

REIVINDICACIONES

1. Un proceso mejorado de conjugación para obtener nuevos conjugados sintéticos de oligosacáridos- proteínas que comprenden las etapas de:

(a) la reacción de un oligosacárido sintético que tiene al menos un enlazador amino terminal con un reactivo que tiene al menos un grupo tiol funcional reactivo para obtener un oligosacárido activado;

(b) hacer reaccionar una proteína vehículo con al menos un entrecruzante bifuncional hetero alifático para obtener una proteína portadora activada que tiene el grupo funcional de maleimida reactivo;

(c) llevar a cabo la reacción de conjugación de dicho oligosacárido sintético activado de la etapa (a) con dicha proteína portadora activada de la etapa (b) para obtener un conjugado sintético de oligosacárido- proteína (OS- PR) que tiene un enlace de tioéter;

en donde

- dicho proceso de conjugación se completa en un intervalo de 14 horas a 22 horas,
- dicho proceso resulta en mayores rendimientos de conjugado de oligosacárido-proteína vis a vis los rendimientos de los conjugados convencionales,
- dicho conjugado de oligosacárido-proteína presenta títulos de anticuerpo significativamente elevados incluyendo anticuerpos funcionales.

2. El proceso mejorado de conjugación según la reivindicación 1 en el que dicho oligosacárido es oligosacárido sintético que consta de:

- al menos un enlazador amino terminal incorporado,
- cuatro a ocho unidades monoméricas de repetición de polisacáridos

en donde dichos oligosacáridos sintéticos así formados imitan los polisacáridos naturales de bacterias gram negativas tales como *Neisseria meningitidis* y *Haemophilus influenzae*.

3. El proceso mejorado de la conjugación como se reivindica en la reivindicación 2 en el que dicha *Neisseria meningitidis* consta de los serogrupos A, C, Y, W135, X y dicha *influenzae Haemophilus* comprende el tipo b.

4. El proceso mejorado de conjugación según la reivindicación 1 en el que dicha proteína portadora se obtiene a partir de bacterias gram positivas seleccionadas de *Clostridium tetani* (toxoides del tétanos), *Corynebacterium diphtheriae* (CRM197) o versiones recombinantes de los mismos.

5. El proceso mejorado de conjugación según la reivindicación 1 en el que dicho oligosacárido activado se obtiene mediante las etapas de:

(a) hacer reaccionar dicho oligosacárido que tiene al menos un amino enlazador terminal con al menos un agente sulfhidrilante a condiciones predeterminadas para obtener el oligosacárido sulfhidrilado;

(b) someter dicho oligosacárido sulfhidrilado de la etapa (a) a cromatografía de filtración de gel para remover SATA sin reaccionar;

(c) hacer reaccionar dicho oligosacárido sulfhidrilado de la etapa (b) con al menos un nucleófilo para obtener el oligosacárido activado;

en el que dichas condiciones predeterminadas son adición de 2-5x, preferiblemente 2,5 veces el exceso molar del agente sulfhidrilante a un pH de 6,0-8,0, preferiblemente 7,5.

6. El proceso mejorado de conjugación como se reivindica en la reivindicación 1 en donde dicho agente sulfhidrilante es un agente químico sulfhidrilante para facilitar la conversión del enlazador amino terminal al grupo sulfhidrilo, dicho agente sulfhidrilante que es preferiblemente N-succinimidil acetiltioacetato S- (SATA).

7. El procedimiento mejorado de conjugación como se reivindica en la reivindicación 5 en el que dicho nucleófilo se selecciona de entre un grupo de agentes reductores, preferiblemente hidrócloruro de hidroxilamina para facilitar la conversión del grupo sulfhidrilo al grupo tiol reactivo.

8. El proceso mejorado de conjugación según la reivindicación 1 en el que dicho reticulador heterobifuncional alifático es un reticulador químico para generar el grupo funcional de maleimida reactivo, dicho agente de reticulación heterobifuncional alifático es preferiblemente éster de N-(beta-maleimido propiloxy) succinimida (BMPS).
9. El proceso mejorado de conjugación tal como se reivindica en la reivindicación 1 en donde dicho proceso resulta en la recuperación del oligosacárido activado en el intervalo de 40% a 90%.
10. El proceso mejorado de conjugación según la reivindicación 1 en donde dicho proceso da como resultado mayores rendimientos de dichos conjugados sintéticos OS-PR en el intervalo de 21% a 48% para los conjugados meningococales tales como los conjugados MenX, MenC, MenW135, MenY, preferiblemente en el rango de 25% a 30%; y en el rango de 45% a 65% para los conjugados Hib, preferiblemente en el intervalo de 50% a 60%.
11. El proceso mejorado de conjugación según la reivindicación 1 en donde dicho proceso resulta en títulos altos totales de anticuerpos IgG y de títulos de SBA en la dosis.
12. El proceso mejorado de conjugación según la reivindicación 11 en el que dichos títulos de IgG totales son 4 a 18 veces mayores que los títulos de pre-immunización para los conjugados de oligosacáridos del serogrupo C, dichos títulos SBA son al menos 4 veces mayores que los títulos de SBA de pre-immunización para los conjugados de oligosacáridos del serogrupo C, dichos títulos totales de IgG e SBA para conjugados MenX oligómero-TT son 4 veces más altos que el control negativo (vehículo) y hasta 45 veces más altos en términos de IgG total y títulos de SBA hasta 350 veces más altos que el control negativo (vehículo).
13. El proceso mejorado de conjugación según la reivindicación 1 en el que dicho proceso se lleva a cabo en ausencia de purga de nitrógeno y utiliza los reactivos para los que se requieren habilidades específicas de manejo, con lo que el proceso es conveniente y rentable.

14. Nuevos conjugados OS-PR sintéticos obtenidos a partir del proceso como se reivindica en la reivindicación 1 en el que dicho conjugado sintético OS-PR produce la respuesta inmune específica y homogénea y es capaz de ser utilizado en la preparación de vacunas conjugadas sintéticas, ya sea en una sola vacuna o como vacunas de combinación y también herramienta de diagnóstico.

15. El conjugado novedoso OS-PR sintético como se reivindica en la reivindicación 14 en donde dicho conjugado tiene una relación OS/PR en el intervalo de 0.17 a 0.5, preferiblemente en el intervalo de 0.2 a 0.4.