

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:
see form PCT/ISA/220

PCT

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (PCT Rule 43*bis*.1)

Date of mailing (day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION See paragraph 2 below
--

International application No. PCT/IB2016/052455	International filing date (day/month/year) 29.04.2016	Priority date (day/month/year) 04.05.2015
International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC INV. C07K16/12 A61K39/09		
Applicant PFIZER INC.		

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☒ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step and industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1*bis*(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Fax: +49 89 2399 - 4465	Date of completion of this opinion see form PCT/ISA/210	Authorized Officer Rojo Romeo, Elena Telephone No. +49 89 2399-0	
--	--	--	---

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed.
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. ☐ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of a sequence listing:
 - a. ☐ forming part of the international application as filed:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☒ In response to the invitation (Form PCT/ISA/206) to pay additional fees, the applicant has, within the applicable time limit:
- ☒ paid additional fees
 - ☐ paid additional fees under protest and, where applicable, the protest fee
 - ☐ paid additional fees under protest but the applicable protest fee was not paid
 - ☐ not paid additional fees
2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees.
3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rule 13.1, 13.2 and 13.3 is
- ☐ complied with
 - ☒ not complied with for the following reasons:
see separate sheet
4. Consequently, this report has been established in respect of the following parts of the international application:
- ☒ all parts.
 - ☐ the parts relating to claims Nos.

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>14, 19-23, 86-121</u>
	No: Claims	<u>1-13, 15-18, 24-85, 122</u>
Inventive step (IS)	Yes: Claims	<u>20-23</u>
	No: Claims	<u>1-19, 24-122</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-122</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

Re Item IV

Lack of unity of invention

According to Rule 13 PCT an application shall relate to one invention only or to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept, i.e. having at least one common technical feature defining a contribution over the known prior art.

Present independent claims 1, 12, 30-34, 80, 85, 122 are linked by the single general concept of a polysaccharide-protein conjugate from GBS (in claim 12, not even from GBS).

Since polysaccharide-protein conjugate and immunogenic compositions comprising them were already known from prior art (see e.g. WO2014/053607, US5795580 or US2001051364; cited passages), this single general concept is not novel and thus cannot be inventive. There is thus lack of unity between these independent claims.

Claim 1, 30-34, provide independent solutions to the problem of providing an immunogenic polysaccharide-protein conjugate comprising a capsular polysaccharide from GBS.

The solutions provided by these claims are however not the same nor corresponding in view of the prior art which discloses capsular polysaccharide (CPS) conjugates from GBS. for instance, WO2014/053607 (examples and passages cited) discloses the investigation of the immunogenicity of lyophilized GBS trivalent vaccines (Ia, Ib, III polysaccharides conjugated to CRM 197) reconstituted with: (i) Alum adjuvanted liquid vaccine containing Tetanus, Diphteria and Acellular Pertussis antigens (TdaP) and (ii) Alum adjuvanted liquid vaccine containing Tetanus, Diphteria, Acellular Pertussis and Polio antigens (TdaP-IPV).

Furthermore, at least 60% sialation is considered to be a result to be achieved since the claims lack the technical features to achieve this percentage of sialic acid content. Therefore, this feature does not confer novelty to present claims. Concerning this, it was known from prior art that the higher the sialisation, the more the GBS are pathogenic (see e.g. Teixeira et al. 1993, page 93, last par.).

Furthermore, culture conditions and serotypes influence the levels of sialic acid content of the capsular polysaccharide (Hunolstein et al.; results). Therefore, without the indication of what 100% sialisation means, percentages of sialisation are meaningless.

Furthermore, without the indication of how the percentage is determined (% of total CPS; % of chains (still) bearing sialic acid moieties...), this value is meaningless. for instance, D3/US2001051364 determines 100% CPS purity based on the content of sialic acid (par. 100 and 105) and cannot also for this reason be deemed to afford novelty to claim 1.

Each claim 1, 30-34 defines an independent group of inventions.

Claims 1-11, 29 (partially), 30-79, however, could be searched together. Therefore, no additional search fees are asked for these groups of inventions.

Independent claims 12, 27, 85 and 122 are directed to methods of isolating a capsular polysaccharide, or of making the capsular polysaccharide of claims 1-11 (which are not novel) or 28 (product-by-process of claims 12-26), i.e. by another method.

None of these methods identifies a step which is related to the content of sialic acid.

These claims provide each a solution to the problem of providing a method for the isolation of capsular polysaccharide without any connection to the immunogenic conjugate of claim 1-11. Their steps are not the same nor corresponding, and thus they define independent groups of inventions.

The methods of claims 12, 27 and 85 are thus not linked by any technical feature which could be considered to be a single general inventive concept.

Claim 12 is directed to a method of isolating a capsular polysaccharide comprising reacting an organic reagent with a cell broth comprising a capsular polysaccharide producing bacterium. This method does not even refer to GBS.

Concerning this, method claim 27 although referring to claims 1-11, actually refers to method claims 12-26. Claim 27 does not even have steps to define the method.

This group of inventions also contains claim 28 (product-by-process), and claim 29 (partially).

Claim 85 is directed to a method of making an immunogenic polysaccharide conjugate of claims 1-11 or 28, which are not deemed to be novel.

This method has the steps of (a) reacting the GBS capsular polysaccharide with an oxidizing agent resulting in an inactivated polysaccharide; and (b) reacting the activated polysaccharide with the carrier protein resulting in a polysaccharide-protein conjugate.

US5795580/D2 discloses the preparation of an immunogenic polysaccharide-protein conjugate comprising group B streptococcus (GBS) capsular polysaccharide. The sialic acid is activated by oxidation and coupled to carrier protein (see cited passages). The method of claim 85 is therefore disclosed in D2.

Due to this lack of novelty, no search fees were asked for this claim and its dependent claims.

Independent claim 122 seems completely unrelated to the other claims. It concerns a method of making a (GBS) polysaccharide-protein conjugate.

Claim 80 is directed to a capsular polysaccharide in the immunoconjugate of any of claims 1-11 or 28. This claim is thus directed to any GBS capsular polysaccharide.

Since claims 1-11 and 28 are deemed to lack novelty, the antibody of claim 80 and the method of producing an antibody comprising administering the immunogenic composition of any one of claims 29-63 to a subject, and a method of conferring passive immunity to a subject comprising administering said antibody are not unitary with the product claims and their therapeutic uses.

Concerning this, present applicant does not isolate any antibody at all.

Antibodies are prepared against GBS CPS and used in passive immunisation (see column 7, lines 35-53). Claims 80-84 thus lack novelty in view of D2.

Because of this lack of novelty, no search fees were requested for this group of inventions.

The final grouping is as listed.

1. claims: 1-11, 30-121 (completely); 29 (partially)

Claims searched

- 1.1. claims: 1-11(completely); 29(partially)

An immunogenic polysaccharide-protein conjugate comprising a group B streptococcus (GBS) capsular polysaccharide and a carrier protein, wherein the capsular polysaccharide has a sialic acid level of greater than about 60%, greater than about 95%, or about 100%; embodiments thereof.

- 1.2. claims: 30(completely); 37-79(partially)

An immunogenic composition comprising polysaccharide-protein conjugates, wherein the conjugates comprise capsular polysaccharides from group B streptococcus (GBS) serotype IV and at least one additional serotype selected from the group consisting of Ia, Ib, II, III, V, VI, VII, VIII, and IX; embodiments thereof.

- 1.3. claims: 31(completely); 37-79(partially)

An immunogenic composition comprising polysaccharide-protein conjugates, wherein the conjugates comprise capsular polysaccharides from GBS serotypes Ia, Ib, II, III, and IV; embodiments thereof.

- 1.4. claims: 32(completely); 37-79(partially)

An immunogenic composition comprising polysaccharide-protein conjugates, wherein the conjugates comprise capsular polysaccharides from GBS serotypes Ia, Ib, II, III, and V; embodiments thereof.

- 1.5. claims: 33(completely); 37-79(partially)

An immunogenic composition comprising polysaccharide-protein conjugates, wherein the conjugates comprise capsular polysaccharides from GBS serotypes Ia, Ib, II, III, IV, and V; embodiments thereof.

- 1.6. claims: 34-36(completely); 37-79(partially)

An immunogenic composition comprising polysaccharide-protein conjugates comprising at least four GBS capsular polysaccharide serotypes selected from the group consisting of Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, and IX; embodiments thereof.

- 1.7. claims: 80-84

An antibody that binds to a capsular polysaccharide in the immunogenic conjugate of any one of claims 1-11 or 28; embodiments thereof.

1.8. claims: 85-121

Method of making an immunogenic polysaccharide conjugate, having the steps of (a) reacting the GBS capsular polysaccharide with an oxidizing agent resulting in an inactivated polysaccharide; and (b) reacting the activated polysaccharide with the carrier protein resulting in a polysaccharide-protein conjugate.

2. claims: 12-28(completely); 29(partially)

Method of isolating a capsular polysaccharide comprising reacting an organic reagent with a cell broth comprising a capsular polysaccharide producing bacterium; embodiments thereof.

3. claim: 122

A method of making a polysaccharide-protein conjugate comprising the steps of:(a) reacting isolated GBS capsular polysaccharide with an oxidizing agent; (b) quenching the oxidation reaction of step (a) by addition of a quenching agent resulting in an activated GBS capsular polysaccharide; (c) compounding the activated GBS capsular polysaccharide with a carrier protein, (d) reacting the compounded activated GBS capsular polysaccharide and carrier protein with a reducing agent to form a GBS capsular polysaccharide-carrier protein conjugate, and (e) capping unreacted aldehyde by addition of sodium borohydride (NaBH_4), wherein steps (c) and (d) are carried out in DMSO.

Consequently, the Applicant was invited to pay additional fees for the claims which were not searched, i.e. concerning claims 12-28, and 122.

Since applicant paid the two requested additional search fees, present opinion concerns all claims.

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

Inventions 1-8 (groups 1.1-1.8)

1 Novelty (Art. 33(2) PCT)

- 1.1** WO2014/053607 (examples, page 3, line 4 to page 6, line 8) discloses the investigation of the immunogenicity of lyophilized GBS trivalent vaccines (Ia, Ib, III polysaccharides conjugated to CRM 197) reconstituted with: (i) Alum adjuvanted liquid vaccine containing Tetanus, Diphteria and Acellular Pertussis antigens (TdaP) and (ii) Alum adjuvanted liquid vaccine containing Tetanus, Diphteria, Acellular Pertussis and Polio antigens (TdaP-IPV).

GBS serotypes can be Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, or VIII (page 2, line 29-30). And the immunogenic composition can have one, two, three, four, or five serotypes (page 3, lines 4-13).

If this document does not disclose the content of sialic acid, it discloses that the sialation of the GBS capsular polysaccharides was known (page 2, line 16 to page 3, line 3).

At least 60% sialation is considered to be a result to be achieved since the claims lack the technical features to achieve this percentage of sialic acid content. Therefore, this feature does not confer novelty to present claims. Concerning this, it was known from prior art that the higher the sialisation, the more the GBS are pathogenic (see e.g. Teixeira et al. 1993, page 93, last par.).

Furthermore, culture conditions and serotypes influence the levels of sialic acid content of the capsular polysaccharide (Hunolstein et al.; results). Therefore, without the indication of what 100% sialisation means, percentages of sialisation are meaningless.

Furthermore, without the indication of how the percentage is determined (% of total CPS; % of chains (still) bearing sialic acid moieties...), this value is meaningless. for instance, D3/US2001051364 determines 100% CPS purity based on the content of sialic acid (par. 100 and 105) and cannot also for this reason be deemed to afford novelty to claim 1.

In summary, claims 1-3 are not novel.

- 1.2 Concerning this, Berti et al. disclose that the chemical structure of serotypes Ia, Ib, II-VIII was known (see citations 13-20 within) and discloses that of serotype IX. Since they are different, the definition of what the % of sialation means must be clear and adapted to each serotype.

The typical molecular range of GBS capsular polysaccharides vary depending on the serotype from 30-400 kDA in this document (page 7, lines 2-12), thus falling under the scope of claims 4 and 5.

- 1.3 O-acetylation may be completely lost (i.e. 0%) or partially (page 7, lines 13-23). Claims 6-9 thus lack novelty.

- 1.4 The carrier protein is CRM197 (page 9, lines 9-11, examples).
Claims 10 and 11 thus lack novelty.

- 1.5 For the same reasons, claims 29-34, 35 (serotype V), 36 (result to be achieved without indicating the necessary technical features), 37-46 (see e.g. claims 32, 33, 34, page 24, lines 12-15 of D1), 47-51 (page 26, line 3 to page 27, line 30 of D1), 52-63 (page 22, lines 1-12; page 25, line 24 of D1), 64-71 (page 30, line 28 to page 34, line 22 of D1) lack novelty.

For the same reasons, the methods of treatment of claims 72-79 lack novelty.

To summarise, claims 1-11, 29-79 are deemed to lack novelty in view of D1.

- 1.6 US5795580/D2 also discloses a similar teaching, including the preparation of an immunogenic polysaccharide-protein conjugate comprising group B streptococcus (GBS) capsular polysaccharide. The sialic acid is activated by oxidation and coupled to carrier protein (see cited passages). Claims 1-11, 29-79 are also objected to for lack of novelty in view of D2.

The method of claim 85 is therefore also disclosed in D2.

1.7 Furthermore, antibodies are prepared and used in passive immunisation (see column 7, lines 35-53). Claims 80-84 thus lack novelty in view of D2.

1.8 To summarise, claims 1-11, 29-79, 80-85 lack novelty.

2 Inventive activity (Art.33(3) PCT)

2.1 Claims 1-11, 30-79 are not deemed to be novel and, in any case, concern embodiments standard in the art and lack inventive activity also for this reason.

2.2 Concerning claims 80-84, D1 already discusses the passive immunisation of infants through maternal antibodies. Also in view of this information, the generation of antibodies against GBS capsular polysaccharides to confer passive immunity is not inventive.

2.3 The embodiments of claims 86-121 are standard conditions in the art and cannot impart inventive activity to the method of claim 85.

2.4 Consequently, claims 1-11, 29-79, 80-121 lack inventive step.

3 Industrial applicability (Art. 33(4) PCT)

Present claims 1-11, 29-79, 80-84 involve industrially applicable subject-matter.

4 REMARK

For the assessment of the present claims 72-79 and 84 on the question whether they are patentable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as patentable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may

allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

Patentability, in particular novelty and inventive step, of these claims has been assessed on the basis of a purpose-limited product claim taking into account the alleged effects of the compound/composition (Rule 39.1(iv) PCT).

Invention 9 (group 2)

5 Novelty (Art. 33(2) PCT)

Invention 9 concerns a method of isolating a capsular polysaccharide comprising reacting an organic reagent with a cell broth comprising a capsular polysaccharide producing bacterium.

EP0534764 discloses a method of isolating a capsular polysaccharide comprising reacting an organic reagent (phenol; page 19, lines 31-36) with a cell broth comprising a capsular polysaccharide producing bacterium and having a pH of 7 (*Neisseria meningitidis* Group B; page 18, lines 44-45). The bacterium was not lysed, but further centrifuged and diafiltered to obtain a cell paste (page 19, lines 38-41). OMPC is isolated, including an incubation step with SDS at 56 °C (page 19, lines 50-54). The use of these preparations is for either active or passive protection prophylactically or therapeutically against bacteremia caused by the cognate organism (page 14, lines 14-15).

Claims 12,13, 15,16,17,18, 24, 25, 26, 27, 28 and 29 lack novelty in view of this document.

6 Inventive step (Art. 33(3) PCT)

Claim 14 specifies that the bacterium is heat killed.

There does not seem to be any technical effect or advantage associated with this step. Therefore, inventive activity is denied.

Claim 19 concerns *Streptococcus agalactiae*.

S. agalactiae is one of the possible Group B bacteria to be treated. This particular choice, therefore, does not involve inventive activity.

Claims 20-23 concern hydroxyl amines.

A method of isolating a capsular polysaccharide comprising reacting a hydroxyl amine with the cell broth is not suggested in the prior art.

Claims 20-23 appear to be inventive.

Consequently, claims 12,13, 14, 15,16,17,18, 19, 24, 26, 27, 28 and 29 lack inventive step.

7 Industrial applicability (Art. 33(4) PCT)

Present claims 12-29 concern industrially applicable subject-matter.

Invention 10 (group 3)

8 Novelty (Art. 33(2) PCT)

Invention 10 concerns a method of making a polysaccharide-protein conjugate comprising the steps of: (a) reacting isolated GBS capsular polysaccharide with an oxidizing agent; (b) quenching the oxidation reaction of step (a) by addition of a quenching agent resulting in an activated GBS capsular polysaccharide; (c) compounding the activated GBS capsular polysaccharide with a carrier protein, (d) reacting the compounded activated GBS capsular polysaccharide and carrier protein with a reducing agent to form a GBS capsular polysaccharide-carrier protein conjugate, and (e) capping unreacted aldehyde by addition of sodium borohydride (NaBH_4), wherein steps (c) and (d) are carried out in DMSO.

The examples of WO2006110381 describes all the steps of claim 122, including the use of DMSO as solvent vs aqueous solution, except the quenching.

Present application, however, does not provide any quenching step instead of e.g. filtration to stop the oxidation reaction.

Claim 122, therefore, is deemed to lack novelty in view of this document.

A similar teaching is derivable from the examples of WO2014097099.

9 Inventive step (Art. 33(3) PCT)

For the sake of completeness, it is pointed out that the use of quenching instead of filtration does not involve any inventive activity.

Consequently, claim 122 lacks inventive step.

10 Industrial applicability (Art. 33(4) PCT)

Claim 122 concerns industrially applicable subject-matter.

Re Item VIII

Certain observations on the international application

11 Clarity (Art. 6 PCT)

Concerning claim 1, the percentage of sialic acid given is unclear since the skilled person is at loss to know what the percentage expresses (w/w, for instance?).

12 Support by specification (Art. 6 PCT), in combination with Art. 5 PCT (complete and enabling disclosure)

Present application only supports immunogenic compositions comprising capsular polysaccharides from *S. agalactiae*, i.e. Streptococcus group B or GBS of different serotypes.

Concerning the methods, present application discloses in examples 1-4 the following conditions:

S. agalactiae strains for respective serotypes were fermented in submerged culture with pH-control in a defined medium.

The **capsular polysaccharide was removed from the cells by NaOH treatment. After clarification, a series of UF/DF, precipitation, and carbon filtration steps afforded the purified polysaccharide.** See, *e.g.*,

U.S. Patent No. 8,652,480 Reductive amination chemistry was used to conjugate the activated polysaccharide to CRM₉₇. See, *e.g.*, U.S. Patent No. 5,360,897.

The cell paste from GBS capsular polysaccharide (CP) serotype Ia obtained **after heat killing and centrifugation of the fermentation broth** (1.2L) was re-suspended in 175 mL of 25 mM potassium phosphate buffer (25 mM, pH 6.9). The suspension was mixed with an **aqueous hydroxyl amine O-sulfonic acid solution to a final concentration of 10 mM**. The pH of the suspension was determined to be about **5.8**. The suspension was stirred at **55°C for 72 hours**. Afterward, **the suspension was centrifuged at around 10,000 rpm and the supernatant was collected**. The supernatant containing the crude cleaved CPs was analyzed for molecular weight and yield. The remaining portion was subjected to purification by **diafiltration using 30 kDa MWCO membrane using water for injection (WFI)**. The purified polysaccharide was further analyzed for molecular weight by size exclusion chromatography combined with multiangle light scattering detector (SEC-MALS).

In general, **increased hydroxyl amine concentration, higher temperature and longer reaction time lead to higher yield**.

Dibenzyl hydroxylamine worked best.

Polysaccharide oxidation was carried out in 100 mM potassium phosphate buffer (pH 6.0 ± 0.5) by sequential addition of calculated amount of 500 mM potassium phosphate buffer (pH 6.0) and water for injection (WFI) to give final polysaccharide concentration of 2.0 g/L. If required, the reaction pH was adjusted to pH 6.0, approximately. After pH adjustment, the reaction temperature was adjusted to 23 °C. Oxidation was initiated by the addition of approximately 0.25 molar equivalents of **sodium periodate**. The oxidation reaction was performed at 5 ± 3 °C during 16 hrs, approximately.

[0329] Concentration and diafiltration of the activated polysaccharide was carried out using 5K MWCO ultrafiltration cassettes. Diafiltration was performed against 20-fold diavolumes of WFI. The purified activated polysaccharide was then stored at 5 ± 3°C. The purified activated saccharide is **characterized** , *inter alia*, by (i) saccharide concentration by colorimetric assay; (ii) aldehyde concentration by colorimetric assay; (iii) degree of oxidation; and (iv) molecular weight by SEC-MALLS.

GBS serotypes Ia, Ib, II, III, IV and V conjugates were generated by **deliberately varying periodate oxidation/reductive amination chemistry (PO/RAC) conditions**, including the solvent for the reagent (aqueous medium versus DMSO), varying levels of sialic acid in the initial polysaccharide, and degree of oxidation/saccharide epitope modification. In general, **the conjugates produced using DMSO as the solvent were found to have lower levels of unreacted (free) polysaccharide, higher conjugate molecular weight, and higher saccharide/protein ratios than conjugates produced using aqueous medium.**

It thus appears that the essential feature of claim 122 which seems to concern otherwise standard periodate oxidation/reductive amination chemistry, is the use of DMSO as solvent.

It appears that the essential features of the method for the preparation of the polysaccharide are not completely present in the independent claim 12.

Concerning this, the fact that the bacterium is not lysed, and heat killed, the steps of centrifugation and filtration, the use of a hydroxyl amine, the pH, the temperature, for instance appear to be essential.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference PC72220A	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/IB2016/052455	International filing date (<i>day/month/year</i>) 29 April 2016 (29-04-2016)	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 4 May 2015 (04-05-2015)
Applicant PFIZER INC.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 9 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6**bis**(a)).

c. ☐ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☒ **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. 1
☒ as suggested by the applicant
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2016/052455

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2016/052455

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 INV. C07K16/12 A61K39/09
 ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, Sequence Search, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2014/053607 A1 (NOVARTIS AG [CH]) 10 April 2014 (2014-04-10) Examples page 3, line 4 - page 6, line 8 page 2, line 29 - line 30 page 3, line 4 - line 13 page 2, line 16 - page 3, line 3 claims 32-34 page 24, lines 12-15 page 26, line 3 - page 27, line 30 page 22, line 1 - line 12 page 25, line 24 page 30, line 28 - page 34, line 22 ----- -/--	1-11, 29-79, 86-121



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 September 2016

Date of mailing of the international search report

04/10/2016

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Rojo Romeo, Elena

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2016/052455

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 795 580 A (JENNINGS HAROLD J [CA] ET AL) 18 August 1998 (1998-08-18) column 2, line 28 - column 3, line 28 column 3, line 62 - column 7, line 53 Examples	1-11, 29-121
A	----- US 2001/051364 A1 (MICHON FRANCIS [US] ET AL) 13 December 2001 (2001-12-13) paragraph [0100] table 2 paragraph [0105]	1-11, 29-121
A	----- L. A. TEIXEIRA ET AL: "Sialic acid content and surface hydrophobicity of group B streptococci", EPIDEMIOLOGY AND INFECTION., vol. 110, no. 01, 1 February 1993 (1993-02-01), page 87, XP055282350, GB ISSN: 0950-2688, DOI: 10.1017/S0950268800050718 page 93, last paragraph	1-11, 29-121
A	----- NAGANO Y ET AL: "SIALIC ACID LEVELS AND LAG TIME OF GROWTH IN CHEMICALLY DEFINED MEDIUM CONTAINING 200 MM PHOSPHATE AMONG STRAINS OF VARIOUS SEROTYPES OF STREPTOCOCCUS-AGALACTIAE", JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 27, no. 10, 1989, pages 2148-2151, XP002759144, ISSN: 0095-1137 the whole document	1-11, 29-121
A	----- CHRISTINA VON HUNOLSTEIN ET AL: "Sialic acid and biomass production by under different growth conditions", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 38, no. 4, 1 January 1993 (1993-01-01), pages 458-462, XP035170462, ISSN: 1432-0614, DOI: 10.1007/BF00242937 cited in the application Results ----- -/--	1-11, 29-121

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2016/052455

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	F. BERTI ET AL: "Structure of the Type IX Group B Streptococcus Capsular Polysaccharide and Its Evolutionary Relationship with Types V and VII", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 289, no. 34, 2 July 2014 (2014-07-02), pages 23437-23448, XP055228586, US ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M114.567974 cited in the application the whole document	1-11, 29-121
X	----- EP 0 534 764 A1 (MERCK & CO INC [US]) 31 March 1993 (1993-03-31) page 19, line 31 - line 36 page 18, line 44 - line 45 page 19, line 38 - line 41 page 14, line 14 - line 15 -----	12-19, 24-29
X	WO 2006/110381 A1 (WYETH CORP [US]; HAUSDORFF WILLIAM P [BE]; SIBER GEORGE RAINER [US]; P) 19 October 2006 (2006-10-19) Examples	122
X	----- WO 2014/097099 A2 (PFIZER [US]) 26 June 2014 (2014-06-26) Examples -----	122

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2016/052455

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2014053607	A1	10-04-2014	AR 092896 A1 06-05-2015
			AR 092897 A1 06-05-2015
			AU 2013326498 A1 26-02-2015
			AU 2013326503 A1 26-02-2015
			CA 2883481 A1 10-04-2014
			CA 2896552 A1 10-04-2014
			CN 104582718 A 29-04-2015
			CN 104717977 A 17-06-2015
			EP 2903636 A1 12-08-2015
			EP 2903638 A1 12-08-2015
			JP 2015531389 A 02-11-2015
			JP 2015531390 A 02-11-2015
			KR 20150073160 A 30-06-2015
			KR 20150073943 A 01-07-2015
			SG 11201500978T A 30-07-2015
			SG 11201500979R A 30-07-2015
			US 2015224185 A1 13-08-2015
			US 2015224204 A1 13-08-2015
			WO 2014053607 A1 10-04-2014
			WO 2014053612 A1 10-04-2014
US 5795580	A	18-08-1998	AT 203167 T 15-08-2001
			AU 690525 B2 30-04-1998
			CA 2145397 A1 31-03-1994
			DE 69330464 D1 23-08-2001
			DE 69330464 T2 08-11-2001
			DK 0667787 T3 29-10-2001
			EP 0667787 A1 23-08-1995
			ES 2160601 T3 16-11-2001
			FI 951412 A 24-05-1995
			GR 3036928 T3 31-01-2002
			IL 107103 A 19-03-2001
			JP 4163251 B2 08-10-2008
			JP 4308174 B2 05-08-2009
			JP H08501563 A 20-02-1996
			JP 2005306884 A 04-11-2005
			JP 2009132727 A 18-06-2009
			NO 951109 A 22-05-1995
			NZ 248766 A 26-11-1996
			NZ 299249 A 25-08-2000
			PT 667787 E 31-10-2001
			US 5795580 A 18-08-1998
			US 5993825 A 30-11-1999
US 2001051364	A1	13-12-2001	NONE
EP 0534764	A1	31-03-1993	CA 2078359 A1 25-03-1993
			EP 0534764 A1 31-03-1993
			JP H05279399 A 26-10-1993
			US 5371197 A 06-12-1994
WO 2006110381	A1	19-10-2006	AR 053354 A1 02-05-2007
			AT 548051 T 15-03-2012
			AU 2006235013 A1 19-10-2006
			BR PI0607025 A2 28-07-2009
			CA 2604363 A1 19-10-2006
			CN 101180079 A 14-05-2008
			CN 102716480 A 10-10-2012

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2016/052455

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		CN 104815327 A	05-08-2015
		CY 1112777 T1	10-02-2016
		DK 1868645 T3	10-04-2012
		EP 1868645 A1	26-12-2007
		EP 2425851 A1	07-03-2012
		EP 2425852 A1	07-03-2012
		EP 2425853 A1	07-03-2012
		EP 2425854 A1	07-03-2012
		EP 2425855 A1	07-03-2012
		EP 2425856 A1	07-03-2012
		ES 2382048 T3	04-06-2012
		HK 1120416 A1	23-11-2012
		HK 1213184 A1	30-06-2016
		IL 186367 A	30-09-2013
		JP 4472770 B2	02-06-2010
		JP 5173920 B2	03-04-2013
		JP 5730261 B2	03-06-2015
		JP 2008535838 A	04-09-2008
		JP 2009161567 A	23-07-2009
		JP 2013006881 A	10-01-2013
		KR 20070118700 A	17-12-2007
		KR 20130048262 A	09-05-2013
		KR 20150061018 A	03-06-2015
		KR 20150061019 A	03-06-2015
		KR 20150061020 A	03-06-2015
		KR 20150061021 A	03-06-2015
		MY 145150 A	30-12-2011
		NZ 562406 A	25-09-2009
		PL 1868645 T3	31-07-2012
		PT 1868645 E	17-05-2012
		RS 52249 B	31-10-2012
		SI 1868645 T1	30-04-2012
		TW I386222 B	21-02-2013
		TW 201212937 A	01-04-2012
		TW 201438734 A	16-10-2014
		US 2006228380 A1	12-10-2006
		US 2009130137 A1	21-05-2009
		US 2012237542 A1	20-09-2012
		US 2014314805 A1	23-10-2014
		US 2016158345 A1	09-06-2016
		WO 2006110381 A1	19-10-2006
		ZA 200709483 B	25-03-2009

WO 2014097099	A2	26-06-2014	
		AU 2013365873 A1	04-06-2015
		CA 2893343 A1	26-06-2014
		CN 104870463 A	26-08-2015
		EP 2935299 A2	28-10-2015
		HK 1213267 A1	30-06-2016
		JP 2016509081 A	24-03-2016
		KR 20150085070 A	22-07-2015
		US 2015328328 A1	19-11-2015
		WO 2014097099 A2	26-06-2014

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-11, 30-121(completely); 29(partially)

Claims searched

1.1. claims: 1-11(completely); 29(partially)

An immunogenic polysaccharide-protein conjugate comprising a group B streptococcus (GBS) capsular polysaccharide and a carrier protein, wherein the capsular polysaccharide has a sialic acid level of greater than about 60%, greater than about 95%, or about 100%; embodiments thereof.

1.2. claims: 30(completely); 37-79(partially)

An immunogenic composition comprising polysaccharide-protein conjugates, wherein the conjugates comprise capsular polysaccharides from group B streptococcus (GBS) serotype IV and at least one additional serotype selected from the group consisting of Ia, Ib, II, III, V, VI, VII, VIII, and IX; embodiments thereof.

1.3. claims: 31(completely); 37-79(partially)

An immunogenic composition comprising polysaccharide-protein conjugates, wherein the conjugates comprise capsular polysaccharides from GBS serotypes Ia, Ib, II, III, and IV; embodiments thereof.

1.4. claims: 32(completely); 37-79(partially)

An immunogenic composition comprising polysaccharide-protein conjugates, wherein the conjugates comprise capsular polysaccharides from GBS serotypes Ia, Ib, II, III, and V; embodiments thereof.

1.5. claims: 33(completely); 37-79(partially)

An immunogenic composition comprising polysaccharide-protein conjugates, wherein the conjugates comprise capsular polysaccharides from GBS serotypes Ia, Ib, II, III, IV, and V; embodiments thereof.

1.6. claims: 34-36(completely); 37-79(partially)

An immunogenic composition comprising polysaccharide-protein conjugates comprising at least four GBS capsular polysaccharide serotypes selected from the group consisting of Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, and IX; embodiments thereof.

1.7. claims: 80-84

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

An antibody that binds to a capsular polysaccharide in the immunogenic conjugate of any one of claims 1-11 or 28; embodiments thereof.

1.8. claims: 85-121

Method of making an immunogenic polysaccharide conjugate, having the steps of (a) reacting the GBS capsular polysaccharide with an oxidizing agent resulting in an inactivated polysaccharide; and (b) reacting the activated polysaccharide with the carrier protein resulting in a polysaccharide-protein conjugate.

2. claims: 12-28(completely); 29(partially)

Method of isolating a capsular polysaccharide comprising reacting an organic reagent with a cell broth comprising a capsular polysaccharide producing bacterium; embodiments thereof.

3. claim: 122

A method of making a polysaccharide-protein conjugate comprising the steps of:(a) reacting isolated GBS capsular polysaccharide with an oxidizing agent; (b) quenching the oxidation reaction of step (a) by addition of a quenching agent resulting in an activated GBS capsular polysaccharide; (c) compounding the activated GBS capsular polysaccharide with a carrier protein, (d) reacting the compounded activated GBS capsular polysaccharide and carrier protein with a reducing agent to form a GBS capsular polysaccharide-carrier protein conjugate, and (e) capping unreacted aldehyde by addition of sodium borohydride (NaBH₄), wherein steps (c) and (d) are carried out in DMSO.

(10) International Publication Number
WO 2016/178123 A1(43) International Publication Date
10 November 2016 (10.11.2016)

(51) International Patent Classification:

C07K 16/12 (2006.01) *A61K 39/09* (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/IB2016/052455

(22) International Filing Date:

29 April 2016 (29.04.2016)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

62/156,500	4 May 2015 (04.05.2015)	US
62/237,813	6 October 2015 (06.10.2015)	US
62/237,820	6 October 2015 (06.10.2015)	US
62/319,539	7 April 2016 (07.04.2016)	US

(71) Applicant: **PFIZER INC.** [US/US]; 235 East 42nd Street, New York, New York 10017 (US).

(72) Inventors: **ANDERSON, Annaliesa Sybil**; 49 Hillcrest Drive, Upper Saddle River, New Jersey 07458 (US). **BHUPENDER BHALLA, Amardeep Singh**; 37 Forshee Circle, Montvale, New Jersey 07645 (US). **DONALD, Robert G.K.**; 129 Kenneth Terrace, South Orange, New Jersey 07079 (US). **GU, Jianxin**; 367 Bullard Avenue, Paramus, New Jersey 07652 (US). **JANSEN, Kathrin Ute**; 160 East 65th Street, Apt. 11C, New York, New York 10065 (US). **KAINTHAN, Rajesh Kumar**; 15 Key Place,

Tappan, New York 10983 (US). **KHANDKE, Lakshmi**; 120 E. Allison Avenue, Nanuet, New York 10954 (US). **KIM, Jin-Hwan**; 16 Fox Court, Suffern, New York 10901 (US). **LIBERATOR, Paul**; 37 Hillcrest Road, Holmdel, New Jersey 07733 (US). **PRASAD, Avvari Krishna**; 105 Worsham Drive, Chapel Hill, North Carolina 27516 (US). **RUPPEN, Mark Edward**; 6 Lea Court, Garnerville, New York 10923 (US). **SCULLY, Ingrid Lea**; 23 Grand Street, Cornwall, New York 12518 (US). **SINGH, Suddham**; 5 Makan Road, Monroe, New York 10950 (US). **YANG, Cindy Xudong**; 6 Lanram Road, Tappan, New York 10983 (US).

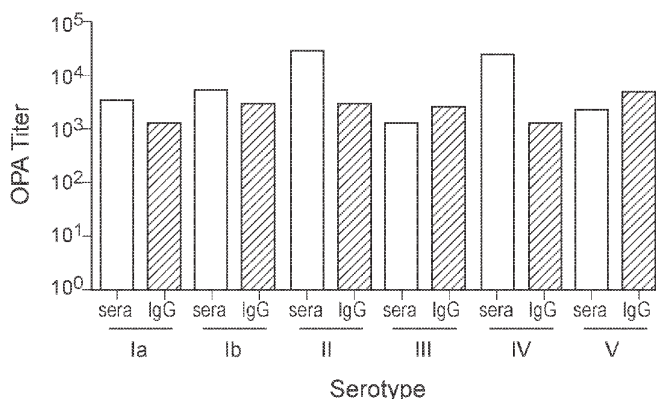
(74) Agent: **WALDRON, Roy F.**; Pfizer INC., 235 East 42nd Street, MS 235/9/S20, New York, NY 10017 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[Continued on next page]

(54) Title: GROUP B STREPTOCOCCUS POLYSACCHARIDE-PROTEIN CONJUGATES, METHODS FOR PRODUCING CONJUGATES, IMMUNOGENIC COMPOSITIONS COMPRISING CONJUGATES, AND USES THEREOF

FIG. 1



(57) Abstract: The invention relates to immunogenic polysaccharide-protein conjugates comprising a capsular polysaccharide (CP) from *Streptococcus agalactiae*, commonly referred to as group B streptococcus (GBS), and a carrier protein, wherein the CP is selected from the group consisting of serotypes Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, and IX, and wherein the CP has a sialic acid level of greater than about 60%. The invention also relates to methods of making the conjugates and immunogenic compositions comprising the conjugates. The invention also relates to immunogenic compositions comprising polysaccharide-protein conjugates, wherein the conjugates comprise a CP from GBS serotype IV and at least one additional serotype. The invention further relates to methods for inducing an immune response in subjects against GBS and/or for reducing or preventing invasive GBS disease in subjects using the compositions disclosed herein. The resulting antibodies can be used to treat or prevent GBS infection via passive immunotherapy.



(84) Designated States (*unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

— as to the identity of the inventor (Rule 4.17(i))

— as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))

— as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))

Published:

— with international search report (Art. 21(3))

— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))

**CONJUGADOS PROTEÍNA-POLISACÁRIDO DE ESTREPTOCOCO GRUPO B,
MÉTODOS PARA PRODUCIR CONJUGADOS, COMPOSICIONES INMUNÓGENAS
QUE COMPRENDEN CONJUGADOS Y SUS USOS**

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La invención se refiere a conjugados inmunógenos proteína-polisacárido que comprenden un polisacárido capsular (CP) de *Streptococcus agalactiae*, denominado comúnmente estreptococo grupo B (GBS), y una proteína portadora, en donde CP se selecciona del grupo que consiste en los serotipos Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII y IX, y en donde CP tiene un nivel de ácido siálico mayor de alrededor de 60 %. La invención también se refiere a métodos para obtener los conjugados y las composiciones inmunógenas que comprenden los conjugados. La invención también se refiere a composiciones inmunógenas que comprenden conjugados proteína-polisacárido, en donde los conjugados comprenden un CP de GBS serotipo IV y al menos un serotipo adicional. Asimismo, la invención se refiere a métodos para inducir una respuesta inmunitaria en sujetos contra GBS y/o para reducir o prevenir la enfermedad por GBS invasivo en sujetos usando las composiciones descritas en la presente. Los anticuerpos resultantes se pueden usar para tratar o prevenir la infección por GBS mediante inmunoterapia pasiva.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Streptococcus agalactiae son organismos con cápsula de polisacáridos gram positivos que también se denominan estreptococo grupo B (GBS). Son un comensal común de los tractos gastrointestinal y genital humanos y también son causa de enfermedades graves en niños y adultos mayores (Baker, C.J., Vaccine, 31(Suppl. 4):D3-D6 (2013)). El principal factor de riesgo de la infección por GBS en niños es la colonización materna (Dillon, H.C., et al., J. Pediatr., 110(1):31-36 (1987)). Como máximo, una de cada cuatro mujeres portan GBS en el recto o la vagina, que puede infectar el líquido amniótico o el bebé antes o durante el parto, y así causar sepsis, neumonía y meningitis (Baker 2013; Heath, P.T., et al., BMJ Clin. Evid. (Online), pii:0323 (2014)). El 25 % de los niños que sobreviven a la meningitis por GBS sufren deterioro neurológico, en donde el 19 % tiene retraso cognitivo, parálisis cerebral, ceguera y pérdida de la audición (Libster, R., et al., Pediatrics, 130(1):e8-152012 (2012)). GBS también puede causar abortos espontáneos y partos prematuros, y está relacionado a mortinatos (McDonald, H.M., et al., Infectious

Diseases in Obstetrics and Gynecology, 8(5-6):220-227 (2000); Randis, T.M., et al., The Journal of Infectious Diseases, 210(2):265-273 (2014); Kessous, R., et al., J. Matern. Fetal Neonatal Med., 25(10):1983-1986 (2012)). Los niños con peso de nacimiento muy bajo presentan un mayor riesgo de infectarse, en donde hasta 3 % presenta infecciones y las tasas de mortalidad son de hasta 30 %, incluso con tratamiento inmediato con antibióticos (Heath 2014).

La introducción a finales de 1990 del cribado de GBS y de la profilaxis antibiótica intraparto (IAP) en EE.UU. mostró una reducción en las tasas de enfermedades neonatales que ocurrían en la primera semana de vida (enfermedades de inicio temprano [EOD]), pero no tuvo un impacto mensurable en cuanto a las tasas de enfermedades de inicio tardío (LOD) que aparecen en los primeros 3 meses de vida. Las tasas en EE.UU. de casos de EOD y LOD son actualmente de 0,25 y 0,27 cada 1.000 partos, respectivamente (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), informe de vigilancia Active Bacterial Core (ABC) (2013) disponible en <http://www.cdc.gov/abcs/reports-findings/survreports/gbs13.pdf>). Luego de la introducción de vacunas de conjugados neumocócicos para la prevención de la enfermedad neumocócica invasiva, que incluye bacteriemia y meningitis, y a pesar de IAP para la prevención de la enfermedad por GBS, GBS se convirtió en la causa más común de sepsis neonatal (EOD) y meningitis (< 2 mo) en niños en EE.UU. (Verani, J.R., et al., MMWR, 59(RR10):1-32 (2010); Thigpen, M.C., et al., New England Journal of Medicine, 364(21):2016-2025 (2011)). A diferencia de EE.UU., la introducción de guías de prevención para enfermedades por GBS invasivo e IAP no redujo la incidencia de EOD en los Países Bajos ni en el Reino Unido (Bekker, V., et al., The Lancet Infectious Diseases, 14(11):1083-1089 (2014); Lamagni, T.L., et al., Clin. Infect. Dis., 57(5):682-688 (2013)). Esta falta de efecto se puede deber a la falta de cribado universal e IAP restrictivo aplicados a las madres en los grupos con mayor riesgo (por ejemplo, fiebre, ruptura prolongada de membranas). Las tasas de EOD son considerablemente mayores en los países donde no se usa IAP, con una incidencia media informada de 0,75 cada 1.000 partos en los que el recién nacido está vivo (95 % CI 0,58-0,89) (Edmond, K.M., et al., Lancet, 379(9815):547-556 (2012)).

Las personas mayores constituyen otra población en riesgo de tener enfermedad por GBS. Los factores de riesgo incluyen problemas médicos crónicos, tales como diabetes mellitus, cáncer, insuficiencia cardíaca y condiciones neurológicas y urológicas. De acuerdo con los datos de vigilancia ABC de CDC, la incidencia anual en EE.UU de GBS invasivo en 2013 fue de 0,28/1.000 adultos o 12.400 casos/año en adultos ≥ 65 años. Esta tasa aborda

la incidencia de la enfermedad neumocócica invasiva en las personas mayores (vs. 0,30/1.000 para >65). Se espera que estas tasas continúen aumentando tanto en EE.UU. como en Europa (CDC 2013; Lamagni 2013).

Un enfoque para prevenir la enfermedad por GBS en niños y personas mayores es el uso de una vacuna a base de polisacáridos. La implementación de una vacuna profiláctica materna contra GBS tiene el potencial para prevenir la enfermedad por GBS en niños en EE. UU., independientemente de si se usa IAP. Si bien los polisacáridos pueden ser inmunógenos en sí, la conjugación de polisacáridos con portadores de proteínas se usó para mejorar la inmunogenicidad, en particular, en niños y personas mayores. Las vacunas de conjugado proteína-polisacárido se fabrican usando polisacáridos, en general, de la capa superficial de bacterias, ligados a portadores de proteínas. El enlace químico del polisacárido y el portador de proteínas induce una respuesta inmunitaria contra bacterias que muestran el polisacárido contenido en la vacuna en su superficie, y así previene la enfermedad. En consecuencia, la vacunación con polisacáridos de bacterias patógenas es una estrategia potencial para reforzar la inmunidad del huésped.

Los polisacáridos que cubren bacterias varían considerablemente, incluso en una sola especie de bacterias. Por ejemplo, en GBS, existen diez serotipos diferentes debido a la variación en la cápsula de polisacáridos bacterianos. Por lo tanto, se desea que las vacunas a base de polisacáridos consistan en un panel de polisacáridos a fin de garantizar la amplitud de cobertura contra diferentes cepas circulantes.

La proteína portadora puede ser un antígeno de la proteína relacionado del patógeno diana, que refuerza la respuesta inmunitaria específica contra ese patógeno, o una proteína generalmente inmunógena que sirve más como un adyuvante o estimulante de la respuesta inmunitaria general.

Los conjugados proteína-polisacárido monovalentes individuales de GBS serotipos Ia, Ib, II, III y V se evaluaron en ensayos clínicos de fase 1 y 2 en adultos no embarazados (Brigtsen, A.K., et al., *Journal of Infectious Diseases*, 185(9):1277-1284 (2002); Baker, C.J., et al., *J. Infect. Dis.*, 188(1):66-73 (2003); Baker, C.J., et al., *J. Infect. Dis.*, 189(6):1103-1112 (2004); Baker, C.J., et al., *Vaccine*, 25(1):55-63 (2007)). Asimismo, se estudiaron las vacunas bivalentes de glucoconjugados II-TT y III-TT, y una vacuna trivalente que comprende los glucoconjugados Ia-CRM₁₉₇, Ib-CRM₁₉₇ y III-CRM₁₉₇ (Baker *JID* 2003; Clinicaltrials.gov NCT01193920, NCT01412801 y NCT01446289). Sin embargo, aún no se aprobó ninguna vacuna contra GBS.

Además, si bien la vacuna trivalente cubre >90% de cepas invasivas que causan enfermedades neonatales en Sudáfrica (Madzivhandila, M., et al., PloS One, 6(3):e17861 (2011)), estos mismos serotipos representan solo el 62 % y 66 % de aislados invasivos en América del Norte y Europa, respectivamente, en función de la vigilancia de aislados neonatales recientes de una recolección global de 901 muestras recolectadas entre 2004-2013 de Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (T.E.S.T., <http://www.testsurveillance.com/>).

El análisis de las cepas obtenido de las muestras de T.E.S.T. mostró que el 95 % de las cepas recolectadas pertenecía a uno de los cinco serotipos principales documentados (Ia, Ib, II, III y V) y que un 3 % adicional pertenecía al serotipo IV. Una serie de publicaciones también confirmaron la aparición del serotipo IV en la última década en América y Europa (Diedrick, M.J., et al., J. Clin. Microbiol., 48(9):3100-3104 (2010); Teatero (2014); Meehan, M. et al., European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 33(7):1155-1162 (2014); Florindo, C., et al., Euro Surveillance: Bulletin European sur les Maladies Transmissibles (European Communicable Disease Bulletin), 19(23) (2014); Palmiero, J.K., et al., Journal of Clinical Microbiology, 48(12):4397-4403 (2010)). Un estudio que evaluó la portación rectovaginal en mujeres adultas, que es un factor de riesgo para la transmisión de GBS al bebé, también mostró que el 97 % de los aislados pertenecían a uno de los seis serotipos, en donde el serotipo IV representaba una frecuencia de ~4 %. El estudio se designó para monitorear la portación de estreptococos beta-hemolíticos (que incluyen GBS), *Clostridium difficile* y *Staphylococcus aureus* en adultos saludables en EE.UU. (véase Matson, M.A., et al, ICAAC, Abstract I-306 (Washington, DC, sep. 5-9, 2014)).

De manera similar, el análisis de muestras de T.E.S.T. mostró que el 98 % de los aislados sanguíneos en EE.UU. de adultos ≥ 65 años pertenecía a los mismos seis serogrupos predominantes. La diferencia más notable entre los aislados de personas mayores y las otras poblaciones es la distribución de serogrupos. Para los aislados de pacientes mayores, las cepas de serotipo V constituyen el grupo más grande (34 % vs. 18 % para cepas neonatales o 18 % para cepas portadoras en adultos).

Otros estudios descubrieron que existe una varianza geográfica de prevalencia de serotipos. Por ejemplo, se demostró que los aislados de serotipo VI y VIII eran colonizadores predominantes de mujeres embarazadas saludables en Japón (Lachenauer, C.S., et al., JID 179(4):1030-1033 (1999)).

En consecuencia, existe la necesidad de vacunas de conjugado proteína-polisacárido o anticuerpos monoclonales a fin de conferir inmunidad pasiva como medio para prevenir o tratar enfermedades por GBS, que incluyen aquellas causadas por el surgimiento del serotipo IV, entre amplias poblaciones en el mundo.

SÍNTESIS DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a conjugados inmunógenos proteína-polisacárido de GBS novedosos, métodos para producir los conjugados y composiciones inmunógenas que comprenden los conjugados, e incluye la invención descrita en la solicitud provisional estadounidense N.º 62/156.500, presentada el 4 de mayo de 2015; la solicitud provisional estadounidense N.º 62/237.813, presentada el 4 de mayo de 2015; y la solicitud provisional estadounidense N.º 62/237.820, presentada el 6 de octubre de 2015, que se incorporan en la presente en su totalidad por referencia. Las siguientes cláusulas describen algunos aspectos y formas de realización de la invención.

En un aspecto, la invención se refiere a un conjugado inmunógeno proteína-polisacárido que comprende un polisacárido capsular del estreptococo grupo B (GBS) y una proteína portadora, en donde el polisacárido capsular tiene un nivel de ácido siálico mayor de alrededor de 60 %, mayor de alrededor de 95 %, o alrededor de 100 %. En otra forma de realización, el polisacárido capsular se puede desialilar hasta alrededor de 40 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 60 %). En otra forma de realización, el polisacárido capsular se selecciona del grupo que consiste en los serotipos Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII y IX.

En un aspecto adicional, el conjugado inmunógeno proteína-polisacárido comprende un polisacárido capsular que tiene alrededor de 1,0 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, por ejemplo, al menos alrededor de 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9 o 0,95 mM de ácido siálico por mM de polisacárido.

