

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 080**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

A61K 39/04 (2006.01)

C12P 19/04 (2006.01)

C08B 37/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C12Q 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2008 E 08864247 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.01.2015 EP 2235159**

54 Título: **Procesos de depuración para la obtención de cps de Estreptococos**

30 Prioridad:

20.12.2007 US 8941 P
08.10.2008 GB 0818453

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

05.05.2015

73 Titular/es:

NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH

72 Inventor/es:

COSTANTINO, PAOLO;
NORELLI, FRANCESCO;
BERTI, FRANCESCO;
CICALA, CONCETTA MARIA;
BAZZOCCHI, GIULIA;
FONTANI, SILVIA y
OLIVIERI, ROBERTO

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 535 080 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

Procesos de depuración para la obtención de cps de *Streptococos*.

5 ÁMBITO DE LA INVENCION

[0001] Esta invención se encuentra en el ámbito de los cultivos bacterianos y se refiere, preferentemente, a los novedosos métodos de purificación para mejorar la producción de polisacáridos capsulares bacterianos.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 [0002] Los polisacáridos capsulares (cps) son importantes inmunógenos que se hallan en la superficie de la bacteria implicada en varias enfermedades bacterianas. Esta propiedad les ha llevado a ser un importante componente en el diseño de las vacunas. Se ha demostrado su utilidad para desencadenar respuestas inmunes, especialmente cuando están vinculados a proteínas portadoras (ref. 1).

20 [0003] Habitualmente, los polisacáridos capsulares se producen utilizando cultivos discontinuos en medios complejos (*Streptococo* del grupo B, *Estafilococo aureus*, *Streptococo pneumoniae* y *Hemófilus influenzae*) y alimentan los cultivos discontinuos (*H. influenzae*) o continuos (*Streptococo* del grupo B y *Lactobacilo rhamnosus*), (refs. 2-7). La mayoría de los estudios utilizaron sistemas de cultivo discontinuos en los cuales la tasa de crecimiento, los niveles de nutrientes y las concentraciones metabólicas cambian durante la incubación. En tales sistemas, la alteración de un factor se traduce en cambios en otros factores asociados con el crecimiento que pueden afectar, de forma impredecible, a los rendimientos. Los cultivos continuos permiten al investigador separar y definir los parámetros que son interdependientes durante el crecimiento del cultivo discontinuo como, por ejemplo, la
25 tasa de crecimiento, las concentraciones de nutrientes y productos, así como la densidad celular. Durante el cultivo continuo, se añade el medio fresco al cultivo a una tasa fijada y se extraen tanto las células como el medio a una tasa que mantiene un volumen constante de cultivo. Se prefirió el cultivo continuo para la producción de polisacáridos capsulares cuando se demostró que dependía de las condiciones (ref. 8).

30 [0004] Para el *Streptococo* del grupo B (*S. agalactiae*, GBS), la tasa de crecimiento celular se presentó como el principal factor que regula la producción de polisacáridos capsulares. Además, se mostró la producción del tipo III de polisacáridos capsulares para que se produjeran independientemente del nutriente limitante del crecimiento. Los mayores rendimientos específicos (hasta, aproximadamente, 90 mg/g CDW) se obtuvieron cuando las células soportaron un tiempo de duplicación (td) de masa más rápido (0,8, 1,4 ó 1,6 h) en lugar de un tiempo más lento (td= 2,6 u 11 h) (refs. 8-10).

35 [0005] Existe la necesidad de simplificar los protocolos de purificación que pueden utilizarse en la producción a gran escala de polisacáridos capsulares postfermentivos. El enfoque se pone de manifiesto en el WO 2007/052168, basado en el método divulgado en el WO 2006/082527, el cual incluye extracción, precipitación alcohólica, diafiltración, tratamiento con detergente catiónico y resolubilización. Este procedimiento es altamente eficiente y, habitualmente, brinda una preparación para los polisacáridos capsulares que es pura en, aproximadamente, un 80%. Sin embargo, la fase del tratamiento con detergente catiónico se traduce en la precipitación del polisacárido capsular. La subsiguiente separación del precipitado a partir del sobrenadante (p.ej., mediante centrifugación) así como la resolubilización son laboriosas y pueden traducirse en la pérdida de polisacáridos capsulares, reduciéndose
40 así su rendimiento. La eficiencia del tratamiento con detergente catiónico puede depender también de la pureza inicial del polisacárido capsular. Cuanto menor sea la pureza inicial del polisacárido capsular, menos eficiente puede ser el tratamiento con detergente catiónico y más restrictivo su rendimiento. En consecuencia, existe la necesidad de simplificar el procedimiento de purificación, lo cual producirá mayores niveles de pureza con un menor número de complicadas y/o costosas fases de purificación. Existe también la necesidad de un procedimiento de purificación que proporcione un buen rendimiento del polisacárido capsular, cualquiera que sea la pureza inicial del polisacárido.
45
50

RESUMEN DE LAS MATERIALIZACIONES DIVULGADAS

55 [0006] La invención proporciona un método para purificar un polisacárido capsular a partir del *Streptococo agalactiae* y comprende una fase de filtración utilizando para ello un filtro adherente, donde el método no incluye la fase del tratamiento con detergente catiónico para precipitar el polisacárido capsular, seguida de una fase de resolubilización del polisacárido capsular. El filtro adherente es uno de los que une los contaminantes que pueden estar presentes en el polisacárido capsular, p.ej., las proteínas y/o los ácidos nucleicos, mientras que permite que el polisacárido capsular pase a través del filtro. Los inventores han descubierto que los filtros adherentes pueden utilizarse para purificar los polisacáridos capsulares en lugar del tratamiento con detergente catiónico descrito en el
60 WO 2007/052168 y en el WO 2006/082527. El uso de un filtro adherente hace que sea inútil aplicar un detergente catiónico, lo que significa que no hay precipitación del polisacárido capsular en esta etapa del método. Esto, a su vez, hace que sea inútil separar el precipitado del sobrenadante, simplificándose así el método y previniendo cualquier pérdida de polisacárido capsular que pueda producirse durante esta separación. El uso de un filtro adherente puede, en consecuencia, mejorar el rendimiento del método de purificación. La eficiencia del filtro adherente también depende menos de la pureza inicial del polisacárido capsular.
65

[0007] El experto es capaz de identificar los filtros adherentes adecuados para utilizarlos en este método. Habitualmente, el principal contaminante en el polisacárido capsular es la proteína y el filtro adherente es, en consecuencia, un filtro de proteína adherente. Los inventores han descubierto que los filtros de carbono son particularmente adecuados. Se componen, habitualmente, de carbono activado (p. ej., como el lecho de carbono granular o como el bloque de carbono prensado o extrudido) que actúa como filtro para la purificación de la muestra.

[0008] El experto es capaz de identificar los filtros de carbono adecuados. Habitualmente y para su uso en la presente invención, un filtro de carbono contiene carbono activado inmovilizado en una matriz. La matriz puede ser cualquier filtro poroso en un medio permeable para la muestra. La matriz puede estar compuesta de un material de apoyo y/o un material aglutinante. El material de apoyo puede ser un polímero sintético o un polímero de origen natural. Los polímeros sintéticos adecuados pueden contener poliestireno, poliacrilamida y polimetacrilato mientras que los polímeros de origen natural pueden contener celulosa, polisacárido, dextrano y agarosa. Habitualmente, el material de apoyo polimérico presenta la forma de una red de fibra para proporcionar rigidez mecánica. El material aglutinante puede ser una resina. La matriz puede tener la forma de una lámina de membrana. Habitualmente, el carbono activado e inmovilizado en la matriz puede presentar la forma de un cartucho. Un cartucho es un organismo independiente que contiene carbono activado en polvo, inmovilizado en la matriz y preparado con la forma de una lámina de membrana. La lámina de membrana puede capturarse en un soporte de plástico permeable para formar un disco. Opcionalmente, la lámina de membrana puede estar enrollada en espiral. Para incrementar el área de superficie del filtro, se pueden apilar varios discos, uno encima de otro. En particular, los discos apilados uno encima de otro tienen un tubo de núcleo central para recoger y extraer del filtro la muestra tratada con carbono. La configuración de los discos apilados puede ser lenticular. El carbono activado en el filtro de carbono puede derivarse de diferentes materias primas, p. ej., turba, lignito, madera o cáscara de coco. Cualquier proceso conocido en la ciencia como, por ejemplo, el vapor o los tratamientos químicos pueden utilizarse para activar el carbono. En la presente invención, el carbono activado e inmovilizado en una matriz puede colocarse en una carcasa para formar una unidad de filtro independiente. Cada unidad de filtro tiene su propia entrada y salida para que la muestra se purifique. Los ejemplos de unidades de filtro que se pueden utilizar en la presente invención son los cartuchos de carbono de Cuno Inc. (Meriden, EE. UU.) o Pall Corporation (East Hill, EE. UU.).

[0009] En particular, los inventores han descubierto que los filtros CUNO zetacarbone™ son adecuados para su uso en la invención. Estos filtros de carbono se componen de una matriz de celulosa dentro de la cual el polvo de carbono activado está encerrado y la resina adherida en su sitio.

[0010] El material de partida para el método puede ser, en este aspecto de la invención, uno de los materiales de partida descritos en el apartado titulado "Material de partida" (véase más abajo). El método puede componerse, adicionalmente, de una o más fases de las descritas en los apartados titulados "Precipitación alcohólica e intercambio catiónico", "Diafiltración", "Re-N-acetilación", "Más diafiltración", "Preparación de un conjugado" y/o "Otras fases" (véase más abajo). En consecuencia, una secuencia habitual de fases sería así : i) una fase o fases descritas en el apartado titulado "Precipitación alcohólica e intercambio catiónico"; ii) una fase o fases descritas en el apartado "Diafiltración"; iii) una fase de filtración utilizando para ello un filtro adherente como el descrito arriba; iv) una fase o fases descritas en el apartado titulado "Re-N-acetilación" y v) una fase o fases descritas en el apartado titulado "Más diafiltración". Este proceso puede entonces seguirse por una fase o varias fases de las descritas en el apartado titulado "Preparación de un conjugado". Finalmente, este proceso puede seguirse por una fase o varias fases de las descritas en el apartado titulado "Otras fases".

[0011] El método omite las fases descritas en los apartados titulados "Tratamiento con detergente catiónico" y "Resolubilización", descritos más abajo, porque el tratamiento con detergente catiónico para precipitar el polisacárido capsular y la subsiguiente resolubilización del polisacárido no es necesaria cuando la filtración se lleva a cabo utilizando un filtro adherente en el método de la invención. Por consiguiente, la invención proporciona un método específico para purificar un polisacárido capsular a partir del *Streptococo agalactiae* y comprende la fase de filtración, utilizando para ello un filtro adherente, donde el método no incluye una fase de tratamiento con detergente catiónico para precipitar el polisacárido capsular, seguida de una fase de resolubilización del polisacárido capsular.

[0012] Los métodos pueden utilizarse para purificar los polisacáridos capsulares (cps) a partir del *Streptococo* y también en una escala de fabricación. Las especies de *Streptococo* o *Streptococo agalactiae* se las conoce también como Grupo B de Lancefield, *Streptococo* o GBS, en particular, las cepas 090, H36b, CB111 o M781.

[0013] En la materialización elegida, el método de producción de un polisacárido capsular purificado incluye una o más de las siguientes fases: (a) consistente en proporcionar un aislamiento rudimentario que contiene un polisacárido capsular; (b) extracción de un precipitado de alcohol formado por el contacto entre el aislamiento rudimentario y una solución de alcohol; (c) filtración para extraer los compuestos de peso molecular más pequeño, mientras se conserva el polisacárido capsular y (d) extracción de los contaminantes proteínicos con un filtro de proteína adherente para producir el polisacárido capsular purificado. En la materialización elegida, el método incluye todas las fases anteriores.

[0014] En algunas materializaciones, se pueden realizar una o más fases adicionales que incluyan (e) Re-N-acetilación el polisacárido capsular purificado, (f) la precipitación del polisacárido capsular purificado y/o (g) la formulación de una vacuna que tenga como componente un polisacárido capsular.

5 **[0015]** En algunas materializaciones, se añade la solución de alcohol a una concentración suficiente para precipitar los contaminantes de ácido nucleico pero no el polisacárido capsular. En las materializaciones elegidas, el etanol es el alcohol que se añade preferiblemente a la concentración entre, aproximadamente, un 10% y alrededor del 50% de etanol, siendo preferible una concentración de, aproximadamente, un 30% de etanol. La solución de alcohol puede contener, de manera opcional, un catión y, preferiblemente, un catión metálico o, mejor aún, un catión divalente, siendo el calcio el más recomendable.

10 **[0016]** En algunas materializaciones, el filtro de proteína adherente es un filtro de carbono activado.

15 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

[0017]

La figura 1 muestra los polisacáridos capsulares que son GBS y objetivos potenciales de la vacuna.

20 La figura 2 es la representación esquemática de un modelo propuesto para el enlace de los polisacáridos capsulares (cps) y el Grupo B de carbohidratos de GBS.

La figura 3 muestra la estructura molecular de los polisacáridos capsulares (cps) serotipo-específicos de GBS, del tipo Ia y del tipo Ib

25 La figura 3B muestra la estructura molecular de los serotipo-específicos de GBS, del tipo III y del tipo V.

La figura 4 muestra el proceso de producción de la vacuna glucoconjugada contra las GBS.

30 Las figuras eliminadas en las referencias 5-21 se refieren a la fermentación del *Streptococo agalactia*, tal y como se expuso en el WO2009081276.

