

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 848 048**

51 Int. Cl.:

A61K 39/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.10.2013 E 18214396 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.11.2020 EP 3482770**

54 Título: **Composiciones inmunogénicas**

30 Prioridad:

03.10.2012 US 201261744880 P
15.03.2013 US 201361799123 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.08.2021

73 Titular/es:

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (100.0%)
Rue de l'Institut, 89
1330 Rixensart, BE

72 Inventor/es:

GRANDI, GUIDO;
MARGARIT Y ROS, IMMACULADA y
MAIONE, DOMENICO

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 848 048 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones inmunogénicas

Campo técnico

5 La presente invención pertenece al campo de las composiciones inmunogénicas que comprenden conjugados de sacáridos capsulares de *Streptococcus agalactiae* y vehículos proteicos. Las composiciones son útiles para la inmunización.

Antecedentes de la técnica

10 Los sacáridos capsulares de bacterias se han usado durante muchos años en vacunas contra bacterias encapsuladas. Dado que los sacáridos son antígenos independientes de los linfocitos T, sin embargo, son poco inmunogénicos. La conjugación con un vehículo puede convertir a los antígenos independientes de los linfocitos T en antígenos dependientes de los linfocitos T, mejorando así las respuestas de memoria y permitiendo el desarrollo de inmunidad protectora. Las vacunas de sacáridos más eficaces se basan, por tanto, en glicoconjugados, y la vacuna de conjugado prototipo era contra *Haemophilus influenzae* de tipo b ('Hib') [por ejemplo, véase el capítulo 14 de "Vaccines" (2004), editores Plotkin y Orenstein. ISBN 0-7216-9688-0].

15 Otra bacteria para la que se han descrito vacunas de conjugado es *Streptococcus agalactiae*, también conocido como "estreptococo del grupo B", o simplemente como "GBS". La mayor parte de este trabajo ha sido realizado por Dennis Kasper y colaboradores, y se describe en documentos tales como las referencias 1 a 9. Se ha demostrado que las vacunas de conjugado para cada uno de los serotipos Ia, Ib, II, III y V de GBS son seguras e inmunogénicas en seres humanos [10 y 11]. Sin embargo, sigue existiendo la necesidad de vacunas de conjugado de GBS adicionales y mejoradas.

Divulgación de la invención

25 La invención proporciona una composición inmunogénica que comprende: i) un sacárido capsular de serotipo Ia de GBS conjugado con un vehículo proteico; ii) un sacárido capsular de serotipo Ib de GBS conjugado con un vehículo proteico; iii) un sacárido capsular de serotipo III de GBS conjugado con un vehículo proteico; iv) un sacárido capsular de serotipo V de GBS conjugado con un vehículo proteico; y v) un sacárido capsular de serotipo II de GBS conjugado con un vehículo proteico.

30 Por lo general, la composición inmunogénica no comprenderá ningún conjugado distinto de los que se mencionan específicamente, en particular, conjugados que comprenden sacáridos capsulares de serotipos de GBS distintos de los que se mencionan específicamente. Sin embargo, en algunas realizaciones, las composiciones pueden comprender otros conjugados, incluyendo conjugados que comprenden sacáridos capsulares de otros serotipos de GBS. Por ejemplo, las composiciones pueden comprender un conjugado que sea un sacárido capsular de serotipo VI de GBS conjugado con un vehículo proteico. En otra posibilidad, las composiciones pueden comprender un conjugado que sea un sacárido capsular de serotipo VIII de GBS conjugado con un vehículo proteico.

35 Las composiciones inmunogénicas descritas anteriormente pueden comprender cualquier cantidad adecuada del/de los sacárido/s capsulares por dosis unitaria. Las cantidades adecuadas de sacárido/s capsular/es pueden ser de 0,1 a 50 µg por dosis unitaria. Por lo general, cada sacárido capsular de GBS está presente en una cantidad de 1 a 30 µg, por ejemplo de 2 a 25 µg y, en particular, de 5 a 20 µg. Las cantidades adecuadas de sacárido/s capsular/es pueden incluir 5, 10 y 20 µg por dosis unitaria.

40 Puede ser posible reducir aún más al mínimo la cantidad de sacárido/s capsular/es por dosis unitaria. En particular, las cantidades adecuadas de sacárido/s capsular/es pueden ser de 0,1 a 5 µg por dosis unitaria. Por lo general, por lo tanto, cada sacárido capsular de GBS puede estar presente en una cantidad de 0,1 a 5 µg, por ejemplo, de 0,5, 2,5 o 5 µg, por dosis unitaria. Por ejemplo, cada sacárido capsular de GBS puede estar presente en una cantidad de 0,5 a 5 µg, de 1 a 4 µg, de 2 a 3 µg o de aproximadamente 2,5 µg por dosis unitaria.

45 En las realizaciones descritas anteriormente, en las que la composición inmunogénica comprende más de un conjugado, la proporción de la masa de un sacárido capsular dado con respecto a la masa del/de los otro/s sacárido/s capsular/es puede variar. Sin embargo, normalmente, la proporción de las masas de los sacáridos capsulares de serotipo Ia, Ib, II, III y V de GBS son 1:1:1:1:1.

50 A continuación, se analizan los procedimientos para administrar las composiciones inmunogénicas de la invención. En resumen, las composiciones inmunogénicas de la invención pueden administrarse en monodosis o multidoses. La administración de una sola dosis de las composiciones inmunogénicas de la invención es eficaz. Por lo tanto, en la invención, se prefiere la administración de una sola dosis, en particular, para estas realizaciones.

Como alternativa, puede ser eficaz una dosis unitaria seguida de una segunda dosis unitaria. Por lo general, la segunda (o tercera, cuarta, quinta, etc.) dosis unitaria es idéntica a la primera dosis unitaria. La segunda dosis unitaria puede administrarse en cualquier momento adecuado después de la primera dosis unitaria, en particular, después de 1, 2 o

3 meses. Por ejemplo, la segunda dosis unitaria puede administrarse 3 meses después de la primera dosis unitaria. En otro ejemplo, la segunda dosis unitaria puede administrarse 1 mes después de la primera dosis unitaria. Por lo general, las composiciones inmunogénicas de la invención se administrarán por vía intramuscular, por ejemplo, mediante administración intramuscular en el muslo o en la parte superior del brazo como se describe a continuación.

- 5 Como se describe a continuación, las composiciones inmunogénicas de la invención pueden incluir uno o más adyuvantes. Sin embargo, también puede ser eficaz el uso de composiciones no adyuvantes. Puede ser ventajoso omitir adyuvantes para reducir la posible toxicidad. Por consiguiente, las composiciones inmunogénicas que no contienen ningún adyuvante (en especial, que no contienen ningún adyuvante de sal de aluminio) son preferidas para su uso en la invención, en particular, para estas realizaciones.

10 **El sacárido capsular**

La invención se basa en el sacárido capsular de *Streptococcus agalactiae*. El sacárido capsular está unido covalentemente a la cadena principal de peptidoglicano de GBS, y es distinto del antígeno del grupo B, que es otro sacárido que está unido a la cadena principal de peptidoglicano.

- 15 Los sacáridos capsulares de GBS están relacionados químicamente, pero son muy diferentes desde un punto de vista antigénico. Todos los polisacáridos capsulares de GBS comparten el siguiente núcleo de trisacárido:



- 20 Los distintos serotipos de GBS difieren en la forma en que se modifica este núcleo. La diferencia entre los serotipos Ia y III, por ejemplo, surge del uso de GlcNAc (Ia) o Gal (III) en este núcleo para unir núcleos de trisacáridos consecutivos. Los serotipos Ia e Ib tienen un disacárido [$\alpha\text{-D-NeupNAc}(2\rightarrow3)\beta\text{-D-Galp}(1\rightarrow)$] unido a GlcNAc en el núcleo, pero el enlace es bien $1\rightarrow4$ (Ia) o $1\rightarrow3$ (Ib).

- 25 La enfermedad relacionada con GBS surge principalmente de los serotipos Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII y VIII, estando más del 85 % causada por cinco serotipos: Ia, Ib, III y V. La invención usa preferentemente un sacárido de uno o más de estos cuatro serotipos, en particular, de uno o más de los serotipos: Ia, Ib y III. Los sacáridos capsulares de cada uno de estos cuatro serotipos incluyen: (a) un resto terminal de ácido N-acetil-neuramínico (NeuNAc) (comúnmente denominado ácido siálico), que, en todos los casos, está enlazado $2\rightarrow3$ a un resto de galactosa; y (b) un resto de N-acetil-glucosamina (GlcNAc) dentro del núcleo de trisacárido.

Los cuatro sacáridos incluyen restos de galactosa dentro del núcleo de trisacárido, pero los serotipos Ia, Ib, II y III también contienen restos adicionales de galactosa en cada unidad de repetición.

- 30 El sacárido puede modificarse químicamente en relación con el sacárido capsular como se encuentra en la naturaleza. Por ejemplo, el sacárido puede estar des-O-acetilado (parcial o totalmente), des-N-acetilado (parcial o totalmente), N-propionato (parcial o totalmente), etc. La desacetilación puede ocurrir antes, durante o después de la conjugación, pero preferentemente ocurre antes de la conjugación. Dependiendo del sacárido en particular, la desacetilación puede o no afectar a la inmunogenicidad. La relevancia de la O-acetilación en los sacáridos de GBS en distintos serotipos se analiza en la referencia 12, y en algunas realizaciones, la O-acetilación de restos de ácido siálico en las posiciones 7, 8 y/o 9 se retiene antes, durante y después de la conjugación, por ejemplo, mediante protección/desprotección, mediante reacetilación, etc. Sin embargo, normalmente, el sacárido de GBS usado en la presente invención no tiene esencialmente ninguna O-acetilación de restos de ácido siálico en las posiciones 7, 8 y/o 9. En particular, cuando el sacárido de GBS se ha purificado mediante extracción de bases como se describe a continuación, entonces la O-acetilación normalmente se pierde (ref. 12). El efecto de la desacetilación, etc. puede evaluarse mediante ensayos de rutina. El sacárido capsular de serotipo V puede modificarse como se describe en las ref. 13 y 14. Por ejemplo, puede ser útil un sacárido capsular del serotipo V que prácticamente está desialilado como se describe en las ref. 13 y 14. El sacárido capsular de serotipo V de GBS desialilado puede prepararse tratando el sacárido capsular de serotipo V de GBS purificado en condiciones ligeramente ácidas (por ejemplo, ácido sulfúrico 0,1 M a 80 °C durante 60 minutos) o mediante tratamiento con neuraminidasa, como se describe en la referencia 13. Un procedimiento preferido para preparar el sacárido capsular de serotipo V de GBS desialilado es mediante el tratamiento del sacárido purificado con ácido acético 1 M a 81 °C +/- 3 °C durante 2 h.

- 50 En particular, el grado de oxidación del ácido siálico del polisacárido capsular del serotipo V de GBS es inferior al 40 %, inferior al 25 %, inferior al 20 %, inferior al 17 %, inferior al 15 %, inferior al 10 %, por ejemplo, aproximadamente del 12 %, aproximadamente del 9 %, aproximadamente del 8 %, aproximadamente del 7 %. En particular, el contenido de ácido N-acetil-neuramínico (NeuNAc o ácido siálico) del polisacárido capsular del serotipo V de GBS es superior al 50 %, superior al 60 %, superior al 70 %, superior al 75 %, superior al 80 %, superior al 85 %, superior al 90 %, superior al 95 %, en comparación con el polisacárido de serotipo V de GBS nativo en el que se considera que el contenido de NeuNAc es de aproximadamente 100 %. En particular, el polisacárido del serotipo V de GBS es un polisacárido completamente sialilado o "nativo". Por ejemplo, con un contenido de ácido siálico de aproximadamente el 100 %, 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 %, aproximadamente el 90 % (o cualquier intervalo entre estos valores) en comparación con el polisacárido de serotipo V de GBS nativo. En particular, el polisacárido de tipo V contiene D-glucosa, D-galactosa, 2-acetamido-2-desoxi-glucosa y ácido siálico en una proporción molar de 3:2:1:1.

El sacárido usado de acuerdo con la invención puede ser un polisacárido capsular de longitud esencialmente completa, como se encuentra en la naturaleza, o puede ser de menor longitud que la natural. Los polisacáridos de longitud completa se pueden despolimerizar para dar fragmentos más cortos para su uso con la invención, por ejemplo, mediante hidrólisis en ácido suave, mediante calentamiento, cromatografía de dimensionamiento, etc. Se ha informado que la longitud de la cadena afecta a la inmunogenicidad de los sacáridos de GBS en conejos [4]. En particular, los sacáridos capsulares de serotipo II y/o III usados en la invención pueden despolimerizarse como se describe en las ref. 15 y 16. Estos documentos describen la despolimerización parcial de los sacáridos capsulares de tipo II y tipo III mediante la escisión desaminadora leve en fragmentos antigénicos con restos terminales reductores de 2,5-anhidro-D-manosa. En resumen, el sacárido capsular se disuelve en NaOH 0,5 N y se calienta a 70 °C durante aproximadamente 1-4 h. La duración de esta incubación controla el grado de despolimerización, que puede determinarse mediante procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante HPLC como se describe en la referencia 15). La muestra se enfría en un baño de agua con hielo antes de añadir ácido acético glacial para llevar el pH a 4. El producto parcialmente N-desacilado se desamina luego mediante la adición de NaNO₂ al 5 % (p/v) con agitación a 4 °C durante 2 h. Los aldehídos libres de los restos de 2,5-anhidro-D-manosa recién formados pueden usarse para la conjugación con un vehículo proteico, como se describe a continuación.

Se ha informado de la despolimerización del sacárido capsular del serotipo III por endo-β-galactosidasa [ref. 1 y 4-6], incluyendo el uso del material despolimerizado para formar conjugados con un vehículo toxoide tetánico. La ozonólisis de polisacáridos capsulares de los serotipos III y VIII de GBS también se ha usado para la despolimerización [17]. Se prefiere usar sacáridos con PM > 30 kDa, y se pueden usar polisacáridos capsulares de longitud esencialmente completa. Para el serotipo Ia, se prefiere usar polisacáridos con un PM en el intervalo de 150-300 kDa, en particular 175-275 kDa. Por lo general, se usa un sacárido de serotipo Ia con un PM de aproximadamente 200 kDa o aproximadamente 260 kDa. Para el serotipo Ib, se prefiere usar polisacáridos con un PM en el intervalo de 150-300 kDa, en particular 175-250 kDa. Por lo general, se usa un sacárido de serotipo Ib con un PM de aproximadamente 200 kDa o aproximadamente 230 kDa. Para el serotipo III, se prefiere usar polisacáridos con un PM en el intervalo de 50-200 kDa, en particular, 80-150 kDa. Por lo general, se usa un sacárido de serotipo III con PM de aproximadamente 100 kDa o aproximadamente 140 kDa. Para el serotipo V, también se prefiere usar polisacáridos con un PM de hasta ~50 kDa. Por lo general, se usa un sacárido de serotipo V con un PM de aproximadamente 100 kDa. Estas masas moleculares se pueden medir por filtración en gel en relación con patrones de dextrano, tales como los disponibles en Polymer Standard Service [18].

Los sacáridos capsulares pueden purificarse mediante técnicas conocidas, como se describe en las referencias del presente documento, tales como las ref. 2 y 19. Un procedimiento típico implica la extracción de bases, la centrifugación, la filtración, el tratamiento de RNasa/DNasa, el tratamiento de proteasa, la concentración, la cromatografía de exclusión molecular, la ultrafiltración, la cromatografía de intercambio aniónico y la ultrafiltración adicional. El tratamiento de células de GBS con la enzima mutanolisina, que escinde la pared celular bacteriana para liberar los componentes de la pared celular, también es útil.

Como alternativa, se puede usar el procedimiento de purificación descrito en la referencia 20. Esto implica la extracción de bases, el tratamiento con etanol/CaCl₂, la precipitación en CTAB y la redisolución. En la referencia 21, se describe un procedimiento alternativo adicional.

Sin embargo, la invención no se limita a sacáridos purificados de fuentes naturales, y los sacáridos se pueden obtener mediante otros procedimientos, tales como la síntesis total o parcial.

Conjugación

La invención implica conjugados que son sacáridos capsulares de los serotipos de GBS Ia, Ib, II, III y V, cada uno conjugado con un vehículo proteico. En general, la conjugación covalente de sacáridos a vehículos mejora la inmunogenicidad de los sacáridos, ya que los convierte de antígenos independientes en los linfocitos T en antígenos dependientes. En los antígenos T, lo que permite la sensibilización de la memoria inmunológica. La conjugación es particularmente útil para las vacunas pediátricas [por ejemplo, ref. 22] y es una técnica bien conocida [por ejemplo, revisado en las ref. 23 a 31]. Por lo tanto, los procedimientos de la invención pueden incluir la etapa adicional de conjugar el sacárido purificado con una molécula portadora.

