

ANEXO 1

DATOS EXPERIMENTALES ADICIONALES QUE SOPORTAN EL EFECTO
TÉCNICO DE LA INVENCIÓN

- El rendimiento de los procesos de mezcla es un producto del tiempo de mezcla, el tipo de impulsor utilizado, la cantidad de hojas del impulsor, el tamaño de las hojas, las velocidades angulares de trabajo y las configuraciones de los recipientes.
- En la presente invención para preparar la formulación de vacuna antineumocócica conjugada, el impulsor tipo Rushton desempeña un papel importante en la mezcla uniforme debido a su patrón de flujo específico generado en los recipientes de formulación. Estos impulsores generan un fuerte componente radial de la velocidad dirigida hacia la pared de los vasos. Mediante el uso del impulsor de turbina Rushton de seis hojas para la formulación, mejoró la uniformidad de las partículas de aluminio y redujo la formación de agregados en la composición de la vacuna.

Adsorción de conjugados de serotipo neumocócico 17-valente sobre aluminio en presencia de (a) amortiguador de ácido succínico vs (b) amortiguador de histidina-ácido succínico

Nº S.	Serotipo- Proteína Transportadora	(%) Adsorción de conjugados de serotipo en presencia de amortiguador succínico	(%) Adsorción de conjugados de serotipo en presencia de amortiguador histidina-succínico
1	Serotipo 1_ CRM ₁₉₇	100	100
2	Serotipo 2_ CRM ₁₉₇	71	76
3	Serotipo 3_ CRM ₁₉₇	97	100
4	Serotipo 4_ DT	69	75
5	Serotipo 5_ CRM ₁₉₇	94	90
6	Serotipo 6A_ CRM ₁₉₇	85	84
7	Serotipo 6B_ CRM ₁₉₇	78	77
8	Serotipo 7F_ CRM ₁₉₇	92	85
9	Serotipo 9V_ CRM ₁₉₇	94	95
10	Serotipo 12F_ CRM ₁₉₇	76	77
11	Serotipo 14_ CRM ₁₉₇	98	97
12	Serotipo 15B_ TT	63	61
13	Serotipo 18C_ CRM ₁₉₇	55	68
14	Serotipo 19A_ CRM ₁₉₇	96	95
15	Serotipo 19F_ CRM ₁₉₇	85	91
16	Serotipo 22F_ TT	Menos de 20	20-60
17	Serotipo 23F_ CRM ₁₉₇	60	74

Conclusión:

El amortiguador de histidina-ácido succínico combinado proporciona una mejor adsorción sobre el aluminio para los serotipos 2, 3, 4, 18C, 19F y 23F en comparación con la formulación de ácido succínico (solo). La presencia de ácido succínico proporciona una estabilidad del pH a la formulación debido a su acción amortiguadora.

Comparación del porcentaje de adsorción de conjugados de serotipos individuales de formulaciones de conjugados neumocócicos 16-valente en estrategia de una y dos mezclas del proceso de formulación

- Estrategia de una mezcla: Todos los conjugados de polisacárido neumocócico-proteína se mezclaron y se adsorbieron sobre la sal de aluminio.
- Estrategia de dos mezclas:
 - a. Los conjugados de los serotipos 6A, 9V y 23F fueron adsorbidos individualmente sobre la sal de aluminio.
 - b. Los conjugados (diferentes de los conjugados de serotipo 6A, 9V y 23F) se mezclaron y se dejaron adsorber en sal de aluminio.
 - c. Mezcla de los conjugados de los pasos (a) y (b)
- Se realizaron 3 repeticiones para cada estrategia

N° S.	Serotipo	Estrategia de una mezcla % Adsorción			Estrategia de dos mezclas (reivindicado en la presente solicitud) % Adsorción		
		Exp - 1	Exp - 2	Exp - 3	Exp - 1	Exp - 2	Exp - 3
1	Serotipo 1	100	100	100	100	100	100
2	Serotipo 2	75	76	72	87	87	88
3	Serotipo 3	99	99	99	100	100	100
4	Serotipo 4	81	81	77	84	84	84
5	Serotipo 5	91	91	90	91	92	91
6	Serotipo 6A	82	82	80	90	90	89
7	Serotipo 6B	84	83	82	87	87	88
8	Serotipo 7F	85	86	81	84	85	84
9	Serotipo 9V	95	95	94	96	95	97
10	Serotipo 12F	82	82	79	86	85	86
11	Serotipo 14	100	100	100	100	100	100
12	Serotipo 15B	65	64	59	73	72	74
13	Serotipo 18C	69	66	66	78	77	79
14	Serotipo 19A	97	97	96	97	98	98
15	Serotipo 19F	91	91	90	93	94	93
16	Serotipo 23F	68	67	58	88	87	87

Conclusión:

- En la comparación entre las estrategias de una mezcla y dos mezclas, los conjugados mostraron una mejor adsorción en la sal de aluminio en la estrategia de dos mezclas.
- En la estrategia de dos mezclas se observó un porcentaje de adsorción mejorado de los serotipos 2, 6A, 15B, 18C, 19F y 23F en la sal de aluminio en comparación con el proceso de formulación de una sola mezcla de los conjugados neumocócicos 16-valente.

Comparación del porcentaje de adsorción de conjugados de serotipos individuales de formulaciones de conjugados neumocócicos 17-valente en estrategia de una y dos mezclas del proceso de formulación

- Estrategia de una mezcla: Todos los conjugados de polisacárido neumocócico-proteína se mezclaron y se adsorbieron en sal de aluminio.
- Estrategia de dos mezclas:
 - a. Los conjugados de los serotipos 6A, 9V y 23F fueron adsorbidos individualmente en sal de aluminio.
 - b. Los conjugados (diferentes de los conjugados de serotipo 6A, 9V y 23F) se mezclaron y se dejaron adsorber en sal de aluminio.
 - c. Mezcla de los conjugados de los pasos (a) y (b)
- Se realizaron 3 repeticiones repetidos para cada estrategia

N° S.	Serotipos	Estrategia de una mezcla % Adsorción			Estrategia de dos mezclas % Adsorción		
		Exp - 1	Exp - 2	Exp - 3	Exp - 1	Exp - 2	Exp - 3
1	Serotipo 1	100	90	100	100	100	100
2	Serotipo 2	76	77	76	87	87	86
3	Serotipo 3	100	100	100	100	100	100
4	Serotipo 4	77	78	78	79	79	79
5	Serotipo 5	92	92	91	91	92	90
6	Serotipo 6A	81	83	81	88	87	87
7	Serotipo 6B	82	82	83	85	86	84
8	Serotipo 7F	88	88	90	86	87	84
9	Serotipo 9V	95	96	95	97	97	96
10	Serotipo 12F	78	78	78	80	80	81
11	Serotipo 14	100	100	100	98	97	97
12	Serotipo 15B	62	64	63	67	68	64
13	Serotipo 18C	72	72	72	77	78	76
14	Serotipo 19A	97	96	96	96	96	97
15	Serotipo 19F	89	89	90	94	95	94
16	Serotipo 22F	< 20	< 20	< 20	20-60	20-60	20-60
17	Serotipo 23F	56	64	54	86	85	87

Conclusión:

La estrategia de dos mezclas mostró porcentaje de adsorción mejorado de los serotipos 2, 6A, 15B, 18C, 19F y 23F en la sal de aluminio; en comparación con el proceso de formulación de una mezcla de los conjugados neumocócicos 17-valente.

Composición precisa de la vacuna antineumocócica conjugada de polisacárido-
proteína 16-valente (con timerosal)

N° S.	Composiciones		Cantidad/dosis (0.5mL)
Ingredientes Activos*			
1	Serotipo 1	CRM ₁₉₇ (Proteína Transportadora)	2.0 µg
2	Serotipo 2	CRM ₁₉₇ (Proteína Transportadora)	2.0 µg
3	Serotipo 3	CRM ₁₉₇ (Proteína Transportadora)	2.0 µg
4	Serotipo 4	DT(Proteína Transportadora)	2.0 µg
5	Serotipo 5	CRM ₁₉₇ (Proteína Transportadora)	2.0 µg
6	Serotipo 6A	CRM ₁₉₇ (Proteína Transportadora)	2.0 µg
7	Serotipo 6B	CRM ₁₉₇ (Proteína Transportadora)	4.0 µg
8	Serotipo 7F	CRM ₁₉₇ (Proteína Transportadora)	2.0 µg
9	Serotipo 9V	CRM ₁₉₇ (Proteína Transportadora)	2.0 µg
10	Serotipo 12F	CRM ₁₉₇ (Proteína Transportadora)	2.0 µg
11	Serotipo 14	CRM ₁₉₇ (Proteína Transportadora)	2.0 µg
12	Serotipo 15B	TT(Proteína Transportadora)	2.0 µg
13	Serotipo 18C	CRM ₁₉₇ (Proteína Transportadora)	2.0 µg
14	Serotipo 19A	CRM ₁₉₇ (Proteína Transportadora)	2.0 µg
15	Serotipo 19F	CRM ₁₉₇ (Proteína Transportadora)	2.0 µg
16	Serotipo 23F	CRM ₁₉₇ (Proteína Transportadora)	2.0 µg
Ingredientes inactivos			
17	Fosfato de aluminio		0.125 mg de Al ³⁺
18	Histidina		1.55 mg
19	Ácido succínico		1.18 mg
20	Cloruro de sodio		4.5 mg
21	Polisorbato 20		50 µg
22	Tiomersal**		25 µg
24	agua para inyección		c.s. a 0.5 mL
Nota: ** Solo se agregó en la presentación de múltiples dosis.			

