

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 664**

51 Int. Cl.:

C12P 19/04 (2006.01)

A61K 39/09 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.11.2006** **E 06842366 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2012** **EP 1951886**

54 Título: **Procedimientos de cultivo semicontinuo de estreptococos**

30 Prioridad:

01.11.2005 GB 0522303

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.03.2013

73 Titular/es:

**NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS S.R.L.
(100.0%)
VIA FIORENTINA 1
53100 SIENA (SI), IT**

72 Inventor/es:

SWENNEN, ERWIN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 398 664 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimientos de cultivo semicontinuo de estreptococos

Campo técnico

La presente invención pertenece al campo de los cultivos bacterianos y específicamente, se refiere a la optimización de las condiciones de cultivo para mejorar la producción de polisacáridos capsulares bacterianos.

Técnica antecedentes

Los polisacáridos capsulares (cps) son importantes inmunógenos implicados en diversas enfermedades bacterianas. Esta característica ha hecho de ellos un importante componente en el diseño de vacunas. Han demostrado ser útiles para desencadenar respuestas inmunitarias cuando se unen a proteínas portadoras [1]. Típicamente, los polisacáridos capsulares se producen usando un cultivo discontinuo en un medio complejo (estreptococos del grupo B, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*), un cultivo semicontinuo (*H. influenzae*) o un cultivo continuo (estreptococos del grupo B y *Lactobacillus rhamnosus*) [2 - 7]. La mayoría de los estudios usan sistemas de cultivo discontinuos en los que la tasa de crecimiento, los niveles de nutrientes y las concentraciones metabólicas varían durante la incubación. En dichos sistemas, la alteración de un factor da como resultado cambios en los factores asociados con el crecimiento. Los cultivos continuos permiten al investigador separar y definir parámetros que son independientes durante el crecimiento del cultivo discontinuo, tales como la tasa de crecimiento, las concentraciones de nutrientes y de producto y la densidad celular. Durante el cultivo continuo se añade medio nuevo a un cultivo a una tasa fija, y las células y el medio se eliminan a una tasa que mantiene un volumen de cultivo constante. Se prefería el cultivo continuo para la producción de polisacáridos capsulares cuando se demostró que era dependiente de las condiciones [8].

Para los estreptococos del grupo B (GBS, *S. agalactiae*), se notificó que la tasa de crecimiento celular era el principal factor regulador de la producción de los polisacáridos capsulares. Adicionalmente, se demostró que la producción de polisacáridos capsulares de tipo III se producía independientemente del nutriente limitante del crecimiento. Se obtuvieron mayores rendimientos específicos (de hasta aproximadamente 90 mg/g en PS) cuando las células se mantenían en un tiempo de duplicación de masa rápido (0,8, 1,4 ó 1,6 h) [t_d] en lugar de un tiempo lento ($t_d = 2,6$ u 11 h) [8 - 10]. Sin embargo, el cultivo continuo tiende a forzar problemas de estabilidad y de contaminación. Adicionalmente, el cultivo continuo es un tanto caro debido al suministro continuo de medio de nutrientes.

Hay por lo tanto una necesidad de encontrar alternativas al cultivo continuo para la producción con alto rendimiento de polisacáridos capsulares con objeto de superar los problemas del cultivo continuo que se mencionaron anteriormente.

Divulgación de la invención

Los inventores han descubierto que pueden obtenerse altos rendimientos de polisacáridos capsulares para cualquier cepa de estreptococos usando un cultivo semicontinuo, que es un cultivo que se inicia con la inoculación de células en un volumen finito de medio nuevo y se termina con una única recogida después de que han crecido las células, añadiéndose nutrientes adicionales al cultivo una vez que se ha agotado la fuente inicial de nutrientes. Dichos elevados rendimientos son comparables o mejores a los obtenidos usando cultivos continuos. Adicionalmente, los procedimientos desvelados en el presente documento no tienden a los problemas de estabilidad y de contaminación del cultivo continuo.

La invención proporciona un procedimiento para cultivar estreptococos según la reivindicación 1. Preferiblemente, el estreptococo es un GBS. El cultivo semicontinuo puede ser semicontinuo de volumen fijo o semicontinuo de volumen variable. En el cultivo semicontinuo de volumen fijo se suministra un sustrato limitante sin diluir el cultivo (por ejemplo, usando un líquido concentrado o un gas o mediante el uso de diálisis). En el cultivo semicontinuo de volumen variable, el volumen cambia durante el tiempo de fermentación debido al suministro de sustrato. Se sabe que algunas cepas de estreptococos son "malas productoras" de polisacáridos capsulares porque típicamente sólo producen bajos niveles polisacáridos capsulares en cultivo. Algunos ejemplos de dichos malos productores incluyen las cepas de GBS DK21 y 2603. Sin embargo, usando los procedimientos desvelados en el presente documento, pueden obtenerse altos niveles de polisacáridos capsulares incluso partir de dichos "malos productores".

Preferiblemente, el procedimiento de la invención es aquel en el que se produce un alto rendimiento de polisacáridos capsulares. Preferiblemente, el rendimiento de polisacáridos capsulares es de 10 mg/g en PS (mg de polisacáridos capsulares por g en peso seco de bacterias) o más (por ejemplo, de 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 o más), y más preferiblemente > 30 mg/g en PS. Preferiblemente, el rendimiento de polisacáridos capsulares del medio de cultivo es de 10 mg/l o más (por ejemplo, de 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300 o más). Más preferiblemente, el rendimiento de polisacáridos capsulares del medio de cultivo es de 50 mg/l o más (por ejemplo, de 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650 o más). Por lo tanto, el procedimiento de la invención permite la producción de polisacáridos capsulares con un rendimiento mucho mayor por unidad de volumen en comparación con el cultivo continuo. En

algunos casos, el rendimiento por unidad de volumen puede ser del doble o más del doble que el producido usando un cultivo continuo.

El procedimiento de cultivo global se divide en fases específicas (discontinuo, semicontinuo y con suministro de carbono), que pueden subdividirse adicionalmente. Inicialmente, se inicia un cultivo discontinuo durante el cual la tasa de duplicación del cultivo (μ) aumenta para conseguir un tiempo de duplicación bajo (t_d). El t_d puede aumentar entonces durante una primera fase semicontinua (FB1) hasta alcanzar el valor de producción deseado. Esta tasa de duplicación puede mantenerse entonces en un nivel estacionario durante una segunda fase semicontinua (FB2). Entonces se inicia un suministro de carbono (GF) que da como resultado un aumento del t_d según van desapareciendo del medio los ingredientes no auxótrofos pero limitantes. La fase semicontinua inicial permite que la bacteria comience el crecimiento y consiga un t_d bajo. Las fases semicontinua y de suministro de carbono permiten la producción en polisacáridos capsulares a una tasa elevada. La fase semicontinua proporciona nutrientes al cultivo según se van usando. La fase de suministro de carbono proporciona una fuente de carbono adicional, de forma que otros nutrientes se vuelven limitantes.

El elevado rendimiento puede mantenerse cultivando las bacterias a un bajo t_d durante la fase semicontinua. Preferiblemente, este bajo t_d se mantiene a lo largo de la segunda fase semicontinua (FB2) en particular. Preferiblemente, el t_d es de 80 minutos o menos, preferiblemente de 60 minutos o menos (por ejemplo, de 58, 56, 54, 52, 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 38, 36, 34, 32, 30, 25, 20, 15 o menos). Preferiblemente, el t_d es de aproximadamente 45 minutos (0,75 h) (por ejemplo, de 0,6 - 1,0 h). El t_d puede ajustarse usando procedimientos conocidos en la técnica, tales como la temperatura y la concentración de oxígeno, o limitando los niveles de nutrientes.

Como apreciará la persona experta, el t_d puede ser monitorizado mediante cualquiera de varios factores limitantes. Generalmente, las bacterias se dejan crecer libremente hasta que se ha alcanzado un t_d deseado (la fase "discontinua"), después de lo cual se inicia un mecanismo de control para mantener el t_d (la fase "semicontinua"). Preferiblemente, durante la fase de crecimiento libre, el suministro de carbono no es un factor limitante. Sin embargo, una vez que se ha alcanzado el t_d deseado, puede usarse cualquiera de los varios factores limitantes, incluyendo el suministro de carbono (aunque no es preferido), para limitar el crecimiento y mantener el cultivo al t_d deseado.

Con objeto de mantener los niveles de carbono durante la producción de polisacáridos capsulares, se prefiere que se mantenga la concentración de la fuente de carbono usando un suministro dependiente del pH. Dicho suministro puede iniciarse desde el comienzo del cultivo o únicamente cuando se haya conseguido un t_d específico. Sin embargo, si el suministro se comienza después del inicio del cultivo, la tasa de suministro debe mantenerse mayor que la tasa de consumo para evitar que la fuente de carbono se vuelva un factor limitante del crecimiento. Cuando disminuye la concentración de la fuente de carbono en el medio, se reduce el metabolismo y aumenta el pH. Cuando el pH del cultivo aumenta por encima de un cierto pH umbral (pHc), se añade la fuente de carbono al medio. El suministro de la fuente de carbono se detiene cuando el pH del cultivo cae por debajo del valor del pHc. Preferiblemente, el pHc es aproximadamente neutro, por ejemplo, de entre 6 y 8 (por ejemplo, de 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9 u 8,0). Preferiblemente, el pHc está entre 6,9 y 7,5. Preferiblemente el pHc es un pH de 7,2.

En el presente documento también se desvela un procedimiento para producir un alto rendimiento de polisacáridos capsulares procedentes de estreptococos, en el que el cultivo incluye una fase en la que se cultivan los estreptococos a un t_d de 45 minutos.

Adicionalmente, en el presente documento se desvela un procedimiento para cultivar estreptococos que comprende iniciar un cultivo semicontinuo de estreptococos en un medio, y monitorizar el pH del cultivo de forma que cuando el pH se eleva por encima de un valor umbral, se añade una fuente de carbono al medio, y cuando el pH cae por debajo del valor umbral, se detiene el suministro de la fuente de carbono, mediante lo que el t_d de los estreptococos se mantiene a 60 minutos o menos (por ejemplo, a 58, 56, 54, 52, 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 38, 36, 34, 32, 30, 25, 20, 15 o menos). Preferiblemente, el t_d es de aproximadamente 45 minutos (0,75 h) (por ejemplo, de 0,6 - 1,2 h). Preferiblemente, el pH umbral (pHc) es según se definió anteriormente, por ejemplo, de aproximadamente pH 7,2.

La fermentación puede ser monitorizada manualmente o automatizarse mediante un ordenador u otra máquina. En una forma de realización, el pH se monitoriza con un ordenador. En una forma de realización adicional, un ordenador monitoriza y/o ajusta la tasa de suministro de la fuente de carbono para mantener el pH alrededor de un punto establecido (el pH se ajusta mediante la adición de un álcali, tal como NaOH o NH₄OH, o de un ácido, según sea apropiado). En una forma de realización adicional, un ordenador monitoriza y/o ajusta la tasa de suministro de la fuente de carbono para mantener el pH alrededor de un punto establecido. En una forma de realización adicional, un ordenador monitoriza y/o ajusta la tasa de suministro de oxígeno (y/o la agitación, la aireación, la contrapresión, o una combinación de estos parámetros) para mantener el pH alrededor de un punto establecido. También pueden monitorizarse y controlarse otras variables usando un ordenador, tal como, pero no limitándose a, la concentración de nitrógeno y la temperatura.

Otras formas de realización adicionales monitorizan el contenido de oxígeno disuelto y/o la concentración de la fuente de carbono con un ordenador. El uso del ordenador en esta solicitud pretende incluir específicamente todos los programas, controladores, dispositivos necesarios para funcionar según se describe. El ordenador puede formar parte de un dispositivo asistido por ordenador.

- 5 En el presente documento también se desvela un algoritmo de control para controlar el crecimiento de las bacterias en un cultivo, en el que el pH del cultivo se monitoriza de forma que cuando el pH se eleva por encima del pH_c, se le suministra la fuente de carbono al cultivo, y cuando el pH cae por debajo del pH_c, se detiene el suministro. Preferiblemente, el cultivo es un cultivo semicontinuo. Preferiblemente, las bacterias son estreptococos. El algoritmo también puede controlar otros parámetros tales como, pero no limitándose a, la concentración de la fuente de carbono, la temperatura, la saturación de oxígeno y la concentración de nitrógeno.

- 10 Después del cultivo, las bacterias pueden experimentar etapas de procesamiento adicionales para purificar los polisacáridos capsulares y para conjugarlos con una proteína portadora. En el presente documento se desvela un procedimiento que comprende a) cultivar estreptococos en un cultivo semicontinuo, y b) purificar los polisacáridos capsulares a partir de las bacterias. El procedimiento puede comprender adicionalmente la etapa c) de conjugar el sacárido capsular con una proteína portadora, para dar un conjugado de proteína-sacárido. Los polisacáridos capsulares purificados pueden experimentar etapas de procesamiento adicionales con objeto de preparar preparaciones farmacéuticas. Algunos ejemplos de dichas capas se proporcionan a continuación.

Estreptococos

- 20 El estreptococo puede elegirse de entre *S. agalactiae* (GBS), *S. pyogenes* (GAS), *S. pneumoniae* (neumococo) y *S. mutans*. El estreptococo puede ser alternativamente *S. thermophilus* o *S. lactis*. Si el estreptococo usado es un GBS, entonces preferiblemente el serotipo seleccionado es 1a, 1b, 3, 4 ó 5. Preferiblemente, las cepas usadas de GBS son 090 (1a), 7357 (1b), H36b (1b), DK21 (2), M781 (3) ó 2603 (5). Si el estreptococo usado es *S. pneumoniae*, entonces preferiblemente los serotipos seleccionados son uno o más, o todos, de 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F. También puede seleccionarse preferiblemente el serotipo 1. Preferiblemente, los serotipos seleccionados uno o más, o todos, de 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F.

El cultivo producido usando el procedimiento de la invención puede ser homogéneo (es decir, consiste en una única especie o cepa de estreptococo), o puede ser heterogéneo (es decir, comprende dos o más especies o cepas de estreptococos). Preferiblemente, el cultivo es homogéneo.