La conjugación de sacáridos de GBS ha sido ampliamente publicada, por ejemplo, véase la referencia 1. Aunque los polisacáridos son inmunogénicos, la conjugación de polisacáridos con vehículos proteicos puede mejorar o potenciar la inmunogenicidad. Por lo tanto, como se usa en el presente documento, el término "vehículo" se refiere a una sustancia inmunogénica que, cuando se conjuga con un antígeno (tal como un polisacárido) y se administra a un animal, inducirá o mejorará una respuesta inmunitaria en el animal, particularmente, una respuesta inmunitaria protectora, y provoca la producción de anticuerpos que se unen específicamente al antígeno, por ejemplo, los polisacáridos descritos anteriormente. El procedimiento típico de la técnica anterior para la conjugación de sacáridos de GBS normalmente implica la aminación reductora de un sacárido purificado a un vehículo proteico como el toxoide tetánico (TT) o CRM197 [2]. La aminación reductora implica un grupo amina en la cadena lateral de un aminoácido en el vehículo y un grupo aldehído en el sacárido. Como los sacáridos capsulares de GBS no incluyen un grupo aldehído en su forma natural, esto normalmente se genera antes de la conjugación por oxidación (por ejemplo, oxidación de peryodato) de una parte (por ejemplo, entre el 5 y 40 %, particularmente, entre el 10 y 30 %, preferentemente

aproximadamente el 20 %) de los restos de ácido siálico del sacárido [2,32]. Las vacunas de conjugado preparadas de esta manera han demostrado ser seguras e inmunogénicas en seres humanos para cada uno de los serotipos de GBS Ia, Ib, II, III y V [10]. Por lo general, todos los conjugados en las composiciones inmunogénicas de la presente invención se han preparado de esta manera. Sin embargo, cuando la invención usa un sacárido capsular de serotipo V que está desialilado, entonces, se puede generar un grupo aldehído en este sacárido antes de la conjugación por oxidación (por ejemplo, oxidación de peryodato) de una parte (por ejemplo, entre el 5 y 40 %, particularmente, entre el 10 y 30 %, preferentemente, aproximadamente el 20 %) de los restos de galactosa del sacárido [14]. Un procedimiento de conjugación alternativo implica el uso de grupos -NH₂ en el sacárido (ya sea a partir de la des-N-acetilación o tras la introducción de aminas) junto con enlaces bifuncionales, como se describe en la ref. 33. En algunas realizaciones, uno o más de los conjugados de las composiciones inmunogénicas de la presente invención se han preparado de esta manera. Un procedimiento alternativo adicional se describe en las ref. 15 y 16. En este procedimiento, se usan los grupos aldehídos libres de los restos terminales de 2,5-anhidro-D-manosa de la despolimerización de los sacáridos capsulares de tipo II o tipo III mediante escisión desaminadora leve para la conjugación mediante aminación reductora. En algunas realizaciones, uno o más de los conjugados de las composiciones inmunogénicas de la presente invención se han preparado de esta manera.

La invención implica el uso de vehículos moleculares, que normalmente son proteínas. Los vehículos proteicos útiles incluyen toxinas bacterianas o toxoides, tales como el toxoide diftérico o el toxoide tetánico. También se pueden usar fragmentos de toxinas o toxoides, por ejemplo, fragmento C del toxoide tetánico [34].

El mutante CRM197 de la toxina diftérica [35-37] es un vehículo particularmente útil para su uso con la invención. El material de reacción cruzada (CRM197) es una preparación desintoxicada genéticamente de la toxina diftérica. CRM197 difiere de la toxina diftérica (DT) en un solo aminoácido y, por lo tanto, es altamente reactivo con DT (CRM = Cross Reactive Material, material de reacción cruzada). Este mutante de la toxina diftérica no requiere desintoxicación con formaldehído, y se pueden obtener fácilmente preparaciones homogéneas de antígeno purificado, por ejemplo, de cultivos de la cepa C7 de *Corynebacterium diphtheria* (beta197) cultivados en casaminoácidos y medio de extracto de levadura. Como alternativa, CRM 197 se puede preparar de forma recombinante de acuerdo con el documento US 5.614.382. CRM197 tiene licencia para uso humano como vehículo proteico para distintos antígenos de polisacárido capsular y es una posible alternativa al toxoide diftérico convencional preparado mediante el tratamiento con formaldehído.

Otros vehículos proteicos adecuados incluyen la proteína de membrana externa de *N.meningitidis* [38], péptidos sintéticos [39,40], proteínas de choque térmico [41,42], proteínas de tos ferina [43,44], citocinas [45], linfocinas [45], hormonas [45], factores de crecimiento [45], albúmina de suero humano (preferentemente recombinante), proteínas artificiales que comprenden múltiples epítomos de linfocitos T CD4+ humanos de diferentes antígenos derivados de patógenos [46] tales como N19 [47], proteína D de *H. influenzae* [48,49], proteína de superficie neumocócica PspA [50], neumolisina [51], proteínas de captación de hierro [52], toxina A o B de *C. difficile* [53], exoproteína A de *Pseudomonas aeruginosa* recombinante (rEPA) [54], etc.

La unión al vehículo es preferentemente a través de un grupo -NH₂, por ejemplo, en la cadena lateral de un resto de lisina de un vehículo proteico, o de un resto de arginina, o en el extremo N-terminal. La unión también puede ser a través de un grupo -SH, por ejemplo, en la cadena lateral de un resto de cisteína.

Es posible usar más de un vehículo proteico, por ejemplo, para reducir el riesgo de supresión del vehículo. Por lo tanto, se pueden usar diferentes vehículos proteicos para diferentes serotipos de GBS, por ejemplo, los sacáridos del serotipo Ia podrían conjugarse con CRM197, mientras que los sacáridos del serotipo Ib podrían conjugarse con el toxoide tetánico. En particular, los sacáridos del serotipo Ia, Ib y III podrían conjugarse con un primer vehículo, tales como CRM197, mientras que los sacáridos del serotipo II y V podrían conjugarse con un segundo vehículo (diferente), tal como el toxoide tetánico (-TT). Aún más particularmente, los sacáridos del serotipo Ia, Ib, III y V podrían conjugarse con un primer vehículo, tales como CRM197, mientras que los sacáridos del serotipo II podrían conjugarse con un segundo vehículo (diferente), tal como -TT.

Una composición inmunogénica ilustrativa de la invención comprende (a) un conjugado que es un sacárido capsular del serotipo Ia de GBS conjugado con CRM197; b) un conjugado que es un sacárido capsular del serotipo Ib de GBS conjugado con CRM197; c) un conjugado que es un sacárido capsular del serotipo III de GBS conjugado con CRM197; d) un conjugado que es un sacárido capsular del serotipo II de GBS conjugado con CRM197; y e) un conjugado que es un sacárido capsular del serotipo V de GBS conjugado con CRM197. Otra composición inmunogénica ilustrativa de la invención comprende (a) un conjugado que es un sacárido capsular del serotipo Ia de GBS conjugado con CRM197; b) un conjugado que es un sacárido capsular del serotipo Ib de GBS conjugado con CRM197; c) un conjugado que es un sacárido capsular del serotipo III de GBS conjugado con CRM197; d) un conjugado que es un sacárido capsular del serotipo II de GBS conjugado con toxoide tetánico; y e) un conjugado que es un sacárido capsular del serotipo V de GBS conjugado con toxoide tetánico. Otra composición inmunogénica ilustrativa más de la invención comprende (a) un conjugado que es un sacárido capsular del serotipo Ia de GBS conjugado con CRM197; b) un conjugado que es un sacárido capsular del serotipo Ib de GBS conjugado con CRM197; c) un conjugado que es un sacárido capsular del serotipo III de GBS conjugado con CRM197; d) un conjugado que es un sacárido capsular del serotipo II de GBS conjugado con toxoide tetánico; y e) un conjugado que es un sacárido capsular del serotipo V de GBS conjugado con CRM197. Incluso otra composición inmunogénica ilustrativa más de la invención comprende (a)

un conjugado que es un sacárido capsular del serotipo Ia de GBS conjugado con CRM197; b) un conjugado que es un sacárido capsular del serotipo Ib de GBS conjugado con CRM197; c) un conjugado que es un sacárido capsular del serotipo III de GBS conjugado con CRM197; d) un conjugado que es un sacárido capsular del serotipo II de GBS conjugado con CRM197; y e) un conjugado que es un sacárido capsular del serotipo V de GBS conjugado con toxoide tetánico. También es posible usar más de un vehículo proteico para un antígeno de sacárido en particular, por ejemplo, los sacáridos del serotipo III pueden estar en dos grupos, con algunos conjugados con CRM197 y otros conjugados con toxoide tetánico. En general, sin embargo, se prefiere usar el mismo vehículo proteico para todos los sacáridos.

Un solo vehículo proteico podría portar más de un antígeno de sacárido [55,56]. Por ejemplo, un solo vehículo proteico podría tener conjugado al mismo sacáridos de los serotipos Ia y Ib. Para conseguir este objetivo, se pueden mezclar diferentes sacáridos antes de la reacción de conjugación. En general, sin embargo, se prefiere tener conjugados separados para cada serogrupo, con los diferentes sacáridos que se mezclan después de la conjugación. Los conjugados separados pueden basarse en el mismo vehículo.

Por lo general, se usan conjugados con una proporción de sacárido:proteína (p/p) de entre 1:5 (es decir, proteína en exceso) y 5:1 (es decir, sacárido en exceso), en particular, proporciones de entre 1:5 y 2:1. Para el conjugado que es un sacárido capsular del serotipo Ia de GBS conjugado con un vehículo proteico, la proporción de sacárido:proteína (p/p) está normalmente entre aproximadamente 1:1 a 1:2, en particular, de aproximadamente 1:1,3. Para el conjugado que es un sacárido capsular del serotipo Ib de GBS conjugado con un vehículo proteico, la proporción normalmente es de aproximadamente 1:1 a 1:2, en particular, de aproximadamente 1:1,3. Para el sacárido capsular del serotipo III de GBS conjugado con un vehículo proteico, la proporción de sacárido:proteína (p/p) normalmente es de aproximadamente 3:1 a 1:1, en particular, de aproximadamente 2:1. Sin embargo, también se puede usar el serotipo III de GBS conjugado con un vehículo proteico con una proporción de sacárido:proteína (p/p) de aproximadamente 1:1 a 1:5, en particular, de aproximadamente 1:3,3. Para el conjugado que es un sacárido capsular del serotipo V de GBS conjugado con un vehículo proteico, entonces la proporción es normalmente de aproximadamente 2:1 a 1:1, en particular, de aproximadamente 1,1:1. Por lo tanto, es típico un exceso de peso de sacárido, particularmente, con cadenas de sacárido más largas.

Si se usa polisacárido de serotipo V de GBS desialilado, se usan niveles particularmente diferentes de entrecruzamiento de polisacárido con proteína. El nivel de entrecruzamiento se puede modular, por ejemplo, variando la proporción de proteína-polisacárido. En particular, la proporción de sacárido:proteína (p/p) es inferior a 1:1,5, inferior a 1:1, inferior a o de aproximadamente 1:0,5.

Las composiciones pueden incluir una pequeña cantidad de vehículo libre [57]. Cuando un vehículo proteico dado está presente tanto en forma libre como conjugada en una composición de la invención, la forma no conjugada, preferentemente, no es más del 5 % de la cantidad total del vehículo proteico en la composición en su totalidad, y más preferentemente, está presente en menos del 2 % en peso.

Después de la conjugación, los sacáridos libres y conjugados se pueden separar. Hay muchos procedimientos adecuados, incluyendo cromatografía hidrófoba, ultrafiltración tangencial, diafiltración, etc. [véanse también las ref. 58 y 59, etc.]. En la referencia 60, se describe un procedimiento preferido.

Cuando la composición de la invención incluye un oligosacárido despolimerizado, se prefiere que la despolimerización preceda a la conjugación.

Procedimientos y usos farmacéuticos

Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables típicos incluyen cualquier vehículo que no induzca la producción de anticuerpos dañinos para el individuo que recibe la composición. Los vehículos adecuados son normalmente macromoléculas grandes, que se metabolizan lentamente, tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, sacarosa [61], trehalosa [62], lactosa y agregados lipídicos (tales como gotitas de aceite o liposomas). Dichos vehículos son bien conocidos por los expertos habituales en la materia. Las vacunas también pueden contener diluyentes, tales como agua, solución salina, glicerol, etc. Además, pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponantes del pH y similares. La solución salina fisiológica tamponada con fosfato, libre de pirógenos y estéril es un vehículo típico. Hay un análisis exhaustivo de los excipientes farmacéuticamente aceptables en la referencia 63.

Las composiciones de la invención pueden estar en forma acuosa (es decir, soluciones o suspensiones) o en forma seca (por ejemplo, liofilizada). Si se usa una vacuna seca, se reconstituirá en un medio líquido antes de la inyección. La liofilización de vacunas de conjugados se conoce en la técnica, por ejemplo, el producto Menjugate™ se presenta en forma liofilizada. Cuando las composiciones inmunogénicas de la invención incluyen conjugados que comprenden sacáridos capsulares de más de un serotipo de GBS, es típico que los conjugados se preparen por separado, se mezclen y luego se liofilicen. De este modo, se pueden preparar composiciones liofilizadas que comprenden dos, tres o cuatro conjugados, etc., como se describe en el presente documento. Para estabilizar los conjugados durante la liofilización, puede preferirse incluir un alcohol de azúcar (por ejemplo, manitol) y/o un disacárido (por ejemplo,

sacarosa o trehalosa), por ejemplo entre 1 mg/ml y 30 mg/ml (por ejemplo, aproximadamente 25 mg/ml) en la composición. Se ha recomendado el uso de sacarosa como estabilizador para las vacunas de conjugado de GBS (ref. 64). Sin embargo, es típico que el estabilizador de la presente invención sea manitol. Cuando la vacuna seca se reconstituye en un medio líquido antes de la inyección, la concentración de manitol residual será normalmente de aproximadamente 2-20 mg/ml, por ejemplo, de 3,75 mg/ml, 7,5 mg/ml o 15 mg/ml. El uso de manitol es ventajoso, porque el manitol es químicamente distinto de las subunidades de monosacárido de los sacáridos capsulares de GBS. Esto significa que la detección de los sacáridos capsulares, por ejemplo, para el análisis de control de calidad, puede basarse en la presencia de las subunidades de los sacáridos sin la interferencia del manitol. Por el contrario, un estabilizador como la sacarosa contiene glucosa, que pueden interferir con la detección de subunidades de glucosa en los sacáridos.

Las composiciones pueden presentarse en viales o en jeringas precargadas. Las jeringas pueden suministrarse con o sin agujas. Una jeringa incluirá una sola dosis de la composición, mientras que un vial puede incluir una sola dosis o múltiples dosis.

Las composiciones acuosas de la invención también son adecuadas para reconstituir otras vacunas a partir de una forma liofilizada. Cuando una composición de la invención se va a usar para dicha reconstitución extemporánea, la invención proporciona un kit, que puede comprender dos viales, o puede comprender una jeringa precargada y un vial, usándose el contenido de la jeringa para reactivar el contenido del vial antes de la inyección.

Las composiciones de la invención se pueden acondicionar en forma de dosis unitaria o en forma de múltiples dosis. Para las formas de múltiples dosis, se prefieren los viales a las jeringas precargadas. Los volúmenes de dosificación eficaces se pueden establecer de forma habitual, pero una dosis para seres humanos típica de la composición tiene un volumen de 0,5 ml, por ejemplo, para la inyección intramuscular.

El pH de la composición está preferentemente entre 6 y 8, siendo, preferentemente, de aproximadamente 7. El pH estable se puede mantener mediante el uso de un tampón. Las composiciones inmunogénicas de la invención normalmente comprenden un tampón de dihidrógeno fosfato de potasio. El tampón de dihidrógeno fosfato de potasio puede comprender aproximadamente 1-10 mM de dihidrógeno fosfato de potasio, por ejemplo, 1,25 mM, 2,5 mM o 5,0 mM. Si una composición comprende una sal de hidróxido de aluminio, se prefiere usar un tampón de histidina [65]. La composición puede ser estéril y/o libre de pirógenos. Las composiciones de la invención pueden ser isotónicas con respecto a los seres humanos.

Las composiciones de la invención son inmunogénicas, y más preferentemente, son composiciones vacunales. Las vacunas de acuerdo con la invención pueden ser bien profilácticas (es decir, para prevenir la infección) o terapéuticas (es decir, para tratar la infección), pero normalmente serán profilácticas. Las composiciones de la invención son inmunogénicas, y más preferentemente, son composiciones vacunales. Las vacunas de acuerdo con la invención pueden ser bien profilácticas (es decir, para prevenir la infección) o terapéuticas (es decir, para tratar la infección), pero normalmente serán profilácticas. Las vacunas profilácticas no garantizan una protección completa contra la enfermedad, porque incluso si el paciente desarrolla anticuerpos, puede haber un retardo o retraso antes de que el sistema inmunitario pueda combatir la infección. Por lo tanto, y para evitar dudas, la expresión vacuna profiláctica también puede referirse a vacunas que mejoran los efectos de una futura infección, por ejemplo, reduciendo la gravedad o duración de dicha infección. Las expresiones "protección contra la infección" y/o "proporcionar inmunidad protectora" significan que el sistema inmunitario de un sujeto ha sido sensibilizado (por ejemplo, mediante vacunación) para generar una respuesta inmunitaria y repeler la infección. En particular, la respuesta inmunitaria generada es capaz de repeler la infección contra diversos patógenos, tales como diferentes cepas de bacterias. Por lo tanto, un sujeto vacunado puede infectarse, pero tiene una mayor capacidad para repeler la infección que un sujeto de control.

Las composiciones inmunogénicas usadas como vacuna comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de antígeno o antígenos, así como cualquier otro componente, según sea necesario. Por "cantidad inmunológicamente eficaz", se entiende que la administración de esa cantidad a un individuo, ya sea en una sola dosis o como parte de una serie, es eficaz para el tratamiento o la prevención. De manera habitual, el resultado deseado es la producción de una respuesta inmunitaria específica del antígeno (por ejemplo, patógeno) que sea capaz de contribuir a proteger al sujeto contra el patógeno. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y del estado físico del individuo que se va a tratar, de la edad, del grupo taxonómico del individuo que se va a tratar (por ejemplo, primate no humano, primate, etc.), de la capacidad del sistema inmunitario del individuo para sintetizar anticuerpos, del grado de protección deseado, de la formulación de la vacuna, de la evaluación de la situación médica por parte del médico tratante y de otros factores relevantes. Se espera que la cantidad esté dentro de un intervalo relativamente amplio que pueda determinarse a través de pruebas habituales.