Composición precisa de la vacuna antineumocócica conjugada de polisacárido-
proteína 16-valente (con 2-fenoxietanol)

Nº S.	Composiciones		Cantidad/dosis (0.5 mL)
Ingredientes Activos*			
1	Serotipo 1	CRM ₁₉₇ (Proteína Transportadora)	2.0 µg
2	Serotipo 2	CRM ₁₉₇ (Proteína Transportadora)	2.0 µg
3	Serotipo 3	CRM ₁₉₇ (Proteína Transportadora)	2.0 µg
4	Serotipo 4	DT(Proteína Transportadora)	2.0 µg
5	Serotipo 5	CRM ₁₉₇ (Proteína Transportadora)	2.0 µg
6	Serotipo 6A	CRM ₁₉₇ (Proteína Transportadora)	2.0 µg
7	Serotipo 6B	CRM ₁₉₇ (Proteína Transportadora)	4.0 µg
8	Serotipo 7F	CRM ₁₉₇ (Proteína Transportadora)	2.0 µg
9	Serotipo 9V	CRM ₁₉₇ (Proteína Transportadora)	2.0 µg
10	Serotipo 12F	CRM ₁₉₇ (Proteína Transportadora)	2.0 µg
11	Serotipo 14	CRM ₁₉₇ (Proteína Transportadora)	2.0 µg
12	Serotipo 15B	TT(Proteína Transportadora)	2.0 µg
13	Serotipo 18C	CRM ₁₉₇ (Proteína Transportadora)	2.0 µg
14	Serotipo 19A	CRM ₁₉₇ (Proteína Transportadora)	2.0 µg
15	Serotipo 19F	CRM ₁₉₇ (Proteína Transportadora)	2.0 µg
16	Serotipo 23F	CRM ₁₉₇ (Proteína Transportadora)	2.0 µg
Ingredientes inactivos			
17	Fosfato de aluminio		0.125 mg de Al ³⁺
18	Histidina		1.55 mg
19	Ácido succínico		1.18 mg
20	Cloruro de sodio		4.5 mg
21	Polisorbato 20		50 µg
22	2-fenoxietanol**		5 mg
23	agua para inyección		c.s. a 0.5 mL
Nota: ** Solo se agregó en la presentación de múltiples dosis.			

Composición precisa de la vacuna antineumocócica conjugada de polisacárido-
proteína 17-valente (con timerosal)

Nº S.	Composiciones		Cantidad/dosis (0.5 mL)
Ingredientes Activos*			
1	Serotipo 1	CRM ₁₉₇ (Proteína Transportadora)	2.0 µg
2	Serotipo 2	CRM ₁₉₇ (Proteína Transportadora)	2.0 µg
3	Serotipo 3	CRM ₁₉₇ (Proteína Transportadora)	2.0 µg
4	Serotipo 4	DT(Proteína Transportadora)	2.0 µg
5	Serotipo 5	CRM ₁₉₇ (Proteína Transportadora)	2.0 µg
6	Serotipo 6A	CRM ₁₉₇ (Proteína Transportadora)	2.0 µg
7	Serotipo 6B	CRM ₁₉₇ (Proteína Transportadora)	4.0 µg
8	Serotipo 7F	CRM ₁₉₇ (Proteína Transportadora)	2.0 µg
9	Serotipo 9V	CRM ₁₉₇ (Proteína Transportadora)	2.0 µg
10	Serotipo 12F	CRM ₁₉₇ (Proteína Transportadora)	2.0 µg
11	Serotipo 14	CRM ₁₉₇ (Proteína Transportadora)	2.0 µg
12	Serotipo 15B	TT(Proteína Transportadora)	2.0 µg
13	Serotipo 18C	CRM ₁₉₇ (Proteína Transportadora)	2.0 µg
14	Serotipo 19A	CRM ₁₉₇ (Proteína Transportadora)	2.0 µg
15	Serotipo 19F	CRM ₁₉₇ (Proteína Transportadora)	2.0 µg
16	Serotipo 22F	TT (Proteína Transportadora)	2.0 µg
17	Serotipo 23F	CRM ₁₉₇ (Proteína Transportadora)	2.0 µg
Ingredientes inactivos			
18	Fosfato de aluminio		0.125 mg de Al ³⁺
19	Histidina		1.55 mg
20	Ácido succínico		1.18 mg
21	Cloruro de sodio		4.5 mg
22	Polisorbato 20		50 µg
24	Tiomersal**		25 µg
25	agua para inyección		c.s. a 0.5 mL
Nota: ** Solo se agregó en la presentación de múltiples dosis.			

Composición precisa de la vacuna antineumocócica conjugada de polisacárido-
proteína 17-valente (con 2-fenoxietanol)

N° S.	Composiciones		Cantidad/dosis (0.5 mL)
Ingredientes Activos*			
1	Serotipo 1	CRM ₁₉₇ (Proteína Transportadora)	2.0 µg
2	Serotipo 2	CRM ₁₉₇ (Proteína Transportadora)	2.0 µg
3	Serotipo 3	CRM ₁₉₇ (Proteína Transportadora)	2.0 µg
4	Serotipo 4	DT(Proteína Transportadora)	2.0 µg
5	Serotipo 5	CRM ₁₉₇ (Proteína Transportadora)	2.0 µg
6	Serotipo 6A	CRM ₁₉₇ (Proteína Transportadora)	2.0 µg
7	Serotipo 6B	CRM ₁₉₇ (Proteína Transportadora)	4.0 µg
8	Serotipo 7F	CRM ₁₉₇ (Proteína Transportadora)	2.0 µg
9	Serotipo 9V	CRM ₁₉₇ (Proteína Transportadora)	2.0 µg
10	Serotipo 12F	CRM ₁₉₇ (Proteína Transportadora)	2.0 µg
11	Serotipo 14	CRM ₁₉₇ (Proteína Transportadora)	2.0 µg
12	Serotipo 15B	TT(Proteína Transportadora)	2.0 µg
13	Serotipo 18C	CRM ₁₉₇ (Proteína Transportadora)	2.0 µg
14	Serotipo 19A	CRM ₁₉₇ (Proteína Transportadora)	2.0 µg
15	Serotipo 19F	CRM ₁₉₇ (Proteína Transportadora)	2.0 µg
16	Serotipo 22F	TT (Proteína Transportadora)	2.0 µg
17	Serotipo 23F	CRM ₁₉₇ (Proteína Transportadora)	2.0 µg
Ingredientes inactivos			
18	Fosfato de aluminio		0.125 mg de Al ³⁺
19	Histidina		1.55 mg
20	Ácido succínico		1.18 mg
21	Cloruro de sodio		4.5 mg
22	Polisorbato 20		50 µg
24	2-fenoxietanol**		5 mg
25	agua para inyección		c.s. a 0.5 mL
Nota: ** Solo se agregó en la presentación de múltiples dosis.			

Efecto del cambio de pH sobre el comportamiento de agregación de las formulaciones de la vacuna antineumocócica conjugada 17-valente (PCV-17)

N° S.	Descripciones de la formulación	% de viales rechazados debido a agregados (partículas/flóculos blancos)	
		Experimento-1	Experimento-2
1	Formulaciones de PCV-17 sin ‘cambio de pH’ (a pH 6.8)	7%	5%
2	Formulaciones de PCV-17 con ‘cambio de pH’ de pH 6,8 a pH 5,6-5,8	Experimento-3	Experimento-4
		Sin agregados (no se rechaza la prueba)	Sin agregados (no se rechaza la prueba)

Conclusión:

Los datos de agregación sugieren que el cambio en el pH afecta la agregación de antígenos en la formulación de la vacuna antineumocócica conjugada 17-valente que es la responsable final del rechazo del vial durante la revisión. Los datos confirmaron que sin cambio de pH había agregados en los viales que causaron el 5-7% de rechazo del vial, mientras que en la condición de cambio de pH no hubo agregados grandes de antígenos y, por lo tanto, no hubo rechazo del vial debido a estos agregados en la revisión.

Parámetros de la reacción de conjugación específica del serotipo para los serotipos 2, 3, 4, 12F, 15B, 18C, 22F (parte de 16-valente y 17-valente)

Detalles de Conjugación							
Parámetros de proceso de diferentes serotipos en la elaboración del conjugado							
Serotipos	2	3	4	12F	15B	18C	22F
Concentración inicial Polisacárido (mg/ml)	5	5	4	6	10	5	10
Tiempo de activación (min)	4	4	4	4	4	5	4
Relación Polisacárido:CDAP:CRM	1:0.8:1	1:0.3:1	---	1:1:0.8	---	1:1:1	---
Relación Polisacárido:CDAP:TTH	--	--	---	---	1:1:1	---	1:1:1
Relación Polisacárido:CDAP:DTTH	--	--	1:1:1	---	---	---	---

Conjugado monovalente a granel. Resultados obtenidos utilizando los parámetros del proceso anterior.							
Concentración de Polisacárido (mg/ml)	3.26	2.67	3.11	2.64	1.52	2.82	1.22
Concentración de CRM 197 (mg/ml)	1.99	3.28	--	2.54	--	2.92	--
Concentración de TT (mg/ml)	--	--	--	--	2.29	--	2.05
Concentración de DT (mg/ml)	--	--	2.44	--	--	--	--
Relación Polisacárido:CRM	1.63	0.81	--	1.04	--	0.97	--
Relación Polisacárido:TTH	--	--	--	--	0.7	--	0.6
Relación Polisacárido:DTH	--	--	1.27	--	--	--	--
pH ^a :pH ^c :pH ^q	9.5:9.5:8.1	9.5:9.5:8.1	9.5:9.5:8.1	9.5:9.5:8.1	9.5:9.5:8.1	9.5:9.5:8.1	9.5:9.5:8.1
Polisacárido libre (%)	2.55	3.9	7	18.5	1.54	15.32	< 1
Proteína libre (%)	< 2	< 2	ND	< 2	ND	< 2	ND
Peso Molecular (kDa) por MALS	6998	4818	8030	6592	8852	4803	15370

Proceso de conjugación detallado
Proceso de conjugación para el serotipo 2.

Ejemplo 1:

Se tomó 1 g de polisacárido homogeneizado para el proceso de conjugación con NaCl 2 M y concentraciones iniciales de Polisacárido de 5 mg/ml en una botella de vidrio como reactor de conjugación. pH ajustado a $8,5 \pm 0,3$ por hidróxido de sodio/ácido acético a 23 ± 3 °C antes de la activación mediada por CDAP. Para la activación de polisacárido por CDAP, se añadió una solución química de CDAP recién preparada (~ 100 mg/ml en acetonitrilo) en la proporción de polisacárido:CDAP (1:0.8) para la activación química de polisacárido con mezclado por agitador magnético. Después de completar la mezcla de CDAP bajo agitación (200-300 RPM), el pH se ajustó a 9.5 ± 0.3 usando hidróxido de sodio/ácido acético. El tiempo de activación comienza con el ajuste del pH, que fue de 4 ± 1 min.

Después de completar el tiempo de activación con las mismas condiciones de agitación y temperatura, se añadió solución de CRM al polisacárido activado en una relación de 1:1 (polisacárido:CRM197) para iniciar la reacción de conjugación. Cuando la conversión de RI/proteína es mínima (o RI > 35% y para UV > 80%), se detiene la reacción con no menos de 10 partes de glicina 2M con ajuste de pH 8.1 ± 0.3 . La reacción continuará durante no menos de 1 h y posteriormente se almacena a $2-8$ °C durante 10-20 horas de incubación durante la noche.

