25 9. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que además comprende glucoconjugados de los serotipos 6A y 19A de *S. pneumoniae*.
10. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 que además comprende al menos un glucoconjugado del serotipo 3 de *S. pneumoniae*.
- 30 11. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que es una composición antineumocócica conjugada 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20-valente.
12. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para su uso como medicamento.
13. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para su uso como vacuna.
14. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, para su uso en un procedimiento para prevenir, tratar o aliviar una infección, enfermedad o afección asociada con *S. pneumoniae* en un sujeto.

35

**FIGURA 1**



**FIGURA 2**





**FIGURA 4**

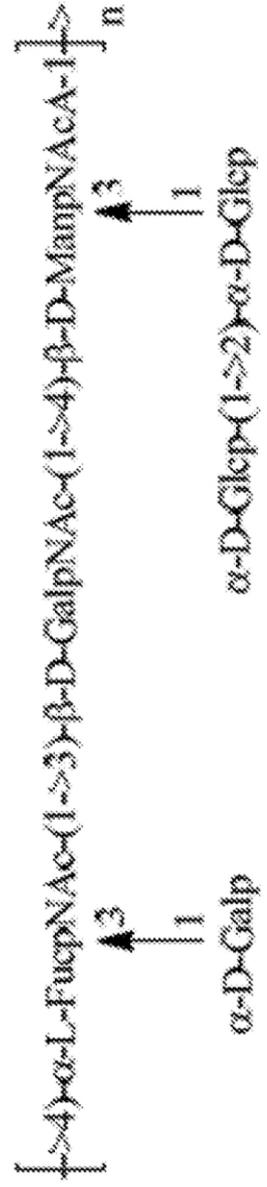
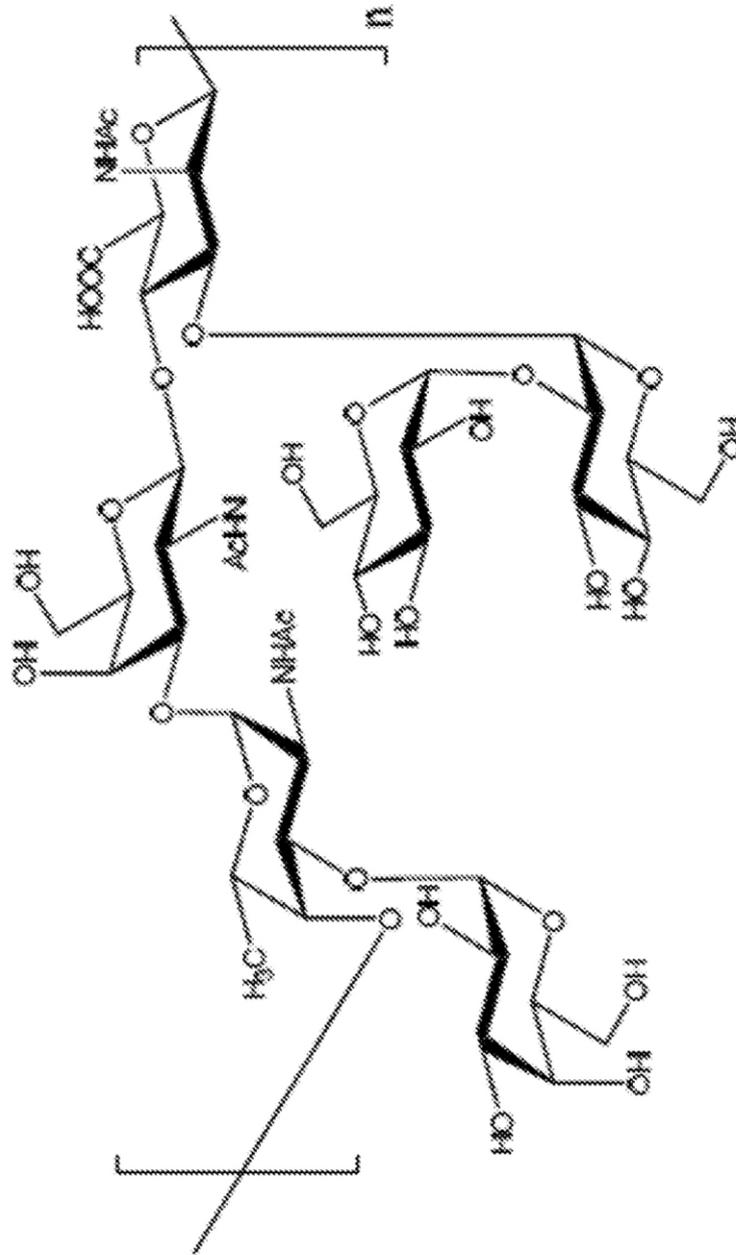
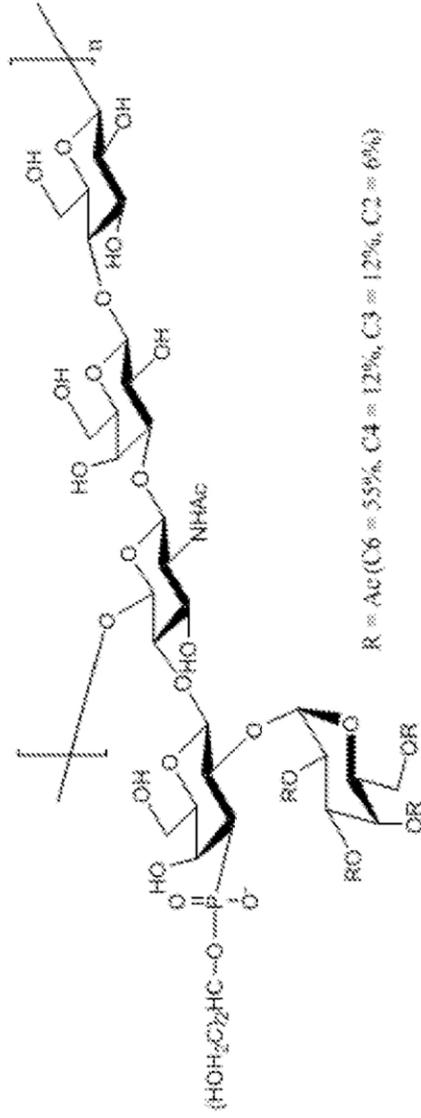