Dentro de cada dosis, la cantidad de un antígeno sacárido individual, en general, estará entre 0,1-50 μ g (medida como masa de sacárido), en particular, entre 1-50 μ g o 0,5-25 μ g, más particularmente 2,5-7,5 μ g, por ejemplo, aproximadamente 1 μ g, aproximadamente 2,5 μ g, aproximadamente 5 μ g, aproximadamente 10 μ g, aproximadamente 15 μ g, aproximadamente 20 μ g o aproximadamente 25 μ g. Dentro de cada dosis, la cantidad total de sacáridos capsulares de GBS, en general, será \leq 70 μ g (medida como masa de sacárido), por ejemplo, \leq 60 μ g. En particular, la cantidad total puede ser \leq 40 μ g (por ejemplo, \leq 30 μ g) o \leq 20 μ g (por ejemplo, \leq 15 μ g). Estas cantidades totales son preferidas para su uso en la invención. Puede ser ventajoso reducir al mínimo la cantidad total

de sacárido/s capsular/es por dosis unitaria para reducir la toxicidad potencial. Por consiguiente, se prefiere una cantidad total de $\leq 20 \mu\text{g}$, por ejemplo, $\leq 15 \mu\text{g}$, $\leq 7,5 \mu\text{g}$ o $\leq 1,5 \mu\text{g}$.

El GBS afecta a distintas zonas del cuerpo y, por lo tanto, las composiciones de la invención pueden prepararse en distintas formas. Por ejemplo, las composiciones pueden prepararse como inyectables, ya sea en forma de soluciones o suspensiones líquidas. La composición puede prepararse para la administración pulmonar, por ejemplo, en forma de un inhalador, usando un polvo fino o un pulverizado. La composición puede prepararse en forma de un supositorio o pesario. La composición puede prepararse para la administración nasal, aural u ocular, por ejemplo, como un pulverizado, gotas, gel o polvo [por ejemplo, las ref. 66 y 67]. Se ha informado del éxito obtenido con la administración nasal de sacáridos neumocócicos [68,69], sacáridos de Hib [70], sacáridos de MenC [71], y las mezclas de los conjugados de sacárido Hib y MenC [72].

Las composiciones de la invención pueden combinarse con antígenos aP/wP, TT, DT y/o IPV, es decir, antígenos acelulares de la tos ferina, por ejemplo, hemaglutinina filamentosa de la tos ferina (FHA), pertactina (PRN, 69K-OMP), fimbrias de la tos ferina (FIM), o antígenos celulares de la tos ferina, antígenos de la tos ferina de células enteras, toxoide de la tos ferina o toxina de la tos ferina (PT), toxoide tetánico, toxoide diftérico y/o antígeno de poliovirus inactivado. Por ejemplo, esto podría llevarse a cabo combinando las composiciones de la invención con formulaciones ya disponibles en el mercado que incluyen ANATFTALL®, DIFTETALL®, PENTACEL® o DAPTACEL®.

Las composiciones de la invención pueden incluir un agente antimicrobiano, en particular, cuando se acondicionan en formatos multidosis.

Las composiciones de la invención pueden comprender detergente, por ejemplo, un Tween (polisorbato), tal como Tween 80. En general, los detergentes están presentes a niveles bajos, por ejemplo, $<0,01 \%$.

Las composiciones de la invención pueden incluir sales de sodio (por ejemplo, cloruro de sodio) para dar tonicidad. Es habitual una concentración de $10 \pm 2 \text{ mg/ml}$ de NaCl. En algunas realizaciones, se puede usar una concentración de 4-10 mg/ml de NaCl, por ejemplo, 9,0, 7,0, 6,75 o 4,5 mg/ml.

En general, las composiciones de la invención incluirán un tampón. Es típico un tampón fosfato.

Las composiciones de la invención pueden administrarse junto con otros agentes inmunorreguladores. En particular, las composiciones pueden incluir uno o más adyuvantes. Dichos adyuvantes incluyen, pero sin limitación:

A. Composiciones que contienen minerales

Las composiciones que contienen minerales adecuadas para su uso como adyuvantes en la invención incluyen sales minerales, tales como sales de aluminio y sales de calcio (o mezclas de las mismas). Las sales de calcio incluyen fosfato de calcio (por ejemplo, las partículas "CAP" desveladas en la ref. 73). Las sales de aluminio incluyen hidróxidos, fosfatos, sulfatos, etc., adoptando las sales cualquier forma adecuada (por ejemplo, gel, cristalina, amorfa, etc.). Se prefiere la adsorción a estas sales. Las composiciones que contienen minerales también pueden formularse como una partícula de sal metálica [74].

Se pueden usar los adyuvantes conocidos como hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio. Estos nombres son convencionales, pero se usan solo por conveniencia, ya que tampoco es una descripción precisa del compuesto químico real que está presente (por ejemplo, véase el capítulo 9 de la referencia 75). La invención puede usar cualquiera de los adyuvantes de "hidróxido" o "fosfato" que se usan en general como adyuvantes. Los adyuvantes conocidos como "hidróxido de aluminio" normalmente son sales de oxihidróxido de aluminio, que generalmente son al menos parcialmente cristalinas. Los adyuvantes conocidos como "fosfato de aluminio" normalmente son hidroxifosfatos de aluminio, que también suelen contener una pequeña cantidad de sulfato (es decir, sulfato de hidroxifosfato de aluminio). Pueden obtenerse por precipitación, y las condiciones de reacción y las concentraciones durante la precipitación influyen en el grado de sustitución de fosfato por hidroxilo en la sal.

Una morfología fibrosa (por ejemplo, como la observada en las micrografías electrónicas de transmisión) es típica de los adyuvantes de hidróxido de aluminio. El pH de los adyuvantes de hidróxido de aluminio normalmente es de aproximadamente 11, es decir, el propio adyuvante tiene una carga superficial positiva a pH fisiológico. Se han indicado capacidades de adsorción de entre 1,8-2,6 mg de proteína por mg de Al^{+++} a pH 7,4 para los adyuvantes de hidróxido de aluminio.

Los adyuvantes de fosfato de aluminio tienen, en general, una proporción molar de PO_4/Al de entre 0,3 y 1,2, preferentemente entre 0,8 y 1,2, y más preferentemente $0,95 \pm 0,1$. En general, el fosfato de aluminio será amorfo, particularmente para sales de hidroxifosfato. Un adyuvante típico es el hidroxifosfato de aluminio amorfo con una proporción molar de PO_4/Al de entre 0,84 y 0,92, incluido a 0,6 mg de Al^{3+}/ml . En general, el fosfato de aluminio será en partículas (por ejemplo, morfología de tipo placa como la observada en las micrografías electrónicas de transmisión). Los diámetros típicos de las partículas están en el intervalo de 0,5-20 μm (por ejemplo, aproximadamente 5-10 μm) después de cualquier adsorción de antígeno. Se han indicado capacidades de adsorción de entre 0,7-1,5 mg de proteína por mg de Al^{+++} a pH 7,4 para los adyuvantes de fosfato de aluminio.

El punto de carga cero (PZC) del fosfato de aluminio es inversamente proporcional al grado de sustitución del fosfato por el hidroxilo, y este grado de sustitución puede variar de acuerdo con las condiciones de reacción y la concentración de los reactivos usados para preparar la sal por precipitación. El PZC también se altera cambiando la concentración de iones de fosfato libres en la solución (más fosfato = más PZC ácido) o añadiendo un tampón tal como un tampón de histidina (hace que el PZC sea más básico). Los fosfatos de aluminio usados de acuerdo con la invención, en general, tendrán un PZC de entre 4,0 y 7,0, más preferentemente entre 5,0 y 6,5, por ejemplo, aproximadamente 5,7.

Las suspensiones de sales de aluminio usadas para preparar las composiciones de la invención pueden contener un tampón (por ejemplo, un fosfato o una histidina o un tampón Tris), pero esto no siempre es necesario. Las suspensiones son preferentemente estériles y libres de pirógenos. Una suspensión puede incluir iones fosfato acuoso libres, por ejemplo, presentes a una concentración de entre 1,0 y 20 mM, preferentemente entre 5 y 15 mM, y más preferentemente de aproximadamente 10 mM. Las suspensiones también pueden comprender cloruro de sodio.

La invención puede usar una mezcla de un hidróxido de aluminio y un fosfato de aluminio. En este caso, puede haber más fosfato de aluminio que hidróxido, por ejemplo, una proporción en peso de al menos 2:1, por ejemplo, $\geq 5:1$, $\geq 6:1$, $\geq 7:1$, $\geq 8:1$, $\geq 9:1$, etc.

La concentración de Al^{+++} en una composición para la administración a un paciente es preferentemente inferior a 10 mg/ml, por ejemplo, ≤ 5 mg/ml, ≤ 4 mg/ml, ≤ 3 mg/ml, ≤ 2 mg/ml, ≤ 1 mg/ml, etc. Un intervalo preferente es entre 0,3 y 1 mg/ml. Se prefiere un máximo de 0,85 mg/dosis.

Un adyuvante de fosfato de aluminio adyuvante típico es el hidroxifosfato de aluminio amorfo con una proporción molar de PO_4/Al de entre 0,84 y 0,92, incluido a 0,6 mg de Al^{3+}/ml . Se puede usar la adsorción con una dosis baja de fosfato de aluminio, por ejemplo, de entre 50 y 100 μg de Al^{3+} por conjugado por dosis.

B. Emulsiones de aceite

Las composiciones de emulsión oleosa adecuadas para su uso como adyuvantes en la invención incluyen emulsiones de escualeno-agua, tales como MF59 (escualeno al 5 %, Tween 80 al 0,5 % y Span 85 al 0,5 %, formuladas en partículas submicrométricas usando un microfluidizador) [Capítulo 10 de la ref. 75; véanse también las ref. 76-78]. MF59 se usa como adyuvante en la vacuna de subunidad trivalente del virus de la gripe FLUAD™.

Los adyuvantes particularmente preferidos para su uso en las composiciones son emulsiones submicrométricas de aceite en agua. Las emulsiones submicrométricas de aceite en agua preferidas para su uso en el presente documento son emulsiones de escualeno/agua que opcionalmente contienen cantidades variables de MTP-PE, tales como una emulsión submicrométrica de aceite en agua que contiene 4-5 % p/v de escualeno, 0,25-1,0 % p/v de Tween 80 (monooleato de polioxietilensorbitano), y/o 0,25-1,0 % de Span 85 (trioleato de sorbitán), y, opcionalmente, *N*-acetilmuramil-L-alanil-D-isogluatminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxisforofiloxi) -etilamina (MTP-PE). Las emulsiones submicrométricas de aceite en agua, los procedimientos para fabricar las mismas y agentes inmunoestimulantes, tales como los péptidos de muramilo, para su uso en las composiciones, se describen en detalle en las referencias 76 y 79-80.

El adyuvante completo de Freund (CFA) y el adyuvante incompleto de Freund (IFA) también pueden usarse como adyuvantes en la invención.

C. Formulaciones de saponina (capítulo 22 de la ref. 75)

Las formulaciones de saponina también se pueden usar como adyuvantes en la invención. Las saponinas son un grupo heterólogo de glicósidos de esterol y glicósidos triterpenoides que se encuentran en la corteza, las hojas, los tallos, las raíces e incluso las flores de una amplia gama de especies de plantas. Las saponinas aisladas de la corteza del árbol de *Quillaja saponaria* Molina se ha estudiado ampliamente como adyuvantes. La saponina también se puede obtener en el mercado a partir de *Smilax ornata* (zarzaparrilla), *Gypsophilla paniculata* (velo de novias) y *Saponaria officinalis* (raíz de jabón). Las formulaciones adyuvantes de saponina incluyen formulaciones purificadas, tales como QS21, así como formulaciones de lípidos, tales como ISCOM.

Las composiciones de saponina se han purificado usando HPLC y RP-HPLC. Se han identificado fracciones específicas purificadas usando estas técnicas, incluyendo QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B y QH-C. Preferentemente, la saponina es QS21. En la ref. 81, se desvela un procedimiento de producción de QS21. Las formulaciones de saponina también pueden comprender un esterol, tal como el colesterol [82].

Las combinaciones de saponinas y colesterol se pueden usar para formar partículas distintas denominadas complejos inmunoestimulantes (ISCOM) [capítulo 23 de la ref. 75]. Los ISCOM también incluyen normalmente un fosfolípido tal como fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina. Cualquier saponina conocida puede usarse en los ISCOM. Preferentemente, el ISCOM incluye uno o más de QuilA, QHA y QHC. Los ISCOM se describen con más detalle en las ref. 82-84. Opcionalmente, los ISCOM pueden estar desprovistos de detergentes adicionales [85].

Una revisión del desarrollo de adyuvantes a base de saponina se puede encontrar en las ref. 86 y 87.

D. Virosomas y partículas de tipo virus

Los virosomas y las partículas de tipo virus (VLP) también se pueden usar como adyuvantes en la invención. Estas estructuras, en general, contienen una o más proteínas de un virus opcionalmente combinadas o formuladas con un fosfolípido. En general, no son patógenos, no se replican y generalmente no contienen nada del genoma viral nativo.

5 Las proteínas víricas pueden producirse de forma recombinante o aislarse de virus completos. Estas proteínas víricas adecuadas para su uso en virosomas o VLP incluyen proteínas procedentes del virus de la gripe (tal como HA o NA), virus de la hepatitis B (tales como las proteínas del núcleo o de la cápside), virus de la hepatitis E, virus del sarampión, virus de Sindbis, rotavirus, y virus de la enfermedad del pie y de la boca, retrovirus, virus de Norwalk, virus del papiloma humano, VIH, fagos de ARN, fagos QB (tales como las proteínas de la cubierta), fagos de GA, fagos fr, fagos AP205
10 y Ty (tales como la proteína Ty de retrotransposón p1). Las VLP se analizan más a fondo en las ref. 88-93. Los virosomas se analizan más a fondo en, por ejemplo, la ref. 94.

E. Derivados bacterianos o microbianos

Los adyuvantes adecuados para su uso en la invención incluyen derivados bacterianos o microbianos tales como derivados no tóxicos de lipopolisacáridos (LPS) enterobacterianos, derivados de lípidos A, oligonucleótidos
15 inmunoestimulantes y toxinas ribosilantes de ADP y derivados desintoxicados de los mismos.

Los derivados no tóxicos de LPS incluyen lípido A monofosforilado (MPL) y MPL 3 des-O-acilado (3dMPL). 3dMPL es una mezcla del lípido A monofosforilado 3 des-O-acilado con 4, 5 o 6 cadenas aciladas. Una forma preferida de "partícula pequeña" de lípido A monofosforilado 3 des-O-acilado se desvela en la ref. 95. Dichas "partículas pequeñas" de 3dMPL son lo suficientemente pequeñas para filtrarse de forma estéril a través de una membrana de 0,22 µm [95].
20 Otros derivados de LPS no tóxicos incluyen imitadores de lípidos A monofosforilados, tales como los derivados de fosfato de aminoalquilglucosaminida, por ejemplo, RC-529 [96,97].

Los derivados de lípidos A incluyen derivados de lípido A de *Escherichia coli* tales como OM-174. OM-174 se describe, por ejemplo, en las ref. 98 y 99.

Los oligonucleótidos inmunoestimulantes adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen
25 secuencias de nucleótidos que contienen un motivo CpG (una secuencia de dinucleótidos que contiene una citosina no metilada unida por un enlace fosfato a una guanosina). También se ha demostrado que los ARN bicatenarios y los oligonucleótidos que contienen secuencias palindrómicas o poli(dG) son inmunoestimulantes.

Los CpG pueden incluir modificaciones/análogos de nucleótidos tales como modificaciones de fosforotioato y pueden ser bicatenarios o monocatenarios. Las referencias 100, 101 y 102 desvelan posibles sustituciones de análogos, por ejemplo, reemplazo de guanosina con 2'-desoxi-7-desazaguanosina. El efecto adyuvante de los oligonucleótidos CpG se analiza con más detalle en las ref. 103-108.
30

La secuencia de CpG puede dirigirse a TLR9, tal como el motivo GTCGTT o TTCGTT [109]. La secuencia de CpG puede ser específica para inducir una respuesta inmunitaria Th1, tal como un ODN de CpG-A, o puede ser más específica para inducir una respuesta de linfocitos B, tal como un ODN de CpG-B. Los ODN de CpG-A y CpG-B se analizan en las ref. 110-112. Preferentemente, el CpG es un ODN de CpG-A.
35

Preferentemente, el oligonucleótido CpG se construye de modo que el extremo 5' sea accesible para el reconocimiento del receptor. Opcionalmente, dos secuencias de oligonucleótidos CpG pueden unirse en sus extremos 3' para formar "inmunómeros". Véase, por ejemplo, las ref. 109 y 113-115.