La purificación del conjugado comienza con una filtración por filtro de $0,45 \mu\text{m}$ antes de la etapa de purificación por filtración de flujo tangencial (TFF). Los residuos de reacción no deseados (PnPs, proteína CN-, ACN, DMAP) y los conjugados de bajo peso molecular se eliminan principalmente mediante una membrana TFF de 300 kDa (purificación primaria) con no menos de 20 conjugados por dosis de vial en una solución de NaCl al 0,9%, seguida de una diafiltración de 100 kDa como paso de purificación final utilizando pasos de proceso similares a los de la purificación primaria.

Al conjugado final purificado se agrega una solución madre de L-histidina 200 mM en NaCl al 0,9% p/v para obtener una concentración final de L-histidina de 20 mM. Se realiza la filtración final por filtro de 0.22μ (se obtiene el conjugado monovalente a granel). Se toman muestras para las pruebas de control de calidad y se almacena el granel a $2-8$ °C.

Proceso de conjugación para el serotipo 3

Ejemplo 2:

Se tomó 1 g de polisacárido homogeneizado para el proceso de conjugación con NaCl 2 M y concentraciones iniciales de polisacárido de 5 mg/ml en una botella de vidrio como reactor de conjugación. pH ajustado a $8,5 \pm 0,3$ por hidróxido de sodio/ácido acético a 23 ± 3 °C antes de la activación mediada por CDAP. Para la activación de polisacárido por CDAP, se añadió una solución química de CDAP recién preparada (~ 100 mg/ml en acetonitrilo) en la proporción de polisacárido:CDAP (1:0.3) para la activación química de polisacárido con mezclado por agitador magnético. Después de completar la mezcla de CDAP bajo agitación (200-300 RPM), el pH se ajustó a $9.5 + 0.3$ usando hidróxido de sodio/ácido acético. El tiempo de activación comienza con el ajuste del pH, que fue de 4 ± 1 min.

Después de completar el tiempo de activación con las mismas condiciones de agitación y temperatura, se añadió solución de CRM a polisacárido activado en una relación de 1:1 (polisacárido: CRM197) para iniciar la reacción de conjugación. Cuando la conversión de RI/proteína es mínima (o RI > 35% y para UV > 80%), se detiene la reacción con no menos de 10 partes de glicina 2M con ajuste de pH $8.1 + 0.3$. La reacción continuará durante no menos de 1 h y posteriormente se almacena a 2-8 °C durante 10-20 horas de incubación durante la noche.

La purificación del conjugado comienza con una filtración por filtro de 0,45 µm antes de la etapa de purificación por TFF. Los residuos de reacción no deseados (PnPs, proteína CN-, ACN, DMAP) y los conjugados de bajo peso molecular se eliminan principalmente mediante una membrana TFF de 300 kDa (purificación primaria) con no menos de 20 conjugados por dosis de vial en una solución de NaCl al 0,9%, seguida de una diafiltración de 100 kDa como paso de purificación final utilizando pasos de proceso similares a los de la purificación primaria.

Al conjugado final purificado se agrega una solución madre de L-histidina 200 mM en NaCl al 0,9% p/v para obtener una concentración final de L-histidina de 20 mM. Se realiza la filtración final por filtro de 0.22 µ (se obtiene el conjugado monovalente a granel). Se toman muestras para las pruebas de control de calidad y se almacena el granel a 2-8 °C.

Proceso de conjugación para el serotipo 12F

Ejemplo 3:

Se tomó 1 g de polisacárido homogeneizado para el proceso de conjugación con NaCl 2 M y concentraciones iniciales de polisacárido de 6 mg/ml en una botella de vidrio como

reactor de conjugación. pH ajustado a $8,5 \pm 0,3$ por hidróxido de sodio/ácido acético a 23 ± 3 °C antes de la activación mediada por CDAP. Para la activación de polisacárido por CDAP, se añadió una solución química de CDAP recién preparada (~ 100 mg/ml en acetonitrilo) en la proporción de polisacárido:CDAP (1:1) para la activación química de polisacárido con mezclado por agitador magnético. Después de completar la mezcla de CDAP bajo agitación (200-300 RPM), el pH se ajustó a 9.5 ± 0.3 usando hidróxido de sodio/ácido acético. El tiempo de activación comienza con el ajuste del pH, que fue de 4 ± 1 min.

Después de completar el tiempo de activación con las mismas condiciones de agitación y temperatura, se añadió solución de CRM al polisacárido activado en una relación de 1: 0.8 (polisacárido: CRM197) para iniciar la reacción de conjugación. Cuando la conversión de RI / proteína es mínima (o $RI > 35\%$ y para $UV > 80\%$), se detiene la reacción con no menos de 10 partes de glicina 2M con ajuste de pH 8.1 ± 0.3 . La reacción continuará durante no menos de 1 h y posteriormente se almacena a 2-8 °C durante 10-20 horas de incubación durante la noche.

La purificación del conjugado comienza con una filtración de $0,45 \mu m$ del conjugado antes de la etapa de purificación por TFF. Los residuos de reacción no deseados (PnPs, proteína CN-, ACN, DMAP) y los conjugados de bajo peso molecular se eliminan principalmente mediante una membrana TFF de 300 kDa (purificación primaria) con no menos de 20 conjugados por dosis de vial en una solución de NaCl al 0,9%, seguida de una diafiltración de 100 kDa como paso de purificación final utilizando pasos de proceso similares a los de la purificación primaria.

Al conjugado final purificado se agrega una solución madre de L-histidina 200 mM en NaCl al 0,9% p/v para obtener una concentración final de L-histidina de 20 mM. Se realiza la filtración final por filtro de 0.22μ (se obtiene el conjugado monovalente a granel). Se toman muestras para las pruebas de control de calidad y se almacena el granel a 2-8 °C.

Proceso de conjugación para el serotipo 18C

Ejemplo 4:

Se tomó 1 g de polisacárido homogeneizado para el proceso de conjugación con NaCl 2 M y concentraciones iniciales de polisacárido de 5 mg/ml en una botella de vidrio como reactor de conjugación. pH ajustado a $8,5 \pm 0,3$ por hidróxido de sodio/ácido acético a 23 ± 3 °C antes de la activación mediada por CDAP. Para la activación del polisacárido por CDAP, se añadió una solución química de CDAP recién preparada (~ 100 mg/ml en acetonitrilo) en la proporción de polisacárido:CDAP (1:1) para la activación química de polisacárido con mezclado por agitador magnético. Después de completar la mezcla de

CDAP bajo agitación (200-300 RPM), el pH se ajustó a 9.5 ± 0.3 usando hidróxido de sodio/ácido acético. El tiempo de activación comienza con el ajuste del pH, que fue de 5 ± 1 min.

Después de completar el tiempo de activación con las mismas condiciones de agitación y temperatura, se añadió solución de CRM al polisacárido activado en una relación de 1: 1 (polisacárido: CRM197) para iniciar la reacción de conjugación. Cuando la conversión de RI / proteína es mínima (o RI > 35% y para UV > 80%), se detiene la reacción con no menos de 10 partes de glicina 2M con ajuste de pH 8.1 ± 0.3 . La reacción continuará durante no menos de 1 h y posteriormente se almacena a $2-8^{\circ}\text{C}$ durante 10-20 horas de incubación durante la noche.

La purificación del conjugado comienza con una filtración de $0.45\ \mu\text{m}$ del conjugado antes de la etapa de purificación por TFF. Los residuos de reacción no deseados (PnPs, proteína CN-, ACN, DMAP) y los conjugados de bajo peso molecular se eliminan principalmente mediante una membrana TFF de 300 kDa (purificación primaria) con no menos de 20 conjugados por dosis de vial en una solución de NaCl al 0,9%, seguida de una diafiltración de 100 kDa como paso de purificación final utilizando pasos de proceso similares a los de la purificación primaria.

Al conjugado final purificado se agrega una solución madre de L-histidina 200 mM en NaCl al 0,9% p/v para obtener una concentración final de L-histidina de 20 mM. Se realiza la filtración final por filtro de $0.22\ \mu$ (se obtiene el conjugado monovalente a granel). Se toman muestras para las pruebas de control de calidad y se almacena el granel a $2-8^{\circ}\text{C}$.

Proceso de conjugación para el serotipo 15B

Ejemplo 5:

A. Activación de TT a TTH (TT activado) a escala de 2 g

Se tomaron 2 g de TT para activación y se diluyó TT a una concentración de 5,2 mg/ml usando una solución de NaCl al 0,9% v/v con agitación a 50 a 500 rpm en un reactor de vidrio. Se añadió 12.5% (v/v) de amortiguador MES 1M a pH 6.5 seguido de 1 min de mezcla. Se le agregó 9.26% (v/v) de hidracina 5M a pH 7.0 con las mismas condiciones de mezcla a $\sim 25^{\circ}\text{C}$. Finalmente, se añadió 2,03% (v/v) de solución EDC 1 M y se dejó reaccionar durante 4 h.

Después de 4 h de reacción, la reacción se detuvo mediante la adición de NaOH al 2% a la mezcla de reacción y se agitó durante 5-10 minutos. Después de esto, se realiza diafiltración utilizando membranas de 10 kDa con no menos de conjugados por dosis de vial utilizando 20% de NaCl + 0,3% de solución de Na_2CO_3 . Posteriormente, se concentró a

aproximadamente 25 mg/ml de TT activado (TTH) según el requisito del proceso de conjugación. Finalmente, se filtra el TT activado (TTH) utilizando un filtro de 0,22 mm en una botella de vidrio. Tomar las muestras de TTH concentradas y almacenar entre 2 y 8 grados centígrados.

B. Conjugación de Polisacárido con TTH

Se tomó 1 g de polisacárido homogeneizado para el proceso de conjugación con NaCl 2 M y concentraciones iniciales de polisacárido de 4 mg/ml en una botella de vidrio como reactor de conjugación. pH ajustado a $8,5 \pm 0,3$ por hidróxido de sodio/ácido acético a 23 ± 3 °C antes de la activación mediada por CDAP. Para la activación de polisacárido por CDAP, se añadió una solución química de CDAP recién preparada (~ 100 mg/ml en acetonitrilo) en la proporción de polisacárido:CDAP (1:1) para la activación química de polisacárido con mezclado por agitador magnético. Después de completar la mezcla de CDAP bajo agitación (200-500 RPM), el pH se ajustó a 9.5 ± 0.3 usando hidróxido de sodio/ácido acético. El tiempo de activación comienza con el ajuste del pH, que fue de 4 ± 1 min.