- 30 El estreptococo usado puede ser una cepa natural o puede estar modificada genéticamente. Por ejemplo, puede modificarse para que produzca polisacáridos capsulares no naturales, o polisacáridos heterólogos; o para aumentar el rendimiento.

Medio de crecimiento

- 35 Puede usarse cualquier tipo de medio de crecimiento líquido que sea adecuado para mantener el crecimiento de las especies de estreptococos. Algunos medios preferidos incluyen medios complejos tales como caldo de Columbia, LB, Todd-Hewitt, medio de GC, caldo sanguíneo o infusión de cerebro-corazón; medios semidefinidos tales como MCDM; medios definidos químicamente para estreptococos tales como M1, MC, FMC [11] o C-48 [12]; y medios compuestos para el crecimiento de líneas celulares eucariotas que contienen los componentes auxótrofos necesarios tales como RPMI, medio spent, de McCoy y de Eagle. Un medio típico contiene extracto de levadura. Mediante el aumento de la concentración del medio pueden conseguirse mayores DO, dando como resultado una mayor producción volumétrica de polisacáridos capsulares. Consecuentemente, el medio de crecimiento comprenderá una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, una fuente de azufre y adicionalmente puede comprender uno o más de un antibiótico y un agente antiespumante. Algunos antibióticos típicos incluyen kanamicina, ampicilina y tetraciclina. Los antibióticos pueden usarse para ejercer una presión selectiva para seleccionar una bacteria en particular que contenga un gen de resistencia al antibiótico y/o para seleccionar bacterias grampositivas (por ejemplo, estreptococos). Esto puede usarse por lo tanto para mantener la presión selectiva para las bacterias que expresan los polisacáridos capsulares deseados. Por ejemplo, el antibiótico aztrianam es eficaz frente a bacterias gramnegativas, pero no frente a grampositivas. Los agentes antiespumantes son conocidos en la técnica y pueden incluir aceite mineral, aceite médico, copolímeros de polisiloxano glicol altamente formulados, compuestos y emulsiones de silicona, compuestos oxalquilados, aceite mineral/mezclas sintéticas, mezclas de glicol/éster, etc.

El cultivo también requerirá la adición de otros diversos factores esenciales para el crecimiento, tales como, lípidos (tales como ácidos grasos de cadena larga tales como ácido linoleico u oleico), esteroides (tales como colesterol), purinas y pirimidinas, vitaminas y factores de crecimiento, aminoácidos (en forma L y/o D) y/o elementos químicos o iones inorgánicos (tales como Fe, K, Mg, Mn, Ca, Co, Cu, P y/o Zn).

- 55 Si el medio de crecimiento contiene aditivos obtenidos a partir de animales, tales como albúmina sérica bovina, éstos deberían obtenerse a partir de fuentes exentas de encefalopatías espongiformes transmisibles, para evitar la contaminación del medio y eventualmente de los polisacáridos capsulares.

Fuente de carbono

El tipo de fuente de carbono usado no es esencial. Preferiblemente se elige una fuente de carbono primaria del grupo formado por glucosa, fructosa, lactosa, sacarosa, maltodextrinas, almidón, inulina, glicerol, aceites vegetales tales como aceite de semilla de soja, hidrocarburos, alcoholes tales como metanol y etanol, ácidos orgánicos tales como acetato. Más preferiblemente, la fuente de carbono se elige de entre glucosa, glicerol, lactosa, fructosa, sacarosa y aceite de semilla de soja. El término "glucosa" incluye jarabes de glucosa, es decir, composiciones de glucosa que comprenden oligómeros de glucosa. La fuente de carbono puede añadirse al cultivo como un sólido o como un líquido. Preferiblemente la fuente de carbono se controla para evitar el estrés osmótico en las células, que puede dar como resultado una sobrealimentación. Esto se consigue habitualmente si no se añade toda la fuente de carbono requerida para la duración de la fermentación al cultivo discontinuo inicial. La fuente de carbono también debe controlarse para evitar su agotamiento, que puede dar como resultado una limitación del crecimiento y la producción de pigmentos [13].

Fuente de nitrógeno

El tipo de fuente de nitrógeno no es esencial. Preferiblemente se elige una fuente de nitrógeno de entre urea, hidróxido amónico, sales de amonio (tales como sulfato amónico, fosfato amónico, cloruro amónico y nitrato amónico), otros nitratos, aminoácidos tales como glutamato y lisina, extracto de levadura, hidrolizados de levadura, base nitrogenadas de levadura, hidrolizados de proteína (incluyendo, pero no limitándose a, peptonas, caseína hidrolizados tales como triptona y casaminoácidos), harina de semilla de soja, Hy-Soy, caldo de soja triptico, harina de semilla de algodón, extracto de malta, licor concentrado de maíz y molasas. Más preferiblemente, se elige una fuente de nitrógeno de entre hidróxido amónico, sulfato amónico, cloruro amónico y fosfato amónico. Muy preferiblemente, la fuente de nitrógeno es hidróxido amónico. El uso de hidróxido amónico como fuente de nitrógeno tiene la ventaja de que el hidróxido amónico puede funcionar adicionalmente como agente controlador del pH. Si se usa sulfato amónico y/o fosfato amónico como fuente de nitrógeno, puede satisfacerse al menos una porción de los requerimientos de azufre y/o de fósforo del microorganismo.

Fuente de fósforo

Según se mencionó anteriormente, puede añadirse fósforo al medio de crecimiento. El fósforo puede estar en forma de una sal, en particular puede añadirse como un fosfato (tal como fosfato amónico, según se mencionó anteriormente) o un polifosfato. Si se usa un polifosfato, puede estar en forma de un cristal de fosfato, tal como polifosfato sódico [14]. Dichos cristales de fosfato son útiles ya que sus propiedades de solubilidad son tales que pueden prepararse medios nutrientes concentrados sin ninguna precipitación resultante tras la mezcla.

Otras variables

La temperatura del cultivo se mantiene entre 30 y 45°C (por ejemplo, a 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44°C). Preferiblemente, la temperatura es de aproximadamente 37°C. Por lo tanto, puede ser necesario calentar o enfriar el recipiente que contiene el cultivo para asegurar que se mantiene una temperatura de cultivo constante. La temperatura puede usarse para controlar el t_d , por lo que para un procedimiento de cultivo dado, la temperatura puede ser diferente en diferentes fases (es decir, en la fase discontinua, en la fase semicontinua y en la fase de suministro de carbono).

Puede controlarse el suministro de oxígeno del cultivo. El oxígeno puede suministrarse como aire, oxígeno enriquecido, oxígeno puro o cualquier combinación de los mismos. Los procedimientos para monitorizar la concentración de oxígeno son conocidos en la técnica. El oxígeno puede suministrarse a una cierta tasa de suministro o puede suministrarse a demanda, midiendo el contenido en oxígeno disuelto del cultivo y aportándolo según la intención de mantener un contenido en oxígeno disuelto constante.

También puede controlarse la tasa de agitación o aireación. Esto asegura que los nutrientes y el oxígeno son transferidos al entorno del biorreactor en el que está contenido en cultivo. La velocidad relativa entre la disolución de nutriente y la célula individual debería ser de aproximadamente de 0,5 m/s (por ejemplo, de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 ó 1,0 m/s).

Según se mencionó anteriormente, puede controlarse el pH del cultivo mediante la adición de ácidos o de álcalis. Dado que el pH típicamente caerá durante el cultivo, preferiblemente se añaden álcalis. Algunos ejemplos de álcalis adecuados incluyen NaOH y NH_4OH .

Todas estas variables pueden ser controladas por el ordenador, el dispositivo asistido por ordenador o el algoritmo de control, según se mencionó anteriormente.

La alteración de estas variables puede usarse para controlar el t_d del cultivo.

Preparación de polisacáridos

Los procedimientos para preparar sacáridos capsulares a partir de bacterias son bien conocidos en la técnica, por

ejemplo, véanse las referencias 15, 16, 17, etc.

Para los GBS pueden usarse los siguientes procedimientos (véase también la ref. 18).

Generalmente se libera una pequeña cantidad de polisacárido capsular al medio de cultivo durante el crecimiento bacteriano, y por tanto, el material de partida de la precipitación alcohólica de las proteínas y/o ácidos nucleicos contaminantes puede ser el sobrenadante de un cultivo bacteriano centrifugado. Más típicamente, sin embargo, el material de partida puede prepararse tratando las propias bacterias encapsuladas (o el material que contiene el peptidoglucano bacteriano), de forma que se libere el sacárido capsular.

El polisacárido capsular puede ser liberado desde las bacterias mediante diversos procedimientos, incluyendo el tratamiento químico, físico o enzimático. Por lo tanto, puede tratarse una preparación acuosa del polisacárido antes de la reacción de precipitación inicial de la proteína/ácido nucleico.

Un tratamiento químico típico es la extracción con una base [19] (por ejemplo, usando hidróxido sódico), que puede escindir el enlace fosfodiéster entre el sacárido capsular y el esqueleto de peptidoglucano. Dado que el tratamiento con una base des-N-acetila el sacárido capsular, sin embargo, puede ser necesaria una re-N-acetilación posterior.

Un tratamiento enzimático típico implica el uso tanto de mutanolisina como de β -N-acetilglucosaminidasa [20]. Éstas actúan sobre el peptidoglucano bacteriano para liberar el sacárido capsular para su uso con la invención, pero también da lugar a la liberación del antígeno de carbohidrato específico del grupo. Un tratamiento enzimático alternativo implica el tratamiento con una enzima fosfodiesterasa de tipo II (PDE2). Las enzimas PDE2 pueden escindir los mismos fosfatos que el hidróxido sódico (véase anteriormente) y pueden liberar en sacárido capsular sin escindir el antígeno de carbohidrato específico del grupo y sin des-N-acetilar el sacárido capsular, simplificando así las etapas posteriores. Las enzimas PDE2 son por lo tanto una opción preferida para preparar sacáridos capsulares.

Un material de partida preferible para el procedimiento de la invención es por tanto el polisacárido capsular des-N-acetilado, que puede obtenerse mediante la extracción con una base según se describe en la referencia 19. Otro material de partida preferido es por tanto el producto del tratamiento con PDE2 de los estreptococos. Dichos materiales pueden someterse a una concentración (por ejemplo, ultrafiltración) antes de la precipitación, según se menciona a continuación.

Precipitación alcohólica de intercambio de cationes

El sacárido capsular de estreptococos obtenido tras el cultivo generalmente será impuro y estará contaminado con ácidos nucleicos y proteínas bacterianos. Estos contaminantes pueden eliminarse mediante tratamientos secuenciales hasta el día siguiente con ARNasa, ADNasa y proteasa. Como alternativa, en lugar de eliminar estos contaminantes enzimáticamente, puede usarse una precipitación alcohólica. Si fuera necesario (por ejemplo, después de la extracción con una base), los materiales serán neutralizados habitualmente antes de la precipitación.

El alcohol usado para precipitar los ácidos nucleicos y/o las proteínas contaminantes es preferiblemente un alcohol inferior, tal como metanol, etanol, propan-1-ol, propan-2-ol, butan-1-ol, butan-2-ol, 2-metil-propan-1-ol, 2-metil-propan-2-ol, dioles, etc. La selección de un alcohol apropiado puede ser ensayada empíricamente, sin una carga indebida, pero son preferidos alcoholes tales como etanol e isopropanol (propan-2-ol), en lugar de alcoholes tales como fenol.

El alcohol se añade preferiblemente a la suspensión de polisacáridos para dar una concentración final de alcohol de entre el 10% y el 50% (por ejemplo, de alrededor del 30%). Las concentraciones más útiles son aquellas que consiguen la precipitación adecuada de los contaminantes sin precipitar también el polisacárido. La concentración de alcohol final óptima puede depender del serotipo bacteriano del que se obtiene el polisacárido, y puede determinarse mediante experimentos rutinarios sin una carga indebida. Se ha observado la precipitación de los polisacáridos con concentraciones de etanol > 50%.

El alcohol puede añadirse en forma pura o puede añadirse en forma diluida con un disolvente miscible (por ejemplo, agua). Las mezclas disolventes preferidas son una mezcla de etanol:agua, con una proporción preferida de entre aproximadamente 70:30 y aproximadamente 95:5 (por ejemplo, de 75:25, 80:20, 85:15, 90:10).

El sacárido también se trata con un catión metálico acuoso. Son preferidos los cationes metálicos monovalentes y divalentes, y son particularmente preferidos los cationes divalentes, tales como Mg^{++} , Mn^{++} , Ca^{++} , etc., ya que son más eficaces en la formación de complejos. Los iones de calcio son particularmente útiles, por lo que la mezcla alcohólica incluye preferiblemente iones de calcio solubles. Estos pueden añadirse a una mezcla de sacárido/alcohol en forma de sales de calcio, añadido tanto como un sólido o como en una forma acuosa. Los iones de calcio son preferiblemente aportados mediante el uso de cloruro cálcico.

Los iones de calcio están presentes preferiblemente a una concentración final de entre 10 y 500 mM, por ejemplo, de aproximadamente 0,1 M. La concentración final óptima de Ca^{++} puede depender de la cepa de estreptococo y del serotipo a partir del cual se obtiene el polisacárido, y puede ser determinada mediante experimentos rutinarios sin una carga indebida.

Después de la precipitación alcohólica de las proteínas y/o ácidos nucleicos contaminantes, el polisacárido capsular se deja en disolución. El material precipitado puede separarse de los polisacáridos mediante cualquier medio adecuado, tal como mediante centrifugación. El sobrenadante puede someterse a una microfiltración, y en particular, a una filtración en línea (filtración perpendicular) con objeto de eliminar las partículas que podrían taponar los filtros en etapas posteriores (por ejemplo, partículas precipitadas con un diámetro mayor de 0,22 μm). Como alternativa a la filtración en línea puede usarse la microfiltración tangencial.

Diafiltración

Puede usarse una etapa de diafiltración tras la precipitación de las proteínas y/o de los ácidos nucleicos, y antes de la precipitación mediada por detergente. Esta etapa de diafiltración es particularmente ventajosa si se usó una extracción con base o con fosfodiesterasa para la liberación de sacárido capsular, ya que también se habrá hidrolizado el sacárido específico de grupo, para dar fragmentos mucho menores que el sacárido capsular intacto. Estos pequeños fragmentos pueden ser eliminados mediante la etapa de diafiltración.