En otro aspecto de la invención, el conjugado inmunógeno comprende un polisacárido capsular que tiene un peso molecular de alrededor de 5 kDa a alrededor de 1.000 kDa, de alrededor de 25 kDa a alrededor de 750 kDa, de alrededor de 25 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 25 kDa a alrededor de 200 kDa, o de alrededor de 100 kDa a alrededor de 400 kDa.

En otra forma de realización, el conjugado inmunógeno de la invención tiene un peso molecular de alrededor de 300 kDa a alrededor de 20.000 kDa, por ejemplo, de alrededor de 1.000 kDa a alrededor de 15.000 kDa, o de alrededor de 1.000 kDa a alrededor de

10.000 kDa.

En una forma de realización, el conjugado inmunógeno comprende un polisacárido capsular que tiene de alrededor de 0 % a alrededor de 40 % de O-acetilación, por ejemplo, menos de alrededor de 5 %, menos de alrededor de 4 %, menos de alrededor de 3 %, menos de alrededor de 2 % o menos de alrededor de 1 % de O-acetilación.

En una forma de realización, el conjugado inmunógeno comprende un polisacárido capsular que tiene al menos alrededor de 0,1, 0,2, 0,3, 0,35 o alrededor de 0,4 mM de O-acetato por mM de unidad de repetición de sacáridos. En otra forma de realización, el conjugado inmunógeno comprende un polisacárido capsular que tiene menos de alrededor de 0,01, 0,02, 0,03, 0,04 o 0,05 mM de O-acetato por mM de unidad de repetición de sacáridos.

En una forma de realización, el conjugado inmunógeno comprende CRM₁₉₇ o toxoide tetánico como proteína portadora. En una forma de realización particular, la proteína portadora es CRM₁₉₇.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a métodos para aislar un polisacárido capsular, que comprenden hacer reaccionar un reactivo orgánico con un cultivo celular que comprende una bacteria productora de polisacárido capsular. En una forma de realización, el método también comprende la etapa de centrifugación. En otra forma de realización, el método también comprende la etapa de filtrado. En una forma de realización particular, la bacteria productora de polisacárido capsular se selecciona del grupo que consiste en *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria meningitidis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis*. En una forma de realización, la hidroxilamina se selecciona del grupo que consiste en las aminas enumeradas en la Tabla 2. En una forma de realización adicional, la hidroxilamina se selecciona del grupo que consiste en dibencil hidroxilamina; dietil hidroxilamina; hidroxilamina; etilendiamina; trietilentetramina; 1,1,4,7,10,10 hexametil trietilentetramina; y 2,6,10,trimetil 2,6,10 triazaundecano. Aun en otra forma de realización, la concentración de hidroxilamina es de alrededor de 5 mM a alrededor de 200 mM. En otra forma de realización, el pH de la reacción es de alrededor de 5,5 a alrededor de 9,5. En una forma de realización adicional, la reacción ocurre a una temperatura de alrededor de 20°C a alrededor de 85°C. En otra forma de realización, el tiempo de reacción es de alrededor de 10 horas a alrededor de 90 horas.

En un aspecto, la invención se refiere a una composición inmunógena que comprende conjugados proteína-polisacárido, en donde los conjugados comprenden polisacáridos capsulares de estreptococo grupo B (GBS) serotipo IV y al menos un serotipo adicional seleccionado del grupo que consiste en los serotipos Ia, Ib, II, III, V, VI, VII, VIII y IX. En otra forma de realización, los conjugados comprenden GBS serotipo IV y al menos dos serotipos adicionales seleccionados del grupo que consiste en los serotipos Ia, Ib, II, III, V, VI, VII, VIII y IX. En otra forma de realización, los conjugados comprenden GBS serotipo IV y al menos tres serotipos adicionales seleccionados del grupo que consiste en los serotipos Ia, Ib, II, III, V, VI, VII, VIII y IX. En otra forma de realización, los conjugados comprenden GBS serotipo IV y al menos cuatro serotipos adicionales seleccionados del grupo que consiste en los serotipos Ia, Ib, II, III, V, VI, VII, VIII y IX. En una forma de realización particular, los conjugados comprenden polisacárido capsular de los serotipos Ia, Ib, II, III y IV. En otra forma de realización, la composición comprende GBS serotipo V. En una forma de realización particular, los conjugados comprenden polisacárido capsular de los serotipos Ia, Ib, II, III y V. Aun en otra forma de realización, la composición inmunógena comprende seis conjugados proteína-polisacárido, en donde los conjugados comprenden un polisacárido capsular de estreptococo grupo B serotipos Ia, Ib, II, III, IV y V. Un aspecto de la invención se refiere a una composición inmunógena que no tiene interferencia inmunitaria.

En una forma de realización, la composición inmunógena también comprende un excipiente, un amortiguador, un estabilizante, un adyuvante, un crioprotector, una sal, un catión divalente, un detergente no iónico, un inhibidor de oxidación de radicales libres, un portador aceptables desde el punto de vista farmacéutico, o una mezcla de estos. En una forma de realización adicional, comprende un amortiguador. El amortiguador puede ser HEPES, PIPES, MES, Tris (trimetamina), fosfato, acetato, borato, citrato, glicina, histidina o succinato. En una forma de realización preferida, el amortiguador es histidina.

En otra forma de realización, la composición inmunógena también comprende un tensioactivo. El tensioactivo puede ser ésteres de ácidos grasos de polioxietilen sorbitán, polisorbato 80, polisorbato 60, polisorbato 40, polisorbato 20 o alquiléteres de polioxietileno. En una forma de realización preferida, el tensioactivo es polisorbato 80.

En otra forma de realización, la composición inmunógena también comprende un excipiente. El excipiente se selecciona del grupo que consiste en almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, rafinosa, estaquiosa, melecitosa, dextrano, manitol, lactitol, palatinita,

gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, glicina, arginina, lisina, cloruro de sodio (NaCl), leche descremada seca, glicerol, propilenglicol, agua y etanol. En una forma de realización preferida, el excipiente es cloruro de sodio.

Aun en otra forma de realización, la composición inmunógena también comprende un adyuvante. En una forma de realización como tal, el adyuvante es un adyuvante a base de aluminio o QS-21. En una forma de realización preferida, el adyuvante se selecciona del grupo que consiste en fosfato de aluminio, hidroxil fosfato de aluminio e hidróxido de aluminio. En una forma de realización más preferida, el adyuvante es fosfato de aluminio.

En un aspecto de la invención, la composición inmunógena comprende un amortiguador, un tensioactivo, un excipiente, y de manera opcional, un adyuvante, en donde la composición se amortigua a un pH de alrededor de 6,0 a alrededor de 7,0. En otro aspecto, la composición inmunógena comprende histidina, polisorbato 80, cloruro de sodio, y de manera opcional, fosfato de aluminio, en donde la composición se amortigua a un pH de alrededor de 6,0 a alrededor de 7,0. En una forma de realización preferida, la composición inmunógena comprende alrededor de 10 mM a alrededor de 25 mM de histidina, alrededor de 0,01 % a alrededor de 0,03 % (v/p) de polisorbato 80, alrededor de 10 mM a alrededor de 250 mM de cloruro de sodio (NaCl), y de manera opcional, alrededor de 0,25 mg/ml a alrededor de 0,75 mg/ml de aluminio como fosfato de aluminio. En otro aspecto de la invención, la composición inmunógena comprende una dosis de alrededor de 5 mcg/ml a alrededor de 50 mcg/ml.

En otro aspecto de la invención, la composición inmunógena se liofiliza, opcionalmente en presencia de al menos un excipiente. En una forma de realización, al menos un excipiente se selecciona del grupo que consiste en almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, rafinosa, estaquiosa, melecitosa, dextrano, manitol, lactitol, palatinita, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, glicina, arginina, lisina, cloruro de sodio (NaCl), leche descremada seca, glicerol, propilenglicol, agua y etanol. En una forma de realización preferida, al menos un excipiente se selecciona del grupo que consiste en sacarosa, manitol y glicina. En una forma de realización particular, al menos un excipiente es sacarosa. En un aspecto, la composición liofilizada comprende alrededor de 1 % (p/v) a alrededor de 10 % (p/v) de al menos un excipiente, preferentemente, mayor de alrededor de 5,5 % (p/v). En otra forma de realización, la composición liofilizada comprende un excipiente adicional. En una forma

de realización como tal, el excipiente adicional es manitol o glicina. En una forma de realización preferida, la composición liofilizada comprende alrededor de 1 % (p/v) a alrededor de 10 % (p/v) del excipiente adicional. Aun en otra forma de realización, la composición liofilizada se reconstituye con agua, agua para inyección (WFI), una suspensión de adyuvante o solución salina. En una forma de realización particular, el diluyente es una suspensión de cualquier adyuvante descrito en la presente, tal como una suspensión de adyuvante a base de aluminio, preferentemente, una suspensión de fosfato de aluminio.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para inducir una respuesta inmunitaria contra GBS, que comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz de la composición inmunógena descrita en la presente. En una forma de realización, la invención se refiere a un método para prevenir o reducir una enfermedad o afección asociada a GBS en un sujeto, que comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz de la composición inmunógena descrita en la presente. En una forma de realización particular, el sujeto es una hembra que planea quedar preñada o una hembra preñada. En una forma de realización como tal, la hembra preñada se encuentra en la segunda mitad de la preñez, por ejemplo, al menos en la semana 20 o al menos en la semana 27 de gestación. En una forma de realización preferida, la hembra preñada se encuentra en la semana 27 a 36 de gestación. En otra forma de realización, el sujeto es un adulto mayor, por ejemplo, un adulto de 50 años o más, 65 años o más, y 85 años o más. En otra forma de realización, el sujeto está inmunodeprimido. En un aspecto, el sujeto puede tener una afección seleccionada del grupo que consiste en obesidad, diabetes, infección por VIH, cáncer, enfermedad cardiovascular o enfermedad hepática. En una forma de realización preferida, el estreptococo grupo B es *Streptococcus agalactiae*.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a anticuerpos que se fijan a un polisacárido capsular en la composición inmunógena de la presente invención. En algunas formas de realización, los anticuerpos se generan después de la administración de la composición inmunógena a un sujeto. Otro aspecto se refiere a una composición que comprende los anticuerpos de la presente invención

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método para conferir inmunidad pasiva a un sujeto, que comprende las etapas de (a) generar una preparación de anticuerpos usando la composición inmunógena descrita en la presente; y (b) administrar la preparación de anticuerpos al sujeto para conferir inmunidad pasiva.

Un aspecto de la invención se refiere a métodos para obtener conjugados inmunógenos proteína-polisacárido de la presente invención, que comprenden las etapas de: (a) hacer reaccionar un polisacárido capsular de GBS con un agente oxidante que da como resultado un polisacárido activado; y (b) hacer reaccionar el polisacárido activado con una proteína portadora que da como resultado un conjugado proteína-polisacárido, en donde la etapa (b) se lleva a cabo en un solvente aprótico polar. El solvente puede ser dimetilsulfóxido (DMSO), sulfolano, dimetilformamida (DMF) y hexametilfosforamida (HMPA). En una forma de realización preferida, el solvente es dimetilsulfóxido (DMSO).

En una forma de realización, el polisacárido se hace reaccionar con 0,01 a 10,0 equivalentes molares del agente oxidante. En una forma de realización particular, el agente oxidante es periodato. En una forma de realización como tal, el periodato es periodato de sodio.

En otra forma de realización, la reacción de oxidación dura entre 1 hora y 50 horas. En otra forma de realización, la temperatura de la reacción de oxidación se mantiene entre alrededor de 2 °C y alrededor de 25 °C. Aun en otra forma de realización, la reacción de oxidación se lleva a cabo en un amortiguador seleccionado del grupo que consiste en fosfato de sodio, fosfato de potasio, ácido 2-(N-morfolino)etansulfónico (MES) y Bis-Tris. En una forma de realización como tal, el amortiguador tiene una concentración de alrededor de 1 mM a alrededor de 500 mM. En una forma de realización particular, la reacción de oxidación se lleva a cabo a un pH de alrededor de 4,0 a alrededor de 8,0.

En otro aspecto de la invención, el agente oxidante es 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi (TEMPO). En una forma de realización como tal, N-clorosuccinimida (NCS) es un cooxidante.

En una forma de realización, la etapa (a) de obtener un conjugado inmunógeno proteína-polisacárido de la presente invención también comprende inactivar la reacción de oxidación agregando un agente de inactivación.

En otra forma de realización, la concentración de polisacárido es de alrededor de 0,1 mg/ml a alrededor de 10,0 mg/ml.

En una forma de realización adicional, el grado de oxidación (DO) del polisacárido activado es entre 5 y 25.

En otro aspecto de la invención, el método también comprende la etapa de liofilizar el polisacárido activado. En una forma de realización, el polisacárido activado se liofiliza en presencia de un sacárido seleccionado del grupo que consiste en sacarosa, trehalosa,

rafinosa, estaquiosa, melecitosa, dextrano, manitol, lactitol y palatinita.

En otro aspecto de la invención, la etapa (b) de obtener un conjugado inmunógeno proteína-polisacárido de la presente invención comprende (1) formular un compuesto con polisacárido activado y una proteína portadora, y (2) hacer reaccionar el compuesto de polisacárido activado y proteína portadora con un agente reductor para formar un conjugado proteína portadora-polisacárido capsular de GBS. En una forma de realización, la concentración de polisacárido activado en la etapa (2) es de alrededor de 0,1 mg/ml a alrededor de 10,0 mg/ml. En una forma de realización adicional, la relación inicial (peso en peso) de polisacárido activado con respecto a la proteína portadora es entre 5:1 y 0.1:1. En otra forma de realización, el agente reductor se selecciona del grupo que consiste en cianoborohidruro de sodio (NaBH_3CN), triacetoxiborohidruro de sodio, borohidruro de sodio o zinc en presencia de ácidos de Bronsted o Lewis, amina boranos, tales como piridina borano, 2-picolino borano, 2,6-diboran-metanol, dimetilamin-borano, $t\text{-BuMe}^i\text{PrN-BH}_3$, bencilamin- BH_3 o 5-etil-2-metilpiridina borano (PEMB). En una forma de realización preferida, el agente reductor es (NaBH_3CN). Aun en otra forma de realización, la cantidad de agente reductor es de alrededor de 0,1 a alrededor de 10,0 equivalentes molares. En otra forma de realización, la reacción de reducción de la etapa (2) dura entre 1 hora y 60 horas. En otra forma de realización, la temperatura de la reacción de reducción se mantiene entre 10 °C y 40 °C.

En un aspecto adicional de la invención, el método para obtener un conjugado inmunógeno proteína-polisacárido también comprende una etapa (etapa (c)) de bloquear el aldehído sin reaccionar agregando un borohidruro. En una forma de realización, la cantidad de borohidruro es de alrededor de 0,1 a alrededor de 10,0 equivalentes molares. En otra forma de realización, el borohidruro se selecciona del grupo que consiste en borohidruro de sodio (NaBH_4), cianoborohidruro de sodio, borohidruro de litio, borohidruro de potasio, borohidruro de tetrabutilamonio, borohidruro de calcio y borohidruro de magnesio. En una forma de realización preferida, el borohidruro es borohidruro de sodio (NaBH_4). En otra forma de realización, la etapa de bloqueo dura entre 0,1 horas y 10 horas. Aun en otra forma de realización, la temperatura de la etapa de bloqueo se mantiene entre alrededor de 15 °C y alrededor de 45 °C.

En otro aspecto de la invención, el método también comprende la etapa de purificar el conjugado proteína-polisacárido. En una forma de realización, el conjugado proteína-polisacárido comprende menos de alrededor de 40 % de polisacárido libre en comparación

con la cantidad total de polisacárido. En otra forma de realización, la relación (peso en peso) de polisacárido con respecto a la proteína portadora en el conjugado es de alrededor de 0,5 a alrededor de 3,0. En otra forma de realización, el grado de conjugación del conjugado es entre 2 y 15.

Aun otro aspecto de la invención se refiere a métodos para obtener conjugados inmunógenos proteína-polisacárido de la presente invención, que comprenden las etapas de: (a) hacer reaccionar polisacárido capsular de GBS aislado con un agente oxidante; (b) inactivar la reacción de oxidación de la etapa (a) agregando un agente de inactivación que da como resultado un polisacárido capsular de GBS activado; (c) formular un compuesto con polisacárido capsular de GBS activado y una proteína portadora, (d) hacer reaccionar el compuesto de polisacárido capsular de GBS activado y proteína portadora con un agente reductor para formar un conjugado proteína portadora-polisacárido capsular de GBS, y (e) bloquear el aldehído sin reaccionar agregando borohidruro de sodio (NaBH_4), en donde las etapas (c),(d) y (e) se llevan a cabo en DMSO.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1 Comparación de actividad opsónica de IgG aislada y de suero de ratones inmunizados con vacunas monovalentes GBS Ia-CRM₁₉₇, GBS Ib-CRM₁₉₇, GBS II-CRM₁₉₇, GBS III-CRM₁₉₇, GBS IV-CRM₁₉₇ y GBS V-CRM₁₉₇.

Figura 2 Estabilidad de GBS Ia-CRM₁₉₇ (según se muestra por el cambio de % en el peso molecular usando SEC MALLS) y posterior almacenamiento acelerado (4 semanas) a 50 °C.

Figura 3 Estabilidad de GBS Ib-CRM₁₉₇ (según se muestra por el cambio de % en el peso molecular usando SEC MALLS) y posterior almacenamiento acelerado (4 semanas) a 50 °C.

Figura 4 Estabilidad de GBS II-CRM₁₉₇ (según se muestra por el cambio de % en el peso molecular usando SEC MALLS) y posterior almacenamiento acelerado (4 semanas) a 50 °C.

Figura 5 Estabilidad de GBS III-CRM₁₉₇ (según se muestra por el cambio de % en el peso molecular usando SEC MALLS) y posterior almacenamiento acelerado (4 semanas) a 50 °C.

Figura 6 Estabilidad de GBS IV-CRM₁₉₇ (según se muestra por el cambio de % en el peso molecular usando SEC MALLS) y posterior almacenamiento acelerado (4 semanas) a 50 °C.

Figura 7 Estabilidad de GBS V-CRM₁₉₇ (según se muestra por el cambio de % en el peso molecular usando SEC MALLS) y posterior almacenamiento acelerado (4 semanas) a 50 °C.

Figura 8 Estabilidad de GBS Ia-CRM₁₉₇, GBS Ib-CRM₁₉₇, GBS III-CRM₁₉₇ y GBS IV-CRM₁₉₇, (según se muestra por el ácido siálico libre) y posterior almacenamiento a 37 °C.

Figura 9 Estabilidad de pH en vacuna contra GBS hexavalente (GBS Ia-CRM₁₉₇, GBS Ib-CRM₁₉₇, GBS II-CRM₁₉₇, GBS III-CRM₁₉₇, GBS IV-CRM₁₉₇ y GBS V-CRM₁₉₇) usando succinato como amortiguador.

Figura 10 Estabilidad de pH en vacuna contra GBS hexavalente (GBS Ia-CRM₁₉₇, GBS Ib-CRM₁₉₇, GBS II-CRM₁₉₇, GBS III-CRM₁₉₇, GBS IV-CRM₁₉₇ y GBS V-CRM₁₉₇) usando histidina como amortiguador.

Figura 11 Efecto de la concentración de amortiguador de histidina en una vacuna contra GBS hexavalente (GBS Ia-CRM₁₉₇, GBS Ib-CRM₁₉₇, GBS II-CRM₁₉₇, GBS III-CRM₁₉₇, GBS IV-CRM₁₉₇ y GBS V-CRM₁₉₇) en la fijación de conjugados de GBS a aluminio en una dosis de 10 mcg/ml.

Figura 12 Efecto de la concentración de amortiguador histidina en una vacuna contra GBS hexavalente (GBS Ia-CRM₁₉₇, GBS Ib-CRM₁₉₇, GBS II-CRM₁₉₇, GBS III-CRM₁₉₇, GBS IV-CRM₁₉₇ y GBS V-CRM₁₉₇) en la fijación de conjugados de GBS a aluminio en una dosis de 40 mcg/ml.

Figura 13 Efecto de la concentración de polisorbato 80 en una vacuna contra GBS hexavalente (GBS Ia-CRM₁₉₇, GBS Ib-CRM₁₉₇, GBS II-CRM₁₉₇, GBS III-CRM₁₉₇, GBS IV-CRM₁₉₇ y GBS V-CRM₁₉₇) en la pérdida de porcentaje de antigenicidad total después de estrés por agitación.

Figura 14 Efecto de la concentración de aluminio en una vacuna contra GBS hexavalente (GBS Ia-CRM₁₉₇, GBS Ib-CRM₁₉₇, GBS II-CRM₁₉₇, GBS III-CRM₁₉₇, GBS IV-CRM₁₉₇ y GBS V-CRM₁₉₇) en la fijación de conjugados de GBS a aluminio.

Figura 15 Efecto de 5,5 % (p/v) de sacarosa en una dosis de 10 mcg/ml de vacuna contra GBS hexavalente liofilizada (GBS Ia-CRM₁₉₇, GBS Ib-CRM₁₉₇, GBS II-CRM₁₉₇, GBS III-CRM₁₉₇, GBS IV-CRM₁₉₇ y GBS V-CRM₁₉₇) en la recuperación de la antigenicidad para cada serotipo.

Figura 16 Efecto de 7,0 % (p/v) de sacarosa en una dosis de 10 mcg/ml de vacuna contra GBS hexavalente liofilizada (GBS Ia-CRM₁₉₇, GBS Ib-CRM₁₉₇, GBS II-CRM₁₉₇, GBS III-CRM₁₉₇, GBS IV-CRM₁₉₇ y GBS V-CRM₁₉₇) en la recuperación de la antigenicidad para

cada serotipo.

Figura 17 Efecto de 8,5% (p/v) de sacarosa en una dosis de 10 mcg/ml de vacuna contra GBS hexavalente liofilizada (GBS Ia-CRM₁₉₇, GBS Ib-CRM₁₉₇, GBS II-CRM₁₉₇, GBS III-CRM₁₉₇, GBS IV-CRM₁₉₇ y GBS V-CRM₁₉₇) en la recuperación de la antigenicidad para cada serotipo.

Figura 18 Efecto de 5,5 % (p/v) de sacarosa en una dosis de 50 mcg/ml de vacuna contra GBS hexavalente liofilizada (GBS Ia-CRM₁₉₇, GBS Ib-CRM₁₉₇, GBS II-CRM₁₉₇, GBS III-CRM₁₉₇, GBS IV-CRM₁₉₇ y GBS V-CRM₁₉₇) en la recuperación de la antigenicidad para cada serotipo.

Figura 19 Efecto de 7,0% (p/v) de sacarosa en una dosis de 50 mcg/ml de vacuna contra GBS hexavalente liofilizada (GBS Ia-CRM₁₉₇, GBS Ib-CRM₁₉₇, GBS II-CRM₁₉₇, GBS III-CRM₁₉₇, GBS IV-CRM₁₉₇ y GBS V-CRM₁₉₇) en la recuperación de la antigenicidad para cada serotipo.

Figura 20 Efecto de 8,5% (p/v) de sacarosa en una dosis de 50 mcg/ml de vacuna contra GBS hexavalente liofilizada (GBS Ia-CRM₁₉₇, GBS Ib-CRM₁₉₇, GBS II-CRM₁₉₇, GBS III-CRM₁₉₇, GBS IV-CRM₁₉₇ y GBS V-CRM₁₉₇) en la recuperación de la antigenicidad para cada serotipo.

Figura 21 Efecto de 7,0% (p/v) de sacarosa en una dosis de 40 mcg/ml de vacuna contra GBS hexavalente liofilizada (GBS Ia-CRM₁₉₇, GBS Ib-CRM₁₉₇, GBS II-CRM₁₉₇, GBS III-CRM₁₉₇, GBS IV-CRM₁₉₇ y GBS V-CRM₁₉₇) en la recuperación de la antigenicidad para cada serotipo.

Figura 22 Efecto de 2,0 % (p/v) de sacarosa y 4,0 % (p/v) de manitol en una dosis de 40 mcg/ml de vacuna contra GBS hexavalente liofilizada (GBS Ia-CRM₁₉₇, GBS Ib-CRM₁₉₇, GBS II-CRM₁₉₇, GBS III-CRM₁₉₇, GBS IV-CRM₁₉₇ y GBS V-CRM₁₉₇) en la recuperación de la antigenicidad para cada serotipo. **Figura 23** Efecto de 3,0 % (p/v) de sacarosa y 3,0 % (p/v) de manitol en una dosis de 40 mcg/ml de vacuna contra GBS hexavalente liofilizada (GBS Ia-CRM₁₉₇, GBS Ib-CRM₁₉₇, GBS II-CRM₁₉₇, GBS III-CRM₁₉₇, GBS IV-CRM₁₉₇ y GBS V-CRM₁₉₇) en la recuperación de la antigenicidad para cada serotipo.

Figura 24 Efecto de 2,0 % (p/v) de sacarosa y 4,0 % (p/v) de glicina en una dosis de 40 mcg/ml de vacuna contra GBS hexavalente liofilizada (GBS Ia-CRM₁₉₇, GBS Ib-CRM₁₉₇, GBS II-CRM₁₉₇, GBS III-CRM₁₉₇, GBS IV-CRM₁₉₇ y GBS V-CRM₁₉₇) en la recuperación de la antigenicidad para cada serotipo.

Figura 25 Efecto de 3,0 % (p/v) de sacarosa y 3,0 % (p/v) de glicina en una dosis de 40 mcg/ml de vacuna contra GBS hexavalente liofilizada (GBS Ia-CRM₁₉₇, GBS Ib-CRM₁₉₇, GBS II-CRM₁₉₇, GBS III-CRM₁₉₇, GBS IV-CRM₁₉₇ y GBS V-CRM₁₉₇) en la recuperación de la antigenicidad para cada serotipo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Cabe destacar que la presente invención no está limitada a métodos particulares ni a condiciones experimentales descritos, ya que estos métodos y condiciones pueden variar. Asimismo, cabe destacar que la terminología que se usa en la presente tiene como finalidad describir solamente formas de realización particulares y no pretende limitarlas.

Si bien los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente pueden usarse en la práctica o en pruebas de la invención, a continuación se describen los métodos y materiales preferidos. Todas las publicaciones mencionadas en la presente se incorporan por referencia en su totalidad.

Las expresiones que se usan en la presente tienen los significados que las personas del oficio de nivel medio identifican y conocen; sin embargo, por razones de conveniencia y compleción, se indican expresiones particulares y sus significados a continuación y en toda la memoria descriptiva.

Como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen las referencias en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ello, por ejemplo, las referencias a “el método” incluyen uno o más métodos y/o etapas del tipo descrito en la presente y/o que serán evidentes para las personas del oficio de nivel medio al leer esta descripción.

Las expresiones “alrededor de” o “aproximadamente” se refieren a un rango estadísticamente significativo de un valor. Este rango puede estar en un orden de magnitud, en general, dentro del 20 %, más en general, aun dentro del 10 % y, aun más en general, dentro del 5% de un valor o rango determinados. La variación admisible comprendida por las expresiones “alrededor de” o “aproximadamente” depende del sistema particular que se estudie y podrá ser determinada con facilidad por una persona del oficio de nivel medio. Cuando se indique un rango en la presente solicitud, cada número entero dentro del rango también se contempla como una forma de realización de la invención.

Cabe destacar que, en esta descripción, términos como “comprende”, “comprendido”, “que comprende”, “contiene”, “que contiene” y similares pueden tener el significado que se les atribuye en la ley de patentes estadounidense; por ejemplo, pueden

significar "incluye", "incluido", "que incluye" y similares. Estos términos se refieren a la inclusión de un ingrediente o conjunto de ingredientes particulares sin excluir ningún otro ingrediente. Ciertas expresiones, tales como "que consiste esencialmente en" y "consiste esencialmente en" tienen el significado que se les atribuye en la ley de patentes estadounidense, por ejemplo, permiten la inclusión de ingredientes o etapas adicionales que no se apartan de las características novedosas o básicas de la invención, es decir, excluyen ingredientes o etapas adicionales no mencionados que se apartan de las características novedosas o básicas de la invención, y excluyen ingredientes o etapas del arte previo, tales como documentos en el estado de la técnica que se citan en la presente o que se incorporan por referencia en la presente, en especial, ya que es un objetivo del presente documento definir formas de realización que se puedan patentar, por ejemplo, novedosas, no evidentes, inventivas, con respecto al arte previo, por ejemplo, con respecto a documentos citados en la presente o incorporados por referencia en la presente. Además, las expresiones "consiste en" y "que consiste en" tienen el significado que se les atribuye en la ley de patentes estadounidense; a saber, que estas expresiones tienen un significado cerrado. En consecuencia, estas expresiones se refieren a la inclusión de un ingrediente o conjunto de ingredientes particulares y la exclusión de todos los otros ingredientes.

En general, el término "antígeno" se refiere a una molécula biológica, con frecuencia, una proteína, un péptido, un polisacárido, un lípido o un conjugado que contiene al menos un epítipo al cual un anticuerpo cognado se puede fijar de manera selectiva; o en algunos casos, a una sustancia inmunógena que puede estimular la producción de anticuerpos o respuestas de linfocitos T, o ambos, en un animal, que incluye composiciones que se inyectan o se absorben en un animal. La respuesta inmunitaria se puede generar en toda la molécula o en una o más porciones diferentes de la molécula (por ejemplo, un epítipo o hapteno). El término se puede usar para referirse a una molécula individual o a una población homogénea o heterogénea de moléculas antigénicas. Un antígeno es reconocido por los anticuerpos, los receptores de linfocitos T u otros elementos de inmunidad celular y/o humoral específica. El término "antígeno" incluye todos los epítipos antigénicos relacionados. Los epítipos de un antígeno determinado se pueden identificar usando cualquier cantidad de técnicas de mapeo de epítipos conocidas en el estado de la técnica (véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, NJ). Por ejemplo, los epítipos lineales se pueden determinar, por ejemplo, mediante la síntesis concurrente de grandes cantidades

de péptidos en soportes sólidos, los péptidos correspondientes a las porciones de la molécula proteica, y la reacción de los péptidos con anticuerpos mientras los péptidos aún están unidos a los soportes. Tales técnicas son conocidas en el estado de la técnica y se describen, por ejemplo, en la patente estadounidense N.º 4.708.871; Geysen, H.M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:3998-4002 (1984); Geysen, H.M., et al., Molec. Immunol., 23(7):709-715 (1986), que se incorporan en la presente por referencia en su totalidad. De manera similar, los epítomos conformacionales se pueden identificar determinando la conformación espacial de los aminoácidos, por ejemplo, mediante cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional (véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols, *supra*). Además, a los fines de la presente invención, el término "antígeno" también se puede usar para referirse a una proteína que incluye modificaciones, tales como eliminaciones, adiciones y sustituciones (en general, de naturaleza conservadora, pero pueden ser no conservadoras) y a la secuencia natural, siempre que la proteína mantenga su capacidad de generar una respuesta inmunitaria. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida al sitio, procedimientos de síntesis particulares o métodos de ingeniería genética, o pueden ser accidentales, por ejemplo, mediante mutaciones de huéspedes que producen los antígenos. Asimismo, el antígeno se puede derivar, obtener o aislar de un microbio, por ejemplo, una bacteria, o puede ser un organismo completo. De manera similar, también se incluye en la definición un oligonucleótido o polinucleótido que expresan un antígeno, tal como en las aplicaciones de inmunización de ácidos nucleicos. También se incluyen antígenos sintéticos, por ejemplo, poliepítomos, epítomos laterales y otros antígenos derivados en forma recombinante o sintética (Bergmann, C., et al., Eur. J. Immunol., 23(11):2777-2781(1993); Bergmann, C.C., et al., J. Immunol., 157(8):3242-3249(1996); Suhrbier, A., Immunol. and Cell Biol., 75(4):402-408 (1997)).

Las expresiones "vacuna" o "composición vacunal", que se usan de manera indistinta, se refieren a composiciones farmacéuticas que comprenden al menos una composición inmunógena que induce una respuesta inmunitaria en un animal.

Polisacáridos capsulares

Como se usa en la presente, el término "sacárido" se refiere a una porción de azúcar simple o unidad de monosacárido así como a combinaciones de dos o más porciones de azúcar simple o unidades de monosacárido unidas de manera covalente para formar disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. El término "sacárido" se puede usar de manera

indistinta con el término “carbohidrato”. El polisacárido puede ser lineal o ramificado.

El término “monosacárido”, como se usa en la presente, se refiere a un residuo de azúcar simple en un oligosacárido. El término “disacárido”, como se usa en la presente, se refiere a un polisacárido compuesto por dos unidades o porciones de monosacárido unidas mediante un enlace glucosídico.

En una forma de realización, el polisacárido es un oligosacárido (OS). El término “oligosacárido”, como se usa en la presente, se refiere a un compuesto que contiene dos o más unidades o porciones de monosacárido. En el contexto de un oligosacárido, una unidad o porción de monómero individual es un monosacárido que se une, o se puede unir, mediante un grupo hidroxilo a otra unidad o porción de monosacárido. Los oligosacáridos se pueden preparar mediante síntesis química de residuos de azúcar simple o mediante degradación química de polisacáridos biológicamente producidos. De manera alternativa, los oligosacáridos se pueden preparar mediante métodos enzimáticos *in vitro*.

En una forma de realización preferida, el polisacárido es un polisacárido (PS), que se refiere a un polímero lineal o ramificado de al menos 5 unidades o porciones de monosacárido. Con fines aclaratorios, una cantidad mayor de unidades de repetición, en donde n es mayor de alrededor de 5, por ejemplo, mayor de alrededor de 10, se denominará en la presente polisacárido.

En una forma de realización, el polisacárido es un polisacárido de la superficie celular. Un polisacárido de la superficie celular se refiere a un polisacárido que tiene al menos una porción ubicada en la membrana celular bacteriana o superficie celular bacteriana más exterior, que incluye la capa de peptidoglicano, la pared y la cápsula celulares. En general, un polisacárido de la superficie celular está asociado a la inducción de una respuesta inmunitaria *in vivo*. Un polisacárido de la superficie celular puede ser un “polisacárido de la pared celular” o un “polisacárido capsular.” En general, un polisacárido de la pared celular forma una capa discontinua en la superficie bacteriana.

En una forma de realización, el polisacárido es un polisacárido capsular. Un polisacárido capsular se refiere a un glicopolímero que incluye unidades de repetición de uno o más monosacáridos unidos por enlaces glucosídicos. En general, un polisacárido capsular forma una capa tipo cápsula alrededor de una célula bacteriana. El “polisacárido capsular” se refiere a la cápsula de polisacáridos que es externa a la pared celular de la mayoría de los aislados de estreptococos. Por ejemplo, todos los polisacáridos capsulares de GBS tienen una estructura de repetición ramificada con un ácido siálico terminal unido

en $\alpha 2-3$ que es necesario para la virulencia bacteriana. El ácido siálico asociado a la cápsula (cuantificado mediante ensayo HPLC) se detectó en > 94 % de aislados neonatales invasivos de T.E.S.T. cultivados *in vitro*.

Los inventores de la presente descubrieron que el nivel de ácido siálico de polisacáridos capsulares de GBS es una característica importante para producir una respuesta inmunitaria. Los descubrimientos anteriores solo proporcionaron información contradictoria sobre los niveles de ácido siálico para el serotipo V, con la conclusión de que se prefería el serotipo V desialilado (publicación de solicitud de patente internacional N.º WO 2012/035519) y que se podía usar el contenido de ácido siálico >50 % para el serotipo V (publicación de solicitud de patente internacional N.º WO 2014/053612). Sin embargo, en estas referencias no se describe la importancia de los niveles de ácido siálico para al menos una mayoría de polisacáridos de GBS en la inmunogenicidad. Los inventores de la presente descubrieron sorprendentemente que los polisacáridos capsulares de GBS necesitan alrededor de 60 % o más de ácido siálico antes de la conjugación para proporcionar una respuesta inmunitaria en comparación con aquellos polisacáridos que tienen niveles de ácido siálico nativos (es decir 100 % o mayor de alrededor de 95 %). Los niveles de ácido siálico de incluso 58 %, que se encuentran dentro del rango anterior descrito para el serotipo V, impactaron de manera negativa en la inmunogenicidad.

En consecuencia, en una forma de realización de la invención, los polisacáridos capsulares comprenden su nivel de ácido siálico natural, por ejemplo, alrededor de 100 % o mayor de alrededor de 95 %. En otra forma de realización, los polisacáridos capsulares se pueden desialilar hasta alrededor de 40 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 60 %), por ejemplo, hasta alrededor de 35 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 65 %), hasta alrededor de 30 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 70 %), hasta alrededor de 25 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 75 %), hasta alrededor de 20 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 80 %), hasta alrededor de 15 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 85 %), hasta alrededor de 10 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 90 %) y hasta alrededor de 5 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 95 %).

Cabe destacar que el 100 % del nivel de ácido siálico corresponde a alrededor de 1,0 mM de ácido siálico por mM de polisacárido. Por lo tanto, los polisacáridos capsulares pueden tener alrededor de 1,0 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, por ejemplo, al menos alrededor de 0,95 mM de ácido siálico por mM de polisacárido. En otra forma de

realización, el polisacárido capsular puede tener al menos alrededor de 0,6 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, por ejemplo, al menos alrededor de 0,65 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, al menos alrededor de 0,7 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, al menos alrededor de 0,75 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, al menos alrededor de 0,8 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, al menos alrededor de 0,85 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, al menos alrededor de 0,9 mM de ácido siálico por mM de polisacárido o al menos alrededor de 0,95 mM de ácido siálico por mM de polisacárido.

Los residuos siálicos terminales de algunos serotipos de polisacárido capsular (CP) son parcialmente O-acetilados (OAc) (Lewis, A.L., et al., Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 101(30):11123-8 (2004)). Los serotipos Ib, III, IV, V, VI y IX son parcialmente O-acetilados (hasta ~40 %), mientras que los serotipos Ia, II y VII tienen poca o ninguna O-acetilación (menos de alrededor de 5 %) (Lewis 2004). En una forma de realización de la invención, los polisacáridos capsulares comprenden su nivel de O-acetilación natural (alrededor de 0 % a alrededor de 40 %). En otra forma de realización, los polisacáridos capsulares pueden ser des-O-acetilados (menos de alrededor de 5 %). El grado de O-acetilación del polisacárido u oligosacárido se puede determinar mediante cualquier método conocido en el estado de la técnica, por ejemplo, mediante RMN protónica (Lemercinier, X., et al., Carbohydrate Research, 296:83-96 (1996); Jones, C., et al., Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 30:1233-1247 (2002); publicación de solicitud de patente internacional N.^{os} WO 2005/033148 y WO 00/56357). Otro método que se usa con frecuencia lo describe Hestrin, S., J. Biol. Chem., 180:249-261 (1949).

Debe tenerse en cuenta también que el 100 % de O-acetato corresponde a alrededor de 1,0 mM de O-acetato por mM de unidad de repetición de sacáridos. En consecuencia, los polisacáridos parcialmente O-acetilados comprenden al menos alrededor de 0,1, 0,2, 0,3, 0,35 o alrededor de 0,4 mM de O-acetato por mM de unidad de repetición de sacáridos. Un polisacárido des-O-acetilado comprende menos de alrededor de 0,01, 0,02, 0,03, 0,04 o 0,05 mM de O-acetato por mM de unidad de repetición de sacáridos.

En general, los microorganismos estreptocócicos que pueden causar enfermedades invasivas también pueden producir un CP que encapsula la bacteria y mejora su resistencia a la depuración por el sistema inmunitario innato del huésped. El CP sirve para ocultar la célula bacteriana en una cápsula protectora que hace que las bacterias se vuelvan resistentes a la fagocitosis e inactivación intracelular. Las bacterias no encapsuladas son

más susceptibles a la fagocitosis. Con frecuencia, los polisacáridos capsulares constituyen un importante factor de virulencia para muchos patógenos bacterianos, que incluyen *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* y *Staphylococcus aureus*.

El polisacárido capsular se puede usar para clasificar un serotipo de una especie particular de bacteria. En general, la clasificación de tipos se logra mediante la reacción con un antisuero o anticuerpo monoclonal específicos generados para una estructura específica o característica única del epítipo del polisacárido capsular. Existen diez serotipos de GBS: Ia, Ib y II–IX (Ferrieri, P., et al., Emerg. Infect. Dis. [Internet], 19(4) (2013), disponible en http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/19/4/12-1572_article.

En una forma de realización de la invención, el polisacárido se aísla de *Streptococcus agalactiae*. El polisacárido se puede aislar de cualquier cepa encapsulada de *S. agalactiae*, tal como 090, A909 (N.º de acceso a ATCC BAA-1138), 515 (N.º de acceso a ATCC BAA-1177), B523, CJB524, MB 4052 (N.º de acceso a ATCC 31574), H36B (N.º de acceso a ATCC 12401), S40, S42, MB 4053 (N.º de acceso a ATCC 31575), M709, 133, 7357, PFEGBST0267, MB 4055 (N.º de acceso a ATCC 31576), 18RS21 (N.º de acceso a ATCC BAA-1175), S16, S20, V8 (N.º de acceso a ATCC 12973), DK21, DK23, UAB, 5401, PFEGBST0708, MB 4082 (N.º de acceso a ATCC 31577), M132, 110, M781 (N.º de acceso a ATCC BAA-22), D136C(3) (N.º de acceso a ATCC 12403), M782, S23, 120, MB 4316 (M-732; N.º de acceso a ATCC 31475), M132, K79, COH1 (N.º de acceso a ATCC BAA-1176), PFEGBST0563, 3139 (N.º de acceso a ATCC 49446), CZ-NI-016, PFEGBST0961, 1169-NT1, CJB111(N.º de acceso a ATCC BAA-23), CJB112, 2603 V/R (N.º de acceso a ATCC BAA-611), NCTC 10/81, CJ11, PFEGBST0837, 118754, 114852, 114862, 114866, 118775, B 4589, B 4645, SS1214, CZ-PW-119, 7271, CZ-PW-045, JM9130013, JM9130672, IT-NI-016, IT-PW-62 y IT-PW-64.

Los polisacáridos descritos en la presente se pueden aislar mediante los métodos conocidos en el estado de la técnica, que incluyen, por ejemplo, los métodos descritos en la presente. Como se usa en la presente, “aislado” significa que se obtiene y se separa de una fuente particular. El término “aislado” también se refiere a que no se encuentra en su forma, estado y/o entorno natural respectivo. Por ejemplo, “aislado de estreptococo” se refiere a una materia que se obtuvo y se separó de una célula estreptocócica. El polisacárido aislado no es natural. El término “aislado” significa que el material se retira de su entorno original (por ejemplo, el entorno natural si es natural) o de su organismo huésped

si es una entidad recombinante, o se lo lleva de un entorno a otro diferente. Por ejemplo, un polisacárido capsular, una proteína o un péptido "aislados" son sustancialmente libres de material celular u otra proteína contaminante de la fuente celular o tisular de la cual la proteína deriva, o son sustancialmente libres de precursores químicos u otras sustancias químicas cuando se sintetizan químicamente, o de otro modo están presentes en una mezcla como parte de una reacción química. En la presente invención, las proteínas o los polisacáridos se pueden aislar de la célula bacteriana o de residuos celulares, de manera que se proporcionen en una forma útil en la obtención de una composición inmunógena. Los términos "aislado" o "aislar" pueden incluir métodos para purificar un polisacárido aislado conocido en el estado de la técnica y/o métodos descritos en la presente. La expresión "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de un polipéptido/proteína, en donde el polipéptido/proteína se separa de los componentes celulares de las células de las que se aísla o se produce de manera recombinante. Por lo tanto, un polisacárido capsular, una proteína o un péptido que son sustancialmente libres de material celular incluyen preparaciones del polisacárido capsular, de la proteína o del péptido que tienen menos de alrededor de 30 %, 20 %, 10 %, 5 %, 2,5 % o 1 % (en peso seco) de proteína contaminante o polisacárido u otro material celular. Cuando el polipéptido/proteína se produce de manera recombinante, también es, preferentemente, sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de alrededor de 20 %, 10 % o 5 % del volumen de la preparación de proteínas. Cuando el polipéptido/proteína o polisacárido se producen mediante síntesis química, son, preferentemente, sustancialmente libres de precursores químicos u otras sustancias químicas, es decir, se separan de precursores químicos u otras sustancias químicas que participan de la síntesis de la proteína o polisacárido. En consecuencia, las preparaciones del polipéptido/proteína o polisacárido tienen menos de alrededor de 30 %, 20 %, 10 %, 5 % (en peso seco) de precursores químicos o compuestos que no sean un fragmento de interés de polipéptido/proteína o polisacárido.

En una forma de realización de la invención, el polisacárido se aísla de una bacteria. En otra forma de realización de la invención, el polisacárido se produce de manera recombinante. En otra forma de realización, el polisacárido es sintético o se sintetiza químicamente de acuerdo con métodos convencionales. Aun en otra forma de realización de la invención, el polisacárido se prepara mediante la expresión en un huésped sustituto después de clonar y expresar una vía biosintética para producir el polisacárido. En una

forma de realización, el polisacárido es inmunógeno. Por ejemplo, los inventores descubrieron que cada polisacárido descrito en la presente puede inducir o provocar una respuesta inmunitaria. La expresión “inmunógeno” se refiere a la capacidad de iniciar, desencadenar, causar, mejorar, aumentar y/o acrecentar una respuesta inmunitaria humoral y/o celular en un mamífero. En una forma de realización, el mamífero es un ser humano, primate, conejo, cerdo, ratón, etc.

El peso molecular del polisacárido capsular se debe tener en consideración para usar en composiciones inmunógenas. Los polisacáridos capsulares de alto peso molecular pueden inducir ciertas respuestas inmunitarias del anticuerpo debido a una mayor valencia de los epítopos presentes en la superficie antigénica. Se tiene en cuenta el aislamiento y la purificación de los polisacáridos capsulares de alto peso molecular para usar en los conjugados, las composiciones y los métodos de la presente invención.

Sin embargo, en una forma de realización, el tamaño del polisacárido se puede ajustar a un rango de peso molecular (MW) que sea inferior al peso molecular del polisacárido capsular nativo antes de la conjugación con una proteína portadora. El tamaño del polisacárido capsular purificado se reduce a fin de generar conjugados con características de filtrabilidad y/o rendimientos ventajosos.

En una forma de realización como tal, el tamaño del polisacárido capsular purificado se reduce mediante homogeneización de alta presión. La homogeneización de alta presión alcanza altas velocidades de cizallamiento mediante el bombeo del flujo del proceso a través de un paso de flujo con dimensiones suficientemente pequeñas. La velocidad de cizallamiento se aumenta usando una homogeneización de presión aplicada en mayor medida, y el tiempo de exposición se puede aumentar recirculando el flujo de alimentación a través del homogeneizador.

En una forma de realización, el polisacárido descrito en la presente puede inducir la actividad opsónica. En otra forma de realización, el polisacárido descrito en la presente puede inducir la actividad opsónica y fagocítica (por ejemplo, la actividad opsonofagocítica).

La actividad opsónica u opsonización se refiere a un proceso mediante el cual una opsonina (por ejemplo, un anticuerpo o un factor de complemento) se fija a un antígeno (por ejemplo, un polisacárido aislado descrito en la presente), que facilita la unión del antígeno con un fagocito o una célula fagocítica (por ejemplo, un macrófago, una célula dendrítica y un leucocito polimorfonuclear (PMNL)). Es más probable que algunas bacterias, tales como las bacterias encapsuladas que no están generalmente fagocitadas debido a la presencia

de la cápsula, sean reconocidas por los fagocitos cuando están recubiertas con un anticuerpo opsónico. En una forma de realización, el polisacárido induce una respuesta inmunitaria, por ejemplo, un anticuerpo, que es opsónica. En una forma de realización, la actividad opsónica es contra un coco gram positivo, preferentemente, contra una especie de *Streptococcus*, con mayor preferencia, contra al menos una cepa de *S. agalactiae*.

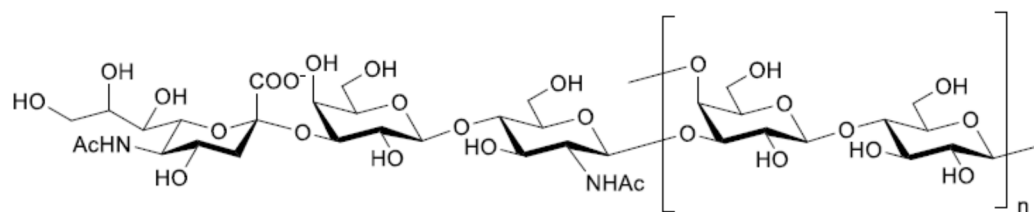
Aun en otra forma de realización, el polisacárido descrito en la presente puede inducir una respuesta inmunitaria bactericida. En una forma de realización, la actividad bactericida es contra un coco gram positivo, preferentemente, contra una especie de *Streptococcus*, con mayor preferencia, contra al menos una cepa de *S. agalactiae*.

Los métodos para medir la opsonización, fagocitosis y/o actividad bactericida se conocen en el estado de la técnica, por ejemplo, midiendo la reducción de carga bacteriana *in vivo* (por ejemplo, midiendo niveles de bacteriemia en mamíferos expuestos a una especie de *Streptococcus*) y/o midiendo la inactivación de células bacterianas *in vitro* (por ejemplo, un ensayo opsonofagocítico *in vitro*). En una forma de realización, el polisacárido puede inducir una actividad opsónica, fagocítica y/o bactericida en comparación con un control adecuado, por ejemplo, en comparación con antisueros producidos contra un coco gram positivo termoinactivado.