FIGURA 5



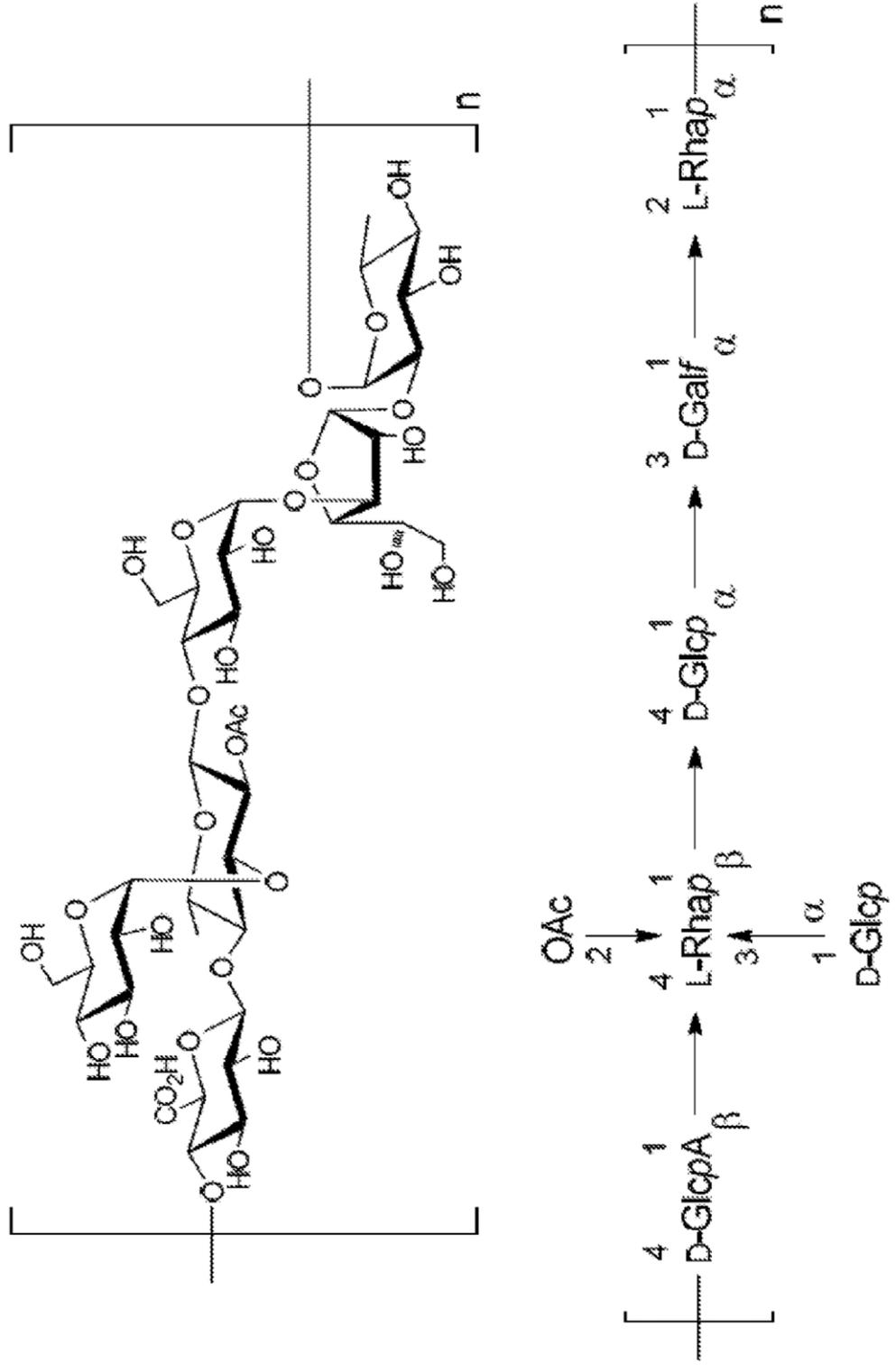
R = Ac (C6 = 55%, C4 = 12%, C3 = 12%, C2 = 6%)