Las toxinas ribosilantes de ADP bacteriana y sus derivados desintoxicados se pueden usar como adyuvantes en la invención. Preferentemente, la proteína se deriva de *E. coli* (enterotoxina lábil al calor de *E. coli* "LT"), cólera ("CT") o tos ferina ("PT"). El uso de toxinas ribosilantes de ADP desintoxicadas como adyuvantes de la mucosa se describe en la ref. 116 y como adyuvantes parenterales en la ref. 117. La toxina o toxoide está preferentemente en forma de una holotoxina, que comprende las subunidades A y B. Preferentemente, la subunidad A contiene una mutación desintoxicante; preferentemente, la subunidad B no está mutada. Preferentemente, el adyuvante es un mutante DE
40 LT desintoxicado tal como LT-K63, LT-R72 y LT-G192. El uso de toxinas ribosilantes de ADP y sus derivados desintoxicados, particularmente LT-K63 y LT-R72, como adyuvantes se pueden encontrar en las ref. 118-125. La referencia numérica para las sustituciones de aminoácidos se basa preferentemente en las alineaciones de las subunidades A y B de las toxinas ribosilantes de ADP expuestas en la ref. 126., incorporada específicamente en el presente documento por referencia en su totalidad.
45

F. Inmunomoduladores humanos

Los inmunomoduladores humanos adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen citocinas, tales como las interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 [127], etc.) [128], interferones (por ejemplo, interferón-γ), factor estimulante de colonias de macrófagos y factor de necrosis tumoral.

G. Bioadhesivos y mucoadhesivos

Los bioadhesivos y mucoadhesivos también pueden usarse como adyuvantes en la invención. Los bioadhesivos adecuados incluyen microesferas de ácido hialurónico esterificado [129] o mucoadhesivos tales como derivados reticulados de poli(ácido acrílico), alcohol polivinílico, polivinilpirolidona, polisacáridos y carboximetilcelulosa. El quitosán y sus derivados también se pueden usar como adyuvantes en la invención [130].

5 H. Micropartículas

Las micropartículas también pueden usarse como adyuvantes en la invención. Se prefieren las micropartículas (es decir, una partícula de ~100 nm a ~150 µm de diámetro, más preferentemente, de 200 nm a ~30 µm de diámetro, y lo más preferentemente de ~500 nm a ~10 µm de diámetro) formadas a partir de materiales que son biodegradables y no tóxicos (por ejemplo, un poli(α-hidroxiácido), un ácido polihidroxiбутírico, un polioctoéster, un polianhídrido, una policaprolactona, etc.), con poli(lactida-co-glicolida), opcionalmente tratadas para tener una superficie cargada negativamente (por ejemplo, con SDS) o una superficie cargada positivamente (por ejemplo, con un detergente catiónico, tal como CTAB).

10 I. Liposomas (Capítulos 13 y 14 de la ref. 75)

Los ejemplos de formulaciones de liposomas adecuadas para su uso como adyuvantes se describen en las ref. 131-133.

15 J. Formulaciones de éter de polioxietileno y éster de polioxietileno

Los adyuvantes adecuados para su uso en la invención incluyen éteres de polioxietileno y ésteres de polioxietileno [134]. Dichas formulaciones incluyen además tensioactivos de éster de polioxietileno sorbitán en combinación con un octoxinol [135], así como éteres alquílicos de polioxietileno o tensioactivos de éster en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional tal como un octoxinol [136]. Los éteres de polioxietileno preferentes se seleccionan de entre el siguiente grupo: polioxietileno-9-lauriléter (laureth 9), polioxietileno-9-esteoriléter, polioxietileno-8-esteoriléter, polioxietileno-4-lauriléter, polioxietileno-35-lauriléter y polioxietileno-23-lauriléter.

20 K. Polifosfaceno (PCPP)

Se describen formulaciones de PCPP, por ejemplo, en las ref. 137 y 138.

25 L. Péptidos muramilos

Los ejemplos de péptidos muramilos adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen *N*-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), *N*-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (no MDP) y *N*-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxi-fosforiloxi)-etilamina MTP-PE).

30 M. Compuestos de imidazoquinolona

Los ejemplos de compuestos de imidazoquinolona adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen Imiquamod y sus homólogos (por ejemplo, "Resiquimod 3M"), descritos más adelante en las ref. 139 y 140.

35 N. Compuestos de tiosemicarbazona

Los ejemplos de compuestos de tiosemicarbazona, así como los procedimientos de formulación, fabricación y selección de compuestos todos adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen los descritos en la ref. 141. Las tiosemicarbazonas son particularmente eficaces en la estimulación de células mononucleares humanas de sangre periférica para la producción de citocinas, tales como TNF-α.

40 O. Compuestos de triptantrina

Los ejemplos de compuestos de triptantrina, así como los procedimientos de formulación, fabricación y selección de compuestos todos adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen los descritos en la ref. 142. Los compuestos de triptantrina son particularmente eficaces en la estimulación de células mononucleares humanas de sangre periférica para la producción de citocinas, tales como TNF-α.

La invención también puede comprender combinaciones de aspectos de uno o más de los adyuvantes identificados anteriormente. Por ejemplo, se pueden usar las siguientes combinaciones como composiciones adyuvantes en la invención: (1) una saponina y una emulsión de aceite en agua [143]; (2) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado de LPS no tóxico (por ejemplo, 3dMPL) [144]; (3) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado de LPS no tóxico (por ejemplo, 3dMPL) + un colesterol; (4) una saponina (por ejemplo, QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + un esteroide) [145]; (5) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite en agua [146]; (6) SAF, que contiene escualeno al 10 %, Tween 80™ al 0,4 %, polímero de bloque pluronic L121 al 5 % y thr-MDP, ya esté microfluidizado en una emulsión submicrométrica o agitado con formación de vórtice para generar una emulsión de mayor tamaño de partícula. (7) sistema adyuvante Ribi™ (RAS), (Ribi Immunochem) que contiene escualeno al 2 %, Tween 80 al 0,2 % y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo que consiste en lípido A monofosforilado (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM) y estructura de pared celular (CWS), preferentemente MPL +

CWS (Detox™); y (8) una o más sales minerales (tales como una sal de aluminio) + un derivado no tóxico de LPS (tal como 3dMPL).

Otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimulantes se desvelan en el capítulo 7 de la ref. 75.

5 Se prefiere particularmente el uso de adyuvantes de sal de aluminio, y los antígenos generalmente se adsorben a dichas sales. Es posible en las composiciones de la invención adsorber algunos antígenos a un hidróxido de aluminio, pero tener otros antígenos en asociación con un fosfato de aluminio. En general, sin embargo, se prefiere usar solo una sal, por ejemplo, por ejemplo, un hidróxido o un fosfato, pero no ambas. No todos los conjugados necesitan ser adsorbidos, es decir, algunos o todos pueden estar libres en solución.

Procedimientos de tratamiento

10 La invención también proporciona un procedimiento para elevar una respuesta inmunitaria en un mamífero, que comprende administrar una composición farmacéutica de la invención al mamífero. La respuesta inmunitaria es preferentemente protectora y preferentemente implica la participación de anticuerpos. El procedimiento puede generar una respuesta de refuerzo.

15 El mamífero es preferentemente un ser humano. Cuando la vacuna es para uso profiláctico, el ser humano es preferentemente un niño (por ejemplo, un niño pequeño o un lactante) o un adolescente; cuando la vacuna es para uso terapéutico, el ser humano es preferentemente un adulto. Una vacuna destinada a niños también se puede administrar a adultos, por ejemplo, para evaluar la seguridad, la dosis, la inmunogenicidad, etc. Una clase preferida de seres humanos para el tratamiento son las mujeres en edad fértil (por ejemplo, adolescentes y mayores). Otra clase preferida son las mujeres embarazadas. Los pacientes de edad avanzada (por ejemplo, mayores de 50, 60, 70, 80 o 20 90, etc., años, en particular, mayores de 65 años), en especial, aquellos que viven en hogares de ancianos en los que el riesgo de infección por GBS puede aumentar ([147]), son otra clase preferida de seres humanos para el tratamiento. En algunas realizaciones, el ser humano tiene un nivel indetectable de anticuerpos contra el sacárido capsular del serotipo Ia de GBS antes de la administración de la composición farmacéutica. En otras realizaciones, el ser humano tiene un nivel indetectable de anticuerpos contra el sacárido capsular del serotipo Ib de GBS antes de la administración de la composición farmacéutica. En otras realizaciones, el ser humano tiene un nivel indetectable de anticuerpos contra el sacárido capsular del serotipo III de GBS antes de la administración de la composición farmacéutica. En otras realizaciones, el ser humano tiene un nivel indetectable de anticuerpos contra el sacárido capsular del serotipo II de GBS antes de la administración de la composición farmacéutica. En otras realizaciones, el ser humano tiene un nivel indetectable de anticuerpos contra el sacárido capsular del serotipo V de GBS antes de la administración de la composición farmacéutica. En particular, el ser humano puede tener un nivel indetectable de anticuerpos contra el sacárido capsular del serotipo Ia de GBS y un nivel indetectable de anticuerpos contra el sacárido capsular del serotipo Ib de GBS antes de la administración de la composición farmacéutica. Como alternativa o además, el ser humano puede tener un nivel indetectable de anticuerpos contra el sacárido capsular del serotipo III de GBS antes de la administración de la composición farmacéutica. Como alternativa o además, el ser humano puede tener un nivel indetectable de anticuerpos contra el sacárido capsular del serotipo II de GBS antes de la administración de la composición farmacéutica. Como alternativa o además, el ser humano puede tener un nivel indetectable de anticuerpos contra el sacárido capsular del serotipo V de GBS antes de la administración de la composición farmacéutica. El/los nivel/es de anticuerpos contra el/los sacárido/s capsular/es puede determinarse usando técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, ELISA. El/los nivel/es de anticuerpos pueden ser de un mes antes de la administración, en particular, de un mes antes de la administración (por ejemplo, de dos semanas, de una semana o del día de la administración). Las mujeres con estos niveles indetectables de anticuerpos contra el/los sacárido/s capsular/es pueden tener tasas más altas de infección por GBS en sus recién nacidos. Esto se debe a que los niveles más altos de anticuerpos maternos contra los sacáridos capsulares de GBS se correlacionan con un menor riesgo de enfermedad en los recién nacidos [ref. 148 y 149]. Por consiguiente, en la presente invención, se contempla específicamente la administración a estas mujeres.

La invención también proporciona una composición de la invención para su uso como un medicamento. El medicamento es preferentemente capaz de elevar una respuesta inmunitaria en un mamífero (es decir, es una composición inmunogénica) y es más preferentemente una vacuna.

50 La invención también proporciona el uso de una composición de la invención en la fabricación de un medicamento para generar una respuesta inmunitaria en un mamífero.

Estos usos y procedimientos son preferentemente para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad causada por *S. agalactiae*, por ejemplo, septicemia neonatal o bacteriemia, neumonía neonatal, meningitis neonatal, endometritis, osteomielitis, artritis séptica, etc.

55 El sujeto en el que se previene la enfermedad puede no ser el mismo que el sujeto que recibe el conjugado de la invención. Por ejemplo, se puede administrar un conjugado a una mujer (antes o durante el embarazo) para proteger a la descendencia (la denominada "inmunización materna" [150-152]). La inmunización de la mujer embarazada proporciona inmunidad mediada por anticuerpos al lactante a través de la inmunidad materna pasiva. La inmunidad pasiva se produce de manera natural cuando los anticuerpos maternos se transfieren al feto a través de la placenta.

La inmunidad pasiva es especialmente importante para los lactantes, porque nacen sin ninguna inmunidad adquirida activamente. La administración de las composiciones de la invención a una mujer embarazada potencia la inmunidad en la mujer, y los anticuerpos pasan al recién nacido a través de la placenta, confiriendo inmunidad materna pasiva al lactante. Sin embargo, la inmunidad pasiva en los lactantes es solo temporal y comienza a disminuir tras las primeras semanas o meses de vida. Como la inmunidad pasiva es solo temporal, puede ser importante que el lactante reciba la administración de una composición de la invención, para inducir inmunidad activa en el lactante, antes de que disminuya la inmunidad pasiva. La administración de una segunda composición inmunogénica al lactante tras el nacimiento induce inmunidad activa en el lactante y extiende la inmunidad transmitida por la madre durante el embarazo.

Como se usa en el presente documento, un lactante es un individuo menor de un año de edad (por ejemplo, de menos de un día de edad, 1 semana de edad, 2 semanas de edad, 3 semanas de edad, 4 semanas de edad, 2 meses de edad, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses de edad, 9 meses de edad, 10 meses de edad, 11 meses de edad, menos de 12 meses de edad).

La mujer embarazada puede recibir la composición de la invención en cualquier momento durante su embarazo. Por ejemplo, la composición puede administrarse a la mujer durante el primer, segundo o tercer trimestre de embarazo. En algunas realizaciones, la composición se administra a la mujer durante las últimas 6-12 semanas del embarazo (por ejemplo, 28 semanas de gestación, 29 semanas de gestación, 30 semanas de gestación, 31 semanas de gestación, 32 semanas de gestación, 33 semanas de gestación, 34 semanas de gestación, 35 semanas de gestación, 36 semanas de gestación, 37 semanas de gestación, 38 semanas de gestación, 39 semanas de gestación). En particular, la composición de la invención se administra a la mujer embarazada al menos cuatro semanas antes del nacimiento del lactante. En algunas realizaciones, se administra una pauta de una dosis a la mujer embarazada entre las semanas 32 y 36 de gestación. En otras realizaciones, se administra una pauta de dos dosis a la mujer embarazada, siendo la primera dosis administrada aproximadamente a las 32 semanas de gestación y la segunda dosis administrada aproximadamente a las 36 semanas de gestación.

El lactante puede recibir la composición en cualquier momento durante el primer año de vida, y posteriormente si se desea. En general, la composición se administrará al lactante, dos, tres, cuatro o más veces durante el primer año de vida. Por ejemplo, la composición de la invención puede administrarse al lactante una o más veces seleccionadas desde el nacimiento, a las 2 semanas de edad, 4 semanas de edad, 6 semanas de edad, 2 meses de edad, 3 meses de edad, 4 meses de edad, 6 meses de edad, 9 meses y 12 meses de edad. En particular, la composición de la invención se administra al lactante en un momento antes de que los anticuerpos maternos hayan disminuido a títulos no protectores. Las administraciones posteriores se pueden producir en cualquier horario deseado.

En una realización, se proporciona un procedimiento para proteger a un lactante contra una enfermedad causada por *Streptococcus agalactiae* que comprende las etapas de (a) administrar una composición de la invención a una mujer durante el embarazo de dicho lactante; y (b), opcionalmente, administrar una composición de la invención al lactante que nace del embarazo. En particular, un procedimiento para proteger a un lactante contra la enfermedad de inicio temprano causada por *Streptococcus agalactiae* de serotipos Ia, Ib, III, II y V. En particular, la enfermedad es la septicemia que se produce en el transcurso de las 0 y 168 horas del nacimiento, aún más particularmente de 0 y 72 horas del nacimiento, aún más particularmente entre las 24 y 72 horas del nacimiento, y aún más particularmente entre las 48 y 72 horas del nacimiento.

También se proporciona un procedimiento para proteger a un lactante contra la enfermedad de inicio tardío causada por *Streptococcus agalactiae* de serotipos Ia, Ib, III, II y V. En particular, la enfermedad se produce en el transcurso de los 7 días a 90 días del nacimiento o más tarde.

Una forma de verificar la eficacia del tratamiento terapéutico implica controlar la infección por GBS tras la administración de la composición de la invención. Una forma de verificar la eficacia del tratamiento profiláctico implica controlar las respuestas inmunitarias contra los antígenos de GBS tras la administración de la composición.

Las composiciones preferidas de la invención pueden conferir un título de anticuerpos en un paciente que sea superior al criterio de seroprotección para cada componente antigénico para un porcentaje aceptable de sujetos humanos. Los antígenos con un título de anticuerpos asociado por encima del cual se considera que un hospedador está seroconvertido contra el antígeno son bien conocidos, y dichos títulos son publicados por organizaciones tales como la OMS. Preferentemente, más del 80 % de una muestra estadísticamente significativa de sujetos está seroconvertida, más preferentemente más del 90 %, aún más preferentemente más del 93 % y de la forma más preferente del 96-100 %.

En general, las composiciones de la invención se administrarán directamente a un paciente. La administración directa puede realizarse mediante inyección parenteral (por ejemplo por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular o al espacio intersticial de un tejido) o por vía rectal, oral, vaginal, tópica, transdérmica, intranasal, ocular, auditiva, pulmonar u otra administración mucosa. Se prefiere la administración intramuscular en el muslo o la parte superior del brazo. La inyección puede ser mediante una aguja (por ejemplo, una aguja hipodérmica), pero también se puede usar, como alternativa, la inyección sin aguja. Una dosis intramuscular habitual es de 0,5 ml. La administración a la mujer embarazada y al lactante puede realizarse por la misma vía o por vías diferentes.

La invención puede usarse para generar inmunidad sistémica y/o mucosal.

El tratamiento de dosificación puede ser una pauta en una sola dosis o una pauta en múltiples dosis. Pueden usarse múltiples dosis en una pauta de inmunización primaria y/o en una pauta de inmunización de refuerzo. Una pauta de dosis primaria puede ir seguida por una pauta de dosis de refuerzo. El tiempo adecuado entre las dosis de sensibilización (por ejemplo, entre 4-16 semanas) y entre la sensibilización y el refuerzo, se puede determinar de manera rutinaria.

General

La expresión "que comprende" abarca "que incluye", así como "que consiste", por ejemplo, una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo más, por ejemplo, X + Y.

La expresión "que consiste en" significa "que consiste solo en". Una composición "que consiste en X" puede no incluir ningún otro componente. Una composición "que consiste esencialmente en X" puede no incluir ningún otro componente activo. La expresión "que consiste esencialmente en" significa que la composición, el procedimiento o la estructura puede incluir ingredientes, etapas y/o partes adicionales, pero solo si los ingredientes, las etapas y/o las partes adicionales no alteran sustancialmente las características básicas y novedosas de la composición, del procedimiento o de la estructura que se reivindica.