Después de completar el tiempo de activación con las mismas condiciones de agitación y temperatura, se añadió DT activado (DTH) con una solución 2 M de NaCl a polisacárido activado en la relación 1:1 (polisacárido:DTH) para iniciar la reacción de conjugación. Cuando la conversión de RI/proteína es mínima (o $RI > 35\%$ y para $UV > 80\%$), se detiene la reacción con no menos de 10 partes de glicina 2M con un ajuste de pH de 8.1 ± 0.3 . La reacción continuará durante no menos de 1 h y luego se almacena a 2-8 °C durante 10-20 horas de incubación durante la noche.

La purificación del conjugado comienza con una filtración de 0,45 µm del conjugado antes de la etapa de purificación por TFF. Los residuos de reacción no deseados (PnPs, proteína CN-, ACN, DMAP) y los conjugados de bajo peso molecular se eliminan principalmente mediante una membrana TFF de 300 kDa (purificación primaria) con no menos de 20 conjugados por dosis de vial en una solución de NaCl al 0,9%, seguida de una diafiltración de 100 kDa como paso de purificación final utilizando pasos de proceso similares a los de la purificación primaria.

Al conjugado final purificado se agrega una solución madre de L-histidina 200 mM en NaCl al 0,9% p/v para obtener una concentración final de L-histidina de 20 mM. Se realiza la filtración final por filtro de 0.22 µ (se obtiene el conjugado monovalente a granel). Se toman muestras para las pruebas de control de calidad y se almacena el granel a 2-8 °C.

Proceso de conjugación para el serotipo 22F

Ejemplo 6:

A. Activación de TT a TTH (TT activado) a escala de 2 g

Se tomaron 2 g de TT para activación y se diluyó TT a una concentración de 5,2 mg/ml usando una solución de NaCl al 0,9% v/v con agitación a 50 a 500 rpm en un reactor de vidrio. Se añadió 12.5% (v/v) de amortiguador MES 1M a pH 6.5 seguido de 1 min de mezcla. Se le agregó 9.26% (v/v) de hidracina 5M a pH 7.0 con las mismas condiciones de mezcla a ~ 25 °C. Finalmente, se añadió 2,03% (v/v) de solución EDC 1 M y se dejó reaccionar durante 4 h.

Después de 4 h de reacción, la reacción se detuvo mediante la adición de NaOH al 2% a la mezcla de reacción y se agitó durante 5-10 minutos. Después de esto, se realiza diafiltración utilizando membranas de 10 kDa con no menos de 35 conjugados por dosis de vial utilizando 20% de NaCl + 0,3% de solución de Na₂CO₃. Posteriormente, se concentró a aproximadamente 25 mg/ml de TT activado (TTH) según el requisito del proceso de conjugación. Finalmente, se filtra el TT activado (TTH) utilizando un filtro de 0,22 mm en una botella de vidrio. Tomar las muestras de TTH concentradas y almacenar entre 2 y 8 grados centígrados.

B. Conjugación de Polisacárido con TTH

Se tomó 1 g de polisacárido homogeneizado para el proceso de conjugación con NaCl 2 M y concentraciones iniciales de polisacárido de 4 mg/ml en una botella de vidrio como reactor de conjugación. pH ajustado a $8,5 \pm 0,3$ por hidróxido de sodio/ácido acético a 23 ± 3 °C antes de la activación mediada por CDAP. Para la activación de polisacárido por CDAP, se añadió una solución química de CDAP recién preparada (~ 100 mg/ml en acetonitrilo) en la proporción de polisacárido:CDAP (1:1) para la activación química de polisacárido con mezclado por agitador magnético. Después de completar la mezcla de CDAP bajo agitación (200-500 RPM), el pH se ajustó a 9.5 ± 0.3 usando hidróxido de sodio/ácido acético. El tiempo de activación comienza con el ajuste del pH, que fue de 4 ± 1 min.

Después de completar el tiempo de activación con las mismas condiciones de agitación y temperatura, se añadió TT activado (TTH) con una solución 2 M de NaCl a polisacárido activado en la relación 1:1 (polisacárido:TTH) para iniciar la reacción de conjugación. Cuando la conversión de RI/proteína es mínima (o RI > 35% y para UV > 80%), se detiene la reacción con no menos de 10 partes de glicina 2M con un ajuste de pH de 8.1 ± 0.3 . La reacción continuará durante no menos de 1 h y luego se almacena a 2-8 °C durante 10-20 horas de incubación durante la noche.

La purificación del conjugado comienza con una filtración de 0,45 µm del conjugado antes de la etapa de purificación por TFF. Los residuos de reacción no deseados (PnPs, proteína CN-, ACN, DMAP) y los conjugados de bajo peso molecular se eliminan principalmente mediante una membrana TFF de 300 kDa (purificación primaria) con no menos de 20 conjugados por dosis de vial en una solución de NaCl al 0,9%, seguida de una diafiltración de 100 kDa como paso de purificación final utilizando pasos de proceso similares a los de la purificación primaria.

Al conjugado final purificado se agrega una solución madre de L-histidina 200 mM en NaCl al 0,9% p/v para obtener una concentración final de L-histidina de 20 mM. Se realiza la filtración final por filtro de 0.22 µ (se obtiene el conjugado monovalente a granel). Se toman muestras para las pruebas de control de calidad y se almacena el granel a 2-8 °C.

Proceso de conjugación para el serotipo 4

Ejemplo 7:

A. Activación de DT a DTH (DT activado) a escala de 2 g

Se tomaron 2 g de DT para activación y se diluyó DT a una concentración de 5,2 mg/ml usando una solución de NaCl al 0,9% v/v con agitación a 50 a 500 rpm en un reactor de vidrio. Se añadió 12.5% (v/v) de amortiguador MES 1M a pH 6.5 seguido de 1 min de mezcla. Se le agregó 9.26% (v/v) de hidracina 5M a pH 7.0 con las mismas condiciones de mezcla a ~ 25 °C. Finalmente, se añadió 2,03% (v/v) de solución EDC 1 M y se dejó reaccionar durante 4 h.

Después de 4 h de reacción, la reacción se detuvo mediante la adición de NaOH al 2% a la mezcla de reacción y se agitó durante 5-10 minutos. Después de esto, se realiza diafiltración utilizando membranas de 10 kDa con no menos de 35 conjugados por dosis de vial utilizando 20% de NaCl + 0,3% de solución de Na₂CO₃. Posteriormente, se concentró a aproximadamente 25 mg/ml de DT activado (DTH) según el requisito del proceso de conjugación. Finalmente, se filtra el DT activado (DTH) utilizando un filtro de 0,22 mm en una botella de vidrio. Tomar las muestras de DTH concentradas y almacenar entre 2 y 8 grados centígrados.

B. Conjugación de Polisacárido con DTH

Se tomó 1 g de polisacárido homogeneizado para el proceso de conjugación con NaCl 2 M y concentraciones iniciales de polisacárido de 4 mg/ml en una botella de vidrio como reactor de conjugación. pH ajustado a 8,5 ± 0,3 por hidróxido de sodio/ácido acético a 23 ± 3 °C antes de la activación mediada por CDAP. Para la activación de polisacárido por CDAP, se añadió una solución química de CDAP recién preparada (~ 100 mg/ml en acetonitrilo) en la proporción de polisacárido:CDAP (1:1) para la activación química de

polisacárido con mezclado por agitador magnético. Después de completar la mezcla de CDAP bajo agitación (200-500 RPM), el pH se ajustó a 9.5 + 0.3 usando hidróxido de sodio/ácido acético. El tiempo de activación comienza con el ajuste del pH, que fue de 4 ± 1 min.

Después de completar el tiempo de activación con las mismas condiciones de agitación y temperatura, se añadió DT activado (DTH) con una solución 2 M de NaCl a polisacárido activado en la relación 1:1 (polisacárido:DTH) para iniciar la reacción de conjugación. Cuando la conversión de RI/proteína es mínima (o RI> 35% y para UV> 80%), se detiene la reacción con no menos de 10 partes de glicina 2M con un ajuste de pH de 8.1 + 0.3. La reacción continuará durante no menos de 1 h y luego se almacena a 2-8 °C durante 10-20 horas de incubación durante la noche.

La purificación del conjugado comienza con una filtración de 0,45 µm del conjugado antes de la etapa de purificación por TFF. Los residuos de reacción no deseados (PnPs, proteína CN-, ACN, DMAP) y los conjugados de bajo peso molecular se eliminan principalmente mediante una membrana TFF de 300 kDa (purificación primaria) con no menos de 20 conjugados por dosis de vial en una solución de NaCl al 0,9%, seguida de una diafiltración de 100 kDa como paso de purificación final utilizando pasos de proceso similares a los de la purificación primaria.

Al conjugado final purificado se agrega una solución madre de L-histidina 200 mM en NaCl al 0,9% p/v para obtener una concentración final de L-histidina de 20 mM. Se realiza la filtración final por filtro de 0.22 µ (se obtiene el conjugado monovalente a granel). Se toman muestras para las pruebas de control de calidad y se almacena el granel a 2-8 °C.

Ejemplo 1: Estudio de inmunogenicidad - Datos experimentales de vacunas antineumocócicas conjugadas 10-valentes preparadas por abordaje de una mezcla y abordaje de dos mezclas.

Se utilizó un ensayo multiplex con perlas para estimar los títulos de IgG

Animal: ratones Harlan NIH [rango de peso - 13-18 g]

Dosis utilizada para la inmunización: 1:10, 1:100 y 1:250 de dosis humana inyectadas por vía subcutánea.

Detalles del estudio	
Día	Immunización
Día 0	Immunización
Día 7	1er refuerzo
Día 14	2do refuerzo
Día 28	Colección de sueros para la estimación total de IgG frente a todos los serotipos.