Ac = Acetilo



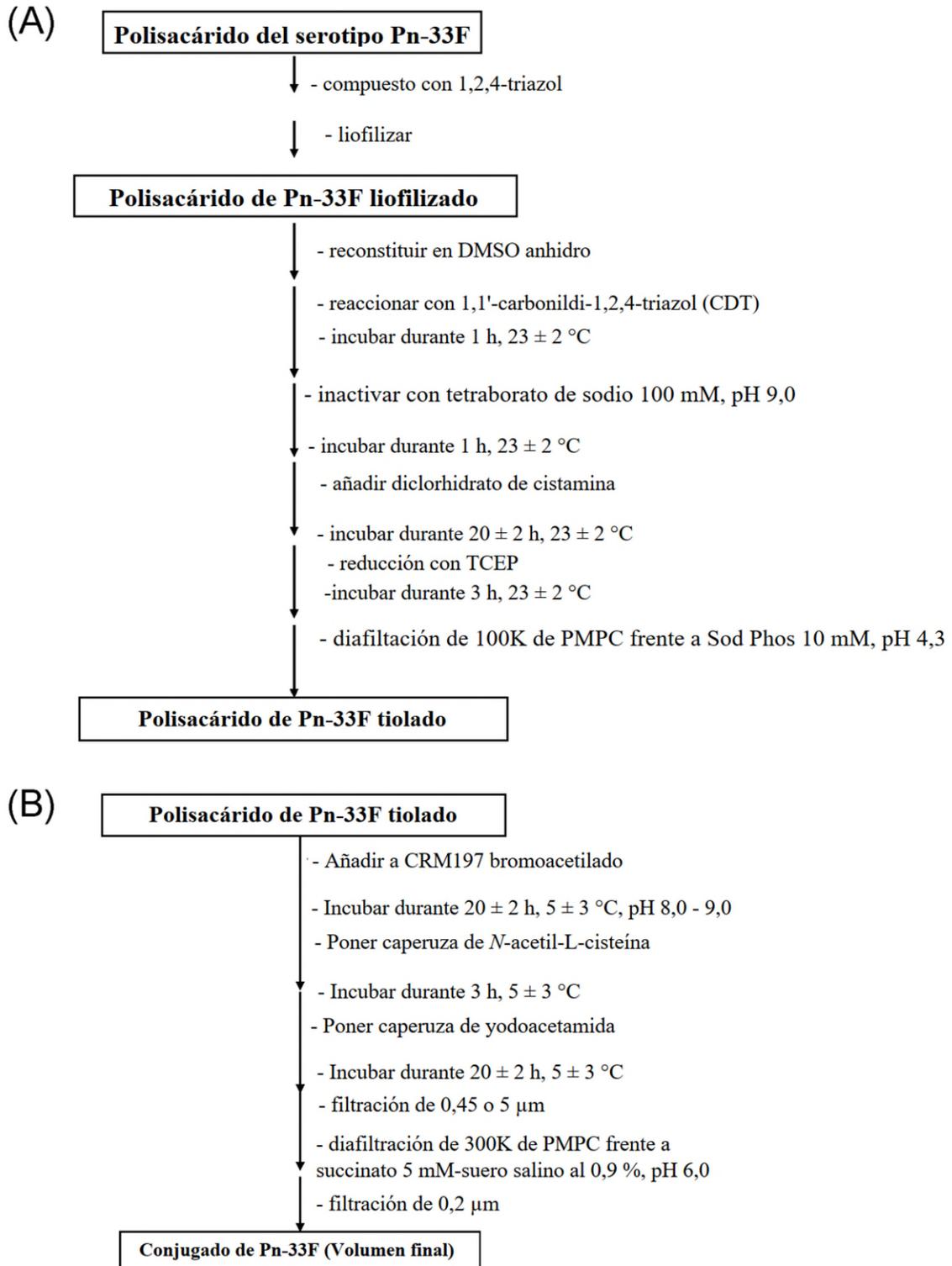
C<sub>37</sub>H<sub>61</sub>NNaO<sub>31</sub>P, PM = 1069,8