Es típica de la diafiltración en flujo tangencial. La membrana de filtración debería ser por tanto aquella que permita el paso de los productos de la hidrólisis de antígeno específico del grupo mientras retiene el polisacárido capsular. Es típico un corte en el intervalo de 10 kDa - 30 kDa. Pueden usarse tamaños de corte menores, ya que los fragmentos de la hidrólisis del antígeno específico del grupo son generalmente de alrededor de 1 kDa (sacáridos 5-mer, 8-mer y 11-mer), pero el mayor corte permite ventajosamente la eliminación de otros contaminantes sin dar lugar a una pérdida del sacárido capsular.

Habitualmente se realizan al menos 5 ciclos de diafiltración en flujo tangencial, por ejemplo, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o más.

Tratamiento con detergente catiónico

En la técnica se conocen muchas técnicas para precipitar polisacáridos. Según la invención, el sacárido se precipita usando uno o más detergentes catiónicos. El tratamiento de una mezcla del sacárido capsular y del sacárido específico del grupo con un detergente catiónico da lugar a una precipitación preferente del sacárido capsular, minimizando así ventajosa y convenientemente la contaminación por los sacáridos específicos de grupo.

Los detergentes particularmente preferidos para su uso en el procedimiento de la invención son sales de tetrabutilamonio y de cetiltrimetilamonio (por ejemplo, las sales de bromuro). El bromuro de cetiltrimetilamonio ('CTAB') es particularmente preferido [21]. El CTAB también se conoce como bromuro de hexadeciltrimetilamonio, bromuro de cetrimonio, Cetavlon y Centimide. Otros detergentes incluyen bromuro de hexadimetrina y sales de miristiltrimetilamonio.

La etapa de precipitación mediada por detergente es preferiblemente selectiva para el polisacárido capsular. Ventajosamente, la invención usa un detergente tal como CTAB, que interactúa con los residuos de ácido siálico del sacárido, por ejemplo, a través de los grupos carboxilo del ácido siálico. El detergente precipitará por tanto preferentemente los sacáridos capsulares que contienen ácido siálico, y particularmente los sacáridos más largos dentro de una población mixta, minimizando así la contaminación por sacáridos cuyos ácidos siálicos antigénicamente importantes pueden haber sido dañados en etapas de tratamiento anteriores.

Resolubilización

Tras la precipitación, el polisacárido (típicamente en forma de un complejo con el detergente catiónico) puede ser resolubilizado, bien en un medio acuoso o bien en un medio alcohólico. Para la resolubilización acuosa, el catión CTA⁺ del precipitado será generalmente sustituido por un catión metálico; para la resolubilización alcohólica, el catión CTA⁺ generalmente se retirará. La elección de una resolubilización acuosa o alcohólica puede depender del serotipo del GBS a partir del cual se obtiene el polisacárido, y de cualquier contaminante todavía presente en esta etapa. Por ejemplo, a veces hay presentes pigmentos en el sedimento precipitado, y éstos pueden eliminarse de forma eficaz mediante la resolubilización alcohólica seguida de una filtración a través de carbono.

Un medio acuoso típico para la resolubilización incluirá un catión metálico. Son preferidos los cationes metálicos monovalentes y divalentes, y son particularmente preferidos los cationes divalentes, tales como Mg^{++} , Mn^{++} , Ca^{++} , etc. Los iones de calcio son particularmente útiles, por lo que la resolubilización usa preferiblemente Ca^{++} , aportado mediante el uso de cloruro cálcico. Se prefiere una concentración de Ca^{++} de entre 10 y 500 mM (por ejemplo, de aproximadamente 0,1 M). La concentración óptima final de Ca^{++} puede depender del serotipo de estreptococo a partir del cual se obtiene el polisacárido, y puede ser determinada mediante experimentos rutinarios sin una carga indebida.

Un medio alcohólico típico para la resolubilización se basa en etanol. Pueden usarse los mismos alcoholes usados para la precipitación de los ácidos nucleicos y/o de las proteínas, pero la concentración requerida para la precipitación del sacárido capsular será generalmente mayor, por ejemplo, el sacárido se añade preferiblemente para dar una concentración final de alcohol de entre el 70% y el 95% (por ejemplo, de aproximadamente el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90% o el 95%). La concentración final óptima de alcohol puede depender del serotipo de estreptococo a partir del cual se obtiene el polisacárido. Para conseguir las mayores concentraciones de alcohol, se

prefiere entonces añadir un alcohol con un bajo contenido en agua, por ejemplo, etanol al 96%.

La resolubilización se producirá típicamente a temperatura ambiente. Preferiblemente se evitan las condiciones ácidas, y la resolubilización tendrá lugar típicamente aproximadamente a pH 7.

El material resolubilizado está altamente purificado con respecto a la suspensión previa a la precipitación.

- 5 Un procedimiento preferido para la preparación de sacáridos implica la precipitación del polisacárido seguida por la solubilización del polisacárido precipitado usando un alcohol inferior, según se describió anteriormente. Después de la resolubilización, el polisacárido puede tratarse adicionalmente para eliminar contaminantes. Esto es particularmente importante en las situaciones en las que no es aceptable ni siquiera una contaminación mínima (por ejemplo, para la producción de vacunas humanas). Esto implicará típicamente una o más etapas de filtración, puede usarse, por ejemplo, filtración profunda, filtración a través de carbón activo, filtración por tamaños y/o ultrafiltración. Una vez filtrado para eliminar los contaminantes, el polisacárido puede ser precipitado para un tratamiento y/o procesamiento o adicional. Esto puede conseguirse convenientemente mediante el intercambio de cationes (por ejemplo, mediante la adición de sales de calcio o de sodio).

- 10 Otro procedimiento preferido para la preparación de sacáridos implica la adición de CTAB, la centrifugación y la recogida del sobrenadante. Puede comprender una ronda adicional de precipitación con CTAB, centrifugación y recolección del sobrenadante, para proporcionar una pasta. La pasta puede mezclarse con cloruro cálcico para dar una suspensión homogénea. La suspensión puede centrifugarse, y recogerse el sobrenadante, por ejemplo, por decantación. El sacárido puede tratarse por ultrafiltración. Entonces puede añadirse cloruro magnésico, puede ajustarse el pH a entre 7,2 y 7,5 (por ejemplo, usando hidróxido sódico), y añadirse nucleasas. Entonces puede añadirse etanol para precipitar los ácidos nucleicos y las proteínas. El material precipitado puede eliminarse mediante centrifugación. Los sacáridos del sobrenadante pueden recuperarse y precipitarse mediante la adición de etanol. Entonces puede secarse el sacárido y disolverse después en una disolución de acetato sódico.

El polisacárido se prepara finalmente preferiblemente como un polvo seco, listo para su conjugación.

Preparación del conjugado

- 25 Después del cultivo de las bacterias y de la preparación de los polisacáridos capsulares, los sacáridos se conjugan con proteína(s) portadora(s). En general, la conjugación covalente de los sacáridos con portadores mejora la inmunogenicidad de los sacáridos ya que los convierte desde su forma de antígenos independientes de linfocitos T a antígenos dependientes de linfocitos T, permitiendo así el cebado de la memoria inmunológica. La conjugación es particularmente útil en vacunas pediátricas [por ejemplo, ref. 22] y es una técnica bien conocida [por ejemplo, revisada en las refs. 23 a 31].

- 30 Las proteínas portadoras preferidas son toxinas o toxoides bacterianos, tales como el toxoide diftérico o el toxoide tetánico. El mutante CRM197 de la toxina diftérica [32 - 34] es un portador particularmente preferido ya que es un toxoide diftérico. Otras proteínas portadoras adecuadas incluyen la proteína de la membrana externa de *N. meningitidis* [35], péptidos sintéticos [36, 37], proteínas de choque térmico [38, 39], proteínas tóxicas [40, 41], citocinas [42], linfocinas [42], hormonas [42], factores de crecimiento [42], proteínas adicionales que comprenden múltiples epítomos de linfocitos T CD4⁺ humanos procedentes de diversos antígenos derivados de patógenos [43] tales como N19 [44], la proteína D de *H. influenzae* [45, 46], la proteína de superficie de neumococos PspA [47], neumolisina [48], proteínas de captación de hierro [49], la toxina A o B de *C. difficile* [50], una proteína de un GBS (véase a continuación) [51], etc.

- 35 La unión al portador es preferiblemente a través de un grupo -NH₂, por ejemplo, en la cadena lateral de un residuo de lisina de una proteína portadora, o de un residuo de arginina. Cuando un sacárido tiene un grupo aldehído libre, entonces éste puede reaccionar con una amina del portador para formar un conjugado mediante aminación reductora. Dicho conjugado puede crearse usando una aminación reductora que implica una galactosa oxidada de sacárido (a partir de la cual se forma un aldehído) y una amina del portador o del conector. La unión también puede ser a través de un grupo -SH, por ejemplo, en la cadena lateral de un residuo de cisteína.

- 40 Es posible usar más de una proteína portadora, por ejemplo, para reducir el riesgo de la supresión del portador. Por lo tanto, pueden usarse diferentes proteínas portadoras para diferentes cepas o serotipos de estreptococos, por ejemplo, los sacáridos del serotipo de GBS la podrían conjugarse con CRM197, mientras que los sacáridos del serotipo Ib podrían conjugarse con el toxoide tetánico. También es posible usar más de una proteína portadora para un antígeno de sacárido en particular, por ejemplo, los sacáridos del serotipo III podrían estar en dos grupos, algunos conjugados con CRM197 y otros conjugados con el toxoide tetánico. En general, sin embargo, se prefiere usar la misma proteína portadora para todos los sacáridos.

- 45 Una única proteína portadora podría aportar más de un antígeno de sacárido [52, 53]. Por ejemplo, una única proteína portadora podría tener conjugados sacáridos de los serotipos Ia y Ib. Para conseguir este objetivo pueden mezclarse diferentes sacáridos antes de la reacción de conjugación. En general, sin embargo, se prefiere tener conjugados por separado para cada serogrupo, mezclándose los diferentes sacáridos después de la conjugación. Los conjugados por separado también pueden basarse en el mismo portador.

Se prefieren los conjugados con una proporción de sacárido:proteína (p/p) de entre un exceso de proteína (por ejemplo, 1:5) y un exceso de sacárido (por ejemplo, 5:1). Se prefieren las proporciones de entre 1:2 y 5:1, como son las proporciones de entre 1:1,25 y 1:2,5. También se prefieren las proporciones de entre 1:1 y 4:1. Con cadenas de sacárido más largas, es típico un exceso de peso del sacárido. En general, la invención proporciona un conjugado, en el que el conjugado comprende un estreptococo, preferiblemente una fracción del sacárido capsular de *S. agalactiae* unida a un portador, en el que la proporción ponderal del sacárido:portador es de al menos 2:1.

Las composiciones pueden incluir una pequeña cantidad del portador libre. Cuando hay presente una proteína portadora dada tanto en forma libre como conjugada en una composición de la invención, la forma no conjugada es preferiblemente no más del 5% de la cantidad total de la proteína portadora de la composición como un todo, y más preferiblemente está presente en menos del 2% en peso.

Puede usarse cualquier reacción de conjunción adecuada, con cualquier conector adecuado cuando sea necesario.

El sacárido estará típicamente activado o funcionalizado antes de la conjugación. La activación puede implicar, por ejemplo, reactivos cianilantes tales como CDAP (por ejemplo, tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino piridinio [54, 55, etc.]). Otras técnicas adecuadas usan carbodiimidas, hidrazidas, ésteres activos, norborano, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S-NHS, EDC, TSTU; véase también la introducción a la referencia 29).

Las uniones a través de un grupo conector pueden realizarse usando cualquier procedimiento conocido, por ejemplo, los procedimientos descritos en las referencias 56 y 57. Un tipo de unión implica la aminación reductora del polisacárido, el acoplamiento del grupo amino resultante con un extremo de un grupo conector de ácido adípico y después el acoplamiento de una proteína al otro extremo del grupo conector del ácido adípico [27, 58, 59]. Otros conectores incluyen B-propionamido [60], nitrofeniletilamina [61], haluros de haloacilo [62], conectores glucosídicos [63], ácido 6-aminocaproico [64], ADH [65], fracciones de C₄ a C₁₂ [66], etc. Como alternativa al uso de un conector puede usarse una unión directa. Las uniones directas con la proteína pueden comprender la oxidación del polisacárido, seguida por una aminación reductora con la proteína, según se describe, por ejemplo, en las referencias 67 y 68.

Se prefiere un procedimiento que implica la introducción de grupos amino en el sacárido (por ejemplo, sustituyendo los grupos =O terminales por -NH₂), seguido de la derivatización con un diéster adípico (por ejemplo, N-hidroxisuccinimido diéster del ácido adípico) y la reacción con una proteína portadora. Otra reacción preferida usa la activación de CDAP con una proteína D portadora.

Después de la conjugación pueden separarse los sacáridos libres y conjugados. Hay muchos procedimientos adecuados, incluyendo cromatografía hidrófoba, ultrafiltración tangencial, diafiltración, etc. (véanse también las refs. 69 & 70, etc.).

Cuando la composición de la invención incluye un oligosacárido despolimerizado, se prefiere que la despolimerización preceda a la conjugación, por ejemplo, es antes de la activación del sacárido.

En un procedimiento de conjugación preferido se hace reaccionar un sacárido con dihidrazida del ácido adípico. Para el serogrupo A, también puede añadirse carbodiimida en esta etapa. Después de un periodo de reacción se añade cianoborhidruro sódico. Entonces puede prepararse el sacárido derivatizado, por ejemplo, mediante ultrafiltración. Entonces el sacárido derivatizado se mezcla con la proteína portadora (por ejemplo, con un toxoide diftérico), y se añade la carbodiimida. Después de un periodo de reacción puede recuperarse el conjugado.

Otras etapas

Al igual que incluyen las etapas descritas anteriormente, los procedimientos de la invención pueden incluir etapas adicionales. Por ejemplo, los procedimientos pueden incluir una etapa de despolimerización de los sacáridos capsulares, después de que se hayan preparado a partir de las bacterias pero antes de la conjugación. La despolimerización reduce la longitud de la cadena de los sacáridos y puede no ser buena para los GBS. Para los estreptococos, especialmente los GBS, los sacáridos más largos tienden a ser más inmunógenos que los cortos [71].