Las formulaciones estudiadas fueron las siguientes:

Detalles de la Formulación
Vacuna Antineumocócica Conjugada 10-valente preparada por abordaje de una mezcla [Serotipos 1, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 19A, 19V, & 23F, todos conjugados a proteína transportadora CRM197]
Vacuna Antineumocócica Conjugada 10-Valente preparada por abordaje de dos mezclas [Serotipos 1, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 19A, 19V, & 23F, todos conjugados a proteína transportadora CRM197]

Resultados: Análisis del título de IgG total Día 28

Vacuna Antineumocócica Conjugada 10-valente preparada por Estrategia de Una Mezcla										
Dilución de la Vacuna (Para Inmunización)	Tipo 1	Tipo 5	Tipo 6A	Tipo 6B	Tipo 7F	Tipo 9V	Tipo 14	Tipo 19A	Tipo 19F	Tipo 23F
	Título Total de IgG									
1:10	12800	6400	1600	1600	400	25600	102400	25600	3200	400
1:100	6400	3200	200	3200	400	1600	25600	12800	800	200
1:250	10400	3200	200	200	0	1600	51200	12800	1600	0

Vacuna Antineumocócica Conjugada 10 Valente preparada por Estrategia de dos Mezclas										
Dilución de la Vacuna (Para Inmunización)	Tipo 1	Tipo 5	Tipo 6A	Tipo 6B	Tipo 7F	Tipo 9V	Tipo 14	Tipo 19A	Tipo 19F	Tipo 23F
	Título Total de IgG									
1:10	25600	6400	3200	3200	800	51200	102400	25600	6400	1600
1:100	6400	3200	400	400	400	6400	51200	6400	800	800
1:250	12800	1600	800	800	200	3200	51200	12800	800	400

Conclusión:

En la comparación de los datos de inmunogenicidad de la vacuna antineumocócica conjugada 10-valente preparada por estrategia de una mezcla y estrategia de dos mezclas:

- Los serotipos 6A, 9V y 23F mostraron una mejora significativa en los títulos para la composición preparada mediante la estrategia de dos mezclas en comparación con la composición preparada mediante la estrategia de una mezcla.

- Se encontró que la composición preparada por la estrategia de dos mezclas era superior a la composición preparada por estrategia de una mezcla para todos los serotipos.

Los resultados anteriores pueden atribuirse a la relación polisacárido a proteína utilizada durante la química de conjugación; y la adsorción individual de conjugados de los serotipos 6A, 9V y 23F, proporcionando así una adsorción mejorada en la sal de aluminio.

Ejemplo 2: Análisis de títulos de IgG total (día 28) para formulaciones 16-valente y 17-valente (ambas preparadas por estrategia de dos mezclas)

Se utilizó un ensayo multiplex con perlas para estimar los títulos de IgG

Animal: ratones Harlan NIH [rango de peso - 13-18 g]

Dosis utilizada para la inmunización: 1:10, 1:100 y 1:250 de dosis humana inyectadas por vía subcutánea.

Detalles del Estudio	
Día	Immunización
0 Día	Immunización
Día 7	1er refuerzo
Día 14	2do refuerzo
Día 28	Colección de sueros para la estimación total de IgG frente a todos los serotipos.

Las formulaciones estudiadas fueron las siguientes:
Vacuna antineumocócica conjugada 16-valente preparada por estrategia de dos mezclas [Serotipos 1, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 19A, 19V, & 23F, 2, 3, 12F, 18C conjugados a Proteína Transportadora CRM197; Serotipo 15B conjugado a Proteína Transportadora Toxoide Tetánico; Serotipo 4 conjugado a Proteína Transportadora Toxoide Diftérico]
Vacuna antineumocócica conjugada 17-valente preparada por estrategia de dos mezclas [Serotipos 1, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 19A, 19V, & 23F, 2, 3, 12F, 18C conjugados a Proteína Transportadora CRM197; Serotipo 15B & 22F conjugado a Proteína Transportadora Toxoide Tetánico; Serotipo 4 conjugado a Proteína Transportadora Toxoide Diftérico]
Pprevnar13 (Pfizer) [<i>Streptococcus pneumoniae</i> Serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, y 23F, unidos individualmente a la proteína de la difteria CRM197 no tóxica]

Resultados: Análisis del título de IgG total Día 28

Los serotipos 3, 4 y 18C en la Vacuna antineumocócica conjugada 16/17 Valente preparada mediante el método de dos mezclas se compararon con la vacuna Prevnar13.

Expt. #	Composición	Dilución de la Vacuna (Para Inmunización)	Título Total de IgG			
			Tipo 3	Tipo 4	Tipo 18C	Tipo 6A
1.1	Vacuna Antineumocócica Conjugada 17 Valente	1:10	51200	25600	12800	12800
1.2		1:100	25600	12800	800	3200
1.3		1:250	6400	6400	400	200
2.1	Vacuna Antineumocócica Conjugada 16 Valente	1:10	25600	12800	3200	12800
2.2		1:100	12800	12800	3200	6400
2.3		1:250	12800	3200	400	800
3.1	Prennar 13	1:10	25600	12800	3200	--
3.2		1:100	12800	6400	200	--
3.3		1:250	6400	3200	400	--

Conclusión:

Se observó que entre las composiciones 10-valente, 16-valente y 17-valente reclamadas en la presente invención, el serotipo 6A se potenció en la composición 16/17-valente en comparación con la composición 10-valente.

Comparación de los datos de inmunogenicidad de la vacuna antineumocócica conjugada 16/17-valente reclamada con vacuna Prennar13:

- Los serotipos 3, 4 y 18C mostraron una mejoría significativa en comparación con Prennar13.

Los resultados anteriores pueden ser atribuidos a:

- Prennar13 utiliza borohidruro de sodio (aminación reductiva) para la conjugación del polisacárido con la proteína portadora, mientras que los inventores usaron química de CDAP para la conjugación del polisacárido con la proteína portadora.
- El ajuste de tamaño del polisacárido en Prennar13 se realiza utilizando medios químicos, mientras que los inventores utilizan medios mecánicos (microfluidificación) para ajustar el tamaño de los polisacáridos.
- En el proceso reclamado, la adsorción individual de conjugados de los serotipos 6A, 9V y 23F proporciona una mejor adsorción en la sal de aluminio.
- La relación polisacárido a proteína utilizada durante la reacción de conjugación.

La composición de la vacuna Prennar13 se compone de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F, unidas individualmente a la proteína CRM197 de la toxina diftérica, mientras que la composición de la vacuna de los inventores se compone de un

serotipo 3 conjugado con CRM-197, serotipo 18C conjugado con CRM197, serotipo 4 conjugado con Toxoide Diftérico, serotipo 15B y 22F con Toxoide Tetánico.

CAPÍTULO REIVINDICATORIO MODIFICADO

(Primer Examen de Fondo)

1. Un método para la preparación de una composición de vacuna conjugada de polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae*-proteína multivalente estable, que presenta una adsorción óptima para cada conjugado y mínima agregación de conjugados, en donde dicho método comprende las siguientes etapas:

i) conjugar moléculas de polisacáridos neumocócicos derivados de *Streptococcus pneumoniae* con una proteína portadora en una relación entre 0,5 y 1,4 y a un pH entre 5,2 y 5,9 para obtener conjugados de polisacárido-proteína;

ii) adsorber individualmente conjugados de polisacárido-proteína obtenidos en la etapa i) que comprenden los serotipos 6A, 9V y 23F sobre un primer adyuvante de sal de aluminio en una solución amortiguadora de histidina-ácido succínico a una concentración entre 1mM y 200mM y a un pH entre 5,6 y 5,8, 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 composición de vacuna final;

iii) mezclar y adsorber conjugados de polisacárido-proteína obtenidos en la etapa i) que comprenden serotipos seleccionados entre 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, y 22F sobre un segundo adyuvante de sal de aluminio en una solución amortiguadora de histidina-ácido succínico a una concentración entre 1mM y 200mM y con un cambio en el pH de 6,8 a entre 5,6 y 5,8, 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 composición de vacuna final; y

iv) mezclar dicho primer conjunto adsorbido obtenido en la etapa (ii) con dicho segundo conjunto adsorbido obtenido en la etapa (iii), en presencia de un surfactante con la ayuda de un impulsor de hoja plana de una turbina de Rushton para obtener una composición de vacuna conjugada de polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae*-proteínas multivalente estable, en donde los conjugados de polisacárido de *Streptococcus pneumoniae*-proteína se elaboran usando química de conjugación de cianilación y la adsorción se encuentra en el rango de 75 – 99%, determinado mediante un ELISA sándwich.

2. El método de la Reivindicación 1, en donde la etapa i) comprende:

i) hacer reaccionar un polisacárido neumocócico que comprende un enlace fosfodiéster entre unidades repetidas unidas de manera covalente a una proteína transportadora 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 22 °C a 25 °C por un período de 4 min a 10 min, lo que da como resultado un polisacárido activado por cianato;

ii) poner en contacto el polisacárido activado por cianato con la proteína a una relación de 1:1, a un pH de 9 a 9,5, por un período de 3 h a 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.

3. El método de la Reivindicación 2, en donde el polisacárido que comprende un enlace fosfodiéster entre unidades repetidas se deriva de un serotipo 19A, 19F, 6A o 6B de *Streptococcus pneumoniae*.

4. El método de la Reivindicación 3, en donde el polisacárido es un polisacárido del serotipo 19A de *Streptococcus pneumoniae* y el agente de cianilación es tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetil-amino-piridinio mezclados en una relación de 1:1 a 22 °C por un período de 4 minutos dando como resultado un polisacárido activado por cianato.

5. El método de la Reivindicación 3, 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 a 10 minutos dando como resultado un polisacárido activado por cianato.

6. 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.

7. El método de la Reivindicación 6, en donde dicha solución amortiguadora de histidina-ácido succínico tiene una concentración de entre 10 mM y 40 mM.

8. Una composición de vacuna conjugada de polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae*-proteína multivalente estable que comprende por lo menos 10 conjugados diferentes de polisacárido de *Streptococcus pneumoniae*-proteína que tienen polisacáridos seleccionados 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, en donde al menos un conjugado de polisacárido-proteína tiene CRM197 como proteína portadora, al menos un conjugado de polisacárido-proteína tiene TT como proteína portadora, al menos un conjugado de polisacárido-proteína tiene DT como proteína portadora.

9. La composición de la Reivindicación 8, en donde el serotipo 3 está conjugado con CRM-197, el serotipo 18C está conjugado con CRM197, el serotipo 4 está conjugado con DT, el serotipo 15B está conjugado con TT, y el serotipo 22F está conjugado con TT.

