

CAPÍTULO REIVINDICATORIO MODIFICADO

(Segundo 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 transportadora 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 10mM y 40mM 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 10mM y 40mM 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 a 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 tiene un tamaño promedio entre 130 KDa y 190 KDa y comprende un enlace fosfodiéster entre unidades repetidas unidas de manera covalente a una proteína transportadora seleccionada del grupo que consiste en CRM197, DT y TT, con un agente de cianilación que es tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetil-amino-piridinio (CDAP) a una relación de entre 1:0,8 y 1:1 a 22 °C a 25 °C por un periodo de 4 min a 10 min, lo que da como resultado un polisacárido activado por cianato; y

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.

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. 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 transportadora, al menos un conjugado de polisacárido-proteína tiene toxoide tetánico (TT) como proteína transportadora, y al menos un conjugado de polisacárido-proteína tiene toxoide de difteria (DT) como proteína transportadora;

en donde los serotipos 6A, 9V y 23F se adsorben individualmente sobre un adyuvante de aluminio, los serotipos seleccionados entre 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F y 22F se mezclan y adsorben sobre un adyuvante de aluminio, y la adsorción se encuentra en el rango de 75 a 99% y;

en donde dicha composición tiene una solución amortiguadora de histidina-ácido succínico a una concentración entre 10mM y 40mM.

7. La composición de la Reivindicación 6, 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.

8. La composición de la Reivindicación 6, 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;

en donde los polisacáridos están conjugados con CRM197 como la proteína transportadora;

en donde los serotipos 6A, 9V y 23F se adsorben individualmente sobre un adyuvante de aluminio, los serotipos seleccionados entre 1, 5, 6B, 7F, 14, 19A y 19F se mezclan y adsorben sobre un adyuvante de aluminio, y la adsorción se encuentra en el rango de 75 a 99% y;

en donde dicha composición tiene una solución amortiguadora de histidina-ácido succínico a una concentración entre 10mM y 40mM.

9. La composición de la Reivindicación 6, 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;

en donde el serotipo 3 está conjugado con CRM197, el serotipo 18C está conjugado con CRM197, el serotipo 4 está conjugado con DT y el serotipo 15B está conjugado con TT.

10. La composición de la Reivindicación 6, 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;

en donde el serotipo 3 está conjugado con CRM197, 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.

11. 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%.

12. La composición de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 6 a 10, que existe en un estado liofilizado, y que además comprende un diluyente que contiene gel de fosfato de aluminio y NaCl.

13. 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 transportadora.

14. Una composición de vacuna conjugada de polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae*-proteína multivalente estable que 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; en donde:

la conjugación del serotipo 3 con CRM197, del serotipo 18C con CRM197 y del serotipo 4 con DT se lleva a cabo usando el agente de cianilación tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetil-amino-piridinio (CDAP);

los conjugados polisacárido-proteína que comprenden serotipos 6A, 9V y 23F se adsorben individualmente sobre una primera sal de aluminio; y

los conjugados polisacárido-proteína que comprenden serotipos seleccionados de 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F y 22F se mezclan y adsorben sobre un segundo adyuvante de sal de aluminio.