El término "aproximadamente" en proporción a un valor numérico x significa, por ejemplo, $x \pm 10\%$.

El término "esencialmente" no excluye "completamente", por ejemplo, una composición que está "esencialmente libre" de Y puede estar completamente libre de Y. Cuando sea necesario, el término "esencialmente" puede omitirse de la definición de la invención.

Se apreciará que los anillos de azúcar pueden existir en forma abierta y cerrada y que, mientras que las formas cerradas se muestran en fórmulas estructurales en el presente documento, también están abarcadas las formas abiertas por la invención. De manera similar, se apreciará que los azúcares pueden existir en forma de piranosa y furanosa y que, mientras que las formas de piranosa se muestran en fórmulas estructurales en el presente documento, las formas de furanosa también están abarcadas. También se abarcan diferentes formas anoméricas de azúcares.

A menos que se indique específicamente, un procedimiento que comprende una etapa de mezclado de dos o más componentes no requiere ningún orden de mezclado específico. Por tanto, los componentes pueden mezclarse en cualquier orden. Cuando existen tres componentes, entonces, se pueden combinar dos componentes entre sí y, a continuación, la combinación puede combinarse con el tercer componente, etc.

Los anticuerpos generalmente serán específicos para su diana. Por lo tanto, tendrán una mayor afinidad por la diana que por una proteína de control irrelevante, tal como la albúmina de suero bovino.

Salvo que se indique de otra forma, la identidad entre secuencias de polipéptidos se determina preferentemente mediante el algoritmo de búsqueda de homología que se implementó en el programa MPSRCH (Oxford Molecular), usando una búsqueda de espacio afín con parámetros de *penalización por apertura de hueco* = 12 y *penalización de extensión de hueco* = 1.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la supervivencia de ratones (% de protección) en un modelo de exposición neonatal. La inmunización materna se llevó a cabo con (A) GBS Ia, (B) GBS Ib, (C) GBS III, (D) GBS II y (E) GBS V, cada uno conjugado con CRM197. Los ratones se expusieron al antígeno correspondiente.

La Figura 2 muestra los títulos de OPK contra (A) GBS Ia, (B) GBS Ib, (C) GBS III, (D) GBS II y (E) GBS V, cada uno conjugado con CRM197. Los ratones se inmunizaron al antígeno correspondiente.

La Figura 3 muestra títulos de IgG (Fig. 3A) y títulos de OPK (Fig. 3B) contra GBS V. Los ratones se inmunizaron con (A) Alumbre, (B) GBS V conjugado con CRM, (C) GBS V conjugado con CRM + vacuna trivalente (GBS Ia, Ib y III conjugado con CRM) y (D) GBS V conjugado con CRM + GBS II conjugado con CRM + Vacuna trivalente (GBS Ia, Ib, y III conjugado con CRM).

La Figura 4 muestra los títulos de IgG (Fig. 4A) y los títulos de OPK (Fig. 4B) contra GBS II. Los ratones se inmunizaron con (A) Alumbre, (B) GBS II conjugado con CRM, (C) GBS II conjugado con CRM + vacuna trivalente (GBS Ia, Ib y III conjugado con CRM) y (D) GBS II conjugado con CRM + GBS V conjugado con CRM + vacuna trivalente (GBS Ia, Ib, y III conjugado con CRM).

Las Figuras 5A y 5B muestran los títulos de IgG (5A) contra GBS Ia, Ib, II, III y V, y los títulos de OPK (5B) contra las cepas 515 Ia, H36B, COH1, 5401, CJB111. Los ratones se inmunizaron con (A) vacuna trivalente: GBS Ia, Ib y III conjugado con CRM y (B) vacuna pentavalente: GBS Ia, Ib, II, III y V conjugado con CRM.

La Figura 6 muestra títulos de IgG contra GBS V. Los ratones se inmunizaron con (A) PBS/Alumbre, (B) GBS V

conjugado con CRM, (C) GBS V conjugado con CRM + vacuna trivalente (GBS Ia, Ib y III conjugado con CRM197), (D) GBS II y V conjugado con CRM + vacuna trivalente (Ia, Ib, III conjugado con CRM197), (E) GBS V conjugado con TT, (F) GBS V conjugado con TT + vacuna trivalente (GBS Ia, Ib y III conjugado con CRM197), (G) GBS II y V conjugado con TT + vacuna trivalente (Ia, Ib, III conjugado con CRM197).

5 La Figura 7 muestra títulos de IgG contra GBS II. Los ratones se inmunizaron con (A) PBS/Alumbre, (B) GBS II conjugado con CRM, (C) GBS II conjugado con CRM + vacuna trivalente (GBS Ia, Ib y III conjugado con CRM197), (D) GBS II y V conjugado con CRM + vacuna trivalente (Ia, Ib, III conjugado con CRM197), (E) GBS II conjugado con TT, (F) GBS II conjugado con TT + vacuna trivalente (GBS Ia, Ib y III conjugado con CRM197), (G) GBS II y V conjugado con TT + vacuna trivalente (Ia, Ib, III conjugado con CRM197).

10 La Figura 8 muestra el análisis de potencia de muestras con diferente contenido de ácido siálico de CRM-Ia, como resultado de la inmunización con 2 dosis de 1 µg de conjugados/ratón. A) títulos de OPKA, el valor medio de tres protocolos está representado por una barra horizontal. B): % acumulado de supervivencia de crías expuestas a los tres protocolos. C): Valores de potencia de IVRP de lotes administrados.

15 La Figura 9 muestra el análisis de potencia de muestras de CRM-Ib desialiladas (resultados de la inmunización con 1 µg de conjugados/ratón). Los paneles A muestran títulos de OPKA (sueros agrupados) en ratones inmunizados con 2 dosis de muestras de Ia-CRM197 desialiladas formuladas con Alumbre. Los datos de la Preparación n.º 1 se muestran en triángulos y los de la Preparación n.º 2 se muestran en círculos; el porcentaje de AS en las dos preparaciones se indica en el eje X. Las barras horizontales muestran la media de los títulos de GMT y OPKA mediante ELISA. B): Porcentaje de supervivencia (media de los tres protocolos) de crías expuestas. C) Valores de potencia de IVRP de la preparación.

20 La Figura 10 muestra el análisis de potencia de muestras de CRM-III desialiladas (resultados de la inmunización con 0,2 µg de conjugados/ratón). Los paneles A muestran títulos de OPKA en sueros de ratones inmunizados con dos dosis de 0,2 µg de muestras desialiladas de Ia-CRM197 de la preparación n.º 1 formulada en alumbre. (A) Los círculos representan los títulos de IgG de cada ratón individual, las barras horizontales muestran la media de los GMT de ELISA. (b) Los círculos representan los títulos de OPKA de sueros agrupados del mismo protocolo. El panel B muestra el porcentaje de supervivencia de crías expuestas de ratones hembra inmunizados.

Modos de llevar a cabo la invención

Vacunas

Las vacunas monovalentes de GBS usadas en los Estudios 1-4 están todas conjugadas con CRM197.

30 La vacuna trivalente de GBS usada en todos los estudios comprende polisacáridos capsulares derivados de serotipos: Ia, Ib y III, cada uno conjugado con CRM197.

Estudio 1

35 Se investigó el nivel de protección de los ratones en un modelo de exposición neonatal (Maione y col., *Science* 1 de julio de 2005: vol. 309 n.º 5731 pág. 148-150). Se administraron a las madres tres dosis de vacunas monovalentes de GBS (1 µg de antígeno) adyuvadas con sal de aluminio (400 µg). Las vacunas monovalentes de GBS probadas fueron GBS Ia, Ib, II, III y V, cada uno conjugado con CRM197. Los resultados se muestran en la Figura 1.

40 También se llevaron a cabo ensayos de OPK, y los resultados se muestran en la Figura 2. Un enfoque viable para evaluar la eficacia de una vacuna es usar un sustituto de protección que, en el caso de GBS, es la actividad opsonizante de los anticuerpos séricos. El ensayo de destrucción de opsonofagocitosis mide la capacidad del anticuerpo sérico para opsonizar el GBS para la destrucción por células efectoras en presencia de complemento. En general, existe una buena correlación entre los títulos de anticuerpos IgG y OPK de ELISA. Se puede ver que los niveles de protección y de OPA por GBS II y GBS V son comparables a los de GBS Ia, Ib y III.

Estudio 2

45 Los ratones se inmunizaron con tres dosis de vacunas monovalentes o multivalentes (1 µg de cada antígeno) adyuvadas con sal de aluminio (400 µg). Las vacunas probadas fueron (1) GBS V, (2) una vacuna tetravalente que contiene GBS V y la vacuna trivalente de GBS, y (3) una vacuna pentavalente que contiene GBS II, GBV y el GBS trivalente. Los ratones se inmunizaron con sal de aluminio sola como control negativo. Se llevaron a cabo ensayos de ELISA y OPK (usando la cepa CJB111 de tipo V) (repetidos dos veces).

50 Los resultados de estos experimentos se muestran en la Figura 3. Se puede ver que no se observó interferencia inmunitaria significativa entre GBS V y los otros antígenos.

Los ratones inmunizados se expusieron a GBS V, y los resultados se proporcionan en la Tabla 1.

Tabla 1. Resultados de la exposición a la cepa de tipo V de GBS (CJB111 de tipo V).

Antígenos	Exposición a GBS V	
	Protegidos/Tratados	% de protección
PBS	39/100	39
CRM-V	108/119	91
CRM-Ia/Ib/III	32/102	31
CRM-Ia/I b/III + CRM-V	60/70	86
CRM-Ia/Ib/III + CRM-II+ CRMV-V	89/95	94

Estudio 3

5 Los ratones se inmunizaron con tres dosis de vacunas monovalentes o multivalentes (1 µg de cada antígeno) adyuvadas con sal de aluminio (400 µg). Las vacunas probadas fueron (1) GBS II, (2) una vacuna tetravalente que contiene GBS II y la vacuna trivalente de GBS, y (3) una vacuna pentavalente que contiene GBS II, GBV y la vacuna trivalente de GBS. Los ratones se inmunizaron con sal de aluminio sola como control negativo. Se llevaron a cabo ensayos de ELISA y OPK (usando la cepa 5401 de tipo II) (repetidos dos veces).

Los resultados se muestran en la Figura 4. No se observó interferencia significativa entre GBS II y los otros antígenos.

10 Los ratones inmunizados se expusieron a GBS II, y los resultados se proporcionan en la Tabla 2.

Tabla 2. Resultados de la exposición contra la cepa de GBS de tipo II (5401 de tipo II).

Antígenos	Exposición a GBS II	
	Protegidos/Tratados	% de protección
PBS	37/120	31
CRM-II	55/80	69
CRM-Ia/Ib/III	15/100	15
CRM-Ia/Ib/III + CRM-II	72/99	73
CRM-Ia/Ib/III + CRM-II + CRM-V	62/129	48

Estudio 4

15 Los ratones se inmunizaron con tres dosis de vacunas trivalentes o pentavalentes (1 µg de cada antígeno) adyuvadas con sal de aluminio (400 µg). Las vacunas probadas fueron (1) GBS II, (2) la vacuna trivalente de GBS (GBS Ia, Ib y III conjugado CRM197), (3) la vacuna tetravalente de GBS (GBS Ia, Ib, II y III conjugado con CRM197 o GBS Ia, Ib y III conjugado con CRM197 + GBS II conjugado con TT) y (4) una vacuna pentavalente que contiene (GBS Ia, Ib, II, III y V conjugado con CRM197 o GBS Ia, Ib y III conjugado con CRM197 + GBS II y V conjugado con TT). Los ratones se inmunizaron con sal de aluminio sola como control negativo. Se llevaron a cabo ensayos de ELISA y OPK (usando la cepa 5401 de tipo II) (repetidos dos veces).

20 Los ratones inmunizados se expusieron a GBS II, y los resultados se proporcionan en la Tabla 3.

Tabla 3. Resultados de la exposición contra la cepa de GBS de tipo II (5401 de tipo II).

Antígenos	Exposición a GBS II	
	Protegidos/Tratados	% de protección
PBS	19/60	31 %
CRM-II	23/30	77 %
CRM-Ia/Ib/III	8/30	26 %
CRM-Ia/Ib/III + CRM-II	40/50	80 %
CRM-Ia/Ib/III + CRM-II + CRM-V	32/77	41 %
CRM-Ia/Ib/III + TT-II	62/77	80 %
CRM-Ia/Ib/III + TT-II + TT-V	75/77	97 %

Estudio 5

25 Los ratones se inmunizaron con tres dosis de vacunas trivalentes o pentavalentes (1 µg de cada antígeno) adyuvadas con sal de aluminio (400 µg). Se llevaron a cabo ensayos de ELISA y OPK (usando la cepa 5401 de tipo II) (repetidos dos veces).

Los resultados se muestran en las Figuras 5A y 5B. No se observó interferencia significativa entre las vacunas trivalentes y pentavalentes.

La inmunogenicidad y protección de los conjugados Ia, Ib y III no se ven afectadas por la adición de PS-II y V. Títulos de ELISA y OPK comparables contra cada PS en la formulación pentavalente.

Estudio 6

Se investigó la inmunogenicidad de los sacáridos de GBS conjugados con diferentes vehículos proteicos.

- 5 Los ratones se inmunizaron con composiciones que contenían GBS II y/o V conjugado con CRM197 ("CRM") o toxoide tetánico ("TT"). El título de anticuerpos contra GBS V se analizó mediante ELISA. Los resultados se muestran en las Figuras 6 y 7. Los ratones se inmunizaron con PBS/sal de aluminio solo como controles negativos.

10 Se puede ver que los conjugados de CRM y TT proporcionan respuestas inmunitarias significativas contra el antígeno correspondiente. Para GBS II, no se observó interferencia inmunitaria significativa entre GBS II y los otros antígenos en las vacunas multivalentes, independientemente de si estaba conjugado con CRM o TT. Del mismo modo, para GBS V, no se observó interferencia inmunitaria significativa entre GBS V y los otros antígenos en las vacunas multivalentes, independientemente de si estaba conjugado con CRM o TT.

Estudio 7

15 Para investigar la contribución del componente de ácido siálico, Se probaron antígenos de polisacárido capsular de *Streptococcus agalactiae* Ia, Ib y II conjugados con CRM197. Se prepararon lotes de vacunas con diferente contenido de ácido siálico y se usaron para inmunizar ratones y determinar los títulos de IgG, la actividad funcional de anticuerpos inducidos y la protección generada contra GBS en un modelo de inmunización materna/exposición neonatal en ratones. Se produjeron lotes monovalentes de conjugados de polisacárido-CRM197 con diferente contenido de ácido siálico, del 100 % al <5 %, mediante el tratamiento de conjugados nativos en condiciones ácidas suaves (por ejemplo, a pH 4,75 a 80 °C para diferentes tiempos de incubación). La potencia se evaluó mediante IVRP. Los sueros de ratones inmunizados con lotes desialilados se analizaron mediante ELISA y el ensayo de Osonofagocitosis (OPKA) para evaluar la inmunogenicidad de la vacuna y la actividad funcional de los anticuerpos inducidos, respectivamente. También se realizaron experimentos de supervivencia para estudiar la protección en crías nacidas de ratones hembra que recibieron las vacunas.

25 En resumen, los conjugados de GBS se desializaron mediante el tratamiento con acetato de sodio deuterado. El contenido de ácido siálico se controló mediante tecnología de RMN. Para todas las preparaciones, se secaron al vacío 3 mg de conjugado (determinado por el contenido total de sacárido) (Genevac mod. EZ-2 Plus) y se disolvieron en 3 ml de acetato de sodio 50 mM deuterado (D2O - Aldrich 151882-100G Lote n.º STBC04462V) a pH 4,75 (Sigma S80750-500G Lote n.º 050M0213V); la mezcla se incubó a 80 °C en diferentes momentos y las partes alícuotas de las preparaciones obtenidas se caracterizaron de la siguiente manera: (1) análisis de RMN de ¹H para estimar la proporción del contenido de ácido siálico unido/libre; (2) Estimación del contenido de sacárido basándose en la determinación de la galactosa (Gal); (3) Determinación del contenido de proteínas; (4) análisis de SDS-PAGE y (5) electroforesis capilar (datos no mostrados).

35 Se formularon lotes monovalentes de conjugados de polisacárido-CRM197 con diferente contenido de AS del 100 % (material nativo no tratado) hasta el 0 % en aluminio, y se administraron a grupos de ratones hembra CD1 de 5 semanas de vida mediante inyección intraperitoneal (i.p.) en los días 1 y 21. Tras la segunda inmunización en el día 21, se aparearon las hembras y las crías se expusieron a una dosis DL90 de GBS del mismo serotipo (GBS 090 para el serotipo Ia, GBS H36b para Ib y GBS M781 para el serotipo III). La mortalidad se registró diariamente durante 3 días después de la exposición. La inmunogenicidad de la vacuna se probó analizando los sueros extraídos 2 semanas después de la última inyección de la vacuna para detectar la presencia de anticuerpos para cada uno de los antígenos específicos de serotipo (Ia, Ib y III). Los títulos de anticuerpos IgG específicos contra cada polisacárido se cuantificaron mediante ELISA. La actividad funcional de los anticuerpos se evaluó en grupos de sueros de animales que recibieron la misma vacuna usando el ensayo de opsonofagocitosis (OPKA) y mediante exposición neonatal.