FIGURA 6



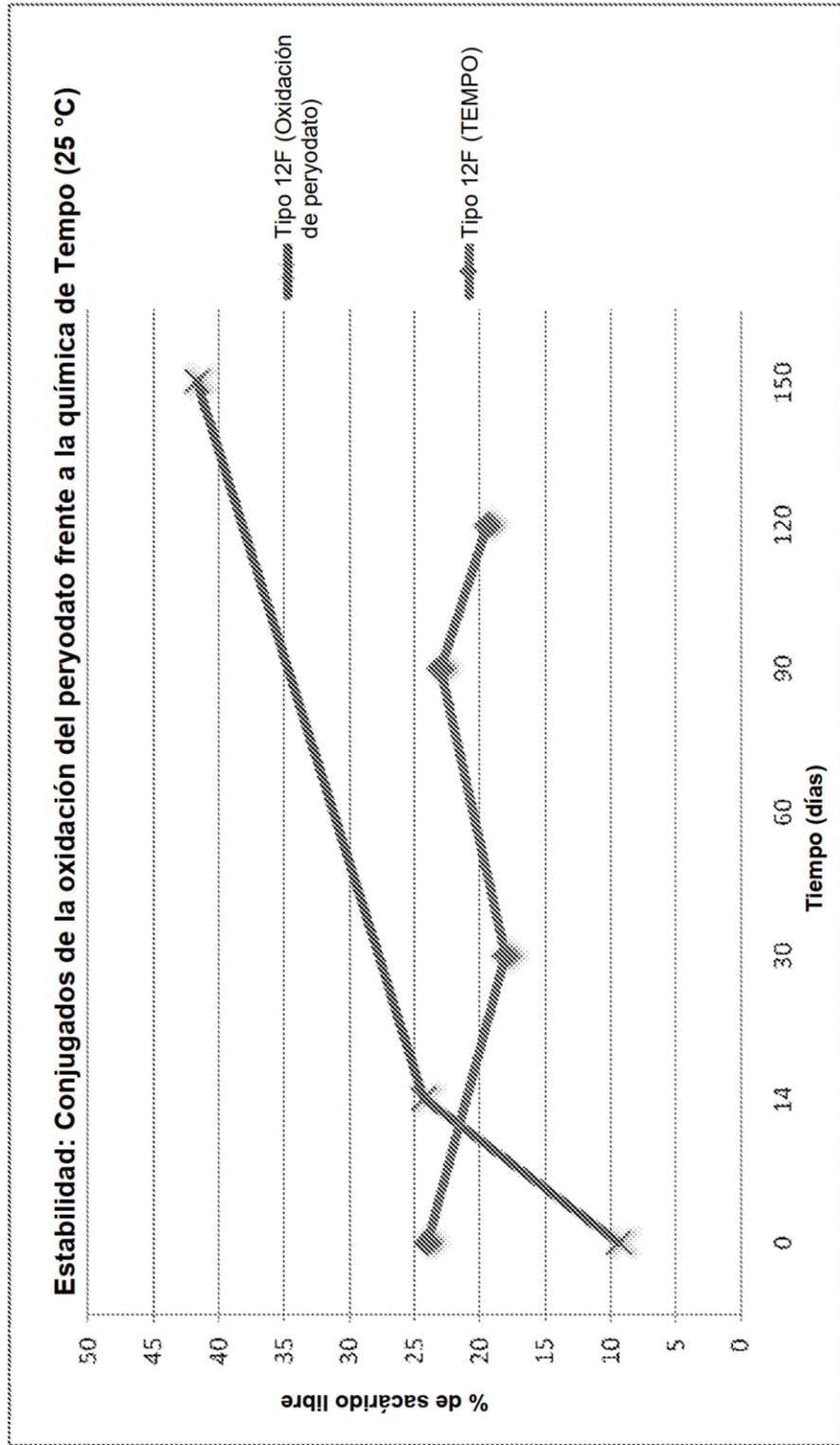


## FIGURA 8