Serotipo Ia

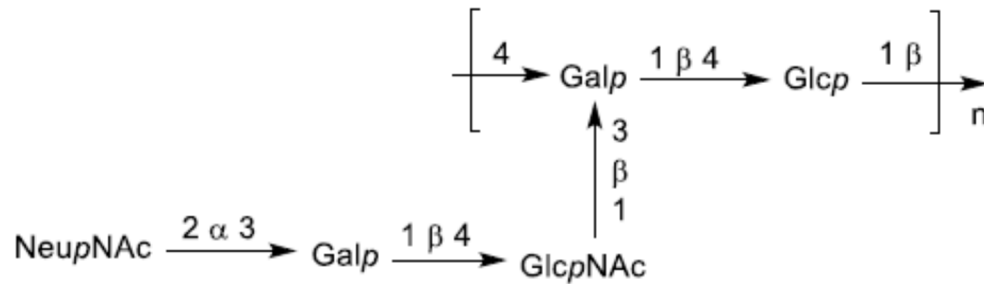
Una forma de realización incluye un polisacárido capsular de GBS serotipo Ia. La estructura del serotipo Ia se puede describir de la siguiente manera:

a)



o

b)



El peso molecular de los polisacáridos capsulares serotipo la antes de la conjugación es de alrededor de 5 kDa a alrededor de 1.000 kDa, por ejemplo, de alrededor de 25 kDa a alrededor de 750 kDa, de alrededor de 25 kDa a alrededor de 500 kDa, de alrededor de 25 kDa a alrededor de 450 kDa, de alrededor de 25 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 25 kDa a alrededor de 350 kDa, de alrededor de 25 kDa a alrededor de 300 kDa, de alrededor de 25 kDa a alrededor de 250 kDa, de alrededor de 25 kDa a alrededor de 200 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 750 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 500 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 450 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 350 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 300 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 250 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 200 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 750 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 500 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 450 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 350 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 300 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 250 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 200 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 750 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 700 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 650 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 600 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 550 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 500 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 450 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 350 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 300 kDa, de alrededor de 200 kDa a 750 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 700 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 650 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 600 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 550 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 500 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 450 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 750 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 700 kDa, de

alrededor de 250 kDa a alrededor de 650 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 600 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 550 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 500 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 450 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 300 kDa a 750 kDa, de alrededor de 300 kDa a alrededor de 700 kDa, de alrededor de 300 kDa a alrededor de 650 kDa, de alrededor de 300 kDa a alrededor de 600 kDa, de alrededor de 300 kDa a alrededor de 550 kDa, o de alrededor de 300 kDa a alrededor de 500 kDa. En una forma de realización preferida, el peso molecular del polisacárido capsular antes de la conjugación es de alrededor de 25 kDa a alrededor de 200 kDa. En otra forma de realización preferida, el peso molecular del polisacárido capsular antes de la conjugación es de alrededor de 100 kDa a alrededor de 400 kDa. Cualquier número entero dentro de cualquiera de los rangos anteriores se contempla como forma de realización de la descripción.

En una forma de realización particular, se usa un proceso de homogeneización de alta presión para reducir el tamaño del polisacárido capsular de GBS nativo serotipo la y a la vez conservar las características estructurales, tales como ácido siálico, del polisacárido.

En una forma de realización de la invención, el polisacárido capsular serotipo la comprende su nivel de ácido siálico natural, por ejemplo, alrededor de 100 % o mayor de alrededor de 95 %. En otra forma de realización, los polisacáridos capsulares se pueden desialilar hasta alrededor de 40 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 60 %), por ejemplo, hasta alrededor de 35 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 65 %), hasta alrededor de 30 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 70 %), hasta alrededor de 25 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 75 %), hasta alrededor de 20 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 80 %), hasta alrededor de 15 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 85 %), hasta alrededor de 10 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 90 %) o hasta alrededor de 5 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 95 %) antes de la conjugación.

En otra forma de realización, el polisacárido capsular serotipo la tiene alrededor de 1,0 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, por ejemplo, al menos alrededor de 0,95 mM de ácido siálico por mM de polisacárido antes de la conjugación. En otra forma de realización, el polisacárido capsular puede tener al menos alrededor de 0,6 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, por ejemplo, al menos alrededor de 0,65 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, al menos alrededor de 0,7 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, al menos alrededor de 0,75 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, al

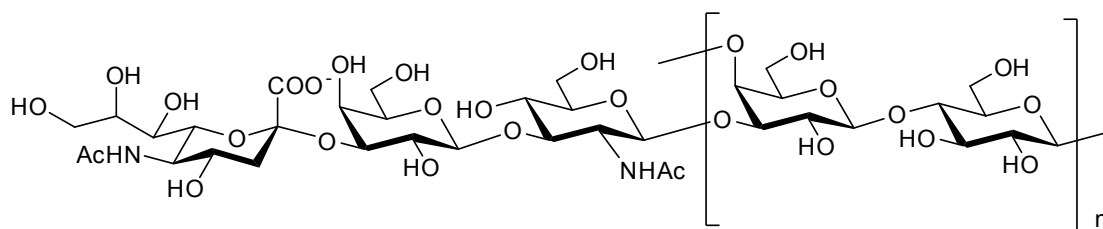
menos alrededor de 0,8 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, al menos alrededor de 0,85 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, al menos alrededor de 0,9 mM de ácido siálico por mM de polisacárido o al menos alrededor de 0,95 mM de ácido siálico por mM de polisacárido antes de la conjugación.

Los polisacáridos capsulares serotipo Ia tienen una O-acetilación de menos de alrededor de 5 %. Algunos ejemplos de cepas de polisacáridos capsulares serotipo Ia de la invención incluyen 090, A909 (N.º de acceso a ATCC BAA-1138), 515 (N.º de acceso a ATCC BAA-1177), B523, CJB524 y MB 4052 (N.º de acceso a ATCC 31574).

Serotipo Ib

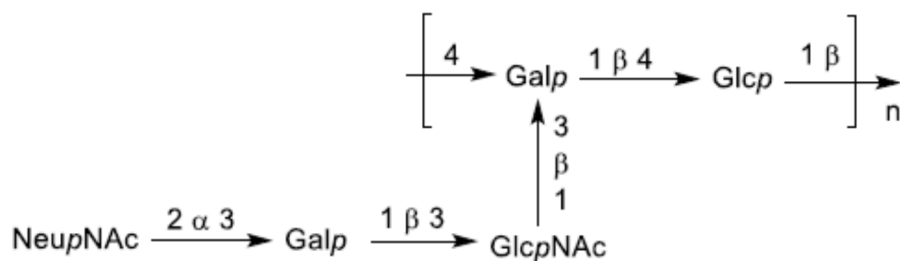
Una forma de realización incluye un polisacárido capsular de GBS serotipo Ib. La estructura del serotipo Ib se puede describir de la siguiente manera:

a)



o

b)



El peso molecular de los polisacáridos capsulares serotipo Ib antes de la conjugación es de alrededor de 5 kDa a alrededor de 1.000 kDa, por ejemplo, de alrededor de 25 kDa a alrededor de 750 kDa, de alrededor de 25 kDa a alrededor de 500 kDa, de alrededor de 25 kDa a alrededor de 450 kDa, de alrededor de 25 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 25 kDa a alrededor de 350 kDa, de alrededor de 25 kDa a alrededor de 300 kDa, de alrededor de 25 kDa a alrededor de 250 kDa, de alrededor de 25 kDa a alrededor de 200 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 750 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 500 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 450 kDa, de alrededor

de 50 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 350 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 300 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 250 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 200 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 750 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 500 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 450 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 350 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 300 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 250 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 200 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 750 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 700 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 650 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 600 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 550 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 500 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 450 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 350 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 300 kDa, de alrededor de 200 kDa a 750 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 700 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 650 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 600 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 550 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 500 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 450 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 750 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 700 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 650 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 600 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 550 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 500 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 450 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 300 kDa a 750 kDa, de alrededor de 300 kDa a alrededor de 700 kDa, de alrededor de 300 kDa a alrededor de 650 kDa, de alrededor de 300 kDa a alrededor de 600 kDa, de alrededor de 300 kDa a alrededor de 550 kDa, o de alrededor de 300 kDa a alrededor de 500 kDa. En una forma de realización preferida, el peso molecular del polisacárido capsular antes de la conjugación es de alrededor de 25 kDa a alrededor de 400 kDa. Cualquier número entero dentro de cualquiera de los rangos anteriores se contempla como forma de realización de la descripción.

En una forma de realización de la invención, el polisacárido capsular serotipo Ib comprende su nivel de ácido siálico natural, por ejemplo, alrededor de 100 % o mayor de alrededor de 95 %. En otra forma de realización, los polisacáridos capsulares se pueden desialilar hasta alrededor de 40 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 60 %), por ejemplo, hasta alrededor de 35 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 65 %), hasta

alrededor de 30 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 70 %), hasta alrededor de 25 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 75 %), hasta alrededor de 20 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 80 %), hasta alrededor de 15 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 85 %), hasta alrededor de 10 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 90 %) o hasta alrededor de 5 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 95 %) antes de la conjugación.

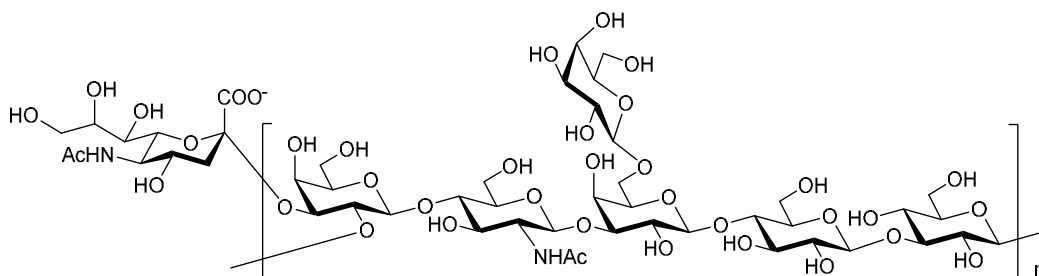
En otra forma de realización, el polisacárido capsular serotipo Ib tiene alrededor de 1,0 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, por ejemplo, al menos alrededor de 0,95 mM de ácido siálico por mM de polisacárido antes de la conjugación. En otra forma de realización, el polisacárido capsular puede tener al menos alrededor de 0,6 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, por ejemplo, al menos alrededor de 0,65 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, al menos alrededor de 0,7 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, al menos alrededor de 0,75 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, al menos alrededor de 0,8 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, al menos alrededor de 0,85 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, al menos alrededor de 0,9 mM de ácido siálico por mM de polisacárido o al menos alrededor de 0,95 mM de ácido siálico por mM de polisacárido antes de la conjugación.

Los polisacáridos capsulares serotipo Ib tienen una O-acetilación de alrededor de 0 % a alrededor de 40 %. En una forma de realización de la invención, el polisacárido es des-O-acetilado (es decir, tiene una O-acetilación de menos de alrededor de 5 %). Algunos ejemplos de cepas de polisacáridos capsulares serotipo Ib de la invención incluyen H36B (N.º de acceso a ATCC 12401), S40, S42, MB 4053 (N.º de acceso a ATCC 31575), M709, 133, 7357 y PFEGBST0267.

Serotipo II

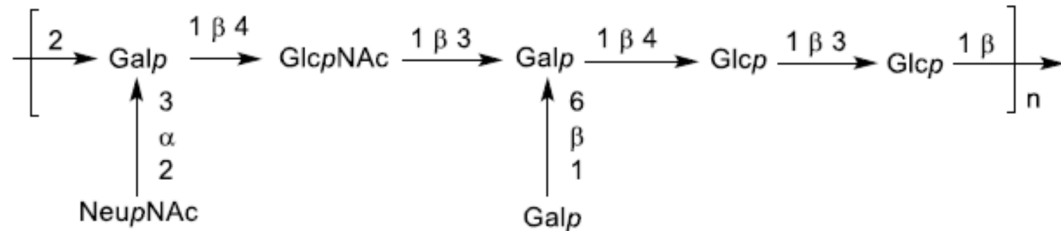
Una forma de realización incluye un polisacárido capsular de GBS serotipo II. La estructura del serotipo II se puede describir de la siguiente manera:

a)



o

b)



El peso molecular de los polisacáridos capsulares serotipo II antes de la conjugación es de alrededor de 5 kDa a alrededor de 1.000 kDa, por ejemplo, de alrededor de 25 kDa a alrededor de 750 kDa, de alrededor de 25 kDa a alrededor de 500 kDa, de alrededor de 25 kDa a alrededor de 450 kDa, de alrededor de 25 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 25 kDa a alrededor de 350 kDa, de alrededor de 25 kDa a alrededor de 300 kDa, de alrededor de 25 kDa a alrededor de 250 kDa, de alrededor de 25 kDa a alrededor de 200 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 750 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 500 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 450 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 350 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 300 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 250 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 200 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 750 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 500 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 450 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 350 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 300 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 250 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 200 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 750 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 700 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 650 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 600 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 550 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 500 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 450 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 350 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 300 kDa, de alrededor de 200 kDa a 750 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 700 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 650 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 600 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 550 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 500 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 450 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor

de 750 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 700 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 650 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 600 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 550 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 500 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 450 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 300 kDa a 750 kDa, de alrededor de 300 kDa a alrededor de 700 kDa, de alrededor de 300 kDa a alrededor de 650 kDa, de alrededor de 300 kDa a alrededor de 600 kDa, de alrededor de 300 kDa a alrededor de 550 kDa, o de alrededor de 300 kDa a alrededor de 500 kDa. En una forma de realización preferida, el peso molecular del polisacárido capsular antes de la conjugación es de alrededor de 25 kDa a alrededor de 400 kDa. Cualquier número entero dentro de cualquiera de los rangos anteriores se contempla como forma de realización de la descripción.

En una forma de realización de la invención, el polisacárido capsular serotipo II comprende su nivel de ácido siálico natural, por ejemplo, alrededor de 100 % o mayor de alrededor de 95 %. En otra forma de realización, los polisacáridos capsulares se pueden desialilar hasta alrededor de 40 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 60 %), por ejemplo, hasta alrededor de 35 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 65 %), hasta alrededor de 30 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 70 %), hasta alrededor de 25 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 75 %), hasta alrededor de 20 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 80 %), hasta alrededor de 15 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 85 %), hasta alrededor de 10 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 90 %) o hasta alrededor de 5 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 95 %) antes de la conjugación.

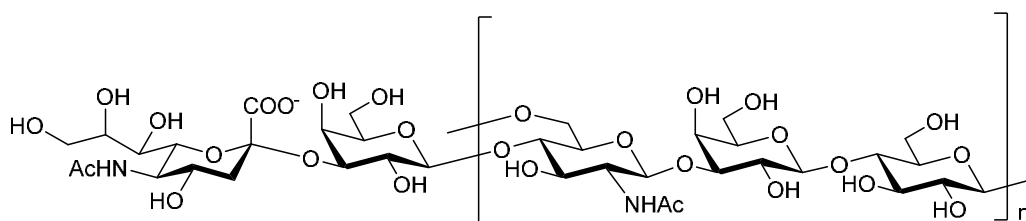
En otra forma de realización, el polisacárido capsular serotipo II tiene alrededor de 1,0 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, por ejemplo, al menos alrededor de 0,95 mM de ácido siálico por mM de polisacárido antes de la conjugación. En otra forma de realización, el polisacárido capsular puede tener al menos alrededor de 0,6 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, por ejemplo, al menos alrededor de 0,65 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, al menos alrededor de 0,7 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, al menos alrededor de 0,75 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, al menos alrededor de 0,8 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, al menos alrededor de 0,85 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, al menos alrededor de 0,9 mM de ácido siálico por mM de polisacárido o al menos alrededor de 0,95 mM de ácido siálico por mM de polisacárido antes de la conjugación.

Los polisacáridos capsulares serotipo II tienen una O-acetilación de menos de alrededor de 5 %. Algunos ejemplos de cepas de polisacáridos capsulares serotipo II de la invención incluyen MB 4055 (N.º de acceso a ATCC 31576), 18RS21 (N.º de acceso a ATCC BAA-1175), S16, S20, V8 (N.º de acceso a ATCC 12973), DK21, DK23, UAB, 5401 y PFEGBST0708.

Serotipo III

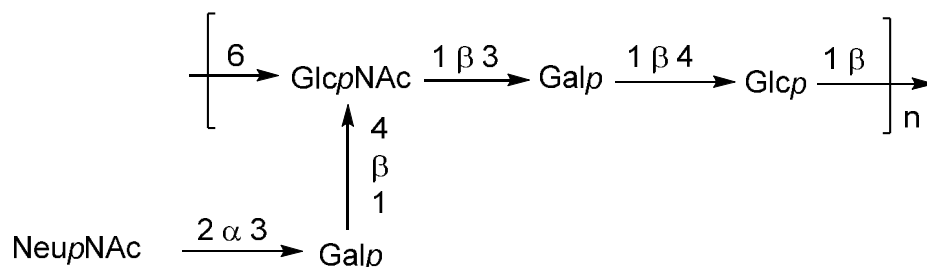
Una forma de realización incluye un polisacárido capsular de GBS serotipo III. La estructura del serotipo III se puede describir de la siguiente manera:

a)



o

b)



El peso molecular de los polisacáridos capsulares serotipo III antes de la conjugación es de alrededor de 5 kDa a alrededor de 1.000 kDa, por ejemplo, de alrededor de 25 kDa a alrededor de 750 kDa, de alrededor de 25 kDa a alrededor de 500 kDa, de alrededor de 25 kDa a alrededor de 450 kDa, de alrededor de 25 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 25 kDa a alrededor de 350 kDa, de alrededor de 25 kDa a alrededor de 300 kDa, de alrededor de 25 kDa a alrededor de 250 kDa, de alrededor de 25 kDa a alrededor de 200 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 750 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 500 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 450 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 350 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 300 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 250 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 200 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor

de 750 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 500 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 450 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 350 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 300 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 250 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 200 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 750 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 700 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 650 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 600 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 550 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 500 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 450 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 350 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 300 kDa, de alrededor de 200 kDa a 750 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 700 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 650 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 600 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 550 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 500 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 450 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 750 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 700 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 650 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 600 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 550 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 500 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 450 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 300 kDa a 750 kDa, de alrededor de 300 kDa a alrededor de 700 kDa, de alrededor de 300 kDa a alrededor de 650 kDa, de alrededor de 300 kDa a alrededor de 600 kDa, de alrededor de 300 kDa a alrededor de 550 kDa, o de alrededor de 300 kDa a alrededor de 500 kDa. En una forma de realización preferida, el peso molecular del polisacárido capsular antes de la conjugación es de alrededor de 25 kDa a alrededor de 200 kDa. En otra forma de realización preferida, el peso molecular del polisacárido capsular antes de la conjugación es de alrededor de 100 kDa a alrededor de 400 kDa. Cualquier número entero dentro de cualquiera de los rangos anteriores se contempla como forma de realización de la descripción.

En una forma de realización particular, se usa un proceso de homogeneización de alta presión para reducir el tamaño del polisacárido capsular de GBS nativo serotipo III y a la vez conservar las características estructurales, tales como ácido siálico, del polisacárido.

En una forma de realización de la invención, el polisacárido capsular serotipo III comprende su nivel de ácido siálico natural, por ejemplo, alrededor de 100 % o mayor de alrededor de 95 %. En otra forma de realización, los polisacáridos capsulares se pueden

desialilar hasta alrededor de 40 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 60 %), por ejemplo, hasta alrededor de 35 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 65 %), hasta alrededor de 30 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 70 %), hasta alrededor de 25 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 75 %), hasta alrededor de 20 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 80 %), hasta alrededor de 15 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 85 %), hasta alrededor de 10 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 90 %) o hasta alrededor de 5 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 95 %) antes de la conjugación.

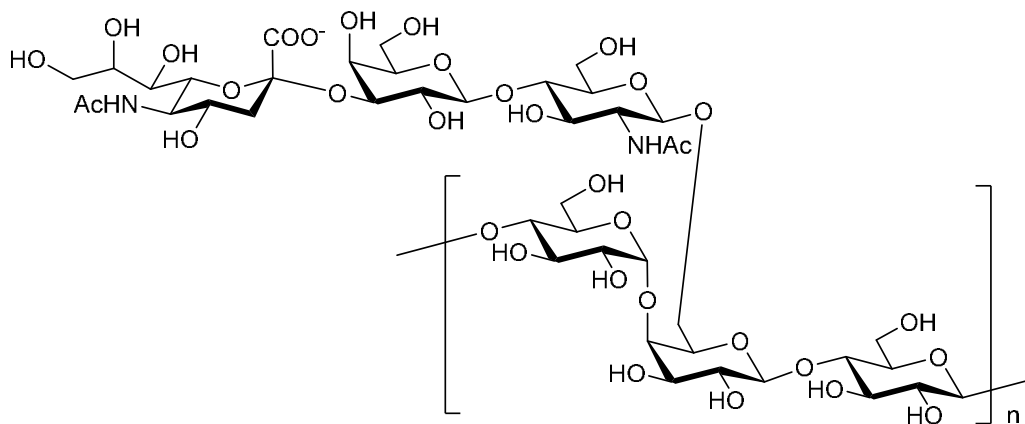
En otra forma de realización, el polisacárido capsular serotipo III tiene alrededor de 1,0 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, por ejemplo, al menos alrededor de 0,95 mM de ácido siálico por mM de polisacárido antes de la conjugación. En otra forma de realización, el polisacárido capsular puede tener al menos alrededor de 0,6 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, por ejemplo, al menos alrededor de 0,65 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, al menos alrededor de 0,7 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, al menos alrededor de 0,75 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, al menos alrededor de 0,8 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, al menos alrededor de 0,85 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, al menos alrededor de 0,9 mM de ácido siálico por mM de polisacárido o al menos alrededor de 0,95 mM de ácido siálico por mM de polisacárido antes de la conjugación.

Los polisacáridos capsulares serotipo III tienen una O-acetilación de alrededor de 0 % a alrededor de 40 %. En una forma de realización de la invención, el polisacárido es des-O-acetilado (es decir, tiene una O-acetilación de menos de alrededor de 5 %). Algunos ejemplos de cepas de polisacáridos capsulares serotipo III de la invención incluyen MB 4082 (N.º de acceso a ATCC 31577), M132, 110, M781 (N.º de acceso a ATCC BAA-22), D136C(3) (N.º de acceso a ATCC 12403), M782, S23, 120, MB 4316 (M-732; N.º de acceso a ATCC 31475), M132, K79, COH1 (N.º de acceso a ATCC BAA-1176) y PFEGBST0563.

Serotipo IV

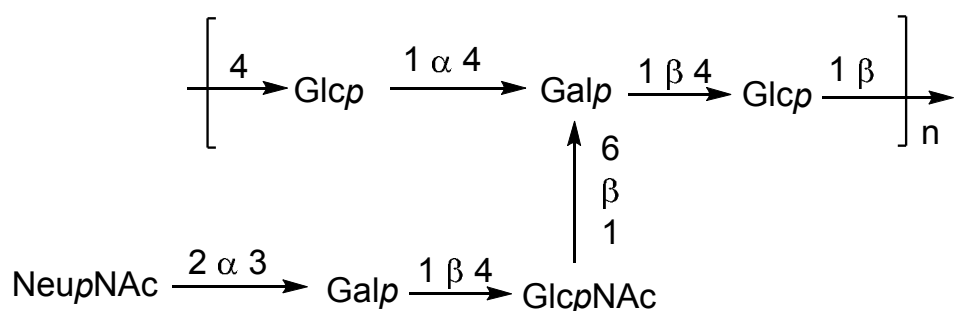
Una forma de realización incluye un polisacárido capsular de GBS serotipo IV. La estructura del serotipo IV se puede describir de la siguiente manera:

a)



o

b)



El peso molecular de los polisacáridos capsulares serotipo IV antes de la conjugación es de alrededor de 5 kDa a alrededor de 1.000 kDa, por ejemplo, de alrededor de 25 kDa a alrededor de 750 kDa, de alrededor de 25 kDa a alrededor de 500 kDa, de alrededor de 25 kDa a alrededor de 450 kDa, de alrededor de 25 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 25 kDa a alrededor de 350 kDa, de alrededor de 25 kDa a alrededor de 300 kDa, de alrededor de 25 kDa a alrededor de 250 kDa, de alrededor de 25 kDa a alrededor de 200 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 750 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 500 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 450 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 350 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 300 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 250 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 200 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 750 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 500 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 450 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 350 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 300 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 250 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 200 kDa, de

alrededor de 100 kDa a alrededor de 750 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 700 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 650 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 600 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 550 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 500 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 450 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 350 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 300 kDa, de alrededor de 200 kDa a 750 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 700 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 650 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 600 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 550 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 500 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 450 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 750 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 700 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 650 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 600 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 550 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 500 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 450 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 300 kDa a 750 kDa, de alrededor de 300 kDa a alrededor de 700 kDa, de alrededor de 300 kDa a alrededor de 650 kDa, de alrededor de 300 kDa a alrededor de 600 kDa, de alrededor de 300 kDa a alrededor de 550 kDa, o de alrededor de 300 kDa a alrededor de 500 kDa. En una forma de realización preferida, el peso molecular del polisacárido capsular antes de la conjugación es de alrededor de 25 kDa a alrededor de 400 kDa. Cualquier número entero dentro de cualquiera de los rangos anteriores se contempla como forma de realización de la descripción.

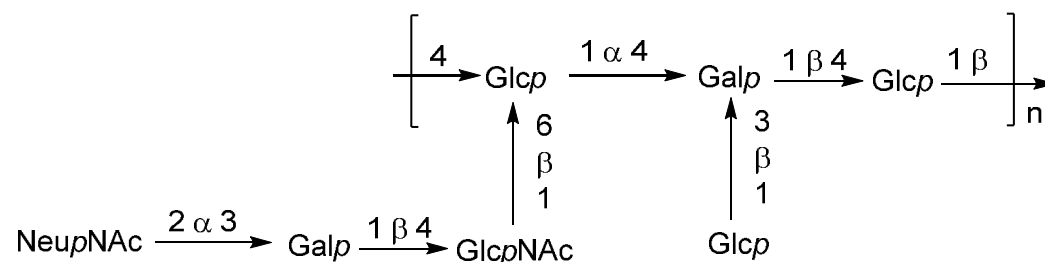
En una forma de realización de la invención, el polisacárido capsular serotipo IV comprende su nivel de ácido siálico natural, por ejemplo, alrededor de 100 % o mayor de alrededor de 95 %. En otra forma de realización, los polisacáridos capsulares se pueden desialilar hasta alrededor de 40 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 60 %), por ejemplo, hasta alrededor de 35 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 65 %), hasta alrededor de 30 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 70 %), hasta alrededor de 25 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 75 %), hasta alrededor de 20 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 80 %), hasta alrededor de 15 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 85 %), hasta alrededor de 10 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 90 %) o hasta alrededor de 5 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 95 %) antes de la conjugación.

En otra forma de realización, el polisacárido capsular serotipo IV tiene alrededor de

Los polisacáridos capsulares serotipo IV tienen una O-acetilación de alrededor de 0 % a alrededor de 40 %. En una forma de realización de la invención, el polisacárido es des-O-acetilado (es decir, tiene una O-acetilación de menos de alrededor de 5 %). Algunos ejemplos de cepas de polisacáridos capsulares serotipo IV de la invención incluyen 3139 (N.º de acceso a ATCC 49446), CZ-NI-016 y PFEGBST0961.

Una forma de realización incluye un polisacárido capsular de GBS serotipo V. La estructura del serotipo V se puede describir de la siguiente manera:

b)



El peso molecular de los polisacáridos capsulares serotipo V antes de la conjugación es de alrededor de 5 kDa a alrededor de 1.000 kDa, por ejemplo, de alrededor de 25 kDa a alrededor de 750 kDa, de alrededor de 25 kDa a alrededor de 500 kDa, de alrededor de 25 kDa a alrededor de 450 kDa, de alrededor de 25 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 25 kDa a alrededor de 350 kDa, de alrededor de 25 kDa a alrededor de 300 kDa, de alrededor de 25 kDa a alrededor de 250 kDa, de alrededor de 25 kDa a alrededor de 200 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 750 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 500 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 450 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 350 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 300 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 250 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 200 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 750 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 500 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 450 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 350 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 300 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 250 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 200 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 750 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 700 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 650 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 600 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 550 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 500 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 450 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 350 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 300 kDa, de alrededor de 200 kDa a 750 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 700 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 650 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 600 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 550 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 500 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 450 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 750 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 700 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 650 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 600 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 550 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 500 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 450 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 300 kDa a 750 kDa, de alrededor de 300 kDa a alrededor de 700 kDa, de alrededor de 300 kDa a alrededor de 650 kDa, de alrededor de 300 kDa a alrededor de 600 kDa, de alrededor de 300 kDa a alrededor de 550 kDa, o de alrededor de 300 kDa a alrededor de 500 kDa. En una forma de realización preferida, el peso molecular del

polisacárido capsular antes de la conjugación es de alrededor de 25 kDa a alrededor de 400 kDa. Cualquier número entero dentro de cualquiera de los rangos anteriores se contempla como forma de realización de la descripción.

En una forma de realización de la invención, el polisacárido capsular serotipo V comprende su nivel de ácido siálico natural, por ejemplo, alrededor de 100 % o mayor de alrededor de 95 %. En otra forma de realización, los polisacáridos capsulares se pueden desialilar hasta alrededor de 40 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 60 %), por ejemplo, hasta alrededor de 35 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 65 %), hasta alrededor de 30 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 70 %), hasta alrededor de 25 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 75 %), hasta alrededor de 20 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 80 %), hasta alrededor de 15 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 85 %), hasta alrededor de 10 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 90 %) o hasta alrededor de 5 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 95 %) antes de la conjugación.

En otra forma de realización, el polisacárido capsular serotipo V tiene alrededor de 1,0 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, por ejemplo, al menos alrededor de 0,95 mM de ácido siálico por mM de polisacárido antes de la conjugación. En otra forma de realización, el polisacárido capsular puede tener al menos alrededor de 0,6 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, por ejemplo, al menos alrededor de 0,65 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, al menos alrededor de 0,7 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, al menos alrededor de 0,75 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, al menos alrededor de 0,8 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, al menos alrededor de 0,85 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, al menos alrededor de 0,9 mM de ácido siálico por mM de polisacárido o al menos alrededor de 0,95 mM de ácido siálico por mM de polisacárido antes de la conjugación.

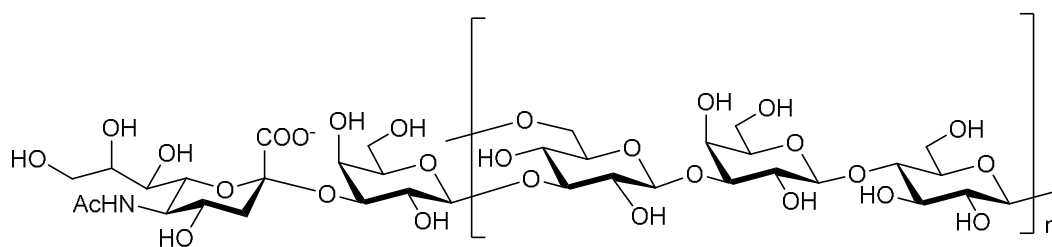
Los polisacáridos capsulares serotipo V tienen una O-acetilación de alrededor de 0 % a alrededor de 40 %. En una forma de realización de la invención, el polisacárido es des-O-acetilado (es decir, tiene una O-acetilación de menos de alrededor de 5 %). Algunos ejemplos de cepas de polisacáridos capsulares serotipo V de la invención incluyen 1169-NT1, CJB111 (N.º de acceso a ATCC BAA-23), CJB112, 2603 V/R (N.º de acceso a ATCC BAA-611), NCTC 10/81, CJ11 y PFEGBST0837.

Serotipo VI

Los polisacáridos capsulares de GBS serotipo VI se describen en von Hunolstein,

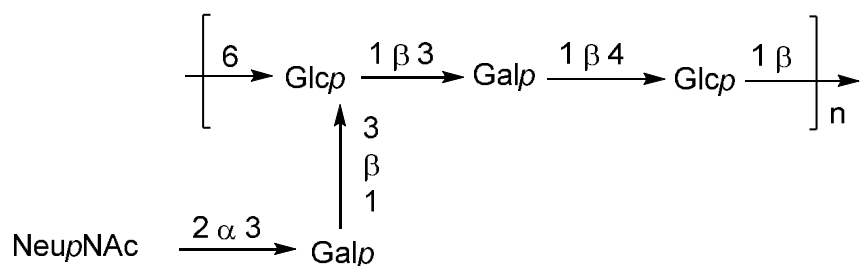
C., et al., *Infection and Immunity*, 61(94):1272-1280 (1993), cuya descripción se incorpora en la presente por referencia en su totalidad. La estructura del serotipo VI se puede describir de la siguiente manera:

a)



o

b)



El peso molecular de los polisacáridos capsulares serotipo VI antes de la conjugación es de alrededor de 5 kDa a alrededor de 1.000 kDa, por ejemplo, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 750 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 500 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 450 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 350 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 300 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 250 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 200 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 750 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 500 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 450 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 350 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 300 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 250 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 200 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 750 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 700 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 650 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 600 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 550 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 500 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 450 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 350 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor

de 300 kDa, de alrededor de 200 kDa a 750 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 700 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 650 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 600 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 550 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 500 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 450 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 750 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 700 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 650 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 600 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 550 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 500 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 450 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 300 kDa a 750 kDa, de alrededor de 300 kDa a alrededor de 700 kDa, de alrededor de 300 kDa a alrededor de 650 kDa, de alrededor de 300 kDa a alrededor de 600 kDa, de alrededor de 300 kDa a alrededor de 550 kDa, o de alrededor de 300 kDa a alrededor de 500 kDa. Cualquier número entero dentro de cualquiera de los rangos anteriores se contempla como forma de realización de la descripción.

En una forma de realización de la invención, el polisacárido capsular serotipo VI comprende su nivel de ácido siálico natural, por ejemplo, alrededor de 100 % o mayor de alrededor de 95 %. En otra forma de realización, los polisacáridos capsulares se pueden desialilar hasta alrededor de 40 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 60 %), por ejemplo, hasta alrededor de 35 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 65 %), hasta alrededor de 30 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 70 %), hasta alrededor de 25 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 75 %), hasta alrededor de 20 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 80 %), hasta alrededor de 15 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 85 %), hasta alrededor de 10 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 90 %) o hasta alrededor de 5 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 95 % de poli) antes de la conjugación.

En otra forma de realización, el polisacárido capsular serotipo VI tiene alrededor de 1,0 mM de ácido siálico por mM de sacárido, por ejemplo, al menos alrededor de 0,95 mM de ácido siálico por mM de polisacárido antes de la conjugación. En otra forma de realización, el polisacárido capsular puede tener al menos alrededor de 0,6 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, por ejemplo, al menos alrededor de 0,65 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, al menos alrededor de 0,7 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, al menos alrededor de 0,75 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, al menos alrededor de 0,8 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, al menos alrededor

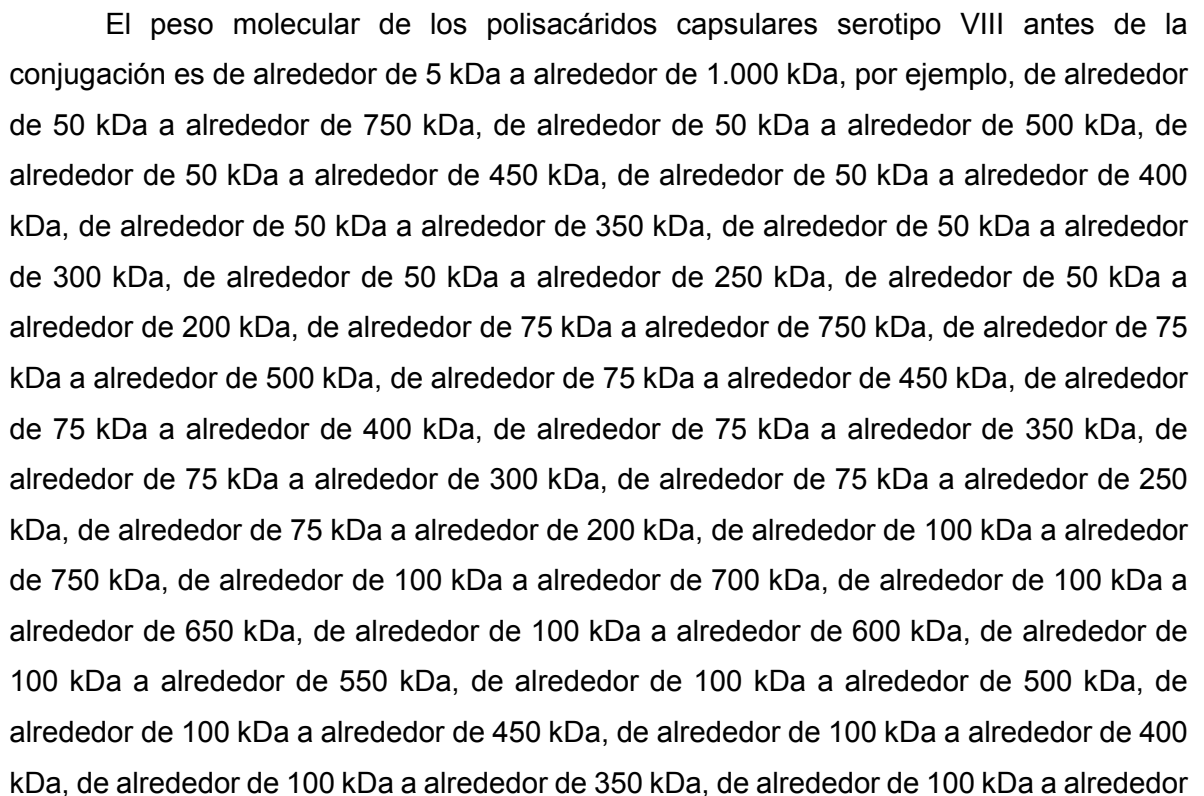
kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 350 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 300 kDa, de alrededor de 200 kDa a 750 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 700 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 650 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 600 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 550 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 500 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 450 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 750 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 700 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 650 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 600 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 550 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 500 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 450 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 300 kDa a 750 kDa, de alrededor de 300 kDa a alrededor de 700 kDa, de alrededor de 300 kDa a alrededor de 650 kDa, de alrededor de 300 kDa a alrededor de 600 kDa, de alrededor de 300 kDa a alrededor de 550 kDa, o de alrededor de 300 kDa a alrededor de 500 kDa. Cualquier número entero dentro de cualquiera de los rangos anteriores se contempla como forma de realización de la descripción.

En una forma de realización de la invención, el polisacárido capsular serotipo VII comprende su nivel de ácido siálico natural, por ejemplo, alrededor de 100 % o mayor de alrededor de 95 %. En otra forma de realización, los polisacáridos capsulares se pueden desialilar hasta alrededor de 40 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 60 %), por ejemplo, hasta alrededor de 35 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 65 %), hasta alrededor de 30 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 70 %), hasta alrededor de 25 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 75 %), hasta alrededor de 20 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 80 %), hasta alrededor de 15 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 85 %), hasta alrededor de 10 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 90 %) o hasta alrededor de 5 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 95 %) antes de la conjugación.

En otra forma de realización, el polisacárido capsular serotipo VII tiene alrededor de 1,0 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, por ejemplo, al menos alrededor de 0,95 mM de ácido siálico por mM de polisacárido antes de la conjugación. En otra forma de realización, el polisacárido capsular puede tener al menos alrededor de 0,6 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, por ejemplo, al menos alrededor de 0,65 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, al menos alrededor de 0,7 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, al menos alrededor de 0,75 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, al

Los polisacáridos capsulares serotipo VII tienen una O-acetilación de menos de alrededor de 5 %. Algunos ejemplos de cepas de polisacáridos capsulares serotipo VII de la invención incluyen 7271 y CZ-PW-045.

Los polisacáridos capsulares de GBS serotipo VIII se describen en Kogan, G., et al., The Journal of Biological Chemistry, 271(15):8786-8790 (1996), cuya descripción se incorpora en la presente por referencia en su totalidad. La unidad de repetición del serotipo VIII es de la siguiente manera:



de 300 kDa, de alrededor de 200 kDa a 750 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 700 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 650 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 600 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 550 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 500 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 450 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 750 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 700 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 650 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 600 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 550 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 500 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 450 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 300 kDa a 750 kDa, de alrededor de 300 kDa a alrededor de 700 kDa, de alrededor de 300 kDa a alrededor de 650 kDa, de alrededor de 300 kDa a alrededor de 600 kDa, de alrededor de 300 kDa a alrededor de 550 kDa, o de alrededor de 300 kDa a alrededor de 500 kDa. Cualquier número entero dentro de cualquiera de los rangos anteriores se contempla como forma de realización de la descripción.

En una forma de realización de la invención, el polisacárido capsular serotipo VIII comprende su nivel de ácido siálico natural, por ejemplo, alrededor de 100 % o mayor de alrededor de 95 %. En otra forma de realización, los polisacáridos capsulares se pueden desialilar hasta alrededor de 40 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 60 %), por ejemplo, hasta alrededor de 35 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 65 %), hasta alrededor de 30 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 70 %), hasta alrededor de 25 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 75 %), hasta alrededor de 20 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 80 %), hasta alrededor de 15 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 85 %), hasta alrededor de 10 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 90 %) o hasta alrededor de 5 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 95 %) antes de la conjugación.

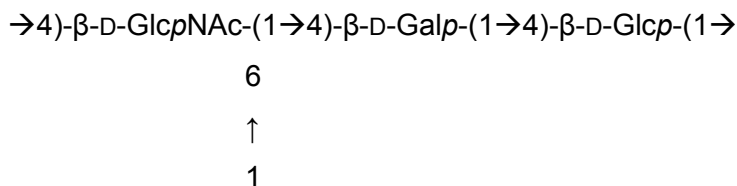
En otra forma de realización, el polisacárido capsular serotipo VIII tiene alrededor de 1,0 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, por ejemplo, al menos alrededor de 0,95 mM de ácido siálico por mM de polisacárido antes de la conjugación. En otra forma de realización, el polisacárido capsular puede tener al menos alrededor de 0,6 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, por ejemplo, al menos alrededor de 0,65 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, al menos alrededor de 0,7 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, al menos alrededor de 0,75 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, al menos alrededor de 0,8 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, al menos alrededor

de 0,85 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, al menos alrededor de 0,9 mM de ácido siálico por mM de polisacárido o al menos alrededor de 0,95 mM de ácido siálico por mM de polisacárido antes de la conjugación.

Los polisacáridos capsulares serotipo VIII tienen una O-acetilación de alrededor de 0 % a alrededor de 40 %. En una forma de realización de la invención, el polisacárido es des-O-acetilado (es decir, tiene una O-acetilación de menos de alrededor de 5 %). Algunos ejemplos de cepas de polisacáridos capsulares serotipo VIII de la invención incluyen JM9130013 y JM9130672.

Serotipo IX

Los polisacáridos capsulares de GBS serotipo IX se describen en Berti, F., et al., The Journal of Biological Chemistry, 289(34):23437-2348 (2014), cuya descripción se incorpora en la presente por referencia en su totalidad. La estructura del serotipo IX se puede describir de la siguiente manera:



El peso molecular de los polisacáridos capsulares serotipo IX antes de la conjugación es de alrededor de 5 kDa a alrededor de 1.000 kDa, por ejemplo, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 750 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 500 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 450 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 350 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 300 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 250 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 200 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 750 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 500 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 450 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 350 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 300 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 250 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 200 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 750 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 700 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 650 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 600 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 550 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 500 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 450 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 400

kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 350 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 300 kDa, de alrededor de 200 kDa a 750 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 700 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 650 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 600 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 550 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 500 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 450 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 750 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 700 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 650 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 600 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 550 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 500 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 450 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 300 kDa a 750 kDa, de alrededor de 300 kDa a alrededor de 700 kDa, de alrededor de 300 kDa a alrededor de 650 kDa, de alrededor de 300 kDa a alrededor de 600 kDa, de alrededor de 300 kDa a alrededor de 550 kDa, o de alrededor de 300 kDa a alrededor de 500 kDa. Cualquier número entero dentro de cualquiera de los rangos anteriores se contempla como forma de realización de la descripción.

En una forma de realización de la invención, el polisacárido capsular serotipo IX comprende su nivel de ácido siálico natural, por ejemplo, alrededor de 100 % o mayor de alrededor de 95 %. En otra forma de realización, los polisacáridos capsulares se pueden desialilar hasta alrededor de 40 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 60 %), por ejemplo, hasta alrededor de 35 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 65 %), hasta alrededor de 30 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 70 %), hasta alrededor de 25 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 75 %), hasta alrededor de 20 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 80 %), hasta alrededor de 15 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 85 %), hasta alrededor de 10 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 90 %) o hasta alrededor de 5 % (nivel de sialilación mayor de alrededor de 95 %) antes de la conjugación.

En otra forma de realización, el polisacárido capsular serotipo IX tiene alrededor de 1,0 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, por ejemplo, al menos alrededor de 0,95 mM de ácido siálico por mM de polisacárido antes de la conjugación. En otra forma de realización, el polisacárido capsular puede tener al menos alrededor de 0,6 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, por ejemplo, al menos alrededor de 0,65 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, al menos alrededor de 0,7 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, al menos alrededor de 0,75 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, al

menos alrededor de 0,8 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, al menos alrededor de 0,85 mM de ácido siálico por mM de polisacárido, al menos alrededor de 0,9 mM de ácido siálico por mM de polisacárido o al menos alrededor de 0,95 mM de ácido siálico por mM de polisacárido antes de la conjugación.

Los polisacáridos capsulares serotipo IX tienen una O-acetilación de alrededor de 0 % a alrededor de 40 %. En una forma de realización de la invención, el polisacárido es des-O-acetilado (es decir, tiene una O-acetilación de menos de alrededor de 5 %). Algunos ejemplos de cepas de polisacáridos capsulares serotipo IX de la invención incluyen IT-NI-016, IT-PW-62 y IT-PW-64.

Conjugados proteína-polisacárido

Como se usa en la presente, la expresión "conjugados" comprende un polisacárido capsular, generalmente de un rango deseado de peso molecular, y una proteína portadora, en donde el polisacárido capsular se conjuga con la proteína portadora. Los conjugados pueden contener o no cierta cantidad de polisacárido capsular libre. Como se usa en la presente, "polisacárido capsular libre" se refiere al polisacárido capsular que está asociado en forma no covalente con (es decir, que, en forma no covalente, está unido a, adsorbido por o atrapado en o con) el conjugado proteína portadora-polisacárido capsular. Las expresiones "polisacárido capsular libre", "polisacárido libre" y "sacárido libre" se pueden usar de manera indistinta y tienen el mismo significado. Independientemente de la naturaleza de la molécula portadora, se puede conjugar con el polisacárido capsular en forma directa o a través de un ligador. Como se usan en la presente, "conjugar", "conjugado" y "que conjuga" se refieren a un proceso mediante el cual un polisacárido capsular bacteriano se une en forma covalente a la molécula portadora. La conjugación mejora la inmunogenicidad del polisacárido capsular bacteriano. La conjugación se puede realizar de acuerdo con los métodos descritos a continuación o mediante procesos conocidos en el estado de la técnica.

Una "composición inmunógena conjugada", como se usa en la presente, se refiere a una composición inmunógena en donde el material inmunógeno incluye un polisacárido antigénico que está unido en forma covalente a una proteína portadora para producir un conjugado proteína-polisacárido. En una forma de realización, un conjugado proteína-polisacárido de la invención se puede formular como una composición inmunógena multivalente.

Como se usa en la presente, la expresión "peso molecular" del polisacárido o del

conjugado proteína portadora-polisacárido se refiere al peso molecular calculado mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) combinada con el detector de dispersión de luz láser multiángulo (MALLS).

Como se usa en la presente, un “conjugado proteína-polisacárido” se refiere a una molécula de polisacárido conjugada con una molécula portadora de proteínas a través de uno o más enlaces covalentes. Puede ser conveniente conjugar el polisacárido con una proteína de otra especie que sea inmunógena en el huésped diana. En consecuencia, en una forma de realización, la molécula portadora es una proteína portadora. Como se define en la presente, tal proteína extraña se denomina “proteína portadora.” Las proteínas portadoras sirven para mejorar la antigenicidad e inmunogenicidad del polisacárido. Como se usa en la presente, la expresión “efecto portador” se refiere al proceso en donde se mejora la antigenicidad e inmunogenicidad de una molécula débilmente inmunógena o no inmunógena, mediante la unión a una molécula más inmunógena como portadora (por ejemplo, una proteína heteróloga). En este caso, el polisacárido en el conjugado proteína-polisacárido combinado se vuelve más inmunógeno que si se presentara solo. Las proteínas portadoras contienen epítomos de linfocitos T para estimular la ayuda de linfocitos T para producir respuestas de los anticuerpos.

Como se usan en la presente, “proteína portadora” o “portador de proteínas” se refieren a cualquier molécula de proteína que se pueda conjugar con un antígeno (tal como los polisacáridos capsulares) contra el cual se desea una respuesta inmunitaria. La conjugación de un antígeno, tal como un polisacárido con una proteína portadora, puede volver inmunógeno al antígeno. Preferentemente, las proteínas portadoras son proteínas que no son tóxicas ni reactogénicas, y se obtienen en una cantidad y pureza suficientes. Algunos ejemplos de proteínas portadoras son toxinas, toxoides o cualquier material de reactividad cruzada mutante (CRM₁₉₇) de la toxina de tétano, difteria, pertussis, especie *Pseudomonas*, *E. coli*, especie *Staphylococcus* y especie *Streptococcus*. Las proteínas portadoras deben poder modificarse con procedimientos de conjugación estándares. En una forma de realización particular de la presente invención, CRM₁₉₇ se usa como proteína portadora.