La figura 22 muestra el perfil OD590nm de la puesta en marcha del primer pre-test de fermentación de las 3 cepas: M781, H36b y 090, a escala de laboratorio.

35 La figura 23 muestra el perfil OD590nm de la puesta en marcha del segundo pre-test de fermentación de las 4 cepas: M781, H36b, 090 y CJB111, utilizando para ello un proceso simplificado. La primera simplificación extrajo tiamina, riboflavina, piridoxina HCl y niacinamida a partir de la solución vitamínica. La segunda simplificación fue la modificación de los parámetros de las etapas de alimentación durante la fermentación.

40 La figura 24 muestra el perfil OD590nm de la puesta en marcha del test de fermentación de las 4 cepas: M781, H36b, 090, CJB111.

45 La figura 25 muestra el espectro RMN 1H del tipo purificado de GBS, la polisacárida registró 25° C. Se reconoce algún hidrógeno en el espectro.

La figura 26 muestra el espectro RMN 1H del tipo Ib purificado de GBS, la polisacárida registró 25° C .Se reconoce algún hidrógeno en el espectro.

50 La figura 27 muestra el espectro RMN 1H del tipo III purificado de GBS, la polisacárida registró 25° C .Se reconoce algún hidrógeno en el espectro.

La figura 28 muestra el espectro RMN 1H del tipo V purificado de GBS, la polisacárida registró 25° C .Se reconoce algún hidrógeno en el espectro.

55 La figura 29 muestra un revestimiento de perfiles de elución en una muestra de polisacárida y de ácido siálico estándar (línea gris) a 0,5 mg/ml.

60 La figura 30 muestra un revestimiento de perfiles de elución en una muestra de polisacárida y en una muestra de polisacárida con ramnosa añadida (línea gris).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS MATERIALIZACIONES ELEGIDAS

65

[0018] Los inventores han desarrollado un protocolo optimizado de purificación para el polisacárido capsular a partir del *Streptococo agalactiae* el cual mejora significativamente las impurezas, mientras que se mantiene el protocolo sencillo y económico para una escala de fabricación.

5 [0019] La invención comprende las fases de purificación de los polisacáridos capsulares (cps) a partir de la bacteria y la conjugación del sacárido capsular con una proteína portadora para generar un conjugado sacárido-proteico (véanse las figuras 1-2). Los polisacáridos capsulares (cps) purificados pueden someterse a las fases del procesamiento posterior con el fin de elaborar preparados farmacéuticos. En las materializaciones elegidas, la purificación se llevará a cabo utilizando el protocolo mejorado de purificación que se divulga aquí.

10

Streptococo

15 [0020] El término *Streptococo* alude al *S. agalactiae* (GBS). Preferiblemente, el serotipo seleccionado es: 1a, 1b, 3, 4 o 5. Preferiblemente, las cepas de GBS utilizadas son 090 (1a), 7357 (1b), H36b (1b), DK21 (2), M781 (3), 2603 (5), o CJB111 (5). Véanse las figuras 3A-B.

20 [0021] Además, el cultivo utilizado en el método de la invención puede ser homogéneo (p. ej., que consista en una única especie o cepa de *Streptococo*) o puede ser heterogéneo (p. ej., que comprenda dos o más especies o cepas de *Streptococo*) Preferiblemente, el cultivo es homogéneo.

25 [0022] El *Streptococo* empleado puede ser un tipo de cepa silvestre o puede estar modificado genéticamente. Por ejemplo, puede modificarse para producir polisacáridos capsulares antinaturales o polisacáridos heterólogos o para incrementar el rendimiento.

Preparación de polisacárido

30 [0023] Los métodos para preparar polisacáridos capsulares a partir de la bacteria son bien conocidos en la ciencia, p. ej., véanse las referencias 15, 16, 17, etc. Se pueden utilizar los siguientes métodos para las GBS (véase también la ref. 18). En particular, se utilizan los métodos de la invención para purificar un polisacárido capsular. Tal y como se expone más arriba, estos métodos de la invención pueden incluir una o más de las siguientes fases:

Material de partida

35 [0024] Generalmente, se libera una pequeña cantidad de polisacárido capsular dentro del medio de cultivo durante el crecimiento bacteriano y así el material de partida puede, por tanto, ser el sobrenadante a partir del cultivo centrifugado bacteriano. Es más habitual, sin embargo, que el material de partida se prepare mediante el tratamiento de las propias bacterias capsuladas (o del material que contiene peptidoglicano bacteriano). Los polisacáridos capsulares (cps) pueden liberarse de la bacteria mediante varios métodos, incluido el tratamiento químico, físico o enzimático. Por tanto, una preparación acuosa de polisacárido puede tratarse antes de la reacción de la precipitación proteica- ácido nucleica inicial.

40

45 [0025] La extracción de base (ref. 19) es un tratamiento químico habitual (p. ej., utilizando hidróxido de sodio), que puede transformar el enlace de fosfodiéster entre el polisacárido capsular y el eje central del peptidoglicano. Como tratamiento de base se des-N-acetila el sacárido capsular, sin embargo, la Re-N-acetilación puede ser necesaria más tarde.

45

50 [0026] Un tratamiento enzimático habitual implica el uso de ambas enzimas: mutanolysin y \square -N-acetylglucosaminidase (ref. 20). Estas actúan en el peptidoglicano bacteriano para liberar el sacárido capsular, para su posterior uso con la invención pero también conducen a liberarlo del grupo específico de antígenos carbohidratos. Un tratamiento enzimático alternativo implica un tratamiento con enzimas fosfodiesterasas del tipo II (PDE2). Las enzimas PDE2 pueden desintegrar los mismos fosfatos como hidróxido de sodio (véase más arriba) y pueden liberar el sacárido capsular sin desintegrar el grupo específico de antígenos carbohidratos y sin des-N-acetilar el sacárido capsular, simplificando, así, las fases posteriores. En consecuencia, las enzimas PDE2 son la opción elegida para la preparación de sacáridos capsulares.

55

60 [0027] Un material de partida elegido para el proceso de la invención es el polisacárido capsular de-N-acetilado, el cual puede obtenerse mediante extracción de base como la descrita en el US 6248570 (ref. 19). Otro material de partida elegido es el producto del tratamiento PDE2 del *Streptococo*. Tales materiales pueden estar sujetos a concentración (p. ej., ultrafiltración), antes de la precipitación, tal y como se menciona más abajo.

60

[0028] El material de partida puede estar sujeto a la precipitación alcohólica de las proteínas contaminantes y/o ácido nucleicos, tal y como se describe más abajo.

65

Precipitación alcohólica e intercambio catiónico

65

[0029] El sacárido capsular *Streptococo* obtenido tras su cultivo será, generalmente, impuro y estará contaminado con ácidos nucleicos bacterianos y con proteínas. Estos contaminantes pueden extraerse mediante tratamientos nocturnos secuenciales, con RNasa, DNasa y proteasa. Sin embargo, como alternativa elegida, en lugar de extraer estos contaminantes enzimáticamente, se puede utilizar la precipitación alcohólica. Si fuera necesario (p. ej., tras la extracción de base), los materiales serán, normalmente, neutralizados antes de la precipitación.

[0030] El alcohol utilizado para precipitar los ácidos nucleicos contaminantes y/o proteínas es, preferiblemente, un alcohol de baja graduación como el metanol, etanol, propan-1-ol, propan-2-ol, butan-1-ol, butan-2-ol, 2-methylpropan-1-ol, 2-methylpropan-2-ol, dioles, etc. La selección de un alcohol apropiado puede probarse empíricamente, sin una carga excesiva, pero se prefieren los alcoholes como el etanol e isopropanol (propan-2-ol), en lugar de los alcoholes como el fenol.

[0031] El alcohol se añade, preferiblemente, a la suspensión de polisacárido para generar una concentración final de alcohol de entre un 10% y un 50% (p. ej., en torno al 30%). Las concentraciones más aptas son aquellas que alcanzan una precipitación adecuada de contaminantes, sin tampoco precipitar el polisacárido. La concentración óptima final de alcohol puede depender del serotipo bacteriano a partir del cual se obtiene el polisacárido y puede determinarse mediante experimentos rutinarios, sin una carga excesiva. Se ha observado que la precipitación de polisacáridos como las concentraciones de etanol es superior al 50%.

[0032] Se puede añadir el alcohol puro o en forma diluida, con un solvente miscible (p. ej., el agua). Se prefieren los preparados de solventes de etanol: preparados de agua con una proporción de entre unos 70:30 y en torno al 95:5 (p.ej., 75:25, 80:20, 85:15, 90:10).

[0033] El sacárido también se puede tratar con un catión metálico y acuoso. Se prefieren los cationes metálicos monovalentes y divalentes y, particularmente, los cationes divalentes como el Mg, Mn, Ca, etc, ya que son más eficientes y cuentan con una formación compleja. Los iones calcio son particularmente aptos y, por tanto, el preparado de alcohol contiene, preferiblemente, iones calcio solubles. Estos pueden añadirse al preparado de sacárido/alcohol en forma de sales de calcio o bien añadirse en forma sólida o acuosa. Los iones calcio se obtienen, preferiblemente, mediante el uso de cloruro de calcio.

[0034] Los iones calcio están, preferiblemente, presentes en una concentración final de entre 10 y 500 mM (p. ej., alrededor de 0,1 M). La concentración óptima final de Ca puede depender de la cepa del *Streptococo* y del serotipo a partir del cual se obtiene el polisacárido y puede determinarse mediante experimentos rutinarios sin carga excesiva.

[0035] Tras la precipitación alcohólica de las proteínas contaminantes y/o los ácidos nucleicos, el polisacárido capsular se queda en la solución. El material precipitado puede separarse del polisacárido mediante cualquier recurso adecuado como la centrifugación. El sobrenadante puede estar sujeto a la microfiltración y, en particular, a la filtración de punto muerto (filtración perpendicular) con el fin de extraer las partículas que pueden obstruir los filtros en las últimas fases (p. ej., las partículas precipitadas con un diámetro de más de 0,22 mm). Como alternativa a la filtración de punto muerto, se puede utilizar la microfiltración tangencial. Por ejemplo, puede utilizarse la microfiltración tangencial que utiliza 0,2 mm de membrana de celulosa. Habitualmente, la fase de microfiltración tangencial va seguida de la filtración que utiliza un filtro de 0.45/0.2 mm.

Diafiltración

[0036] Puede utilizarse la fase de diafiltración. Por ejemplo, si el método incluye la precipitación alcohólica y el intercambio catiónico descritos más arriba, entonces esta fase puede llevarse a cabo tras la precipitación de proteínas y/o ácido nucleicos. En los métodos de la invención que incluyen la filtración en la que se utiliza un filtro adherente, p. ej., filtración con un filtro de proteína adherente, esta fase de diafiltración puede llevarse a cabo antes de esa filtración. Habitualmente, se utiliza la fase de diafiltración tras la precipitación de las proteínas y/o ácidos nucleicos y antes de la filtración en la que se utiliza un filtro adherente, p. ej., un filtro de proteína adherente.

[0037] T La fase de diafiltración es particularmente beneficiosa si se utiliza la extracción de base o fosfodiesterasa para liberar el sacárido capsular, ya que el grupo específico de sacáridos también habrá venido siendo hidrolizado para generar fragmentos mucho más pequeños que el sacárido capsular intacto. Estos pequeños fragmentos pueden extraerse mediante la fase de diafiltración.

[0038] Es habitual la diafiltración a flujo tangencial. La membrana de filtración debería ser, por tanto, aquella que permita el paso de los productos de la hidrólisis del grupo específico de antígenos, mientras se conserva el polisacárido capsular. Es habitual un corte en el intervalo 10 kDa-30 kDa. Pueden utilizarse tamaños de corte menores ya que los fragmentos de hidrólisis del grupo específico de antígenos son, generalmente, de alrededor de 1 kDa (sacáridos 5-mer, 8-mer y 11-mer) pero el mayor corte permite extraer de manera beneficiosa otros contaminantes, sin conducir por ello a la pérdida del sacárido capsular.

[0039] Normalmente se realizan al menos 5 ciclos de diafiltración a flujo tangencial, p. ej., 6, 7, 8, 9, 10, 11 o más. Habitualmente, se realizan dos ciclos de diafiltración a flujo tangencial. Entre el primer y segundo ciclo, el material retenido del primer ciclo de diafiltración puede tratarse con una solución de ácido acético/acetato sódico. La suspensión resultante puede filtrarse para extraer el precipitado, p. ej., utilizando para ello un filtro de 0,45 mm. Además, la suspensión también puede filtrarse utilizando para ello un filtro de 0,2 mm.

[0040] La diafiltración puede ir seguida de otra filtración, utilizando para ello un filtro de 0,45/0,2 mm.

Tratamiento con detergente catiónico

[0041] En la ciencia se conocen muchas técnicas para precipitar polisacáridos solubles, por ejemplo el sacárido puede precipitarse utilizando uno o más detergentes catiónicos, aunque esta invención excluye la precipitación con detergente. El tratamiento de un preparado de sacárido capsular y de sacárido del grupo específico con un detergente catiónico da lugar a una precipitación preferente del sacárido capsular, minimizando así, beneficiosa y convenientemente, la contaminación por los sacáridos del grupo específico.

[0042] Los detergentes elegidos son las sales de detetrabutilamonio y de cetiltrimetilamonio (por ejemplo, las sales de bromuro). Se prefiere, particularmente, el bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) (ref. 21). El CTAB también se conoce como bromuro de hexadeciltrimetilamonio, bromuro de cetrimonio, Cetavlon y Centimide. Otros detergentes contienen bromuro de hexadimetrina y sales de miristiltrimetilamonio.