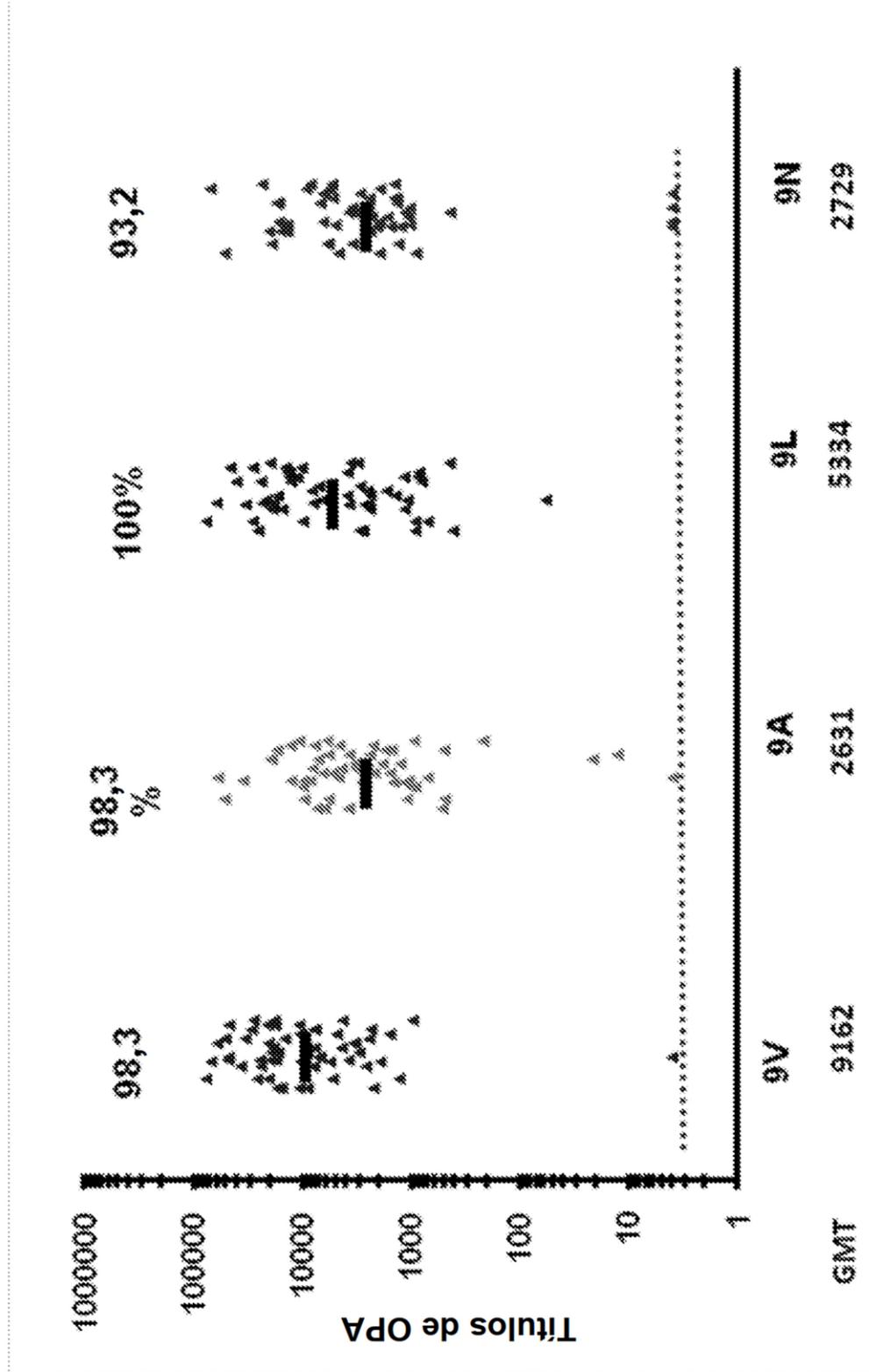




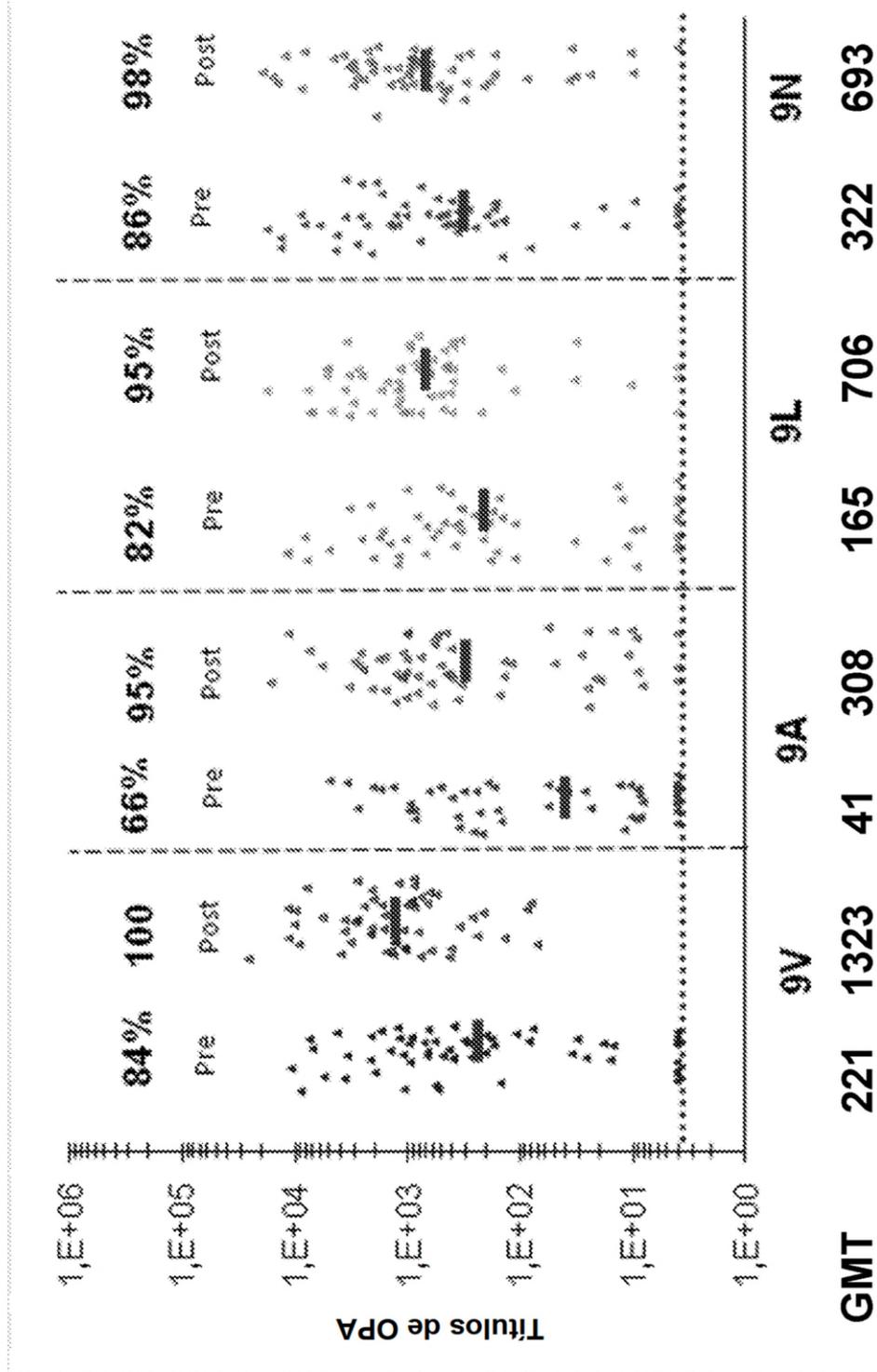