10. La composición de la Reivindicación 8, en donde dicha composición comprende 10 conjugados diferentes de polisacárido de *Streptococcus pneumoniae*-proteína que tienen polisacáridos de los serotipos 1, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 19A, 19F y 23F.
11. La composición de la Reivindicación 8, en donde dicha composición comprende 16 conjugados diferentes de polisacárido de *Streptococcus pneumoniae*-proteína que tienen polisacáridos de los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F y 23F.
12. La composición de la Reivindicación 8, en donde dicha composición comprende 17 conjugados diferentes de polisacárido de *Streptococcus pneumoniae*-proteína que tienen polisacáridos de los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F y 23F.
13. El método de la Reivindicación 4 o 5, en donde dichos conjugados de polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae*-proteína tienen un contenido de polisacárido libre menor que 1,6%.
14. La composición reivindicada en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que además incluye la etapa de guardar dicha composición obtenida en un estado liofilizado, hasta la administración como una formulación de 1, 5 o 10 dosis con un diluyente que contiene gel de fosfato de aluminio y NaCl.
15. La composición reivindicada en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el conjugado de serotipo 6A de *Streptococcus pneumoniae*-CRM197 muestra una inmunogenicidad incrementada cuando se encuentra en una composición 16-valente o 17-valente.
16. Una composición de vacuna conjugada de polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae*-proteína multivalente estable que comprende 10 conjugados diferentes de polisacárido de *Streptococcus pneumoniae*-proteína que tienen polisacáridos de los serotipos 1, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 19A, 19F y 23F en donde los polisacáridos están conjugados con CRM197 como proteína portadora.

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. _____ S. _____ D. _____

Re.: Expediente No. NC2017/0012628

Solicitud de Patente de Invención titulada: “MÉTODOS PARA MEJORAR LA ADSORCIÓN DE CONJUGADOS DE POLISACÁRIDO-PROTEÍNA Y UNA FORMULACIÓN DE VACUNA MULTIVALENTE OBTENIDA CON LOS MISMOS”.

Solicitante: SERUM INSTITUTE OF INDIA PRIVATE LTD.

Nuestra Ref.: P2017/000275

RESPUESTA AL OFICIO No. 1558, NOTIFICADO EL 27 DE MARZO DE 2019
(PRIMER EXAMEN DE FONDO)

CARLOS R. OLARTE, mayor de edad y vecino de Bogotá, identificado tal como aparece al pie de mi firma, en mi carácter de apoderado de la sociedad solicitante, me permito manifestar lo siguiente ante el auto emanado por ese Despacho, dentro del plazo legal previsto en el artículo 45 de la Decisión 486, en los siguientes términos:

1. En primer lugar, con el ánimo de brindar mayor claridad a la materia reivindicada, me permito presentar un **Capítulo Reivindicatorio Modificado**, que reemplaza en su totalidad al Capítulo Reivindicatorio presentado en respuesta al examen de forma el 2 de marzo de 2018.

Así, en el Capítulo Reivindicatorio Modificado se introdujeron los siguientes cambios:

- se eliminaron las Reivindicaciones 1, 2, 6, 10, 17 y 18;
- se introdujeron las nuevas Reivindicaciones 1 a 16, las cuales encuentran soporte en el Capítulo Descriptivo, los ejemplos y en las antiguas Reivindicaciones 1 a 19 de la siguiente manera:
 - las nuevas Reivindicaciones 1 a 5, 9, 10, 13 y 14 corresponden a las antiguas Reivindicaciones 11 a 15, 8, 4, 16 y 19, respectivamente;
 - las nuevas Reivindicaciones 6 y 7 encuentran soporte en la antigua Reivindicación 9;
 - las nuevas Reivindicaciones 11 y 12 encuentran soporte en la antigua Reivindicación 5;

- la nueva Reivindicación 8 encuentra soporte en las antiguas Reivindicaciones 3 y 7;
- se adicionó el nombre del microorganismo *Streptococcus pneumoniae* a lo largo del Capítulo Reivindicatorio para indicar el origen de los polisacáridos neumocócicos reclamados.

Valga anotar que las modificaciones efectuadas en el Capítulo Reivindicatorio cumplen a cabalidad con lo estipulado en el Artículo 34 de la Decisión 486, ya que éstas de ninguna manera implican una ampliación de la protección correspondiente a la divulgación contenida en la solicitud original. Por el contrario, estas corresponden a una limitación de la materia inicialmente reivindicada.

2. a- La SIC eleva las siguientes objeciones respecto a la claridad, concisión y soporte del Capítulo Reivindicatorio:

- la Reivindicación 1 no es clara porque no reclama las etapas y condiciones del método reclamado. La SIC sugiere establecer etapas tales como adición, mezcla de componentes, adyuvantes, amortiguadores y condiciones como pH, temperatura, tiempo, etc. De igual manera, eliminar el término “uso” del ítem iv);
- las Reivindicaciones 1, 3 a 7, 11 y 12 contienen expresiones como “aproximadamente”, “por lo menos” y “una o más”, las cuales son imprecisas y no permiten distinguir la invención del estado de la técnica;
- las Reivindicaciones 1, 2 y 10 no son claras porque no definen el objeto de la solicitud porque presenta “una adsorción óptima para cada conjugado”, “en donde la adsorción se encuentra en el rango (...)”, “una adsorción individual o separada para los conjugados”, “con un cambio en pH de pH neutro a pH ácido”, “en donde la adsorción se encuentra en el rango de 75-99%”, “en donde el cambio en el pH para la solución amortiguadora (...) tiene lugar de 6,8 a un pH de entre 5,6 (...)”, “para obtener una pluralidad de distintos conjugados de polisacárido-proteína”, “para obtener una formulación estable de una vacuna antineumocócica conjugada de polisacárido-proteína multivalente”, “en donde dicho proceso de conjugación minimiza la degradación mediada por los productos secundarios (...)”, “dando como resultado un polisacárido activado por cianato” y “dicho conjugado tiene un contenido de polisacárido libre menor que 1,6%”, las cuales corresponden a resultados a alcanzar;
- las Reivindicaciones 2 a 8, 18 y 19 no son claras porque hacen referencia a una composición dependiente de la Reivindicación 1, sin embargo la

Reivindicación 1 hace referencia a un método. La SIC señala que las composiciones se deben definir por sus componentes y proporciones;

- las Reivindicaciones 3 a 5 y 11 no son claras porque hacen referencia a una selección de serotipos pero no indican de qué organismo se derivan dichos serotipos;
- la Reivindicación 3 no es concisa porque se refiere a combinaciones de “2 conjugados de polisacárido-proteína que contienen un polisacárido seleccionado entre los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9F, 9N, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 33F y 45”, sin determinar de forma concreta las respectivas combinaciones que tienen soporte;
- la Reivindicación 6 no es concisa porque reclama que “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 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”, lo cual no se considera una generalización razonable de lo que está sustentado en el Capítulo Descriptivo;
- las Reivindicaciones 3 y 6 no están enteramente sustentadas porque la combinación de 2 conjugados no tiene soporte en el Capítulo Descriptivo y tampoco todas las proteínas transportadoras reclamadas;
- las Reivindicaciones 8 a 10, 13 a 19 no están redactadas de acuerdo con la estructura: "Preámbulo - enlace gramatical - parte característica";
- las Reivindicaciones 8 a 11 no son claras porque contienen la expresión "preferiblemente", la cual no limita el alcance de las reivindicaciones;
- la Reivindicación 11 carece de claridad y concisión porque incluye términos amplios como “transportador proteico”, “amortiguador”, “un primer y un segundo conjunto de conjugados”, “un adyuvante”, etc., y expresiones imprecisas como “una relación predeterminada”, “una concentración predeterminada”, “conjunto predeterminado de conjugados”, “pluralidad de

conjugados de polisacáridoproteína”, por lo cual no permite distinguir la invención del estado de la técnica;

- la Reivindicación 11 no es clara porque hace referencia a *“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”*, lo cual no corresponde a una forma de expresión de concentración adecuada;
- la Reivindicación 12 no es clara porque hace referencia a *“polisacárido que tiene un tamaño promedio entre 130 KDa y 190 KDa”*, *“un agente de cianilación”* y un *“polisacárido activado por cianato en contacto con una proteína”*, sin definir cuáles son los polisacárido, proteínas y agentes de cianilación;
- la Reivindicación 17 no es clara porque hace referencia a la forma o la metodología como se mide o determina el producto obtenido, lo cual no corresponde a una característica técnica esencial del método;
- la composición de la Reivindicación 19 no es clara porque no está definida por sus características estructurales sino mediante su proceso de embalaje o presentación final como unidosis o multidosis lo cual es una indicación para uso.

b- i) En primer lugar, me permito llamar respetuosamente la atención de la SIC sobre las modificaciones realizadas en el Capítulo Reivindicatorio Modificado adjunto, como lo indiqué en el numeral 1 del presente memorial, en donde se eliminaron las Reivindicaciones 1, 2, 6, 10, 17 y 18, se eliminaron los términos *“uso”* y *“aproximadamente”*, se adicionó el nombre del microorganismo *Streptococcus pneumoniae* a lo largo del Capítulo Reivindicatorio para indicar el origen de los polisacáridos neumocócicos reclamados, y, como puede evidenciarse de una simple revisión, todas las reivindicaciones tienen la estructura preámbulo-frase de transición-parte caracterizante. Por lo tanto, considero completamente superadas las objeciones en relación con dichas reivindicaciones y con los términos señalados.

ii) En relación con la supuesta falta de claridad y concisión del Capítulo Reivindicatorio, me permito señalar que ahora la Reivindicación 1 reclama un *“método para la preparación de una composición de vacuna conjugada de polisacáridos de Streptococcus pneumoniae-proteínas multivalente estable, que presenta una adsorción óptima para cada conjugado y mínima agregación de conjugados”*, en donde dicho método está definido mediante una serie de etapas y las condiciones a las cuales se lleva a cabo cada una de ellas. Así, el método reclamado se encuentra correctamente definido por sus características estructurales, de tal manera que resulta completamente claro para cualquier persona medianamente versada en la materia y no genera ambigüedades en relación con los límites y el alcance de la materia reivindicada.

iii) En relación con la expresión “*por lo menos*”, presente en la Reivindicación 8, esta es clara para cualquier persona medianamente versada en la materia, en tanto su función en la reivindicación es establecer el límite mínimo que la composición debe cumplir, es decir que la invención se refiere a composiciones que comprenden un mínimo de 10 conjugados.

iv) En relación con las expresiones objetadas por la SIC por considerarlas resultados a alcanzar, me permito resaltar que tanto el Manual Andino de Patentes (MAP) como la Guía de la SIC establecen que los parámetros y los resultados a alcanzar son admitidos en las reivindicaciones siempre y cuando estén acompañados de las características técnicas que definen la invención.^{1,2} En el presente caso, el método reclamado en la Reivindicación 1 está correctamente definido mediante las etapas y condiciones en que se realiza, de tal manera que las expresiones objetadas corresponden a características técnicas que limitan aún más el alcance de la invención, puesto que el método reclamado no es cualquier método de preparación de una vacuna conjugada, sino uno que presenta una adsorción óptima para cada conjugado y mínima agregación de conjugados. Adicionalmente la expresión “*la adsorción se encuentra en el rango de 75 – 99%, determinado mediante un ELISA sándwich*”, corresponde a un parámetro del método (un valor característico de una propiedad mensurable de acuerdo con el MAP). Por lo tanto, la técnica de ELISA sándwich no corresponde a la determinación del producto obtenido, sino a la medición de los valores de un parámetro, que de acuerdo con el MAP “*deben incluirse en la reivindicación salvo cuando la persona versada en la materia técnica correspondiente conoce qué método debe ser usado o cuándo todos los métodos llegan al mismo resultado*”³, como sucede en el presente caso en donde no todos los métodos para determinar la adsorción de los conjugados de polisacárido-proteína conducen al mismo resultado.

v) En relación con las composiciones de vacuna reclamadas, ahora estas se encuentran definidas mediante su característica técnica esencial, la cual corresponde a los conjugados de *Streptococcus pneumoniae*-proteína que se encuentran comprendidos en cada composición, de tal manera que su definición es clara y concisa. Asimismo, vale la pena señalar que ahora se han definido específicamente las combinaciones de los serotipos con las proteínas portadoras correspondientes y se especifica también que los serotipos son derivados de *Streptococcus pneumoniae*, por lo que dichas composiciones resultan completamente claras para cualquier persona medianamente versada en la materia.