45 Para el polisacárido Ia-CRM197, los títulos de IgG en animales inmunizados con dosis de vacuna de 1 µg fueron similares para todas las muestras excepto para <5 %, lo que produjo una reducción estadísticamente significativa de aproximadamente 4 veces en comparación con el polisacárido nativo ($p = 0,0067$, prueba de Mann-Whitney). Se pudo apreciar una disminución en la actividad funcional de los anticuerpos al 19 % y <5 % (destrucción de OPKA) y <5 % de contenido siálico (supervivencia). En cuanto a los resultados de IVRP, los valores de potencia de las muestras con un contenido de ácido siálico igual o inferior al 33 % disminuyeron más de 10 veces (Figura 8).

50 Para el polisacárido Ib-CRM197, las muestras que contenían menos del 5 % de AS indujeron títulos inferiores de ELISA, títulos inferiores de OPKA y menor supervivencia en comparación con las muestras con mayor contenido siálico (Figura 9).

55 Para el polisacárido III-CRM197, los GMT de IgG para PS III fueron significativamente mayores en animales que recibieron muestras que contenían menos del 66 % de AS en comparación con los inmunizados con muestras con mayor contenido de AS (prueba de Mann-Whitney, $p < 0,01$). Los niveles de anticuerpos funcionales fueron similares en animales que recibieron dosis de 1 µg de muestras nativas y desialiladas. Sin embargo, se apreció una diferencia en los animales que recibieron dosis de 0,2 µg de conjugados, con una reducción drástica en los títulos de OPKA en

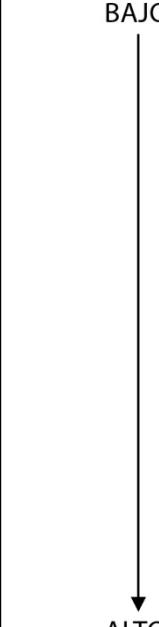
los animales que recibieron muestras con 39 % de AS y tasas de supervivencia inferiores a 24 % de AS (Figura 10).

Estudio 8

5 Para investigar la contribución del componente de ácido siálico, se probó el antígeno V del polisacárido capsular de *Streptococcus agalactiae* conjugado con CRM197. Se prepararon lotes de vacunas con diferente contenido de ácido siálico y se usaron para inmunizar ratones. Se produjeron lotes monovalentes de conjugados de polisacárido-CRM197 con diferente contenido de ácido siálico, del 100 % al 25 %, mediante al tratamiento de conjugados nativos en condiciones ácidas suaves (por ejemplo, a pH 4,75 a 80 °C para diferentes tiempos de incubación).

Vacuna de PSV-CRM197	% de NeuNAc	% de protección (CJB111)
Lote 1 + Alumbre	100	66
Lote 2 + Alumbre	100	81
Lote 3 + Alumbre	100	69
Lote 4 + Alumbre	100	73
Lote 5 + Alumbre	75	45
Lote 6 + Alumbre	50	22
Lote 7 + Alumbre	50	36
Lote 8 + Alumbre	50	46
Lote 9 + Alumbre	25	38
Lote 10 + Alumbre	25	17
Lote 11 + Alumbre	25	10
Control (solo alumbre)	-	11
Control 2 (solo alumbre)	-	2

La eliminación de NeuNAc parece afectar a la protección tras la vacunación en ratones. Estos experimentos sugieren que los conjugados de polisacárido de tipo V en los que el contenido de NeuNAc es superior al 75 % son útiles.

CRM197:PSV	% de NeuNAc	% de protección (CJB111)	Nivel de entrecruzamiento
0,25:1,0	0	100	BAJO  ALTO
0,5:1,0	0	79	
0,5:1,0	0	48	
1,0:1,0	0	32	
1,0:1,0	0	46	
1,5:1,0	0	42	
1,5:1,0	0	43	
2,0:1,0	0	13	
3,0:1,0	0	37	
4,0:1,0	0	31	
Control (solo alumbre)	0	5	

10 La inmunogenicidad de los conjugados de Polisacárido V-polisacárido desialilado de CRM197 es inversamente proporcional a su nivel de entrecruzamiento. Por lo tanto, cuando una composición inmunogénica comprende polisacárido de tipo V, en particular, polisacárido desialilado, los conjugados con niveles inferiores de entrecruzamiento de proteína:polisacárido pueden ser beneficiosos.

Aspectos

15 Aspecto 1. Una composición inmunogénica que comprende: a) un conjugado que es un sacárido capsular del serotipo Ia de GBS conjugado con un vehículo proteico; b) un conjugado que es un sacárido capsular del serotipo Ib de GBS conjugado con un vehículo proteico; c) un conjugado que es un sacárido capsular del serotipo III de

GBS conjugado con un vehículo proteico; d) un conjugado que es un sacárido capsular del serotipo II de GBS conjugado con un vehículo proteico; y e) un conjugado que es un sacárido capsular del serotipo V de GBS conjugado con un vehículo proteico.

5 Aspecto 2. La composición inmunogénica de acuerdo con la realización 1, en la que la cantidad total de sacáridos capsulares de GBS es $\leq 70 \mu\text{g}$.

Aspecto 3. La composición inmunogénica de acuerdo con la realización 1 o la realización 2, en la que cada sacárido capsular de GBS está presente en una cantidad de 1 a $30 \mu\text{g}$ por dosis unitaria.

Aspecto 4. La composición inmunogénica de acuerdo con la realización 3, en la que cada sacárido capsular de GBS está presente en una cantidad de $5 \mu\text{g}$, $10 \mu\text{g}$ o $20 \mu\text{g}$ por dosis unitaria.

10 Aspecto 5. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que las cantidades de los sacáridos capsulares de GBS de los serotipos Ia, Ib, II, V y III por dosis unitaria, se seleccionan del grupo constituido por $20 \mu\text{g}$, $20 \mu\text{g}$, $20 \mu\text{g}$, $20 \mu\text{g}$ y $20 \mu\text{g}$; $10 \mu\text{g}$, $10 \mu\text{g}$, $10 \mu\text{g}$, $10 \mu\text{g}$ y $10 \mu\text{g}$; y $5 \mu\text{g}$, $5 \mu\text{g}$, $5 \mu\text{g}$, $5 \mu\text{g}$ y $5 \mu\text{g}$

15 Aspecto 6. La composición inmunogénica de acuerdo con la realización 5, en la que las cantidades de los sacáridos capsulares de GBS de los serotipos Ia, Ib, II, V y III por dosis unitaria es de $5 \mu\text{g}$, $5 \mu\text{g}$, $5 \mu\text{g}$, $5 \mu\text{g}$ y $5 \mu\text{g}$.

Aspecto 7. La composición inmunogénica de acuerdo con la realización 1 o la realización 2, en la que cada sacárido capsular de GBS está presente en una cantidad de 0,1 a $5 \mu\text{g}$ por dosis unitaria.

Aspecto 8. La composición inmunogénica de acuerdo con la realización 7, en la que cada sacárido capsular de GBS es presente en una cantidad de 0,5, 2,5 o $5 \mu\text{g}$ por dosis unitaria.

20 Aspecto 9. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que la proporción de las masas de los sacáridos capsulares de GBS de los serotipos Ia, Ib, II, V y III es de 1:1:1:1:1.

Aspecto 10. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 9, en la que la composición es para la administración en una dosis unitaria seguida de una segunda dosis unitaria administrada 3 meses después de la primera dosis unitaria.

25 Aspecto 11. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que la composición es para la administración en una dosis unitaria seguida de una segunda dosis unitaria administrada 1 mes después de la primera dosis unitaria.

Aspecto 12. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-9 y 11, en la que la composición es para la administración en una sola dosis.

30 Aspecto 13. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que la composición inmunogénica no contiene un adyuvante de sal de aluminio.

Aspecto 14. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que la composición inmunogénica no contiene ningún adyuvante.

35 Aspecto 15. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que los vehículos proteicos de a), b), c), d) y e) son el toxoide diftérico, el toxoide tetánico o CRM197.

Aspecto 16. La composición inmunogénica de acuerdo con la realización 15, en la que los vehículos proteicos de a), b), c), d) y e) son CRM197.

40 Aspecto 17. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que el sacárido capsular del serotipo Ia de GBS tiene un PM en el intervalo de 150-300 kDa; el sacárido capsular del serotipo Ib de GBS tiene un PM en el intervalo de 150-300 kDa; el sacárido capsular del serotipo III de GBS tiene un PM en el intervalo de 50-200 kDa; el sacárido capsular del serotipo II de GBS tiene un PM en el intervalo de 150-300 kDa; y el sacárido capsular de BGS del serotipo V tiene un PM en el intervalo de 150-300 kDa.

45 Aspecto 18. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que el conjugado que es un sacárido capsular del serotipo Ia de GBS conjugado con vehículo proteico tiene una proporción de sacárido:proteína (p/p) de entre aproximadamente 1:1 a 1:2; el conjugado que es un sacárido capsular del serotipo Ib de GBS conjugado con un vehículo proteico tiene una proporción de sacárido:proteína (p/p) de entre aproximadamente 1:1 a 1:2; el conjugado que es un sacárido capsular del serotipo II de GBS conjugado con un vehículo proteico tiene una proporción de sacárido:proteína (p/p) de entre aproximadamente 1:1 a 1:2; el conjugado que es un sacárido capsular del serotipo V de GBS conjugado con un vehículo proteico tiene una proporción de sacárido:proteína (p/p) de entre aproximadamente 1:1 a 1:2; y el conjugado que es un sacárido capsular del serotipo III de GBS conjugado con vehículo proteico tiene una proporción de sacárido-proteína (p/p) de entre aproximadamente 3:1 a 1:1.

50

- Aspecto 19. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que la composición es para la administración por vía intramuscular.
- Aspecto 20. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que la composición es una solución o suspensión líquida inyectable.
- 5 Aspecto 21. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-19, en la que la composición está liofilizada.
- Aspecto 22. La composición inmunogénica de acuerdo con la realización 21, en la que la composición comprende manitol para estabilizar el conjugado o los conjugados.
- 10 Aspecto 23. Las composiciones inmunogénicas de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores, en las que la composición comprende un tampón de dihidrogenofosfato de potasio.
- Aspecto 24. Las composiciones inmunogénicas de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores, en las que la composición comprende cloruro de sodio.
- Aspecto 25. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que la composición es una vacuna.
- 15 Aspecto 26. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que la composición es para la administración a un ser humano.
- Aspecto 27. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que la composición es para la administración a seres humanos seleccionados de mujeres en edad fértil, mujeres embarazadas y pacientes de edad avanzada.
- 20 Aspecto 28. La composición inmunogénica de acuerdo con la realización 27, en la que la composición es para la administración a una mujer embarazada.
- Aspecto 29. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 26-28, en la que antes de la administración, el ser humano tiene niveles indetectables de anticuerpos contra el sacárido capsular del serotipo Ia de GBS, el sacárido capsular del serotipo Ib de GBS, el sacárido capsular del serotipo II de GBS, el sacárido capsular del serotipo V de GBS y/o el sacárido capsular del serotipo III de GBS.
- 25 Aspecto 30. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que la composición es para su uso como un medicamento.
- Aspecto 31. La composición inmunogénica de acuerdo con la realización 30, en la que la composición es para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad causada por *S. agalactiae*.
- 30 Aspecto 32. La composición inmunogénica de acuerdo con la realización 31, en la que la enfermedad es septicemia neonatal, bacteriemia, neumonía neonatal, meningitis neonatal, endometritis, osteomielitis o artritis séptica.

Referencias

- 35 [1] Paoletti y col. (1990) *J Biol Chem* 265:18278-83.
 [2] Wessels y col. (1990) *J Clin Invest* 86:1428-33.
 [3] Paoletti y col. (1992) *Infect Immun* 60:4009-14.
 [4] Paoletti y col. (1992) *J Clin Invest* 89:203-9.
 [5] Wessels y col. (1987) *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 84:9170-4.
 [6] Wang y col. (2003) *Vaccine* 21:1112-7.
- 40 [7] Wessels y col. (1993) *Infect Immun* 61:4760-6
 [8] Wessels y col. (1995) *J Infect Dis* 171:879-84.
 [9] Baker y col. (2004) *J Infect Dis* 189:1103-12.
 [10] Paoletti y Kasper (2003) *Expert Opin Biol Ther* 3:975-84.
- 45 [11] Documento WO2012/035519
 [12] Lewis y col. (2004) *PNAS EE.UU.* 101:11123-8.
 [13] Documento WO2006/050341
 [14] Guttormsen y col. (2008) *Proc Natl Acad Sci, EE.UU.* 105(15):5903-8. Epub de 31 de marzo de 2008.
 [15] Documento WO96/40795
- 50 [16] Michon y col. (2006) *Clin Vaccine Immunol.* Agosto de 2006;13(8):936-43.
 [17] Patentes de EE.UU. n.º 6027733 y 6274144.
 [18] www.polymer.de
 [19] Wessels y col. (1989) *Infect Immun* 57:1089-94.
 [20] Documento WO2006/082527.

- [21] Solicitud de patente de EE.UU. US 61/008.941, Titulada "FERMENTATION PROCESSES FOR CULTIVATING STREPTOCOCCI AND PURIFICATION PROCESSES FOR OBTAINING CPS THEREFROM" presentada el 20 de diciembre de 2007 y la solicitud de patente internacional WO 2009/081276.
- [22] Ramsay y col. (2001) *Lancet* 357(9251):195-196.
- 5 [23] Lindberg (1999) *Vaccine* 17 Supl 2:S28-36.
- [24] Buttery y Moxon (2000) *J R Coll Physicians Lond* 34:163-68.
- [25] Ahmad y Chapnick (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:113-33, vii.
- [26] Goldblatt (1998) *J. Med. Microbiol.* 47:563-7.
- [27] Patente europea n.º 0477508.
- 10 [28] Patente de EE.UU. n.º 5.306.492.
- [29] Documento WO98/42721.
- [30] Dick y col. en "Conjugate Vaccines", (editores Cruse y col.) Karger, Basel, 1989, 10:48-114.
- [31] Hermanson Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego (1996) ISBN: 0123423368.
- [32] Patente de EE.UU. n.º 4356170.
- 15 [33] Documento WO2006/082530.
- [34] Documento WO2005/000346
- [35] Divulgación de investigación anónima (enero de 2002), 453077.
- [36] Anderson (1983) *Infect Immun* 39(1):233-238.
- [37] Anderson y col. (1985) *J Clin Invest* 76(1):52-59.
- 20 [38] Documento EP-A-0372501.
- [39] Documento EP-A-0378881.
- [40] Documento EP-A-0427347.
- [41] Documento WO93/17712
- [42] Documento WO94/03208.
- 25 [43] Documento WO98/58668.
- [44] Documento EP-A-0471177.
- [45] Documento WO91/01146
- [46] Falugi y col. (2001) *Eur J Immunol* 31:3816-24.
- [47] Baraldo y col. (2004) *Infect Immun* 72:4884-87.
- 30 [48] Documento EP-A-0594610.
- [49] Documento WO00/56360.
- [50] Documento WO02/091998.
- [51] Kuo y col. (1995) *Infect Immun* 63:2706-13.
- [52] Documento WO01/72337
- 35 [53] Documento WO00/61761.
- [54] Documento WO00/33882
- [55] Documento WO99/42130.
- [56] Documento WO2004/011027.
- [57] Documento WO96/40242.
- 40 [58] Lei y col. (2000) *Dev Biol* (Basel) 103:259-264.
- [59] Documento WO00/38711; Patente de EE.UU. n.º 6.146.902.
- [60] Solicitud de patente internacional PCT/IB2008/02690, "CONJUGATE PURIFICATION", que reclama la prioridad con respecto al documento GB-0713880.3 (NOVARTIS AG), publicado como WO 2009/010877.
- 45 [61] Paoletti y col. (2001) *Vaccine* 19:2118-2126.
- [62] Documento WO00/56365.
- [63] Gennaro (2000) "Remington: The Science and Practice of Pharmacy". 20ª edición, ISBN: 0683306472.
- [64] Paoletti (2001) *Vaccine* 19(15-16):2118-26.
- [65] Documento WO03/009869.
- 50 [66] Almeida y Alpar (1996) *J. Drug Targeting* 3:455-467.
- [67] Agarwal y Mishra (1999) *Indian J Exp Biol* 37:6-16.
- [68] Documento WO00/53221.
- [69] Jakobsen y col. (2002) *Infect Immun* 70:1443-1452.
- [70] Bergquist y col. (1998) *APMIS* 106:800-806.
- [71] Baudner y col. (2002) *Infect Immun* 70:4785-4790.
- 55 [72] Ugozzoli y col. (2002) *J Infect Dis* 186:1358-1361.
- [73] Patente de EE.UU. n.º 6355271.
- [74] Documento WO00/23105.
- [75] "Vaccine Design". (1995), editores Powell y Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.
- [76] Documento WO90/14837.
- 60 [77] Podda (2001) *Vaccine* 19:2673-80.
- [78] Frey y col. (2003) *Vaccine* 21:4234-7.
- [79] Patente de EE.UU. n.º 6.299.884.
- [80] Patente de EE.UU. n.º 6.451.325.
- [81] Patente de EE.UU. n.º 5.057.540.
- 65 [82] Documento WO96/33739.
- [83] Documento EP-A-0109942.