Después de la conjugación puede medirse el nivel de proteína portadora no conjugada. Una forma de hacer esta medición implica una electroforesis capilar [72] (por ejemplo, en disolución libre), o una cromatografía electrocinética micelar [73].

Después de la conjugación puede medirse el nivel de sacárido no conjugado. Una forma de hacer esta medición implica una cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución con detección amperométrica pulsada (HP AEC-PAD) [69].

Después de la conjugación puede usarse una etapa de separación del sacárido conjugado del sacárido no conjugado. Una forma de separar estos sacáridos es usar un procedimiento que precipite selectivamente un componente. Se prefiere la precipitación selectiva del sacárido conjugado, para dejar el sacárido no conjugado en disolución, por ejemplo, mediante un tratamiento con desoxicolato [69].

Después de la conjugación puede llevarse a cabo una etapa de medición del tamaño molecular y/o de la masa molecular de un conjugado. En particular, pueden medirse las distribuciones. Una forma de realizar estas mediciones implica una cromatografía de exclusión por tamaños con detección mediante fotometría de dispersión de la luz en ángulos múltiples y refractometría diferencial (SBE-MALS/RI) [74].

5 **Combinaciones de conjugados.**

Los conjugados individuales pueden prepararse según se describió anteriormente para cualquier serogrupo de neumococo. Preferiblemente, los conjugados se preparan para uno o más de los 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F, y 23F. Entonces pueden mezclarse los conjugados individuales con objeto de proporcionar una mezcla polivalente.

- 10 También es posible mezclar un número seleccionado de conjugados para proporcionar una mezcla bivalente, trivalente, tetravalente, pentavalente, hexavalente, heptavalente o undecavalente (por ejemplo, para mezclar 1 + 3 + 4 + 5 + 6B + 7F + 9V + 14 + 18C + 19F + 23F, 4 + 6B + 9V + 14 + 18C + 19F + 23F, ó 1 + 4 + 6B + 9V + 14 + 18C + 19F + 23F, etc.).

Para los GBS, los conjugados se preparan preferiblemente a partir de uno o más de los serogrupos Ia, Ib o III.

- 15 Los conjugados pueden mezclarse añadiéndose individualmente a una disolución tamponada. Una disolución preferida es disolución salina fisiológica tamponada con fosfato (concentración final de fosfato sódico de 10 mM). Una concentración preferida de cada conjugado (medido como sacárido) en la mezcla final es de entre 1 y 20 µg/ml, por ejemplo de entre 5 y 15 µg/ml, tal como aproximadamente 8 µg/ml. En esta etapa puede añadirse un coadyuvante opcional de sal de aluminio (por ejemplo, para dar una concentración final de Al^{3+} de entre 0,4 y 0,5 mg/ml).

- 20 Después de la mezcla los conjugados mixtos pueden filtrarse estériles.

Composiciones farmacéuticas

- 25 Los conjugados preparados mediante los procedimientos de la invención pueden combinarse con portadores farmacéuticamente aceptables. Dichos portadores incluyen cualquier portador que no induzca por sí mismo la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición. Los portadores adecuados son típicamente grandes macromoléculas metabolizadas lentamente tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, sacarosa, trehalosa, lactosa y agregados lipídicos (tales como gotitas de aceite o liposomas). Dichos portadores son bien conocidos por los expertos habituales en la técnica. Las vacunas también pueden contener diluyentes, tales como agua, disolución salina, glicerol, etc. Adicionalmente pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponantes del pH y similares. Un portador típico es una disolución salina fisiológica tamponada con fosfato exenta de pirógenos. Un exhaustivo análisis de los excipientes farmacéuticamente aceptables está disponible en la referencia 75.

Las composiciones pueden incluir un antimicrobiano, particularmente si están envasadas en un formato de dosis múltiples.

- 35 Las composiciones pueden comprender un detergente, por ejemplo, un Tween (polisorbato), tal como Tween 80. Los detergentes están presentes generalmente a un nivel bajo, por ejemplo, < 0,01%.

Las composiciones pueden incluir sales de sodio (por ejemplo, cloruro sódico) para aportar tonicidad. Es típica una concentración de NaCl de 10 ± 2 mg/ml.

Las composiciones incluirán generalmente un tampón. Es típico un tampón de fosfato.

- 40 Las composiciones pueden comprender un alcohol de azúcar (por ejemplo, manitol) o un disacárido (por ejemplo, sacarosa o trehalosa), por ejemplo, aproximadamente a 15 - 30 mg/ml (por ejemplo, 25 mg/ml), particularmente si se van a liofilizar o si incluyen un material que ha sido reconstituido a partir de material liofilizado. El pH de una composición para liofilización puede ajustarse hasta alrededor de 6,1 antes de la liofilización.

- 45 Los conjugados pueden administrarse junto con otros agentes inmunorreguladores. En particular, las composiciones incluirán habitualmente un coadyuvante de vacuna. Los coadyuvantes que pueden usarse las composiciones de la invención incluyen, pero no se limitan a:

A. Composiciones que contienen minerales

- 50 Las composiciones que contienen minerales adecuadas para su uso como coadyuvantes en la invención incluyen sales minerales, tales como sales de aluminio y sales de calcio. La invención incluye sales minerales tales como hidróxido (por ejemplo, oxihidróxidos), fosfatos (por ejemplo, hidroxifosfatos, ortofosfatos), sulfatos, etc. [por ejemplo, véanse los capítulos 8 & 9 de la ref. 76], o mezclas de diferentes compuestos minerales, teniendo los compuestos cualquier forma adecuada (por ejemplo, gel, cristalina, amorfa, etc.), siendo preferida la adsorción. Las composiciones que contienen minerales también pueden formularse como una partícula de sal metálica [77].

Los fosfatos de aluminio son particularmente preferidos, particularmente composiciones que incluyen un antígeno de sacárido de *H. influenzae*, y un coadyuvante típico es hidroxifosfato de aluminio amorfo con una proporción molar PO_4/Al de entre 0,84 y 0,92, incluyendo 0,6 mg Al^{3+}/ml . La adsorción con una baja dosis de fosfato de aluminio puede usarse por ejemplo entre 50 y 100 μg de Al^{3+} por conjugado y por dosis. Cuando hay más de un conjugado en una composición, no es necesario adsorber todos los conjugados.

B. Emulsiones oleosas

Las emulsiones oleosas que son adecuadas para su uso como coadyuvantes en la invención incluyen emulsiones de escualeno-agua, tales como MF59 [capítulo 10 de la ref. 76; véase también la ref. 78] (5% de escualeno, 0,5% de Tween 80 y 0,5% de Span 85, formulado en partículas submicrométricas usando un microfluidificador). También pueden usarse el coadyuvante completo de Freund (CFA) y el coadyuvante incompleto de Freund (IFA).

C. Formulaciones de saponina [capítulo 22 de la ref. 76]

También pueden usarse formulaciones de saponina como coadyuvantes en la invención. Las saponinas son un grupo heterólogo de glucósidos de esteroides y glucósidos triterpenoides que se encuentran en la corteza, hojas, tallos, raíces e incluso en las flores de una amplia variedad de especies vegetales. Las saponinas de la corteza del árbol *Quillaia saponaria* Molina se han estudiado ampliamente como coadyuvantes. Las saponinas también pueden obtenerse comercialmente a partir de *Smilax ornata* (zarzaparrilla), *Gypsophilla paniculata* (velo de novia) y *Saponaria officinalis* (raíz jabonosa). Las formulaciones coadyuvadas con saponinas incluyen formulaciones purificadas, tales como QS21, así como formulaciones lipídicas, tales como los ISCOMs. La QS21 se comercializa como Stimulon™.

Las composiciones de saponinas se han purificado usando HPLC y RP-HPLC. Se han identificado fracciones purificadas específicas usando estas técnicas, incluyendo QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B y QH-C. Preferiblemente, la saponina es QS21. Un procedimiento para la producción de la QS21 se desvela en la ref. 79. Las formulaciones de saponinas también pueden comprender un esteroide tal como colesterol [80].

Las combinaciones de saponinas y colesterol pueden usarse para formar partículas únicas denominadas complejos inmunoestimulantes (ISCOMs) [capítulo 23 de la ref. 76]. Los ISCOMs también incluyen típicamente un fosfolípido tal como fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina. Puede usarse cualquier saponina conocida en los ISCOMs. Preferiblemente, el ISCOM incluye uno o más de QuilA, QHA & QHC. Los ISCOMs se describen adicionalmente en las refs. 80 - 82. Opcionalmente, los ISCOMs pueden estar desprovistos de detergente adicional [83].

Una revisión del desarrollo de los coadyuvantes basados en saponinas puede encontrarse en las refs. 84 & 85.

D. Virosomas y partículas pseudovíricas

Los virosomas y las partículas pseudovíricas (VLPs) también pueden usarse como coadyuvantes en la invención. Estas estructuras contienen generalmente una o más proteínas procedentes de un virus, opcionalmente combinadas o formuladas con un fosfolípido. Generalmente no son patógenos ni replicativos, y generalmente no contienen nada del genoma vírico natural. Las proteínas víricas pueden producirse recombinantemente o aislarse a partir de virus completos. Estas proteínas víricas adecuadas para su uso en virosomas o en VLPs incluyen proteínas derivadas del virus de la gripe (tales como HA o NA), del virus de la Hepatitis B (tales como proteínas del núcleo o de la cápside), del virus de la Hepatitis E, del virus del sarampión, del virus Sindbis, de Rotavirus, del virus de la fiebre aftosa, de Retrovirus, del virus de Norwalk, del virus del papiloma humano, del VIH, de fagos de ARN, del fago Q β (tales como las proteínas de la cubierta), del fago GA, del fago fr, del fago AP205 y Ty (tales como la proteína p1 del retrotransposón Ty). Las VLPs se analizan adicionalmente en las refs. 86 - 91. Los virosomas se analizan adicionalmente, por ejemplo, en la ref. 92.

E. Derivados bacterianos o microbianos

Los coadyuvantes adecuados para su uso en la invención incluyen derivados bacterianos o microbianos tales como derivados no tóxicos del lipopolisacárido enterobacteriano (LPS), derivados del lípido A, oligonucleótidos inmunoestimulantes y toxinas de ribosilación del ADP, y derivados destoxificados de los mismos.

Algunos derivados no tóxicos del LPS incluyen monofosforil lípido A (MPL) y MPL 3-O-desacilado (3dMPL). El 3dMPL es una mezcla del monofosforil lípido A 3-O-desacilado con 4, 5 ó 6 cadenas aciladas. Una forma preferida de "partícula pequeña" del monofosforil lípido A 3-O-desacilado se desvela en la ref. 93. Dichas "partículas pequeñas" del 3dMPL son lo suficientemente pequeñas como para ser filtradas estériles a través de una membrana de 0,22 μm [93]. Otros derivados no tóxicos del LPS incluyen miméticos del monofosforil lípido A, tales como derivados de fosfato de aminoalquil glucosaminida, por ejemplo, RC-529 [94, 95].

Algunos derivados del lípido A incluyen derivados del lípido A de *Escherichia coli* tales como OM-174. El OM-174 se describe, por ejemplo, en las refs. 96 & 97.

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

- 5 Los CpG's pueden incluir modificaciones/análogos de nucleótidos tales como modificaciones de fosforotioato, y pueden ser bicatenarios o monocatenarios. Las referencias 98, 99 y 100 desvelan posibles sustituciones con análogos, por ejemplo, la sustitución de guanosina por 2'-desoxi-7-desazaguanosina. El efecto coadyuvante de los oligonucleótidos CpG se analiza adicionalmente en las refs. 101 - 106.

- 10 La secuencia de los CpG puede estar dirigida a TLR9, tal como el motivo GTCGTT o TTCGTT [107]. La secuencia de los CpG puede ser específica para inducir una respuesta inmunitaria por Th1, tal como un ODN de CpG-A, o puede ser más específica para inducir una respuesta por linfocitos B, tal como un ODN de CpG-B. Los ODNs CpG-A y CpG-B se analizan en las refs. 108 - 110. Preferiblemente, el CpG es un ODN de CpG-A.

- 15 Preferiblemente, el oligonucleótido de CpG se construye de tal forma que el extremo 5' sea accesible para el reconocimiento del receptor. Opcionalmente pueden unirse dos secuencias de oligonucleótidos de CpG por sus extremos 3' para formar "inmunómeros". Véanse, por ejemplo, las refs. 107 & 111 - 113.

- 20 Las toxinas bacterianas de ribosilación del ADP y los derivados destoxificados de las mismas pueden usarse como coadyuvantes en la invención. Preferiblemente, la proteína deriva de *E. coli* (enterotoxina termolábil de *E. coli*, "LT"), del cólera ("CT") o de la difteria ("PT"). El uso de toxinas de ribosilación del ADP destoxificadas como coadyuvantes mucosos se describe en la ref. 114, y como coadyuvantes parenterales en la ref. 115. La toxina o el toxoide está preferiblemente en forma de una holotoxina, que comprende ambas subunidades A y B. Preferiblemente, la subunidad A contiene una mutación destoxificante; preferiblemente, la subunidad B no está mutada. Preferiblemente, el coadyuvante es un mutante de LT destoxificado, tal como LT-K63, LT-R72 y LT-G192. El uso de toxinas de ribosilación del ADP y de derivados destoxificados de las mismas, particularmente de LT-K63 y LT-R72, como coadyuvantes, puede encontrarse en las refs. 116 - 123. La referencia numérica para las sustituciones de aminoácidos se basa preferiblemente en las alineaciones de las subunidades A y B de las toxinas de ribosilación del ADP establecidas en la ref. 124.

F. Inmunomoduladores humanos

- 30 Los inmunomoduladores humanos adecuados para su uso como coadyuvantes en la invención incluyen citocinas, tales como interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 [125], etc.) [126], interferones (por ejemplo, interferón- γ), factor estimulante de las colonias de macrófagos y factor de necrosis tumoral. Un inmunomodulador preferido es la IL-12.

G. Bioadhesivos y Mucoadhesivos

- 35 También pueden usarse bioadhesivos y mucoadhesivos como coadyuvantes en la invención. Algunos bioadhesivos adecuados incluyen microesferas de ácido hialurónico esterificado [127] o mucoadhesivos tales como derivados reticulados del ácido poliacrílico, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, polisacáridos y carboximetilcelulosa. También puede usarse quitosan y derivados del mismo como coadyuvantes en la invención [128].