Resolubilización

[0043] Tras la fase de precipitación con detergente, el polisacárido (habitualmente 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 conservará. 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 pigmentos en el sedimento precipitado y éstos pueden extraerse de forma eficaz mediante la resolubilización alcohólica, seguida de una filtración a través de carbono.

[0044] Un medio acuoso típico para la resolubilización incluirá un catión metálico. Se prefieren los cationes metálicos monovalentes y divalentes y, particularmente, los cationes divalentes, como Mn, Ca, etc. Los iones de calcio son particularmente aptos y, por tanto, la resolubilización utiliza preferiblemente Ca, aportado mediante el uso de cloruro cálcico. Se prefiere una concentración de Ca de entre 10 y 500 mM (p. ej., de aproximadamente, 0,1 M). La concentración óptima final de Ca puede depender del serotipo del *Streptococo* a partir del cual se obtiene el polisacárido y puede determinarse mediante experimentos rutinarios, sin una carga excesiva.

[0045] Un medio alcohólico habitual para la resolubilización se basa en etanol. Pueden utilizarse los mismos alcoholes utilizados 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, p. ej., se añade, preferiblemente, alcohol para generar una concentración final de alcohol de entre el 70% y el 95% (p. ej., de alrededor del 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o del 95%). La concentración final óptima de alcohol puede depender del serotipo del *Streptococo* a partir del cual se obtiene el polisacárido. Para alcanzar mayores concentraciones de alcohol, se prefiere, entonces, añadir un alcohol con un bajo contenido en agua, p. ej., 96% de etanol.

[0046] Habitualmente, la resolubilización se producirá a temperatura ambiente. Preferiblemente, se evitan las condiciones ácidas y la resolubilización tendrá lugar, habitualmente, a, aproximadamente, un pH 7.

[0047] El material resolubilizado está altamente purificado con respecto a la suspensión previa a la precipitación.

Filtración con un filtro adherente

[0048] La purificación de los polisacáridos capsulares incluye una fase de filtración utilizando un filtro adherente. El filtro puede extraer proteínas y/o contaminantes de ADN. El filtro puede ser un filtro de proteína adherente al cual se adhieren las proteínas y/o los ADN pero al cual los polisacáridos capsulares no se adhieren o solo lo hacen débilmente. El ejemplo elegido de dicho filtro es el filtro de carbono. Los filtros adherentes adecuados se describen más arriba.

[0049] La filtración que utiliza un filtro adherente puede ir seguida de otra filtración utilizando para ello un filtro de 0,45/0,2 mm.

Re-N-acetilación

[0050] La fase de Re-N-acetilación puede llevarse a cabo, por ejemplo, tras la fase de filtración utilizando para ello un filtro adherente o, si la hay, otra fase de filtración. La Re-N-acetilación puede ser beneficiosa si los residuos ácido siálicos en los sacáridos capsulares de GBS han sido de-N- acetilados, por ejemplo, durante el tratamiento de base descrito más arriba. La re-N-acetilación controlada puede realizarse convenientemente utilizando un reactivo como el anhídrido acético (CH₃CO)₂O, p.ej., en 5% de bicarbonato de amonio [Wessels et al. (1989) Infect Immun 57:1089-94].

Further diafiltration

[0051] Puede llevarse a cabo otra fase de diafiltración, por ejemplo, tras la Re-N-acetilación. La diafiltración puede llevarse a cabo tal y como se describe más arriba, en el apartado titulado "Diafiltración".

[0052] La diafiltración puede ir seguida de otra filtración utilizando para ello un filtro de 0,45/0,2 mm.

Material final

[0053] Finalmente, el polisacárido se prepara, preferiblemente, como un polvo seco, listo para su conjugación.

Preparación de un conjugado

[0054] 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 T independientes a antígenos T dependientes, permitiendo, por tanto, el cebado de la memoria inmunológica. La conjugación es particularmente apta en vacunas pediátricas (p. ej., ref. 22) y es una técnica bien conocida (p. ej., revisada en las refs. 23 a 31).

[0055] Las proteínas portadoras elegidas son las toxinas o toxoides bacterianos, como el toxoide diftérico o el toxoide tetánico. Se prefiere, particularmente, el mutante CRM197 de la toxina diftérica (refs. 32 – 34) ya que es un toxoide diftérico. Otras proteínas portadoras adecuadas contienen la proteína de la membrana externa de *N.meningitidis* (ref. 35), péptidos sintéticos (refs. 36, 37), proteínas de choque térmico (refs. 38, 39), proteínas tosferínicas (refs. 40, 41), citocinas (ref. 42), linfocinas (ref. 42), hormonas (ref. 42), factores de crecimiento (ref. 42) y proteínas artificiales que comprenden múltiples epítopos de células T CD4 humanas procedentes de diversos antígenos derivados de patógenos (ref. 43), como N19 (ref. 44), la proteína D de *H. influenzae* (refs. 45, 46), la proteína de superficie de *Neumococos* PspA (ref. 47), neumolisina (ref. 48), proteínas de captación de hierro (ref. 49), la toxina A o B de *C. difficile* (ref. 50), una proteína de un GBS (véase más abajo) (ref. 51), etc. La adhesión al portador se hace, preferiblemente, a través de un grupo -NH₂, p. ej., 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 utilizando 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 enlazador. La adhesión también puede hacerse a través de un grupo -SH, p. ej., en la cadena lateral de un residuo de cisteína.

[0056] Es posible usar más de una proteína portadora, p. ej., para reducir el riesgo de supresión de la portadora. Por tanto, pueden utilizarse diferentes proteínas portadoras para diferentes cepas o serotipos de *Streptococo*, p. ej., los sacáridos del serotipo de GBS la podrían conjugarse con la CRM197, mientras que los sacáridos del serotipo Ib podrían conjugarse con el toxoide tetánico. También es posible utilizar más de una proteína portadora para un antígeno de sacárido en particular, p. ej., los sacáridos del serotipo III podrían estar en dos grupos: algunos conjugados con la CRM197 y otros conjugados con el toxoide tetánico. En general, sin embargo, se prefiere utilizar la misma proteína portadora para todos los sacáridos.

[0057] Una única proteína portadora podría ser portadora de más de un antígeno de sacárido (refs. 52, 53). Por ejemplo, una única proteína portadora podría tener sacáridos conjugados de los serotipos Ia y Ib. Para alcanzar este objetivo pueden mezclarse diferentes sacáridos antes de la reacción de conjugación. En general, sin embargo, se prefiere tener conjugados separados para cada serogrupo, de forma que se mezclen los diferentes sacáridos después de la conjugación. Los conjugados separados también pueden basarse en el mismo portador.

[0058] Se prefieren los conjugados con una proporción de sacárido proteína (p/p) de entre un exceso de proteína (p. ej., 1:5) y un exceso de sacárido (p. ej., 5:1). Se prefieren las proporciones de entre 1:2 y 5:1, como 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 habitual un exceso de peso del sacárido. En general, la invención proporciona un conjugado que comprende un *Streptococo*, preferiblemente una fracción del sacárido capsular de *S. agalactiae* unida a un portador, donde la proporción de peso del sacárido portador es de al menos 2:1.

[0059] Las composiciones pueden contener una pequeña cantidad del portador libre. Cuando hay una proteína portadora dada, tanto en forma libre como conjugada, en una composición de la invención, la forma no conjugada

supone, preferiblemente, no más del 5% de la cantidad total de la proteína portadora de la composición, considerada como un todo, y está presente, sobre todo, en menos del 2% en peso.

5 **[0060]** Puede utilizarse cualquier reacción de conjugación adecuada con cualquier enlazador adecuado, cuando ello sea necesario.

10 **[0061]** Habitualmente, el sacárido estará activado o funcionalizado antes de la conjugación. La activación puede implicar, por ejemplo, reactivos cianilantes como el CDAP (p. ej., tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino piridinio (refs. 54, 55, etc.). Otras técnicas adecuadas utilizan carbodiimidias, hidrazidas, ésteres activos, norborano, ácido p-nitrobenzoico, N-hidroxisuccinimida, S-NHS, EDC y TSTU (véase también la introducción a la referencia 29).

15 **[0062]** Los enlaces a través de un grupo enlazador pueden realizarse utilizando cualquier procedimiento conocido, por ejemplo, los procedimientos descritos en las referencias 56 y 57. Un tipo de enlace implica la aminación reductora del polisacárido, el acoplamiento del grupo amino resultante con un extremo de un enlazador de ácido adípico y, después, el acoplamiento de una proteína al otro extremo del grupo enlazador del ácido adípico (refs. 27, 58, 59). Otros enlazadores contienen B-propionamido (ref. 60), nitrofeniletamina (ref. 61), haluros de haloacilo (ref. 62), enlaces glucosídicos (ref. 63), ácido 6-aminocaproico (ref. 64), ADH (ref. 65), fracciones de C4 a C12 (ref. 66), etc. Como alternativa al uso de un grupo enlazador puede utilizarse un enlace directo. Los enlaces directos con la proteína pueden comprender la oxidación del polisacárido, seguida de una aminación reductora con la proteína, según se describe, por ejemplo, en las referencias 67 y 68.

20 **[0063]** Se prefiere un proceso que implica la introducción de grupos amino en el sacárido (p. ej., sustituyendo los grupos =O terminales por -NH₂), seguido de la derivación con un diéster adípico (p. ej., Nhidroxisuccinimido diéster del ácido adípico) y la reacción con una proteína portadora. Otra reacción elegida utiliza la activación del CDAP con una proteína D portadora.

25 **[0064]** Tras la conjugación, pueden separarse los sacáridos libres y conjugados. Hay muchos métodos adecuados que incluyen cromatografía hidrófoba, ultrafiltración tangencial, diafiltración, etc. (véanse también las refs. 69 & 70, etc.).

30 **[0065]** Cuando la composición de la invención contiene un oligosacárido despolimerizado, se prefiere que la despolimerización preceda a la conjugación, p. ej., que sea antes de la activación del sacárido.

35 **[0066]** En el método de conjugación elegido, se hace reaccionar un sacárido con dihidracida de ácido adípico. Para el serogrupo A, también puede añadirse carbodiimida en esta etapa. Después de un periodo de reacción, se añade cianoborohidruro sódico. Entonces puede prepararse el sacárido derivado, p. ej, mediante ultrafiltración.

40 **[0067]** Entonces el sacárido derivado se mezcla con la proteína portadora (p. ej., con un toxoide diftérico) y se añade la carbodiimida. Tras un periodo de reacción puede recuperarse el conjugado.

Otras fases

45 **[0068]** Además de las fases que incluyen y que están descritas más arriba, los métodos de la invención pueden incluir fases adicionales. Por ejemplo, los métodos pueden incluir una fase 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 *Streptococos*, especialmente los GBS, los sacáridos más largos tienden a ser más inmunógenos que los cortos (ref. 71).

50 **[0069]** Tras la conjugación, puede medirse el nivel de proteína portadora no conjugada. Una forma de hacer esta medición implica una electroforesis capilar (ref. 72) (p. ej., en solución libre) o una cromatografía electrocinética micelar (ref. 73).

55 **[0070]** Tras la conjugación, puede medirse el nivel de sacárido no conjugado. Una forma de hacer esta medición implica una HPAEC-PAD (ref. 69).

60 **[0071]** Tras la conjugación, puede utilizarse una fase en la que se separa el sacárido conjugado del sacárido no conjugado. Una forma de separar estos sacáridos es utilizar un método que precipite, selectivamente, un componente. Se prefiere la precipitación selectiva del sacárido conjugado para dejar el sacárido no conjugado en la solución, p. ej., mediante un tratamiento con deoxicolato (ref. 69).

65 **[0072]** Tras la conjugación, puede llevarse a cabo una fase de medición del tamaño molecular y/o de la masa molar 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 (SEC/MALS/RI) (ref. 74).

Combinaciones de conjugados

[0073] Los conjugados individuales pueden prepararse, tal y como se describe más arriba, para cualquier serogrupo del *Streptococo*.

[0074] Entonces, pueden mezclarse los conjugados individuales con el fin de proporcionar un preparado polivalente.

[0075] También es posible mezclar un número seleccionado de conjugados para proporcionar un preparado bivalente, trivalente, tetravalente, pentavalente, hexavalente, heptavalente o undecavalente.

[0076] Los conjugados se preparan, preferiblemente, a partir de uno o más de los serogrupos Ia, Ib o III.

[0077] Los conjugados pueden mezclarse añadiéndolos individualmente a una solución tamponada. La solución elegida es la solución salina fisiológica tamponada con fosfato (concentración final de fosfato sódico de 10 mM). La concentración elegida de cada conjugado (medido como sacárido) en el preparado final es de entre 1 y 20 mg/ml, p. ej., de entre 5 y 15 μ g/ml como, por ejemplo, alrededor de 8 μ g/ml. En esta etapa puede añadirse un coadyuvante opcional de sal de aluminio (p. ej., para generar una concentración final de Al³⁺ de entre 0,4 y 0,5 mg/ml).

[0078] Tras la mezcla, se pueden filtrar los conjugados mixtos, ya esterilizados.