Los materiales de reactividad cruzada o CRM son especialmente útiles para algunas formas de realización de la presente invención. Uno de ellos puede producir proteínas modificadas genéticamente, que son antigénicamente similares a determinadas toxinas bacterianas, pero no son tóxicas. Estos se denominan “materiales de reactividad cruzada”

o CRM. CRM₁₉₇ (Wyeth/Pfizer Inc., Sanford, NC) es notable dado que tiene un cambio de un aminoácido simple de la toxina diftérica nativa y no se distingue inmunológicamente de esta. Véase Pappenheimer, A.M., et al., *Immunochem.*, 9(9):891-906 (1972); patente estadounidense N.º 5.614.382, cuyas descripciones se incorporan en la presente por referencia en su totalidad. CRM₁₉₇ es una variante no tóxica (es decir, toxoide) de la toxina diftérica aislada de cultivos de *Corynebacterium diphtheriae* cepa C7 (β197) cultivada en ácidos casamino y medio a base de extracto de levadura. CRM₁₉₇ se purifica a través de ultrafiltración, precipitación de sulfato de amonio y cromatografía de intercambio iónico. Un cultivo de *C. diphtheriae* cepa C7 (β197), que produce la proteína CRM₁₉₇, se depositó en American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, y se le asignó el número de acceso ATCC 53281. Otros toxoides diftéricos también son adecuados para usar como proteínas portadoras. CRM3201 es una variante genéticamente manipulada de la toxina pertussis. Véase Black, W.J., et al., *Science*, 240(4852):656-659 (1988), cuya descripción se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.

Además de un toxoide diftérico (DT), CRM₁₉₇, y un toxoide pertúsico, otros ejemplos de proteínas portadoras incluyen un toxoide tetánico (TT), un toxoide colérico (por ejemplo, como se describe en la publicación de la solicitud de patente internacional N.º WO 2004/083251), un toxoide termolábil (LT) de *E. coli*, un toxoide termoestable de *E. coli* (ST), neumolisina de *S. pneumonia* (de tipo silvestre o mutante con toxicidad reducida), proteína A de superficie del neumococo (PspA), proteína A de adhesina del neumococo (PsaA), una peptidasa C5a de *Streptococcus*, hemolisina de *Staphylococcal aureus*, proteínas de *Haemophilus influenzae* no tipificable (NTHi), proteína D de *Haemophilus influenzae*, exotoxinas/toxoide de *Clostridium perfringens*, antígeno de superficie de la hepatitis B, antígeno del núcleo de la hepatitis B, proteína VP 7 del rotavirus y proteínas F y G del virus respiratorio sincicial, ovalbúmina, hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina de suero bovino (BSA), derivado proteico purificado de tuberculina (PPD) y una exotoxina de *Pseudomonas* o sus derivados, que incluyen una exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* mutante no tóxica producida de manera recombinante. También se pueden usar proteínas de membrana externa bacterianas, tales como el complejo c proteico de la membrana externa (OMPC), porinas, proteínas de fijación a transferrina, o enterotoxina de *C. difficile* (toxina A) y citotoxina (toxina B). Otras proteínas, tales como la ovalbúmina, la hemocianina de lapa californiana (KLH), la albúmina de suero bovino (BSA) o el derivado de la proteína purificada de tuberculina (PPD), también se pueden usar como proteínas portadoras. En

una forma de realización preferida, la proteína portadora es un toxoide diftérico. Con mayor preferencia, la proteína portadora es CRM₁₉₇. En otra forma de realización de la invención, la proteína portadora es toxoide tetánico.

Para la síntesis de una composición inmunógena conjugada multivalente, los conjugados proteína-polisacárido se pueden producir conjugando una mezcla de polisacáridos purificados de bacterias de dos especies diferentes con una proteína portadora. De manera alternativa, una composición inmunógena conjugada multivalente se puede producir combinando polisacáridos purificados de bacterias de dos o más serotipos diferentes de las mismas bacterias y conjugándolos como una mezcla con una proteína portadora. De manera alternativa, se pueden mezclar los conjugados proteína-polisacárido que se producen haciendo reaccionar un solo tipo de polisacárido con una proteína portadora en reacciones separadas usando polisacáridos diferentes. Por lo tanto, una composición inmunógena multivalente puede incluir una proteína portadora que tenga una población homogénea o heterogénea de polisacáridos unidos.

Después de la conjugación del polisacárido capsular con la proteína portadora, los conjugados proteína-polisacárido se purifican (se enriquecen con respecto a la cantidad de conjugado proteína-polisacárido) mediante varias técnicas. Estas técnicas incluyen, por ejemplo, operaciones de concentración/diafiltración, precipitación/elución, cromatografía en columna y filtración de profundidad.

Como se describió anteriormente, la presente invención se refiere a conjugados que comprenden polisacáridos capsulares de GBS conjugados con proteínas portadoras. Una forma de realización de la invención proporciona conjugados que comprenden un polisacárido capsular de GBS serotipo IV conjugado con una proteína portadora y al menos un conjugado adicional que comprende un polisacárido capsular de GBS serotipo Ia conjugado con una proteína portadora, un polisacárido capsular de GBS serotipo Ib conjugado con una proteína portadora, un polisacárido capsular de GBS serotipo II conjugado con una proteína portadora, un polisacárido capsular de GBS serotipo III conjugado con una proteína portadora, un polisacárido capsular de GBS serotipo V conjugado con una proteína portadora, un polisacárido capsular de GBS serotipo VI conjugado con una proteína portadora, un polisacárido capsular de GBS serotipo VII conjugado con una proteína portadora, un polisacárido capsular de GBS serotipo VIII conjugado con una proteína portadora o un polisacárido capsular de GBS serotipo IX conjugado con una proteína portadora. En un aspecto de la invención, los polisacáridos

tienen un peso molecular de alrededor de 5 kDa a 1.000 kDa; los conjugados tienen pesos moleculares de alrededor de 300 kDa a alrededor de 20.000 kDa; y los conjugados comprenden menos de alrededor de 40 % de polisacárido libre con respecto al total de polisacárido. En una forma de realización, los conjugados comprenden menos de alrededor de 30 %, menos de alrededor de 25 %, menos de alrededor de 20 %, menos de alrededor de 15 %, menos de alrededor de 10 % o menos de alrededor de 5 % de polisacárido libre con respecto al total de polisacárido.

En una forma de realización, el polisacárido serotipo Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII y/o IX tiene un peso molecular antes de la conjugación de alrededor de 5 kDa a alrededor de 1.000 kDa, por ejemplo, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 750 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 500 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 450 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 350 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 300 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 250 kDa, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 200 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 750 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 500 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 450 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 350 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 300 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 250 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 200 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 750 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 700 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 650 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 600 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 550 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 500 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 450 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 350 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 300 kDa, de alrededor de 200 kDa a 750 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 700 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 650 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 600 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 550 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 500 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 450 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 400 kDa, , de alrededor de 250 kDa a alrededor de 750 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 700 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 650 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 600 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 550 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 500 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 450 kDa, de alrededor de 250 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 300 kDa a 750 kDa, de alrededor de 300

kDa a alrededor de 700 kDa, de alrededor de 300 kDa a alrededor de 650 kDa, de alrededor de 300 kDa a alrededor de 600 kDa, de alrededor de 300 kDa a alrededor de 550 kDa o de alrededor de 300 kDa a alrededor de 500 kDa. Cualquier número entero dentro de cualquiera de los rangos anteriores se contempla como forma de realización de la descripción.

En una forma de realización, el conjugado tiene un peso molecular de alrededor de 300 kDa a alrededor de 20.000 kDa, por ejemplo, de alrededor de 300 kDa a alrededor de 15.000 kDa, de alrededor de 300 kDa a alrededor de 10.000 kDa, de alrededor de 300 kDa a alrededor de 9.000 kDa, de alrededor de 300 kDa a alrededor de 8.000 kDa, de alrededor de 300 kDa a alrededor de 7.000 kDa, de alrededor de 300 kDa a alrededor de 6.000 kDa, de alrededor de 300 kDa a alrededor de 5.000 kDa, de alrededor de 300 kDa a alrededor de 4.000 kDa, de alrededor de 300 kDa a alrededor de 3.000 kDa, de alrededor de 300 kDa a alrededor de 2.000 kDa, de alrededor de 300 kDa a alrededor de 1.000 kDa, de alrededor de 500 kDa a alrededor de 20.000 kDa, de alrededor de 500 kDa a alrededor de 15.000 kDa, de alrededor de 500 kDa a alrededor de 10.000 kDa, de alrededor de 500 kDa a alrededor de 9.000 kDa, de alrededor de 500 kDa a alrededor de 8.000 kDa, de alrededor de 500 kDa a alrededor de 7.000 kDa, de alrededor de 500 kDa a alrededor de 6.000 kDa, de alrededor de 500 kDa a alrededor de 5.000 kDa, de alrededor de 500 kDa a alrededor de 4.000 kDa, de alrededor de 500 kDa a alrededor de 3.000 kDa, de alrededor de 500 kDa a alrededor de 2.000 kDa, de alrededor de 500 kDa a alrededor de 1.000 kDa, de alrededor de 1.000 kDa a alrededor de 20.000 kDa, de alrededor de 1.000 kDa a alrededor de 15.000 kDa, de alrededor de 1.000 kDa a alrededor de 10.000 kDa, de alrededor de 1.000 kDa a alrededor de 9.000 kDa, de alrededor de 1.000 kDa a alrededor de 8.000 kDa, de alrededor de 1.000 kDa a alrededor de 7.000 kDa, de alrededor de 1.000 kDa a alrededor de 6.000 kDa, de alrededor de 1.000 kDa a alrededor de 5.000 kDa, de alrededor de 1.500 kDa a alrededor de 20.000 kDa, de alrededor de 1.500 kDa a alrededor de 15.000 kDa, de alrededor de 1.500 kDa a alrededor de 10.000 kDa, de alrededor de 1.500 kDa a alrededor de 9.000 kDa, de alrededor de 1.500 kDa a alrededor de 8.000 kDa, de alrededor de 1.500 kDa a alrededor de 7.000 kDa, de alrededor de 1.500 kDa a alrededor de 6.000 kDa, de alrededor de 1.500 kDa a alrededor de 5.000 kDa, de alrededor de 2.000 kDa a alrededor de 20.000 kDa, de alrededor de 2.000 kDa a alrededor de 15.000 kDa, de alrededor de 2.000 kDa a alrededor de 10.000 kDa, de alrededor de 2.000 kDa a alrededor de 9.000 kDa, de alrededor de 2.000 kDa a alrededor de 8.000 kDa, de alrededor de 2.000 kDa a alrededor

de 7.000 kDa, de alrededor de 2.000 kDa a alrededor de 6.000 kDa, de alrededor de 2.500 kDa a alrededor de 20.000 kDa, de alrededor de 2.500 kDa a alrededor de 15.000 kDa, de alrededor de 2.500 kDa a alrededor de 10.000 kDa, de alrededor de 2.500 kDa a alrededor de 9.000 kDa, de alrededor de 2.500 kDa a alrededor de 8.000 kDa, de alrededor de 2.500 kDa a alrededor de 7.000 kDa, de alrededor de 2.500 kDa a alrededor de 6.000 kDa, de alrededor de 3.000 kDa a alrededor de 20.000 kDa, de alrededor de 3.000 kDa a alrededor de 15.000 kDa, de alrededor de 3.000 kDa a alrededor de 10.000 kDa, de alrededor de 3.000 kDa a alrededor de 9.000 kDa, de alrededor de 3.000 kDa a alrededor de 8.000 kDa, de alrededor de 3.000 kDa a alrededor de 7.000 kDa o de alrededor de 3.000 kDa a alrededor de 6.000 kDa.

En una forma de realización, un conjugado de polisacárido capsular de GBS serotipo IV tiene un peso molecular de cualquiera de los rangos anteriores.

En una forma de realización, un conjugado de polisacárido capsular de GBS serotipo Ia tiene un peso molecular de cualquiera de los rangos anteriores.

En una forma de realización, un conjugado de polisacárido capsular de GBS serotipo Ib tiene un peso molecular de cualquiera de los rangos anteriores.

En una forma de realización, un conjugado de polisacárido capsular de GBS serotipo II tiene un peso molecular de cualquiera de los rangos anteriores.

En una forma de realización, un conjugado de polisacárido capsular de GBS serotipo III tiene un peso molecular de cualquiera de los rangos anteriores.

En una forma de realización, un conjugado de polisacárido capsular de GBS serotipo V tiene un peso molecular de cualquiera de los rangos anteriores.

En una forma de realización, un conjugado de polisacárido capsular de GBS serotipo VI tiene un peso molecular de cualquiera de los rangos anteriores.

En una forma de realización, un conjugado de polisacárido capsular de GBS serotipo VII tiene un peso molecular de cualquiera de los rangos anteriores.

En una forma de realización, un conjugado de polisacárido capsular de GBS serotipo VIII tiene un peso molecular de cualquiera de los rangos anteriores.

En una forma de realización, un conjugado de polisacárido capsular de GBS serotipo IX tiene un peso molecular de cualquiera de los rangos anteriores.

En una forma de realización, los conjugados de la invención tienen al menos alrededor de 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9, 0,95, 0,97 o 0,98 mM de ácido siálico por mM de polisacárido. En una forma de realización preferida, los conjugados tienen al menos

alrededor de 0,9 o 0,95 mM de ácido siálico por mM de polisacárido.

En una forma de realización, un conjugado de polisacárido capsular de GBS serotipo IV tiene un contenido de ácido siálico de al menos cualquiera de los valores anteriores.

En una forma de realización, un conjugado de polisacárido capsular de GBS serotipo Ia tiene un contenido de ácido siálico de al menos cualquiera de los valores anteriores.

En una forma de realización, un conjugado de polisacárido capsular de GBS serotipo Ib tiene un contenido de ácido siálico de al menos cualquiera de los valores anteriores.

En una forma de realización, un conjugado de polisacárido capsular de GBS serotipo II tiene un contenido de ácido siálico de al menos cualquiera de los valores anteriores.

En una forma de realización, un conjugado de polisacárido capsular de GBS serotipo III tiene un contenido de ácido siálico de al menos cualquiera de los valores anteriores.

En una forma de realización, un conjugado de polisacárido capsular de GBS serotipo V tiene un contenido de ácido siálico de al menos cualquiera de los valores anteriores.

En una forma de realización, un conjugado de polisacárido capsular de GBS serotipo VI tiene un contenido de ácido siálico de al menos cualquiera de los valores anteriores.

En una forma de realización, un conjugado de polisacárido capsular de GBS serotipo VII tiene un contenido de ácido siálico de al menos cualquiera de los valores anteriores.

En una forma de realización, un conjugado de polisacárido capsular de GBS serotipo VIII tiene un contenido de ácido siálico de al menos cualquiera de los valores anteriores.

En una forma de realización, un conjugado de polisacárido capsular de GBS serotipo IX tiene un contenido de ácido siálico de al menos cualquiera de los valores anteriores.

En una forma de realización, el conjugado de la invención comprende menos de alrededor de 0,01, 0,02, 0,03, 0,04 o 0,05 mM de O-acetato por mM de unidad de repetición de sacáridos. En otra forma de realización, el conjugado comprende al menos alrededor de 0,1, 0,2, 0,3, 0,35 o alrededor de 0,4 mM de O-acetato por mM de unidad de repetición de sacáridos.

En una forma de realización, un conjugado de polisacárido capsular de GBS serotipo IV tiene un contenido de O-acetato de cualquiera de los valores anteriores.

En una forma de realización, un conjugado de polisacárido capsular de GBS serotipo Ia tiene un contenido de O-acetato de cualquiera de los valores anteriores.

En una forma de realización, un conjugado de polisacárido capsular de GBS serotipo Ib tiene un contenido de O-acetato de cualquiera de los valores anteriores.

En una forma de realización, un conjugado de polisacárido capsular de GBS serotipo

II tiene un contenido de O-acetato de cualquiera de los valores anteriores.

En una forma de realización, un conjugado de polisacárido capsular de GBS serotipo III tiene un contenido de O-acetato de cualquiera de los valores anteriores.

En una forma de realización, un conjugado de polisacárido capsular de GBS serotipo V tiene un contenido de O-acetato de cualquiera de los valores anteriores.

En una forma de realización, un conjugado de polisacárido capsular de GBS serotipo VI tiene un contenido de O-acetato de cualquiera de los valores anteriores.

En una forma de realización, un conjugado de polisacárido capsular de GBS serotipo VII tiene un contenido de O-acetato de cualquiera de los valores anteriores.

En una forma de realización, un conjugado de polisacárido capsular de GBS serotipo VIII tiene un contenido de O-acetato de cualquiera de los valores anteriores.

En una forma de realización, un conjugado de polisacárido capsular de GBS serotipo IX tiene un contenido de O-acetato de cualquiera de los valores anteriores.

En otra forma de realización, el conjugado inmunógeno comprende menos de alrededor de 40 %, menos de alrededor de 35 %, menos de alrededor de 30 %, menos de alrededor de 25 %, menos de alrededor de 20 %, menos de alrededor de 15 %, menos de alrededor de 10 % o menos de alrededor de 5 % de polisacárido capsular de GBS libre en comparación con la cantidad total de polisacárido capsular de GBS. En una forma de realización preferida, el conjugado inmunógeno comprende menos de alrededor de 5 % de sacárido libre sin reaccionar en comparación con la cantidad total de polisacárido capsular de GBS.

Aun en otra forma de realización, la relación (peso en peso) de polisacárido capsular de GBS con respecto a la proteína portadora en el conjugado es de alrededor de 0,5 a alrededor de 3,0. En un aspecto, la relación de polisacárido capsular de GBS con respecto a la proteína portadora en el conjugado es de alrededor de 0,5 a alrededor de 2,0, de alrededor de 0,5 a alrededor de 1,5, de alrededor de 0,5 a alrededor de 1,0, de alrededor de 1,0 a alrededor de 1,5, o de alrededor de 1,0 a alrededor de 2,0. En una forma de realización preferida, la relación de polisacárido capsular de GBS con respecto a la proteína portadora en el conjugado es de alrededor de 0,8 a alrededor de 1,0.

En otra forma de realización, el grado de conjugación del conjugado es de 2 a 15, de 2 a 13, de 2 a 10, de 2 a 8, de 2 a 6, de 2 a 5, de 2 a 4, de 3 a 15, de 3 a 13, de 3 a 10, de 3 a 8, de 3 a 6, de 3 a 5, de 3 a 4, de 5 a 15, de 5 a 10, de 8 a 15, de 8 a 12, de 10 a 15, o de 10 a 12. En una forma de realización preferida, el grado de conjugación del conjugado

es de 2 a 5.

Conjugación

La conjugación puede ser directa, en donde los átomos del polisacárido se unen en forma covalente a átomos de la superficie de la proteína. De manera alternativa, la conjugación puede ser a través de una molécula ligadora, que reacciona con el polisacárido y la proteína y los conecta, uniendo el carbohidrato a la proteína.

Cuando un portador y uno o más antígenos, tales como un polisacárido, se conjugan (es decir, se asocian en forma covalente), la conjugación puede ser mediante cualquier método químico, proceso o técnica genética conocidos en el estado de la técnica. Por ejemplo, un polipéptido portador y uno o más antígenos seleccionados de un grupo que comprende un carbohidrato, un oligosacárido, un lípido, un lipooligosacárido, un polisacárido, un conjugado oligosacárido-proteína, un conjugado proteína-polisacárido, un conjugado péptido-proteína, un conjugado oligosacárido-péptido, un conjugado polisacárido-péptido, un conjugado proteína-proteína, un conjugado lipooligosacárido-proteína, un conjugado proteína-polisacárido, o cualquier combinación de estos, se pueden conjugar mediante técnicas que incluyen, entre otras: (1) acoplamiento directo mediante grupos funcionales de proteínas (por ejemplo, ligadura tiol-tiol, ligadura amina-carboxilo, ligadura amina-aldehído; acoplamiento directo de enzimas); (2) acoplamiento homobifuncional de aminas (por ejemplo, usando bis-aldehídos); (3) acoplamiento homobifuncional de tioles (por ejemplo, usando bis-maleimidias); (4) acoplamiento homobifuncional mediante reactivos fotoactivados (5) acoplamiento heterobifuncional de aminas a tioles (por ejemplo, usando maleimidias); (6) acoplamiento heterobifuncional mediante reactivos fotoactivados (por ejemplo, la familia de β -carboniídiazos); (7) introducción de grupos que reaccionan con amina en un polisacárido u oligosacárido mediante la activación de bromuro de cianógeno o carboximetilación; (8) introducción de grupos que reaccionan con tiol en un polisacárido u oligosacárido mediante un compuesto heterobifuncional, tal como maleimido-hidrazida; (9) conjugación proteína-lípido mediante la introducción de un grupo hidrófobo en la proteína y (10) conjugación proteína-lípido mediante la incorporación de un grupo reactivo en el lípido. Además, se contemplan las técnicas de “acoplamiento no covalente” heterobifuncional, tales como la interacción biotina-avidina. Otros métodos conocidos en el estado de la técnica para realizar la conjugación de oligosacáridos y polisacáridos con proteínas portadoras inmunógenas también se encuentran dentro del alcance de algunas formas de realización de la invención.

En una forma de realización, los conjugados proteína-polisacárido capsular de GBS se obtienen activando el polisacárido con tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino piridinio (CDAP) para formar un éster de cianato. El polisacárido activado se puede acoplar directamente o mediante un grupo espaciador (ligador) a un grupo amino en la proteína portadora. Por ejemplo, el espaciador puede ser cistamina o cisteamina para obtener un polisacárido tiolado que se puede acoplar al portador mediante una ligadura de tioéter obtenida después de la reacción con una proteína portadora activada con maleimida (por ejemplo, usando GMBS) o una proteína portadora haloacetilada (por ejemplo, usando iodoacetimida, SIB, SIAB, sulfo-SIAB, SIA o SBAP).

En un aspecto, el éster de cianato (producido opcionalmente mediante química de CDAP) se acopla con hexanodiamina o ácido adípico dihidrazida (ADH), y el sacárido derivado de amino se conjuga con la proteína portadora usando química de carbodiimida (por ejemplo, EDAC o EDC) mediante un grupo carboxilo en el portador de proteínas. Tales conjugados se describen, por ejemplo, en las publicaciones de solicitud de patente internacional N.^{os} WO 93/15760, WO 95/08348 y WO 96/29094.

Otras técnicas adecuadas usan carbodiimidas, hidrazidas, ésteres activos, norborano, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S--NHS, EDC y TSTU. Muchas se describen en la publicación de solicitud de patente internacional N.º WO 98/42721. La conjugación puede incluir un ligador carbonilo que se puede formar mediante la reacción de un grupo hidroxilo libre del sacárido con 1,1 carbonildiimidazol (CDI) o 1,1 carbonil di 1,2,4 triazol (CDT)_(Véase Bethell, et al., J. Biol. Chem., 254:2572-2574 (1979); Hearn, et al., J. Chromatogr., 218:509-518 (1981)), y luego la reacción con una proteína para formar un enlace de carbamato. Esto puede incluir la reducción del terminal anomérico a un grupo hidroxilo primario, la protección/desprotección opcional del grupo hidroxilo primario, la reacción del grupo hidroxilo primario con CDI/CDT para formar un intermediario de carbamato CDI/CDT y el acoplamiento del intermediario de carbamato CDI/CDT con un grupo amino en una proteína.

En formas de realización preferidas, los conjugados proteína-polisacárido capsular de GBS de la invención se preparan usando aminación reductora. La aminación reductora incluye dos etapas: (1) oxidación del polisacárido para generar funcionalidades aldehído de dioles próximos en unidades de hexasacárido individuales y (2) reducción del polisacárido activado y una proteína portadora para formar un conjugado.

En una forma de realización, el polisacárido capsular de GBS se activa (oxida)

mediante un proceso que comprende las etapas de:

(a) hacer reaccionar el polisacárido capsular de GBS aislado con un agente oxidante; y

(b) inactivar la reacción de oxidación agregando un agente de inactivación que da como resultado un polisacárido capsular de GBS activado.

En un aspecto de la invención, la concentración del polisacárido capsular aislado es de alrededor de 0,1 mg/ml a alrededor de 10,0 mg/ml, por ejemplo, de alrededor de 0,5 mg/ml a alrededor de 5,0 mg/ml, de alrededor de 1,0 mg/ml a alrededor de 3,0 mg/ml, o alrededor de 2,0 mg/ml.

En una forma de realización particular, el agente oxidante es periodato. El periodato oxida grupos hidroxilo próximos para formar grupos carbonilo o aldehído y produce la escisión de un enlace C-C. El término 'periodato' incluye periodato y ácido periódico. Este término también incluye metaperiodato (IO_4^-) y ortoperiodato (IO_6^{5-}). El término 'periodato' también incluye las diversas sales de periodato, que incluyen periodato de sodio y periodato de potasio. En una forma de realización preferida, el agente oxidante es periodato de sodio. En una forma de realización preferida, el periodato que se usa para la oxidación de polisacáridos capsulares de GBS es metaperiodato. En una forma de realización preferida, el periodato que se usa para la oxidación de polisacárido capsular de serotipo es metaperiodato de sodio.

En otra forma de realización, el polisacárido se hace reaccionar con 0,01 a 10,0, 0,05 a 5,0, 0,1 a 1,0, 0,5 a 1,0, 0,7 a 0,8, 0,05 a 0,5, o 0,1 a 0,3 equivalentes molares de agente oxidante. En una forma de realización particular, el polisacárido se hace reaccionar con alrededor de 0,05, alrededor de 0,1, alrededor de 0,15, alrededor de 0,2, alrededor de 0,25, alrededor de 0,3, alrededor de 0,35, alrededor de 0,4, alrededor de 0,45, alrededor de 0,5, alrededor de 0,55, alrededor de 0,6, alrededor de 0,65, alrededor de 0,7, alrededor de 0,75, alrededor de 0,8, alrededor de 0,85, alrededor de 0,9 o alrededor de 0,95 equivalentes molares de agente oxidante. En otra forma de realización, el polisacárido se hace reaccionar con alrededor de 0,1 equivalentes molares de agente oxidante. En otra forma de realización, el polisacárido se hace reaccionar con alrededor de 0,15 equivalentes molares de agente oxidante. En otra forma de realización, el polisacárido se hace reaccionar con alrededor de 0,25 equivalentes molares de agente oxidante. Aun en otra forma de realización, el polisacárido se hace reaccionar con alrededor de 0,5 equivalentes molares de agente oxidante. En una forma de realización alternativa, el polisacárido se hace

reaccionar con alrededor de 0,6 equivalentes molares de agente oxidante. En otra forma de realización, el polisacárido se hace reaccionar con alrededor de 0,7 equivalentes molares de agente oxidante.

En un aspecto de la invención, la duración de la reacción de oxidación es de alrededor de 1 hora a alrededor de 50 horas, de alrededor de 10 horas a alrededor de 30 horas, de alrededor de 15 horas a alrededor de 20 horas, de alrededor de 15 horas a alrededor de 17 horas, o de alrededor de 16 horas.

En otro aspecto de la invención, la temperatura de la reacción de oxidación se mantiene a una temperatura de alrededor de 2 °C a alrededor de 25 °C, de alrededor de 2 °C a alrededor de 8 °C o de alrededor de 20 °C a alrededor de 25 °C. En una forma de realización preferida, la temperatura de la reacción se mantiene a alrededor de 23 °C. En otra forma de realización preferida, la temperatura de la reacción se mantiene a alrededor de 5 °C.

En otro aspecto, la reacción de oxidación se lleva a cabo en un amortiguador seleccionado del grupo que consiste en fosfato de sodio, fosfato de potasio, ácido 2-(N-morfolino)etansulfónico (MES) y Bis-Tris. En una forma de realización preferida, el amortiguador es fosfato de potasio.

En un aspecto adicional, el amortiguador tiene una concentración de alrededor de 1 mM a alrededor de 500 mM, de alrededor de 1 mM a alrededor de 300 mM o de alrededor de 50 mM a alrededor de 200 mM. En una forma de realización preferida, el amortiguador tiene una concentración de alrededor de 100 mM.

En un aspecto, la reacción de oxidación se lleva a cabo a un pH de alrededor de 4,0 a alrededor de 8,0, de alrededor de 5,0 a alrededor de 7,0 o de alrededor de 5,5 a alrededor de 6,5. En una forma de realización preferida, el pH es de alrededor de 6,0.

En una forma de realización, el polisacárido capsular de GBS activado se obtiene haciendo reaccionar alrededor de 0,5 mg/l a alrededor de 5,0 mg/ml de polisacárido capsular aislado con alrededor de 0,05 a alrededor de 0,3 equivalentes molares de periodato a una temperatura de alrededor de 20 °C a 25 °C.

En otra forma de realización, el polisacárido capsular de GBS activado se obtiene haciendo reaccionar alrededor de 0,5 mg/l a alrededor de 5,0 mg/ml de polisacárido capsular aislado con alrededor de 0,05 a alrededor de 0,3 equivalentes molares de periodato a una temperatura de alrededor de 2 °C a alrededor de 8 °C.

En otra forma de realización, el polisacárido capsular de GBS activado se purifica

de acuerdo con métodos conocidos por las personas del oficio de nivel medio, tales como cromatografía de penetración en gel (GPC), diálisis o ultrafiltración/diafiltración. Por ejemplo, el polisacárido capsular activado se purifica mediante concentración y diafiltración usando un dispositivo de ultrafiltración.

En una forma de realización, el grado de oxidación del polisacárido capsular de GBS activado es de 5 a 25, por ejemplo, de 5 a 15, de 5 a 10, de 10 a 25, de 10 a 20, de 10 a 15. En una forma de realización preferida, el grado de oxidación del polisacárido capsular de GBS activado es de 10 a 20, de 11 a 19, de 12 a 18, de 13 a 17 o de 14 a 16.

En otra forma de realización, el polisacárido capsular de GBS activado tiene un peso molecular de alrededor de 5 kDa a alrededor de 1.000 kDa, por ejemplo, de alrededor de 50 kDa a alrededor de 300 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 75 kDa a alrededor de 200 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 700 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 500 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 100 kDa a alrededor de 300 kDa, de alrededor de 200 kDa a alrededor de 400 kDa y de alrededor de 300 kDa a alrededor de 700 kDa. En una forma de realización preferida, el polisacárido capsular de GBS activado tiene un peso molecular de alrededor de 75 kDa a alrededor de 400 kDa.

En una forma de realización, el polisacárido capsular de GBS activado se liofiliza, opcionalmente en presencia de un sacárido. En una forma de realización preferida, el sacárido se selecciona de sacarosa, trehalosa, rafinosa, estaquiosa, melecitosa, dextrano, manitol, lactitol y palatinita. En una forma de realización preferida, el sacárido es sacarosa. Luego, se puede formular un compuesto con el polisacárido capsular activado liofilizado y una solución que comprende la proteína portadora.

En otra forma de realización, se formula un compuesto con el polisacárido capsular de GBS activado y la proteína portadora y se liofiliza, opcionalmente en presencia de un sacárido. En un aspecto, el sacárido se selecciona de sacarosa, trehalosa, rafinosa, estaquiosa, melecitosa, dextrano, manitol, lactitol y palatinita. En una forma de realización preferida, el sacárido es sacarosa. El polisacárido y la proteína portadora coliofilizados luego se pueden volver a suspender en solución y pueden hacerse reaccionar con un agente reductor.

El polisacárido capsular de GBS activado se puede conjugar con una proteína portadora mediante un proceso que comprende la etapa de:

(a) formular un compuesto con el polisacárido capsular de GBS activado y una

proteína portadora, y

(b) hacer reaccionar el compuesto de polisacárido capsular de GBS activado y proteína portadora con un agente reductor para formar un conjugado proteína portadora-polisacárido capsular de GBS.

La conjugación de polisacárido capsular de GBS activado con un portador de proteínas mediante aminación reductora en un solvente aprótico polar es adecuada para mantener niveles bajos de polisacárido libre en comparación, por ejemplo, con la aminación reductora en solución acuosa, en donde el nivel de polisacárido (libre) sin reaccionar se eleva considerablemente. En una forma de realización preferida, la etapa (a) y la etapa (b) se llevan a cabo en un solvente aprótico polar.

En una forma de realización, la etapa (a) comprende disolver el polisacárido capsular de GBS liofilizado en una solución que comprende una proteína portadora y un solvente aprótico polar. En otra forma de realización, la etapa (a) comprende disolver el polisacárido capsular de GBS y la proteína portadora coliofilizados en un solvente aprótico polar.

En una forma de realización, el solvente aprótico polar se selecciona del grupo que consiste en dimetilsulfóxido (DMSO), sulfolano, dimetilformamida (DMF) y hexametilfosforamida (HMPA). En una forma de realización preferida, el solvente aprótico polar es DMSO.

Cuando las etapas (a) y (b) se llevan a cabo en solución acuosa, las etapas (a) y (b) se llevan a cabo en un amortiguador en un medio acuoso, seleccionado preferentemente de PBS, MES, HEPES, Bis-tris, ADA, PIPES, MOPSO, BES, MOPS, DIPSO, MOBS, HEPPSO, POPSO, TEA, EPPS, Bicine o HEPB a un pH de alrededor de 6,0 a alrededor de 8,5, de alrededor de 7,0 a alrededor de 8,0 o de alrededor de 7,0 a alrededor de 7,5. En una forma de realización preferida, el amortiguador es PBS. En una forma de realización preferida, el pH es de alrededor de 7,3.

En una forma de realización, la concentración de polisacárido capsular de GBS activado en la etapa (b) es de alrededor de 0,1 mg/ml a alrededor de 10,0 mg/ml, de alrededor de 0,5 mg/ml a alrededor de 5,0 mg/ml o de alrededor de 0,5 mg/ml a alrededor de 2,0 mg/ml. En una forma de realización preferida, la concentración de polisacárido capsular de GBS de serotipo activado en la etapa (b) es de alrededor de 0,1 mg/ml, alrededor de 0,2 mg/ml, alrededor de 0,3 mg/ml, alrededor de 0,4 mg/ml, alrededor de 0,5 mg/ml, alrededor de 0,6 mg/ml, alrededor de 0,7 mg/ml, alrededor de 0,8 mg/ml, alrededor

de 0,9 mg/ml, alrededor de 1,0 mg/ml, alrededor de 1,1 mg/ml, alrededor de 1,2 mg/ml, alrededor de 1,3 mg/ml, alrededor de 1,4 mg/ml, alrededor de 1,5 mg/ml, alrededor de 1,6 mg/ml, alrededor de 1,7 mg/ml, alrededor de 1,8 mg/ml, alrededor de 1,9 mg/ml, alrededor de 2,0 mg/ml, alrededor de 2,1 mg/ml, alrededor de 2,2, alrededor de 2,3 mg/ml, alrededor de 2,4 mg/ml, alrededor de 2,5 mg/ml, alrededor de 2,6 mg/ml, alrededor de 2,7 mg/ml, alrededor de 2,8 mg/ml, alrededor de 2,9 mg/ml o alrededor de 3,0 mg/ml.

En una forma de realización preferida, la relación inicial (peso en peso) de polisacárido capsular de GBS de serotipo activado con respecto a la proteína portadora es de alrededor de 5:1 a 0,1:1, 2:1 a 0,1:1, 2:1 a 1:1, 1,5:1 a 1:1, 0,1:1 a 1:1, 0,3:1 a 1:1, 0,6:1 a 1:1. En una forma de realización preferida, la relación inicial de polisacárido capsular de GBS de serotipo activado con respecto a la proteína portadora es de alrededor de 0,4:1, 0,5:1, 0,6:1, 0,7:1, 0,8:1, 0,9:1, 1:1, 1,1:1, 1,2:1, 1,3:1, 1,4:1, 1,5:1, 1,6:1, 1,7:1, 1,8:1, 1,9:1, 2:1.

En una forma de realización, el agente reductor es cianoborohidruro de sodio, triacetoxiborohidruro de sodio, borohidruro de sodio o zinc en presencia de ácidos de Bronsted o Lewis, amina boranos, tales como piridina borano, 2-picolina borano, 2,6-diboran-metanol, dimetilamin-borano, t-BuMe²PrN-BH₃, bencilamin-BH₃ o 5-etil-2-metilpiridina borano (PEMB). En una forma de realización preferida, el agente reductor es cianoborohidruro de sodio.

En otra forma de realización, la cantidad de agente reductor que se usa en la etapa (b) es de alrededor de 0,1 a alrededor de 10,0 equivalentes molares, de alrededor de 0,5 a alrededor de 5,0 equivalentes molares o de alrededor de 1,0 a alrededor de 2,0 equivalentes molares. En una forma de realización preferida, la cantidad de agente reductor que se usa en la etapa (b) es de alrededor de 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 o 2,0 equivalentes molares.

En una forma de realización preferida, la duración de la etapa (b) es de 1 hora a 60 horas, de 10 horas a 50 horas, de 40 horas a 50 horas o de 42 horas a 46 horas. En una forma de realización preferida, la duración de la etapa (b) es de alrededor de 44 horas.

En otra forma de realización, la temperatura de la reacción en la etapa (b) se mantiene a una temperatura de 10 °C a 40 °C, de 15 °C a 30 °C o de 20 °C a 26 °C. En una forma de realización preferida, la temperatura de la reacción en la etapa (b) se mantiene a alrededor de 23 °C.

En una forma de realización adicional, el proceso para la preparación de un

conjugado inmunógeno que comprende el polisacárido capsular de GBS unido en forma covalente a una proteína portadora también comprende una etapa (etapa (c)) de bloqueo de aldehídos sin reaccionar (inactivación) mediante la adición de un borohidruro.

En una forma de realización, el reactivo bloqueante es un borohidruro que se selecciona del grupo que consiste en borohidruro de sodio (NaBH_4), cianoborohidruro de sodio, borohidruro de litio, borohidruro de potasio, borohidruro de tetrabutilamonio, borohidruro de calcio y borohidruro de magnesio. En una forma de realización preferida, el reactivo bloqueante es borohidruro de sodio.

Aun en otra forma de realización, la cantidad de borohidruro que se usa en la etapa (c) es de alrededor de 0,1 a alrededor de 10,0 equivalentes molares, de alrededor de 0,5 a alrededor de 5,0 equivalentes molares o de alrededor de 1,0 a 3,0 equivalentes molares. En una forma de realización preferida, la cantidad de borohidruro que se usa en la etapa (c) es de alrededor de 2,0 equivalentes molares.

En una forma de realización preferida, el borohidruro que se usa en la etapa (c) es NaBH_4 en una concentración de alrededor de 2,0 equivalentes molares.

En una forma de realización, la duración de la etapa (c) es de 0,1 horas a 10 horas, de 0,5 horas a 5 horas, de 2 horas a 4 horas. En una forma de realización preferida, la duración de la etapa (c) es de alrededor de 3 horas.

En otra forma de realización, la temperatura de la reacción en la etapa (c) se mantiene a una temperatura de alrededor de 15 °C a alrededor de 45 °C, de alrededor de 15 °C a alrededor de 30 °C o de alrededor de 20 °C a alrededor de 26 °C. En una forma de realización preferida, la temperatura de la reacción en la etapa (c) se mantiene a alrededor de 23 °C.

Después de la conjugación del polisacárido capsular de GBS con la proteína portadora y el bloqueo, el conjugado proteína-polisacárido se puede purificar (enriquecer con respecto a la cantidad de conjugado proteína-polisacárido) mediante varias técnicas conocidas por la persona del oficio de nivel medio. Estas técnicas incluyen diálisis, operaciones de concentración/diafiltración, filtración de flujo tangencial, precipitación/elución, cromatografía en columna (DEAE o cromatografía de interacción hidrófoba) y filtración de profundidad.

En otra forma de realización, el conjugado inmunógeno comprende menos de alrededor de 40 %, menos de alrededor de 35 %, menos de alrededor de 30 %, menos de alrededor de 25 %, menos de alrededor de 20 %, menos de alrededor de 15 %, menos de

alrededor de 10 % o menos de alrededor de 5 % de polisacárido capsular de GBS libre en comparación con la cantidad total de polisacárido capsular de GBS. En una forma de realización preferida, el conjugado inmunógeno comprende menos de alrededor de 5 % de sacárido libre sin reaccionar en comparación con la cantidad total de polisacárido capsular de GBS.

En una forma de realización preferida, el conjugado proteína-polisacárido de GBS tiene un peso molecular de alrededor de 300 kDa a alrededor de 20.000 kDa, por ejemplo, de alrededor de 1.000 kDa a alrededor de 15.000 kDa o de alrededor de 1.000 kDa a alrededor de 10.000 kDa.

Aun en otra forma de realización, la relación (peso en peso) de polisacárido capsular de GBS con respecto a la proteína portadora en el conjugado es de alrededor de 0,5 a alrededor de 3,0. En un aspecto, la relación de polisacárido capsular de GBS con respecto a la proteína portadora en el conjugado es de alrededor de 0,5 a alrededor de 2,0, de alrededor de 0,5 a alrededor de 1,5, de alrededor de 0,5 a alrededor de 1,0, de alrededor de 1,0 a alrededor de 1,5, o de alrededor de 1,0 a alrededor de 2,0. En una forma de realización preferida, la relación de polisacárido capsular de GBS con respecto a la proteína portadora en el conjugado es de alrededor de 0,8 a alrededor de 1,0.

En otra forma de realización, el grado de conjugación del conjugado es de 2 a 15, de 2 a 13, de 2 a 10, de 2 a 8, de 2 a 6, de 2 a 5, de 2 a 4, de 3 a 15, de 3 a 13, de 3 a 10, de 3 a 8, de 3 a 6, de 3 a 5, de 3 a 4, de 5 a 15, de 5 a 10, de 8 a 15, de 8 a 12, de 10 a 15 o de 10 a 12. En una forma de realización preferida, el grado de conjugación del conjugado es de 2 a 5.

En un aspecto de la invención, los conjugados proteína-polisacárido capsular de GBS se obtienen mediante el método de aminación reductora descrito anteriormente. Por ejemplo, en un aspecto, la presente descripción proporciona un conjugado proteína-polisacárido capsular de GBS que comprende un polisacárido conjugado con una proteína portadora que se produce o se puede obtener mediante el método que comprende las etapas de:

(a) hacer reaccionar el polisacárido capsular de GBS aislado con un agente oxidante;

(b) inactivar la reacción de oxidación agregando un agente de inactivación que da como resultado un polisacárido capsular de GBS activado;

(c) formular un compuesto con el polisacárido capsular de GBS activado y una

proteína portadora,

(d) hacer reaccionar el compuesto de polisacárido capsular de GBS activado y proteína portadora con un agente reductor para formar un conjugado proteína portadora-polisacárido capsular de GBS, y opcionalmente

(e) bloquear el aldehído sin reaccionar mediante la adición de borohidruro de sodio (NaBH_4).

En una forma de realización preferida, las etapas (c) y (d) se llevan a cabo en DMSO.

En otro aspecto de la invención, los conjugados proteína-polisacárido capsular de GBS de la invención se preparan usando aminación reductora como se describió anteriormente, pero con el radical libre 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi (TEMPO) y N-clorosuccinimida (NCS) como cooxidante en la etapa de activación/oxidación. Véase la publicación de solicitud de patente internacional N.º WO 2014/097099, que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad. En dicha forma de realización, los glucoconjugados de polisacáridos capsulares de GBS se preparan usando el radical libre TEMPO para oxidar los alcoholes primarios del sacárido a aldehídos usando NCS como cooxidante (en adelante “oxidación de TEMPO/NCS”), como se describe en el Ejemplo 7 y en la publicación de solicitud de patente internacional N.º WO 2014/097099. Por ende, en un aspecto, los conjugados de polisacáridos capsulares de GBS se pueden obtener mediante un método que comprende las etapas de: a) hacer reaccionar un polisacárido capsular de GBS con TEMPO y NCS en un solvente para producir un sacárido activado; y b) hacer reaccionar el sacárido activado con una proteína portadora que comprende uno o más grupos amina (en adelante “aminación reductora de TEMPO/NCS”). En una forma de realización, el solvente puede ser un solvente acuoso o DMSO.

En un aspecto, los conjugados proteína-polisacárido capsular de GBS se obtienen mediante dicho método. Por ejemplo, en un aspecto, la presente descripción proporciona un conjugado proteína-polisacárido capsular de GBS que comprende un polisacárido conjugado con una proteína portadora que se produce o se puede obtener mediante el método que comprende las etapas de: a) hacer reaccionar un sacárido con 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi (TEMPO) y N-clorosuccinimida (NCS) en un solvente para producir un sacárido activado; y b) hacer reaccionar el sacárido activado con una proteína portadora que comprende uno o más grupos amina. En una forma de realización, el solvente puede ser un solvente acuoso o DMSO.

Composiciones inmunógenas

Después de que los conjugados individuales se purifican, se pueden combinar para formular una composición inmunógena de la presente invención que se puede usar, por ejemplo, en una vacuna. La formulación de la composición inmunógena de la presente invención se puede lograr usando métodos conocidos en el estado de la técnica.

Una "respuesta inmunitaria" contra una composición inmunógena es el desarrollo en un sujeto de una respuesta inmunitaria humoral y/o celular a moléculas presentes en la composición de interés (por ejemplo, un antígeno, tal como una proteína o un polisacárido). A los fines de la presente invención, una "respuesta inmunitaria humoral" es una respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos e implica la generación de anticuerpos con afinidad a los antígenos presentes en las composiciones inmunógenas de la invención, mientras que una "respuesta inmunitaria celular" es aquella mediada por linfocitos T y/u otros glóbulos blancos. Una "respuesta inmunitaria celular" es provocada por la presentación de epítomos antigénicos en asociación con moléculas clase I o clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Esto activa los linfocitos T colaboradores CD4+ o los linfocitos T citotóxicos CD8+ (CTL) específicos contra el antígeno. Los CTL tienen especificidad para antígenos de péptidos o lípidos que se presentan en asociación con proteínas codificadas por el MHC o CD1 y expresadas en las superficies de las células. Los CTL ayudan a inducir y promover la destrucción intracelular de microbios intracelulares, o la lisis de células infectadas con dichos microbios. Otro aspecto de la inmunidad celular implica una respuesta específica contra el antígeno por parte de los linfocitos T colaboradores. Los linfocitos T colaboradores actúan para ayudar a estimular la función y concentran la actividad de células efectoras no específicas contra células que exhiben antígenos de péptidos asociados a moléculas de MHC clásicos o no clásicos en su superficie. Una "respuesta inmunitaria celular" también se refiere a la producción de citocinas, quimiocinas y otras moléculas producidas por linfocitos T activados y/u otros glóbulos blancos, que incluyen aquellos que derivan de linfocitos T CD4+ y CD8+. La capacidad de una composición o de un antígeno particular de estimular una respuesta inmunitaria celular se puede determinar mediante varios ensayos, tales como ensayos de linfoproliferación (activación linfocítica), ensayos de células citotóxicas CTL, analizando linfocitos T específicos contra el antígeno en un sujeto sensibilizado, o midiendo la producción de citocina mediante linfocitos T en respuesta a la reestimulación con antígeno. Tales ensayos son conocidos en el estado de la técnica. Véanse, por ejemplo, Erickson, A.L., et al., J. Immunol., 151(8):4189-4199 (1993); Doe, B., et al., Eur. J. Immunol. 24(10):2369-2376

(1994).

El término "inmunógeno" se refiere a la capacidad de un antígeno o una vacuna de provocar una respuesta inmunitaria, ya sea humoral o celular, o ambas.

Una "cantidad inmunógena", una "cantidad inmunológicamente eficaz" o "dosis", cada una de las cuales se usa de manera indistinta en la presente, en general, se refieren a la cantidad de antígeno o composición inmunógena suficiente para provocar una respuesta inmunitaria, ya sea una respuesta celular (linfocito T) o humoral (linfocito B o anticuerpo), o ambas, como se mide mediante ensayos estándares conocidos por las personas del oficio de nivel medio.

"Interferencia inmunitaria" o "interferencia inmunitaria significativa", como se usan en la presente, se refieren a una disminución estadísticamente significativa en la respuesta inmunitaria contra un antígeno individual en una vacuna multivalente o multicomponente en comparación con la respuesta inmunitaria al mismo antígeno cuando se administra en una vacuna monovalente.

Una respuesta inmunitaria "protectora" se refiere a la capacidad de una composición inmunógena de provocar una respuesta inmunitaria, ya sea humoral o celular, que funciona para proteger al sujeto de una infección. No es necesario que la protección sea absoluta, es decir, no es necesario que la infección se prevenga o se erradique por completo si hay una mejora considerable desde el punto de vista estadístico en comparación con una población de control de sujetos, por ejemplo, animales infectados a los que no se les administró la vacuna ni la composición inmunógena. La protección se puede limitar a mitigar la gravedad o la rapidez de la aparición de los síntomas de la infección. Se conocen diversos ensayos en el estado de la técnica para determinar si una respuesta inmunitaria es un indicio de una "respuesta inmunitaria protectora". Por ejemplo, un aumento de los niveles de anticuerpo se puede medir mediante un ensayo de fijación, tal como un ensayo celular ELISA que se describe en mayor detalle más adelante. Otros ensayos incluyen medir respuestas de anticuerpos funcionales, tales como la facilitación de la inactivación de bacterias, que se pueden evaluar con un ensayo de opsonofagocitosis (OPA) como se describe a continuación. En situaciones particulares, una "respuesta inmunitaria protectora" podría incluir la inducción de un doble aumento de los niveles de anticuerpos o un cuádruple aumento de los niveles de anticuerpos para un antígeno en particular en al menos el 50 % de los sujetos. En otra situación, una "respuesta inmunitaria protectora" puede incluir una disminución del recuento bacteriano de al menos 10 %, 25 %, 50 %, 65

%, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más.