**FIGURA 10**



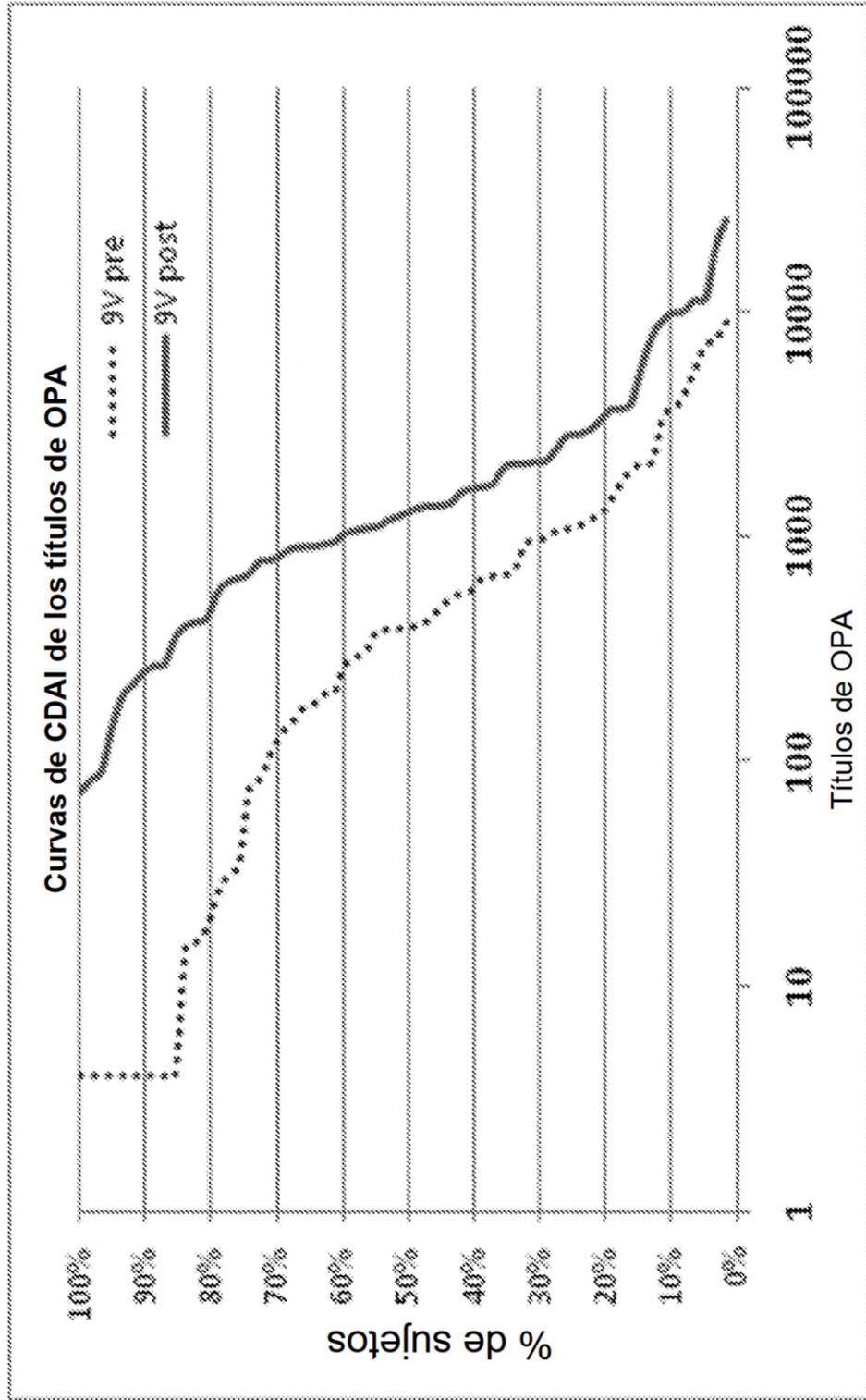
**FIGURA 11**