Composiciones farmacéuticas

[0079] Los conjugados preparados mediante los métodos de la invención pueden combinarse con portadores farmacéuticamente aceptables. Tales 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, habitualmente, grandes macromoléculas metabolizadas lentamente como, por ejemplo, proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, sacarosa, trehalosa, lactosa y agregados lipídicos (como, por ejemplo, gotitas de aceite o liposomas). Tales portadores son bien conocidos por los expertos habituales en la ciencia. Las vacunas también pueden contener diluyentes, como el agua, solución salina, glicerol, etc. Adicionalmente, puede haber sustancias auxiliares como, por ejemplo, los agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponantes del pH y similares. Un portador habitual es una solución salina fisiológica, tamponada con fosfato, libre de pirógenos y esterilizada. Un exhaustivo análisis de los excipientes farmacéuticamente aceptables está disponible en la referencia 75.

[0080] Las composiciones pueden incluir un antimicrobiano, particularmente si están envasadas en un formato de dosis múltiples.

[0081] Las composiciones pueden comprender un detergente, p. ej., un Tween (polisorbato) como, por ejemplo, el Tween 80 (TM). Los detergentes están generalmente presentes a un nivel bajo (p. ej., > 0,01%).

[0082] Las composiciones pueden incluir sales de sodio (p. ej., cloruro sódico) para aportar tonicidad. Es habitual una concentración de NaCl de 1062 mg/ml.

[0083] Las composiciones incluirán, generalmente, un tampón. Es habitual un tampón fosfato.

[0084] Las composiciones pueden componerse de un alcohol de azúcar (p. ej., manitol) o un disacárido (p. ej., sacarosa o trehalosa), p. ej., alrededor de 15 -30 mg/ml (p. ej., 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.

[0085] Los conjugados pueden administrarse junto con otros agentes inmunorreguladores. En particular, las composiciones incluirán, normalmente, un coadyuvante de vacuna. Los adyuvantes que pueden utilizarse en las composiciones de la invención incluyen, pero no se limitan a:

A. Composiciones que contienen minerales

[0086] Las composiciones que contienen minerales adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen sales minerales como, por ejemplo, sales de aluminio y sales de calcio (o preparados de las mismas). La invención incluye sales minerales como, por ejemplo, hidróxidos (p. ej., oxihidróxidos), fosfatos (p. ej., hidroxifosfatos, ortofosfatos), sulfatos, etc. (véanse los capítulos 8 y 9 de la ref. 76) o preparados de diferentes compuestos minerales, de manera que los compuestos adopten cualquier forma adecuada (p. ej., gel, cristalina, amorfa, etc.) siendo preferible la adsorción. Las composiciones que contienen minerales también pueden formularse como unas partículas de sal metálica (ref. 77).

- [0087] Se prefieren, particularmente, los fosfatos de aluminio, sobre todo en composiciones que incluyen un antígeno de sacárido de *H. influenzae* y un coadyuvante habitual como es el hidroxifosfato de aluminio amorfo, con una proporción molar PO_4/Al de entre 0,84 y 0,92 que incluye 0,6 mg Al_{3+}/ml .
- 5 [0088] La adsorción con una baja dosis de fosfato de aluminio puede utilizarse, p. ej., 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.
- 10 [0089] Las sales de calcio contienen fosfato de calcio (p. ej., las partículas CAP divulgadas en al referencia 258) Las sales de aluminio contienen hidróxidos, fosfatos, sulfatos, etc., con sales que adoptan cualquier forma adecuada (p. ej., gel, cristalina, amorfa, etc.). Es preferible la adsorción de estas sales. Las composiciones que contienen minerales también pueden formularse como unas partículas de sal metálica (ref. 77). Los adyuvantes de sal de aluminio se describen con más detalle más abajo.
- 15 [0090] Pueden utilizarse los adyuvantes conocidos como hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio. Estos son los nombres convencionales pero solo se utilizan por comodidad ya que no es una descripción precisa de los actuales compuestos químicos que están presentes (p. ej., véase el capítulo 9 o la referencia 76). La invención puede utilizar cualquiera de los adyuvantes de hidróxido o fosfato de uso general.
- 20 [0091] Los adyuvantes conocidos como hidróxido de aluminio son, habitualmente, sales de oxihidróxidos de aluminio que, normalmente, son, al menos parcialmente, cristalinas. El oxihidróxido de aluminio, que puede representarse mediante la fórmula $AlO(OH)$, puede distinguirse de otros compuestos de aluminio como, por ejemplo, el hidróxido de aluminio $Al(OH)_3$, mediante espectroscopia infrarroja (IR), en particular, por la presencia de un banda de adsorción de $1070cm^{-1}$ y un arcén resistente de $3090-3100cm^{-1}$ (capítulo 9 de la ref. 76). El grado de cristalinidad de un adyuvante de hidróxido de aluminio se refleja a través de la anchura de la banda de difracción a media altura (WHH), con partículas escasamente cristalinas que muestran una mayor ampliación de la línea debido a los pequeños tamaños de las cristalitas. La zona de la superficie se incrementa a medida que incrementa la WHH y los adyuvantes con valores más altos de WHH han venido teniendo mayor capacidad para la adsorción de antígenos. Es habitual una morfología fibrosa (p. ej., como se ve en los micrografos de transmisión de electrones) en los adyuvantes de hidróxido de aluminio. El pl de los adyuvantes de hidróxido de aluminio es, habitualmente, de, aproximadamente, 11, es decir, el propio adyuvante tiene una carga de superficie positiva con un pH fisiológico. Las capacidades de absorción que se han indicado para los adyuvantes de hidróxido de aluminio son de entre 1.8-2.6 mg de proteínas por mg Al_{+++} a 7,4 pH.
- 25 30 35 [0092] Los adyuvantes conocidos como fosfatos de aluminio son, habitualmente, hidroxifosfatos de aluminio que, a menudo, contienen también una pequeña cantidad de sulfato (p. ej., sulfato de hidroxifosfato de aluminio). Pueden obtenerse mediante precipitación y las condiciones de reacción, así como las concentraciones durante la precipitación influyen en el grado de sustitución del fosfato por hidróxido en la sal. Los hidroxifosfatos tienen, generalmente, una proporción molar PO_4/Al de entre 0,3 y 1,2. Los hidroxifosfatos pueden distinguirse del $AlPO_4$, en sentido estricto, por la presencia de los grupos de hidróxidos. Por ejemplo, una banda espectral de IR con $3164cm^{-1}$ (p. ej., cuando se calienta a $200^\circ C$) indica la presencia de hidróxidos estructurales (capítulo 9 de la referencia 76).
- 40 45 [0093] La proporción molar PO_4/Al_{3+} de un adyuvante de fosfato de aluminio será, generalmente, de entre 0,3 y 1,2 y, preferentemente, de entre 0,8 y 1,2 y, sobre todo, de $0,95 \pm 0,1$. El fosfato de aluminio será, generalmente, amorfo, particularmente para las sales de hidroxifosfatos. Un adyuvante habitual es el hidroxifosfato de aluminio amorfo con una proporción molar PO_4/Al de entre 0,84 y 0,92 que incluye 0.6mg Al_{3+}/ml . El fosfato de aluminio será, generalmente, particulado (p. ej., placa con una morfología como se ve en los micrografos de transmisión de electrones). Los diámetros habituales de las partículas están en el intervalo de 0,5-20 μm (p. ej., aproximadamente, 5-10 μm) tras la adsorción de cualquier antígeno. Las capacidades de absorción que se han indicado para los adyuvantes de fosfato de aluminio son de entre 0.7-1.5 mg de proteínas por mg Al_{+++} a 7,4 pH.
- 50 55 [0094] El punto de carga cero (PZC) del fosfato de aluminio está inversamente relacionado con el grado de sustitución del fosfato por hidróxido y este grado de sustitución puede variar en función de las condiciones de reacción y de la concentración de los reactivos utilizados para preparar la sal mediante precipitación. El PZC también se altera cambiando la concentración de iones fosfato libre en solución (más fosfato = más PZC ácido) o añadiendo un tampón como, por ejemplo, un tampón de histidina (hace que el PZC sea más básico). Los fosfatos de aluminio utilizados según la invención tendrán, generalmente, un PZC de entre 4,0 y 7,0 y, sobre todo, entre 5,0 y 6,5, p. ej., aproximadamente, 5,7.
- 60 65 [0095] Las suspensiones de sales de aluminio utilizadas para preparar las composiciones de la invención pueden contener un tampón (p. ej., un fosfato, una histidina o un tampón Tris) pero esto no siempre es necesario. Se prefiere que las suspensiones estén esterilizadas y libres de pirógeno. Una suspensión puede contener iones fosfato libres de agua, p. ej., presente en una concentración de entre 1,0 y 20 mM, preferiblemente entre 5 y 15 mM y, sobre todo, aproximadamente 10 mM. Las suspensiones también pueden componerse de cloruro sódico.

[0096] La invención puede utilizar un preparado de ambos: un hidróxido de aluminio y un fosfato de aluminio, como en DARONRIX™. En este caso puede haber más fosfato de aluminio que hidróxido, p. ej., una proporción de peso de al menos 2:1 p.ej., >5:1, >6:1, >7:1, >8:1, >9:1, etc.

5 [0097] La concentración de Al+++ en una composición para su administración a un paciente debe ser, preferiblemente, de menos de 10 mg/ml, p. ej., <5 mg/ml, <4 mg/ml, <3 mg/ml, <2 mg/ml, <1 mg/ml, etc. El intervalo elegido es el de entre 0,3 y 1 mg/ml. Se prefiere una dosis máxima de 0.85 mg.

B. Emulsiones oleosas

10 [0098] Las emulsiones oleosas que son adecuadas para su uso como adyuvantes en la invención incluyen emulsiones de escualeno-agua como, por ejemplo, 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, utilizando para ello un microfluidificador). También pueden utilizarse el adyuvante completo de Freund (CFA) y el adyuvante incompleto de Freund (IFA).

15 [0099] Las gotitas de aceite en la emulsión tienen, generalmente, un diámetro de menos de 5 µm y pueden incluso tener un diámetro submicrométrico, una vez alcanzados estos pequeños tamaños con un microfluidificador, se proporcionan emulsiones estables. Se prefieren las gotitas con un tamaño de menos de 220 nm ya que pueden estar sujetas a una esterilización de filtro.

C. Formulaciones de saponina (capítulo 22 de la ref. 76)

25 [0100] También pueden utilizarse formulaciones de saponina como adyuvantes 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 adyuvantes. Las saponinas también pueden obtenerse comercialmente a partir de la *Smilax ornata* (zarzaparrilla), *Gypsophylla paniculata* (velo de novia) y de la *Saponaria officinalis* (raíz jabonosa). Las formulaciones adyuvadas con saponina incluyen formulaciones purificadas como, por ejemplo, QS21, además de formulaciones lipídicas como, por ejemplo, los ISCOMs. La QS21 se comercializa como Stimulon™.

30 [0101] Las composiciones de saponina se han purificado utilizando HPLC y RP-HPLC. Se han identificado fracciones purificadas específicas utilizando estas técnicas, incluyendo QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B y QH-C. Preferiblemente, la saponina es una QS21. En la ref. 79 se divulga un método para la producción de la QS21. Las formulaciones de saponina también pueden componerse de un esteroide como, por ejemplo, el colesterol (ref.80).

35 [0102] Las combinaciones de saponinas y colesterol pueden utilizarse para formar partículas únicas denominadas complejos inmunoestimulantes (ISCOMs) (capítulo 23 de la ref. 76). Los ISCOMs también contienen, habitualmente, un fosfolípido como, por ejemplo, la fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina. Puede utilizarse cualquier saponina conocida en los ISCOMs. Preferiblemente, el ISCOM incluye uno o más de QuilA, QHA y QHC. Los ISCOMs se describen adicionalmente en las refs. 80 - 82. De manera opcional, los ISCOMs pueden estar desprovistos de detergente adicional (ref. 83).

40 [0103] En las refs. 84 y 85 puede encontrarse una revisión del desarrollo de los adyuvantes basados en saponinas.

D. Virosomas y partículas pseudovíricas

45 [0104] Los virosomas y las partículas pseudovíricas (VLPs) también pueden utilizarse como adyuvantes en la invención. Estas estructuras contienen, generalmente, una o más proteínas procedentes de un virus y, opcionalmente, combinadas o formuladas con un fosfolípido. Generalmente, no son patógenos ni replicativos y no suelen contener nada del genoma vírico originario. 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, contienen proteínas derivadas del virus de la gripe (como, por ejemplo, HA o NA), del virus de la Hepatitis B (como, por ejemplo, proteínas del núcleo o de la cápsida), del virus de la Hepatitis E, del virus del sarampión, del virus Sindbis, del Rotavirus, del virus de la fiebre aftosa, del Retrovirus, del virus de Norwalk, del virus del papiloma humano, del VIH, de fagos de ARN, del fago Q ϕ (como, por ejemplo, las proteínas de la cubierta), del fago GA, del fago fr, del fago AP205 y Ty (como, por ejemplo, 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

50 [0105] Los adyuvantes adecuados para su uso en la invención contienen derivados bacterianos o microbianos como, por ejemplo, derivados no tóxicos del lipopolisacárido enterobacteriano (LPS), derivados del lípido A, oligonucleótidos inmunoestimulantes, toxinas de ribosilación del ADP y derivados destoxificados de los mismos.

65

[0106] Algunos derivados no tóxicos del LPS contienen monofosforil lípido A (MPL) y MPL 3-O-desacilado (3dMPL). El 3dMPL es un preparado del monofosforil lípido A 3-O-desacilado con 4, 5 ó 6 cadenas aciladas. La forma elegida de "partícula pequeña" del monofosforil lípido A 3-O-desacilado se divulga en la ref. 93. Tales "partículas pequeñas" del 3dMPL son lo suficientemente pequeñas como para ser filtradas esterilizadas a través de una membrana de 0,22 mm (ref.93). Otros derivados no tóxicos del LPS contienen miméticos del monofosforil lípido A, como, por ejemplo, derivados de fosfato de aminoalquil glucosaminida, p. ej., RC-529 (refs.94, 95).