La cantidad de un conjugado particular en una composición se calcula, generalmente, en función del total de polisacárido, conjugado y no conjugado, para ese conjugado. Por ejemplo, un conjugado de polisacárido capsular de GBS con 20 % de polisacárido libre tendrá alrededor de 80 mcg/ml de polisacárido capsular de GBS conjugado a alrededor de 20 mcg/ml de polisacárido capsular de GBS no conjugado en una dosis de polisacárido capsular de GBS de 100 mcg/ml. En general, la contribución del portador de proteínas al conjugado no se considera cuando se calcula la dosis de un conjugado. La cantidad de conjugado puede variar según el serotipo estreptocócico. En general, cada dosis comprenderá alrededor de 0,01 mg/ml a alrededor de 100 mcg/ml de cada polisacárido, en particular, alrededor de 1 mcg/ml a alrededor de 70 mcg/ml, y más en particular, alrededor de 5 mcg/ml a alrededor de 50 mcg/ml. La "cantidad inmunógena" de los distintos componentes de polisacáridos en la composición inmunógena puede diferir, y cada uno puede comprender alrededor de 0,01 mcg/ml, alrededor de 0,1 mcg/ml, alrededor de 0,25 mcg/ml, alrededor de 0,5 mcg/ml, alrededor de 1 mcg/ml, alrededor de 2 mcg/ml, alrededor de 3 mcg/ml, alrededor de 4 mcg/ml, alrededor de 5 mcg/ml, alrededor de 6 mcg/ml, alrededor de 7 mcg/ml, alrededor de 8 mcg/ml, alrededor de 9 mcg/ml, alrededor de 10 mcg/ml, alrededor de 15 mcg/ml, alrededor de 20 mcg/ml, alrededor de 25 mcg/ml, alrededor de 30 mcg/ml, alrededor de 40 mcg/ml, alrededor de 50 mcg/ml, alrededor de 60 mcg/ml, alrededor de 70 mcg/ml, alrededor de 80 mcg/ml, alrededor de 90 mcg/ml o alrededor de 100 mcg/ml de cualquier antígeno de polisacárido particular. Una dosis o cantidad inmunógena de una composición inmunógena multivalente indicaría la dosis de cada polisacárido, a menos que se indique lo contrario. Por ejemplo, una dosis de 10 mcg/ml de una composición inmunógena hexavalente contendría 10 mcg/ml de cada uno de los seis polisacáridos.

La eficacia de un antígeno como inmunógeno se puede determinar midiendo los niveles de actividad de los linfocitos B midiendo los niveles de anticuerpos circulantes específicos contra el antígeno en suero usando inmunoensayos, ensayos de inmunoprecipitación, ensayos de anticuerpos funcionales, tales como el ensayo opsónico *in vitro* y muchos otros ensayos conocidos en el estado de la técnica. Otra medición de la eficacia de un antígeno como inmunógeno de linfocitos T se puede medir mediante ensayos de proliferación, mediante ensayos citolíticos, tales como ensayos de liberación de cromo, para medir la capacidad de un linfocito T de lisar su célula diana específica. Además, en la

presente invención, una "cantidad inmunógena" también se puede definir midiendo los niveles de suero del anticuerpo específico contra el antígeno inducido después de la administración del antígeno o midiendo la capacidad de los anticuerpos así inducidos de mejorar la capacidad opsonofagocítica de los glóbulos blancos particulares como se describe en la presente. El nivel de protección de la respuesta inmunitaria se puede medir exponiendo el huésped inmunizado con el antígeno que se inyectó. Por ejemplo, si el antígeno para el cual se desea una respuesta inmunitaria es una bacteria, el nivel de protección inducido por la "cantidad inmunógena" del antígeno se puede medir detectando el porcentaje de supervivencia o el porcentaje de mortalidad después de exponer a los animales a las células bacterianas. En una forma de realización, la cantidad de protección se puede determinar midiendo al menos un síntoma asociado a la infección bacteriana, por ejemplo, fiebre asociada a la infección. La cantidad de cada uno de los antígenos en la vacuna multiantigénica o de componentes múltiples o composiciones inmunógenas varía con respecto a cada uno de los componentes y se puede determinar mediante métodos conocidos por la persona del oficio de nivel medio. Tales métodos incluyen, por ejemplo, procedimientos para medir la inmunogenicidad y/o la eficacia *in vivo*.

La expresión "composición inmunógena" se refiere a cualquier composición farmacéutica que contiene un antígeno, por ejemplo, un microorganismo o un componente de este, que se puede usar para provocar una respuesta inmunitaria en un sujeto. Las composiciones inmunógenas de la presente invención se pueden usar para tratar a un ser humano susceptible a la infección por GBS, mediante la administración de composiciones inmunógenas mediante una vía sistémica transdérmica o mucosa. Estas administraciones pueden incluir la inyección por vía intramuscular (i.m.), intraperitoneal (i.p.), intradérmica (i.d.) o subcutánea; la aplicación mediante un parche u otro dispositivo de administración transdérmica; o mediante la administración a través de la mucosa bucal/del tubo digestivo, de las vías respiratorias o del aparato genitourinario. En una forma de realización, la composición inmunógena se puede usar en la fabricación de una vacuna o en la estimulación de anticuerpos policlonales o monoclonales que se pueden usar para proteger de manera pasiva o para tratar a un animal.

En un aspecto, la presente invención se refiere a composiciones inmunógenas que incluyen una cantidad eficaz de al menos un polisacárido, oligosacárido, conjugado proteína-polisacárido o un equivalente biológico de estos, como se describe en la presente. Por ejemplo, en una forma de realización, la composición inmunógena incluye conjugados

proteína-polisacárido, en donde el polisacárido capsular se selecciona del grupo que consiste en estreptococo grupo B serotipos Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII y IX, y en donde el polisacárido capsular tiene un nivel de ácido siálico mayor de alrededor de 60 %. En otro ejemplo, la composición inmunógena incluye conjugados proteína-polisacárido, en donde los conjugados comprenden polisacáridos capsulares de estreptococo grupo B serotipo IV y al menos un serotipo adicional seleccionado del grupo que consiste en los serotipos Ia, Ib, II, III, V, VI, VII, VIII y IX. En otra forma de realización, la composición inmunógena comprende conjugados proteína-polisacárido, en donde los conjugados comprenden polisacáridos capsulares de estreptococo grupo B serotipo IV y al menos dos serotipos adicionales seleccionados del grupo que consiste en los serotipos Ia, Ib, II, III, V, VI, VII, VIII y IX. Aun en otra forma de realización, la composición inmunógena comprende conjugados proteína-polisacárido, en donde los conjugados comprenden polisacáridos capsulares de estreptococo grupo B serotipo IV y al menos tres serotipos adicionales seleccionados del grupo que consiste en los serotipos Ia, Ib, II, III, V, VI, VII, VIII y IX. En otra forma de realización, la composición inmunógena comprende conjugados proteína-polisacárido, en donde los conjugados comprenden polisacáridos capsulares de estreptococo grupo B serotipo IV y al menos cuatro serotipos adicionales seleccionados del grupo que consiste en los serotipos Ia, Ib, II, III, V, VI, VII, VIII y IX. En una forma de realización particular, la composición inmunógena [omisión en el texto fuente] conjugados proteína-polisacárido, en donde los conjugados comprenden polisacáridos capsulares de estreptococo grupo B serotipos Ia, Ib, II, III y V. En otra forma de realización, la composición inmunógena [omisión en el texto fuente] conjugados proteína-polisacárido, en donde los conjugados comprenden polisacáridos capsulares de estreptococo grupo B serotipos Ia, Ib, II, III y IV. Aun en otra forma de realización, la composición inmunógena [omisión en el texto fuente] conjugados proteína-polisacárido, en donde los conjugados comprenden polisacáridos capsulares de estreptococo grupo B serotipo IV y al menos cinco serotipos adicionales seleccionados del grupo que consiste en los serotipos Ia, Ib, II, III, V, VI, VII, VIII y IX. En una forma de realización como tal, la composición inmunógena comprende seis conjugados proteína-polisacárido, en donde los conjugados comprenden un polisacárido capsular de estreptococo grupo B serotipos Ia, Ib, II, III, IV y V.

En una forma de realización, la composición inmunógena de la invención comprende de 2 a 10 serotipos diferentes de *S. agalactiae*. Por lo tanto, en una forma de realización, la composición inmunógena de la invención es una composición conjugada de GBS con una

valencia de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En una forma de realización como tal, la composición inmunógena es una composición conjugada de GBS con una valencia de 5. En otra forma de realización, la composición inmunógena es una composición conjugada de GBS con una valencia de 6. Aun en otra forma de realización, la composición inmunógena es una composición conjugada de GBS con una valencia de 7. En otra forma de realización, la composición inmunógena es una composición conjugada de GBS con una valencia de 8.

Pese a las indicaciones anteriores de usar menos de seis, menos de cinco o menos de cuatro antígenos de GBS en una composición (véase la publicación de solicitud de patente internacional N.^{os} WO 2006/082527 y WO 2006/082530) y experiencias de interferencia inmunitaria, en particular con respecto al uso de serotipo V en composiciones multivalentes (véase la publicación de solicitud de patente internacional N.^o WO 2012/035519), la presente invención no muestra ninguna interferencia inmunitaria significativa con el uso de cuatro o más antígenos de GBS ni con el uso de serotipo V en una composición multivalente. En consecuencia, la presente invención se refiere a composiciones inmunógenas multivalentes que comprenden conjugados proteína-polisacárido que comprenden al menos cuatro serotipos de polisacárido capsular de GBS, por ejemplo, al menos cinco serotipos de polisacárido capsular de GBS, al menos seis serotipos de polisacárido capsular de GBS, al menos siete serotipos de polisacárido capsular de GBS, al menos ocho serotipos de polisacárido capsular de GBS o al menos nueve serotipos de polisacárido capsular de GBS, en donde la composición no tiene interferencia inmunitaria significativa. En una forma de realización particular, la composición inmunógena comprende el polisacárido capsular de GBS serotipo V.

Los conjugados proteína-polisacárido pueden comprender los mismos portadores de proteínas u otros. En una forma de realización, los conjugados comprenden el mismo portador de proteínas, y los sacáridos se conjugan con la misma molécula del portador de proteínas (moléculas portadoras que tienen 2 o más polisacáridos diferentes conjugados con ellas) [véase, por ejemplo, la publicación de la solicitud de patente internacional N.^o WO 2004/083251]. En otra forma de realización, los polisacáridos se conjugan individualmente con diferentes moléculas del portador de proteínas (cada molécula de portador de proteínas solo tiene un tipo de polisacárido conjugado con ella). En dicha forma de realización, se considera que los sacáridos capsulares se conjugan individualmente con la proteína portadora.

Las cantidades óptimas de componentes para una composición inmunógena

particular se pueden determinar mediante estudios estándares que implican la observación de respuestas inmunitarias adecuadas en los sujetos. Después de la vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o más inmunizaciones de refuerzo adecuadamente espaciadas.

Las composiciones inmunógenas de la invención también pueden comprender uno o más conservantes, además de diversos conjugados proteína-polisacárido capsular. La FDA exige que los productos biológicos en viales de múltiples dosis (multidosis) contengan un conservante, salvo algunas excepciones. La presente invención contempla el uso de los viales de múltiples dosis. Los productos de vacunas que contienen conservantes incluyen vacunas que contienen cloruro de bencetonio (ántrax), 2-fenoxietanol (DTaP, HepA, Lyme, polio (parenteral)) y fenol (neumonía, fiebre tifoidea (parenteral)). Los conservantes aprobados para usar en fármacos inyectables incluyen, por ejemplo, clorobutanol, m cresol, metilparabeno, propilparabeno, 2-fenoxietanol, cloruro de bencetonio, cloruro de benzalconio, ácido benzoico, alcohol bencílico, fenol y nitrato fenilmercúrico.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición que incluye al menos uno de cualquier polisacárido descrito en la presente y un excipiente, un amortiguador, un estabilizante, un adyuvante, un crioprotector, una sal, un catión divalente, un detergente no iónico, un inhibidor de oxidación de radicales libres, un diluyente o un portador aceptables desde el punto de vista farmacéutico, o una mezcla de estos.

La composición inmunógena puede comprender opcionalmente uno o más amortiguadores fisiológicamente aceptables seleccionados de HEPES, PIPES, MES, Tris (trimetamina), fosfato, acetato, borato, citrato, glicina, histidina y succinato, entre otros. En una forma de realización preferida, el amortiguador es histidina.

En una forma de realización, la composición inmunógena comprende un amortiguador a una concentración de alrededor de 5 mM a alrededor de 50 mM, alrededor de 5 mM a alrededor de 40 mM, alrededor de 5 mM a alrededor de 30 mM, alrededor de 5 mM a alrededor de 20 mM, alrededor de 5 mM a alrededor de 10 mM, alrededor de 10 mM a alrededor de 50 mM, alrededor de 10 mM a alrededor de 40 mM, alrededor de 10 mM a alrededor de 35 mM, alrededor de 10 mM a alrededor de 30 mM, alrededor de 10 mM a alrededor de 25 mM, alrededor de 10 mM a alrededor de 20 mM, alrededor de 10 mM a alrededor de 15 mM, alrededor de 15 mM a alrededor de 50 mM, alrededor de 15 mM a alrededor de 40 mM, alrededor de 15 mM a alrededor de 35 mM, alrededor de 15 mM a alrededor de 30 mM, alrededor de 15 mM a alrededor de 25 mM o alrededor de 15 mM a alrededor de 20 mM. En una forma de realización preferida, la composición inmunógena

comprende un amortiguador a una concentración de alrededor de 10 mM a alrededor de 25 mM, y con máxima preferencia, alrededor de 20 mM.

En una forma de realización preferida, la composición inmunógena comprende histidina a una concentración de alrededor de 20 mM.

En algunas formas de realización, la formulación se amortigua dentro de un rango de pH de alrededor de 5,0 a alrededor de 7,1, por ejemplo, alrededor de 5,3 a alrededor de 7,1, alrededor de 5,5 a alrededor de 7,0, alrededor de 6,0 a alrededor de 7,0, alrededor de 6,0 a alrededor de 6,5, alrededor de 6,3 a alrededor de 7,0 o alrededor de 6,5 a alrededor de 7,0. En otra forma de realización, la formulación se amortigua a un pH de alrededor de 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 o 7,0. En una forma de realización preferida, la formulación se amortigua a un rango de pH de alrededor de 6,0 a alrededor de 7,0, y con máxima preferencia, alrededor de 6,5.

La composición inmunógena puede comprender opcionalmente uno o más tensioactivos no iónicos, que incluyen, entre otros, ésteres de ácidos grasos de polioxietilen sorbitán, polisorbato 80 (TWEEN 80), polisorbato 60 (TWEEN 60), polisorbato 40 (TWEEN 40), polisorbato 20 (TWEEN 20) y alquiléteres de polioxietileno, que incluyen, entre otros, BRIJ 58, BRIJ 35 y otros, tales como TRITON X-100; TRITON X- 114, NP40, SPAN 85 y la serie PLURONIC de tensioactivos no iónicos (por ejemplo, PLURONIC 121). En una forma de realización, la composición inmunógena comprende polisorbato 80 o polisorbato 40, preferentemente, polisorbato 80 (PS80).

En una forma de realización, la composición inmunógena comprende un tensioactivo a una concentración de alrededor de 0,001 % a alrededor de 2 % (v/p), alrededor de 0,001 % a alrededor de 1 %, alrededor de 0,001 % a alrededor de 0,5 %, alrededor de 0,001 % a alrededor de 0,1 %, alrededor de 0,001 % a alrededor de 0,05 %, alrededor de 0,001 % a alrededor de 0,01 %, alrededor de 0,001 % a 0,005 %, alrededor de 0,005 % a alrededor de 2 %, alrededor de 0,005 % a alrededor de 1 %, alrededor de 0,005 % a alrededor de 0,5 %, alrededor de 0,005 % a alrededor de 0,1 %, alrededor de 0,005 % a alrededor de 0,05 %, alrededor de 0,005 % a alrededor de 0,01 %, alrededor de 0,01 % a alrededor de 2 %, alrededor de 0,01 % a alrededor de 1 %, alrededor de 0,01 % a alrededor de 0,5 %, alrededor de 0,01 % a alrededor de 0,1 %, alrededor de 0,01 % a alrededor de 0,05 %, alrededor de 0,01 % a alrededor de 0,04 %, alrededor de 0,01 % a alrededor de 0,03 %, alrededor de 0,015 % a alrededor de 2 %, alrededor de 0,015 % a alrededor de 1 %, alrededor de 0,015 % a alrededor de 0,5 %, alrededor de 0,015 % a

alrededor de 0,1 %, alrededor de 0,015 % a alrededor de 0,05 %, alrededor de 0,015 % a alrededor de 0,04 %, alrededor de 0,015 % a alrededor de 0,03 %, alrededor de 0,02 % a alrededor de 2 %, alrededor de 0,02 % a alrededor de 1 %, alrededor de 0,02 % a alrededor de 0,5 %, alrededor de 0,02 % a alrededor de 0,1 %, alrededor de 0,02 % a alrededor de 0,05 %, alrededor de 0,02 % a alrededor de 0,04 %, alrededor de 0,02 % a alrededor de 0,03 %, alrededor de 0,05 % a alrededor de 2 %, alrededor de 0,05 % a alrededor de 1 %, alrededor de 0,05 % a alrededor de 0,5 %, alrededor de 0,05 % a alrededor de 0,1 %, alrededor de 0,1 % a alrededor de 2 %, alrededor de 0,1 % a alrededor de 1 %, alrededor de 0,1 % a alrededor de 0,5 % o alrededor de 0,1 % a alrededor de 0,25 %. En una forma de realización preferida, la composición inmunógena comprende un tensioactivo a una concentración de alrededor de 0,01 % a alrededor de 0,03 %, y con máxima preferencia, alrededor de 0,02 %.

En otra forma de realización, la composición inmunógena comprende polisorbato 80 a una concentración de alrededor de 0,001 % a alrededor de 2 % (en donde se prefiere hasta alrededor de 0,25 %) o polisorbato 40 a una concentración de alrededor de 0,001 % a 1 % (en donde se prefiere hasta alrededor de 0,5 %).

En una forma de realización preferida, la composición inmunógena comprende PS80 a una concentración de alrededor de 0,02 %.

Los portadores aceptables desde el punto de vista farmacéutico no deben confundirse con las "proteínas portadoras", que se usan para unir el carbohidrato de la invención a una proteína y modificar la respuesta inmunitaria contra aquel carbohidrato. Para evitar la confusión con los portadores de proteínas descritos en la presente, se preferirá "diluyente aceptable desde el punto de vista farmacéutico" antes que "portadores aceptables desde el punto de vista farmacéutico", pero, en ocasiones, estas expresiones pueden usarse de manera indistinta. La expresión "portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico" significa un portador aprobado por una autoridad reguladora del gobierno federal o estatal, u otra autoridad reguladora, o enumerado en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea de amplio reconocimiento para usar en animales, incluidos seres humanos y mamíferos no humanos. El término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el cual se administra la composición farmacéutica. Los diluyentes aceptables desde el punto de vista farmacéutico adecuados incluyen todos los solventes convencionales, medios de dispersión, agentes de relleno, portadores sólidos, soluciones acuosas, recubrimientos, agentes antibacterianos y

antifúngicos, agentes demoradores de la absorción e isotónicos, y similares. Tales diluyentes aceptables desde el punto de vista farmacéutico pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceite, que incluyen aquellos de origen petrolero, animal, vegetal o sintético. Se puede usar agua, agua para inyección (WFI), soluciones salinas isotónicas estériles, solución salina amortiguada con fosfato, suspensiones de adyuvante, soluciones acuosas de dextrosa y glicerol, y combinaciones de estos, como portadores líquidos, en particular, para soluciones inyectables. Los diluyentes aceptables desde el punto de vista farmacéutico también pueden comprender cantidades menores de sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulgentes, conservantes o amortiguadores que mejoran la vida útil o la efectividad en el cuerpo. La preparación y el uso de diluyentes aceptables desde el punto de vista farmacéutico se conocen en el estado de la técnica. Los ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences", de E. W. Martin. En una forma de realización, el diluyente es agua, agua para inyección (WFI), una suspensión de adyuvante o solución salina. En una forma de realización particular, el diluyente es una suspensión de cualquier adyuvante descrito en la presente. En una forma de realización preferida, el diluyente es una suspensión de adyuvante a base de aluminio, tal como una suspensión de fosfato de aluminio.

Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, rafinosa, estaquiosa, melecitosa, dextrano, manitol, lactitol, palatinita, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, glicina, arginina, lisina, cloruro de sodio (NaCl), leche descremada seca, glicerol, propilenglicol, agua, etanol, y similares. En una forma de realización preferida, el excipiente es NaCl.

En una forma de realización, la composición inmunógena comprende un excipiente a una concentración de alrededor de 10 mM a alrededor de 500 mM, alrededor de 10 mM a alrededor de 450 mM, alrededor de 10 mM a alrededor de 400 mM, alrededor de 10 mM a alrededor de 350 mM, alrededor de 10 mM a alrededor de 300 mM, alrededor de 10 mM a alrededor de 250 mM, alrededor de 10 mM a alrededor de 200 mM, alrededor de 10 mM a alrededor de 150 mM, alrededor de 10 mM a alrededor de 100 mM, alrededor de 10 mM a alrededor de 50 mM, alrededor de 10 mM a alrededor de 30 mM, alrededor de 10 mM a alrededor de 20 mM, 20 mM a alrededor de 500 mM, alrededor de 20 mM a alrededor de 450 mM, alrededor de 20 mM a alrededor de 400 mM, alrededor de 20 mM a alrededor de

350 mM, alrededor de 20 mM a alrededor de 300 mM, alrededor de 20 mM a alrededor de 250 mM, alrededor de 20 mM a alrededor de 200 mM, alrededor de 20 mM a alrededor de 150 mM, alrededor de 20 mM a alrededor de 100 mM, alrededor de 20 mM a alrededor de 50 mM, alrededor de 20 mM a alrededor de 30 mM, 50 mM a alrededor de 500 mM, alrededor de 50 mM a alrededor de 450 mM, alrededor de 50 mM a alrededor de 400 mM, alrededor de 50 mM a alrededor de 350 mM, alrededor de 50 mM a alrededor de 300 mM, alrededor de 50 mM a alrededor de 250 mM, alrededor de 50 mM a alrededor de 200 mM, alrededor de 50 mM a alrededor de 150 mM, alrededor de 50 mM a alrededor de 100 mM, alrededor de 100 mM a alrededor de 500 mM, alrededor de 100 mM a alrededor de 450 mM, alrededor de 100 mM a alrededor de 400 mM, alrededor de 100 mM a alrededor de 350 mM, alrededor de 100 mM a alrededor de 300 mM, alrededor de 100 mM a alrededor de 250 mM, alrededor de 100 mM a alrededor de 200 mM, alrededor de 100 mM a alrededor de 150 mM, alrededor de 150 mM a alrededor de 500 mM, alrededor de 150 mM a alrededor de 450 mM, alrededor de 150 mM a alrededor de 400 mM, alrededor de 150 mM a alrededor de 350 mM, alrededor de 150 mM a alrededor de 300 mM, alrededor de 150 mM a alrededor de 250 mM, alrededor de 150 mM a alrededor de 200 mM, alrededor de 200 mM a alrededor de 500 mM, alrededor de 200 mM a alrededor de 450 mM, alrededor de 200 mM a alrededor de 400 mM, alrededor de 200 mM a alrededor de 350 mM, alrededor de 200 mM a alrededor de 300 mM, alrededor de 200 mM a alrededor de 250 mM, alrededor de 250 mM a alrededor de 500 mM, alrededor de 250 mM a alrededor de 450 mM, alrededor de 250 mM a alrededor de 400 mM, alrededor de 250 mM a alrededor de 350 mM, alrededor de 250 mM a alrededor de 300 mM, alrededor de 300 mM a alrededor de 500 mM, alrededor de 300 mM a alrededor de 450 mM, alrededor de 300 mM a alrededor de 400 mM, alrededor de 300 mM a alrededor de 350 mM, alrededor de 350 mM a alrededor de 500 mM, alrededor de 350 mM a alrededor de 450 mM, alrededor de 350 mM a alrededor de 400 mM, alrededor de 400 mM a alrededor de 500 mM, alrededor de 400 mM a alrededor de 450 mM o alrededor de 450 mM a alrededor de 500 mM. En una forma de realización preferida, la composición inmunógena comprende un excipiente a una concentración de alrededor de 10 mM a alrededor de 250 mM, y con máxima preferencia, alrededor de 150 mM.

En una forma de realización preferida, el excipiente es NaCl a una concentración de alrededor de 150 mM.

Si se desea, la composición también puede contener cantidades menores de agentes humectantes, volumétricos o emulgentes, o agentes amortiguadores de pH. Estas

composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsión, polvo o pastilla liofilizados, y similares. La formulación debe adaptarse al modo de administración. Excepto en el caso de que un medio o agente convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones inmunógenas de la presente invención.

En una forma de realización, la composición inmunógena se liofiliza, opcionalmente en presencia de al menos un excipiente. En una forma de realización preferida, al menos un excipiente se selecciona del grupo que consiste en almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, rafinosa, estaquiosa, melecitosa, dextrano, manitol, lactitol, palatinita, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, glicina, arginina, lisina, cloruro de sodio (NaCl), leche descremada seca, glicerol, propilenglicol, agua y etanol. En una forma de realización preferida, al menos un excipiente se selecciona del grupo que consiste en sacarosa, manitol y glicina. En una forma de realización particular, al menos un excipiente es sacarosa. En otra forma de realización, la composición liofilizada comprende un excipiente adicional. En una forma de realización como tal, el excipiente adicional es manitol o glicina.

En otra forma de realización, la composición liofilizada comprende alrededor de 1 % (p/v) a alrededor de 10 % (p/v) de al menos un sacárido, por ejemplo, alrededor de 1,5 %, 2,0 %, 2,5 %, 3,0 %, 3,5 %, 4,0 %, 4,5 %, 5,0 %, 5,5 %, 6,0 %, 6,5 %, 7,0 %, 7,5 %, 8,0 %, 8,5 %, 9,0 %, 9,5 % o 10,0 %. En una forma de realización preferida, la composición liofilizada comprende más de alrededor de 5,5 % (p/v) de al menos un excipiente, por ejemplo, más de alrededor de 7,0 % (p/v). En otra forma de realización, la composición liofilizada comprende alrededor de 1 % (p/v) a alrededor de 10 % (p/v) de un excipiente adicional, por ejemplo, alrededor de 1,5 %, 2,0 %, 2,5 %, 3,0 %, 3,5 %, 4,0 %, 4,5 %, 5,0 %, 5,5 %, 6,0 %, 6,5 %, 7,0 %, 7,5 %, 8,0 %, 8,5 %, 9,0 %, 9,5 % o 10,0 %. En una forma de realización preferida, la composición liofilizada comprende alrededor de 1 % (p/v) a alrededor de 10 % (p/v) de al menos un excipiente y alrededor de 1 % (p/v) a alrededor de 10 % (p/v) del excipiente adicional.

Aun en otra forma de realización, la composición liofilizada se reconstituye con agua, agua para inyección (WFI), una suspensión de adyuvante o solución salina. En una forma de realización preferida, el diluyente es una suspensión de adyuvante a base de aluminio, tal como una suspensión de fosfato de aluminio.

En una forma de realización, la composición incluye un polisacárido aislado descrito

en la presente y una molécula portadora. Las moléculas portadoras adecuadas pueden incluir proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, agregados de lípidos (tales como gotas de aceite o liposomas) y partículas virales inactivas. Algunos ejemplos de portadores particulados incluyen aquellos derivados de polímeros de polimetil metacrilato y micropartículas derivadas de poli(láctidos) y poli(láctido-co-glicólidos), conocidos como PLG.

Las composiciones inmunógenas de la presente invención también pueden comprender uno o más "inmunomoduladores" adicionales, que son agentes que perturban o alteran el sistema inmunitario, de manera que se observa la regulación ascendente o la regulación descendente de la inmunidad humoral y/o celular. En una forma de realización particular, se prefiere la regulación ascendente de los brazos humorales y/o celulares del sistema inmunitario. Los ejemplos de algunos inmunomoduladores incluyen, por ejemplo, un adyuvante o una citocina, o ISCOMATRIX (CSL Limited, Parkville, Australia), descritos en la patente estadounidense N.º 5.254.339, entre otros. El término "adyuvante" se refiere a un compuesto o una mezcla que mejora la respuesta inmunitaria contra un antígeno, como se describe adicionalmente en la presente.

Los ejemplos no limitativos de adyuvantes que se pueden usar en la composición de la presente invención incluyen el sistema de adyuvantes RIBI (Ribi Inc., Hamilton, Mont.); geles minerales, tales como gel de hidróxido de aluminio; emulsiones de agua en aceite, tales como los adyuvantes de Freund completos e incompletos; copolímero en bloque (CytRx, Atlanta Ga.); SAF-M (Chiron, Emeryville, Calif.); adyuvante AMPHIGEN®; saponina; Quil A u otra fracción de saponina; monofosforil lípido A; y adyuvante lípido-amina Avridine. Los ejemplos no limitativos de emulsiones de aceite en agua útiles como adyuvante en la vacuna de la invención incluyen MF59 (patente estadounidense N.º 6.299.884) (que contiene 5 % de escualeno, 0,5 % de polisorbato 80 y 0,5 % de Span 85 (que contiene opcionalmente diversas cantidades de MTP-PE) formulado en partículas submicrónicas usando un microfluidizador, tal como el microfluidizador modelo 110Y(Microfluidics, Newton, MA)) y SAF (que contiene 10 % de escualeno, 0,4 % de polisorbato 80, 5 % de polímero en bloque L121 Pluronic, y thr-MDP, microfluidizado en una emulsión submicrónica o agitado por vórtice para generar una emulsión de partículas de mayor tamaño); SEAM62 modificado (que contiene 5 % (v/v) de escualeno (Sigma), 1 % (v/v) de detergente 85 SPAN® (ICI Surfactants), 0,7 % (v/v) de detergente de polisorbato 80 (ICI Surfactants), 2,5 % (v/v) de etanol, 200 µg/ml de Quil A, 100 µg/ml de colesterol y 0,5

% (v/v) de lecitina); y SEAM 1/2 modificado (que contiene 5 % (v/v) de escualeno, 1 % (v/v) de detergente 85 SPAN®, 0,7 % (v/v) de detergente de polisorbato 80, 2,5 % (v/v) de etanol, 100 µg/ml de Quil A y 50 µg/ml de colesterol).

Los adyuvantes adecuados que se usan para mejorar una respuesta inmunitaria también incluyen, entre otros, MPL™ (monofosforil lípido A 3-O-desacilado, Corixa, Hamilton, MT), que se describe en la patente estadounidense N.º 4.912.094. También son adecuados para usarse como adyuvantes los análogos sintéticos de lípido A o los compuestos de fosfato de aminoalquil glucosamina (AGP), o derivados o análogos de estos, que están disponibles de Corixa (Hamilton, MT) y que se describen en la patente estadounidense N.º 6.113.918. Un AGP como tal es 2-[(R)-3-tetradecanoiloxi- γ -tetradecanoil-amino] etil 2-desoxi-4-O-fosfono-3-O-[(R)-3-tetra- γ -decanoioxi- γ -tetra- γ -canoil]-2-[(R)-3-tetradecanoiloxi- γ -tetradecanoil-amino]-b-D-glucopiranosida, que también se conoce como 529 (antes denominado RC529). Este adyuvante 529 se formula como una forma acuosa (AF) o como una emulsión estable (SE).

Aun otros adyuvantes incluyen un derivado de ciclodextrina (patente estadounidense N.º 6.165.995); un polímero polianiónico (patente estadounidense N.º 6.610.310); péptidos de muramilo, tales como N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP) y N-acetil-normuramil-L-alanin-2-(1'-2' dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxi-fosforil-oxi)-etilamina (MTP-PE); Amphigen; Avridine; L121/escualeno; D-láctido-poliláctido/glicósido; polioles Pluronic; *Bordetella* inactivada; saponinas, tales como Stimulon™ QS-21 (Antigenics, Framingham, MA.), descritas en la patente estadounidense N.º 5.057.540; *Mycobacterium tuberculosis*; lipopolisacáridos bacterianos; polinucleótidos sintéticos, tales como los oligonucleótidos que contienen un motivo CpG (por ejemplo, patente estadounidense N.º 6.207.646); IC-31 (Intercell AG, Viena, Austria), descrito en las patentes europeas N.ºs 1.296.713 y 1.326.634; una toxina pertussis (PT) o un mutante de esta, una toxina colérica o un mutante de esta (por ejemplo, patentes estadounidenses N.ºs 7.285.281, 7.332.174, 7.361.355 y 7.384.640); o una toxina termolábil (LT) de *E. coli* o un mutante de esta, en particular, LT-K63, LT-R72 (por ejemplo, patentes estadounidenses N.ºs 6.149.919, 7.115.730 y 7.291.588).

Otros "inmunomoduladores" que se pueden incluir en la vacuna incluyen, por ejemplo, una o más de las interleucinas 1- α , 1- β , 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12 (véase, por ejemplo, patente estadounidense N.º 5.723.127), 13, 14, 15, 16, 17 y 18 (y sus formas mutantes); los interferones- α , β y γ ; factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-

CSF) (véanse, por ejemplo, patente estadounidense N.º 5.078.996 y número de acceso a ATCC 39900); factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF); factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF); o los factores de necrosis tumoral α y β . Aun otros adyuvantes que son útiles con las composiciones inmunógenas descritas en la presente incluyen quimiocinas, que incluyen, entre otras, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β y RANTES; moléculas de adhesión, tales como una selectina, por ejemplo, L-selectina, P-selectina y E-selectina; moléculas similares a mucina, por ejemplo, CD34, GlyCAM-1 y MadCAM-1; un miembro de la familia de integrina, tal como LFA-1, VLA-1, Mac-1 y p150.95; un miembro de la superfamilia de inmunoglobulina, tal como PECAM, ICAM, por ejemplo, ICAM-1, ICAM-2 e ICAM-3, CD2 y LFA-3; moléculas coestimuladoras, tales como B7-1, B7-2, CD40 y CD40L; factores de crecimiento, que incluyen el factor de crecimiento vascular, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento epidérmico, PDGF, BL-1 y factor de crecimiento endotelial vascular; moléculas de receptores, que incluyen Fas, receptor TNF, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2 y DR6; y Caspase (ICE).

Debe comprenderse que la decisión con respecto a usar un inmunomodulador y/o adyuvante o la elección de qué inmunomodulador y/o adyuvante se debe usar dependerá del sujeto al que se administrará la vacuna o composición inmunógena, la vía de inyección y la cantidad de inyecciones que se deben dar. Por ejemplo, si el sujeto se expuso al patógeno naturalmente, un adyuvante puede no ser necesario ya que los antígenos de la vacuna pueden inducir de manera eficaz una respuesta de la memoria. En algunas formas de realización, la composición inmunógena incluirá uno o más adyuvantes. En una forma de realización, la composición inmunógena comprende un adyuvante a base de aluminio. En una forma de realización como tal, el adyuvante de aluminio es hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio o hidroxil fosfato de aluminio. En una forma de realización particular, el adyuvante es fosfato de aluminio. En otra forma de realización de la invención, la composición inmunógena comprende QS-21 como adyuvante.

En una forma de realización, la composición inmunógena comprende un adyuvante a una concentración de alrededor de 0,1 mg/ml a alrededor de 1,0 mg/ml, 0,1 mg/ml a alrededor de 0,9 mg/ml, 0,1 mg/ml a alrededor de 0,8 mg/ml, 0,1 mg/ml a alrededor de 0,7 mg/ml, 0,1 mg/ml a alrededor de 0,6 mg/ml, 0,1 mg/ml a alrededor de 0,5 mg/ml, 0,1 mg/ml a alrededor de 0,4 mg/ml, 0,1 mg/ml a alrededor de 0,3 mg/ml, 0,1 mg/ml a alrededor de 0,2 mg/ml, 0,25 mg/ml a alrededor de 0,95 mg/ml, 0,25 mg/ml a alrededor de 0,85 mg/ml,

0,25 mg/ml a alrededor de 0,75 mg/ml, 0,25 mg/ml a alrededor de 0,65 mg/ml, 0,25 mg/ml a alrededor de 0,55 mg/ml, 0,25 mg/ml a alrededor de 0,45 mg/ml, 0,25 mg/ml a alrededor de 0,35 mg/ml, 0,5 mg/ml a alrededor de 1,0 mg/ml, 0,5 mg/ml a alrededor de 0,9 mg/ml, 0,5 mg/ml a alrededor de 0,8 mg/ml, 0,5 mg/ml a alrededor de 0,75 mg/ml, 0,5 mg/ml a alrededor de 0,7 mg/ml, 0,5 mg/ml a alrededor de 0,65 mg/ml, 0,5 mg/ml a alrededor de 0,6 mg/ml, 0,75 mg/ml a alrededor de 1,0 mg/ml, 0,75 mg/ml a alrededor de 0,95 mg/ml, 0,75 mg/ml a alrededor de 0,9 mg/ml y 0,75 mg/ml a alrededor de 0,85 mg/ml. En una forma de realización preferida, la composición inmunógena comprende un adyuvante a una concentración de alrededor de 0,25 mg/ml a alrededor de 0,75 mg/ml, y con máxima preferencia, alrededor de 0,5 mg/ml.

En una forma de realización preferida, el adyuvante es a base de aluminio a una concentración de alrededor de 0,5 mg/ml. En una forma de realización como tal, el adyuvante a base de aluminio es fosfato de aluminio o hidroxil fosfato de aluminio.

En una forma de realización, la composición inmunógena comprende un conjugado proteína-polisacárido como se describe en la presente, un amortiguador, un tensioactivo, un excipiente, y de manera opcional, un adyuvante, en donde la composición se amortigua a un pH de alrededor de 6,0 a alrededor de 7,0.

En una forma de realización como tal, la composición inmunógena comprende un conjugado proteína-polisacárido de GBS, un amortiguador, un tensioactivo, un excipiente, y de manera opcional, un adyuvante, en donde la composición se amortigua a un pH de alrededor de 6,0 a alrededor de 7,0, y en donde el polisacárido capsular tiene un nivel de ácido siálico mayor de alrededor de 60 %.

En una forma de realización particular, la composición inmunógena comprende un conjugado proteína-polisacárido de GBS, histidina, polisorbato 80, cloruro de sodio, y de manera opcional, fosfato de aluminio, en donde la composición se amortigua a un pH de alrededor de 6,0 a alrededor de 7,0, y en donde el polisacárido capsular tiene un nivel de ácido siálico mayor de alrededor de 60 %.

En una forma de realización preferida, la composición inmunógena comprende alrededor de 5 mcg/ml a alrededor de 50 mcg/ml de un conjugado proteína-polisacárido de GBS, alrededor de 10 mM a alrededor de 25 mM de histidina, alrededor de 0,01 % a alrededor de 0,03 % (v/p) de polisorbato 80, alrededor de 10 mM a alrededor de 250 mM de cloruro de sodio, y de manera opcional, alrededor de 0,25 mg/ml a alrededor de 0,75 mg/ml de aluminio como fosfato de aluminio, en donde el polisacárido capsular tiene un

nivel de ácido siálico mayor de alrededor de 60 %.

En una forma de realización como tal, la composición inmunógena comprende al menos dos conjugados proteína-polisacárido de GBS, un amortiguador, un tensioactivo, un excipiente, y de manera opcional, un adyuvante, en donde la composición se amortigua a un pH de alrededor de 6,0 a alrededor de 7,0, y en donde los conjugados comprenden polisacáridos capsulares de estreptococo grupo B (GBS) serotipo IV y al menos un serotipo adicional seleccionado del grupo que consiste en Ia, Ib, II, III, V, VI, VII, VIII y IX.

En una forma de realización particular, la composición inmunógena comprende al menos dos conjugados proteína-polisacárido de GBS, histidina, polisorbato 80, cloruro de sodio, y de manera opcional, fosfato de aluminio, en donde la composición se amortigua a un pH de alrededor de 6,0 a alrededor de 7,0, y en donde los conjugados comprenden polisacáridos capsulares de estreptococo grupo B (GBS) serotipo IV y al menos un serotipo adicional seleccionado del grupo que consiste en Ia, Ib, II, III, V, VI, VII, VIII y IX.

En una forma de realización preferida, la composición inmunógena comprende alrededor de 5 mcg/ml a alrededor de 50 mcg/ml de cada uno de al menos dos conjugados proteína-polisacárido de GBS, alrededor de 10 mM a alrededor de 25 mM de histidina, alrededor de 0,01 % a alrededor de 0,03 % (v/p) de polisorbato 80, alrededor de 10 mM a alrededor de 250 mM de cloruro de sodio, y de manera opcional, alrededor de 0,25 mg/ml a alrededor de 0,75 mg/ml de aluminio como fosfato de aluminio, en donde los conjugados comprenden polisacáridos capsulares de estreptococo grupo B (GBS) serotipo IV y al menos un serotipo adicional seleccionado del grupo que consiste en Ia, Ib, II, III, V, VI, VII, VIII y IX.

Evaluación de composiciones inmunógenas

Se usan diversas pruebas *in vitro* para evaluar la inmunogenicidad de las composiciones inmunógenas de la invención. Por ejemplo, un ensayo opsonico *in vitro* se lleva a cabo incubando una mezcla de células estreptocócicas, suero inactivado por calor que contiene anticuerpos específicos contra los antígenos en cuestión y una fuente exógena de complemento. La opsonofagocitosis se realiza durante la incubación de leucocitos polimorfonucleares (PMN) recientemente aislados o células efectoras diferenciadas, tales como HL60, y la mezcla de células de anticuerpo/complemento/estreptococo. Las células bacterianas que están recubiertas con el anticuerpo y el complemento se inactivan durante la opsonofagocitosis. Las unidades formadoras de colonias (cfu) de las bacterias sobrevivientes que se recuperan de la

opsonofagocitosis se determinan colocando la mezcla del ensayo en una placa. Los títulos se informan como valores recíprocos de la mayor dilución que produce 50 % de la inactivación bacteriana, según se determina mediante la comparación con controles de ensayo.

También se puede usar un ensayo celular ELISA para evaluar la inmunogenicidad *in vitro* y la exposición en la superficie del antígeno, en donde la cepa bacteriana de interés (*S. agalactiae*) se recubre en una placa, tal como una placa de 96 cavidades, y el suero de prueba de un animal inmunizado se hacen reaccionar con las células bacterianas. Si un anticuerpo específico contra el antígeno de prueba reacciona con un epítipo expuesto en la superficie del antígeno, este se puede detectar mediante métodos estándares conocidos por la persona del oficio de nivel medio. En consecuencia, se puede usar citometría de flujo para medir la exposición en la superficie de antígenos del polisacárido capsular y la especificidad de los anticuerpos, que incluyen anticuerpos monoclonales.

Un antígeno que demuestra la actividad *in vitro* deseada luego se puede evaluar en un modelo de exposición *in vivo* de animal. En algunas formas de realización, las composiciones inmunógenas se usan en la inmunización de un animal (por ejemplo, un ratón) mediante métodos y vías de inmunización conocidos por las personas del oficio de nivel medio (por ejemplo, intranasal, parenteral, oral, rectal, vaginal, transdérmica, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, etc.). Después de la inmunización del animal con una composición inmunógena de GBS, el animal se expone a una cepa de *Streptococcus agalactiae* y se evalúa para determinar su resistencia a la infección estreptocócica.

En una forma de realización, los ratones libres de patógenos se inmunizan y se exponen a *S. agalactiae*. Por ejemplo, los ratones se inmunizan con una o más dosis del antígeno deseado en una composición inmunógena. Luego, los ratones se exponen a *S. agalactiae*, y la supervivencia se controla a lo largo del tiempo después de la exposición.

Métodos de uso

Como se usa en la presente, "inmunocomprometido" se refiere a un sujeto que tiene una deficiencia con respecto al brazo celular y/o humoral del sistema inmunitario. En consecuencia, se contempla el alcance de la deficiencia en la función inmunitaria que varía de insuficiencia leve en el proceso inmunitario a inmunodepresión completa.

El término "sujeto" se refiere a un mamífero, ave, pez, reptil o cualquier otro animal. El término "sujeto" también incluye seres humanos. El término "sujeto" también incluye mascotas. Los ejemplos no limitativos de mascotas incluyen: perros, gatos, cerdos, conejos,

ratas, ratones, jerbos, hámsteres, conejillos de Indias, hurones, aves, serpientes, lagartos, peces, tortugas y ranas. El término "sujeto" también incluye animales de ganado. Los ejemplos no limitativos de animales de ganado incluyen: alpaca, bisonte, camellos, vacas, ciervos, cerdos, caballos, llamas, mulas, asnos, ovejas, cabras, conejos, renos, yaks, gallinas, gansos y pavos.

Como se usa en la presente, "tratamiento" (que incluye variaciones de este, por ejemplo, "tratar" o "tratado") se refiere a uno o más de los siguientes: (i) la prevención de la infección o de la reinfección, como en una vacuna tradicional, (ii) la reducción de la gravedad de los síntomas o su eliminación, y (iii) la eliminación sustancial o completa del patógeno o trastorno en cuestión. Por ende, el tratamiento puede realizarse profilácticamente (antes de la infección) o terapéuticamente (después de la infección). En la presente invención, se pueden usar tratamientos profilácticos o terapéuticos. De acuerdo con una forma de realización particular de la presente invención, se proporcionan composiciones y métodos para tratar, lo que incluye inmunizar profiláctica y/o terapéuticamente, a un animal huésped contra la infección microbiana (por ejemplo, una bacteria, tal como *S. agalactiae*). Los métodos de la presente invención son útiles para conferir inmunidad profiláctica y/o terapéutica a un sujeto. Los métodos de la presente invención también se pueden practicar en sujetos para aplicaciones de investigación biomédica.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para inducir una respuesta inmunitaria contra GBS en un sujeto mediante la administración al sujeto de una cantidad eficaz de una composición inmunógena descrita en la presente. En una forma de realización, la invención se refiere a un método para prevenir o reducir una enfermedad o afección asociada al estreptococo grupo B en un sujeto mediante la administración al sujeto de una cantidad eficaz de la composición inmunógena descrita en la presente. En un aspecto, la invención se refiere a la composición inmunógena descrita en la presente para usar como medicamento. En un aspecto, la invención se refiere a la composición inmunógena descrita en la presente para usar en un método para inducir una respuesta inmunitaria contra GBS en un sujeto. En una forma de realización particular, el sujeto es una hembra que planea quedar preñada o una hembra preñada. En una forma de realización como tal, la hembra preñada se encuentra en el tercer trimestre/la segunda mitad de la preñez, por ejemplo, al menos en la semana 20 o al menos en la semana 27 de gestación. En una forma de realización preferida, la hembra preñada se encuentra en la

semana 27 a 36 de gestación. En otra forma de realización, el sujeto es un adulto mayor, por ejemplo, un adulto de 50 años o más, 65 años o más, y 85 años o más. En otra forma de realización, el sujeto está inmunodeprimido. En un aspecto, el sujeto puede tener una afección seleccionada del grupo que consiste en obesidad, diabetes, infección por VIH, cáncer, enfermedad cardiovascular o enfermedad hepática. En una forma de realización preferida, el estreptococo grupo B es *S. agalactiae*.

En una forma de realización, la composición inmunógena comprende conjugados proteína-polisacárido que comprenden GBS serotipo IV y al menos un serotipo adicional seleccionado del grupo que consiste en los serotipos Ia, Ib, II, III, V, VI, VII, VIII y IX. En otra forma de realización, los conjugados comprenden GBS serotipo IV y al menos dos serotipos adicionales seleccionados del grupo que consiste en los serotipos Ia, Ib, II, III, V, VI, VII, VIII y IX. En una forma de realización adicional, los conjugados comprenden GBS serotipo IV y al menos tres serotipos adicionales seleccionados del grupo que consiste en los serotipos Ia, Ib, II, III, V, VI, VII, VIII y IX. Aun en otra forma de realización, los conjugados comprenden GBS serotipo IV y al menos cuatro serotipos adicionales seleccionados del grupo que consiste en los serotipos Ia, Ib, II, III, V, VI, VII, VIII y IX. En una forma de realización particular, los conjugados comprenden los serotipos Ia, Ib, II, III y IV de GBS. En otra forma de realización, los conjugados comprenden GBS serotipo IV y al menos cinco serotipos adicionales seleccionados del grupo que consiste en los serotipos Ia, Ib, II, III, V, VI, VII, VIII y IX. En otra forma de realización, la composición comprende GBS serotipo V. En una forma de realización particular, los conjugados comprenden los serotipos Ia, Ib, II, III y V de GBS. En una forma de realización preferida, la composición inmunógena comprende seis conjugados proteína-polisacárido de los serotipos Ia, Ib, II, III, IV y V de GBS. Un aspecto de la invención se refiere a una composición inmunógena que no tiene interferencia inmunitaria.

Una cantidad inmunógena o eficaz de una composición inmunógena se puede determinar mediante un estudio de respuesta a la dosis en el cual los sujetos se inmunizan con cantidades de crecimiento gradual de la composición inmunógena y se analiza la respuesta inmunitaria para determinar la dosis óptima. Los puntos de partida para el estudio se pueden inferir de los datos de inmunización en los modelos de animales. La cantidad de dosis puede variar según las condiciones específicas del individuo. La cantidad se puede determinar en ensayos de rutina por medios conocidos por las personas del oficio de nivel medio.

Una cantidad inmunológicamente eficaz de la composición inmunógena en una cantidad adecuada de dosis se administra al sujeto para provocar una respuesta inmunitaria. La cantidad de dosis puede variar según las condiciones específicas del individuo, tales como la edad y el peso. Esta cantidad se puede determinar en ensayos de rutina por medios conocidos por las personas del oficio de nivel medio.

