

CAPITULO REIVINDICATORIO MODIFICADO

(Examen de Forma)

1. Un método para la preparación de una formulación de vacuna antineumocócica conjugada de polisacáridos-proteínas multivalente estable, que presenta una adsorción óptima para cada conjugado en donde, en dicho método, se previene la agregación mediante el empleo de un proceso que comprende:

i. Una adsorción individual o separada para los conjugados que de lo contrario muestran una adsorción menor relativa por una adsorción combinada;

ii. Un sistema amortiguador de histidina-ácido succínico junto con un cambio en el pH de pH neutro a pH ácido;

iii. Una relación de polisacárido a proteína de entre 0,5 y aproximadamente 1,4; y/o

iv. El uso de un impulsor de turbina tipo Rushton en el recipiente de formulación.

2. El método de la Reivindicación 1, en donde la adsorción se encuentra en el rango de 75 – 99%.

3. Una composición de vacuna antineumocócica conjugada multivalente preparada de acuerdo con la Reivindicación 1; en donde dicha composición comprende por lo menos 2 conjugados de polisacárido-proteína que contienen un polisacárido seleccionado entre los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9A, 9V, 9F, 9N, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B, 38 y 45.

4. Una composición de vacuna antineumocócica conjugada multivalente preparada de acuerdo con la Reivindicación 3; en donde dicha composición comprende por lo menos 10 conjugados de polisacárido-proteína que contienen un polisacárido de los serotipos 1, 5, 6A,

6B, 7F, 9V, 14, 19A, 19F y 23F.

5. Una composición vacuna antineumocócica conjugada multivalente preparada de acuerdo con la Reivindicación 3; en donde dicha composición comprende por lo menos 16 conjugados de polisacárido-proteína que contienen un polisacárido de los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F y 23F.

6. La composición de la Reivindicación 1, en donde la proteína transportadora comprende una o más seleccionadas del grupo que consiste en CRM197, adhesina de la superficie neumocócica A (PsaA), toxoide de la difteria (DT), toxoide del tétano (TT), fragmento C de toxoide del tétano, toxoide de Pertussis, proteína D de H. influenzae, LT de E. coli, ST de E. coli y exotoxina A de Pseudomonas aeruginosa, complejo c de la membrana exterior (OMPC), porinas, proteínas de unión a transferrina, neumolisina, proteína de la superficie neumocócica A (PspA), adhesina de la superficie neumocócica A (PsaA), PhtD neumocócica, proteínas de la superficie neumocócica BVH-3 y BVH-11, antígeno protector (PA) de Bacillus anthracis y el factor de edema detoxificado (EF) y el factor letal (LF) de Bacillus anthracis, ovoalbúmina, hemocianina de lapa (KLH), albúmina de suero humano, albúmina de suero bovina (BSA) y proteína purificada derivado de tuberculina (PPD), en particular CRM197, el toxoide del tétano, el toxoide de la difteria o PsaA.

7. La composición de la Reivindicación 1, en donde dicha composición multivalente comprende:

- i. por lo menos un conjugado de polisacárido-proteína que comprende CRM197 como proteína transportadora, por lo menos un conjugado de polisacárido-proteína que tiene TT como proteína transportadora; o
- ii. por lo menos un conjugado de polisacárido-proteína que tiene CRM197 como proteína transportadora, por lo menos un conjugado de polisacárido-proteína que tiene DT

como proteína transportadora; o

iii. por lo menos un conjugado de polisacárido-proteína que tiene CRM197 como proteína transportadora, por lo menos un conjugado de polisacárido-proteína que comprende la adhesina de la superficie pneumocócica A (PsaA) como proteína transportadora; o

iv. por lo menos un conjugado de polisacárido-proteína que tiene CRM197 como proteína transportadora, por lo menos un conjugado de polisacárido-proteína que tiene TT como proteína transportadora, por lo menos un conjugado de polisacárido-proteína que tiene DT como proteína transportadora; o

v. por lo menos un conjugado de polisacárido-proteína que tiene CRM197 como proteína transportadora, por lo menos un conjugado de polisacárido-proteína que tiene TT como proteína transportadora, por lo menos un conjugado de polisacárido-proteína que tiene adhesina de la superficie pneumocócica A (PsaA) como proteína transportadora; o

vi. por lo menos un conjugado de polisacárido-proteína que tiene CRM197 como proteína transportadora, por lo menos un conjugado de polisacárido-proteína que tiene TT como proteína transportadora, por lo menos un conjugado de polisacárido-proteína que tiene adhesina de la superficie pneumocócica A (PsaA) como proteína transportadora.

8. La composición de la Reivindicación 3, en donde el serotipo 3 preferiblemente está conjugado con CRM-197, el serotipo 18C preferiblemente está conjugado con CRM197 y el serotipo 4 se puede conjugar con TT o DT.

9. El método de la Reivindicación 1, en donde dicha solución amortiguadora de histidina-ácido succínico tiene una concentración de entre 1 mM y 200 mM, preferiblemente entre 10 mM y 40 mM, más preferiblemente de 20 mM.

10. El método de la Reivindicación 1, en donde el cambio en el pH para la solución amortiguadora de histidina-succínico preferiblemente tiene lugar de 6,8 a un pH de entre 5,6 y

5,8.