[0107] Algunos derivados del lípido A contienen derivados del lípido A de *Escherichia coli* como, por ejemplo, OM-174. El OM-174 se describe, por ejemplo, en las refs. 96 y 97.

[0108] Algunos oligonucleótidos inmunoestimulantes adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen secuencias de nucleótidos que contienen un motivo CpG (una secuencia de dinucleótidos que contiene una citosina no metilada y unida mediante un enlace de fosfato a una guanosina). También se ha venido demostrando que los ARN bicatenarios o los oligonucleótidos que contienen secuencias palindrómicas o de poli(dG) son inmunoestimulantes.

[0109] Los CpG's pueden incluir modificaciones/análogos de nucleótidos como, por ejemplo, modificaciones de fosforotioato y pueden ser bicatenarios o monocatenarios. Las referencias 98, 99 y 100 divulgan posibles sustituciones con análogos, p. ej., reemplazar guanosina por 2'-desoxi-7-desazaguanosina. El efecto adyuvante de los oligonucleótidos CpG se analiza adicionalmente en las refs. 101 - 106.

[0110] La secuencia de los CpG puede estar dirigida a TLR9 como, por ejemplo, el motivo GTCGTT o TTCGTT (ref. 107). La secuencia de los CpG puede ser específica para inducir una respuesta inmunitaria por Th1 como, por ejemplo, un ODN de CpG-A o puede ser más específica para inducir una respuesta por células B como, por ejemplo, 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.

[0111] Preferiblemente, el oligonucleótido de CpG se construye de tal forma que el extremo 5' sea accesible para el reconocimiento del receptor. De manera opcional, pueden conectarse dos secuencias de oligonucleótidos de CpG por sus extremos 3' para formar "inmunómeros". Véanse, por ejemplo, las refs. 107 y 111 - 113.

[0112] Las toxinas bacterianas de ribosilación del ADP y los derivados destoxificados de las mismas pueden utilizarse como adyuvantes en la invención. Preferiblemente, la proteína deriva de *E. coli* (enterotoxina termolábil de *E. coli*, "LT"), del cólera ("CT") o de la tosferina ("PT"). El uso de toxinas de ribosilación del ADP destoxificadas como adyuvantes mucosos se describe en la ref. 114 y como adyuvantes parenterales en la ref. 115. La toxina o el toxoide se encuentra, 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 adyuvante es un mutante de LT destoxificado como, por ejemplo, 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 adyuvantes, pueden 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

[0113] Los inmunomoduladores humanos adecuados para su uso como adyuvantes en la invención contienen citoquinas como, por ejemplo, las interleucinas (p. ej., IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 (ref. 125), etc.) (ref. 126), interferones (p. ej., interferón- γ), factor estimulante de las colonias de macrófagos y factor de necrosis tumoral. El inmunomodulador elegido es el IL-12.

G. Bioadhesivos y Mucoadhesivos

[0114] También pueden utilizarse bioadhesivos y mucoadhesivos como adyuvantes en la invención. Algunos bioadhesivos adecuados contienen microesferas de ácido hialurónico esterificado (ref. 127) o mucoadhesivos como, por ejemplo, derivados reticulados del ácido poliacrílico, alcohol polivinílico, polivinil pirrolidona, polisacáridos y de la carboximetilcelulosa. También puede utilizarse Chitosan y derivados del mismo como adyuvantes en la invención (ref. 128).

H. Micropartículas

[0115] También pueden utilizarse micropartículas como adyuvantes en la invención. Se prefieren las micropartículas (es decir, una partícula de ~100 nm a ~150 μ m de diámetro, preferiblemente de ~200 nm a ~30 μ m de diámetro y, sobre todo, ~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 polihidroxi-butírico, un poliortoéster, un polianhídrido, una policaprolactona, etc.), con poli(lactida-co-glicólido) que, de manera opcional, se tratan para que tengan una superficie cargada negativamente (p. ej., con SDS) o una superficie cargada positivamente (p. ej., con un detergente

catiónico como, por ejemplo, el CTAB).

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

- 5 [0116] Algunos ejemplos de formulaciones de liposomas adecuadas para su uso como adyuvantes se describen en las refs. 129 - 131.

J. Formulaciones de éter de polioxietileno y éster de polioxietileno

- 10 [0117] Algunos adyuvantes adecuados para su uso en la invención contienen éteres de polioxietileno y ésteres de polioxietileno (ref. 132). Tales formulaciones contienen, adicionalmente, un tensioactivo de éster de polioxietilén sorbitano en combinación con un octoxinol (ref. 133), además de alquil éteres de polioxietileno u otros tensioactivos de ésteres en combinación con, al menos, un tensioactivo no iónico adicional como, por ejemplo, un octoxinol (ref. 134). Los éteres de polioxietileno elegidos se seleccionan del siguiente grupo: éter de polioxietilén-9-laurilo (laureth 9), éter de polioxietilén-9-esteorilo, éter de polioxietilén-8-esteorilo, éter de polioxietilén-4-laurilo, éter de polioxietilén-35-laurilo y éter de polioxietilén-23-laurilo.

K. Polifosfaceno (PCPP)

- 20 [0118] Las formulaciones de PCPP se describen, por ejemplo, en las refs. 135 y 136.

L. Péptidos de muramilo

- 25 [0119] Algunos ejemplos de péptidos de muramilo adecuados para su uso como adyuvantes en la invención contienen Nacetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP) y Nacetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxi-fosforiloxi)-etilamina (MTP-PE).

M. Compuestos de imidazoquinolona

- 30 [0120] Algunos ejemplos de compuestos de imidazoquinolona, adecuados para su uso como adyuvantes en la invención, contienen Imiquimod (TM) y sus homólogos (p. ej., Resiquimod 3M, TM), descritos, adicionalmente, en las refs. 137 y 138.

- 35 [0121] La invención también puede comprender combinaciones de los aspectos de uno o más de los adyuvantes identificados más arriba. Por ejemplo, en la invención, pueden utilizarse las siguientes composiciones de adyuvantes: (1) una saponina y una emulsión de aceite en agua (ref. 139); (2) una saponina (p. ej., QS21) + un derivado no tóxico de LPS (p. ej., 3dMPL) (ref. 140); (3) una saponina (p. ej., QS21) + un derivado no tóxico de LPS (p. ej., 3dMPL) + un colesterol; (4) una saponina (p. ej., QS21) + 3dMPL + IL-12 (de manera opcional+ un esteroil) (ref. 141); (5) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite en agua (ref. 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, bien microfluidificados en una emulsión submicrométrica o bien sometidos a agitación vorticial para generar un sistema adyuvante 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 del esqueleto de la pared celular (CWS), preferiblemente, MPL + CWS (Detox™) y (8) una o más sales minerales (como, por ejemplo, una sal de aluminio) + un derivado no tóxico de LPS (como, por ejemplo, 3dMPL).

- 50 [0122] Otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimulantes se divulgan en el capítulo 7 de la ref. 76.

[0123] Se prefiere, particularmente, el uso de un adyuvante de hidróxido de aluminio y/o de fosfato de aluminio y, generalmente, los antígenos se adsorben con estas sales. El fosfato cálcico es otro coadyuvante elegido.

- 55 [0124] La composición puede estar esterilizada y/o estar libre de pirógenos. Las composiciones pueden ser isotónicas con respecto a los seres humanos.

- 60 [0125] Las composiciones pueden presentarse en viales o en jeringas precargadas. Las jeringas pueden suministrarse con o sin agujas. Una jeringa contendrá una única dosis de la composición, mientras que un vial puede contener una o múltiples dosis. Normalmente, las composiciones inyectables serán soluciones o suspensiones líquidas. Opcionalmente, pueden presentarse en forma sólida (p. ej., congeladas en seco) para su solución o suspensión en vehículos líquidos antes de su inyección.

- 65 [0126] 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 fijarse de forma rutinaria pero una dosis humana habitual de la composición para su inyección tiene un volumen de 0,5 ml.

[0127] Cuando va a prepararse una composición extemporáneamente, antes de su uso (p. ej., cuando un componente se presenta en forma liofilizada) y se presenta como un kit, el kit puede comprender dos viales o una jeringa precargada y un vial, debiendo utilizarse el contenido de la jeringa para reactivar el contenido del vial antes de la inyección.

5 [0128] Las composiciones inmunógenas utilizadas como vacunas comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de antígeno(s) además de cualquier otro componente, cuando 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, de la edad, del grupo taxonómico del individuo a tratar (p. ej., 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 que imparte el tratamiento y de otros factores relevantes. Se espera que la cantidad esté en un intervalo relativamente amplio que puede determinarse a través de ensayos rutinarios y que una cantidad habitual de cada conjugado de *Streptococo* deba estar entre 1 mg y 20 mg por conjugado (medido como sacárido).

10 [0129] Por tanto, la invención proporciona un método para preparar una composición farmacéutica que comprende las fases de: (a) preparación de un conjugado, tal y como se describe más arriba; (b) mezcla del conjugado con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables.

15 [0130] La invención proporciona, adicionalmente, un método para preparar un producto farmacéutico, que comprende las fases de: (a) preparación de un conjugado, tal y como se describe más arriba; (b) mezcla del conjugado con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables y (c) envasado de la mezcla de conjugado/portador en un recipiente como, por ejemplo, un vial o una jeringa, para generar un producto farmacéutico. Su inserción en la jeringa puede realizarse en fábrica o en quirófano.

20 [0131] La invención también proporciona un método para preparar una composición farmacéutica a partir de un conjugado de sacárido-proteína, que comprende la fase de mezcla del conjugado con un portador farmacéuticamente aceptable, donde el conjugado se ha preparado mediante un proceso de conjugación, tal y como se describe más arriba. El método de conjugación y la fase de mezcla pueden realizarse en momentos muy diferentes, por personas diferentes y en sitios diferentes (p. ej., en diferentes países).

25 [0132] La invención también proporciona un método para envasar un conjugado de sacárido-proteína en un producto farmacéutico, donde el conjugado se ha preparado mediante un proceso de conjugación, tal y como se describe más arriba. El método de conjugación y la fase de mezcla pueden realizarse en momentos muy diferentes, por personas diferentes y en sitios diferentes (p. ej., en diferentes países).

Usos farmacéuticos

30 [0133] También se divulga la composición para su uso en un método para tratar a un paciente, que comprende la administración de la composición al paciente. El paciente puede estar en riesgo de enfermedad o bien ser una mujer embarazada (inmunización maternal). El paciente debe ser, preferiblemente, un ser humano. El ser humano puede tener cualquier edad, p.ej., < 2 años, entre 2 - 11 años, entre 11 - 55 años, > 55 años, etc.

35 [0134] También se divulga la composición para su uso en terapias. La composición puede utilizarse en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades.

40 [0135] Generalmente, las composiciones se administrarán directamente a un paciente. La administración directa puede ejecutarse mediante inyección parenteral (p. ej., transcutáneamente, subcutáneamente, intraperitonealmente, intravenosamente, intramuscularmente o en el espacio intersticial de un tejido) o mediante administración por vía rectal, oral, vaginal, óptica, transdérmica, intranasal, ocular, ótica, pulmonar u otra administración a través de las mucosas. Se prefiere la administración intramuscular (p. ej., en el muslo o en la parte superior del brazo). La inyección puede ser mediante una aguja (p. ej., una aguja hipodérmica) pero puede utilizarse, opcionalmente, una inyección sin aguja. La dosis intramuscular habitual es de 0,5 ml.

45 [0136] La composición puede utilizarse para desencadenar la inmunidad sistémica y/o de mucosas.

50 [0137] El tratamiento dosificado puede ser un programa de dosis única o de dosis múltiples. Las dosis múltiples pueden utilizarse en un programa de inmunización primaria y/o en un programa de inmunización de refuerzo. Un programa de dosis primarias puede ir seguido de un programa de dosis de refuerzo. Los plazos adecuados entre las dosis de cebado (p. ej., entre 4 -16 semanas) y entre el cebado y el refuerzo pueden determinarse de forma rutinaria.

55 [0138] Las infecciones bacterianas afectan a varias zonas del cuerpo y, por esta razón, las composiciones pueden prepararse de varias formas. Por ejemplo, las composiciones pueden prepararse como inyectables o bien como soluciones o suspensiones líquidas. También pueden prepararse formas sólidas adecuadas para su solución o su suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección (p. ej., una composición liofilizada). La composición puede

prepararse para su administración tópica, p. ej., como una pomada, una crema o un polvo. La composición puede prepararse para su administración oral, p. ej., como un comprimido, una cápsula o como un jarabe (opcionalmente saborizado). La composición puede prepararse para su administración pulmonar, p. ej., como un inhalador, utilizando un polvo fino o un aerosol. La composición puede prepararse como un supositorio o como un pesario vaginal.

5 [0139] La composición puede prepararse para su administración nasal, ótica u ocular, p. ej., en aerosol, gotas, gel o polvo (p. ej., refs. 143 y 144). Se prefieren las composiciones inyectables.