En una forma de realización, los pacientes a los que se administran composiciones inmunógenas de la invención muestran una reducción de los índices de portación de *S. agalactiae*. Esta reducción de la portación o un intervalo de tiempo prolongado que pasa como no portador después de la administración de una composición inmunógena es significativa desde una perspectiva de necesidad médica. Por ejemplo, la reducción de la portación de *S. agalactiae* total en los portadores se puede evaluar después de una dosis de la composición inmunógena de la invención. Por ejemplo, 1 día antes de la administración de la composición inmunógena, un grupo de adultos de 18-50 años de edad se puede cribar para identificar la portación mediante hisopados nasales, faríngeas, axilares, rectales, perineales y vaginales, y luego el cultivo para determinar el estado de portación. Luego, se puede administrar al grupo una composición inmunógena de la invención con un grupo que recibe un control. Los hisopados nasales, faríngeos, axilares, rectales, perineales y vaginales, que se realizan semanalmente durante un período de 12 semanas y mensualmente hasta 6 meses después de la administración de la composición inmunógena, se realizan y se comparan con el placebo. Un criterio principal de valoración es comparar los índices de portación en pacientes después de la administración de una composición inmunógena con respecto al placebo en intervalos de 3 meses después de la inmunización.

Anticuerpos

Un “anticuerpo” es una molécula de inmunoglobulina capaz de fijarse específicamente a una diana, tal como un hidrato de carbono, polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., mediante al menos un sitio de reconocimiento de antígenos ubicado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se usa en la presente, a menos que el contexto indique lo contrario, el término pretende abarcar no solo anticuerpos policlonales o monoclonales intactos, sino también anticuerpos modificados por ingeniería genética (por ejemplo, quiméricos, humanizados y/o derivatizados para alterar las funciones efectoras, la estabilidad y otras actividades biológicas) y fragmentos de aquellos (tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), anticuerpos monocatenarios (ScFv) y de dominio, que

incluyen anticuerpos de tiburón y de camélidos, y proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada) y fragmentos de anticuerpos, como se describen en la presente, y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de antígenos. Un anticuerpo incluye un anticuerpo de cualquier clase, tal como IgG, IgA o IgM (o una subclase de estos), y no es necesario que el anticuerpo sea de una clase en particular. Según la secuencia de aminoácidos del anticuerpo del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir a su vez en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2 en seres humanos. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa, delta, épsilon, gamma y mi, respectivamente. Se conocen las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas.

La expresión "fragmentos de anticuerpo" comprende solo una porción de un anticuerpo intacto, en donde la porción preferentemente retiene al menos una, preferentemente, la mayoría o todas las funciones que, en general, se asocian asociadas a tal porción cuando está presente en un anticuerpo intacto.

Como se usan en la presente, "actividad funcional" de un anticuerpo o "anticuerpo funcional" se refieren a un anticuerpo que, como mínimo, se puede fijar específicamente a un antígeno. Las funciones adicionales se conocen en el estado de la técnica y pueden incluir componentes adicionales del sistema inmunitario que producen la depuración o inactivación del patógeno, por ejemplo, mediante opsonización, ADCC o citotoxicidad mediada por el complemento. Después de la fijación al antígeno, cualquier función del anticuerpo posterior se puede mediar a través de la región Fc del anticuerpo. El ensayo de opsonofagocitosis (OPA) con anticuerpos es un ensayo *in vitro* diseñado para medir la inactivación asistida por el complemento Ig *in vitro* de bacterias con células efectoras (glóbulos blancos), y de esta manera, imita un proceso biológico. La fijación del anticuerpo también puede inhibir directamente la función biológica del antígeno al que se fija. En algunas formas de realización, un "anticuerpo funcional" se refiere a un anticuerpo que es funcional según se mide mediante la inactivación de bacterias en un modelo de eficacia en animales o un ensayo de inactivación opsonofagocítico que demuestra que los anticuerpos

inactivan las bacterias.

En un aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo aislado, o un fragmento de este, que se fija específicamente a un polisacárido descrito en la presente. Como se usa en la presente, un anticuerpo “aislado” se refiere a un anticuerpo que fue identificado y separado, y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con usos terapéuticos o de diagnóstico para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En formas de realización de ejemplo, el anticuerpo se purificará (1) hasta obtener más de 95 % en peso de anticuerpo según se determina mediante el método de Lowry y, con máxima preferencia, más de 99 % en peso, (2) en la medida suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos interna o del terminal N mediante el uso de un secuenciador de taza giratoria, o (3) hasta alcanzar homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción de plata. Un anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de las células recombinantes, ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Sin embargo, en general, un anticuerpo aislado se puede preparar mediante al menos una etapa de purificación.

Un anticuerpo que “se fija específicamente a” o es “específico contra” un polisacárido particular o un epítipo en un polisacárido particular es aquel que se fija a ese polisacárido particular o epítipo en un polisacárido particular sin fijarse sustancialmente a ningún otro polisacárido o epítipo de polisacárido.

Cuando se usa en la presente, la palabra “etiqueta” se refiere a un compuesto o una composición detectables que se conjugan directa o indirectamente con el anticuerpo para generar un anticuerpo “etiquetado”. La etiqueta puede ser detectable por sí misma (por ejemplo, etiquetas de radioisótopos o etiquetas fluorescentes) o, en el caso de una etiqueta enzimática, puede catalizar la alteración química de un compuesto o una composición de sustrato que es detectable.

La invención también proporciona anticuerpos y composiciones de anticuerpos que se fijan de manera específica y selectiva a uno o más antígenos de una composición inmunógena de la presente invención. En algunas formas de realización, los anticuerpos se generan después de administrarle a un sujeto una composición inmunógena de la presente invención. En algunas formas de realización, la invención provee anticuerpos purificados o

aislados dirigidos contra uno o más de los antígenos de una composición inmunógena de la presente invención. En algunas formas de realización, los anticuerpos de la presente invención son funcionales según se mide mediante la inactivación de bacterias en un modelo de eficacia animal o mediante un ensayo de inactivación opsonofagocítico. En algunas formas de realización, los anticuerpos de la invención confieren inmunidad pasiva a un sujeto. La presente invención también proporciona moléculas de polinucleótidos que codifican un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención, y una célula o línea celular (tal como células de hibridoma u otras líneas celulares modificadas por ingeniería genética para la producción recombinante de anticuerpos) y un animal transgénico que produce un anticuerpo o composición de anticuerpo de la invención, usando técnicas conocidas por las personas del oficio de nivel medio.

Los anticuerpos o las composiciones de anticuerpos de la invención se pueden usar en un método para tratar o prevenir una infección, enfermedad o afección estreptocócicas asociadas a *S. agalactiae* en un sujeto, en donde el método comprende generar una preparación de anticuerpos policlonales o monoclonales y usar dicho anticuerpo o composición de anticuerpos para conferir inmunidad pasiva al sujeto. Los anticuerpos de la invención también pueden ser útiles para métodos de diagnóstico, por ejemplo, para detectar la presencia de uno o más antígenos de las composiciones inmunógenas de la presente invención, o para cuantificar sus niveles.

Las respuestas del anticuerpo a las estructuras de repetición, tales como un polisacárido de la presente invención, pueden presentar algunas características únicas. Por ejemplo, la regularidad de las unidades de repetición puede significar que las moléculas de antígeno de pesos moleculares muy diferentes se pueden fijar a anticuerpos específicos contra el polisacárido. En segundo lugar, las estructuras de repetición de los polisacáridos de mayor longitud son capaces de inducir respuestas del anticuerpo independientes de los linfocitos T. Por ende, cuando se usan polisacáridos conjugados con portadores de proteínas que tienen epítopos colaboradores de linfocitos T, se pueden estimular respuestas del anticuerpo independientes de linfocitos T y dependientes de linfocitos T. Por lo tanto, la respuesta inmunitaria se puede modificar mediante la selección adecuada del tamaño de polisacárido y según se use o no una proteína portadora.

Anticuerpos policlonales

En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-polisacárido es un anticuerpo policlonal. Los anticuerpos policlonales, como se definen en la presente, se refieren a una

mezcla de anticuerpos que tienen especificidades diferentes derivadas de una preparación de suero y que se originan de clones de linfocitos B diferentes. La preparación y caracterización de anticuerpos policlonales se conocen en el estado de la técnica.

Los anticuerpos policlonales se generan en un sujeto, por ejemplo, en un mamífero, mediante la administración de una o más inyecciones de un inmunógeno o una composición inmunógena descritos en la presente y, si se desea, un adyuvante, un amortiguador y/o un diluyente. Se pueden usar diversas especies de animales para la producción de antisueros específicos. En general, un animal que se usa para la producción de antisuero policlonal anti-sacárido es un primate no humano, una cabra, una oveja, un conejo, un ratón, una rata, un hámster o un conejillo de Indias. En general, el inmunógeno o la composición inmunógena con o sin el adyuvante se inyecta en el mamífero mediante múltiples inyecciones. El material inmunógeno puede incluir un polisacárido, oligosacárido, polisacárido, conjugado proteína-polisacárido descritos en la presente, o un conjunto más grande de inmunógenos. Generalmente, a partir de 2-6 semanas después de la primera inmunización, la sangre se recolecta del animal inmunizado, se deja coagular, y el suero se recolecta. El suero contiene los anticuerpos policlonales anti-sacárido del animal inmunizado y, con frecuencia, se denomina antisuero.

Anticuerpos monoclonales

Un anticuerpo monoclonal anti-sacárido se puede preparar mediante el uso de técnicas de hibridomas conocidas. En general, la preparación de anticuerpos monoclonales implica, en primer lugar, inmunizar un huésped animal diana adecuado con un inmunógeno seleccionado que comprende un polisacárido, oligosacárido, polisacárido o conjugado proteína-polisacárido de la presente invención. Si se desea, se pueden incluir un adyuvante, un amortiguador y/o diluyentes. La inmunización se lleva a cabo de manera suficiente para hacer que los linfocitos B produzcan o expresen anticuerpos que se fijan específicamente al polisacárido o a un conjugado de este. De manera alternativa, los linfocitos se inmunizan *in vitro*.

Los linfocitos luego se fusionan con una línea celular inmortalizada usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma. La fuente de los linfocitos determina si los anticuerpos monoclonales son de origen humano o animal. En general, se usan linfocitos de sangre periférica ("PBL") si se desean los anticuerpos y las células de origen humano, y se usan células de bazo o células de nódulos linfáticos si no se desean fuentes de mamíferos no humanos.

Las líneas celulares immortalizadas, en general, se transforman en células de mamíferos, en particular, células de mieloma de origen roedor, bovino y humano. En general, se usan líneas celulares de mieloma de rata o ratón. Las células de hibridoma se cultivan en un medio de cultivo adecuado que contiene, preferentemente, una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células immortalizadas no fusionadas. Por ejemplo, si las células de origen carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas generalmente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio de HAT"), sustancias que previenen el crecimiento de las células deficientes en HGPRT.

Las líneas celulares immortalizadas se eligen para consideraciones prácticas, tales como especies de características de origen, fusión y crecimiento. Por ejemplo, las líneas celulares immortalizadas adecuadas son aquellas que se fusionan de manera eficaz, respaldan la expresión estable de nivel alto del anticuerpo mediante la selección de células que producen anticuerpos, y son sensibles a un medio, tal como un medio de HAT. Algunos ejemplos de líneas celulares immortalizadas incluyen: líneas de mieloma murino. Las líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-ser humano también se describieron para la producción de anticuerpos monoclonales humanos.

Las células de hibridoma secretan el anticuerpo monoclonal en el medio de cultivo. El medio de cultivo luego se somete a un ensayo para identificar la presencia de anticuerpos monoclonales que reconocen y se fijan al polisacárido. La especificidad de fijación anti-polisacárido de anticuerpos monoclonales particulares producidos por las células de hibridoma se determina mediante uno de los numerosos procedimientos que se conocen en el estado de la técnica. Por ejemplo, la especificidad de fijación del anticuerpo se puede determinar mediante inmunoprecipitación, radioinmunoensayo (RIA), transferencia western, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o resonancia de plasmones superficiales (por ejemplo, Biacore). El epítipo preciso reconocido por el anticuerpo monoclonal se determina mediante mapeo de epítopos. Tales técnicas y ensayos se conocen en el estado de la técnica.

Después de que se identifican las células de hibridoma que producen anticuerpos con la especificidad deseada, los clones se subclonan mediante disolución limitada y se cultivan usando métodos estándares. Los medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, medio Eagle modificado de Dulbecco y medio RPMI-1640. De manera alternativa, las células de hibridoma se cultivan *in vivo* como ascitis en un mamífero.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se aíslan o se purifican del medio de cultivo o fluido de ascitis mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulina, tales como proteína A-sepharose, cromatografía con hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía por afinidad.

De manera alternativa, los anticuerpos que tienen la especificidad deseada y de la especie de origen deseada se pueden obtener mediante el uso de colecciones de expresión en fagos. Además, se pueden encontrar ejemplos de métodos y reactivos particularmente dispuestos a usarse para generar y cribar colecciones de expresión de anticuerpos en el estado de la técnica.

Usos de los anticuerpos

En un aspecto, la invención se refiere al uso de una composición inmunógena descrita en la presente para producir un anticuerpo y/o fragmento de anticuerpo de GBS. Los conjugados proteína-polisacárido descritos en la presente y/o los anticuerpos generados de estos se pueden usar en varias técnicas de inmunodiagnóstico conocidas por las personas del oficio de nivel medio, que incluyen tecnologías relacionadas a ELISA y micromatrices. Además, estos reactivos se pueden usar para evaluar las respuestas del anticuerpo, que incluyen niveles de anticuerpo en suero, por ejemplo, a conjugados de polisacáridos inmunógenos. Las metodologías de ensayo de la invención pueden implicar el uso de etiquetas, tales como etiquetas fluorescentes, quimioluminiscentes, radioactivas, enzimáticas o moléculas de tinción, y/o reactivos inmunitarios secundarios para la detección directa o indirecta de un complejo entre un antígeno o anticuerpo en una muestra biológica y un anticuerpo o antígeno correspondiente unido a un soporte sólido.

El anticuerpo o fragmento de anticuerpo producido también puede ser útil en la inmunoterapia pasiva o para la profilaxis contra una infección estreptocócica.

Método de producción de un polisacárido

Aun en otro aspecto, la invención se refiere a un método para producir los polisacáridos descritos en la presente. El método incluye cultivar un GBS y recolectar el polisacárido producido por la bacteria. En una forma de realización, el GBS incluye *S. agalactiae*. La bacteria puede ser cualquier cepa de *S. agalactiae*. En una forma de realización preferida, la bacteria es una cepa encapsulada de *S. agalactiae*. Las cepas de *S. agalactiae* para usar en la presente invención incluyen 090, A909 (N.º de acceso a ATCC BAA-1138), 515 (N.º de acceso a ATCC BAA-1177), B523, CJB524, MB 4052 (N.º de acceso a ATCC 31574), H36B (N.º de acceso a ATCC 12401), S40, S42, MB 4053 (N.º de

acceso a ATCC 31575), M709, 133, 7357, PFEGBST0267, MB 4055 (N.º de acceso a ATCC 31576), 18RS21 (N.º de acceso a ATCC BAA-1175), S16, S20, V8 (N.º de acceso a ATCC 12973), DK21, DK23, UAB, 5401, PFEGBST0708, MB 4082 (N.º de acceso a ATCC 31577), M132, 110, M781 (N.º de acceso a ATCC BAA-22), D136C(3) (N.º de acceso a ATCC 12403), M782, S23, 120, MB 4316 (M-732; N.º de acceso a ATCC 31475), M132, K79, COH1 (N.º de acceso a ATCC BAA-1176), PFEGBST0563, 3139 (N.º de acceso a ATCC 49446), CZ-NI-016, PFEGBST0961, 1169-NT1, CJB111 (N.º de acceso a ATCC BAA-23), CJB112, 2603 V/R (N.º de acceso a ATCC BAA-611), NCTC 10/81, CJ11, PFEGBST0837, 118754, 114852, 114862, 114866, 118775, B 4589, B 4645, SS1214, CZ-PW-119, 7271, CZ-PW-045, JM9130013, JM9130672, IT-NI-016, IT-PW-62 y IT-PW-64.

Un polisacárido descrito en la presente se puede producir cultivando el GBS en un medio adecuado. Un medio adecuado puede incluir el cultivo Columbia. El medio puede incluir dextrosa, hemina y/o glucosa. Preferentemente, el medio incluye el cultivo Columbia y dextrosa. Si *S. agalactiae* se cultiva usando el cultivo Columbia y dextrosa, preferentemente, la temperatura para el cultivo es de 20 a 40 °C, preferentemente, 37 °C. En una forma de realización preferida, la bacteria se cultiva en condiciones aeróbicas. En otra forma de realización preferida, la bacteria se cultiva durante 12 a 60 horas.

Un polisacárido se puede recolectar del cultivo obtenido mediante un método conocido en el estado de la técnica para recolectar una sustancia diana de un cultivo, tal como calentamiento, tratamiento con enzimas, centrifugación, precipitación, tratamiento con carbón activado y/o filtración. (Véanse, por ejemplo, las publicaciones de las solicitudes de patente estadounidense N.ºs 2006/0228380, 2006/0228381, 2007/0184071, 2007/0184072, 2007/0231340 y 2008/0102498; la publicación de la solicitud de patente internacional N.º WO 2008/118752). En una forma de realización, el cultivo que contiene la bacteria y el polisacárido se centrifuga y se trata con una enzima, tal como lisozima, RNasa, DNasa, Pronasa, mutanolisina y combinaciones de estas. Por ejemplo, en una forma de realización, un solvente orgánico adecuado se agrega al sobrenadante obtenido para precipitar proteínas, y el precipitado se retira mediante centrifugación. Luego se puede precipitar un polisacárido agregando adicionalmente un solvente orgánico adecuado al sobrenadante, y el polisacárido se puede recolectar mediante centrifugación. Más específicamente, un polisacárido descrito en la presente se puede obtener agregando etanol en una concentración final de alrededor de 25 % de volumen al sobrenadante del cual se retiró la bacteria, retirando una precipitación que contiene proteína mediante

centrifugación, agregando más etanol en una concentración final de alrededor de 75 % de volumen a este, y luego recolectando un precipitado mediante centrifugación. El precipitado resultante se puede secar con nitrógeno. El precipitado resultante se puede volver a suspender en Tris y 0,05 % de azida de Na.

Otro aspecto de la invención proporciona un método novedoso, que usa reactivos orgánicos, tales como compuestos de hidroxilamina derivatizados, para el aislamiento de CP de alto peso molecular en gran medida intactos, y a la vez, preserva los grupos N- y O-acetilo. Dado que este método no lisa las células, los CP aislados mediante centrifugación se contaminan mínimamente con componentes intracelulares y pueden producir un mayor rendimiento general. Asimismo, estos reactivos escinden la impureza del antígeno de grupo B a fragmentos muy pequeños debido a sus múltiples enlaces de fosfodiéster, que se pueden eliminar con facilidad mediante diafiltración.

En una forma de realización, el CP se aísla haciendo reaccionar una hidroxilamina con una pasta celular que comprende una bacteria productora de polisacárido capsular. En una forma de realización particular, el método también comprende la etapa de centrifugación. En otra forma de realización, el método también comprende la etapa de filtración. Aun en otra forma de realización, la bacteria productora de polisacárido capsular se selecciona del grupo que consiste en *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria meningitidis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis*.

En un aspecto de la invención, la hidroxilamina puede ser de aquellas que se enumeran en la Tabla 2 en el Ejemplo 2. En una forma de realización preferida, la hidroxilamina se selecciona del grupo que consiste en dibencil hidroxilamina; dietil hidroxilamina; hidroxilamina; etilendiamina; trietilentetramina; 1,1,4,7,10,10 hexametil trietilentetramina; y 2,6,10,trimetil 2,6,10 triazaundecano.

En un aspecto de la invención, la concentración de hidroxilamina es de alrededor de 5 mM a alrededor de 200 mM, por ejemplo, alrededor de 5 mM a alrededor de 150 mM, alrededor de 5 mM a alrededor de 100 mM, alrededor de 5 mM a alrededor de 75 mM, alrededor de 5 mM a alrededor de 50 mM, alrededor de 5 mM a alrededor de 25 mM, alrededor de 5 mM a alrededor de 10 mM, 10 mM a alrededor de 200 mM, por ejemplo, alrededor de 10 mM a alrededor de 150 mM, alrededor de 10 mM a alrededor de 100 mM, alrededor de 10 mM a alrededor de 75 mM, alrededor de 10 mM a alrededor de 50 mM,

alrededor de 10 mM a alrededor de 25 mM, alrededor de 25 mM a alrededor de 200 mM, alrededor de 25 mM a alrededor de 150 mM, alrededor de 25 mM a alrededor de 100 mM, alrededor de 25 mM a alrededor de 75 mM, alrededor de 25 mM a alrededor de 50 mM, alrededor de 50 mM a alrededor de 200 mM, alrededor de 50 mM a alrededor de 150 mM, 50 mM a alrededor de 100 mM y alrededor de 50 mM a alrededor de 75 mM.

En otro aspecto, el pH de la reacción se mantiene de alrededor de 5,5 a alrededor de 9,5, por ejemplo, alrededor de 5,5 a alrededor de 9,0, alrededor de 5,5 a alrededor de 8,5, alrededor de 5,5 a alrededor de 8,0, alrededor de 5,5 a alrededor de 7,5, alrededor de 5,5 a alrededor de 7,0, alrededor de 5,5 a alrededor de 6,5, alrededor de 6,0 a alrededor de 9,5, alrededor de 6,0 a alrededor de 9,0, alrededor de 6,0 a alrededor de 8,5, alrededor de 6,0 a alrededor de 8,0, alrededor de 6,0 a alrededor de 7,5, alrededor de 6,0 a alrededor de 7,0, alrededor de 6,5 a alrededor de 9,5, alrededor de 6,5 a alrededor de 8,5, alrededor de 6,5 a alrededor de 8,0, alrededor de 6,5 a alrededor de 7,5, alrededor de 7,0 a alrededor de 9,5, alrededor de 7,0 a alrededor de 9,0, 7,0 a alrededor de 8,5 y alrededor de 7,0 a alrededor de 8,0.

En otro aspecto de la invención, la reacción se realiza a una temperatura de alrededor de 20 °C a alrededor de 85 °C, por ejemplo, alrededor de 20 °C a alrededor de 80 °C, alrededor de 20 °C a alrededor de 75 °C, alrededor de 20 °C a alrededor de 70 °C, alrededor de 20 °C a alrededor de 65 °C, alrededor de 20 °C a alrededor de 60 °C, alrededor de 20 °C a alrededor de 55 °C, alrededor de 20 °C a alrededor de 50 °C, alrededor de 25 °C a alrededor de 85 °C, alrededor de 25 °C a alrededor de 80 °C, alrededor de 25 °C a alrededor de 75 °C, alrededor de 25 °C a alrededor de 70 °C, alrededor de 25 °C a alrededor de 65 °C, alrededor de 25 °C a alrededor de 60 °C, alrededor de 25 °C a alrededor de 55 °C, alrededor de 25 °C a alrededor de 50 °C, alrededor de 30 °C a alrededor de 85 °C, alrededor de 30 °C a alrededor de 80 °C, alrededor de 30 °C a alrededor de 75 °C, alrededor de 30 °C a alrededor de 70 °C, alrededor de 30 °C a alrededor de 65 °C, alrededor de 30 °C a alrededor de 60 °C, alrededor de 30 °C a alrededor de 55 °C, alrededor de 30 °C a alrededor de 50 °C, alrededor de 35 °C a alrededor de 85 °C, alrededor de 35 °C a alrededor de 80 °C, alrededor de 35 °C a alrededor de 75 °C, alrededor de 35 °C a alrededor de 70 °C, alrededor de 35 °C a alrededor de 65 °C, alrededor de 35 °C a alrededor de 60 °C, alrededor de 35 °C a alrededor de 55 °C, alrededor de 40 °C a alrededor de 85 °C, alrededor de 40 °C a alrededor de 80 °C, alrededor de 40 °C a alrededor de 75 °C, alrededor de 40 °C a alrededor de 70 °C, alrededor de 40 °C a alrededor de 65 °C, alrededor de 40 °C a

alrededor de 60 °C, alrededor de 45 °C a alrededor de 85 °C, alrededor de 45 °C a alrededor de 80 °C, alrededor de 45 °C a alrededor de 75 °C, alrededor de 45 °C a alrededor de 70 °C, alrededor de 45 °C a alrededor de 65 °C, alrededor de 50 °C a alrededor de 85 °C, alrededor de 50 °C a alrededor de 80 °C, alrededor de 50 °C a alrededor de 75 °C, alrededor de 50 °C a alrededor de 70 °C, alrededor de 55 °C a alrededor de 85 °C, alrededor de 55 °C a alrededor de 80 °C, alrededor de 55 °C a alrededor de 75 °C, alrededor de 60 °C a alrededor de 85 °C y alrededor de 65 °C a alrededor de 85 °C.

Aun en otro aspecto, el tiempo de reacción es de alrededor de 10 horas a alrededor de 90 horas, por ejemplo, alrededor de 10 horas a alrededor de 85 horas, alrededor de 10 horas a alrededor de 80 horas, alrededor de 10 horas a alrededor de 75 horas, alrededor de 10 horas a alrededor de 70 horas, alrededor de 10 horas a alrededor de 60 horas, alrededor de 10 horas a alrededor de 50 horas, alrededor de 10 horas a alrededor de 40 horas, alrededor de 10 horas a alrededor de 30 horas, alrededor de 10 horas a alrededor de 25 horas, alrededor de 10 horas a alrededor de 20 horas, alrededor de 10 horas a alrededor de 15 horas, alrededor de 15 horas a alrededor de 90 horas, alrededor de 15 horas a alrededor de 85 horas, alrededor de 15 horas a alrededor de 80 horas, alrededor de 15 horas a alrededor de 75 horas, alrededor de 15 horas a alrededor de 70 horas, alrededor de 15 horas a alrededor de 60 horas, alrededor de 15 horas a alrededor de 50 horas, alrededor de 15 horas a alrededor de 40 horas, alrededor de 15 horas a alrededor de 30 horas, 15 horas a alrededor de 20 horas, por ejemplo, alrededor de 20 horas a alrededor de 90 horas, alrededor de 20 horas a alrededor de 85 horas, alrededor de 20 horas a alrededor de 80 horas, alrededor de 20 horas a alrededor de 75 horas, alrededor de 20 horas a alrededor de 70 horas, alrededor de 20 horas a alrededor de 60 horas, alrededor de 20 horas a alrededor de 50 horas, alrededor de 20 horas a alrededor de 40 horas, alrededor de 20 horas a alrededor de 30 horas y alrededor de 20 horas a alrededor de 25 horas.

De manera alternativa, en otra forma de realización de la invención, el polisacárido se sintetiza químicamente. El polisacárido se puede sintetizar químicamente de acuerdo con métodos convencionales.

Aun en otra forma de realización de la invención, el polisacárido se prepara mediante la expresión en un huésped sustituto después de clonar y expresar una vía biosintética para producir el polisacárido. Por ejemplo, una célula huésped se puede modificar para producir un polisacárido que tiene similitud estructural a un polisacárido descrito en la presente, en

donde una unidad de repetición del polisacárido producido en la célula huésped es parcialmente idéntica a una unidad de repetición de un polisacárido descrito en la presente. Un polisacárido es estructuralmente similar a un polisacárido descrito en la presente si, por ejemplo, una unidad de repetición del polisacárido tiene una rama faltante, es heterogénea en cuanto a tamaño y/o es heterogénea en cuanto a la disposición de las ramificaciones, en comparación con una unidad de repetición de un polisacárido descrito en la presente. Preferentemente, la célula huésped es una célula huésped bacteriana.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos demuestran algunas formas de realización de la presente invención. Sin embargo, cabe destacar que estos ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser completamente definitivos con respecto a las condiciones y al alcance de la presente invención. Se debería tener en cuenta cuando se proporcionan condiciones de reacción típicas (por ejemplo, temperatura, tiempos de reacción, etc.), las condiciones por encima y por debajo de los rangos especificados también se pueden usar, a pesar de que sea, por lo general, menos conveniente. Todas las partes y los porcentajes mencionados en la presente son en función del peso, y todas las temperaturas se expresan en grados centígrados a menos que se especifique lo contrario.

Además, los siguientes ejemplos se llevaron a cabo usando técnicas estándares, que son conocidas y rutinarias para las personas del oficio de nivel medio, excepto cuando se describa de otro modo en detalle. Como se indicó anteriormente, los siguientes ejemplos se presentan con fines ilustrativos, y no deben interpretarse de modo alguno como limitativos del alcance de la presente invención.

Ejemplo 1: Preparación de conjugados proteína-polisacárido con polisacáridos des-O-acetilados

Las cepas de *S. agalactiae* para los serotipos respectivos se fermentaron en cultivo sumergido con control de pH en un medio definido. Los procedimientos y medios usados se optimizaron mediante experimentación y fueron extensiones de técnicas básicas descritas previamente en von Hunolstein, C. et al., Appl. Micro. Biotech. 38(4):458-462 (1993). El polisacárido capsular se retiró de las células mediante tratamiento con NaOH. Después de la clarificación, una serie de etapas de UF/DF, precipitación y filtración de carbono produjo el polisacárido purificado. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense N.º 8.652.480. Se usó química de aminación reductora para conjugar el polisacárido activado con CRM₁₉₇. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense N.º 5.360.897.

Ejemplo 2. Aislamiento de polisacáridos O-acetilados

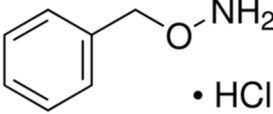
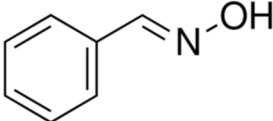
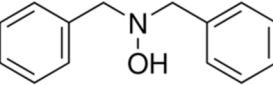
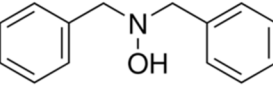
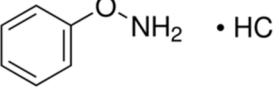
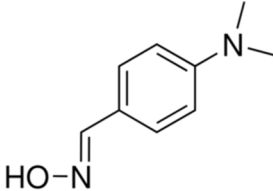
La pasta celular del polisacárido capsular (CP) de GBS serotipo la obtenida después de la termoinactivación y la centrifugación del cultivo de fermentación (1,2 l) se volvió a suspender en 175 ml de 25 mM de amortiguador de fosfato de potasio (25 mM, pH 6,9). La suspensión se mezcló con una solución acuosa de ácido hidroxilaminO-sulfónico a una concentración final de 10 mM. Se determinó que el pH de la suspensión era de alrededor de 5,8. La suspensión se agitó a 55 °C durante 72 horas. Luego, la suspensión se centrifugó a alrededor de 10.000 rpm, y el sobrenadante se recolectó. El sobrenadante que contenía los CP escindidos crudos se analizó para determinar el peso molecular y el rendimiento. La porción restante se sometió a purificación mediante diafiltración usando 30 kDa de membrana MWCO con agua para inyección (WFI). El polisacárido purificado se analizó adicionalmente para determinar el peso molecular mediante cromatografía de exclusión por tamaño combinada con detector de dispersión de luz láser multiángulo (SEC-MALS) (Tabla 1).

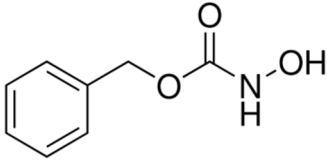
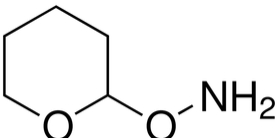
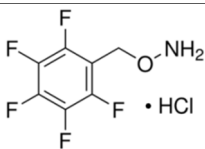
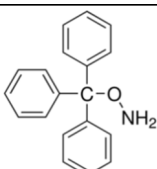
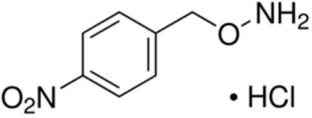
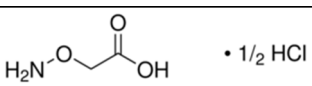
Tabla 1. Purificación de GBS serotipo la mediante diafiltración

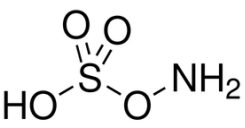
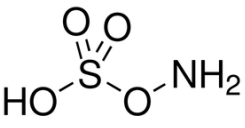
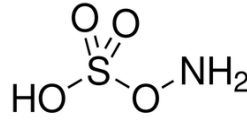
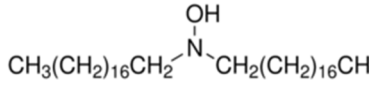
Muestra	Mw (kDa)	Polidispersidad (PD)
Crudo	340	1,2
Poli purificado	320	1,3

Diversas hidroxilaminas, compuestos sustituidos con nitrógeno y oxígeno, se cribaron para determinar su actividad usando el método descrito anteriormente. Los rendimientos se calcularon mediante cromatografía de penetración en gel combinada con detección de dispersión de luz multiángulo (GPC-MALS) de los sobrenadantes crudos usando la respuesta del índice refractario (RI) y el cuadrado del valor de incremento del índice refractario (dn/dc) específico de 0,135. El rendimiento dependió del tipo de hidroxilaminas y de la optimización de las condiciones, tales como la concentración, la temperatura y el tiempo de reacción (véase la Tabla 2). En general, el aumento de la concentración de hidroxilamina, una temperatura más alta y un tiempo de reacción más prolongado producen un rendimiento más alto.

Tabla 2. Cribado de diversas hidroxilaminas y optimización de condiciones del polisacárido capsular de GBS serotipo Ia

Experi mento N.º	Reactivo	Conc. (Mm)	Temp (°C)	Tiem po (h)	Rendimi ento/1 l de ferment ación	Mw de polisacárid o (kDa)	Polidisper sidad (PD)
1	 O-bencilhidroxilamina clorhidrato	10	55	72	42	2240	1,2
2	 Benzaldehído oxima	10	55	72	68	1400	1,2
3	 N,N-dibencilhidroxilamina	10	55	72	101	980	1,3
4	 N,N-dibencilhidroxilamina	50	55	17	320	590	1,3
5	 O-fenilhidroxilamina clorhidrato	10	55	72	109	850	1,3
6	 4-	10	55	72	90	1400	1,2

	(dimetilamino)benzaldehí do oxima						
7	 Bencil hidroxilcarbamato	10	55	84	323	1835	1,5
8	 O-(tetrahydro-2H-piran-2- il)hidroxilamina	10	55	84	304	1270	1,4
9	 O- ((perfluorofenil)metil)hidro xilamina	10	55	84	185	1330	1,6
10	 O-tritilhidroxilamina	10	55	84	371	1275	1,7
11	 O-(4-nitrobencil) hidroxilamina clorhidrato	10	55	84	190	3500	1,3
12	 Ácido 2-(aminooxi)acético clorhidrato	10	55	84	252	2600	1,2

13	 Ácido (aminooxi)sulfónico	10	55	84	463	490	1,4
14	 Ácido (aminooxi)sulfónico	50	55	17	460	270	1,2
15	 Ácido (aminooxi)sulfónico	100	23	21	240	500	1,2
16	 N,N-dioctadecilhidroxilamina	10	55	84	380	4700	1,7

Se descubrió que las hidroxilaminas sustituidas y no sustituidas eran muy eficaces en la liberación del polisacárido capsular de GBS de la pared celular. Este enfoque produce el aislamiento de CP de alto peso molecular con la conservación de grupos N- y O-acetilo. Entre los diversos compuestos cribados, se descubrió que la dibencil hidroxilamina era la más eficaz. Los datos se muestran en la Tabla 3 ([dibencil hidroxilamina] – 50 mM ; ph – 7-8; temp – 50 °C; tiempo – 24 h).

Tabla 3. Datos de liberación de CP de GBS usando dibencil hidroxilamina

Tipo de GBS	Ia	Ib	III
Rendimiento de liberación de polisacárido	86%	81%	46%
Rendimiento de purificación total	63%	54%	30%
Peso molecular (Mw)	330 kDa	212 kDa	171 kDa
O-acetilación (NMR)	NA	31%	37%
N-acetilación (NMR)	106%	104%	87%

NA – El serotipo Ia no es O-acetilado

Debido a que la dibencil hidroxilamina tiene baja hidrosolubilidad, se desea un derivado alternativo de hidroxilamina que es libremente hidrosoluble y tiene una actividad

similar o mayor que dibencil hidroxilamina. Después de cribar algunos compuestos, se descubrió que la dietil hidroxilamina era una buena alternativa. Los datos se muestran en la Tabla 4 ([dietil hidroxilamina] – 100 mM; pH – 7-8; temp – 60 °C; tiempo – 19 h).

Tabla 4. Datos de liberación de CP de GBS usando dietil hidroxilamina

Tipo de GBS	Ia	Ib	III
% de rendimiento de liberación de poli	100	94	59
Peso molecular (Mw)	890 kDa	560 kDa	309 kDa

También se descubrió que la hidroxilamina (NH₂-OH) era eficaz en la escisión de CP de la pared celular. Los datos se muestran en la Tabla 5 ([hidroxilamina] – 100 mM; pH – 7-7,5; temp – 65 °C; tiempo – 17 h). Para el serotipo III, el rendimiento fue 54 % después de 17 horas; sin embargo, el rendimiento aumentó hasta 70 % después de 3 días y medio.

Tabla 5. Datos de liberación de CP de GBS usando hidroxilamina

Tipo de GBS	Ia	III
% de rendimiento de liberación de poli	100	54
Peso molecular (Mw)	1160 kDa	500 kDa

Cribado de oligoaminas para la liberación de polisacárido capsular de GBS de las células

Se descubrió que la hidroxilamina y sus compuestos sustituidos eran muy eficaces para la escisión de los polisacáridos capsulares de la pared celular de GBS. Sin embargo, se descubrió que eran menos eficaces para los serotipos II y V. Por lo tanto, las oligoaminas se evaluaron debido a que se creía que podían ser más activas debido a su múltiple funcionalidad de amina.

Se descubrió que la etilendiamina era eficaz en la liberación de polisacáridos capsulares de todos los serotipos. Los datos se muestran en la Tabla 6 ([etilendiamina] – 50 o 100 mM; pH 8,0 ; 16 h; 80 °C; 25 mM de EDTA).

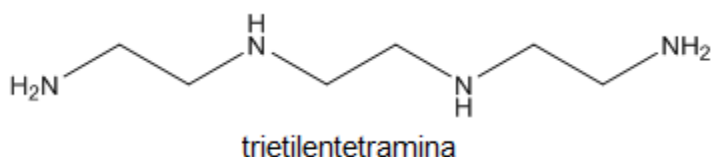
Tabla 6: Datos de liberación de CP de GBS usando etilendiamina

Serotipo de GBS	Recuperación (%)	Mw (kDa)
Ia	96%	242
Ib	83%	225
II	30%	76

Serotipo de GBS	Recuperación (%)	Mw (kDa)
III	68%	94
V	30%	235

Otras oligoaminas representativas se evaluaron para determinar su actividad usando las pastas celulares serotipos Ia y V pero también se descubrió que eran menos eficaces para el serotipo V. Los datos se muestran en las Tablas 7 ([trietilentetramina] – 100 mM; pH – 8,9; temp – 60 °C; tiempo – 15 h), 8 ([1,1,4,7,10,10 hexametil trietilentetramina] – 10 mM; pH – 6,3; temp – 60 °C; tiempo – 20 h) y 9 ([2,6,10,trimetil 2,6,10 triazaundecano] – 10 mM; pH – 7-8; temp – 60 °C; tiempo – 19 h).

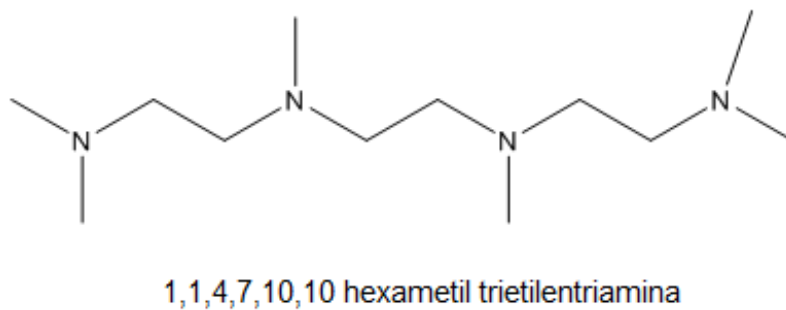
Tabla 7. Datos de liberación de CP de GBS usando trietilentetramina



Tipo de GBS	Ia	V
% de rendimiento de liberación de poli	100	~ 10 después de 2,5 días
Peso molecular (Mw)	1280	nd

nd – no determinado

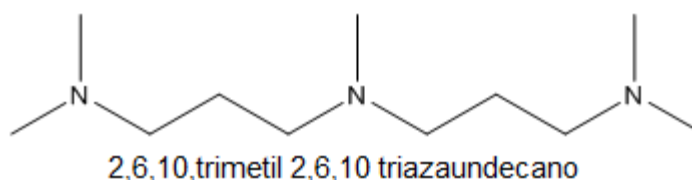
Tabla 8. Datos de liberación de CP de GBS usando 1,1,4,7,10,10 hexametil trietilentetramina



Tipo de GBS	Ia	V
% de rendimiento de liberación de poli	100	~ 1 %
Peso molecular (Mw)	980	nd

nd – no determinado

Tabla 9. Datos de liberación de CP de GBS usando 2,6,10,trimetil 2,6,10 triazaundecano



Tipo de GBS	Ia	V
% de rendimiento de liberación de poli	100	~1 %
Peso molecular (Mw)	1100	nd

nd – no determinado

Ejemplo 3. Conjugación de polisacáridos capsulares de GBS mediante aminación reductora

Activación de polisacárido

La oxidación del polisacárido se realizó en 100 mM de amortiguador de fosfato de potasio (pH 6,0 ± 0,5) mediante la adición secuencial de la cantidad calculada de 500 mM de amortiguador de fosfato de potasio (pH 6,0) y agua para inyección (WFI) para obtener la concentración de polisacárido final de 2,0 g/l. Si se requiere, el pH de reacción se ajustó a pH 6,0, aproximadamente. Después del ajuste de pH, la temperatura de reacción se ajustó a 23 °C. La oxidación se inició mediante la adición de aproximadamente 0,25 equivalentes molares de periodato de sodio. La reacción de oxidación se realizó a 5 ± 3 °C durante 16 h, aproximadamente.

La concentración y la diafiltración del polisacárido activado se llevaron a cabo usando casetes de membrana de ultrafiltración MWCO de 5K. La diafiltración se llevó a cabo contra diavolumenes de WFI de 20 veces. El polisacárido activado purificado luego se almacenó a 5 ± 3 °C. El sacárido activado purificado se caracterizó, *inter alia*, mediante (i) concentración de sacárido mediante ensayo colorimétrico; (ii) concentración de aldehído

mediante ensayo colorimétrico; (iii) grado de oxidación; y (iv) peso molecular mediante SEC-MALLS.

El grado de oxidación (DO = moles de unidades de repetición de azúcar / moles de aldehído) del polisacárido activado se determinó de la siguiente manera:

Los moles de la unidad de repetición de azúcar se determinaron mediante diversos métodos colorimétricos, por ejemplo, mediante el método de antrona. Mediante el método de antrona, el polisacárido primero se descompone en monosacáridos mediante la acción del ácido sulfúrico y el calor. El reactivo antrona reacciona con las hexosas para formar un complejo de color amarillo-verde cuya absorbancia se leyó espectrofotométricamente a 625 nm. Dentro del rango del ensayo, la absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de hexosa presente.

Los moles de aldehído también se determinaron simultáneamente, usando el método colorimétrico de MBTH. El ensayo de MBTH incluye la formación de un compuesto de azina haciendo reaccionar grupos aldehído (de una muestra determinada) con una 3-metil-2-benzotiazolon hidrazona (reactivo del ensayo de MBTH). El exceso de 3-metil-2-benzotiazolon hidrazona se oxida para formar un catión reactivo. El catión reactivo y la azina reaccionan para formar un cromóforo azul. El cromóforo formado luego se leyó espectroscópicamente a 650 nm.

Formulación de un compuesto con polisacárido activado y excipiente de sacarosa, y liofilización

Se formuló un compuesto con polisacárido activado y sacarosa en una relación de 25 gramos de sacarosa por gramo de polisacárido activado. Luego, la botella de la mezcla de compuesto se liofilizó. Después de la liofilización, las botellas que contenían polisacárido activado liofilizado se almacenaron a -20 ± 5 °C. La cantidad calculada de proteína CRM₁₉₇ se congeló superficialmente y se liofilizó por separado. La CRM₁₉₇ liofilizada se almacenó a -20 ± 5 °C.

Reconstitución de polisacárido activado liofilizado y proteína portadora

El polisacárido activado liofilizado se reconstituyó en sulfóxido de dimetilo anhidro (DMSO). Después de la disolución completa del polisacárido, una cantidad igual de DMSO anhidro se agregó a CRM₁₉₇ liofilizada para la reconstitución.

Conjugación y bloqueo

El polisacárido activado reconstituido se combinó con CRM₁₉₇ reconstituida en un recipiente de reacción, y luego se mezcló exhaustivamente para obtener una solución

transparente antes de iniciar la conjugación con cianoborohidruro de sodio. La concentración de polisacárido final en la solución de reacción fue de aproximadamente 1 g/l. La conjugación se inició agregando 1,0 – 1,5 MEq de cianoborohidruro de sodio a la mezcla de reacción e incubándola a 23 ± 2 °C durante 20-48 h. La reacción de conjugación se finalizó agregando 2 MEq de borohidruro de sodio (NaBH_4) para bloquear aldehídos sin reaccionar. Esta reacción de bloqueo continuó a 23 ± 2 °C durante 3 ± 1 h.

Purificación del conjugado

La solución de conjugado se diluyó 1:10 con 5 mM de succinato enfriado-0,9 % de solución salina (pH 6,0) en la preparación para la purificación mediante filtración de flujo tangencial usando membranas MWCO de 100-300K.

La solución de conjugado diluida se hizo pasar a través de un filtro de 5 μm , y la diafiltración se llevó a cabo usando 5 mM de succinato / 0,9 % de solución salina (pH 6,0) como medio. Después de que la diafiltración se había completado, el retentato de conjugado se transfirió a través de un filtro de 0,22 μm . El conjugado se diluyó adicionalmente con 5 mM de succinato / 0,9 % de solución salina (pH 6), en una concentración de sacárido diana de aproximadamente 0,5 mg/ml. De manera alternativa, el conjugado se purificó usando 20 mM de histidina-0,9 % de solución salina (pH 6,5) mediante filtración de flujo tangencial usando membranas MWCO de 100-300K. La etapa de filtración final de 0,22 μm se completó para obtener el conjugado inmunógeno.

Ejemplo 4: Efectos de las diversas condiciones de conjugación en conjugados CRM₁₉₇-polisacárido de GBS

Los conjugados de los serotipos Ia, Ib, II, III, IV y V de GBS se produjeron variando deliberadamente las condiciones químicas de oxidación de periodato/aminación reductora (PO/RAC), que incluyen el solvente para el reactivo (medio acuoso contra DMSO), los diversos niveles de ácido siálico en el polisacárido inicial y el grado de oxidación/modificación de epítipo de sacárido. En general, se descubrió que los conjugados que se produjeron usando DMSO como solvente tienen menores niveles de polisacárido (libre) sin reaccionar, mayor peso molecular de conjugado y mayores relaciones sacárido/proteína que los conjugados que se produjeron usando medio acuoso.

Un proceso de conjugación que produce conjugados con menores niveles de polisacárido (libre) sin reaccionar es ventajoso y preferible. Se conoce que los altos niveles de polisacárido (libre) sin reaccionar pueden producir una respuesta inmunitaria independiente de linfocitos T excesiva, que tiene el potencial de diluir la respuesta

dependiente de linfocitos T producida por el conjugado proteína-polisacárido, y así disminuyen la respuesta inmunógena producida por el conjugado.

Los polisacáridos de GBS se desialilaron químicamente mediante métodos conocidos en el estado de la técnica (véase Chaffin, D.O, et al., J Bacteriol 187(13):4615-4626 (2005)) para producir variantes de conjugados para determinar el impacto del % de desialilación en la inmunogenicidad. La desialilación de más de alrededor de 40 % (es decir, niveles de ácido siálico de menos de alrededor de 60 %) tuvo un impacto negativo en la inmunogenicidad.

De manera similar, en la mayoría de los casos, un grado de oxidación de menos de alrededor de 5, o la modificación de epítipo de sacárido de más de alrededor de 20 %, tuvo un impacto negativo en la inmunogenicidad. Debido a que la oxidación se produjo a través del ácido siálico en el polisacárido capsular, los resultados parecieron indicar que la modificación de epítipo de sacárido de más de alrededor de 20 % redujo el contenido de ácido siálico, lo que produjo inmunogenicidad reducida.

Por el contrario, los conjugados que tienen una variedad de relación sacárido/proteína o peso molecular de polisacárido produjeron una respuesta inmunógena en ratones, lo que indica un rango relativamente amplio de criterios de aceptación con respecto a estos atributos.

Las variantes de conjugado adicionales también se produjeron usando vías químicas alternativas. Una química alternativa incluyó producir conjugados haciendo reaccionar el polisacárido con carbonilditriazol (CDT), y llevando a cabo la reacción de conjugación en DMSO. En otra química alternativa, los conjugados se generaron mediante oxidación del polisacárido usando reactivo TEMPO [(2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-il)oxilo] (en lugar de periodato de sodio), y luego mediante conjugación usando química de aminación reductora (TEMPO/RAC) en DMSO, como se detalló en el Ejemplo 3 anterior. Todos los conjugados producidos por estas químicas alternativas demostraron ser inmunógenos en ratones, lo que indicó la idoneidad de las vías químicas alternativas además de PO/RAC. Sin embargo, algunas químicas de conjugación tuvieron un mejor rendimiento con algunos serotipos que con otros.