11. El método de la Reivindicación 1, en donde dicho método comprende los siguientes pasos:

i. agregar moléculas de polisacárido a un transportador proteico en una relación predeterminada, preferiblemente de 0,8 a 1,4 y más preferiblemente 1:1, y a un pH predeterminado, preferiblemente entre 5,2 y 5,9, para obtener una pluralidad de distintos conjugados de polisacárido-proteína;

ii. adsorber de manera individual sobre un primer adyuvante de sal de aluminio en una solución amortiguadora de histidina-ácido succínico a una concentración predeterminada, un primer conjunto predeterminado de conjugados de polisacárido-proteína seleccionados entre dicha pluralidad de conjugados de polisacárido-proteína obtenida en el paso el (i), en donde la cantidad de dicho adyuvante de sal de aluminio varía en un rango entre 20-375 μg de Al^{+++} por 0,5 ml de dosis de la formulación de vacuna final; en donde el conjunto de conjugados de polisacárido-proteína comprende 6A, 9V y 23F.

iii. adsorber de un modo combinado sobre un segundo adyuvante de sal de aluminio en una solución amortiguadora de histidina-ácido succínico que se encuentra a una concentración predeterminada, un segundo conjunto predeterminado de conjugados de polisacárido-proteína seleccionado entre dicha pluralidad de conjugados de polisacárido-proteína obtenida en el paso (i), en donde la cantidad de dicho adyuvante de sal de aluminio varía en un rango entre 20-375 μg de Al^{+++} por 0,5 ml de dosis de la formulación de vacuna final; en donde el conjunto de conjugados de polisacárido-proteína comprende 1, 5, 6B, 7F, 14, 19A y 19F.

iv. mezclar dicho primer conjunto adsorbido obtenido en el paso (ii) con dicho segundo conjunto adsorbido obtenido en el paso (iii), y opcionalmente agregar un agente tensioactivo, preferiblemente Polisorbato-20, y/o por lo menos un conservante seleccionado del grupo que consiste en conservantes mercuriales tales como Timerosal, 2-fenoxi-etanol,

metilparabeno, propilparabeno, alcohol bencílico y mezclas de los mismos, con la ayuda de un impulsor de hoja plana de una turbina de Rushton para obtener una formulación estable de una vacuna antineumocócica conjugada de polisacárido-proteína multivalente.

12. Un método para reducir la agregación de polisacárido-polisacárido en reacciones de reducción y conjugación, en particular para polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* que contienen un enlace fosfodiéster entre unidades repetidas unidas de manera covalente a una proteína transportadora usando química de cianilación, para así proporcionar una inmunogenicidad y estabilidad mejoradas para cada conjugado, en donde dicho método comprende:

i) hacer reaccionar un polisacárido que tiene un tamaño promedio entre 130 KDa y 190 KDa con un agente de cianilación a una relación de entre 1:0,8 y 1:1 a una temperatura entre aproximadamente 22 °C y aproximadamente 25 °C por un período de entre aproximadamente 4 min y aproximadamente 10 min, lo que da como resultado un polisacárido activado por cianato; y

ii) poner el polisacárido activado por cianato en contacto con una proteína a una relación de 1:1, a un pH de entre aproximadamente 9 y aproximadamente 9,5, por un período de 3 h y 5 h, seguido por neutralización con glicina;

en donde dicho proceso de conjugación minimiza la degradación mediada por los productos secundarios del agente de cianilación de un polisacárido reducido e impide la subsiguiente agregación de polisacárido-polisacárido, dando como resultado un conjugado que tiene un contenido mínimo de polisacáridos libres.

13. El método de la Reivindicación 12, en donde el polisacárido que comprende un enlace fosfodiéster entre unidades repetidas deriva de un serotipo 19A, 19F, 6A o 6B de *Streptococcus pneumoniae*.

14. El método de la Reivindicación 13, en donde el polisacárido es un polisacárido del serotipo 19A de *Streptococcus pneumoniae* y el agente de cianilación es tetrafluoroborate de 1-ciano-4-dimetil-amino-piridinio mezclados a una relación de 1:1 a 22 °C por un período de 4 minutos dando como resultado un polisacárido activado por cianato.

15. El método de la Reivindicación 13, en donde el polisacárido es un polisacárido del serotipo 19F de *Streptococcus pneumoniae* y el agente cianilante es tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetil-amino-piridinio mezclados a una relación de 1:0,8 a 22°C por un período de 8-10 minutos dando como resultado un polisacárido activado por cianato.

16. El método de la Reivindicación 14 ó 15, en donde dicho conjugado tiene un contenido de polisacárido libre menor que 1,6%.

17. El método de la Reivindicación 2, en donde el porcentaje de adsorción se mide mediante un ELISA sándwich, que comprende en particular un paso de disolución de muestras de conjugados adsorbidos sobre alúmina usando hidróxido de sodio y ácido cítrico.

18. La composición reivindicada en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde se usa PsaA como un adyuvante.

19. La composición reivindicada en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que además incluye el paso de guardar dicha formulación de vacuna conjugada obtenida en un estado liofilizado, hasta la administración como una formulación de 1, 5 ó 10 dosis con un diluyente que contiene gel de fosfato de aluminio y NaCl.