H. Micropartículas

- 40 También pueden usarse micropartículas como coadyuvantes en la invención. Se prefieren las micropartículas (es decir, una partícula de ~100 nm a ~150 μ m de diámetro, más preferiblemente de ~200 nm a ~30 μ m de diámetro, y muy preferiblemente ~500 nm a ~10 μ m de diámetro) formadas a partir de materiales que son biodegradables y no tóxicos (por ejemplo, un ácido (α -hidroxiácido), un ácido polihidroxibutírico, un poliortoéster, un polianhídrido, una policaprolactona, etc.), con poli(lactida-co-glicólido), tratados opcionalmente para que tengan una superficie cargada negativamente (por ejemplo, con SDS) o una superficie cargada positivamente (por ejemplo, con un detergente catiónico, tal como CTAB).

- 45 I. Liposomas (capítulos 13 & 14 de la ref. 76)

Algunos ejemplos de formulaciones de liposomas adecuadas para su uso como coadyuvantes se describen en las refs. 129 - 131.

J. Formulaciones de éter de polioxietileno y éster de polioxietileno

- 50 Algunos coadyuvantes adecuados para su uso en la invención incluyen éteres de polioxietileno y ésteres de polioxietileno [132]. Dichas formulaciones incluyen adicionalmente un tensioactivo de éster de polioxietilén sorbitano en combinación con un octoxinol [133], así como alquil éteres de polioxietileno u otros tensioactivos de ésteres en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional tal como un octoxinol [134]. Los éteres de polioxietileno preferidos se eligen del siguiente grupo: éter de polioxietilen-9-laurilo (laureth 9), éter de polioxietilen-9-estearilo, éter de polioxietilen-8-estearilo, éter de polioxietilen-4-laurilo, éter de polioxietilen-35-laurilo y éter de

polioxietilen-23-laurilo.

K. Polifosfaceno (PCPP)

Las formulaciones de PCPP se describen, por ejemplo, en las refs. 135 y 136.

L. Péptidos de muramilo

- 5 Algunos ejemplos de péptidos de muramilo adecuados para su uso como coadyuvantes en la invención incluyen N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (tr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP) y N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-hidroxfosforiloxi)-etilamina MTP-PE).

M. Compuestos de imidazoquinolona

- 10 Algunos ejemplos de compuestos de imidazoquinolona adecuados para su uso como coadyuvantes en la invención incluyen imiquamod y sus homólogos (por ejemplo, "Resiquimod 3M"), descritos adicionalmente en las refs. 137 y 138.

- 15 La invención también puede comprender combinaciones de aspectos de uno o más de los coadyuvantes identificados anteriormente. Por ejemplo, pueden usarse las siguientes composiciones coadyuvantes en la invención: (1) una saponina y una emulsión de aceite en agua [139]; (2) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado no tóxico de LPS (por ejemplo, 3dMPL) [140]; (3) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado no tóxico de LPS (por ejemplo, 3dMPL) + un colesterol; (4) una saponina (por ejemplo, QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + un esteroide) [141]; (5) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite en agua [142]; (6) SAF, que contiene un 10% de escualano, un 0,4% de Tween 80™, un 5% de polímero en bloque de pluronic L121, y thr-MDP, tanto microfluidificados en una emulsión submicrométrica como sometidos a agitación vorticial para generar un sistema coadyuvante de una emulsión con un tamaño de partícula mayor (7) Ribi™ (RAS), (Ribi Immunochem) que contiene un 2% de escualano, un 0,2% de Tween 80, y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo formado por monofosforil lípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM), y esqueleto de pared celular (CWS), preferiblemente MPL + CWS (Detox™); y (8) una o más sales minerales (tales como una sal de aluminio) + un derivado no tóxico LPS (tal como 3dMPL).

- 25 Otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimulantes se desvelan en el capítulo 7 de la ref. 76.

El uso de un coadyuvante de hidróxido de aluminio y/o de fosfato de aluminio es particularmente preferido, y los antígenos están generalmente adsorbidos a estas sales. El fosfato cálcico es otro coadyuvante preferido.

La composición puede ser estéril y/o estar exenta de pirógenos. Las composiciones pueden ser isotónicas con respecto a los seres humanos.

- 30 Las composiciones pueden presentarse en viales, o pueden presentarse en jeringas precargadas. Las jeringas pueden suministrarse con o sin agujas. Una jeringa incluirá una única dosis de la composición, mientras que un vial puede incluir una única dosis o múltiples dosis. Las composiciones inyectables serán habitualmente disoluciones o suspensiones líquidas. Alternativamente, pueden presentarse en forma sólida (por ejemplo, liofilizada) para su disolución o suspensión en vehículos líquidos antes de su inyección.

- 35 Las composiciones pueden envasarse en forma de dosis unitaria o en forma de dosis múltiples. Para las formas de dosis múltiples se prefieren los viales a las jeringas precargadas. Los volúmenes de dosificación eficaces pueden establecerse de forma rutinaria, pero una dosis humana típica de la composición para inyección tiene un volumen de 0,5 ml.

- 40 Cuando va a prepararse una composición extemporáneamente antes de su uso (por ejemplo, cuando un componente se presenta en forma liofilizada) y se presenta como un kit, el kit puede comprender dos viales, o puede comprender una jeringa precargada y un vial, usándose el contenido de la jeringa para reactivar el contenido del vial antes de la inyección.

- 45 Las composiciones inmunógenas usadas como vacunas comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de antígeno(s), así como cualquier otro componente, según sea necesario. Por "cantidad inmunológicamente eficaz" se entiende que la administración de esa cantidad a un individuo, bien en una única dosis o bien como parte de una serie, es eficaz para el tratamiento o la prevención. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y del estado físico del individuo que se va a tratar, la edad, del grupo taxonómico del individuo que se va a tratar (por ejemplo, primate no humano, primate, etc.), de la capacidad del sistema inmunitario del individuo para sintetizar anticuerpos, del grado de protección deseado, de la formulación de la vacuna, de la valoración del médico tratante y de otros factores relevantes. Se espera que la cantidad estará en un intervalo relativamente amplio que puede ser determinado mediante ensayos rutinarios, y una cantidad típica de cada conjugado de estreptococo está entre 1 mg y 20 mg por conjugado (medido como sacárido).

Por lo tanto, la invención proporciona un procedimiento para preparar una composición farmacéutica, que comprende las etapas de: (a) preparar un conjugado según se describió anteriormente; (b) mezclar el conjugado con

uno o más portadores farmacéuticamente aceptables.

La invención proporciona adicionalmente un procedimiento para preparar un producto farmacéutico, que comprende las etapas de: (a) preparar un conjugado según se describió anteriormente; (b) mezclar el conjugado con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables; y (c) envasar la mezcla de conjugado/portador en un recipiente, tal como un vial o una jeringa, para dar un producto farmacéutico. La inserción en la jeringa puede realizarse en fábrica o en quirófano.

La invención también proporciona un procedimiento para preparar una composición farmacéutica a partir de un conjugado de sacárido-proteína, que comprende la etapa de mezclar el conjugado con un portador farmacéuticamente aceptable, en el que el conjugado se ha preparado mediante un procedimiento de conjugación según se describió anteriormente. El procedimiento de conjugación y la etapa de mezcla pueden realizarse en momentos muy diferentes por personas diferentes en sitios diferentes (por ejemplo, en diferentes países).

La invención también proporciona un procedimiento para envasar un conjugado de sacárido-proteína en un producto farmacéutico, en el que el conjugado se ha preparado mediante un procedimiento de conjugación según se describió anteriormente. El procedimiento de conjugación y la etapa de mezcla pueden realizarse en momentos muy diferentes por personas diferentes en sitios diferentes (por ejemplo, en diferentes países).

Usos farmacéuticos

También se desvela la composición para su uso en un procedimiento para tratar un paciente, que comprende la administración de la composición al paciente. El paciente puede estar en riesgo de enfermedad o ser una mujer embarazada ("inmunización maternal"). El paciente es preferiblemente un ser humano. El ser humano puede tener cualquier edad, por ejemplo, < 2 años de edad, entre 2 - 11 años de edad, entre 11 - 55 años de edad, > 55 años de edad, etc.

También se desvela la composición para su uso en terapia. La invención también proporciona el uso de la composición en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades. Preferiblemente la enfermedad es gripe o neumonía.

Las composiciones se administrarán generalmente directamente a un paciente. La administración directa puede realizarse mediante inyección parenteral (por ejemplo, subcutáneamente, intraperitonealmente, intravenosamente, intramuscularmente o en el espacio intersticial de un tejido), o mediante administración por vía rectal, oral, vaginal, tópica, transdérmica, intranasal, ocular, ótica, pulmonar u otra administración a través de las mucosas. Se prefiere la administración intramuscular (por ejemplo, en el muslo o en la parte superior del brazo). La inyección puede ser mediante una aguja (por ejemplo, una aguja hipodérmica), pero alternativamente puede usarse una inyección sin aguja. Una dosis intramuscular típica desde 0,5 ml.

La composición puede usarse para desencadenar la inmunidad sistémica y/o de mucosas.

El tratamiento dosificado puede ser un esquema de dosis única o un esquema de dosis múltiples. Las dosis múltiples pueden usarse en un esquema de inmunización primaria y/o en un esquema de inmunización de recuerdo único. Un esquema de dosis primaria puede estar seguido por un esquema de dosis de refuerzo. Los intervalos temporales adecuados entre las dosis de cebado (por ejemplo, entre 4 - 16 semanas), y entre el cebado y el recuerdo pueden determinarse rutinariamente.

Las infecciones bacterianas afectan a diversas zonas del cuerpo, y por lo tanto las composiciones pueden prepararse de varias formas. Por ejemplo, las composiciones pueden prepararse como inyectables, como disoluciones o como suspensiones líquidas. También pueden prepararse formas sólidas adecuadas para su disolución o su suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección (por ejemplo, una composición liofilizada). La composición puede prepararse para su administración tópica, por ejemplo, como un ungüento, una crema o un polvo. La composición puede prepararse para su administración oral, por ejemplo, como un comprimido o una cápsula, o como un jarabe (opcionalmente saborizado). La composición puede prepararse para su administración pulmonar, por ejemplo, como un inhalador, usando un polvo fino o un aerosol. La composición puede prepararse como un supositorio o un óvulo vaginal. La composición puede prepararse para su administración nasal, ótica u ocular, por ejemplo, en aerosol, gotas, gel o polvo [por ejemplo, refs. 143 & 144]. Se prefieren las composiciones inyectables.

Componentes antigénicos adicionales de las composiciones de la invención

Los procedimientos de la invención también pueden comprender las etapas de mezclar un conjugado de estreptococo con uno o más de los siguientes antígenos adicionales:

- un antígeno de sacárido de *Haemophilus influenzae B* [por ejemplo, capítulo 14 de la ref. 145].
- un antígeno proteico purificado del serogrupo B de *Neisseria meningitidis*.
- una preparación de la membrana externa del serogrupo B de *Neisseria meningitidis*.
- un antígeno del virus de la hepatitis A, tal como el virus inactivado [por ejemplo, 146, 147].

- un antígeno del virus de la hepatitis B, tal como los antígenos de superficie y/o del núcleo [por ejemplo, 147, 148].
- un antígeno de la difteria, tal como un toxoide diftérico [por ejemplo, capítulo 13 de la ref. 145]
- un antígeno del tétanos, tal como un toxoide tetánico [por ejemplo, capítulo 27 de la ref. 145].
- 5 - un antígeno de *Bordetella pertussis*, tal como holotoxina tosferínica (PT) y hemaglutinina filamentosa (FHA) de *B. pertussis*, opcionalmente también en combinación con pertactina y/o aglutinógenos 2 y 3 [por ejemplo, refs. 149 & 150; capítulo 21 de la ref. 145].
- antígeno(s) de la polio [por ejemplo, 151, 152] tal como IPV [capítulo 24 de la ref. 145].
- antígenos de sarampión, paperas y/o rubéola [por ejemplo, capítulos 19, 20 & 26 de la ref. 145].
- 10 - antígeno(s) de la gripe [por ejemplo, capítulo 17 de la ref. 145], tal como las proteínas superficiales de la hemaglutinina y/o la neuraminidasa.
- un antígeno de *Moraxella catarrhalis* [por ejemplo, 153].
- un antígeno proteico de *Streptococcus agalactiae* (estreptococo del grupo B) [por ejemplo, 154, 155].
- un antígeno de *Streptococcus pyogenes* (estreptococo del grupo A) [por ejemplo, 155, 156, 157].
- 15 - un antígeno de *Staphylococcus aureus* [por ejemplo, 158].

La composición puede comprender uno o más de estos antígenos adicionales.

Los antígenos proteicos tóxicos pueden destoxificarse cuando sea necesario (por ejemplo, destoxificación de la toxina tosferínica mediante un medio químico y/o genético [150]).

- 20 Cuando se incluye un antígeno diftérico en la composición, también se prefiere incluir los antígenos tetánico y tosferínico. De forma similar, cuando se incluye un antígeno tetánico también se prefiere incluir los antígenos diftérico y tosferínico. De forma similar, cuando se incluye un antígeno tosferínico se prefiere incluir también los antígenos diftérico y tetánico. Por lo tanto se prefieren las combinaciones de DTP.

- 25 Los antígenos de la composición estarán presentes típicamente a una concentración de al menos 1 µg/ml cada uno. En general, la concentración de cualquier antígeno dado será suficiente para desencadenar una respuesta inmunitaria frente a ese antígeno.

Como alternativa al uso de antígenos proteicos en las composiciones inmunógenas de la invención, pueden usarse ácidos nucleicos (preferiblemente ADN, por ejemplo, en forma de un plásmido) que codifiquen para el antígeno.

Los antígenos se adsorben preferiblemente a una sal de aluminio.

- 30 Algunos antígenos no estreptocócicos preferidos para su inclusión en las composiciones son aquellos que protegen frente a *Haemophilus influenzae* de tipo B (Hib). Típicamente, éste será un antígeno del sacárido capsular de Hib. Los antígenos de sacáridos de *H. influenzae* b son bien conocidos.