OPA se llevó a cabo de acuerdo con Nanra, J.S., et al., Hum. Vaccin. Immunother., 9(3):480-487 (2013), con la sustitución de aislados de estreptococo grupo B para aislados de *Staphylococcus aureus* y la omisión de la etapa de preopsonización. Se proporcionaron títulos OPA después de la dosis 3 (PD3) como una media geométrica de un grupo de 10-

20 ratones inmunizados con 1 mcg/ml en cada dosis de conjugado respectivo.

Conjugados CRM₁₉₇-polisacárido de GBS serotipo Ia

Los conjugados producidos usando PO/RAC y los polisacáridos activados que tienen un DO de 16-17 (aproximadamente 6 % de modificación de epítipo de sacárido) demostraron ser inmunógenos (conjugados 1 y 3). Sin embargo, usar polisacáridos activados que tienen un DO de 5,4 (aproximadamente 19 % de modificación de epítipo de sacárido) tuvo un impacto negativo en la inmunogenicidad (conjugado 2). De manera similar, un nivel de ácido siálico de 50 % produjo casi ninguna respuesta inmunógena (conjugado 4). Los resultados se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Efectos de las diversas condiciones de procesos de química de oxidación de periodato/aminación reductora en conjugados GBS serotipo Ia-CRM₁₉₇

Conjugado	1	2	3	4
Solvente	DMSO	DMSO	Acuoso	DMSO
MW de polisacárido (kDa)	190	190	190	190
% de ácido siálico en polisacárido inicial	>95	>95	>95	50
% de modificación	6	19	6	6
Grado de oxidación (DO)	16,8	5,4	16,2	16,4
Relación sacárido/proteína	0,8	0,8	2,0	1,1
% de sacárido libre	<5	<5	26	<5
MW de conjugado mediante SEC-MALLS, kDa	6040	15390	806	3763
Título OPA	300	172	406	68

Las variantes de conjugado adicionales se produjeron usando químicas de conjugación alternativas y atributos moleculares del conjugado (los resultados se muestran en la Tabla 11). El conjugado 5 se produjo haciendo reaccionar el polisacárido con carbonilditriazol (CDT), y la reacción de conjugación se llevó a cabo en DMSO. El conjugado 6 se produjo mediante oxidación del polisacárido usando reactivo TEMPO (en lugar de periodato de sodio), y luego mediante conjugación usando química de aminación reductora en DMSO, como se detalló en el Ejemplo 3 anterior. El conjugado 7 se produjo mediante PO/RAC y mediante la variación deliberada de los parámetros de conjugación para producir un conjugado con una alta relación sacárido/proteína (SPR). El conjugado 8 se produjo mediante PO/RAC usando un polisacárido que tiene un MW bajo (40 kDa). Todos estos

conjugados demostraron ser inmunógenos en ratones, lo que indicó la idoneidad de las químicas de conjugación alternativas, además de la química de oxidación de periodato/aminación reductora, así como atributos de conjugado alternativos, tales como SPR y MW bajo del polisacárido inicial.

Tabla 11. Efectos de las diversas condiciones de procesos de química de oxidación de periodato/aminación reductora y opciones de químicas alternativas en conjugados GBS serotipo Ia-CRM₁₉₇

Conjugado	5	6	7	8
Química de conjugación	CDT	TEMPO/RAC	PO/RAC	PO/RAC
MW de polisacárido (kDa)	383	220	383	40
% de ácido siálico en polisacárido inicial	>95	>95	>95	>95
% de modificación	N/A	11	6	8
Grado de oxidación (DO)	N/A	9,2	17,5	12
Relación sacárido/proteína	1,2	0,9	2,5	1
% de sacárido libre	12,5	11,2	13,3	24,3
MW mediante SEC-MALLS, kDa	7128	1678	4347	2000
Título OPA	1028	371	303	1484

Conjugados CRM₁₉₇-polisacárido de GBS serotipo Ib

Los conjugados producidos usando PO/RAC y los polisacáridos activados que tienen un DO de 15,8 (aproximadamente 6 % de modificación de epítipo de sacárido) en DMSO demostraron ser inmunógenos en ratones (conjugados 9 y 11). Los conjugados producidos mediante PO/RAC en DMSO fueron levemente más inmunógenos que el conjugado producido mediante PO/RAC en el medio acuoso cuando todos los otros atributos moleculares del conjugado fueron similares (conjugados 9 y 11, respectivamente). Sin embargo, usar polisacáridos activados que tienen un DO de 4,7 (aproximadamente 21% de modificación de epítipo de sacárido) tuvo un impacto negativo en la inmunogenicidad (conjugado 10). La inmunogenicidad se eliminó casi por completo, con muy pocos respondedores, en el conjugado producido mediante PO/RAC y un polisacárido 95 % desialilado (5 % de nivel de ácido siálico) (conjugado 12). Los resultados se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Efectos de las diversas condiciones de procesos de química de oxidación de periodato/aminación reductora en conjugados GBS serotipo Ib-

CRM₁₉₇

Conjugado	9	10	11	12
Solvente	DMSO	DMSO	Acuoso	DMSO
MW de polisacárido (kDa)	120	120	120	120
% de ácido siálico en polisacárido inicial	>95	>95	>95	5
% de modificación	6	21	6	9
Grado de oxidación (DO)	15,8	4,7	15,8	11,7
Relación sacárido/proteína	1,1	1	2	1,1
% de sacárido libre	11	<5	33	7
MW mediante SEC-MALLS, kDa	2608	7302	381	8418
Título OPA	417	159	278	62

Las variantes de conjugado adicionales se produjeron usando químicas de conjugación alternativas y atributos moleculares del conjugado (los resultados se muestran en la Tabla 13). El conjugado 13 se produjo mediante PO/RAC usando un polisacárido que tiene una baja sialilación (65 %) en el polisacárido inicial. El conjugado 14 se produjo mediante PO/RAC y mediante la variación deliberada de los parámetros de conjugación para producir un conjugado con una alta relación sacárido/proteína (SPR). El conjugado 15 se produjo haciendo reaccionar el polisacárido con carbonilditriazol (CDT), y la reacción de conjugación se llevó a cabo en DMSO. El conjugado 16 se produjo mediante oxidación del polisacárido usando reactivo TEMPO (en lugar de periodato de sodio), y luego mediante conjugación usando química de aminación reductora en DMSO, como se detalló en el Ejemplo 3 anterior. Todos estos conjugados demostraron ser inmunógenos en ratones, lo que indicó la idoneidad de las químicas de conjugación alternativas, además de la química de oxidación de periodato/aminación reductora, así como atributos de conjugado alternativos, tales como SPR y MW bajo del polisacárido inicial.

Tabla 13. Efectos de las diversas condiciones de procesos de química de oxidación de periodato/aminación reductora y opciones de químicas alternativas para conjugados GBS serotipo Ib-CRM₁₉₇

Conjugado	13	14	15	16
Química de conjugación	PO/RAC	PO/RAC	CDT	TEMPO/RAC
MW de polisacárido (kDa)	141	141	141	150
% de ácido siálico en polisacárido inicial	65	>95	>95	>95
% de modificación	8	7	N/A	13
Grado de oxidación (DO)	12	14,7	N/A	7,8
Relación sacárido/proteína	1,06	2,1	1,29	0,85
% de sacárido libre	<5%	16%	21	7
MW mediante SEC-MALLS, kDa	5345	1594	2760	1400
Título OPA	246	118	287	548

Conjugados CRM₁₉₇-polisacárido de GBS serotipo II

Los conjugados producidos usando PO/RAC y los polisacáridos activados que tienen un DO de 4-15 (aproximadamente -23% de modificación de epítipo de sacárido) demostraron ser inmunógenos en ratones (conjugados 17 - 20). El conjugado producido mediante PO/RAC y un polisacárido con 74 % de nivel de sialilación (26 % desialilado) también demostró ser inmunógeno (conjugado 20). Los resultados se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Efectos de las diversas condiciones de procesos de química de oxidación de periodato/aminación reductora en conjugados GBS serotipo II-CRM₁₉₇

Conjugado	17	18	19	20
Solvente	DMSO	DMSO	Acuoso	DMSO
MW de polisacárido (kDa)	95	95	109	109
% de ácido siálico en polisacárido inicial	>95	>95	>95	74
% de modificación	8	23	10	7
Grado de oxidación (DO)	12,6	4,3	9,8	15,2
Relación sacárido/proteína	0,84	0,90	1,13	0,63

% de sacárido libre	16	<5	6	<5
MW mediante SEC-MALLS, kDa	3600	4650	1611	6140
Título OPA	610	967	2149	684

Las variantes de conjugado adicionales se produjeron usando químicas de conjugación alternativas y atributos moleculares del conjugado (los resultados se muestran en la Tabla 15). Los conjugados 21 y 22 se produjeron mediante PO/RAC y mediante la variación deliberada de los parámetros de conjugación para producir conjugados con relaciones sacárido/proteína (SPR) bajas y altas, respectivamente. El conjugado 23 se produjo mediante oxidación del polisacárido usando reactivo TEMPO (en lugar de periodato de sodio), y luego mediante conjugación usando química de aminación reductora en DMSO, como se detalló en el Ejemplo 3 anterior. El conjugado 24 se produjo haciendo reaccionar el polisacárido con carbonilditriazol (CDT), y la reacción de conjugación se llevó a cabo en DMSO. Todos estos conjugados demostraron ser inmunógenos en ratones, lo que indicó la idoneidad de las químicas de conjugación alternativas, además de la química de oxidación de periodato/aminación reductora, así como atributos de conjugado alternativos, tales como SPR.

Tabla 15. Efectos de las diversas condiciones de procesos de química de oxidación de periodato/aminación reductora y opciones de químicas alternativas para conjugados GBS serotipo II-CRM₁₉₇

Conjugado	21	22	23	24
Química de conjugación	PO/RAC	PO/RAC	TEMPO/RAC	CDT
MW de polisacárido (kDa)	109	109	109	109
% de ácido siálico en polisacárido inicial	>95	>95	>95	>95
% de modificación	10	10	11	N/A
Grado de oxidación (DO)	10	10	8,8	N/A
Relación sacárido/proteína	0,61	2,03	0,66	0,87
% de sacárido libre	<5	25	<5%	12
MW mediante SEC-MALLS, kDa	8850	1480	5270	603
Título OPA	3117	891	2167	631

Conjugados CRM₁₉₇-polisacárido de GBS serotipo III

Los conjugados producidos usando PO/RAC y los polisacáridos activados que tienen un DO de 10-17 (aproximadamente 6-10% de modificación de epítipo de sacárido) en DMSO demostraron ser inmunógenos en ratones (conjugados 25 y 30). Los conjugados que tienen un DO de 2,9 (aproximadamente 34 % de modificación de epítipo de sacárido) o una relación sacárido/proteína (2,1) (conjugados 26 y 27, respectivamente) demostraron ser relativamente menos inmunógenos. El conjugado producido mediante PO/RAC y un polisacárido con 81 % de nivel de sialilación (19 % desialilado) demostró ser inmunógeno (conjugado 30). Sin embargo, el conjugado producido mediante polisacárido con 58 % de nivel de sialilación (42 % desialilado) demostró ser poco inmunógeno (conjugado 29). El conjugado producido mediante PO/RAC en DMSO fue levemente más inmunógeno que el conjugado producido mediante PO/RAC en el medio acuoso cuando todos los otros atributos moleculares del conjugado fueron similares (conjugados 25 y 28, respectivamente). Los resultados se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16. Efectos de las diversas condiciones de procesos de química de oxidación de periodato/aminación reductora en conjugados GBS serotipo III-

CRM₁₉₇

Conjugado	25	26	27	28	29	30
Solvente	DMSO	DMSO	DMSO	Acuoso	DMSO	DMSO
MW de polisacárido (kDa)	263	358	358	358	355	358
% de ácido siálico en polisacárido inicial	>95	>95	>95	>95	58	81
% de modificación	10	34	6	8	6	6
Grado de oxidación (DO)	10	2,9	17	13	16	17
Relación sacárido/proteína	1,1	1,2	2,1	1,7	1,15	1,19
% de sacárido libre	10	7	24	19	<5	<5
MW mediante SEC-MALLS. kDa	2396	14340	3066	1885	5110	4643
Título OPA	701	57	252	248	137	505

Las variantes de conjugado adicionales se produjeron usando químicas de conjugación alternativas y atributos moleculares del conjugado (los resultados se muestran en la Tabla 17). Los conjugados 31 - 35 se produjeron mediante PO/RAC y mediante la variación deliberada de los parámetros de conjugación para producir conjugados con diversos MW. El conjugado 36 se produjo haciendo reaccionar el polisacárido con carbonilditriazol (CDT), y la reacción de conjugación se llevó a cabo en DMSO. El conjugado 37 se produjo mediante oxidación del polisacárido usando reactivo TEMPO (en lugar de periodato de sodio), y luego mediante conjugación usando química de aminación reductora en DMSO, como se detalló en el Ejemplo 3 anterior. Todos estos conjugados demostraron ser inmunógenos en ratones, lo que indicó la idoneidad de las químicas de conjugación alternativas, además de la química de oxidación de periodato/aminación reductora, así como atributos de conjugado alternativos, tales como MW. Los conjugados producidos con un DO tan bajo como 5 (aproximadamente 20 % de modificación de epítipo de sacárido) todavía eran inmunógenos en ratones (conjugado 32 en la Tabla 17) en comparación con los conjugados producidos con un DO de 2,9 (aproximadamente 34 % de modificación de epítipo de sacárido) (conjugado 26 en la Tabla 16 anterior).

Tabla 17. Efectos de las diversas condiciones de procesos de química de oxidación de periodato/aminación reductora y opciones de químicas alternativas para conjugados GBS serotipo III-CRM₁₉₇

Conjugado	31	32	33	34	35	36	37
Química de conjugación	PO/RA C	PO/RA C	PO/RA C	PO/RA C	PO/RA C	CDT	TEMPO/RA C
MW de polisacárido (kDa)	353	350	355	50	349	355	355
% de ácido siálico en polisacárido inicial	>95	>95	>95	>95	>95	>95	>95
% de modificación	6	5	6	8	20	N/A	10

Grado de oxidación (DO)	17	19	17	12	5	N/A	10
Relación sacárido/proteína	0,8	1,1	1,2	0,9	1,0	1,16	0,96
% de sacárido libre	<5	<5	<5	20	<5	<5	<5
MW mediante SEC-MALLS. kDa	9278	5291	4982	1201	8024	10740	3415
Título OPA	646	204	176	441	1116	448	336

Conjugados CRM₁₉₇-polisacárido de GBS serotipo IV

Los conjugados producidos usando PO/RAC y los polisacáridos activados que tienen un DO de 6,9-14,2 (aproximadamente -14% de modificación de epítipo de sacárido) demostraron ser inmunógenos en ratones (conjugados 38-41). El conjugado producido mediante PO/RAC y un polisacárido con 60% de nivel de sialilación (40% desialilado) también demostró ser inmunógeno (conjugado 41). Los resultados se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18. Efectos de las diversas condiciones de procesos de química de oxidación de periodato/aminación reductora en conjugados GBS serotipo IV-CRM₁₉₇

Conjugado	38	39	40	41
Solvente	DMSO	DMSO	Acuoso	DMSO
MW de polisacárido (kDa)	143	143	133	121
% de ácido siálico en polisacárido inicial	>95	>95	>95	60
% de modificación	7	14	7	8
Grado de oxidación (DO)	14,2	6,9	13,6	13,2
Relación sacárido/proteína	0,80	0,91	1,92	1,0
% de sacárido libre	<5	<5	33,4	<5
MW mediante SEC-MALLS. kDa	8268	10210	657	5691
Título OPA	3140	2379	3080	6708

Las variantes de conjugado adicionales se produjeron usando químicas de conjugación alternativas y atributos moleculares del conjugado. Los resultados se muestran en la Tabla 19. Los conjugados 42 y 45 se produjeron mediante PO/RAC y mediante la variación deliberada de los parámetros de conjugación para producir conjugados con DO alto (nivel de oxidación menor) y SPR alta, respectivamente. El conjugado 43 se produjo haciendo reaccionar el polisacárido con carbonilditriazol (CDT), y la reacción de conjugación se llevó a cabo en DMSO. El conjugado 44 se produjo mediante oxidación del polisacárido usando reactivo TEMPO (en lugar de periodato de sodio), y luego mediante conjugación usando química de aminación reductora en DMSO, como se detalló en el Ejemplo 3 anterior. Todos los conjugados serotipo IV demostraron ser inmunógenos en ratones, lo que indicó la idoneidad de las químicas de conjugación alternativas, además de la química de oxidación de periodato/aminación reductora, así como atributos de conjugado, tales como SPR. Los conjugados producidos con un DO (oxidación menor) de hasta al menos 20 (aproximadamente 5 % de modificación de epítipo de sacárido) todavía eran inmunógenas en ratones.

Tabla 19. Efectos de las diversas condiciones de procesos de química de oxidación de periodato/aminación reductora y opciones de químicas alternativas en conjugados GBS serotipo IV-CRM₁₉₇

Conjugado	42	43	44	45
Química de conjugación	PO/RAC	CDT	TEMPO	PO/RAC
MW de polisacárido (kDa)	143	133	133	140
% de ácido siálico en polisacárido inicial	>95	>95	>95	>95
% de modificación	5	N/A	7	7
Grado de oxidación (DO)	20	N/A	13,7	14,6
Relación sacárido/proteína	1,0	0,9	0,52	1,96
% de sacárido libre	<5	<5	6	<5
MW mediante SEC-MALLS. kDa	3580	12390	4580	2710
Título OPA	8614	1989	7567	3695

Conjugados CRM₁₉₇-polisacárido de GBS serotipo V

Los conjugados producidos usando PO/RAC y los polisacáridos activados que

tienen un DO de 4,4-14,6 (aproximadamente 7-23 % de modificación de epítipo de sacárido) demostraron ser inmunógenos en ratones (conjugados 46 y 47). El conjugado desialilado (5 % de nivel de sialilación) no fue inmunógeno (conjugado 49), y el conjugado producido mediante un proceso de PO/RAC usando un solvente acuoso produjo una respuesta inmunitaria baja (conjugado 48). Los resultados se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20. Efectos de las diversas condiciones de procesos de química de oxidación de periodato/aminación reductora en conjugados GBS serotipo V-CRM₁₉₇

Conjugado	46	47	48	49
Solvente	DMSO	DMSO	Acuoso	DMSO
MW de polisacárido (kDa)	132	132	132	132
% de ácido siálico en polisacárido inicial	>95%	>95%	>95%	5%
% de modificación	7	23	8	6
Grado de oxidación (DO)	14,6	4,4	12,1	18
Relación sacárido/proteína	1,32	1,43	1,27	0,94
% de sacárido libre	11	<5	25,4	<5
MW mediante SEC-MALLS. kDa	4304	14510	573	4847
Título OPA	335	181	93	60

Las variantes de conjugado adicionales se produjeron usando químicas de conjugación alternativas y atributos moleculares del conjugado. Los resultados se muestran en la Tabla 21. Los conjugados 50 y 53 se produjeron mediante PO/RAC y mediante la variación deliberada de los parámetros de conjugación para producir conjugados con un nivel de sialilación menor: 81 % de sialilación) y MW bajo, respectivamente. El conjugado 51 se produjo haciendo reaccionar el polisacárido con carbonilditriazol (CDT), y la reacción de conjugación se llevó a cabo en DMSO. El conjugado 52 se produjo mediante oxidación del polisacárido usando reactivo TEMPO (en lugar de periodato de sodio), y luego mediante conjugación usando química de aminación reductora en DMSO, como se detalló en el Ejemplo 3 anterior. Todos los conjugados de serotipo V, excepto el conjugado producido mediante química de CDT, demostraron ser inmunógenos en ratones, lo que indicó la idoneidad de las químicas de conjugación alternativas, además de la química de oxidación de periodato/aminación reductora, así como los atributos del conjugado, tales como MW. El

conjugado producido mediante química de CDT demostró ser significativamente menos inmunógeno en comparación con otros conjugados producidos mediante RAC. El conjugado con 81 % de sialilación (conjugado 50) produjo una respuesta inmunitaria más baja en comparación con el conjugado con >95 % de sialilación (conjugado 53), pero más alta que el conjugado con 5 % de sialilación (conjugado 49 en la Tabla 20 anterior).

Tabla 21. Efectos de las diversas condiciones de procesos de química de oxidación de periodato/aminación reductora y opciones de químicas alternativas en conjugados GBS serotipo V-CRM₁₉₇

Conjugado	50	51	52	53
Química de conjugación	PO/RAC	CDT	TEMPO	PO/RAC
MW de polisacárido (kDa)	159	193	193	37
% de ácido siálico en polisacárido inicial	>81%	>95%	>95%	>95%
% de modificación	7	N/A	5	10
Grado de oxidación (DO)	13,5	N/A	18,2	10,3
Relación sacárido/proteína	1,2	1,14	0,71	0,53
% de sacárido libre	<5	<5	22,3	7,3
MW mediante SEC-MALLS. kDa	3037	4756	3501	3044
Título OPA	160,3	101	320	279

Ejemplo 5: Vacunas de conjugado monovalentes GBS III-CRM₁₉₇ y GBS V-CRM₁₉₇ que producen una respuesta OPA en ratones

Se inmunizaron ratones CD-1 hembra con 1 mcg, 0,1 mcg o 0,01 mcg de estreptococo grupo B (GBS) serotipo III conjugado con CRM₁₉₇ (GBS III-CRM₁₉₇) o GBS serotipo V conjugado con CRM₁₉₇ (GBS V-CRM₁₉₇) tres veces por vía subcutánea en las semanas 0, 3 y 6. Los sueros posteriores a la dosis tres (PD3) se evaluaron mediante ensayo opsonofagocítico (OPA). Los OPA se realizaron como describe en el Ejemplo 4. Los dos conjugados indujeron respuestas OPA en ratones (Tabla 22). A las muestras sin una respuesta OPA detectable se les asignó un valor de 50.

Tabla 22: Conjugados GBS III y GBS V que inducen respuestas OPA en ratones

Tipo de conjugado	Dosis (mcg)	Media geométrica de títulos OPA
III	1	701
	0,1	103
	0,01	50
V	1	378
	0,1	204

Ejemplo 6: Vacunas de conjugado monovalentes GBS Ia-CRM₁₉₇, GBS Ib-CRM₁₉₇, GBS II-CRM₁₉₇, GBS III-CRM₁₉₇, GBS IV-CRM₁₉₇ y GBS V-CRM₁₉₇ que producen una respuesta OPA en ratones

Se inmunizaron seis conjuntos de ratones CD-1 hembra por vía subcutánea con una vacuna que contenía 1 mcg de un polisacárido capsular (CP) de GBS individual conjugado con CRM₁₉₇ en las semanas 0, 3 y 6. Los estudios iniciales mostraron que los ratones no tenían títulos OPA preexistentes con respecto a cualquiera de los seis serotipos evaluados. Los sueros de PD3 se analizaron mediante OPA contra serotipo de GBS cognado contenido en la vacuna. Los OPA se realizaron como se describe en el Ejemplo 4. Los resultados se muestran en las Tablas 23 y 24 a continuación.

Tabla 23: Media geométrica de títulos OPA de ratones después de la inmunización con conjugados CP GBS-CRM₁₉₇ individuales

Serotipo	Media geométrica de títulos OPA
Ia	300
Ib	417
II	610
III	188
IV	3140
V	378

Tabla 24: Aumento de títulos OPA de ratones después de la inmunización con conjugados CP GBS-CRM₁₉₇ individuales

Serotipo	Media geométrica de títulos OPA
Ia	6
Ib	8
II	12
III	4
IV	63
V	8

Nota: El aumento se calculó asumiendo que los ratones no tenían títulos preexistentes.

Ejemplo 7: Actividad opsónica de sueros en comparación con IgG aislada de ratones inmunizados con vacunas de conjugado monovalentes GBS Ia-CRM₁₉₇, GBS Ib-CRM₁₉₇, GBS II-CRM₁₉₇, GBS III-CRM₁₉₇, GBS IV-CRM₁₉₇ y GBS V-CRM₁₉₇

Se inmunizaron ratones CD-1 o BALB/c hembra con 1 mcg de CP de GBS individual conjugado con CRM₁₉₇ tres veces por vía subcutánea en las semanas 0, 3 y 6. Se usó AIPO₄ o QS-21 como adyuvante. Los sueros de PD3 se evaluaron mediante OPA específico de serotipo, y luego la fracción de inmunoglobulina G se aisló y se evaluó para determinar la actividad OPA. La actividad OPA de IgG purificada se normalizó a 5 mg/ml (en el rango de la cantidad de IgG en suero de ratón normal). Los seis conjugados CP de GBS indujeron anticuerpos IgG con actividad opsónica (Figura 1).

Ejemplo 8: Vacunas de conjugado monovalentes GBS Ia-TT, GBS Ib-TT, GBS II-TT, GBS III-TT, GBS IV-TT y GBS V-TT que producen una respuesta OPA en conejos

Los conejos se inmunizaron tres veces con 50 mcg/ml de polisacárido de GBS serotipo Ia conjugado con toxoide tetánico, 10 mcg/ml de polisacárido GBS serotipo Ib conjugado con toxoide tetánico, 50 mcg/ml de polisacárido de GBS serotipo II conjugado con toxoide tetánico, 50 mcg/ml de polisacárido de GBS serotipo III conjugado con toxoide tetánico, 50 mcg/ml de polisacárido de GBS serotipo IV conjugado con toxoide tetánico o 50 mcg/ml de polisacárido de GBS serotipo V conjugado con toxoide tetánico y administrado con adyuvante de Freund completo en la primera dosis y adyuvante de Freund incompleto en la segunda y tercera dosis. Los conjugados se produjeron usando polisacáridos que

tenían un nivel de ácido siálico de >95 % y química de CDAP (tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino piridinio). Las respuestas inmunitarias contra PD3 se midieron mediante OPA como se describe en el Ejemplo 4. Los títulos de suero se muestran en la Tabla 25, mientras que los títulos de IgG purificada se muestran en la Tabla 26 a continuación. Los polisacáridos de GBS serotipo Ia, Ib, II, III, IV y V conjugados con TT fueron altamente inmunógenos en conejos.

Tabla 25: Media geométrica de títulos OPA de sueros de conejo después de la inmunización con conjugados CP GBS-TT individuales.

Serotipo de GBS	Media geométrica de títulos OPA
Ib	11550
II	36753
IV	34345

Tabla 26: Media geométrica de títulos OPA de IgG purificada de conejo después de la inmunización con conjugados CP GBS-TT individuales.

Serotipo de GBS	Media geométrica de títulos OPA (1 mg/ml de pAb)
Ia	7190
Ib	2817
II	41870
III	40146
IV	15565
V	12124

Ejemplo 9: Vacuna de conjugado de GBS hexavalente que produjo una respuesta OPA en primates no humanos

Se inmunizaron tres grupos de *Macaca mulatta* con una vacuna hexavalente de estreptococo grupo B (GBS6) tres veces por vía intramuscular en las semanas 0, 4 y 8. La vacuna GBS6 comprendía GBS Ia-CRM₁₉₇, GBS Ib-CRM₁₉₇, GBS II-CRM₁₉₇, GBS III-CRM₁₉₇, GBS IV-CRM₁₉₇ y GBS V-CRM₁₉₇. Dos grupos incluían fosfato de aluminio (AlPO₄) como adyuvante y se dosificaron con 5 mcg de cada conjugado o 50 mcg de cada conjugado. El tercer grupo se dosificó con 5 mcg de cada conjugado y no contenía adyuvante. La Tabla 27 a continuación describe el cronograma de inmunización.

Tabla 27: Cronograma de inmunización de *Macaca mulatta*

Grupo	N.º de NH P	Dosis de la vacuna (cada conjugado)	Alum como AIPO ₄ (mg/ml)	Volumen de vacunación	Administración	Cronograma de inmunización (semanas)
1	10	5 µg	0,5	1,0 ml	IM	0, 4, 8
2	10	50 µg	0,5	1,0 ml	IM	0, 4, 8
3	10	5 µg	Ninguna	1,0 ml	IM	0, 4, 8

Se analizaron suero preinmunitario y suero de PD3 mediante OPA para los seis serotipos de GBS contenidos en la vacuna. Los OPA se realizaron como se describe en el Ejemplo 4. Los resultados se muestran en las Tablas 28 y 29 a continuación. Para los seis serotipos, las fórmulas con AIPO₄ como adyuvante provocaron una respuesta OPA detectable (aumento en los títulos de pre a PD3, o aumento pre/PD3 > 1). La dosis sin adyuvante de 5 mcg/conjugado provocó respuestas OPA detectables para cinco de los seis serotipos.

Tabla 28: Media geométrica de títulos OPA de *Macaca mulatta* antes y después de la inmunización con GBS6

Serotipo	5 mcg + AIPO ₄		50 mcg + AIPO ₄		5 mcg sin adyuvante	
	Pre	PD3	Pre	PD3	Pre	PD3
Ia	97	2907	118	8106	166	69
Ib	53	3821	53	2957	50	313
II	54	980	62	764	61	362
III	105	7759	204	8448	762	4515
IV	78	2350	89	3331	309	899
V	233	5556	442	16476	6192	4226

Tabla 29: Aumento de títulos OPA de *Macaca mulatta* después de la inmunización con GBS6

Serotipo	5mcg + AlPO ₄	50mcg + AlPO ₄	5mcg sin adyuvante
Ia	30	69	4
Ib	72	56	6
II	18	12	6
III	74	41	6
IV	30	37	3
V	24	37	1

Ejemplo 10: Vacuna de conjugado de GBS hexavalente que produjo una respuesta OPA en ratas

Se inmunizaron ratas Sprague-Dawley hembra dos veces por vía subcutánea con 5 mcg/ml de cada conjugado en la vacuna de conjugado de polisacárido de GBS6 como se describe en el Ejemplo 9, formulada con o sin fosfato de aluminio (AlPO₄). El suero preinmunitario (inicio) y el suero posterior a la dosis 2 se evaluaron para los títulos de ensayo OPA contra los seis serotipos de GBS cognados. Los títulos OPA se midieron para cada serotipo en el formato de ensayo de 384 cavidades de GBS, y se calcularon los aumentos. Las ratas a las que se administró la vacuna GBS6 presentaron una fuerte respuesta de anticuerpos funcionales contra cada serotipo después de la segunda dosis; en ausencia de AlPO₄, los serotipos aumentaron de 7 a 205 veces, mientras que en su presencia, aumentaron de 11 a 294 veces (Tabla 30).

Tabla 30. Aumento posterior a la dosis 2 (PD2) en títulos de ensayo de actividad opsonofagocítica (OPA) en ratas inmunizadas con una vacuna de conjugado de GBS hexavalente

	Aumento en la media geométrica de títulos OPA de preinmunitario a PD2	
Serotipo de GBS	Sin AlPO ₄	Con AlPO ₄
Ia	36	11
Ib	7	39

Tabla 30. Aumento posterior a la dosis 2 (PD2) en títulos de ensayo de actividad opsonofagocítica (OPA) en ratas inmunizadas con una vacuna de conjugado de GBS hexavalente

Serotipo de GBS	Aumento en la media geométrica de títulos OPA de preinmunitario a PD2	
	Sin AlPO_4	Con AlPO_4
II	205	294
III	107	141
IV	45	33
V	185	195

Ejemplo 11: Inmunización de hembras preñadas con una vacuna de glucoconjugado de GBS monovalente o hexavalente que mostró efecto protector de infección por GBS III o V en su cría después del nacimiento

Se inmunizaron ratones CD-1 hembra tres veces por vía subcutánea con la vacuna GBS6 como se describe en el Ejemplo 9, que contenía 5 mcg/ml de cada conjugado y 100 mcg/ml de AlPO_4 , un vacuna de glucoconjugado monovalente de GBS III o V (cada una contenía 10 mcg/ml del conjugado y 100mcg/ml de AlPO_4), o solo control de vehículo. Los ratones se criaron antes de la tercera inmunización. Las crías de los ratones inmunizados se expusieron a una dosis letal de bacterias GBS serotipo III o serotipo V de acuerdo con la vacuna recibida, y se monitoreó la supervivencia durante 90 horas. La inmunización de las madres con GBS6 + AlPO_4 o GBS III-CRM197 + AlPO_4 proporcionó protección significativa ($p < 0,0001$) para sus crías contra la exposición letal a serotipo III de GBS. Asimismo, la inmunización de las madres con GBS V-CRM197 + AlPO_4 proporcionó protección significativa ($p < 0,0001$) para sus crías contra la exposición letal a GBS serotipo V. Los resultados se muestran en la Tabla 31.

Tabla 31: Inmunización con vacuna de GBS monovalente y hexavalente que aumentó la supervivencia de las crías

	# de crías sobrevivientes/total de crías (% de supervivencia)		
Exposición a serotipo	Cría de madre inmunizada con GBS6	Cría de madre inmunizada con monovalente cognado	Cría de madre inmunizada con vehículo
III	20/22 (91 %)	28/28 (100 %)	9/29 (31 %)
V		35/40 (85 %)	3/27 (11 %)

Ejemplo 12: Inmunización pasiva de anticuerpos monoclonales contra GBS III en ratas bebé que mostró efecto protector

Los anticuerpos monoclonales (mAb) de estreptococo grupo B serotipo III (GBS III) se generaron inmunizando ratones con una vacuna pentavalente que comprendía los serotipos Ia, Ib, II, III y V. Se seleccionaron los clones de mAb específicos contra GBS III, y se generaron mAb que reconocían CP de GBS III usando procedimientos estándares. Los mAb de GBS serotipo III se administraron de manera pasiva a ratas bebé (n=10 por grupo; se muestran 2 experimentos independientes) 16 horas antes de la exposición a un aislado clínico de GBS III. Cuatro horas después de la exposición, la sangre se recolectó y las CFU restantes se enumeraron. El tratamiento con un mAb de GBS III redujo las CFU recuperadas en ratas bebé en 4 log o más (Tabla 32).

Tabla 32: mAb de GBS III redujo CFU recuperadas en ratas bebé

	Tratamiento	CFU recuperadas (log)
Experimento 1	mAb de GBS III	1,8
	Control	7,5
Experimento 2	mAb de GBS III	2,4
	Control	6,4

Ejemplo 13: Inmunización pasiva de anticuerpos monoclonales contra GBS Ib, III y V en ratones hembra preñados que mostró efecto protector en sus crías después del nacimiento

Los anticuerpos monoclonales (mAb) se generaron de ratones inmunizados con una vacuna pentavalente (GBS Ia-CRM₁₉₇, GBS Ib-CRM₁₉₇, GBS II-CRM₁₉₇, GBS III-CRM₁₉₇ y GBS V-CRM₁₉₇) usando procedimientos estándares. Los mAb luego se identificaron por reconocer de manera específica polisacáridos capsulares de cada uno de los cinco serotipos. Se administraron de manera pasiva dosis de 500 mcg/ml de mAb de GBS serotipo Ib (GBS Ib), mAb de GBS serotipo III (GBS III), mAb de GBS serotipo V (GBS V) o mAb de control apareado con el isotipo a ratones hembra preñados aproximadamente 24 a 48 horas antes del parto. 24 a 48 horas después del nacimiento, las crías de las madres murinas inmunizadas se expusieron a una dosis letal de bacterias de GBS Ib, GBS III o GBS V. Se monitoreó la supervivencia durante 96 horas. Se observó una supervivencia significativamente mayor en crías que habían nacido de madres inmunizadas con mAb de GBS Ib, mAb de GBS III o mAb de GBS V en comparación con el mAb de control después de la exposición a GBS (Tabla 33).

Tabla 33: mAb de GBS III & V aumentó la supervivencia en crías

Serotipo de exposición a GBS	% de supervivencia de crías nacidas de madres pasivamente inmunizadas con:	
	mAb cognado	mAb de control
Ib	80	0
III	93	0
V	100	12

Ejemplo 14: Estabilidad de conjugados de GBS

GBS Ia-CRM₁₉₇, GBS Ib-CRM₁₉₇, GBS II-CRM₁₉₇, GBS III-CRM₁₉₇, GBS IV-CRM₁₉₇ y GBS V-CRM₁₉₇ se formularon individualmente en 10 mM de succinato-fosfato y 155 mM de NaCl en diversos niveles de pH para evaluar la estabilidad de los conjugados en condiciones aceleradas de almacenamiento. El cambio de porcentaje en el peso molecular, según se determinó mediante SEC MALLS, se midió después de 4 semanas de almacenamiento a 50 °C. Los resultados se muestran en las Figuras 2-7.

Los conjugados GBS Ia-CRM₁₉₇, GBS Ib-CRM₁₉₇, GBS III-CRM₁₉₇ y GBS IV-CRM₁₉₇ se evaluaron para determinar la estabilidad de sialilación en diversas condiciones de amortiguador que se muestran en la Tabla 34. Se midió ácido siálico libre (ácido N-acetil-

neuramínico; NANA) usando HPLC después de 1 mes de almacenamiento a 37 °C. Los resultados se muestran en la Figura 8.

Ambos estudios sugirieron que los conjugados tuvieron un mejor rendimiento a un pH por encima de 6,0, y un óptimo rendimiento a un pH de alrededor de 6,5.

Tabla 34. Condiciones de amortiguador para evaluar la estabilidad de sialilación

pH	Sal	Concentración salina (mM)	Amortiguador	Concentración del amortiguador (mM)
5,8	Nulo	0	Succinato	10
6,2	Nulo	0	Succinato	10
6,6	Nulo	0	Succinato	10
6,9	Nulo	0	Succinato	10
5,8	NaCl	150	Succinato	10
6,3	NaCl	150	Succinato	10
6,6	NaCl	150	Succinato	10
6,9	NaCl	150	Succinato	10
6,1	Nulo	0	Histidina	10
6,5	Nulo	0	Histidina	10
6,9	Nulo	0	Histidina	10
6,1	NaCl	150	Histidina	10
6,5	NaCl	150	Histidina	10
6,9	NaCl	150	Histidina	10

Ejemplo 15: Formulación de GBS6

Para determinar la elección del amortiguador, GBS Ia-CRM₁₉₇, GBS Ib-CRM₁₉₇, GBS II-CRM₁₉₇, GBS III-CRM₁₉₇, GBS IV-CRM₁₉₇ y GBS V-CRM₁₉₇ (GBS6) se formularon juntos usando las mismas condiciones de amortiguador que se indican en la Tabla 33 anterior. El pH real de las formulaciones se evaluó en los siguientes puntos temporales: 0 (cuando se elabora la formulación), después de 1 mes a 5 °C, después de 1 mes a 25 °C y después de 1 mes a 37 °C. Se observó un cambio en el pH en las formulaciones usando succinato como amortiguador, mientras que no se observó ningún cambio en las formulaciones

usando histidina como amortiguador. Los resultados se muestran en las Figuras 9-10.

También se evaluó el efecto de la concentración del amortiguador de histidina en la fijación de conjugados de GBS a aluminio. Una formulación que comprende 150 mM de NaCl, 0,01 % de polisorbato 80 a pH 6,5, y 0,5 mg/ml de aluminio como AlPO_4 se evaluó con dos concentraciones diferentes de conjugados (10 mcg/ml y 40 mg/ml de cada serotipo) y varias concentraciones diferentes de histidina. El porcentaje de conjugados unido a aluminio se determinó midiendo la cantidad total de cada uno de los conjugados en la vacuna y la cantidad total de cada uno de los conjugados unidos al aluminio. Los conjugados unidos se midieron centrifugando la formulación de la vacuna, volviendo a suspender el pelet de aluminio, solubilizando el aluminio y midiendo los conjugados unidos mediante nefelometría con anticuerpos policlonales específicos de serotipo contra cada uno de los serotipos. Los resultados se muestran en las Figuras 11-12. Se descubrió que la concentración del amortiguador de histidina influenció el porcentaje de cada serotipo unido a aluminio, y la influencia fue más pronunciada en la dosis más baja que en la dosis más alta.

Un estudio de agitación se realizó para determinar la cantidad de polisorbato 80 (PS80) que sería deseable. Las formulaciones de GBS6 que comprenden 20 mM de histidina, 150 mM de NaCl, 0,5 mg/ml de AlPO_4 (si está presente) y ya sea ningún PS80, 0,01 % de PS80, 0,02 % de PS80 o 0,03 % de PS80 a pH 6,5 se evaluaron para determinar el porcentaje de antigenicidad total perdido después de estrés por agitación. Las jeringas que se llenaron previamente con las formulaciones se agitaron a 500 RPM durante 72 horas a temperatura ambiente. Las muestras de control (sin agitar) se almacenaron a temperatura ambiente durante 72 horas. Los resultados se muestran en la Figura 13.

La concentración de aluminio en formulaciones de GBS6 también se estudió para determinar el efecto en los conjugados de GBS que se fijan a aluminio. Las formulaciones de GBS6 que comprenden 10 mM de histidina, 150 mM de NaCl, 0,02 % de PS80, y 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,75 mg/ml o 1,0 mg/ml de aluminio como fosfato de aluminio (AlPO_4) a pH 6,5 se evaluaron para determinar el porcentaje de conjugado unido a aluminio. El porcentaje de fijación a AlPO_4 aumentó con concentración de AlPO_4 en aumento. Los resultados se muestran en la Figura 14.

Ejemplo 16: Formulación liofilizada de GBS6

Una variedad de formulaciones liofilizadas de GBS6 (GBS Ia-CRM₁₉₇, GBS Ib-CRM₁₉₇, GBS II-CRM₁₉₇, GBS III-CRM₁₉₇, GBS IV-CRM₁₉₇ y GBS V-CRM₁₉₇) se evaluaron

para determinar estabilidad. Las formulaciones de dosis bajas (10 mcg/ml) y altas (50 mcg/ml) que comprenden 20 mM de histidina a pH 6,5, 0,02 % de PS80, alrededor de 28 mM de NaCl y 5,5 %, 7,0 % o 8,5 % (p/v) de sacarosa se liofilizaron. La estabilidad de las formulaciones liofilizadas se evaluó midiendo el pH y la humedad después de 4 meses a 5 °C, 4 meses a 37 °C y 1 mes a 50 °C. Todas las formulaciones estaban estables en función del pH y la humedad (no se muestran los datos). Además, el porcentaje de recuperación de antigenicidad para cada serotipo se evaluó para todas las formulaciones después de 1, 4 y 9 meses a 5 °C y 37 °C, y después de 1, 2 y 4 semanas a 50 °C. Los resultados se muestran en las Figuras 15-20.

Las siguientes variaciones en los excipientes también se prepararon y se evaluaron para obtener una dosis de 40 mcg/ml de formulación de GBS6: 1) 7 % (p/v) de sacarosa, 2) 2 % (p/v) de sacarosa y 4 % (p/v) de manitol, 3) 3 % (p/v) de sacarosa y 3 % (p/v) de manitol, 4) 2 % (p/v) de sacarosa y 4 % (p/v) de glicina, o 5) 3 % (p/v) de sacarosa y 3 % (p/v) de glicina. . El pH y la humedad de todas las cinco formulaciones estaban estables después de 3 meses a 5 °C, 3 meses a 25 °C, 3 meses a 37 °C y 1 mes a 50 °C (no se muestran los datos). Además, el porcentaje de recuperación de antigenicidad para cada serotipo se evaluó para todas las formulaciones después de 1, 3 y 7 meses a 52-8 °C, 25 °C y 37 °C, y después de 1, 2 y 4 semanas a 50 °C. Los resultados se muestran en las Figuras 21-25.

El porcentaje de antígeno unido a adyuvante de fosfato de aluminio para la vacuna de GBS6 en una formulación liofilizada reconstituida y una formulación líquida se evaluaron usando nefelometría. Las formulaciones liofilizadas y líquidas que contenían 20 mM de histidina, 0,02 % de PS80, 7,0 % (p/v) de sacarosa y 500 mcg/ml de aluminio como fosfato de aluminio se prepararon en dosis bajas (10 mcg/ml) y altas (50 mcg/ml). También se evaluaron diversas concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) para determinar el efecto sobre la fijación al antígeno. Los resultados para las formulaciones liofilizadas y las formulaciones líquidas se muestran en las Tablas 35 y 36, respectivamente. Las formulaciones de dosis bajas para composiciones liofilizadas y líquidas tuvieron resultados comparables cuando se usaron concentraciones de NaCl de alrededor de 150 mM y más.

Tabla 35. Porcentaje de antígeno unido a fosfato de aluminio en formulaciones liofilizadas reconstituidas con diversos niveles de NaCl

	NaCl (mM)	Ia (%)	Ib (%)	II (%)	III (%)	IV (%)	V(%)
10 mcg/ml de cada conjugado con 7,0 % de sacarosa	~23	40	36	31	34	38	39
	~80	46	45	37	40	44	44
	~150	78	69	63	62	82	84
	~300	77	64	63	60	79	86
50 mcg/ml de cada conjugado con 7,0 % de sacarosa	~23	21	23	24	18	27	24
	~34	24	23	23	21	27	40
	~150	66	58	52	46	65	67
	~300	65	56	50	48	66	64

Tabla 36. Porcentaje de antígeno unido a fosfato de aluminio en formulaciones líquidas con diversos niveles de NaCl

	NaCl (mM)	Ia (%)	Ib (%)	II (%)	III (%)	IV (%)	V (%)
10 mcg/ml de cada conjugado	40	78,4	72,4	62,9	73,3	70,9	70,8
	100	61,0	63,3	52,3	51,9	49,8	53,9
	150	72,7	77,0	68,1	67,1	64,0	71,0
	200	67,7	73,0	58,6	52,3	51,9	60,1
	300	78,3	79,2	71,1	57,1	58,0	74,1
50 mcg/ml de cada conjugado	100	50,5	38,3	49,0	52,8	51,7	37,9
	150	49,8	37,6	49,0	50,8	50,9	38,7
	200	40,1	35,9	45,3	47,4	44,0	34,7
	300	40,3	41,9	50,9	42,2	43,5	37,5

Aspectos de la invención

Las siguientes cláusulas describen formas de realización adicionales de la invención:

- C1. Un conjugado inmunógeno proteína-polisacárido que comprende un polisacárido capsular de estreptococo grupo B (GBS) y una proteína portadora, en donde el polisacárido capsular tiene un nivel de ácido siálico mayor de alrededor de 60 %.
- C2. El conjugado inmunógeno de C1, en donde el polisacárido capsular se selecciona del grupo que consiste en los serotipos Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII y IX.
- C3. El conjugado inmunógeno de C2, en donde el polisacárido capsular es de serotipo Ia.
- C4. El conjugado inmunógeno de C2, en donde el polisacárido capsular es de serotipo Ib.
- C5. El conjugado inmunógeno de C2, en donde el polisacárido capsular es de serotipo II.
- C6. El conjugado inmunógeno de C2, en donde el polisacárido capsular es de serotipo III.
- C7. El conjugado inmunógeno de C2, en donde el polisacárido capsular es de serotipo IV.
- C8. El conjugado inmunógeno de C2, en donde el polisacárido capsular es de serotipo V.
- C9. El conjugado inmunógeno de C2, en donde el polisacárido capsular es de serotipo VI.
- C10. El conjugado inmunógeno de C2, en donde el polisacárido capsular es de serotipo VII.
- C11. El conjugado inmunógeno de C2, en donde el polisacárido capsular es de serotipo VIII.
- C12. El conjugado inmunógeno de C2, en donde el polisacárido capsular es de serotipo IX.
- C13. El conjugado inmunógeno de cualquiera de C1-C12, en donde el polisacárido capsular tiene un nivel de ácido siálico mayor de alrededor de 95 %.
- C14. El conjugado inmunógeno de cualquiera de C1-C13, en donde el polisacárido capsular tiene un nivel de ácido siálico de alrededor de 100 %.
- C15. El conjugado inmunógeno de cualquiera de C1-C14, en donde los polisacáridos capsulares tienen al menos alrededor de 0,6 mM de ácido siálico por mM de polisacárido.
- C16. El conjugado inmunógeno de cualquiera de C1-C15, en donde los polisacáridos

capsulares tienen al menos alrededor de 0,65 mM de ácido siálico por mM de polisacárido.

C17. El conjugado inmunógeno de cualquiera de C1-C16, en donde los polisacáridos capsulares tienen al menos alrededor de 0,7 mM de ácido siálico por mM de polisacárido.

C18. El conjugado inmunógeno de cualquiera de C1-C17, en donde los polisacáridos capsulares tienen al menos alrededor de 0,75 mM de ácido siálico por mM de polisacárido.

C19. El conjugado inmunógeno de cualquiera de C1-C18, en donde los polisacáridos capsulares tienen al menos alrededor de 0,8 mM de ácido siálico por mM de polisacárido.

C20. El conjugado inmunógeno de cualquiera de C1-C19, en donde los polisacáridos capsulares tienen al menos alrededor de 0,85 mM de ácido siálico por mM de polisacárido.

C21. El conjugado inmunógeno de cualquiera de C1-C20, en donde los polisacáridos capsulares tienen alrededor de 0,9 mM de ácido siálico por mM de polisacárido.

C22. El conjugado inmunógeno de cualquiera de C1-C21, en donde los polisacáridos capsulares tienen al menos alrededor de 0,95 mM de ácido siálico por mM de polisacárido.

C23. El conjugado inmunógeno de cualquiera de C1-C22, en donde el polisacárido capsular tiene un peso molecular de alrededor de 5 kDa a alrededor de 1.000 kDa.