- [84] Documento WO96/11711.
 [85] Documento WO00/07621.
 [86] Barr y col. (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:247-271.
 [87] Sjolanderet y col. (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:321-338.
 5 [88] Niikura y col. (2002) *Virology* 293:273-280.
 [89] Lenz y col. (2001) *J Immunol* 166:5346-5355.
 [90] Pinto y col. (2003) *J Infect Dis* 188:327-338.
 [91] Gerber y col. (2001) *Viral* 75:4752-4760.
 [92] Documento WO03/024480
 10 [93] Documento WO03/024481
 [94] Gluck y col. (2002) *Vaccine* 20:B10-B16.
 [95] Documento EP-A-0689454.
 [96] Johnson y col. (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.
 [97] Evans y col. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:219-229.
 15 [98] Meraldi y col. (2003) *Vaccine* 21:2485-2491.
 [99] Pajak y col. (2003) *Vaccine* 21:836-842.
 [100] Kandimalla y col. (2003) *Nucleic Acids Research* 31:2393-2400.
 [101] Documento WO02/26757.
 [102] Documento WO99/62923.
 20 [103] Krieg (2003) *Nature Medicine* 9:831-835.
 [104] McCluskie y col. (2002) "FEMS Immunology and Medical Microbiology" 32:179-185.
 [105] Documento WO98/40100.
 [106] Patente de EE.UU. n.º 6.207.646.
 [107] Patente de EE.UU. n.º 6.239.116.
 25 [108] Patente de EE.UU. n.º 6.429.199.
 [109] Kandimalla y col. (2003) "Biochemical Society Transactions", 31 (parte 3):654-658.
 [110] Blackwell y col. (2003) *J Immunol* 170:4061-4068.
 [111] Krieg (2002) *Trends Immunol* 23:64-65.
 [112] Documento WO01/95935.
 30 [113] Kandimalla y col. (2003) *BBRC* 306:948-953.
 [114] Bhagat y col. (2003) *BBRC* 300:853-861.
 [115] Documento WO03/035836.
 [116] Documento WO95/17211.
 [117] Documento WO98/42375.
 35 [118] Beignon y col. (2002) *Infect Immun* 70:3012-3019.
 [119] Pizza y col. (2001) *Vaccine* 19:2534-2541.
 [120] Pizza y col. (2000) *Int J Med Microbiol* 290:455-461.
 [121] Scharton-Kersten y col. (2000) *Infect Immun* 68:5306-5313.
 [122] Ryan y col. (1999) *Infect Immun* 67:6270-6280.
 40 [123] Partidos y col. (1999) *Immunol Lett* 67:209-216.
 [124] Peppoloni y col. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:285-293.
 [125] Pine y col. (2002) *J Control Release* 85:263-270.
 [126] Domenighini y col. (1995) *Mol Microbiol* 15:1165-1167.
 [127] Documento WO99/40936.
 45 [128] Documento WO99/44636.
 [129] Singh y col] (2001) *J Cont Release* 70:267-276.
 [130] Documento WO99/27960.
 [131] Patente de EE.UU. n.º 6.090.406
 [132] Patente de EE.UU. n.º 5.916.588
 50 [133] Documento EP-A-0626169.
 [134] Documento WO99/52549.
 [135] Documento WO01/21207.
 [136] Documento WO01/21152.
 [137] Andrianov y col. (1998) *Biomaterials* 19:109-115.
 55 [138] Payne y col. (1998) *Adv Drug Delivery Review* 31:185-196.
 [139] Stanley (2002) *Clin Exp Dermatol* 27:571-577.
 [140] Jones (2003) *Curr Opin Investig Drugs* 4:214-218.
 [141] Documento WO04/60308
 [142] Documento WO04/64759.
 60 [143] Documento WO99/11241.
 [144] Documento WO94/00153.
 [145] Documento WO98/57659.
 [146] Solicitudes de patente europeas 0835318, 0735898 y 0761231.
 [147] Hennings y col. (2001) *J Infect Dis*. 183(7):1138-42. Epub de 1 de marzo de 2001.
 65 [148] Lin y col. (2001) *J Infect Dis*. 184(8):1022-8.
 [149] Lin y col. (2004) *J Infect Dis*. 190(5):928-34

- [150] Glezen y Alpers (1999) *Clin. Infect. Dis.* 28:219-224
- [151] Madoff y col. (1994) *J Clin Invest* 94:286-92.
- [152] Paoletti y col. (1994) *Infect Immun* 62:3236-43.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición inmunogénica que comprende: a) un conjugado que es un sacárido capsular del serotipo Ia de GBS conjugado con CRM197; b) un conjugado que es un sacárido capsular del serotipo Ib de GBS conjugado con CRM197; c) un conjugado que es un sacárido capsular del serotipo III de GBS conjugado con CRM197; d) un conjugado que es un sacárido capsular del serotipo II de GBS conjugado con CMR197; y e) un conjugado que es un sacárido capsular del serotipo V de GBS conjugado con CMR197, en la que el sacárido capsular del serotipo V de GBS tiene un contenido de NeuNAc superior al 75 % en comparación con el polisacárido de serotipo V de GBS nativo en el que se considera que el contenido de NeuNAc es de aproximadamente 100 %.
- 10 2. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que cada sacárido capsular de GBS está presente en una cantidad de 1 a 30 µg por dosis unitaria.
3. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la proporción de las masas de los sacáridos capsulares de serotipo Ia, Ib, II, V y III de GBS son 1:1:1:1:1.
- 15 4. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la composición es para la administración en una sola dosis.
- 15 5. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición inmunogénica no contiene un adyuvante de sal de aluminio.
- 20 6. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición inmunogénica no contiene ningún adyuvante.
- 20 7. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el sacárido capsular del serotipo Ia de GBS tiene un PM en el intervalo de 150-300 kDa; el sacárido capsular del serotipo Ib de GBS tiene un PM en el intervalo de 150-300 kDa; el sacárido capsular del serotipo III de GBS tiene un PM en el intervalo de 50-200 kDa; el sacárido capsular del serotipo II de GBS tiene un PM en el intervalo de 150-300 kDa; y el sacárido capsular de BGS del serotipo V tiene un PM en el intervalo de 150-300 kDa.
- 25 8. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el conjugado que es un sacárido capsular del serotipo Ia de GBS conjugado con CMR197 tiene una proporción de sacárido:proteína (p/p) de entre aproximadamente 1:1 y 1:2; el conjugado que es un sacárido capsular del serotipo Ib de GBS conjugado con CMR197 tiene una proporción de sacárido:proteína (p/p) de entre aproximadamente 1:1 y 1:2; el conjugado que es un sacárido capsular del serotipo II de GBS conjugado con CMR197 tiene una proporción de sacárido:proteína (p/p) de entre aproximadamente 1:1 y 1:2; el conjugado que es un sacárido capsular del serotipo V de GBS conjugado con un vehículo proteico tiene una proporción de sacárido:proteína (p/p) de entre aproximadamente 1:1 y 1:2; y el conjugado que es un sacárido capsular del serotipo III de GBS conjugado con CMR197 tiene una proporción de sacárido:proteína (p/p) de entre aproximadamente 3:1 y 1:1.
- 30 9. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición es adecuada para la administración por vía intramuscular.
- 35 10. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición es una solución o suspensión líquida inyectable.
11. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en la que la composición está liofilizada.
- 40 12. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición es una vacuna.
13. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición es adecuada para la administración a un ser humano, en particular, seleccionado entre mujeres en edad fértil, mujeres embarazadas y pacientes de edad avanzada.
- 45 14. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 13, en la que la composición es adecuada para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad causada por *S. agalactiae*, por ejemplo, septicemia neonatal, bacteriemia, neumonía neonatal, meningitis neonatal, endometritis, osteomielitis o artritis séptica.
15. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición es para su uso como un medicamento.
- 50 16. La composición inmunogénica para su uso de acuerdo con la reivindicación 15, en la que la composición es para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad causada por *S. agalactiae*.
17. La composición inmunogénica para su uso de acuerdo con la reivindicación 16, en la que la enfermedad es septicemia neonatal, bacteriemia, neumonía neonatal, meningitis neonatal, endometritis, osteomielitis o artritis séptica.