Componentes antigénicos adicionales de las composiciones de la invención

10 [0140] Los métodos de la invención también pueden comprender las fases de mezcla de un conjugado de *Streptococo* con uno o más de los siguientes antígenos adicionales:

- 15 - un antígeno de sacárido de *Haemophilus influenzae B* (p. ej., 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*.
- 20 - un antígeno del virus de la hepatitis A como, por ejemplo, un virus inactivado (p.ej., 46, 147).
- un antígeno del virus de la hepatitis B como, por ejemplo, los antígenos de superficie y/o del núcleo (p. ej., 147, 148).
- 25 - un antígeno de la difteria como, por ejemplo, un toxoide diftérico (p.ej., capítulo 13 de la ref. 145).
- un antígeno del tétanos como, por ejemplo, un toxoide tetánico (p.ej., capítulo 27 de la ref. 145).
- 30 - un antígeno de *Bordetella pertussis* como, por ejemplo, holotoxina tosferínica (PT) y hemaglutinina filamentosa (FHA) de *B. pertussis* y, de manera opcional, también en combinación con pertactina y/o aglutinógenos 2 y 3 (p. ej., refs. 149 y 150; capítulo 21 de la ref. 145).
- antígeno(s) de la polio (p. ej., 151, 152) como, por ejemplo, IPV (capítulo 24 de la ref. 145).
- 35 - antígenos de sarampión, paperas y/o rubéola (p. ej., capítulos 19, 20 y 26 de la ref. 145).
- antígeno(s) de la gripe (p. ej., capítulo 17 de la ref. 145) como, por ejemplo, las proteínas superficiales de la hemaglutinina y/o la neuraminidasa.
- 40 - un antígeno de *Moraxella catarrhalis* (p. ej., 153).
- un antígeno proteico de *Streptococcus agalactiae* (*Streptococo* del grupo B) (p. ej., 154, 155).
- 45 - un antígeno de *Streptococcus pyogenes* (*Streptococo* del grupo A) (p. ej., 155, 156, 157).
- un antígeno de *Staphylococcus aureus* (p. ej., 158).

[0141] La composición puede comprender uno o más de estos antígenos adicionales.

50 [0142] Los antígenos proteicos tóxicos pueden destoxificarse cuando sea necesario (p. ej., destoxicación de la toxina tosferínica mediante un recurso químico y/o genético, ref. 150).

[0143] Cuando se incluye un antígeno diftérico en la composición, también se prefiere incluir los antígenos tetánicos y tosferínicos. 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 tanto, se prefieren las combinaciones de DTP.

55 [0144] Los antígenos de la composición estarán, habitualmente, presentes en una concentración de al menos 1 g/ml cada uno. En general, la concentración de cualquier antígeno dado será suficiente para desencadenar una respuesta inmunitaria frente a ese antígeno.

60 [0145] Como alternativa al uso de antígenos proteicos en las composiciones inmunógenas de la invención, pueden utilizarse ácidos nucleicos (preferiblemente ADN, p. ej., en forma de un plásmido) que codifican el antígeno.

65 [0146] Los antígenos se adsorben, preferiblemente, a una sal de aluminio.

[0147] Algunos antígenos no estreptocócicos elegidos para su inclusión en las composiciones son aquellos que protegen frente a *Haemophilus influenzae* del tipo B (Hib). Habitualmente, este será un antígeno del sacárido capsular de Hib. Los antígenos de sacáridos de *H. influenzae* B son bien conocidos.

5 [0148] Ventajosamente, el sacárido de Hib está conjugado covalentemente con una proteína portadora, con el fin de potenciar su inmunogenicidad, especialmente en niños. La preparación de conjugados de polisacáridos, en general, y del polisacárido capsular de Hib, en particular, está bien documentada.

10 [0149] La invención puede utilizar cualquier conjugado adecuado de Hib. Algunas proteínas portadoras adecuadas se describen más arriba y los portadores elegidos para los sacáridos de Hib son el CRM197 (HbOC), el toxoide tetánico (PRP-T) y el complejo de la membrana externa de *N. meningitidis* (PRP-OMP).

15 [0150] La fracción de sacárido del conjugado puede ser un polisacárido (p. ej., fosfato de polirribosilribitol completo, PRP) pero se prefiere hidrolizar los polisacáridos para formar oligosacáridos (p. ej., con un PM de desde ~1 hasta ~5 kDa).

[0151] El conjugado elegido comprende un oligosacárido de Hib enlazado covalentemente a CRM197 a través de un enlazador de ácido adípico (ref. 159, 160). El toxoide tetánico también es un portador elegido.

20 [0152] La administración del antígeno de Hib da como resultado, preferiblemente, una concentración de anticuerpos anti- PRP de > 0,15 μ g/ml y, sobre todo, 1 μ g/ml.

25 [0153] Cuando una composición contiene un antígeno de sacárido de Hib, se prefiere que no contenga también un adyuvante de hidróxido de aluminio. Si la composición contiene un adyuvante de fosfato de aluminio, entonces el antígeno de Hib puede adsorberse al adyuvante (ref. 161) o puede no adsorberse (ref. 162). La prevención de la adsorción puede ejecutarse seleccionando el pH correcto durante la mezcla del antígeno/adyuvante, un adyuvante con un punto de carga cero apropiado y un orden de mezcla apropiado para mezclar los diferentes antígenos en una composición (ref. 163).

30 [0154] Las composiciones de la invención pueden comprender más de un antígeno de Hib. Los antígenos de Hib pueden estar liofilizados, p. ej., para su reconstitución en composiciones meningocócicas. Por tanto, un antígeno de Hib puede envasarse separado de los conjugados de meningococos o puede estar mezclado con ellos.

35 [0155] Otros antígenos no estreptocócicos, para su inclusión en las composiciones de la invención, son aquellos derivados de una enfermedad de transmisión sexual (ETS). Tales antígenos pueden proporcionar profilaxis o terapias para las ETS como, por ejemplo, clamidia, herpes genital, hepatitis (como, por ejemplo, HCV), verrugas genitales, gonorrea, sífilis y/o chancroide (ref. 164). Los antígenos pueden derivar de una o más ETS víricas o bacterianas. Los antígenos de ETS víricas pueden derivar, para su uso en la invención, 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, para su uso en la invención, de, por ejemplo, de *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Treponema pallidum*, *Haemophilus ducreyi* o *E. coli*

45 [0156] La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, ADN recombinante e inmunología, las cuales se engloban en la experiencia de la ciencia. Tales técnicas se explican detenidamente en la literatura. Véanse, p. ej., *DNA Cloning*, Volúmenes I y II (D.N Glover, 1985), *Oligonucleotide Synthesis* (MT Gait, 1984), *Nucleic Acid Hybridization* (B.D. Hames & ST Higgins, 1984), *Transcription and Translation* (B.D. Hames & ST Higgins, 1984), *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, 1986), *Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press, 1986), *B. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984), *The Methods in Enzymology series* (Academic Press, Inc.), especialmente los volúmenes 154 y 155; *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.H. Millerand M.P. Calos, 1987, Cold Spring Harbor Laboratory), Mayer and Walker (1987), *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology* (Academic Press, London), Scopes (1987) *Protein Purification: Principles and Practice*, segunda edición (Springer-Verlag, N.Y.), *Handbook of Experimental Immunology*, Volúmenes I-IV (D.M. Weir and C. C.Blackwell, 1986), *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Company, Easton, Pa., decimonovena edición(1995); *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan, Academic Press, Inc.) y *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, 1986, Blackwell Scientific Publications); *Sambrook, et al.,Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª edición, 1989), *Handbook of Surface and Colloidal Chemistry* (Birdi, K.S, CRC Press, 1997), *Short Protocols in Molecular Biology*, 4ª ed. (Ausubel et al., 1999, John Wiley & Sons), *Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course* (Ream et al., 1998, Academic Press), *PCR (Introduction to Biotechniques Series)*, 2ª ed. (Newton & Graham, 1997, Springer Verlag) y *Peters and Dalrymple, Fields Virology* (2ª ed.), Fields et al., B.N. Raven Press, New York, NY.

[0157] En este plan se utilizan abreviaciones estandarizadas para los nucleótidos y los aminoácidos.

EJEMPLOS

65

[0158] Para ilustrar los métodos que aquí se recogen, se aisló a los pacientes con la enfermedad de GBS y se estudiaron los *Streptococcus agalactiae* 090, H36b, M781 y CBJ111 que producen cuatro serotipos representativos (Ia, Ib, III y V). La fermentación de estas cepas se investigó y se analizó en el ejemplo 1-5 del WO2009081276.

5 **Ejemplo A – Producción a escala experimental**

[0159] Este ejemplo se aplica a la producción a escala de fabricación del polisacárido capsular de serotipo específico de la bacteria *Streptococcal*.

10 **A) Cultivo del inóculo**

i) Medio del cultivo

15 [0160] El cultivo del inóculo se realizó en cuatro frascos de agitación de 5 L esterilizados a temperatura (programa de autoclave n° 1 min./ máx., 40 min., 121° C, tabla 6) que contiene 1 L de medio complejo (17 g/L de extracto de levadura Difco, 8 g/L de Na₂HPO₄.2H₂O, 2 g/L de NaH₂PO₄.H₂O y 33 g/L de glucosa monohidratada, esterilizada mediante una filtración de 0,2 mm con el sistema Nalgene de filtro de laboratorio desechable, con pH de 7,3 ± 0,1 adaptado utilizando NaOH 3M), 10 mL de solución de vitaminas (0,05 g/L de cada una de las siguientes vitaminas: tiamina, riboflavina, piridoxina HCl y niacinamida, diluidas en 0, NaOH 1M, esterilizadas mediante una filtración de 0,2 mm) y 5 mL de solución de biotina (0,2 g/L de biotina, esterilizada mediante una filtración de 0,2 mm) añadidos justo antes de la inoculación.

25 **Tabla 6: Correlación entre el contenido del autoclave y las especificaciones de la esterilización**

Descripción de los contenidos del autoclave	Número de programa	Organización (b)	Tiempo de esterilización (min.)	Temperatura de esterilización (°C)
Líquido	7	2 o 4	30	121
Material de vidrio	4	1 min., 1 máx. ó 7	40	121
Sucio	8	3	130	124
Filtro de aire (a)	2	No disponible	40	121
Líquido	6	6	50	121
Antiespumante	9	8	60	121

ii) Inoculación de los frascos y condiciones del cultivo

40 [0161] Cada frasco se inoculó con 2,75 ± 0,25 mL de semillas de trabajo descongeladas extemporáneamente del congelador a una temperatura de -70° C. El cultivo se mantuvo a 35 ± 1° C con una agitación de 200 ± 10 rpm en la incubadora (IN-L0641), durante 4 ± 1 h. Pasado este tiempo, se evaluó la concentración de biomasa mediante la medición del OD a 590 nm y mediante la realización de una tinción de Gram. Si el valor de OD590nm alcanzó 1,2-0,6 y si la tinción de Gram estaba conforme (solo cocos gram positivos), los contenidos de los cuatro frascos se juntaron dentro de un envase de 5 L esterilizado al calor (programa de autoclave n° 1 min. / máx.) y con conexiones a la línea de incubación de 300 L . B. Braun Biotech / fermentador Chemap (ID VS-L0530).

iii) Variables clave de la preparación de inóculos

50 [0162] Las variables clave de la preparación de inóculos se describe en las tablas 7 y 8.

Tabla 7: Variables controladas durante la preparación de inóculos	
Variables controladas	Intervalo objetivo
pH inicial del medio	7,3 ± 0,1
Volumen de la semilla de trabajo	2,5 – 3,0 ml / frasco
Temperatura de incubación	35 ± 1° C
Velocidad de agitación	200 ± 10 rpm

Tabla 8: Variables monitorizadas durante la preparación de inóculos	
Variables monitorizadas	Intervalo objetivo
OD _{590nm} final	0,6-1,8
GRAM	Solo cocos gram positivos
Pureza del cultivo	No contaminante
Tiempo de incubación	3-5 horas

iv) Esterilización y limpieza de los equipos

[0163] Tras su uso, los frascos y el envase de 5 L se esterilizaron al calor (programa de autoclave nº 8, ciclo sucio, véase la tabla 6 para las especificaciones) y se limpiaron.

B) Cultivo en el fermentador de 300 L

i) Preparación del medio y equipo

[0164] Se esterilizaron el conducto mecánico y los filtros de gas del fermentador de 300 L, una vez vacío (programas SEAL2 y EXFC2). Entonces, se comprobaron y calibraron las sondas. La sonda de pH se calibró utilizando para ello dos soluciones tamponadas, con unos valores de pH de 7 y 10. La correcta aplicación de la sonda de oxígeno se verificó poniendo la sonda en el agua, con un flujo de gas de nitrógeno para el punto 0% y de aire para el punto 100%. Su calibración se realizó dentro del fermentador.

[0165] Se formuló el medio básico (120 L, 2 g/L Na₂HPO₄·2H₂O, 1 mL para 120 L de antiespumante "PPG 2500") y se esterilizó en el fermentador de 300 L (programa FVES 2). Durante la esterilización, se comprobó el valor de 0% de la sonda de oxígeno y se reinició, si ello fue necesario. Tras las etapas de enfriamiento de la esterilización, la temperatura del medio alcanzó los 36° C y el medio básico se completó con 17 L de extracto de levadura (150 g/L), 9 L de glucosa monohidratada (550 g/L), 2 L de una solución de vitaminas (0,05 g/L de cada una de las siguientes vitaminas: tiamina, riboflavina, piridoxina HCl y niacinamida, diluidas en 0, NaOH 1M) todos esterilizados mediante una filtración de 0,2 mm. Se calibró, entonces, el valor de 100% de la sonda de oxígeno, tras la oxigenación del medio. Tras la adición de 4 L de inóculo, el volumen final fue de 150 L al principio de la fermentación y la concentración final del extracto de levadura fue de 17 g/L y la glucosa fue de 33 g/L. Estas adiciones se realizaron en líneas esterilizables con una bomba peristáltica a una velocidad máxima (400 rpm) que se correspondía con el flujo de 550 mL/min.

ii) Proceso de fermentación y controles durante el proceso

[0166] Antes de la inoculación, se añadió una solución de biotina (1 L, 0.2 g/L de biotina, esterilizada mediante una filtración de 0,2 mm) Entonces, el fermentador de 300 L se inoculó utilizando para ello el envase de 5 L con un contenido de 4 frascos de inóculo.