¹ Comunidad Andina de Naciones, Manual Andino de Patentes, 2004, Secciones 4.6.6 y 4.6.7, p. 41

² Guía para Examen de Solicitudes de Patente de Invención y Modelo de Utilidad. Superintendencia de Industria y Comercio (2014) Sección 2.6.5.8, p. 79

³ Manual Andino de Patentes. *Op Cit.* Sección 4.6.7

De igual manera, en cuanto a las expresiones “*transportador proteico*”, “*amortiguador*”, “*un primer y un segundo conjunto de conjugados*”, “*un agente de cianilación*”, “*polisacárido activado por cianato en contacto con una proteína*” cada una de ellas ahora está acompañada de las opciones correspondientes, o se reemplazó por los compuestos específicos (por ejemplo el agente de cianilación es tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetil-amino-piridinio) por lo que no resultan de manera alguna ambiguas o imprecisas.

Sin perjuicio de lo anterior, vale la pena señalar que en el presente caso, la materia reclamada en el Capítulo Reivindicatorio Modificado adjunto corresponde al concepto inventivo desarrollado por el inventor, y no debería existir obligación alguna de limitar las composiciones reivindicadas, pues esta medida reduciría injustamente el concepto inventivo a que el inventor tiene derecho. Asimismo, la posibilidad de obtener la invención en diversas modalidades es una práctica aceptada a nivel mundial en el ámbito de las patentes, ya que una patente de invención no se limita a una única modalidad, sino que cubre un concepto inventivo global que abarca diferentes modalidades (diversas materializaciones de la invención) ligadas por un efecto técnico común que finalmente delimita el alcance de la invención. Por lo tanto, no existe requerimiento alguno que determine que los ejemplos deban ilustrar todos y cada uno de los compuestos o composiciones que se encuentran dentro del alcance de la invención, o que las reivindicaciones sólo pueden reclamar lo ilustrado en los ejemplos, ya que lo fundamental es que el Capítulo Descriptivo proporcione la información necesaria para que la persona medianamente versada en la materia pueda reproducir la invención, sin tener que acudir a experimentación adicional excesiva. Además, vale la pena recordarle a la SIC que la función de los Ejemplos en el Capítulo Descriptivo es **estrictamente ilustrativa** y de ninguna manera puede considerarse como el único alcance reivindicable posible. De hecho, reclamar estrictamente aquello ejemplificado en el Capítulo Descriptivo limita injustamente el alcance de la protección a la cual el inventor tiene derecho, de tal forma que para que existiera una infracción, dichos elementos específicos ilustrados en los ejemplos deberían necesariamente estar presentes en el producto o proceso infractor, lo que fácilmente podría lograrse al tratarse de elementos que pueden ser cambiados o modificados.

vi) En cuanto a la concentración del adyuvante de sal de aluminio, respetuosamente difiero de la opinión de la SIC, cuando señala que “*un rango entre 20 - 375µg por 0,5 ml de dosis de la formulación*” no corresponde a una forma adecuada de expresar dicha concentración, puesto que la concentración expresa la proporción que existe entre el soluto y el solvente en una solución química y cualquier persona medianamente versada en la materia comprendería que una cantidad de soluto expresada en unidades de peso, en relación a un volumen dado, es una expresión de concentración correcta, sin importar si esta se refiere a la unidad de volumen, puesto que con una simple operación matemática es posible llegar a la misma. En el presente caso, una concentración de 20µg

por 0,5 ml de dosis de la formulación equivale a 40µg/ml, con lo que sin importar cuál sea el volumen de la dosis o el número de dosis de la composición, la concentración siempre será la misma. De igual manera 375µg por 0,5ml equivale a una concentración de la solución de 750µg/ml. Así, la concentración de la sal de aluminio está entre 40µg/ml y 750µg/ml, lo cual es completamente claro para cualquier persona medianamente versada en la materia.

Por consiguiente, para el presente caso, la persona medianamente versada en la materia se encuentra en total capacidad de comprender el alcance de la invención, pues notaría que éste se encuentra dentro de la materia divulgada en el Capítulo Descriptivo y sería capaz de reproducir la materia reclamada sin acudir a experimentación adicional excesiva.

vii) Así, a la luz de las modificaciones y argumentos planteados anteriormente, considero que el Capítulo Reivindicatorio Modificado adjunto cumple con los requisitos de claridad y concisión establecidos en la Decisión 486, permitiéndole a la persona medianamente versada en la materia comprender inequívocamente el alcance de la materia reclamada para reproducirla sin recurrir a experimentación adicional excesiva.

3. a- La SIC establece que las reivindicaciones carecen de unidad de invención *a posteriori*, puesto que el concepto común a todas las reivindicaciones son composiciones de vacuna anti-neumocócica conjugada multivalente, el cual se encuentra anticipado por los documentos US2010209450 (D1), WO2007071786, US2014377302. Así, la SIC identifica dos grupos inventivos a saber:

- **Grupo I. Reivindicaciones 1, 2, 3 a 8, 9 a 11, 18 y 19.** Método para la preparación de una formulación de vacuna anti-neumocócica conjugada de polisacáridos-proteína multivalente estable que previene la agregación, y composición de vacuna anti-neumocócica conjugada multivalente que comprende polisacáridos de serotipo escogido entre 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.
- **Grupo II. Reivindicaciones 12 a 17.** Método para reducir la agregación de polisacárido-polisacárido en reacciones de reducción y conjugación mediante un agente de cianilación.

b- i) En relación con la unidad de invención, llamo respetuosamente la atención de la SIC sobre el Capítulo Reivindicatorio Modificado adjunto, el cual reclama un método de preparación de una composición de vacuna conjugada de polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae*-proteínas multivalente estable, en donde en particular se realiza una adsorción individual de los serotipos 6A, 9V y 23F sobre la sal de aluminio; una adsorción combinada de conjugados de otros serotipos de *Streptococcus pneumoniae*; una

solución amortiguadora de histidina-ácido succínico de pH 5,8; una relación de polisacárido a proteína de entre 0,5 y 1,4 durante la conjugación y se emplea un impulsor de hoja plana de una turbina de Rushton para obtener una composición estable de vacuna antineumocócica conjugada. La combinación de los elementos anteriores proporciona la ventaja de una mínima agregación de los conjugados de polisacárido-proteína en la formulación, una adsorción mejorada sobre la sal de aluminio, estabilidad y una mejor inmunogenicidad del producto final.

Las Reivindicaciones 1 a 7 y 13 del Capítulo Reivindicatorio Modificado adjunto reclaman el método de preparación de la composición multivalente de conjugados de polisacáridos neumocócicos-proteína y las Reivindicaciones 8 a 12 y 14 a 16 reclaman la composición multivalente de conjugados de polisacáridos neumocócicos-proteína. La etapa i) de la Reivindicación 1 de la presente solicitud reclama la conjugación de los polisacáridos neumocócicos a una proteína transportadora, las Reivindicaciones 2 a 7 reclaman los parámetros durante la reacción de conjugación. Por todo lo anterior, la materia reclamada en el Capítulo Reivindicatorio Modificado adjunto reviste unidad de invención dado que se reclama un único concepto inventivo, el cual, adicionalmente no se encuentra sugerido o divulgado en los documentos citados por la SIC.

4. a- La SIC señala que las patentes D1 y US2011195086 (D2) anticipan cada una de manera independiente el objeto de la Reivindicación 3, por lo que ésta no tiene novedad.

La SIC indica que D1 hace referencia a una composición inmunogénica antineumocócica conjugada multivalente que comprende por lo menos dos conjugados que contienen serotipos iguales a los reclamados en la presente invención. Asimismo, la SIC argumenta que las Reivindicaciones 4 y 5 reclaman una composición de vacuna antineumocócica conjugada multivalente en donde dicha composición comprende por lo menos 10 o 16 serotipos, lo cual está anticipado por D1 ya que enseña una composición que puede ser de 10 valencias (10 serotipos) o 16 valencias (16 serotipos) los cuales son escogidos de los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 14, 15, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 33F. Adicionalmente, la SIC señala que D1 menciona 2 o más proteínas transportadoras seleccionadas entre proteína D, proteína DT, proteína TT o CRM-197 lo cual anticipa el objeto de las Reivindicaciones 6 y 7.