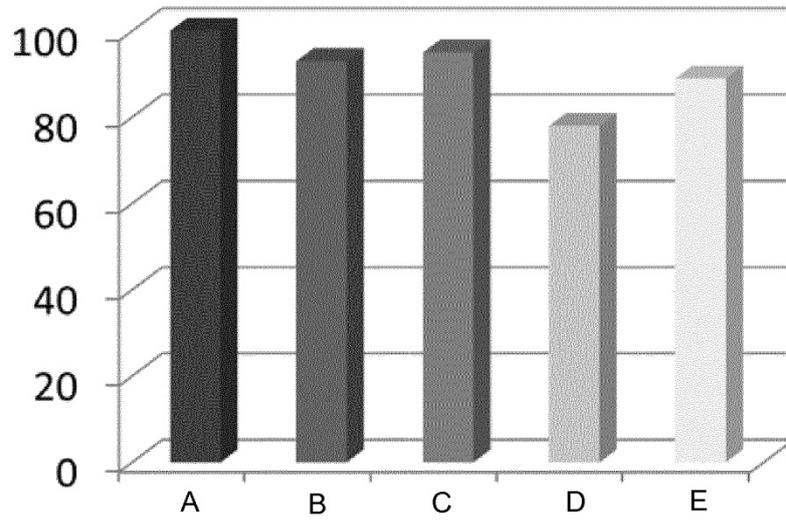


Fig. 1

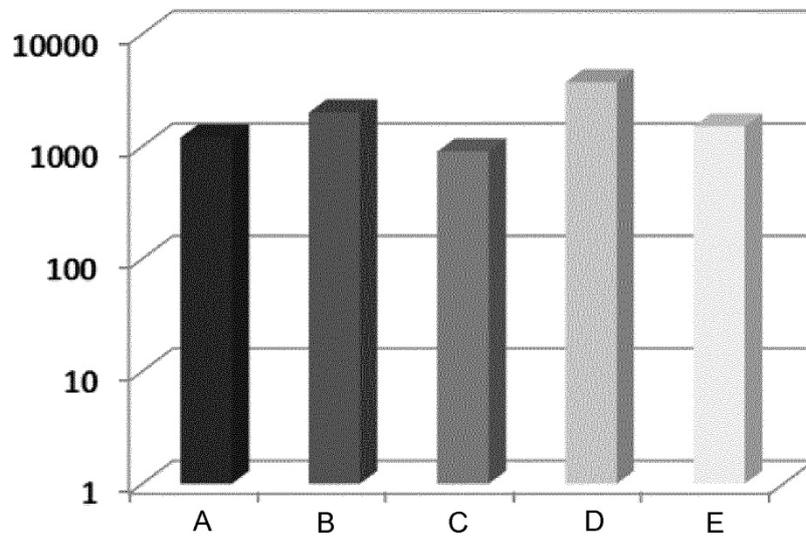


Fig. 2

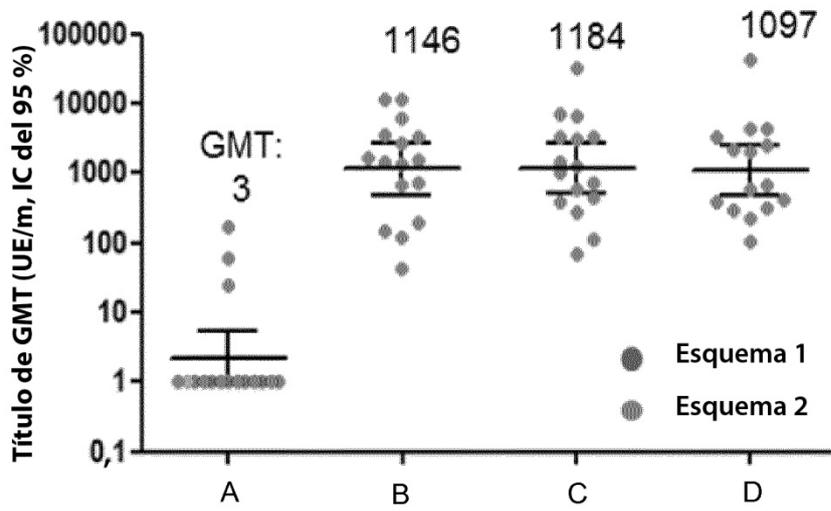


Fig. 3A

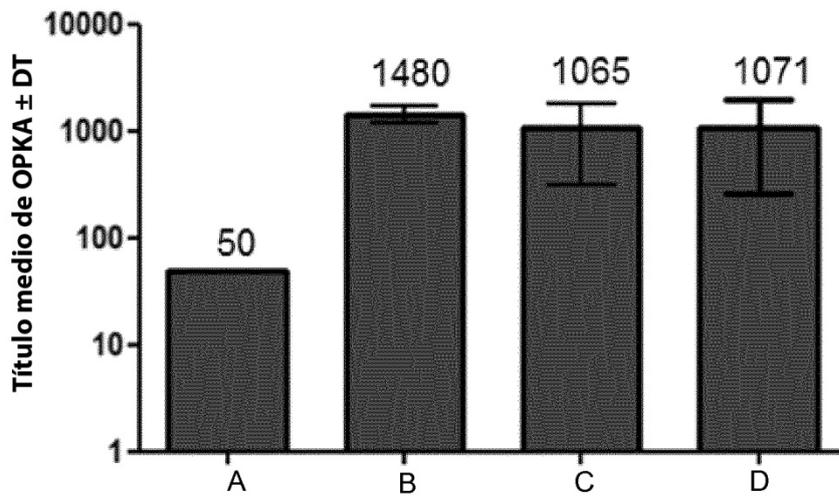


Fig. 3B

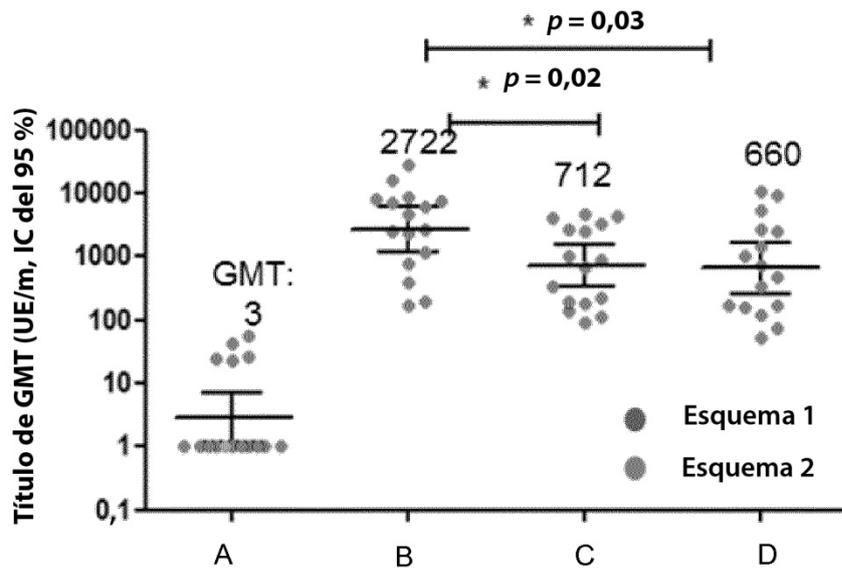


Fig. 4A

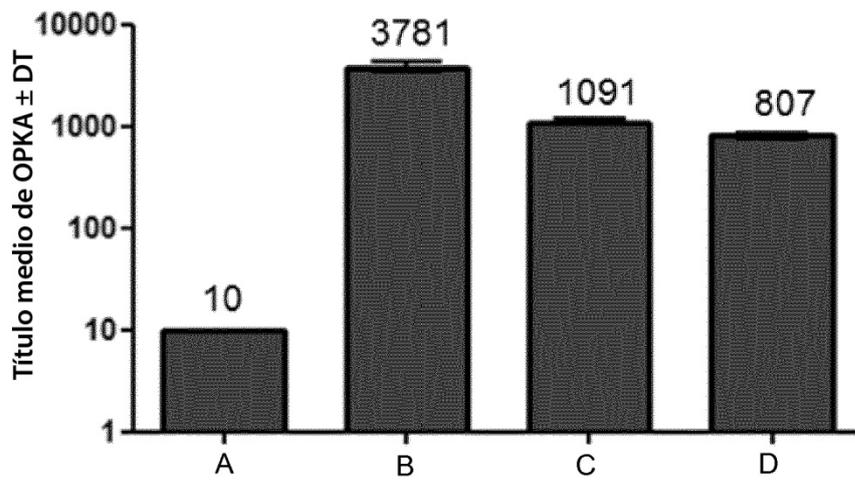


Fig. 4B

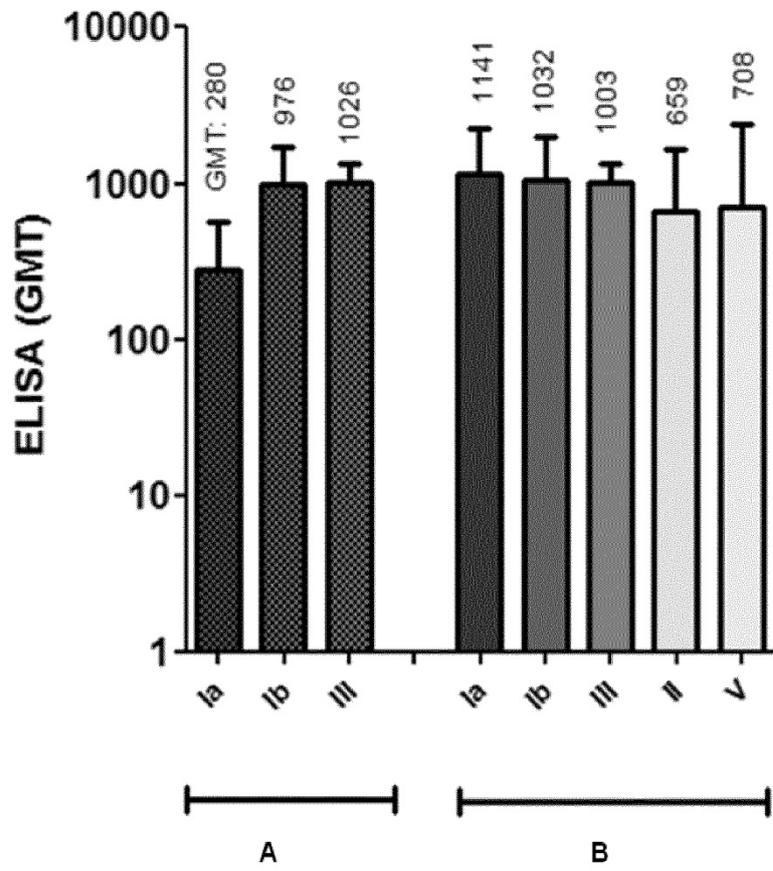


Fig. 5A

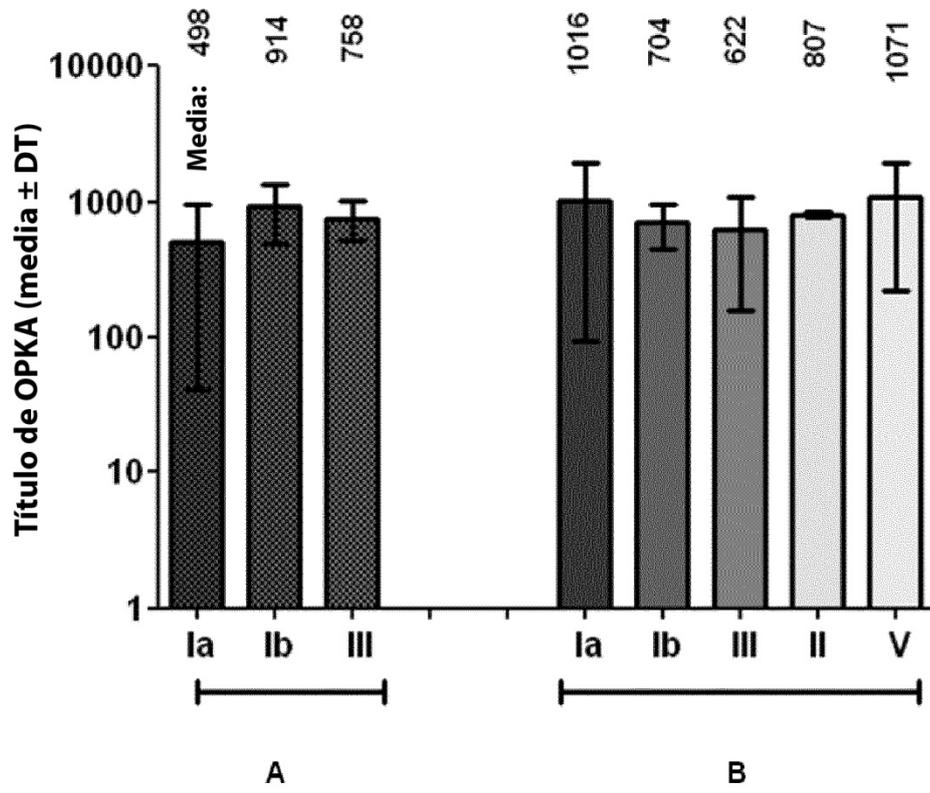


Fig. 5B

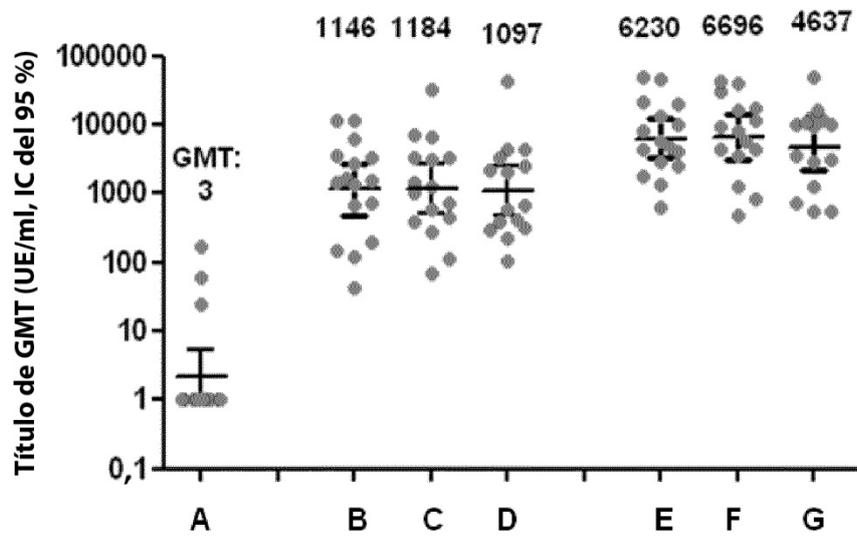


Fig. 6

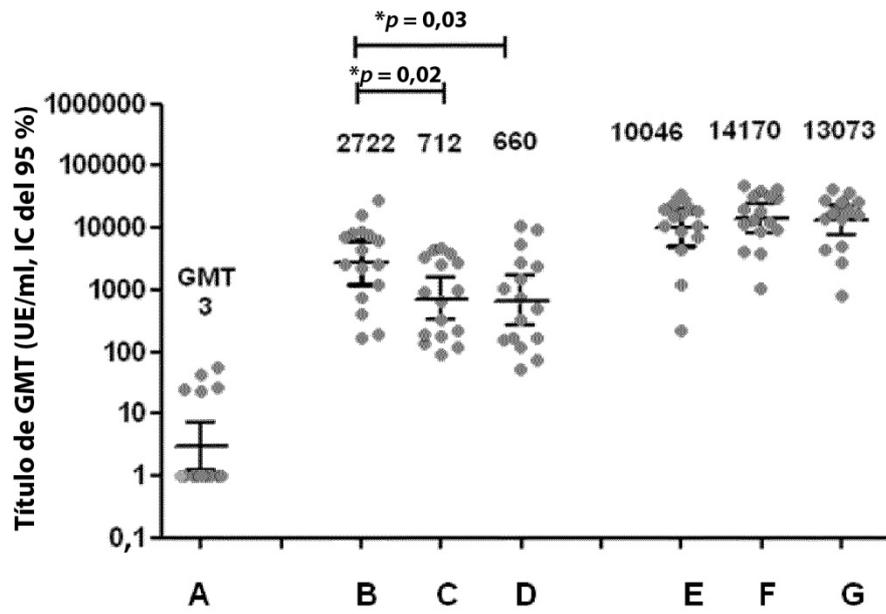


Fig. 7

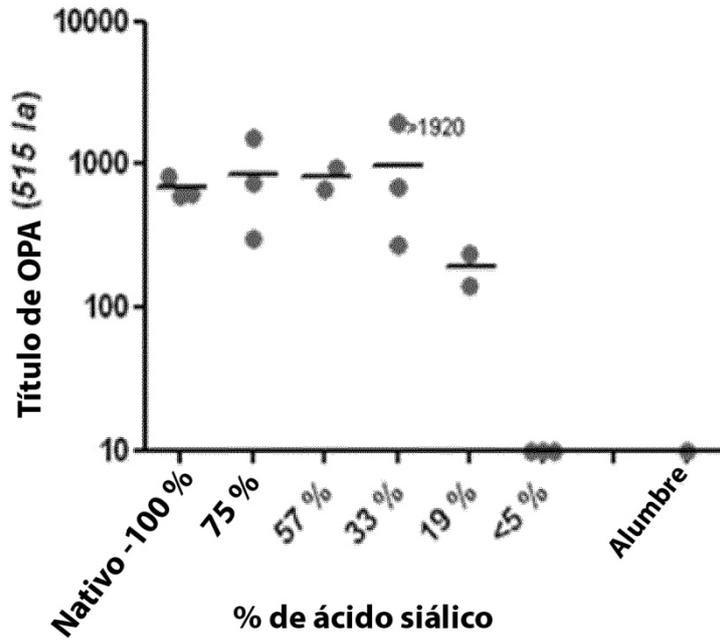


Fig. 8A

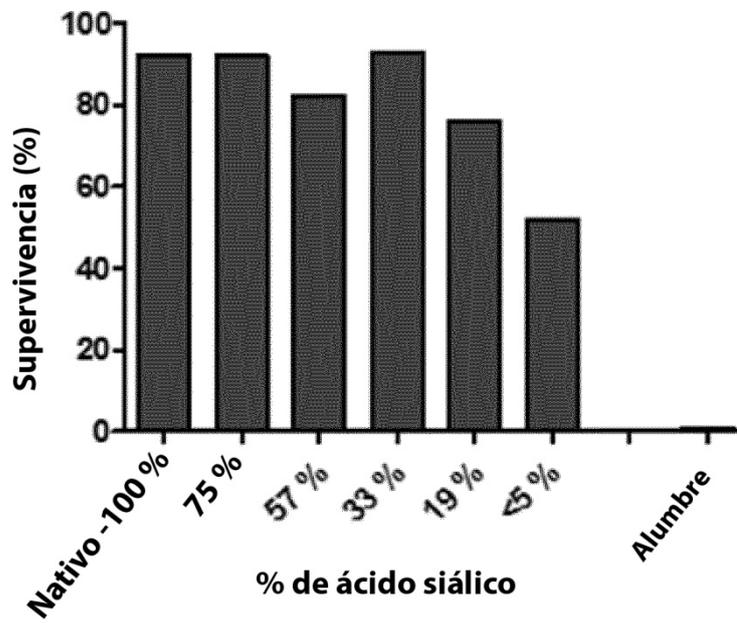


Fig. 8B

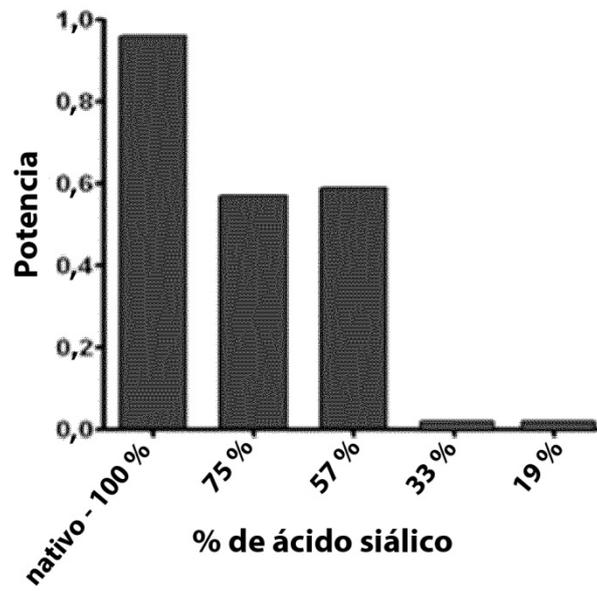


Fig. 8C

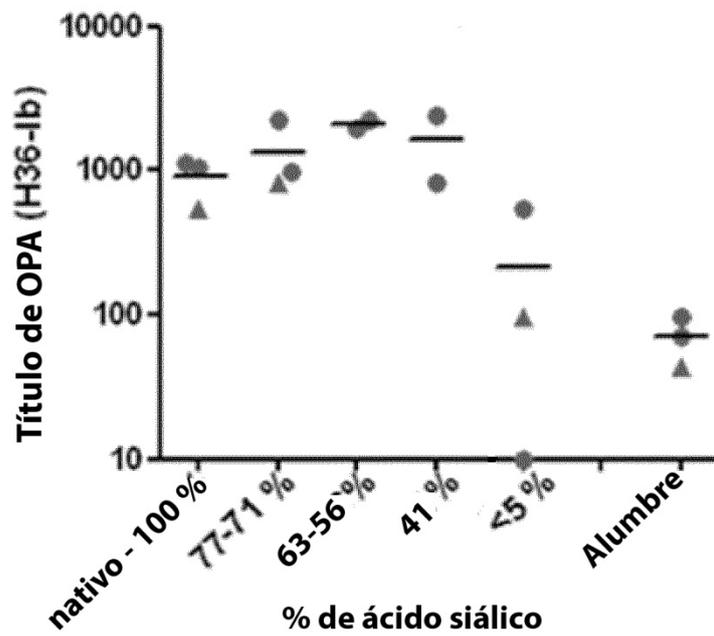


Fig. 9A

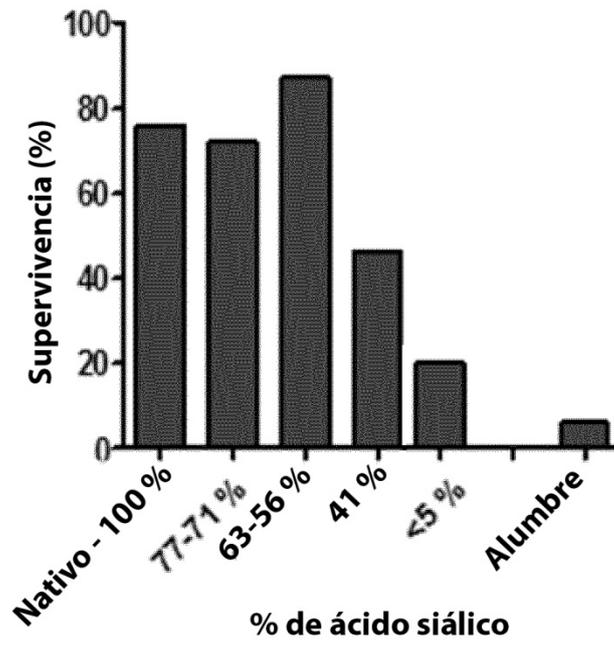


Fig. 9B

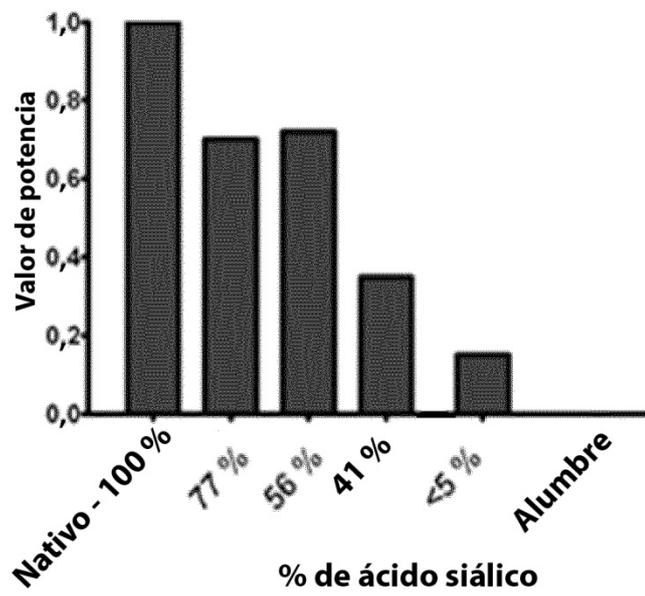


Fig. 9C

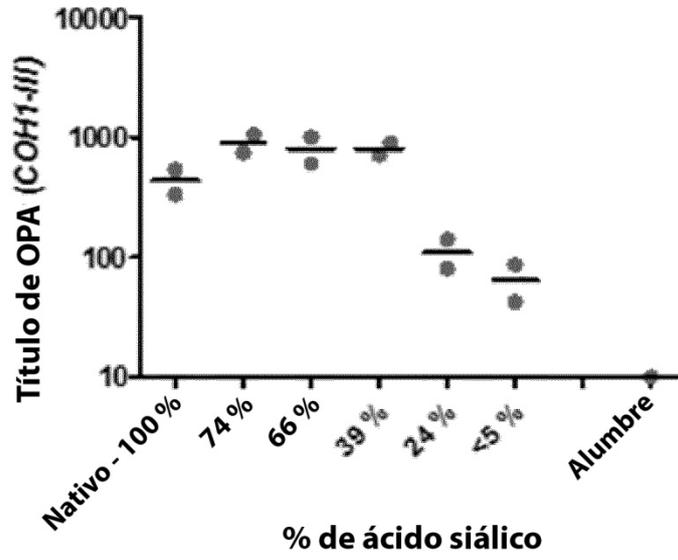


Fig. 10A

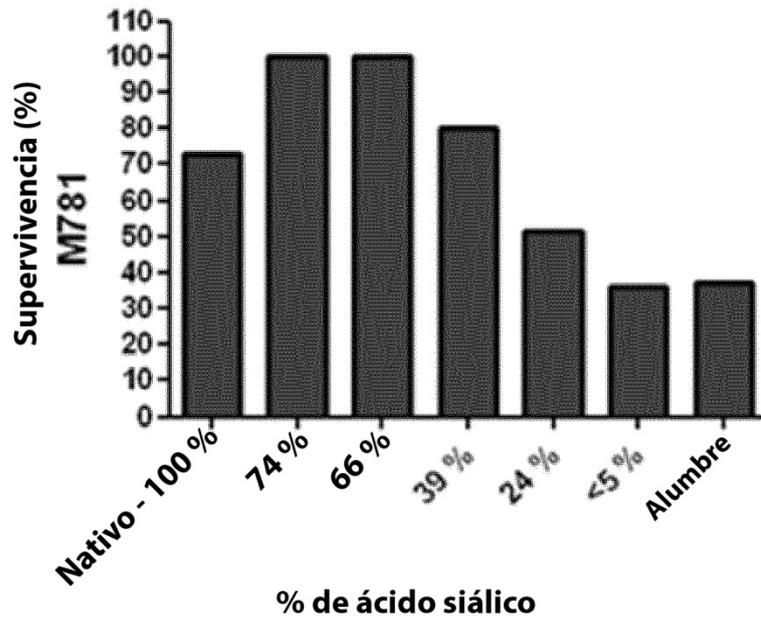


Fig. 10B