[0167] Entonces, se comprobó el valor de los parámetros siguientes, se ajustó, si ello fue necesario y se controló automáticamente durante el proceso:

- se controló que la temperatura del cultivo fuera de $36 \pm 1^\circ \text{C}$,

- se fijó la sobrepresión del interior del fermentador en 0,2 bares,

- se fijó el pH en $7,3 \pm 0,1$ y se ajustó utilizando para ello NaOH 4M. No hubo ninguna corrección del pH utilizando para ello una solución ácida porque el valor del pH descendió de forma natural debido a la fermentación,

- la agitación inicial se fijó en 50 rpm y el flujo de aire inicial se fijó en 20 L/min.,

- el nivel de espuma en el fermentador fue monitorizado visualmente y ajustado, utilizando para ello un antiespumante PPG 2500, si ello fue necesario,

- la tensión de oxígeno disuelto (DOT) se fijó en el 30%, regulado en cascada mediante:

- la agitación (intervalo de valores entre 50 y 350 rpm)

- el flujo de aire (intervalo de valores entre 20 y 100 L/min)

- el flujo de oxígeno (intervalo de valores entre 0 y 100 L/min)

[0168] Las muestras se tomaron durante la etapa de dosificación de la fermentación, dos horas después de la inoculación y se midió el OD590nm. Las muestras se tomaron cada 15 minutos, hasta que se alcanzó el 3 OD590nm. En ese objetivo de OD, se inició la adición del primer exponencial del lote alimentado, utilizando para ello 3,6 L de una solución de extracto de levadura (150 g/L), manteniendo, así, el tiempo de duplicación de la población en 300 minutos.

[0169] Aproximadamente 45 minutos tras la primera adición, se midió el OD590nm. Las muestras se tomaron cada 15 minutos hasta que se alcanzó el 5 OD590nm. En ese objetivo de OD, se inició la adición de un segundo exponencial del lote alimentado, utilizando para ello la solución de extracto de levadura (150 g/L), manteniendo, así, el tiempo de duplicación de la población en 50 minutos.

[0170] Al final de la adición de este segundo exponencial del lote alimentado, se realizó la adición de un lote alimentado de pH-stat. Cuando el valor del pH excedió de 7,18, se añadió una solución de glucosa monohidratada (550 g/L). Durante esta adición, se tomó una muestra cada hora para medir el OD590nm.

[0171] La fermentación terminó, aproximadamente, 3 horas después de la última adición. Entonces, los controles automáticos de los parámetros se pararon. La agitación se reguló a 100 rpm y la temperatura a 30 ° C.

iii) Variables clave del proceso de fermentación

[0172] Las variables clave del proceso de fermentación se describen en la tabla 9 y en la 10.

Tabla 9: Variables controladas durante la fermentación	
Variables controladas	Intervalo objetivo
pH del medio	7,3 ±0,1
Punto de control de DOT	30%
Temperatura	36 ± 1°C
Sobrepresión	0,2 bares

Tabla 10: Variables monitorizadas durante la fermentación	
Variables monitorizadas	Intervalo objetivo
Comprobación de la esterilización antes de la inoculación	No contaminante
OD _{590nm} para cada muestra	-
Pureza del cultivo al final de la fermentación	Falta de contaminante
Tinción de GRAM	Solo cocos gram positivos
Tiempo de fermentación	-

iv) Desinfección, esterilización y limpieza de los equipos

[0173] Una vez que se extrajo la biomasa del fermentador de 300 L, se inició la desinfección mediante la adición de 200 L de ROW dentro del fermentador. Entonces, se añadió NaOH 3M dentro del fermentador hasta que el pH alcanzó 11. La temperatura se mantuvo durante 30 minutos a 80 ° C. Tras enfriar la temperatura ambiente, se desechó el contenido del fermentador dentro del depósito de residuos situado en la planta baja.

[0174] Entonces se realizó la esterilización mediante la adición de 200 L de ROW y mediante la activación del programa (FVES 2), según los procedimientos operativos estándar (SOP).Tras las etapas de enfriamiento de la esterilización, se extrajeron el pH y la sonda de oxígeno del fermentador y se almacenaron, respectivamente, en una solución KCl 3M y en ROW.

[0175] Finalmente, se lavó el fermentador utilizando para ello 200 L de NaOH 1M y se agitó a 100 rpm durante, al menos, 30 minutos. Tras el lavado, se vaciaron esos 200 L de NaOH dentro del depósito destructivo y se colocaron otros 100 L de NaOH en el fermentador a través de un catéter de pulverización para limpiar la parte superior del recipiente. Se volvieron a poner en circulación esos 100 L utilizando para ello una bomba de pistón para un tiempo mínimo de 30 minutos. Tras la fase de limpieza, se lavó el fermentador con ROW hasta que el pH descendió a un intervalo de entre 5 y 7.

C) Centrifugación de la biomasa

i) Preparación del equipo

5 **[0176]** Se conectó un depósito con agua fisiológica (~100 L, 9g/L NaCl, esterilizada mediante una filtración de 0,2 mm) a la línea de transferencia que unía el fermentador de 300 L con el centrífugo Alfa-Laval (ID CT-L0526). Se utilizó esta agua, durante la centrifugación, para lavar el pellet de biomasa. Entonces se esterilizó al calor la línea de transferencia, como el depósito separador y colector de biomasa. Se prepararon los equipos antes del final de la fermentación con el fin de comenzar la centrifugación lo antes posible, tras el final de la fermentación.

10 *ii) Proceso de centrifugación de flujo continuo*

[0177] El proceso de centrifugación de flujo continuo se compuso del siguiente ciclo:

- 15 - 7 minutos de centrifugación de biomasa a un flujo de 100 L/h, ajustado manualmente. Se transfirió la biomasa desde el fermentador al separador a través de la línea de transferencia y mediante un exceso de presión de 0,6 bares en el fermentador,
- 3 minutos de lavado con agua fisiológica, a un flujo de 100 L/h,
- 20 - vertido del pellet

[0178] Este ciclo se repitió, normalmente, hasta que se procesó toda la biomasa. No se recogió el sobrenadante que, en su lugar, alimentó al depósito de residuos. Durante el proceso, se recogió el pellet en el depósito (VS-L0536) y, entonces, se transfirió mediante un exceso de presión de 0,3 bares, a través de una conexión de silicona a una bolsa esterilizada desechable de 100 L para tratamientos químicos.

iii) Variables clave de la centrifugación

[0179] Las variables clave del proceso de fermentación se describen en la tabla 11.

30

Tabla 11: Variables controladas durante la centrifugación	
Variables controladas	Valor objetivo
Presión en el fermentador	0,6 ± 0,1 bares
Flujo	100 L/h
Temperatura de la biomasa	30 ± 1° C
Tiempo de vertido	10 (7+3) min (a)
Temperatura del pellet	30 ± 1° C
Presión del sobrenadante	3,0 ± 0,3 bares
NOTA: 7 minutos de centrifugación de biomasa + 3 minutos de lavado con una solución fisiológica.	

45

[0180] Las variables monitorizadas fueron varias de vertido y del peso de la biomasa recogida.

50

iv) Esterilización y limpieza de los equipos

[0181] Tras la centrifugación y la transferencia del pellet a la bolsa desechable, se esterilizaron al calor y se limpiaron la línea de transferencia, el depósito separador y el colector de biomasa. Se limpiaron la línea de transferencia y el depósito separador, utilizando para ello 100 L de NaOH 1 M a temperatura ambiente en el fermentador y, entonces, se transfirieron, a través de la línea de transferencia, al depósito separador, a un flujo de 100 L/h. Se limpió el depósito colector mediante la circulación, durante 30 minutos, de 20 L de NaOH 1 M en el depósito, a través de un catéter de pulverización para limpiar la parte superior del depósito. Tras esta fase de limpieza, se lavó el depósito con ROW hasta que el pH descendió a un intervalo de entre 5 y 7.

55

D) Tratamientos químicos del pellet celular

60

i) Inactivación del pellet celular

[0182] El tratamiento químico del pellet celular desactivó la bacteria y permitió que los cps se liberaran de la bacteria. El tratamiento implicaba la adición de una solución de NaOH 4 M (a través de un tubo con una bomba peristáltica) al pellet para obtener una concentración teórica de NaOH 0,8 M. El peso de NaOH 4 M que se añadió se obtuvo mediante la división del peso de la biomasa por cuatro desde 1L (1 kg pesado). Esta fase se realizó en una

65

bolsa desechable de 100 L con un sistema agitador integrado y se desechó en el Sistema Levtech Sartorius (ID AG-10645, balanza y agitador termostatizados). Se reguló la temperatura para mantener el pellet a 37° C y, entonces, se agitó a 180 rpm durante un período de tiempo determinado. Fue suficiente con 12 h para desactivar los microorganismos. Fueron adecuadas las 36 h para liberar los cps de la cápsula bacteriana. En otros experimentos, se descubrió que 1 h era suficiente para desactivar los microorganismos, mientras que las 24 h fueron adecuadas para liberar los cps de la cápsula bacteriana. En consecuencia, un total de 36 h ó 24 h resulta adecuado para esta fase.

ii) Variables clave de la desactivación

[0183] Las variables clave del proceso de fermentación se describen en la tabla 12.

Tabla 12: Variables controladas durante la desactivación y la liberación de los cps	
Variables controladas	Valor objetivo
Temperatura de desactivación	37 ± 0,1° C
Agitación	180 ± 10 rpm
Tiempo	36 menas

iii) Neutralización y precipitación

[0184] Se añadió una solución tampón de TRIS 1 M utilizando para ello tubos de silicona con una bomba peristáltica para obtener una concentración final igual a 0,1 M. El peso de TRIS que hubo que añadir se calculó mediante la división del peso de la biomasa desactivada por 9. Esta adición fue importante para poder evitar la variación del pH en el pellet durante la neutralización. Por tanto, se controló el pH utilizando para ello una sonda de pH que se desechó en la bolsa desechable. Se añadió HCl 6M para obtener un valor final de pH de 7,5-8,5.

[0185] Se añadieron CaCl2 2 M y 96% de soluciones de etanol para precipitar proteínas y ácidos nucleicos en el pellet. La concentración final de CaCl2 fue de 0,05 M y del 30% de etanol. El peso de CaCl2 2 M que se añadió se obtuvo mediante la división del peso de la biomasa neutralizada por 19 y el peso del 96% de etanol se obtuvo dividiendo el peso de la biomasa neutralizada con CaCl2 por 3,1.

E) Microfiltración y diálisis del pellet tratado

[0186] La biomasa, químicamente tratada con CaCl2 y con 30% de etanol, experimentó una microfiltración para recuperar los polisacáridos liberados en el sobrenadante y para eliminar los residuos celulares, además de los precipitados de proteína y de ácido nucleico.

i) Preparación del equipo

[0187] Se realizaron la microfiltración y la diálisis utilizando un Sartocon II Sartorius de más soporte con una carcasa desechable y 4 cassettes Hydrosart de 0,22 mm, 0,6 m2 que representaban una superficie total de 2,4 m2. El sistema se ajustó utilizando para ello una llave dinamométrica de 90 Nm.

[0188] Los cassettes se desinfectaron utilizando para ello 20 L de NaOH 1 M y se esterilizaron mediante una filtración de 0,2 mm, utilizándose una bomba de pistón para asegurar y regular la presión en el sistema .Entonces, volvió a circular, durante 30 minutos, el material retenido y permeado en las siguientes condiciones:

- Presión de entrada: 2,0 ± 0,2 bares
- Válvula de permeato cerrada durante 5 minutos y, luego, ampliamente abierta.

[0189] El agua destilada se utilizó para lavar el sistema hasta que el pH alcanzó 5-7, en cuyo momento se lavó el sistema con 20 L de agua fisiológica (0.9 g/L NaCl, esterilizada utilizando una filtración de 0,2 mm) para obtener un pH de 5-7 en las siguientes condiciones:

- Presión de entrada: Pin = 2,0 ± 0,2 bares
- Presión de permeato: Pperm = 0 bar (abrir la válvula)
- Válvula de retención cerrada.

[0190] Antes de la microfiltración, se acondicionaron los cassettes con una solución tampón de diálisis ((34,77 g/L NaCl, 4,49 g/L TRIS, 10,93 g/L CaCl2, pH ajustado a 7,8 ± 0,1 utilizando para ello HCl 6 M, WFI qsp

74,4 % del volumen final, 96% de etanol hasta el volumen final, esterilizado mediante una filtración de 0,2 mm).

ii) Microfiltración y diálisis

5 [0191] Se conectó el tubo de salida de la bolsa desechable, que contenía la biomasa tratada, con la entrada de la carcasa de microfiltración. Se conectó la salida del material retenido de la carcasa con la bolsa desechable que contenía la biomasa tratada para que la biomasa procesada volviera a circular. Se conectó la salida de permeato con una bolsa desechable y esterilizada de 200 L para recoger el permeato.