Por otra parte, la SIC señala que D2 anticipa las características de la Reivindicación 3 porque hace referencia a una composición inmunogénica antineumocócica conjugada multivalente que comprende polisacáridos de *S. pneumoniae* conjugados que contiene serotipos escogidos entre 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F o 33F tal como los reclamados en la presente invención. De la misma forma, la SIC argumenta que la Reivindicación 4 reclama una composición de vacuna antineumocócica conjugada

multivalente en donde dicha composición comprende por lo menos 10 serotipos, lo cual se encuentra divulgado en D2. Adicionalmente, según la SIC D2 también menciona que los polisacáridos están conjugados específicamente con la proteína transportadora CRM-197 lo cual anticipa el objeto de la Reivindicación 6.

b- i) En respuesta a la objeción de la SIC, en primer lugar me permito señalar que las Reivindicaciones 8 a 12 y 14 a 16 de la presente invención se refieren a composiciones de vacuna 10, 16 y 17-valente de conjugados de polisacáridos neumocócicos-proteína, donde el serotipo 4 se conjuga con DT, el 18C se conjuga con CRM197, el 15B se conjuga con TT, el 22F se conjuga con TT y el resto de serotipos se conjugan con CRM197. El Capítulo Reivindicatorio Modificado adjunto también reclama un método para la preparación de una composición de vacuna conjugada de polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae*-proteínas multivalente estable, que presenta una adsorción óptima para cada conjugado y mínima agregación de conjugados, mejora la estabilidad y la inmunogenicidad del producto final.

ii) Ahora bien, considerando las modificaciones realizadas en el Capítulo Reivindicatorio, me permito referirme a las diferencias que existen entre la materia ahora reivindicada y el arte previo citado por la SIC:

- D1 enseña vacunas neumocócicas conjugadas que comprenden 10 o más sacáridos capsulares de serotipos de *S. pneumoniae* conjugados con 2 o más proteínas transportadoras, en donde el serotipo 19F se conjuga con toxoide diftérico y los demás sacáridos capsulares de serotipos de *S. pneumoniae* se conjugan con proteína D.
- La vacuna reclamada comprende sacáridos capsulares de serotipo 19F de *S. pneumoniae* conjugados con CRM197 (no con toxoide diftérico como se enseña en D1); adicionalmente, la presente invención no reclama polisacáridos capsulares de serotipos de *S. pneumoniae* conjugados con proteína D.
- La vacuna reclamada comprende los serotipos 3 y 18C conjugados con CRM197; serotipo 22 con TT y serotipo 4 conjugado con DT.
- En D1 la neutralización de la reacción de conjugación se lleva a cabo a un pH de 9,0, mientras que en la presente invención se hace a un pH de 8,1.
- La presente invención reclama la adsorción individual de conjugados de los serotipos 6A, 9V y 23F de *S. pneumoniae* sobre sal de aluminio y una solución amortiguadora de histidina-ácido succínico en la formulación, una relación de polisacárido a proteína de entre 0,5 y 1,4 durante la conjugación, y el uso de un impulsor de turbina tipo Rushton durante la formulación. Para una composición neumocócica 10-valente, D1 enseña una relación de polisacárido:CRM en el rango

de 0,5 a 2,5, mientras que la solicitud emplea una relación de polisacárido a proteína en el rango de 0,7 a 1,05.

- Más aún, el conjugado del serotipo 19A sufre degradación en presencia de DMAP, la cual se evita mediante la relación modificada de polisacárido a CDAP de la presente invención, tal como se puede observar en el Ejemplo 10. La relación óptima de polisacárido:CDAP:proteína transportadora utilizada en la presente invención proporciona conjugados estables y reduce la despolimerización dependiente de DMAP que causa la agregación del producto final. Asimismo, dicha relación también evita una etapa adicional de diafiltración.
- D1 divulga el uso de un enlazador para el serotipo 22F el cual aumenta la inmunogenicidad. Específicamente D1 enseña que el uso de 22F-AH PhtD induce una respuesta IgG significativamente más alta en comparación con 22F-PhtD. La presente invención por el contrario no requiere un enlazador para inducir la inmunogenicidad requerida.

iii) En relación con D2, este divulga polisacáridos capsulares elaborados a partir de diferentes serotipos de *S. pneumoniae* (1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F o 33F) conjugados con una proteína transportadora, preferiblemente CRM197.

- D2 no divulga polisacáridos capsulares de los serotipos 2, 12F y 15B.
- D2 enseña que todos los polisacáridos se conjugan con CRM197 y no enseña las combinaciones específicas de polisacárido-proteína que se reclaman en la presente invención: serotipo 3 de *Streptococcus pneumoniae* conjugado con CRM197, serotipo 18C conjugado con CRM197, serotipo 4 conjugado con DT, serotipo 15B conjugado con TT y serotipo 22F conjugado con TT.
- D2 no divulga el uso de una solución amortiguadora de histidina-ácido succínico en la formulación.
- D2 no divulga la adsorción individual de los conjugados de serotipos 6A, 9V y 22F de *Streptococcus pneumoniae* sobre la sal de aluminio.
- D2 no divulga el uso de un impulsor de turbina tipo Rushton durante la formulación.

iii) En este punto me permito resaltar que para fundamentar una afectación válida contra la novedad de una invención, el MAP exige que el arte previo divulgue **explícitamente** todas y cada una de las características de la invención.⁴ Adicionalmente, el Tribunal Andino de Justicia (TAJ) ha determinado que para establecer una objeción de novedad válida, la “divulgación debe ser **detallada y, en todo caso,**

⁴ Manual Andino de Patentes, *op. cit.*, Sección 9.4

suficiente para que una persona del oficio pueda utilizar esa información para ejecutar o explotar la invención”⁵.

Como se demostró anteriormente, ninguno de los documentos citados por la SIC divulga todas y cada una de las características técnicas del método o la composición reclamados en la presente invención, por lo que la materia reclamada en el Capítulo Reivindicatorio Modificado adjunto es novedosa.

5. Ahora bien, con el fin de dar mayor claridad sobre las características esenciales de la invención y las ventajas técnicas que éstas le confieren, vale la pena resaltar que el método reclamado se refiere específicamente a la reducción o prevención de la agregación de conjugados en la composición final, lo cual se logra mediante los siguientes parámetros:

- El método emplea una relación de polisacárido a proteína entre 0,5 y 1,4 durante la reacción de conjugación, lo cual previene la hidrólisis de los polisacáridos a lo largo de la conjugación.
- El método emplea la adsorción individual de conjugados particulares sobre el adyuvante de sal de aluminio, es decir, los conjugados de los serotipo s 6A, 9V y 23F, que de otra manera muestran una adsorción relativamente baja sobre el adyuvante de sal de aluminio en presencia de serotipos seleccionados entre 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, y 22F;
- La relación específica de polisacárido:CDAP:proteína transportadora proporciona conjugados estables y reduce la despolimerización dependiente de DMAP que es causa de la agregación del producto final.
- La neutralización de la reacción de conjugación se realiza a un pH de 8,1.
- El método emplea adsorción combinada de conjugados de *S. pneumoniae* seleccionados entre los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, y 22F sobre el adyuvante de sal de aluminio.
- El método emplea una solución reguladora de histidina-ácido succínico a un pH de 5,8 para la formulación de la vacuna conjugada de *S. pneumoniae*.
- El método emplea un impulsor de turbina tipo Rushton en el recipiente de formulación.

La combinación de todos los anteriores elementos proporciona la ventaja de una mínima agregación de los conjugados en la formulación y una adsorción mejorada sobre la sal de aluminio, estabilidad y mejor inmunogenicidad del producto final.

⁵ Proceso 06-IP-89 (<http://intranet.comunidadandina.org/Documentos/Procesos/209-IP-2005.doc>) y Proceso 36-IP-2004 (<http://www.notinet.com.co/serverfiles/servicios/archivos/30jul04/ca36-04.htm>)

Adicionalmente, y con el único fin de evidenciar de manera rápida las ventajas de la presente invención, me permito radicar adjunto al presente escrito el Anexo 1, en el que se incluyen los datos experimentales adicionales que demuestran dichas ventajas técnicas y que describo a continuación:

i) En primer lugar, la solución amortiguadora de histidina-ácido succínico mejoró la adsorción de los serotipos 2, 3, 4, 9V, 12F, 18C, 19F, 22F y 23F (ejemplo con la composición 17-valente). En particular, el serotipo 22F, que presentó un porcentaje de adsorción sobre la sal de aluminio menor de 20% en presencia de ácido succínico, presentó un porcentaje de adsorción de hasta 60% en presencia del amortiguador de histidina-ácido succínico. De esta manera, la solución amortiguadora de histidina-ácido succínico permite una mejor adsorción de los conjugados sobre la sal de aluminio, en comparación con la solución de ácido succínico, con lo cual las composiciones multivalentes son más estables ya que se reduce la formación de agregados.

ii) Adicionalmente, el cambio de pH de 6,8 a entre 5,6 y 5,8 permitió reducir el porcentaje de viales rechazados por presencia de agregados (en forma de partículas o flóculos) de la composición de vacuna 17-valente, de entre 5 a 7% a 0.

iii) Ahora bien, la estrategia de dos mezclas, donde los conjugados de los serotipos 6A, 9V y 23F fueron adsorbidos individualmente en sal de aluminio y posteriormente se mezclaron con los demás conjugados adsorbidos sobre la sal de aluminio, mostró porcentajes de adsorción mejorados para los serotipos 2, 3, 4, 6A, 6B, 12F, 15B, 18C, 19A, 19F, y 23F, tanto para la composición 16-valente como para la 17-valente. De igual manera, el conjugado 22F en la composición 17-valente con la estrategia de dos mezclas pasó de tener un porcentaje de adsorción de 20%, hasta un 60%. Estos resultados, sumados a los obtenidos con la solución amortiguadora de histina-ácido succínico y el cambio de pH (características esenciales del método reclamado), demuestran que dicho método para la preparación de vacunas conjugadas 10, 16 y 17-valentes de *S. pneumoniae*-proteína, permite obtener composiciones más estables debido a que la adsorción de los conjugados sobre la sal de aluminio se mejora y por lo tanto la formación de agregados se reduce sustancialmente.

iv) Finalmente, las composiciones de vacuna 16 y 17-valente obtenidas mediante el método de la invención se compararon con la vacuna Prevnar 13®, encontrándose que los títulos de IgG obtenidos son de hasta el doble de los obtenidos con dicha vacuna. Lo anterior se puede atribuir tanto a la disminución de la formación de agregados, como a la relación de polisacárido a proteína utilizada durante la reacción de conjugación.

Todo lo anterior conduce a que las composiciones de vacuna obtenidas mediante el proceso reclamado sean más estables y tengan mejor inmunogenicidad debido a que las etapas del proceso permiten obtener conjugados con adsorción mejorada sobre la sal de aluminio y una relación de polisacárido a proteína que incrementa la inmunogenicidad de las composiciones multivalentes aquí reclamadas.

6. Por todo lo anterior, considero que las objeciones presentadas por la SIC en su primer examen de fondo han sido resueltas y por consiguiente solicito respetuosamente que el Despacho tenga por cumplidos los requisitos de patentabilidad y proceda con la concesión de la patente.

Atentamente,



CARLOS R. OLARTE

C.C. No. 79.782.747 de Bogotá

T.P. 74.295

Anexos:

- Capítulo Reivindicatorio Modificado;
- Anexo 1 - Datos Experimentales Adicionales