- 35 Ventajosamente, el sacárido de Hib está conjugado covalentemente a una proteína portadora, con objeto de mejorar su inmunogenicidad, especialmente en niños. La preparación de conjugados de polisacáridos, en general, y del polisacárido capsular del Hib, en particular, está bien documentada. La invención puede usar cualquier conjugado adecuado de Hib. Algunas proteínas portadoras adecuadas se describieron anteriormente, y los portadores preferidos para los sacáridos de Hib son CRM₁₉₇ ('HbOC'), toxoide tetánico ('PRP-T') y el complejo de la membrana externa de *N. meningitidis* ('PRP-OMP').

- 40 La fracción de sacárido del conjugado puede ser un polisacárido (por ejemplo, fosfato de polirribosilribitol completo (PRP)), pero se prefiere hidrolizar los polisacáridos para formar oligosacáridos (por ejemplo, con un PM de desde ~1 hasta ~5 kDa).

Un conjugado preferido comprende un oligosacárido de Hib unido covalentemente a CRM₁₉₇ a través de un conector de ácido adipico [159, 160]. El toxoide tetánico también es un portador preferido.

La administración del antígeno de Hib da como resultado preferiblemente una concentración de anticuerpos anti-PRP ≥ 0,15 µg/ml, y más preferiblemente ≥ 1 µg/ml.

- 45 Cuando una composición incluye un antígeno de sacárido de Hib, se prefiere no contenga también un coadyuvante de hidróxido de aluminio. Si la composición incluye un coadyuvante de fosfato de aluminio, entonces el antígeno de Hib puede adsorberse al coadyuvante [161] o puede no adsorberse [162]. La prevención de la adsorción puede conseguirse seleccionando el pH correcto durante la mezcla del antígeno/coadyuvante, un coadyuvante con un punto de carácter apropiado, y un orden de mezcla apropiado al mezclar los diversos antígenos diferentes en una composición [163].
- 50

Las composiciones pueden comprender más de un antígeno de Hib. Los antígenos de Hib pueden estar liofilizados, por ejemplo, para su reconstitución en composiciones meningocócicas. Por lo tanto, un antígeno de Hib puede envasarse por separado de los conjugados de meningococos, o puede estar mezclado con ellos.

Otros antígenos no estreptocócicos para su inclusión en las composiciones son aquellos derivados de una enfermedad de transmisión sexual (ETS). Dichos antígenos pueden aportar profilaxis o tratamiento de las ETS tales como clamidia, herpes genital, hepatitis (tal como HCV), verrugas genitales, gonorrea, sífilis y/o chancroide [164]. Los antígenos pueden derivar de una o más ETS víricas o bacterianas. Los antígenos de ETS víricas pueden derivar de, por ejemplo, el VIH, del virus del herpes simple (HSV-1 y HSV-2), del papilomavirus humano (HPV) y/o del virus de la hepatitis (HCV). Los antígenos de ETS bacterianas pueden derivar, por ejemplo, de *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Treponema pallidum*, *Haemophilus ducreyi* o *E. coli*.

General

El término "comprende" engloba "incluye" así como "consiste", por ejemplo, una composición que "comprende" X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y.

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

La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente", por ejemplo, una composición que está "sustancialmente exenta" de Y puede estar completamente exenta de Y. Cuando sea necesario, puede omitirse la palabra "sustancialmente" de la definición de la invención.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la producción específica de (A) polisacárido capsular de tipo 1a, (B) polisacárido capsular de tipo 1b y (C) polisacárido capsular de tipo 3 durante diferentes fermentaciones continuas y a diferentes tasas de crecimiento. Los valores del polisacárido capsular específico se expresan en mg/g en PS.

La Figura 2 muestra cómo aumenta la productividad volumétrica a lo largo del cultivo semicontinuo.

La Figura 3 muestra cómo no aumenta la productividad específica a lo largo del cultivo semicontinuo.

La Figura 4 muestra un cultivo semicontinuo de medio complejo con control del agotamiento final de glucosa regulado por el pH.

La Figura 5 muestra el control del pH del suministro de glucosa.

Modos de llevar a cabo la invención

Establecimiento de la tasa de crecimiento óptima para un elevado rendimiento específico

Para determinar la mejor tasa de crecimiento para la producción de un polisacárido capsular específico, se realizaron muchos cultivos continuos a diferentes diluciones. El contenido en polisacárido capsular se determinó usando el procedimiento de dosificación química para cuantificar el ácido siálico [165]. Según se aplicó el procedimiento a una muestra compleja, se determinaron las interferencias usando una cepa mutante no encapsulada (COH1-13) [166]. El procedimiento se validó añadiendo ácido siálico y polisacárido capsular purificado. Los resultados también se validaron de forma cruzada mediante cromatografía.

Se demostró que la cepa 090 de tipo 1a producía 1,5 veces más polisacárido capsular a una tasa de crecimiento mayor que una lenta (véase la Figura 1A). Se ensayó la cepa H36b de tipo 1b a una tasa de crecimiento incluso mayor que la usada para la cepa 090 (un t_d de < 35 min). Sin embargo, este crecimiento tan rápido produjo un rendimiento menor que el producido con un t_d de 45 min. Como para todas las cepas ensayadas, el aumento del t_d a 95 min provocó una reducción adicional en el rendimiento del polisacárido capsular. La cepa 7357b mostró el mismo patrón con respecto a la duplicación de tiempo de cultivo, pero era capaz de producir un 70% más de polisacárido capsular del serotipo 1b que la cepa H36b (véase la Figura 1B). El polisacárido capsular del serotipo 3 se produjo usando la cepa M781 (Figura 1C). De nuevo, la producción óptima de polisacárido capsular se produjo a un t_d de 45 min, mientras que unas tasas de crecimiento más rápidas (35 min) y más lentas (64 min) dieron como resultado un menor rendimiento del polisacárido capsular. La Tabla 1 resume los resultados de los experimentos. El rendimiento medio de polisacárido capsular para un t_d de 45 min (0,75 h) demostró ser estadísticamente diferente del conseguido con un $t_d < 0,6$ h o $t_d > 1$ h (usando la prueba de la t de *student* para datos desparejados). El rendimiento óptimo se produjo a un $0,6 \text{ h} < t_d < 1 \text{ h}$.

Tabla 1

Cepa/tipo	T_d (h)	Rendimiento de polisacárido capsular (mg/g en peso seco)	Prueba de la t de <i>student</i>
090 - 1a	$0,76 \pm 0,07$	$60,6 \pm 2,8$	$< 0,001$
	$1,21 \pm 0,11$	$38,2 \pm 3,0$	

(continuación)

Cepa/tipo	Td (h)	Rendimiento de polisacárido capsular (mg/g en peso seco)	Prueba de la <i>t</i> de student
H36b - 1b	0,56 ± 0,04	29,6 ± 4,2	< 0,001
	0,70 ± 0,05	37,5 ± 3,9	
	1,58 ± 0,12	28,3 ± 2,3	< 0,01
7357b - 1b	0,79 ± 0,11	44,9 ± 5,1	
M781 - 3	0,56 ± 0,07	39,2 ± 16,9	< 0,001
	0,75 ± 0,08	62,1 ± 9,3	
	1,11 ± 0,16	40,3 ± 4,1	< 0,001

La productividad volumétrica aumentó durante las diversas fases del cultivo semicontinuo (discontinuo, semicontinuo [FB] y con suministro de carbono [GF]) para las cuatro cepas de estreptococos ensayadas (Figura 2). Durante el suministro del medio complejo, el aumento es debido al aumento en el producto específico. El aumento durante el suministro de carbono (que en este caso es glucosa) es debido a la mayor producción de biomasa.

De forma similar, la productividad específica también mostró un aumento desde la fase discontinua hasta el final de la fase semicontinua (FB2) (Figura 3). Entonces, para las cepas 090 y 7357b (Figuras 3a & b), la productividad permaneció constante desde FB2 hasta el final de la fase de suministro de carbono regulada por el pH (GF3). Sin embargo, la productividad de las cepas M781 y 2603 (Figuras 3c & d) continuó aumentando desde FB2 hasta GF3.

Cultivo semicontinuo con suministro exponencial

Cultivo semicontinuo con suministro de glucosa controlado por el pH final

El cultivo se hizo crecer discontinuo hasta una DO > 5,5, momento en el cual se inició un suministro exponencial de medio complejo con una tasa de dilución (D) de 0,138 h⁻¹ (FB1). Cuando el cultivo alcanzó una DO > 7,5, la tasa de dilución se aumentó hasta 1,08 h⁻¹ (FB2). Se mantuvo un estado estacionario con un t_d de 45 min hasta que se alcanzó un volumen final de 5 l. En este momento se activó un suministro de carbono controlado por pH (GF) (que en este caso era un suministro de glucosa) con el pHc establecido a pH 7,2, y el crecimiento continuó hasta una DO = 16, con una disminución progresiva de la tasa de crecimiento (véase la Figura 4).

El análisis del contenido en polisacáridos en diversos puntos temporales demostró que la producción de polisacáridos específicos se mantuvo al mismo nivel al observado para el cultivo continuo, pero con una densidad de cultivo mucho mayor.

Control del pH del suministro de glucosa

Dado que los estreptococos del grupo B producen muchos metabolitos ácidos, incluso en unas condiciones aeróbicas óptimas (ya que carecen de una parte del ciclo de Krebs), el pH del cultivo cae por debajo del pHc (la bomba de base se activa sólo gradualmente) cuando se deja crecer la cepa sin limitación (es decir, en presencia de glucosa). Cuando la concentración de glucosa cae por debajo de un cierto nivel, la tasa metabólica de los mismos se reduce y el pH se eleva hasta 7,2 (punto de inicio de la regulación - valor del pHc).

Se programó un algoritmo de control para iniciar el suministro de glucosa cuando el pH alcanza el valor del pHc y que lo detiene cuando el pH va más allá (véase la Figura 5). En este caso, el suministro de glucosa sólo se iniciaba una vez que se había alcanzado el volumen final de cultivo de 5 l.

Confrontación de la productividad volumétrica

La fermentación semicontinua de 090 ofrece un procedimiento para duplicar la productividad volumétrica (P), ya que el suministro de glucosa controlado por el pH permite una elevada DO.

Las cepas DK21 y 2603 obtuvieron unas DO de hasta 21 (9,45 g en PS/l). Se sabe que ambas son malas productoras de polisacáridos capsulares, pero el cultivo semicontinuo con un suministro controlado de glucosa ofrece una solución aceptable para obtener sus polisacáridos capsulares. Por lo tanto pueden producirse elevados rendimientos del polisacárido capsular usando un cultivo semicontinuo, evitando así los problemas asociados con el cultivo continuo. Una comparación de las diferentes cepas ensayadas y de sus respectivos rendimientos puede observarse en la Tabla 2. Para ciertas cepas puede conseguirse hasta el doble de productividad volumétrica usando un cultivo semicontinuo.

Tabla 2

Tipo / Cepa / Cultivo (continuo - CC, o semicontinuo - FB)	DO durante la producción	P (mg de polisacárido capsular/l)	Polisacárido capsular (mg/g de peso seco)
1a / 090 / CC	8,4	248 ± 12	60,6 ± 2,8
1a / 090 / FB + pHcGF	16,0	539 ± 94	58,8 ± 9,8
1b / H36b / CC	9,3	95 ± 10	37,5 ± 3,9
1b / H36 / FB + pHcGF	12,7	194	15,2
1b / 7357 / CC	9,5	148 ± 19	44,9 ± 5,1
1b / 7357 / FB + pHcGF	21,1	245 ± 38	36,9 ± 3,5
3 / M781 / CC	9,6	228 ± 34	62,1 ± 9,3
31M781 / FB + pHcGF	16,6	217 ± 14	32,3 ± 1,6
2 / DK21 / FB + pHcGF	21,1	204 ± 17	29,7 ± 2,5
5 / 2603 / FB + pHcGF	16,4	278 ± 100	44,4 ± 0,8

Los experimentos también se llevaron a cabo usando un medio complejo concentrado 5x que contenía 150 g/l de extracto de levadura en condiciones semicontinuas (el medio "estándar" sólo contenía 16,66 g/l de extracto de levadura). Los resultados de las fermentaciones se muestran en la Tabla 3.

5

Tabla 3

Tipo / Cepa / Cultivo	DO durante la producción	P (mg de polisacárido capsular/l)	Polisacárido capsular (mg/g de peso seco)
1a / 090	16,3	847	51,9
1a / 090	17,6	865	49,1
1a / 090	17,4	835	48,0
1b / H36b	12,1	133	11,0
1b / H36b	16,8	180	10,7
3 / M781	15,7	461	29,4
3 / M781	18,4	309	16,8
5 / CJB111	29,0	159	5,5
5 / CJB111	25,1	411	16,4

Estos resultados demuestran que el uso de un medio concentrado permite el crecimiento con una DO mayor, dando como resultado una producción volumétrica generalmente mayor de polisacárido capsular, pero una menor producción específica (mg/g de peso seco). Los resultados también demostraron que podía hacerse crecer CJB11 con una DO mayor que 2603V, haciéndola más útil para la producción comercial de polisacáridos capsulares del serotipo V.

10

Se entenderá que la invención se ha descrito únicamente a modo de ejemplo, y que pueden realizarse modificaciones manteniéndose en el ámbito de la invención, que se define en las reivindicaciones anexas.