C24. El conjugado inmunógeno de cualquiera de C1-C23, en donde el polisacárido capsular tiene un peso molecular de alrededor de 25 kDa a alrededor de 750 kDa.

C25. El conjugado inmunógeno de cualquiera de C1-C24, en donde el polisacárido capsular tiene un peso molecular de alrededor de 25 kDa a alrededor de 400 kDa.

C26. El conjugado inmunógeno de cualquiera de C1-C25, en donde el polisacárido capsular tiene un peso molecular de alrededor de 25 kDa a alrededor de 200 kDa.

C27. El conjugado inmunógeno de cualquiera de C1-C25, en donde el polisacárido capsular tiene un peso molecular de alrededor de 100 kDa a alrededor de 400 kDa.

C28. El conjugado inmunógeno de cualquiera de C1-C27, en donde el peso molecular del conjugado es de alrededor de 300 kDa a alrededor de 20.000 kDa.

C29. El conjugado inmunógeno de cualquiera de C1-C28, en donde el peso molecular del conjugado es de alrededor de 1.000 kDa a alrededor de 15.000 kDa.

C30. El conjugado inmunógeno de cualquiera de C1-C29, en donde el peso molecular del conjugado es de alrededor de 1.000 kDa a alrededor de 10.000 kDa.

C31. El conjugado inmunógeno de cualquiera de C1-C30, en donde el polisacárido capsular tiene una O-acetilación de alrededor de 0 % a alrededor de 40 %.

C32. El conjugado inmunógeno de cualquiera de C1-C31, en donde el polisacárido capsular tiene una O-acetilación menor de alrededor de 5 %.

- C33. El conjugado inmunógeno de cualquiera de C1-C32, en donde el polisacárido capsular tiene una O-acetilación menor de alrededor de 4 %.
- C34. El conjugado inmunógeno de cualquiera de C1-C33, en donde el polisacárido capsular tiene una O-acetilación menor de alrededor de 3 %.
- C35. El conjugado inmunógeno de cualquiera de C1-C34, en donde el polisacárido capsular tiene una O-acetilación menor de alrededor de 2 %.
- C36. El conjugado inmunógeno de cualquiera de C1-C35, en donde el polisacárido capsular tiene una O-acetilación menor de alrededor de 1 %.
- C37. El conjugado inmunógeno de cualquiera de C1-C36, en donde el polisacárido capsular comprende al menos alrededor de 0,1 mM de O-acetato por mM de unidad de repetición de sacáridos.
- C38. El conjugado inmunógeno de cualquiera de C1-C37, en donde el polisacárido capsular comprende al menos alrededor de 0,2 mM de O-acetato por mM de unidad de repetición de sacáridos.
- C39. El conjugado inmunógeno de cualquiera de C1-C38, en donde el polisacárido capsular comprende al menos alrededor de 0,3 mM de O-acetato por mM de unidad de repetición de sacáridos.
- C40. El conjugado inmunógeno de cualquiera de C1-C39, en donde el polisacárido capsular comprende al menos alrededor de 0,35 mM de O-acetato por mM de unidad de repetición de sacáridos.
- C41. El conjugado inmunógeno de cualquiera de C1-C40, en donde el polisacárido capsular comprende alrededor de 0,4 mM de O-acetato por mM de unidad de repetición de sacáridos.
- C42. El conjugado inmunógeno de cualquiera de C1-C41, en donde el polisacárido capsular comprende menos de alrededor de 0,01 mM de O-acetato por mM de unidad de repetición de sacáridos.
- C43. El conjugado inmunógeno de cualquiera de C1-C42, en donde el polisacárido capsular comprende menos de alrededor de 0,05 mM de O-acetato por mM de unidad de repetición de sacáridos.
- C44. El conjugado inmunógeno de cualquiera de C1-C43, en donde el polisacárido capsular comprende menos de alrededor de 0,04 mM de O-acetato por mM de unidad de repetición de sacáridos.
- C45. El conjugado inmunógeno de cualquiera de C1-C44, en donde el polisacárido

capsular comprende menos de alrededor de 0,03 mM de O-acetato por mM de unidad de repetición de sacáridos.

C46. El conjugado inmunógeno de cualquiera de C1-C45, en donde el polisacárido capsular comprende menos de alrededor de 0,02 mM de O-acetato por mM de unidad de repetición de sacáridos.

C47. El conjugado inmunógeno de cualquiera de C1-C46, en donde los polisacáridos se conjugan, cada uno individualmente, con la proteína portadora.

C48. El conjugado inmunógeno de cualquiera de C1-C47, en donde la proteína portadora es CRM₁₉₇ o toxoide tetánico.

C49. El conjugado inmunógeno de cualquiera de C1-C48, en donde la proteína portadora es CRM₁₉₇.

C50. Un método para aislar un polisacárido capsular, que comprende hacer reaccionar un reactivo orgánico con un cultivo celular que comprende una bacteria productora de polisacárido capsular.

C51. El método de C50, en donde la bacteria no se lisa.

C52. El método de C50 o C51, en donde la bacteria se inactiva por calor.

C53. El método de cualquiera de C50-C52, en donde el método también comprende la etapa de centrifugación para proporcionar una pasta celular.

C54. El método de cualquiera de C50-C53, en donde el método también comprende la etapa de filtración.

C55. El método de C54, en donde dicha etapa de filtración es una diafiltración.

C56. El método de cualquiera de C50-C56, en donde la bacteria productora de polisacárido capsular se selecciona del grupo que consiste en *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria meningitidis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis*.

C57. El método de C56, en donde las bacterias son *Streptococcus agalactiae*.

C58. El método de cualquiera de C50-C57, en donde los reactivos orgánicos son compuestos de hidroxilamina derivatizados.

C59. El método de cualquiera de C50-58, en donde la hidroxilamina es cualquier hidroxilamina enumerada en la Tabla 2 del Ejemplo 2.

C60. El método de cualquiera de C50-C59, en donde la hidroxilamina se selecciona del grupo que consiste en dibencil hidroxilamina; dietil hidroxilamina; hidroxilamina;

etilendiamina; trietilentetramina; 1,1,4,7,10,10 hexametil trietilentetramina; y 2,6,10,trimetil 2,6,10 triazaundecano.

C61. El método de cualquiera de C50-C60, en donde la concentración de hidroxilamina es de alrededor de 5 mM a alrededor de 200 mM.

C62. El método de cualquiera de C50-C61, en donde el pH de la reacción es de alrededor de 5,5 a alrededor de 9,5.

C63. El método de cualquiera de C50-C62, en donde la reacción se lleva a cabo a una temperatura de alrededor de 20 °C a alrededor de 85 °C.

C64. El método de cualquiera de C50-C63, en donde el tiempo de reacción es de alrededor de 10 horas a alrededor de 90 horas.

C65. Un método para obtener el conjugado inmunógeno proteína-polisacárido de cualquiera de C1-C49, en donde el polisacárido capsular se aísla de acuerdo con el método de cualquiera de C50-C64.

C66. Un conjugado inmunógeno proteína-polisacárido que comprende un polisacárido capsular preparado mediante el método de cualquiera de C50-C64.

C67. Una composición inmunógena que comprende el conjugado inmunógeno proteína-polisacárido de cualquiera de C1-C49 o C66.

C68. Una composición inmunógena que comprende conjugados proteína-polisacárido, en donde los conjugados comprenden polisacáridos capsulares de estreptococo grupo B (GBS) serotipo IV y al menos un serotipo adicional seleccionado del grupo que consiste en Ia, Ib, II, III, V, VI, VII, VIII y IX.

C69. La composición inmunógena de C68, en donde al menos un serotipo adicional es Ia.

C70. La composición inmunógena de C69, en donde la composición también comprende un conjugado que comprende un polisacárido capsular de GBS serotipo Ib.

C71. La composición inmunógena de C69 o C70, en donde la composición también comprende un conjugado que comprende un polisacárido capsular de GBS serotipo II.

C72. La composición inmunógena de cualquiera de C69-C71, en donde la composición también comprende un conjugado que comprende un polisacárido capsular de GBS serotipo III.

C73. La composición inmunógena de cualquiera de C69-C72, en donde la composición también comprende un conjugado que comprende un polisacárido capsular de GBS serotipo V.

- C74. La composición inmunógena de cualquiera de C69-C73, en donde la composición también comprende un conjugado que comprende un polisacárido capsular de GBS serotipo VI.
- C75. La composición inmunógena de cualquiera de C69-C74, en donde la composición también comprende un conjugado que comprende un polisacárido capsular de GBS serotipo VII.
- C76. La composición inmunógena de cualquiera de C69-C75, en donde la composición también comprende un conjugado que comprende un polisacárido capsular de GBS serotipo VIII.
- C77. La composición inmunógena de cualquiera de C69-C76, en donde la composición también comprende un conjugado que comprende un polisacárido capsular de GBS serotipo IX.
- C78. La composición inmunógena de C68, en donde al menos un serotipo adicional es Ib.
- C79. La composición inmunógena de C78, en donde la composición también comprende un conjugado que comprende un polisacárido capsular de GBS serotipo II.
- C80. La composición inmunógena de C78 o C79, en donde la composición también comprende un conjugado que comprende un polisacárido capsular de GBS serotipo III.
- C81. La composición inmunógena de cualquiera de C78-C80, en donde la composición también comprende un conjugado que comprende un polisacárido capsular de GBS serotipo V.
- C82. La composición inmunógena de cualquiera de C78-C81, en donde la composición también comprende un conjugado que comprende un polisacárido capsular de GBS serotipo VI.
- C83. La composición inmunógena de cualquiera de C78-C82, en donde la composición también comprende un conjugado que comprende un polisacárido capsular de GBS serotipo VII.
- C84. La composición inmunógena de cualquiera de 8-C83, en donde la composición también comprende un conjugado que comprende un polisacárido capsular de GBS serotipo VIII.
- C85. La composición inmunógena de cualquiera de C78-C84, en donde la composición también comprende un conjugado que comprende un polisacárido capsular de GBS serotipo IX.

- C86. La composición inmunógena de C68, en donde al menos un serotipo adicional es II.
- C87. La composición inmunógena de C86, en donde la composición también comprende un conjugado que comprende un polisacárido capsular de GBS serotipo III.
- C88. La composición inmunógena de C86 o C87, en donde la composición también comprende un conjugado que comprende un polisacárido capsular de GBS serotipo V.
- C89. La composición inmunógena de cualquiera de C86-C88, en donde la composición también comprende un conjugado que comprende un polisacárido capsular de GBS serotipo VI.
- C90. La composición inmunógena de cualquiera de C86-C89, en donde la composición también comprende un conjugado que comprende un polisacárido capsular de GBS serotipo VII.
- C91. La composición inmunógena de cualquiera de C86-C90, en donde la composición también comprende un conjugado que comprende un polisacárido capsular de GBS serotipo VIII.
- C92. La composición inmunógena de cualquiera de C86-C91, en donde la composición también comprende un conjugado que comprende un polisacárido capsular de GBS serotipo IX.
- C93. La composición inmunógena de C68, en donde al menos un serotipo adicional es III.
- C94. La composición inmunógena de C93, en donde la composición también comprende un conjugado que comprende un polisacárido capsular de GBS serotipo V.
- C95. La composición inmunógena de C93 o C94, en donde la composición también comprende un conjugado que comprende un polisacárido capsular de GBS serotipo VI.
- C96. La composición inmunógena de cualquiera de C93-C95, en donde la composición también comprende un conjugado que comprende un polisacárido capsular de GBS serotipo VII.
- C97. La composición inmunógena de cualquiera de C93-C96, en donde la composición también comprende un conjugado que comprende un polisacárido capsular de GBS serotipo VIII.
- C98. La composición inmunógena de cualquiera de C93-C97, en donde la composición también comprende un conjugado que comprende un polisacárido capsular de GBS serotipo IX.
- C99. La composición inmunógena de C68, en donde al menos un serotipo adicional es V.

- C100. La composición inmunógena de C99, en donde la composición también comprende un conjugado que comprende un polisacárido capsular de GBS serotipo VI.
- C101. La composición inmunógena de cualquiera de C99 o C100, en donde la composición también comprende un conjugado que comprende un polisacárido capsular de GBS serotipo VII.
- C102. La composición inmunógena de cualquiera de C99-C101, en donde la composición también comprende un conjugado que comprende un polisacárido capsular de GBS serotipo VIII.
- C103. La composición inmunógena de cualquiera de C99-C102, en donde la composición también comprende un conjugado que comprende un polisacárido capsular de GBS serotipo IX.
- C104. La composición inmunógena de C68, en donde al menos un serotipo adicional es VI.
- C105. La composición inmunógena de C104, en donde la composición también comprende un conjugado que comprende un polisacárido capsular de GBS serotipo VII.
- C106. La composición inmunógena de cualquiera de C104 o C105, en donde la composición también comprende un conjugado que comprende un polisacárido capsular de GBS serotipo VIII.
- C107. La composición inmunógena de cualquiera de C104-C106, en donde la composición también comprende un conjugado que comprende un polisacárido capsular de GBS serotipo IX.
- C108. La composición inmunógena de C68, en donde al menos un serotipo adicional es VII.
- C109. La composición inmunógena de C108, en donde la composición también comprende un conjugado que comprende un polisacárido capsular de GBS serotipo VIII.
- C110. La composición inmunógena de cualquiera de C108 o C109, en donde la composición también comprende un conjugado que comprende un polisacárido capsular de GBS serotipo IX.
- C111. La composición inmunógena de C68, en donde al menos un serotipo adicional es VIII.
- C112. La composición inmunógena de C111, en donde la composición también comprende un conjugado que comprende un polisacárido capsular de GBS serotipo IX.
- C113. La composición inmunógena de C112, en donde al menos un serotipo adicional es

IX.

C114. Una composición inmunógena que comprende conjugados proteína-polisacárido, en donde los conjugados comprenden polisacáridos capsulares de GBS serotipos Ia, Ib, II, III y IV.

C115. Una composición inmunógena que comprende conjugados proteína-polisacárido, en donde los conjugados comprenden polisacáridos capsulares de GBS serotipos Ia, Ib, II, III y V.

C116. Una composición inmunógena que comprende conjugados proteína-polisacárido, en donde los conjugados comprenden polisacáridos capsulares de GBS serotipos Ia, Ib, II, III, IV y V.

C117. Una composición inmunógena que comprende conjugados proteína-polisacárido que comprenden al menos cuatro serotipos de polisacárido capsular de GBS seleccionados del grupo que consiste en Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII y IX.

C118. La composición inmunógena de C117, en donde la composición comprende al menos cinco serotipos de polisacárido capsular de GBS.

C119. La composición inmunógena de C117 o C118, en donde la composición comprende al menos seis serotipos de polisacárido capsular de GBS.

C120. La composición inmunógena de cualquiera de C117-C119, en donde la composición comprende al menos siete serotipos de polisacárido capsular de GBS.

C121. La composición inmunógena de cualquiera de C117-C120, en donde la composición comprende al menos ocho serotipos de polisacárido capsular de GBS.

C122. La composición inmunógena de cualquiera de C117-C121, en donde la composición comprende al menos nueve serotipos de polisacárido capsular de GBS.

C123. La composición inmunógena de cualquiera de C117-C122, en donde la composición comprende un polisacárido capsular de GBS serotipo V.

C124. La composición inmunógena de cualquiera de C117-C123, en donde la composición no tiene interferencia inmunitaria.

C125. La composición inmunógena de cualquiera de C67-C124, en donde la composición también comprende un excipiente, un amortiguador, un estabilizante, un adyuvante, un crioprotector, una sal, un catión divalente, un detergente no iónico, un inhibidor de oxidación de radicales libres, un portador aceptables desde el punto de vista farmacéutico, o una mezcla de estos.

C126. La composición inmunógena de cualquiera de C67-C125, en donde la composición

también comprende un amortiguador.

C127. La composición inmunógena de C126, en donde el amortiguador se selecciona del grupo que consiste en HEPES, PIPES, MES, Tris (trimetamina), fosfato, acetato, borato, citrato, glicina, histidina y succinato.

C128. La composición inmunógena de C127, en donde el amortiguador es histidina.

C129. La composición inmunógena de cualquiera de C67-C128, en donde la composición también comprende un tensioactivo.

C130. La composición inmunógena de C129, en donde el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en ésteres de ácidos grasos de polioxietilen sorbitán, polisorbato 80, polisorbato 60, polisorbato 40, polisorbato 20 y alquiléteres de polioxietileno.

C131. La composición inmunógena de C130, en donde el tensioactivo es polisorbato 80.

C132. La composición inmunógena de cualquiera de C67-C131, en donde la composición también comprende un excipiente.

C133. La composición inmunógena de C132, en donde el excipiente se selecciona del grupo que consiste en almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, rafinosa, estaquiosa, melecitosa, dextrano, manitol, lactitol, palatinita, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, glicina, arginina, lisina, cloruro de sodio (NaCl), leche descremada seca, glicerol, propilenglicol, agua, etanol.

C134. La composición inmunógena de C133, en donde el excipiente es cloruro de sodio.

C135. La composición inmunógena de cualquiera de C67-C134, en donde la composición también comprende un adyuvante.

C136. La composición inmunógena de cualquiera de C135, en donde el adyuvante es un adyuvante a base de aluminio o QS-21.

C137. La composición inmunógena de cualquiera de C136, en donde el adyuvante a base de aluminio se selecciona del grupo que consiste en fosfato de aluminio, hidroxil fosfato de aluminio e hidróxido de aluminio.

C138. La composición inmunógena de cualquiera de C137, en donde el adyuvante es fosfato de aluminio.

C139. La composición inmunógena de cualquiera de C138, en donde el adyuvante es hidroxil fosfato de aluminio.

C140. La composición inmunógena de cualquiera de C67-C139, en donde la composición comprende un amortiguador, un tensioactivo, un excipiente, y de manera opcional, un adyuvante, en donde la composición se amortigua a un pH de alrededor de 6,0 a alrededor

de 7,0.

C141. La composición inmunógena de cualquiera de C67-C140, en donde la composición comprende histidina, polisorbato 80, cloruro de sodio, y de manera opcional, fosfato de aluminio, en donde la composición se amortigua a un pH de alrededor de 6,0 a alrededor de 7,0.

C142. La composición inmunógena de cualquiera de C67-C141, en donde la composición comprende alrededor de 10 mM a alrededor de 25 mM de histidina, alrededor de 0,01 % a alrededor de 0,03 % (v/p) de polisorbato 80, alrededor de 10 mM a alrededor de 250 mM de cloruro de sodio, y de manera opcional, alrededor de 0,25 mg/ml a alrededor de 0,75 mg/ml de aluminio como fosfato de aluminio.

C143. La composición inmunógena de cualquiera de C67-C142, en donde la composición comprende una dosis de alrededor de 5 mcg/ml a alrededor de 50 mcg/ml.

C144. La composición inmunógena de cualquiera de C67-C143, en donde la composición se liofiliza, opcionalmente en presencia de al menos un excipiente.

C145. La composición inmunógena de C144, en donde al menos un excipiente se selecciona del grupo que consiste en almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, rafinosa, estaquiosa, melecitosa, dextrano, manitol, lactitol, palatinita, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, glicina, arginina, lisina, cloruro de sodio (NaCl), leche descremada seca, glicerol, propilenglicol, agua y etanol.

C146. La composición inmunógena de C145, en donde al menos un excipiente es sacarosa.

C147. La composición inmunógena de cualquiera de C144-C146, en donde la composición comprende alrededor de 1 % (p/v) a alrededor de 10 % (p/v) de al menos un excipiente.

C148. La composición inmunógena de cualquiera de C144-C147, en donde la composición comprende un excipiente adicional.

C149. La composición inmunógena de C148, en donde el excipiente adicional es manitol o glicina.

C150. La composición inmunógena de C148 o C149, en donde la composición comprende alrededor de 1 % (p/v) a alrededor de 10 % (p/v) del excipiente adicional.

C151. La composición inmunógena de cualquiera de C143-C150, en donde la composición se reconstituye con agua, agua para inyección (WFI), una suspensión de adyuvante o solución salina.

- C152. Una composición inmunógena de cualquiera de C67-C151 para usar como un medicamento.
- C153. Una composición inmunógena de cualquiera de C67-C152 para usar en un método para inducir una respuesta inmunitaria contra GBS en un sujeto.
- C154. La composición inmunógena de C153, en donde el sujeto es una hembra que planea quedar preñada o una hembra preñada.
- C155. La composición inmunógena de C154, en donde la hembra se encuentra en la segunda mitad de la preñez.
- C156. La composición inmunógena de C155, en donde la hembra preñada se encuentra al menos en la semana 20 de gestación.
- C157. La composición inmunógena de C156, en donde la hembra preñada se encuentra en la semana 27 a 36 de gestación.
- C158. La composición inmunógena de C157, en donde el sujeto es un adulto de 50 años o más.
- C159. La composición inmunógena de C158, en donde el sujeto es un adulto de 65 años o más.
- C160. La composición inmunógena de C159, en donde el sujeto es un adulto de 85 años o más.
- C161. La composición inmunógena de cualquiera de C153-C160, en donde el sujeto está inmunodeprimido.
- C162. La composición inmunógena de C161, en donde el sujeto tiene una afección seleccionada del grupo que consiste en obesidad, diabetes, infección por VIH, cáncer, enfermedad cardiovascular o enfermedad hepática.
- C163. La composición inmunógena de cualquiera de C153-162, en donde el estreptococo grupo B es *Streptococcus agalactiae*.
- C164. Un método para inducir una respuesta inmunitaria contra el estreptococo grupo B que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de la composición inmunógena de cualquiera de C67-C150.
- C165. Un método para prevenir o reducir una enfermedad o afección asociada al estreptococo grupo B en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de la composición inmunógena de cualquiera de C67-C151.
- C166. El método de C164 o C165, en donde el sujeto es una hembra que planea quedar preñada o una hembra preñada.

C167. El método de C166, en donde la hembra se encuentra en la segunda mitad de la preñez.

C168. El método de C166 o C167, en donde la hembra preñada se encuentra al menos en la semana 20 de gestación.

C169. El método de cualquiera de C166-C168, en donde la hembra preñada se encuentra en la semana 27 a 36 de gestación.

C170. El método de C164 o C165, en donde el sujeto es un adulto de 50 años o más.

C171. El método de C170, en donde el sujeto es un adulto de 65 años o más.

C172. El método de C170 o C171, en donde el sujeto es un adulto de 85 años o más.

C173. El método de cualquiera de C164-C172, en donde el sujeto está inmunodeprimido.

C174. El método de C173, en donde el sujeto tiene una afección seleccionada del grupo que consiste en obesidad, diabetes, infección por VIH, cáncer, enfermedad cardiovascular o enfermedad hepática.

C175. El método de cualquiera de C164-C174, en donde el estreptococo grupo B es *Streptococcus agalactiae*.

C176. Un anticuerpo que se fija a un polisacárido capsular en el conjugado inmunógeno de cualquiera de C1-C49 o C66.

C177. Una composición que comprende el anticuerpo de C176.

C178. Un método para producir un anticuerpo, que comprende administrar la composición inmunógena de cualquiera de C67-C151 a un sujeto.

C179. Un anticuerpo producido mediante el método de C178.

C180. Un método para conferir inmunidad pasiva a un sujeto, que comprende las etapas de:

(a) generar una preparación de anticuerpo usando la composición inmunógena de cualquiera de C67-C151; y

(b) administrar la preparación de anticuerpos al sujeto para conferir inmunidad pasiva.

C181. Un método para obtener un conjugado inmunógeno proteína-polisacárido de cualquiera de C1-C49 o C66, que comprende las etapas de:

(a) hacer reaccionar el polisacárido capsular de GBS con un agente oxidante, lo que da como resultado un polisacárido activado; y

(b) hacer reaccionar el polisacárido activado con una proteína portadora, lo que da como resultado un conjugado proteína-polisacárido.

- C182. El método de C181, en donde la etapa (b) se lleva a cabo en un solvente aprótico polar.
- C183. El método de C182, en donde el solvente se selecciona del grupo que consiste en dimetilsulfóxido (DMSO), sulfolano, dimetilformamida (DMF) y hexametilfosforamida (HMPA).
- C184. El método de C183, en donde el solvente es dimetilsulfóxido (DMSO).
- C185. El método de cualquiera de C181-C184, en donde el polisacárido se hace reaccionar con 0,01 a 10,0 equivalentes molares del agente oxidante.
- C186. El método de cualquiera de C181-C185, en donde el agente oxidante es periodato.
- C187. El método de C186, en donde el periodato es periodato de sodio.
- C188. El método de cualquiera de C181-C187, en donde la reacción de oxidación de la etapa (a) dura entre 1 hora y 50 horas.
- C189. El método de cualquiera de C181-C188, en donde la temperatura de la reacción de oxidación se mantiene entre alrededor de 2 °C y alrededor de 25 °C.
- C190. El método de cualquiera de C181-C189, en donde la reacción de oxidación se lleva a cabo en un amortiguador seleccionado del grupo que consiste en fosfato de sodio, fosfato de potasio, ácido 2-(N-morfolino)etansulfónico (MES) y Bis-Tris.
- C191. El método de C190, en donde el amortiguador tiene una concentración de alrededor de 1 mM a alrededor de 500 mM.
- C192. El método de cualquiera de C181-C191, en donde la reacción de oxidación se lleva a cabo a un pH de alrededor de 4,0 a alrededor de 8,0.
- C193. El método de C181, en donde el agente oxidante es 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi (TEMPO).
- C194. El método de C193, en donde N-clorosuccinimida (NCS) es un cooxidante.
- C195. El método de cualquiera de C181-C194, en donde la etapa (a) también comprende inactivar la reacción de oxidación agregando un agente de inactivación.
- C196. El método de cualquiera de C182-C195, en donde la concentración de polisacárido es de alrededor de 0,1 mg/ml a alrededor de 10,0 mg/ml.
- C197. El método de cualquiera de C181-C196, en donde el grado de oxidación del polisacárido activado es entre 5 y 25.
- C198. El método de cualquiera de C181-C197, en donde el método también comprende la etapa de liofilizar el polisacárido activado.
- C199. El método de C188, en donde el polisacárido activado se liofiliza en presencia de un

sacárido seleccionado del grupo que consiste en sacarosa, trehalosa, rafinosa, estaquiosa, melecitosa, dextrano, manitol, lactitol y palatinita.

C200. El método de cualquiera de C181-C199, en donde la etapa (b) comprende:

(1) formular un compuesto con el polisacárido activado y una proteína portadora, y

(2) hacer reaccionar el compuesto de polisacárido activado y proteína portadora con un agente reductor para formar un conjugado proteína portadora-polisacárido capsular de GBS.

C201. El método de C200, en donde la concentración de polisacárido activado en la etapa (2) es de alrededor de 0,1 mg/ml a alrededor de 10,0 mg/ml.

C202. El método de C200 o C201, en donde la relación inicial (peso en peso) de polisacárido activado con respecto a la proteína portadora es entre 5:1 y 0,1:1.

C203. El método de cualquiera de C200-C202, en donde el agente reductor se selecciona del grupo que consiste en cianoborohidruro de sodio, triacetoxiborohidruro de sodio, borohidruro de sodio o zinc en presencia de ácidos de Bronsted o Lewis, piridina borano, 2-picolino borano, 2,6-diboran-metanol, dimetilamin-borano, t-BuMeⁱPrN-BH₃, bencilamin-BH₃ o 5-etil-2-metilpiridina borano (PEMB).

C204. El método de C203, en donde el agente reductor es cianoborohidruro de sodio.

C205. El método de cualquiera de C200-C204, en donde la cantidad de agente reductor es de alrededor de 0,1 a alrededor de 10,0 equivalentes molares.

C206. El método de cualquiera de C200-C205, en donde la reacción de reducción de la etapa (2) dura entre 1 hora y 60 horas.

C207. El método de cualquiera de C200-C206, en donde la temperatura de la reacción de reducción se mantiene entre alrededor de 10 °C y 40 °C.

C208. El método de cualquiera de C181-C207, en donde el método también comprende una etapa (etapa(c)) de bloqueo de aldehído sin reaccionar mediante la adición de un borohidruro.

C209. El método de C208, en donde la cantidad de borohidruro es de alrededor de 0,1 a alrededor de 10,0 equivalentes molares.

C210. El método de C208, en donde el borohidruro se selecciona del grupo que consiste en borohidruro de sodio (NaBH₄), cianoborohidruro de sodio, borohidruro de litio, borohidruro de potasio, borohidruro de tetrabutilamonio, borohidruro de calcio y borohidruro de magnesio.

C211. El método de C292, en donde el borohidruro es borohidruro de sodio (NaBH₄).

C212. El método de cualquiera de C207-C211, en donde la etapa de bloqueo dura entre 0,1 horas y 10 horas.

C213. El método de cualquiera de C207-C212, en donde la temperatura de la etapa de bloqueo se mantiene entre alrededor de 15 °C y alrededor de 45 °C.

C214. El método de cualquiera de C181-C213, en donde el método también comprende la etapa de purificación del conjugado proteína-polisacárido.

C215. El método de cualquiera de C181-C214, en donde el conjugado proteína-polisacárido comprende menos de alrededor de 40 % de polisacárido libre en comparación con la cantidad total de polisacárido.

C216. El método de cualquiera de C181-C215, en donde la relación (peso en peso) de polisacárido con respecto a la proteína portadora en el conjugado es de alrededor de 0,5 a alrededor de 3,0.

C217. El método de cualquiera de C181-C216, en donde el grado de conjugación del conjugado es entre 2 y 15.

C218. Un método para obtener un conjugado proteína-polisacárido, que comprende las etapas de:

(a) hacer reaccionar el polisacárido capsular de GBS aislado con un agente oxidante;

(b) inactivar la reacción de oxidación de la etapa (a) agregando un agente de inactivación que da como resultado un polisacárido capsular de GBS activado;

(c) formular un compuesto con el polisacárido capsular de GBS activado y una proteína portadora,

(d) hacer reaccionar el compuesto de polisacárido capsular de GBS activado y proteína portadora con un agente reductor para formar un conjugado proteína portadora-polisacárido capsular de GBS, y

(e) bloquear el aldehído sin reaccionar mediante la adición de borohidruro de sodio (NaBH_4),

en donde las etapas (c) y (d) se llevan a cabo en DMSO.

REIVINDICACIONES:

1. Un conjugado inmunógeno proteína-polisacárido que comprende un polisacárido capsular de estreptococo grupo B (GBS) y una proteína portadora, en donde el polisacárido capsular tiene un nivel de ácido siálico mayor de alrededor de 60 %, mayor de alrededor de 95 % o de alrededor de 100 %.
2. El conjugado inmunógeno de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el polisacárido capsular se selecciona del grupo que consiste en los serotipos Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII y IX.
3. El conjugado inmunógeno de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde los polisacáridos capsulares tienen al menos alrededor de 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9 o 0,95 mM de ácido siálico por mM de polisacárido.
4. El conjugado inmunógeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el polisacárido capsular tiene un peso molecular de alrededor de 5 kDa a alrededor de 1.000 kDa, de alrededor de 25 kDa a alrededor de 750 kDa, de alrededor de 25 kDa a alrededor de 400 kDa, de alrededor de 25 kDa a alrededor de 200 kDa, o de alrededor de 100 kDa a alrededor de 400 kDa.
5. El conjugado inmunógeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el peso molecular del conjugado es de alrededor de 300 kDa a alrededor de 20.000 kDa, de alrededor de 1.000 kDa a alrededor de 15.000 kDa, o de alrededor de 1.000 kDa a alrededor 10.000 kDa.
6. El conjugado inmunógeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el polisacárido capsular tiene una O-acetilación de alrededor de 0 % a alrededor de 40 %.
7. El conjugado inmunógeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el polisacárido capsular tiene una O-acetilación menor de alrededor de 5 %, menor de alrededor 4 %, menor de alrededor de 3 %, menor de alrededor de 2 % o menor de alrededor de 1 %.
8. El conjugado inmunógeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el polisacárido capsular tiene al menos alrededor de 0,1, 0,2, 0,3, 0,35 o alrededor de 0,4 mM de O-acetato por mM de unidad de repetición de sacáridos.
9. El conjugado inmunógeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el polisacárido capsular tiene menos de alrededor de 0,01, 0,02, 0,03, 0,04 o 0,05 mM de O-acetato por mM de unidad de repetición de sacáridos.

10. El conjugado inmunógeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde la proteína portadora es CRM₁₉₇ o toxoide tetánico.
11. El conjugado inmunógeno de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la proteína portadora es CRM₁₉₇.
12. Un método para aislar un polisacárido capsular, que comprende hacer reaccionar un reactivo orgánico con un cultivo celular que comprende una bacteria productora de polisacárido capsular.
13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la bacteria no se lisa.
14. El método de acuerdo con la reivindicación 12 o la reivindicación 13, en donde la bacteria se inactiva por calor.
15. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-14, en donde el método también comprende la etapa de centrifugación para proporcionar una pasta celular.
16. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-15, en donde el método también comprende la etapa de filtración.
17. El método de acuerdo con la reivindicación 16, en donde dicha etapa de filtración es una diafiltración.
18. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-17, en donde la bacteria productora de polisacárido capsular se selecciona del grupo que consiste en *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria meningitidis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis*.
19. El método de acuerdo con la reivindicación 18, en donde las bacterias son *Streptococcus agalactiae*.
20. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-19, en donde los reactivos orgánicos son compuestos de hidroxilamina derivatizados.
21. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-20, en donde la hidroxilamina es cualquier hidroxilamina enumerada en la Tabla 2 del Ejemplo 2.
22. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-21, en donde la hidroxilamina se selecciona del grupo que consiste en dibencil hidroxilamina; dietil hidroxilamina; hidroxilamina; etilendiamina; trietilentetramina; 1,1,4,7,10,10 hexametil trietilentetramina; y 2,6,10,trimetil 2,6,10 triazaundecano.

23. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-22, en donde la concentración de hidroxilamina es de alrededor de 5 mM a alrededor de 200 mM.

24. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-23, en donde el pH de la reacción es de alrededor de 5,5 a alrededor de 9,5.

25. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-24, en donde la reacción se lleva a cabo a una temperatura de alrededor de 20 °C a alrededor de 85 °C.

26. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-26, en donde el tiempo de reacción es de alrededor de 10 horas a alrededor de 90 horas.

27. Un método para obtener el conjugado inmunógeno proteína-polisacárido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde el polisacárido capsular se aísla de acuerdo con el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-26.

28. Un conjugado inmunógeno proteína-polisacárido que comprende un polisacárido capsular preparado mediante el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-26.

29. Una composición inmunógena que comprende el conjugado inmunógeno proteína-polisacárido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11 o la reivindicación 28.

30. Una composición inmunógena que comprende conjugados proteína-polisacárido, en donde los conjugados comprenden polisacáridos capsulares de estreptococo grupo B (GBS) serotipo IV y al menos un serotipo adicional seleccionado del grupo que consiste en Ia, Ib, II, III, V, VI, VII, VIII y IX.

31. Una composición inmunógena que comprende conjugados proteína-polisacárido, en donde los conjugados comprenden polisacáridos capsulares de GBS serotipos Ia, Ib, II, III y IV.

32. Una composición inmunógena que comprende conjugados proteína-polisacárido, en donde los conjugados comprenden polisacáridos capsulares de GBS serotipos Ia, Ib, II, III y V.

33. Una composición inmunógena que comprende conjugados proteína-polisacárido, en donde los conjugados comprenden polisacáridos capsulares de GBS serotipos Ia, Ib, II, III, IV y V.

34. Una composición inmunógena que comprende conjugados proteína-polisacárido que comprenden al menos cuatro serotipos de polisacárido capsular de GBS seleccionados del grupo que consiste en Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII y IX.

35. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 34, en donde la composición comprende un polisacárido capsular de GBS serotipo V.

36. La composición inmunógena de acuerdo con las reivindicaciones 34 o 35, en donde la composición no tiene interferencia inmunitaria.

37. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 29-36, en donde la composición también comprende un excipiente, un amortiguador, un estabilizante, un adyuvante, un crioprotector, una sal, un catión divalente, un detergente no iónico, un inhibidor de oxidación de radicales libres, un portador aceptables desde el punto de vista farmacéutico, o una mezcla de estos.

38. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 29-37, en donde la composición también comprende un amortiguador.

39. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 38, en donde el amortiguador se selecciona del grupo que consiste en HEPES, PIPES, MES, Tris (trimetamina), fosfato, acetato, borato, citrato, glicina, histidina y succinato.

40. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 39, en donde el amortiguador es histidina.

41. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 29-40, en donde la composición también comprende un tensioactivo.

42. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 41, en donde el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en ésteres de ácidos grasos de polioxietilén sorbitán, polisorbato 80, polisorbato 60, polisorbato 40, polisorbato 20 y alquiléteres de polioxietileno.

43. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 42, en donde el tensioactivo es polisorbato 80.

44. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 29-43, en donde la composición también comprende un excipiente.

45. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 44, en donde el excipiente se selecciona del grupo que consiste en almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, rafinosa, estaquiosa, melecitosa, dextrano, manitol, lactitol, palatinita, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, glicina, arginina, lisina, cloruro de sodio (NaCl), leche descremada seca, glicerol, propilenglicol, agua y etanol.

46. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 45, en donde

el excipiente es cloruro de sodio.

47. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 29-46, en donde la composición también comprende un adyuvante.

48. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 47, en donde el adyuvante es un adyuvante a base de aluminio o QS-21.

49. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 48, en donde el adyuvante a base de aluminio se selecciona del grupo que consiste en fosfato de aluminio, hidroxil fosfato de aluminio e hidróxido de aluminio.

50. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 49, en donde el adyuvante es fosfato de aluminio.

51. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 49, en donde el adyuvante es hidroxil fosfato de aluminio.

52. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 29-51, en donde la composición comprende un amortiguador, un tensioactivo, un excipiente, y de manera opcional, un adyuvante, en donde la composición se amortigua a un pH de alrededor de 6,0 a alrededor de 7,0.

53. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 29-52, en donde la composición comprende histidina, polisorbato 80, cloruro de sodio, y de manera opcional, fosfato de aluminio, en donde la composición se amortigua a un pH de alrededor de 6,0 a alrededor de 7,0.

54. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 29-53, en donde la composición comprende alrededor de 10 mM a alrededor de 25 mM de histidina, alrededor de 0,01 % a alrededor de 0,03 % (v/p) de polisorbato 80, alrededor de 10 mM a alrededor de 250 mM de cloruro de sodio, y de manera opcional, alrededor de 0,25 mg/ml a alrededor de 0,75 mg/ml de aluminio como fosfato de aluminio.

55. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 29-54, en donde la composición comprende una dosis de alrededor de 5 mcg/ml a alrededor de 50 mcg/ml.

56. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 29-55, en donde la composición se liofiliza, opcionalmente en presencia de al menos un excipiente.

57. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 56, en donde

al menos un excipiente se selecciona del grupo que consiste en almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, rafinosa, estaquiosa, melecitosa, dextrano, manitol, lactitol, palatinita, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, glicina, arginina, lisina, cloruro de sodio (NaCl), leche descremada seca, glicerol, propilenglicol, agua y etanol.

58. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 57, en donde al menos un excipiente es sacarosa.

59. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 56-58, en donde la composición comprende alrededor de 1 % (p/v) a alrededor de 10 % (p/v) de al menos un excipiente.

60. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 56-59, en donde la composición comprende un excipiente adicional.

61. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 60, en donde el excipiente adicional es manitol o glicina.

62. La composición inmunógena de acuerdo con las reivindicaciones 60 o 61, en donde la composición comprende alrededor de 1 % (p/v) a alrededor de 10 % (p/v) del excipiente adicional.

63. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 29-66, en donde la composición se reconstituye con agua, agua para inyección (WFI), una suspensión de adyuvante o solución salina.

64. Una composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 29-63 para usar como medicamento.

65. Una composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 29-63 para usar en un método para inducir una respuesta inmunitaria contra GBS en un sujeto.

66. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 65, en donde el sujeto es una hembra que planea quedar preñada o una hembra preñada.

67. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 66, en donde la hembra se encuentra en la segunda mitad de la preñez, al menos en la semana 20 de gestación, o en la semana 27 a 36 de gestación.

68. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 65, en donde el sujeto es un adulto de 50 años o más, 65 años o más, y 85 años o más.

69. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las

reivindicaciones 65-68, en donde el sujeto está inmunodeprimido.

70. La composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 69, en donde el sujeto tiene una afección seleccionada del grupo que consiste en obesidad, diabetes, infección por VIH, cáncer, enfermedad cardiovascular o enfermedad hepática.

71. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 65-70, en donde el estreptococo grupo B es *Streptococcus agalactiae*.

72. Un método para inducir una respuesta inmunitaria contra el estreptococo grupo B, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de la composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 29-63.

73. Un método para prevenir o reducir una enfermedad o afección asociada al estreptococo grupo B en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de la composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 29-63.

74. El método de acuerdo con las reivindicaciones 72 o 73, en donde el sujeto es una hembra que planea quedar preñada o una hembra preñada.

75. El método de acuerdo con la reivindicación 74, en donde la hembra se encuentra en la segunda mitad de la preñez, al menos en la semana 20 de gestación, o en la semana 27 a 36 de gestación.

76. El método de acuerdo con las reivindicaciones 72 o 73, en donde el sujeto es un adulto de 50 años o más, 65 años o más, y 85 años o más.

77. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 72-76, en donde el sujeto está inmunodeprimido.

78. El método de acuerdo con la reivindicación 77, en donde el sujeto tiene una afección seleccionada del grupo que consiste en obesidad, diabetes, infección por VIH, cáncer, enfermedad cardiovascular o enfermedad hepática.

79. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 72-78, en donde el estreptococo grupo B es *Streptococcus agalactiae*.

80. Un anticuerpo que se fija a un polisacárido capsular en el conjugado inmunógeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11 o 28.

81. Una composición que comprende el anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 80.

82. Un método para producir un anticuerpo, que comprende administrar la composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 29-63 a un sujeto.

83. Un anticuerpo producido mediante el método de acuerdo con la reivindicación 82.

84. Un método para conferir inmunidad pasiva a un sujeto, que comprende las etapas de:

(a) generar una preparación de anticuerpos usando la composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 29-63; y

(b) administrar la preparación de anticuerpos al sujeto para conferir inmunidad pasiva.

85. Un método para obtener un conjugado inmunógeno proteína-polisacárido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11 o la reivindicación 28, que comprende las etapas de:

(a) hacer reaccionar el polisacárido capsular de GBS con un agente oxidante, lo que da como resultado un polisacárido activado; y

(b) hacer reaccionar el polisacárido activado con una proteína portadora, lo que da como resultado un conjugado proteína-polisacárido.

86. El método de acuerdo con la reivindicación 85, en donde la etapa (b) se lleva a cabo en un solvente aprótico polar.

87. El método de acuerdo con la reivindicación 86, en donde el solvente se selecciona del grupo que consiste en dimetilsulfóxido (DMSO), sulfolano, dimetilformamida (DMF) y hexametilfosforamida (HMPA).

88. El método de acuerdo con la reivindicación 87, en donde el solvente es dimetilsulfóxido (DMSO).

89. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 85-88, en donde el polisacárido se hace reaccionar con 0,01 a 10,0 equivalentes molares del agente oxidante.

90. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 85-89, en donde el agente oxidante es periodato.

91. El método de acuerdo con la reivindicación 90, en donde el periodato es periodato de sodio.

92. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 85-91, en donde la reacción de oxidación de la etapa (a) dura entre 1 hora y 50 horas.

93. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 85-92, en donde la temperatura de la reacción de oxidación se mantiene entre alrededor de 2 °C y alrededor

de 25 °C.

94. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 85-93, en donde la reacción de oxidación se lleva a cabo en un amortiguador seleccionado del grupo que consiste en fosfato de sodio, fosfato de potasio, ácido 2-(N-morfolino)etansulfónico (MES) y Bis-Tris.

95. El método de acuerdo con la reivindicación 94, en donde el amortiguador tiene una concentración de alrededor de 1 mM a alrededor de 500 mM.

96. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 85-95, en donde la reacción de oxidación se lleva a cabo a un pH de alrededor de 4,0 a alrededor de 8,0.

97. El método de acuerdo con la reivindicación 85, en donde el agente oxidante es 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi (TEMPO).

98. El método de acuerdo con la reivindicación 97, en donde N-clorosuccinimida (NCS) es un cooxidante.

99. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 85-98, en donde la etapa (a) también comprende inactivar la reacción de oxidación agregando un agente de inactivación.

100. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 85-99, en donde la concentración de polisacárido es de alrededor de 0,1 mg/ml a alrededor de 10,0 mg/ml.

101. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 85-100, en donde el grado de oxidación del polisacárido activado es entre 5 y 25.

102. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 85-101, en donde el método también comprende la etapa de liofilizar el polisacárido activado.

103. El método de acuerdo con la reivindicación 102, en donde el polisacárido activado se liofiliza en presencia de un sacárido seleccionado del grupo que consiste en sacarosa, trehalosa, rafinosa, estaquiosa, melecitosa, dextrano, manitol, lactitol y palatinita.

104. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 85-103, en donde la etapa (b) comprende:

(1) formular un compuesto con el polisacárido activado y una proteína portadora, y

(2) hacer reaccionar el compuesto de polisacárido activado y proteína portadora con un agente reductor para formar un conjugado proteína portadora-polisacárido capsular de GBS.

105. El método de acuerdo con la reivindicación 104, en donde la concentración

de polisacárido activado en la etapa (2) es de alrededor de 0,1 mg/ml a alrededor de 10,0 mg/ml.

106. El método de acuerdo con las reivindicaciones 104 o 105, en donde la relación inicial (peso en peso) de polisacárido activado con respecto a la proteína portadora es entre 5:1 y 0,1:1.

107. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 104-106, en donde el agente reductor se selecciona del grupo que consiste en cianoborohidruro de sodio, triacetoxiborohidruro de sodio, borohidruro de sodio y zinc en presencia de ácidos de Bronsted o Lewis, piridina borano, 2-picolino borano, 2,6-diboran-metanol, dimetilamin-borano, t-BuMeⁱPrN-BH₃, bencilamin-BH₃ o 5-etil-2-metilpiridina borano (PEMB).

108. El método de acuerdo con la reivindicación 107, en donde el agente reductor es cianoborohidruro de sodio.

109. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 104-108, en donde la cantidad de agente reductor es de alrededor de 0,1 a alrededor de 10,0 equivalentes molares.

110. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 104-109, en donde la reacción de reducción de la etapa (2) dura entre 1 hora y 60 horas.

111. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 104-110, en donde la temperatura de la reacción de reducción se mantiene entre 10 °C y 40 °C.

112. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 104-111, en donde el método también comprende una etapa (etapa(c)) de bloqueo de aldehído sin reaccionar mediante la adición de un borohidruro.

113. El método de acuerdo con la reivindicación 112, en donde la cantidad de borohidruro es de alrededor de 0,1 a alrededor de 10,0 equivalentes molares.

114. El método de acuerdo con la reivindicación 112, en donde el borohidruro se selecciona del grupo que consiste en borohidruro de sodio (NaBH₄), cianoborohidruro de sodio, borohidruro de litio, borohidruro de potasio, borohidruro de tetrabutilamonio, borohidruro de calcio y borohidruro de magnesio.

115. El método de acuerdo con la reivindicación 114, en donde el borohidruro es borohidruro de sodio (NaBH₄).

116. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 112-114, en donde la etapa de bloqueo dura entre 0,1 horas y 10 horas.

117. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 112-116, en

donde la temperatura de la etapa de bloqueo se mantiene entre alrededor de 15 °C y alrededor de 45 °C.

118. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 85-117, en donde el método también comprende la etapa de purificación del conjugado proteína-polisacárido.

119. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 85-118, en donde el conjugado proteína-polisacárido comprende menos de alrededor de 40 % de polisacárido libre en comparación con la cantidad total de polisacárido.

120. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 85-119, en donde la relación (peso en peso) de polisacárido con respecto a la proteína portadora en el conjugado es de alrededor de 0,5 a alrededor de 3,0.

121. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 85-120, en donde el grado de conjugación del conjugado es entre 2 y 15.

122. Un método para obtener un conjugado proteína-polisacárido, que comprende las etapas de:

(a) hacer reaccionar el polisacárido capsular de GBS aislado con un agente oxidante;

(b) inactivar la reacción de oxidación de la etapa (a) agregando un agente de inactivación que da como resultado un polisacárido capsular de GBS activado;

(c) formular un compuesto con el polisacárido capsular de GBS activado y una proteína portadora,

(d) hacer reaccionar el compuesto de polisacárido capsular de GBS activado y proteína portadora con un agente reductor para formar un conjugado proteína portadora-polisacárido capsular de GBS, y

(e) bloquear el aldehído sin reaccionar mediante la adición de borohidruro de sodio (NaBH_4),

en donde las etapas (c) y (d) se llevan a cabo en DMSO.

RESUMEN

La invención se refiere a conjugados inmunógenos proteína-polisacárido que comprenden un polisacárido capsular (CP) de *Streptococcus agalactiae*, denominado comúnmente estreptococo grupo B (GBS), y una proteína portadora, en donde CP se selecciona del grupo que consiste en los serotipos Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII y IX, y en donde CP tiene un nivel de ácido siálico mayor de alrededor de 60 %. La invención también se refiere a métodos para obtener los conjugados y las composiciones inmunógenas que comprenden los conjugados. La invención también se refiere a composiciones inmunógenas que comprenden conjugados proteína-polisacárido, en donde los conjugados comprenden un CP de GBS serotipo IV y al menos un serotipo adicional. Asimismo, la invención se refiere a métodos para inducir una respuesta inmunitaria en sujetos contra GBS y/o para reducir o prevenir la enfermedad por GBS invasivo en sujetos usando las composiciones descritas en la presente. Los anticuerpos resultantes se pueden usar para tratar o prevenir la infección por GBS mediante inmunoterapia pasiva.