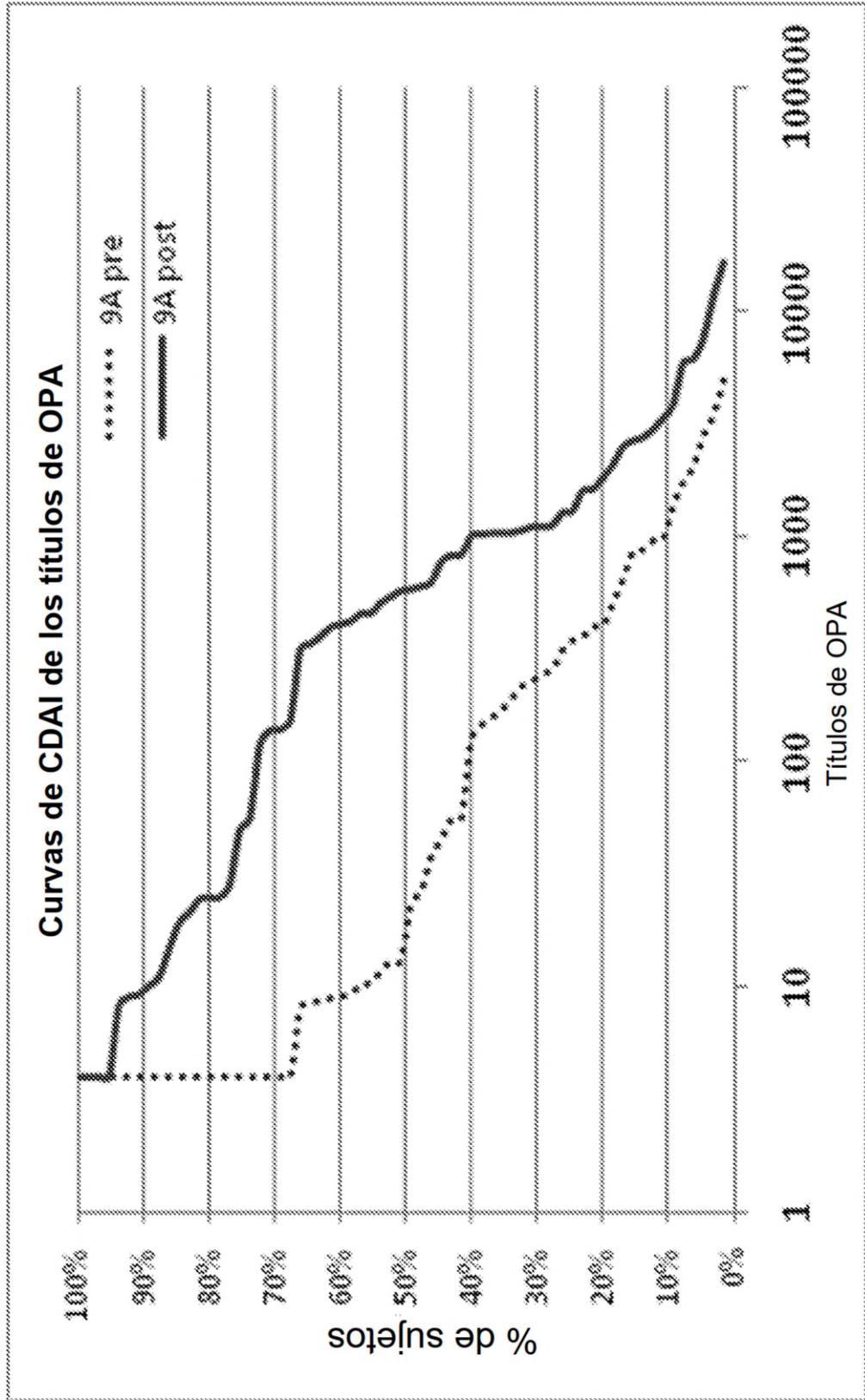
**FIGURA 12**



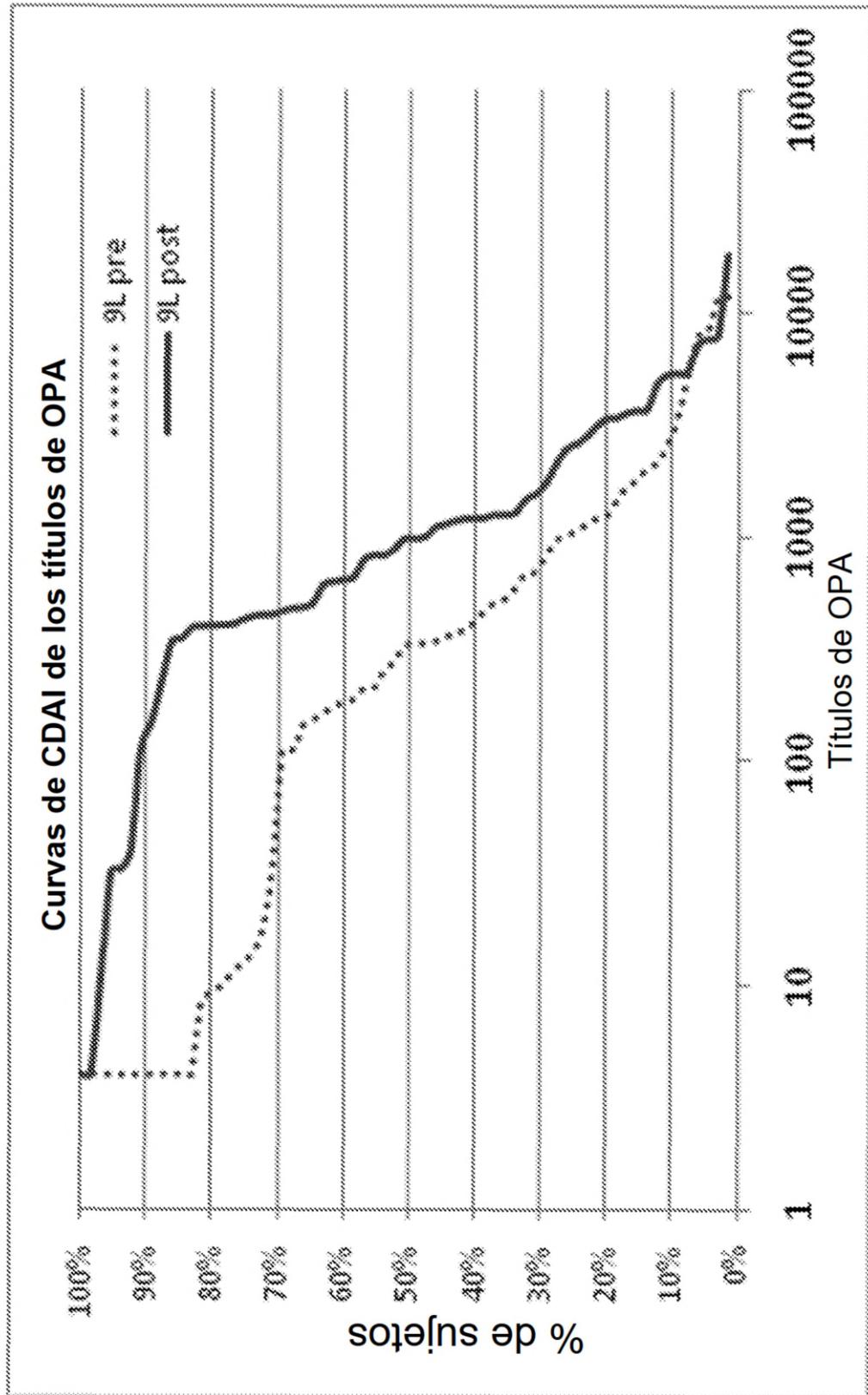
**FIGURA 13**



**FIGURA 14**



**FIGURA 15**



**FIGURA 16**