Referencias

15

- [1] Ada & Isaacs (2003) Clin Microbiol Infect 9: 79 - 85.
- [2] Shen y col. (2001) Vaccine 19: 850 - 61
- [3] Palazzi y col. (2004) J. Infect. Dis. 190: 558 - 64
- [4] Merritt y col. (2000) J. Biotech. 81: 189 - 97
- [5] Dassy & Fournier (1996) Infect. Immun. 64: 2408 - 14
- [6] Suarez y col. (2001) Appl. Env. Microbiol. 67: 969 - 71
- [7] Wicken y col. (1983) J. Bact. 153: 84 - 92
- [8] Paoletti y col. (1996) Infect. Immunol. 64: 1220 - 1226

20

- [9] Ross y col. (1999) J. Bact. 181: 5389 - 5394
- [10] Paoletti y col. (1999) J. Infect. Dis. 180: 892 - 895
- [11] Terleckyj y col. (1975) Infect. Immunol. 11: 649 - 55
- [12] Willett & Morse (1966) J. Bacteriol. 91(6): 2245 - 50
- 5 [13] Merritt y col. (1978) J. Clin. Microbiol. 8: 105 - 7
- [14] Documento WO95/29986
- [15] Documento WO98/32873.
- [16] Frash (1990) págs.123 - 145 de Advances in Biotechnological Processes vol. 13 (eds. Mizrahi & Van Wezel)
- [17] Patente europea 0072513.
- 10 [18] Solicitud de patente del Reino Unido 0502096.1
- [19] Patente de EE.UU. 6248570.
- [20] Deng y col. (2000) J Biol Chem 275: 7497 - 7504.
- [21] Inzana (1987) Infect. Immun. 55: 1573 - 79.
- [22] Ramsay y col. (2001) Lancet 357 (9251): 195 - 196.
- 15 [23] Lindberg (1999) Vaccine 17 Supl. 2: S28 - 36.
- [24] Buttery & Moxon (2000) J R Coll Physicians Lond 34: 163 - 168.
- [25] Ahmad & Chapnick (1999) Infect Dis Clin North Am 13: 113 - 33, vii.
- [26] Goldblatt (1998) J. Med. Microbiol. 47: 563 - 567.
- [27] Patente europea 0477508.
- 20 [28] Patente de EE.UU. 5.306.492.
- [29] Documento WO98/42721.
- [30] Dick y col. en Conjugate Vaccines (eds. Cruse y col.) Karger, Basel, 1989, 10: 48 - 114.
- [31] Hermanson Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego (1996) ISBN: 0123423368.
- [32] Anónimo (enero de 2002) *Research Disclosure*, 453077.
- 25 [33] Anderson (1983) Infect Immun 39 (1): 233 - 238.
- [34] Anderson y col. (1985) J Clin Invest 76 (1): 52 - 59.
- [35] Documento EP- A-0372501.
- [36] Documento EP-A-0378881.
- [37] Documento EP-A-0427347.
- 30 [38] Documento WO93/17712
- [39] Documento WO94/03208.
- [40] Documento WO98/58668.
- [41] Documento EP-A-0471177.
- [42] Documento WO91/01146
- 35 [43] Falugi y col (2001) Eur J Immunol 31: 3816 - 24.
- [44] Baraldo y col. (2004) Infect Immun 72: 4884 - 87.
- [45] Documento EP-A-0594610.
- [46] Documento WO00/56360.
- [47] Documento WO02/091998.
- 40 [48] Kuo y col. (1995) Infect Immun 63: 2706 - 13.
- [49] Documento WO01/72337
- [50] Documento WO00/61761.
- [51] Documento WO2004/041157
- [52] Documento WO99/42130.
- 45 [53] Documento WO2004/011027.
- [54] Lees y col. (1996) Vaccine 14: 190 - 198.
- [55] Documento WO95/08348.
- [56] Patente de EE.UU. 4.882.317
- [57] Patente de EE.UU. 4.695.624
- 50 [58] Porro y col. (1985) Mol Immunol 22: 907 - 919.
- [59] Documento EP-A-0208375
- [60] Documento WO00/10599
- [61] Gevert y col. Med. Microbiol. Immunol, 165: 171 - 288 (1979).
- [62] Patente de EE.UU. 4.057.685.
- 55 [63] Patentes de EE.UU. 4.673.574; 4.761.283; 4.808.700.
- [64] Patente de EE.UU. 4.459.286.
- [65] Patente de EE.UU. 4.965.338
- [66] Patente de EE.UU. 4.663.160.
- [67] Patente de EE.UU. 4.761.283
- 60 [68] Patente de EE.UU. 4.356.170
- [69] Lei y col. (2000) Dev Biol (Basel) 103: 259 - 264.
- [70] Documento WO00/38711; Patente de EE.UU. 6.146.902.
- [71] Wessels y col. (1998) Infect Immun 66: 2186 - 92.
- [72] Lamb y col. (2000) Dev Biol (Basel) 103: 251 - 258.
- 65 [73] Lamb y col. (2000) Journal of Chromatography A 894: 311 - 318.
- [74] D'Ambra y col. (2000) Dev Biol (Basel) 103: 241 - 242.

- [75] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20ª edición, ISBN: 0683306472.
- [76] Vaccine Design... (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.
- [77] Documento WO00/23105.
- [78] Documento WO90/14837.
- 5 [79] Patente de EE.UU. 5.057.540.
- [80] Documento WO96/33739.
- [81] Documento EP-A-0109942.
- [82] Documento W096/11711.
- [83] Documento WO00/07621.
- 10 [84] Barr y col. (1998) Advanced Drug Delivery Reviews 32: 247 - 271.
- [85] Sjolanderet y col. (1998) Advanced Drug Delivery Reviews 32: 321 - 338.
- [86] Niikura y col. (2002) Virology 293: 273 - 280.
- [87] Lenz y col. (2001) J Immunol 166: 5346 - 5355.
- [88] Pinto y col. (2003) J Infect Dis 188: 327 - 338.
- 15 [89] Gerber y col. (2001) Virol 75: 4752 - 4760.
- [90] Documento WO03/024480
- [91] Documento WO03/024481
- [92] Gluck y col. (2002) Vaccine 20: B10 - B16.
- [93] Documento EP-A-0689454.
- 20 [94] Johnson y col. (1999) Bioorg Med Chem Lett 9: 2273 - 2278.
- [95] Evans y col. (2003) Expert Rev Vaccines 2: 219 - 229.
- [96] Meraldi y col. (2003) Vaccine 21: 2485 - 2491.
- [97] Pajak y col. (2003) Vaccine 21: 836 - 842.
- [98] Kandimalla y col. (2003) Nucleic Acids Research 31: 2393 - 2400.
- 25 [99] Documento WO02/26757.
- [100] Documento WO99/62923.
- [101] Krieg (2003) Nature Medicine 9: 831 - 835.
- [102] McCluskie y col. (2002) FEMS Immunology and Medical Microbiology 32: 179 - 185.
- [103] Documento WO98/40100.
- 30 [104] Patente de EE.UU. 6.207.646.
- [105] Patente de EE.UU. 6.239.116.
- [106] Patente de EE.UU. 6.429.199.
- [107] Kandimalla y col. (2003) Biochemical Society Transactions 31 (parte 3): 654 - 658.
- [108] Blackwell y col. (2003) J Immunol 170: 4061 - 4069.
- 35 [109] Krieg (2002) Trends Immunol 23: 64 - 65.
- [110] Documento WO01/95935.
- [111] Kandimalla y col. (2003) BBRC 306: 948 - 953.
- [112] Bhagat y col. (2003) BBRC 300: 853 - 861.
- [113] Documento WO03/035836.
- 40 [114] Documento WO95/17211.
- [115] Documento WO98/42375.
- [116] Beignon y col. (2002) Infect Immun 70: 3012 - 3019.
- [117] Pizza y col. (2001) Vaccine 19: 2534 - 2541.
- [118] Pizza y col. (2000) Int J Med Microbiol 290: 455 - 461.
- 45 [119] Scharton - Kersten y col. (2000) Infect Immun 68: 5306 - 5313.
- [120] Ryan y col. (1999) Infect Immun 67: 6270 - 6280.
- [121] Partidos y col. (1999) Immunol Lett 67: 209 - 216.
- [122] Peppoloni y col. (2003) Expert Rev Vaccines 2: 285 - 293.
- [123] Pine y col. (2002) J Control Release 85: 263 - 270.
- 50 [124] Domenighini y col. (1995) Mol Microbiol 15: 1165 - 1167.
- [125] Documento WO99/40936.
- [126] Documento WO99/44636.
- [127] Singh y col] (2001) J Cont Release 70: 267 - 276.
- [128] Documento WO99/27960.
- 55 [129] Patente de EE.UU. 6.090.406
- [130] Patente de EE.UU. 5.916.588
- [131] Documento EP-A-0626169.
- [132] Documento WO99/52549.
- [133] Documento WO01/21207.
- 60 [134] Documento WO01/21152.
- [135] Andrianov y col. (1998) Biomaterials 19: 109 - 115.
- [136] Payne y col. (1998) Adv Drug Delivery Review 31: 185 - 196.
- [137] Stanley (2002) Clin Exp Dermatol 27: 571 - 577.
- [138] Jones (2003) Curr Opin Investig Drugs 4: 214 - 218.
- 65 [139] WO99/11241.
- [140] WO94/00153.

- [141] WO98/57659.
- [142] Solicitudes de patente europea 0835318, 0735898 y 0761231.
- [143] Almeida & Alpar (1996) J. Drug Targeting 3: 455 - 467.
- [144] Agarwal & Mishra (1999) Indian J Exp Biol 37: 6 - 16.
- 5 [145] Vaccines (2004) eds. Plotkin & Orenstein. ISBN 0-7216-9688-0.
- [146] Bell (2000) Pediatr Infect Dis J 19: 1187 - 1188.
- [147] Iwarson (1995) APMIS 103: 321 - 326.
- [148] Gerlich y col. (1990) Vaccine 8 Supl: S63 - 68 & 79 - 80.
- [149] Gustafsson y col. (1996) N. Engl. J. Med 334: 349 - 355.
- 10 [150] Rappuoli y col. (1991) TIBTECH 9: 232 - 238.
- [151] Sutter y col. (2000) Pediatr Clin North Am 47: 287 - 308.
- [152] Zimmerman & Spann (1999) Am Fam Physician 59: 113 - 118, 125 - 126.
- [153] McMichael (2000) Vaccine 19 Suppl 1: S101 - 107.
- [154] Schuchat (1999) Lancet 353(9146): 51 - 6.
- 15 [155] Documento WO02/34771.
- [156] Dale (1999) Infect Dis Clin North Am 13: 227 - 43, viii.
- [157] Ferretti y col. (2001) PNAS EE.UU. 98: 4658 - 4663.
- [158] Kuroda y col. (2001) Lancet 357 (9264): 1225 - 1240; véanse también las páginas 1218 - 1219.
- [159] Kanra y col. (1999) The Turkish Journal of Paediatrics 42: 421 - 427.
- 20 [160] Ravenscroft y col. (2000) Dev Biol (Basel) 103: 35 - 47.
- [161] Documento WO97/00697.
- [162] Documento WO02/00249.
- [163] Documento WO96/37222; Patente de EE.UU. 6.333.036.
- [164] Documento WO00/15255.
- 25 [165] Svennerholm (1957) Biochem. Biophys. ACTA 24: 604 - 11
- [166] Rubens y col. (1987) Proc Natl Acad Sci 84: 7208 - 12

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para cultivar estreptococos, en el que el estreptococo se hace crecer en un cultivo semicontinuo y el procedimiento se divide en una fase discontinua; una fase semicontinua en la que se usa un nivel de nutriente limitante para limitar el crecimiento y para mantener el cultivo a un tiempo de duplicación deseado; y una fase de suministro de carbono en la que se proporciona una fuente adicional de carbono de forma que se hagan limitantes los nutrientes distintos al carbono.
2. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que el rendimiento de polisacárido capsular es > 10 mg de polisacárido capsular/g en PS.
- 10 3. El procedimiento según cualquier reivindicación previa, en el que la fase semicontinua se subdivide adicionalmente en una primera fase semicontinua en la que el tiempo de duplicación del cultivo se aumenta hasta un valor deseado, y una segunda fase semicontinua en la que el tiempo de duplicación se mantiene en un estado estacionario.
4. Un procedimiento según cualquier reivindicación previa, en el que las bacterias se cultivan a un t_d de 0,6 - 1,0 h durante una fase semicontinua.
- 15 5. Un procedimiento según cualquier reivindicación previa, en el que el cultivo semicontinuo comprende el suministro de un medio complejo.
6. Un procedimiento según cualquier reivindicación previa, en el que el cultivo tiene una fase discontinua, seguida por una fase semicontinua, en el que durante la fase semicontinua el t_d se mantiene a 80 minutos o menos.
7. Un procedimiento según la reivindicación 6, en el que el t_d se mantiene a 45 minutos.
- 20 8. Un procedimiento según cualquier reivindicación previa, en el que el nivel de carbono se mantiene usando un suministro dependiente del pH.
9. Un procedimiento según la reivindicación 8, en el que el suministro dependiente del pH es un suministro de glucosa dependiente del pH.
- 25 10. Un procedimiento según la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en el que el suministro dependiente del pH se controla mediante un punto de pH establecido (pHc) en el que cuando el pH del cultivo supera el pHc, se añade la fuente de carbono al medio, y cuando el pH del cultivo cae por debajo del pHc, se detiene el suministro de carbono.
11. Un procedimiento según la reivindicación 10, en el que el pHc está entre 6 y 8.
12. Un procedimiento según la reivindicación 11, en el que el pHc es 7,2.
- 30 13. Un procedimiento según cualquier reivindicación previa, en el que el estreptococo es un estreptococo del grupo B.
14. Un procedimiento según la reivindicación 13, en el que el estreptococo del grupo B es el serotipo Ia, Ib, III, IV o V.
15. Un procedimiento según la reivindicación 13 ó 14, en el que el estreptococo del grupo B está seleccionado de entre las cepas 090, 7357, H36b, DK21, M781 y 2603.
- 35 16. Un procedimiento según cualquier reivindicación previa, en el que el cultivo tiene un suministro de oxígeno.
17. Un procedimiento que comprende a) cultivar estreptococos en un cultivo semicontinuo mediante un procedimiento según cualquier reivindicación previa, y b) preparar el polisacárido capsular a partir de las bacterias.
18. El procedimiento según la reivindicación 17, que comprende adicionalmente la etapa c) conjugar el sacárido capsular con una proteína portadora, para dar un conjugado de proteína-sacárido.
- 40 19. Un procedimiento según la reivindicación 18, en el que la proteína portadora es el toxoide diftérico, el toxoide tetánico del mutante CRM197 de la toxina diftérica.
20. Un procedimiento según la reivindicación 18 ó 19, en el que el conjugado se obtiene mediante la oxidación del polisacárido seguido por una aminación reductora con la proteína.
- 45 21. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, en el que el conjugado tiene una proporción de sacárido:proteína (p/p) de entre 1:5 y 5:1.
22. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21, que comprende adicionalmente la etapa de mezclar los conjugados individuales preparados a partir de uno o más estreptococos del grupo B de los serogrupos Ia, Ib o III para proporcionar una mezcla polivalente.

23. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 22, que comprende adicionalmente la etapa de mezclar los conjugados individuales para proporcionar una mezcla bivalente, trivalente, tetravalente, pentavalente, hexavalente, heptavalente o undecavalente.
- 5 24. Un procedimiento para preparar una composición farmacéutica, que comprende las etapas de: a) preparar un conjugado mediante el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21, y b) mezclar el conjugado con uno o más portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables.
25. Un procedimiento según la reivindicación 24, que comprende adicionalmente la etapa de: c) mezclar el producto de la etapa b) con un coadyuvante.
- 10 26. Un procedimiento según la reivindicación 24 ó 25, que comprende adicionalmente la etapa de: d) envasar la mezcla de conjugado/portador en un recipiente, tal como un vial o una jeringa, para dar un producto farmacéutico.

Figura 1a

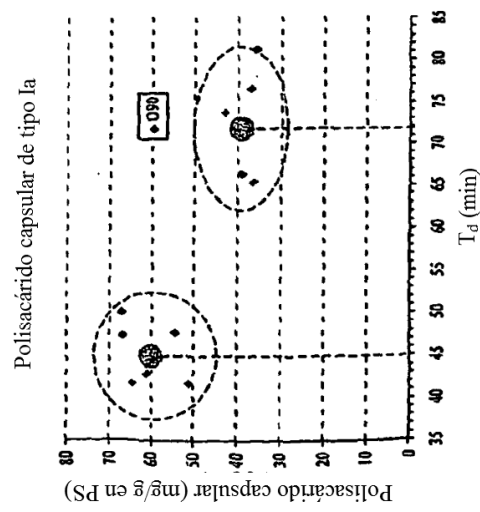


Figura 1b

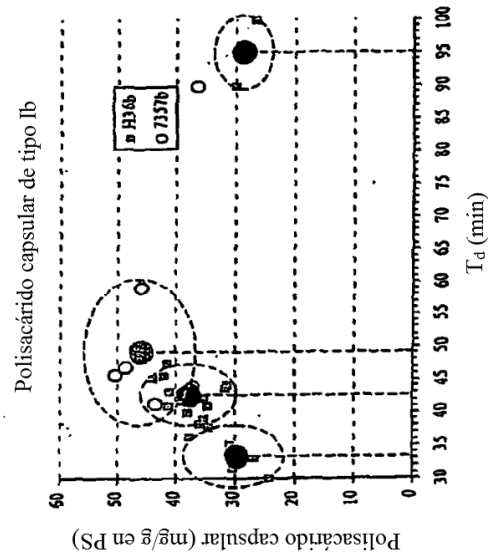


Figura 1c

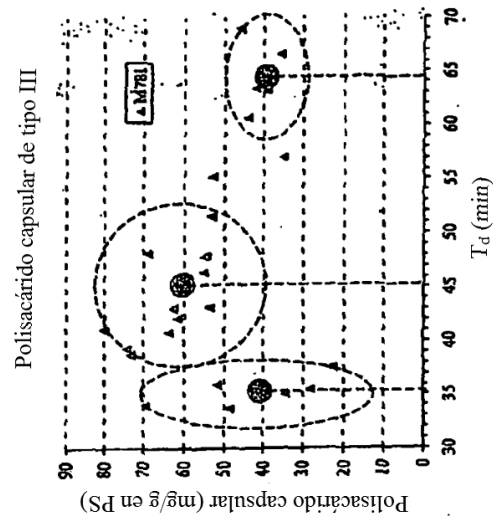


Figura 2

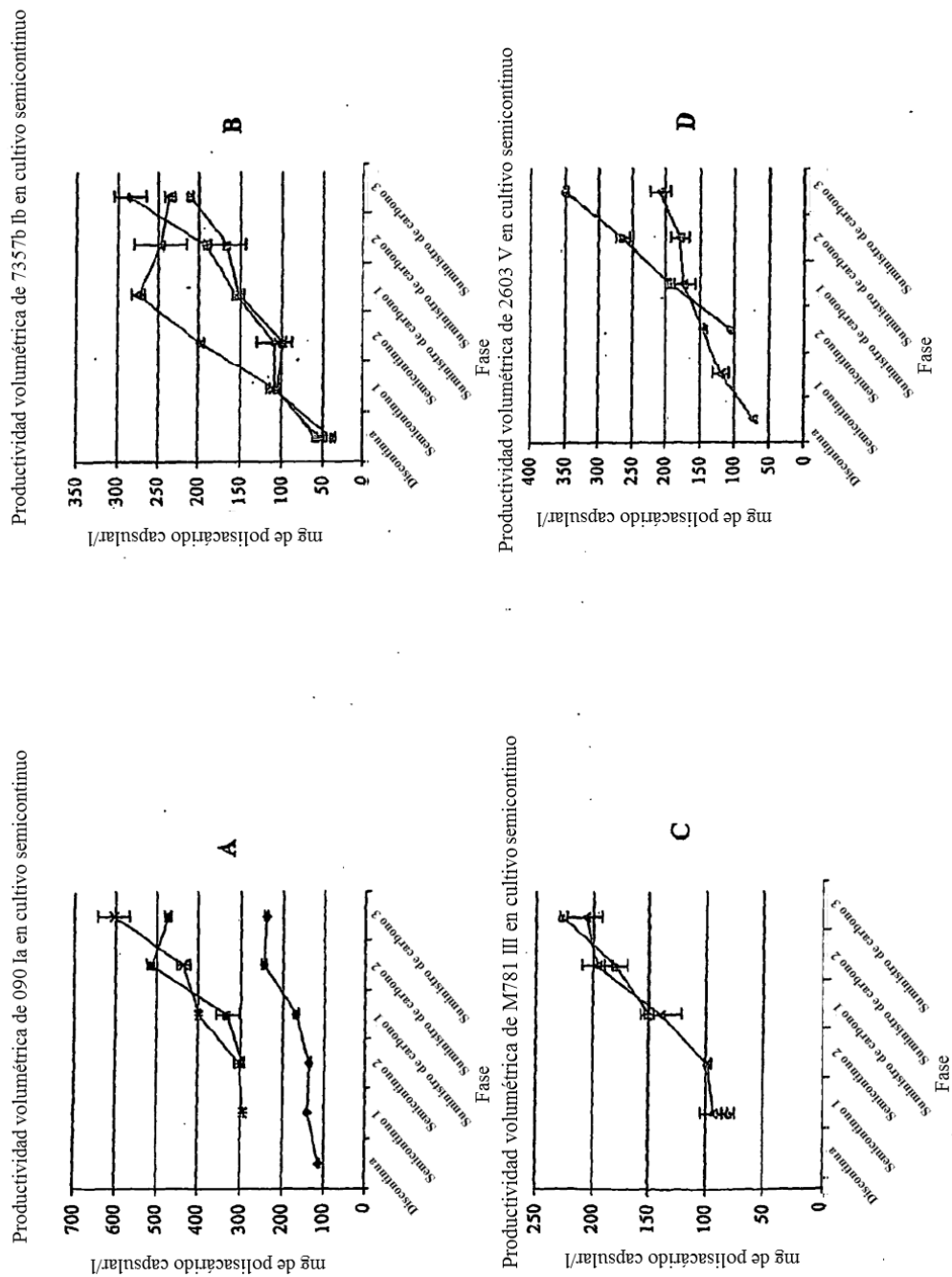
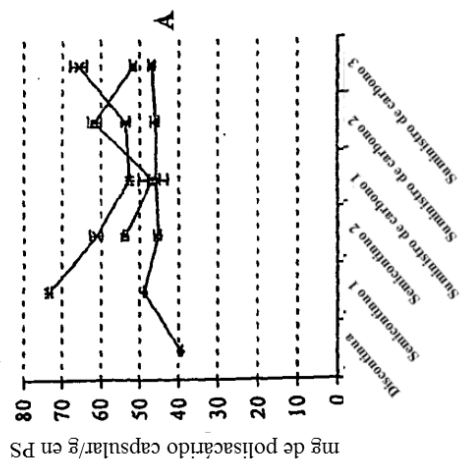
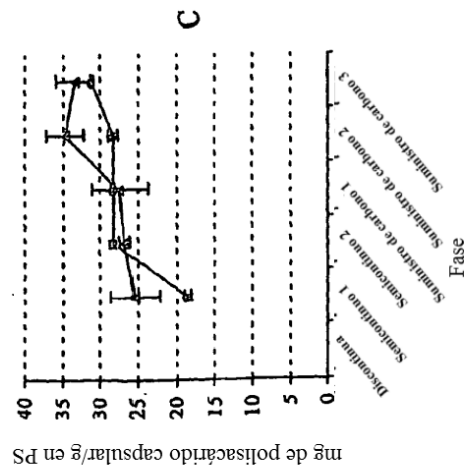


Figura 3

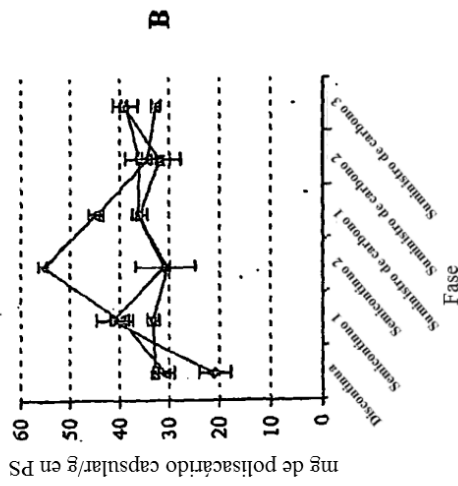
Productividad específica de O90 Ia en cultivo semicontinuo



Productividad específica de M781 III en cultivo semicontinuo



Productividad específica de 7357b Ib en cultivo semicontinuo



Productividad específica de 2603 V en cultivo semicontinuo

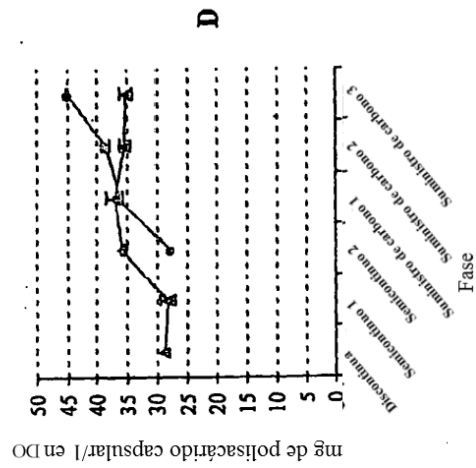


Figura 4

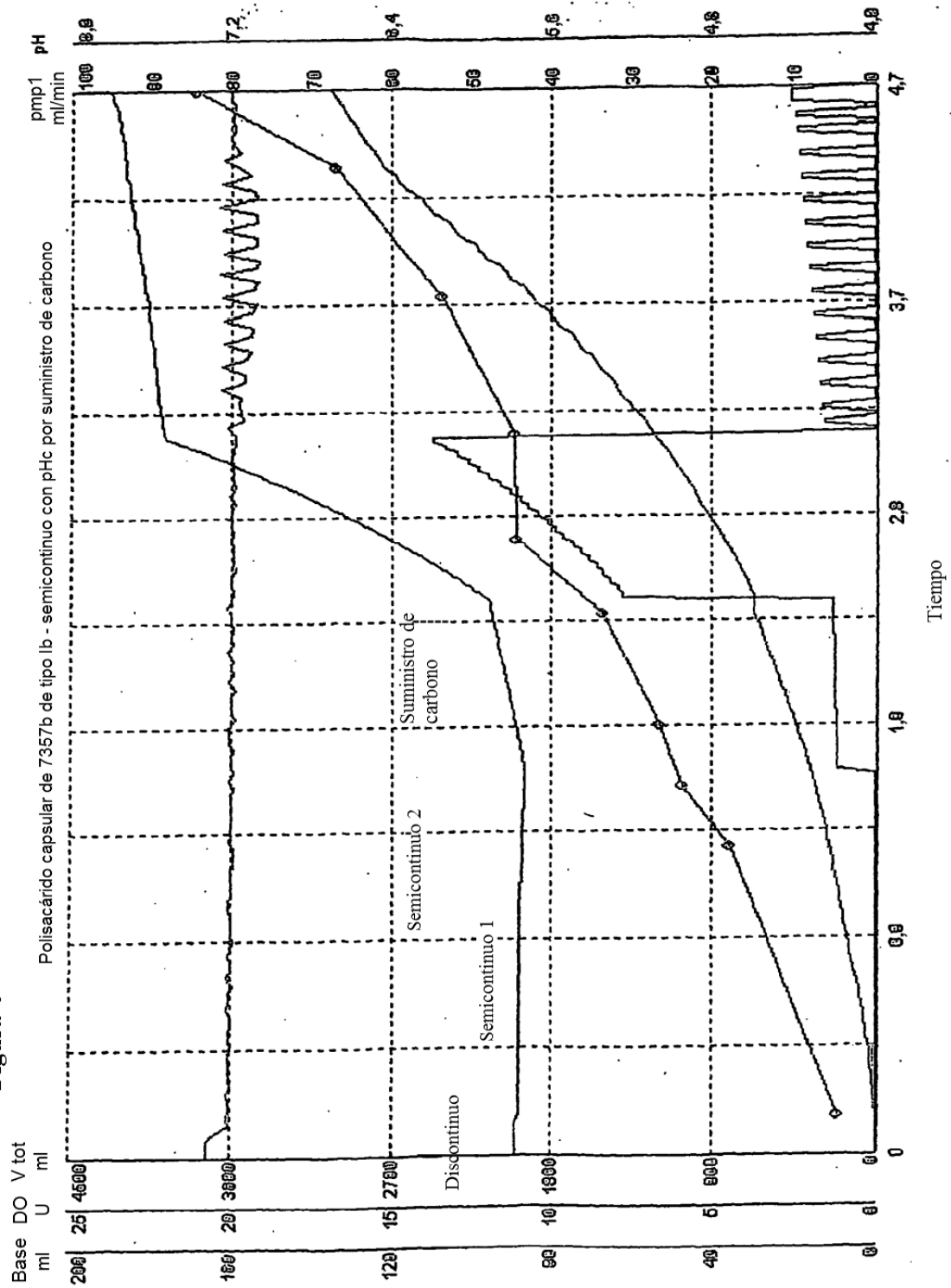


Figura 5