10 [0192] La válvula de permeato estuvo inicialmente cerrada para dejar que el pellet circulara en el sistema de microfiltración. Entonces, se abrió esta válvula y se controló la velocidad de la bomba de pistón para obtener las siguientes condiciones:

- 15 - Presión de entrada: $P_{in} = 2,0 \pm 0,2$ bares
- Presión de permeato: $P_{perm} = 0,6 \pm 0,1$ bares

[0193] La biomasa se concentró 10 veces y se dializó el material retenido contra 3 volúmenes de tampón. Para determinar con precisión la circulación en el sistema de microfiltración, el peso del material retenido no debe ser de menos de 10 Kg. Es así como se concentró el material retenido hasta que la biomasa pesó $10 \pm 0,5$ kg. La diálisis se realizó, entonces, en sucesivas fases. El peso de la solución tampón utilizada se calculó a partir del peso de $CaCl_2$ -etanol dividido por el factor 10 de concentración teórica y multiplicado por el número deseado de ciclos de diálisis.

25 iii) Esterilización mediante filtración del permeato

[0194] El permeato se esterilizó mediante filtración utilizando para ello un filtro de 2000 cm² Sartobran P 0.22 mm y a la salida del sistema de microfiltración, antes de su recogida dentro de la bolsa desechable de 200 L. El producto final se almacenó a temperatura ambiente, antes de su liberación dentro de un servicio de purificación.

30 iv) Variables clave de la microfiltración y diálisis

[0195] T Las variables clave de la microfiltración y diálisis se describen en la tabla 13.

Tabla 13: Variables controladas durante la microfiltración y diálisis	
Variables controladas	Valor objetivo
Pin	$2 \pm 0,2^\circ C$
Pperm	$0,6 \pm 0,1$ bares
Temperatura del material retenido	$\leq 20^\circ C$

[0196] Las variables monitorizadas son el flujo de permeato y la cantidad de polisacáridos.

45 v) Limpieza del equipo

[0197] Tras la microfiltración, se conectó la entrada al depósito que contenía 100 L de agua fisiológica para lavar los cassettes desechables y la carcasa. Entonces se utilizaron los 20 L de NaOH 1 M para desinfectar el sistema y se conectó el material permeado y retenido a la entrada para volver a circular durante 30 minutos, mientras que se mantenían las siguientes condiciones:

- 50 - Presión de entrada: $P_{in} = 2,0 \pm 0,2$ bares
- Válvula de permeato cerrada durante 5 minutos y, luego, ampliamente abierta.

55 [0198] Entonces se vaciaron el sistema y el conducto y se lavaron con agua destilada hasta que los valores de pH del material permeado y retenido se situaron en un intervalo de entre 5 y 7. En este pH objetivo, el sistema se desmontó.

60 [0199] Se utilizó un test de integridad del filtro Sartobran P para esterilizar el permeato durante la microfiltración y se realizó la diálisis antes de la liberación del lote del servicio de purificación.

F) Descripción de los perfiles de fermentación

65 [0200] Se analizaron los perfiles de fermentación de los experimentos a escala piloto correspondientes a las 3 cepas de GBS: M781 (serotipo III), H36b (serotipo Ib) y 090 (serotipo Ia) y se compararon con la fermentación de control

realizada a escala de laboratorio en un fermentador de 30 L (B. Braun Biotech Biostat); con la cepa H36b se utilizó un proceso idéntico.

[0201] Los perfiles OD590nm de las 3 fermentaciones a escala piloto fueron muy parecidos los unos a los otros, además de la fermentación de control (véase la figura 22). El perfil general del crecimiento de los microorganismos puede describirse de la siguiente manera:

La etapa de dosificación duró, aproximadamente, 2,5 horas y resultó ser igual a 3 en un OD590nm. La adición del primer exponencial alimentado de extracto de levadura (F1, 150 g/L) duró, aproximadamente, 45 minutos y resultó ser igual a 5 en un OD590nm. La adición del segundo exponencial alimentado de extracto de levadura (F2, 150 g/L) duró, aproximadamente, 45 minutos y resultó ser de , aproximadamente, 10 en un OD590nm. La adición del tercer pH-*stat* alimentado de glucosa monohidratada (F3, 550 g/L) duró, aproximadamente, 3 horas.

G) Evaluación de la tasa de crecimiento y los tiempos de duplicación de la población

[0202] Las tasas de crecimiento (μ) y los tiempos de duplicación de la población (t_d) se evaluaron durante los 3 pre-ensayos, así como la fermentación de control. Los valores se indican en la figura 22, además de en la tabla 14.

	Etapa	M781	H36b	090
μ_{F1} (h^{-1})	F1	0,59	0,96	0,54
td_{F1} (min)		71	43	88
μ_{F2} (h^{-1})	F2	1,01	0,89	0,65
td_{F2} (min)		41	47	64
μ_{F3} (h^{-1})	F3	0,20	0,23	0,23
td_{F3} (min)		203	182	182

[0203] Los tiempos de duplicación de la población durante la adición del primer exponencial alimentado de los pre-ensayos se situaron en un intervalo de entre 43 y 77 minutos. Durante la adición del segundo exponencial alimentado de los pre-ensayos, los tiempos de duplicación de la población se situaron en un intervalo de entre 41 y 64 minutos, lo cual fue casi igual a la fermentación de referencia (55 minutos) y muy cerca de la duplicación teórica de la población (50 minutos).

H) Evaluación de la producción de los polisacáridos capsulares

[0204] La concentración de cps se evaluó al final de la fermentación utilizando para ello un método colorimétrico basado en la determinación de la concentración del compuesto de ácido siálico de los cps. En base a este resultado, se calculó la cantidad de cps producidos durante el cultivo multiplicando la concentración de cps por el volumen final dentro del fermentador (20 L para la fermentación de referencia, 215 L para el fermentador a escala piloto). También se calculó la producción volumétrica y específica según como se establece más abajo, en los Métodos analíticos relacionados con la fermentación. Los valores se indican en la tabla 15.

	M781	H36b	090
OD _{590nm} final	18,15	25,1	14,0
Concentración final de biomasa seca (g/L)	7,93	10,97	6,12
Concentración final de cps (g/L)	0,38	0,31	0,42
Cantidad de cps producidos (g)	82	67	90
Proporción cps/biomasa (%)	4,8	2,8	6,8

I) Simplificación del proceso inicial

[0205] El proceso de fermentación se simplificó en dos días para evitar potenciales variaciones en la ampliación y para reducir el riesgo de contaminación en el fermentador.

[0206] Primero, las soluciones de vitaminas que contienen tiamina, riboflavina, piridoxina HCl y niacinamida (0,05 g/L de cada una, diluidas en 0,1 NaOH 1 M y esterilizadas mediante una filtración de 0,2 μ m) se extrajeron del medio del inóculo y del fermentador. De hecho, los resultados de laboratorio habían mostrado que la adición de

estas vitaminas no era necesaria para el crecimiento de los GBS y tenía un impacto insignificante en la producción de los cps.

5 [0207] Segundo, se modificaron los parámetros de las etapas de alimentación durante la fermentación. Se reemplazaron las dos etapas de adición de un exponencial alimentado de extracto de levadura por dos adiciones instantáneas y la etapa de la adición del pH-*stat* alimentado de glucosa se reemplazó por una adición lineal. La primera adición instantánea (F1) se compone de la adición de 3,6 L de una solución de extracto de levadura, 150 g/L utilizando una bomba peristáltica a un flujo de 550 mL.min⁻¹, cuando el OD590nm estaba en el intervalo de entre 2,5 y 3. La segunda adición instantánea (F2) se compone de la adición de 13,4 L de una solución de extracto de levadura, 150 g/L utilizando una bomba peristáltica a un flujo de 550 mL. min⁻¹, cuando el OD590nm estaba en el intervalo de entre 4,5 y 5. La tercera adición lineal (F3) se compone de la adición de 17 L de una solución de glucosa utilizando una bomba peristáltica a un flujo de 95 m/l. min⁻¹, cuando el OD590nm estaba en el intervalo de entre 10 y 12.

15 **J) Descripción de los perfiles de fermentación y comparación con los anteriores ensayos.**

[0208] Se analizaron los perfiles de fermentación de esta serie de pre-ensayos y se compararon con la primera serie para asegurarse de que el proceso simplificado no tenía ningún impacto a escala piloto.

20 [0209] Los perfiles de OD590nm de las 3 fermentaciones a escala piloto fueron muy parecidos los unos a los otros, además del perfil general observado en la primera serie de pre-ensayos (véase figura 23). El parecido entre los perfiles llama la atención sobre el hecho de que las modificaciones del proceso no tengan impacto en el crecimiento de los microorganismos, como se puso de manifiesto a escala de laboratorio.

25 **K) Evaluación de las tasas de crecimiento, los tiempos de duplicación de la población y la producción de polisacáridos capsulares**

[0210] .Las tasas de crecimiento y los tiempos de duplicación de la población de esta serie (tabla 16) también eran muy parecidas a la primera serie de pre-ensayos y no se observaron variaciones significativas.

30

Table 16: Tasa de crecimiento y tiempo de duplicación de la población durante la segunda serie de pre-ensayos					
	Etapa	M781	H36b	090	
35	F1	μ_{F1} (h ⁻¹)	0,80	0,66	0,67
		td _{F1} (min)	52	63	63
	F2	μ_{F2} (h ⁻¹)	0,92	0,76	0,92
40		td _{F2} (min)	45	55	45
	F3	μ_{F3} (h ⁻¹)	0,18	0,31	0,19
		td _{F3} (min)	232	133	219

45 [0211] La concentración final de cps de estos pre-ensayos era acorde con los pre-ensayos anteriores. Esto apunta a que no había diferencia significativa que resultara de las modificaciones, ni a escala de laboratorio ni a escala piloto (véase tabla 17).

50

Tabla 17: Producción y productividad de los polisacáridos capsulares				
	M781	H36b	090	CJB111
	18,25	20,7	17,5	25,5
55	7,98	9,05	7,65	10,5
	0,26	0,30	0,40	0,37
	56	65	86	86
60	3,2	3,3	5,2	3,4

L) Fases críticas del proceso y definición del plan de muestreo para la confirmación del proceso

65 [0212] Durante estas dos series de ensayos a escala piloto, se han venido definiendo los importantes controles del proceso interno de las fases críticas del procesamiento con sus criterios de aceptación y el plan de muestreo asociado. El primer control del proceso interno fue el OD590nm del frasco antes de la inoculación que es,

preferiblemente, de entre 0,6 y 1,8, para evitar una potencial etapa de latencia al principio del cultivo en el fermentador, según se observó a escala de laboratorio. Los siguientes controles del proceso interno fueron relevantes para la pureza del cultivo: se realizaron tinciones de Gram del medio de los frascos, además de la extensión en placas del envase colectivo y del medio del fermentador para asegurarse de que el medio ambiente no estaba contaminado. Al final del cultivo, se realizaron otras tinciones de Gram y extensiones en placas del medio, dentro del fermentador, para confirmar que no hubo contaminación durante el proceso. Se confirmó la desactivación del pellet mediante la extensión del pellet en NaOH 0,8 M, en las placas, tras 36 horas de desactivación. Los otros procesos de control interno descritos en la tabla 18 se utilizaron para calcular los rendimientos de purificación de los cps. Se desarrolló un perfil de las variaciones de parámetro (PO₂, flujo de aire, flujo de O₂, agitación, pH y temperatura) y fue un buen indicador de la reproducibilidad del proceso de fermentación.

i) Descripción de los perfiles de fermentación general y comparación con los ensayos anteriores

[0213] Los perfiles OD_{590nm} de este ensayo fueron muy parecidos los unos a los otros, además del perfil general observado en los ensayos previos, en este ejemplo (véase la figura 24).

[0214] Las tasas de crecimiento y los tiempos de duplicación de la población de esta serie (tabla 18) eran comparables a los pre-ensayos. Más específicamente, las tasas de crecimiento de las etapas de adición de los tres ensayos estuvieron entre los valores mínimos y máximos de las tasas de crecimiento indicadas anteriormente. Sin embargo, las tasas de crecimiento de la etapa F3, durante el cultivo de M781 y de la etapa F2, durante el cultivo de 090, estuvieron ligeramente por debajo del valor mínimo indicado anteriormente (0,15 < 0,18 y 0,62 < 0,65, respectivamente) pero sin ninguna incidencia en los valores finales de OD_{590nm} que estuvieron entre los valores extremos de OD_{590nm}, obtenidos durante los ensayos previos (14 y 25,1, respectivamente para el primer pre-ensayo de la cepa 090 y H36b).

	Etapa	M781	H36b	090	CJB111
μ_{F1} (h ⁻¹)	F1	0,82	0,85	0,63	0,72
td _{F1} (min)		51	49	60	58
μ_{F2} (h ⁻¹)	F2	0,92	0,96	0,62	1,16
td _{F2} (min)		45	43	67	36
μ_{F3} (h ⁻¹)	F3	0,15	0,21	0,17	0,27
td _{F3} (min)		281	201	242	158

[0215] La concentración final y la cantidad de cps de los ensayos fueron mayores que las de los pre-ensayos, cuando se compararon los resultados de cada una de las 3 cepas (véase la tabla 19). El valor de la cepa de H36b estuvo entre los valores obtenidos anteriormente para las otras cepas (0.35 L⁻¹ entre 0,26 y 0,42, respectivamente, obtenidos para el primer pre-ensayo de 090 y el segundo de M781). Los valores obtenidos para las cepas M781 y 090 fueron mayores de lo previsto. Es así como las proporciones de cps a biomasa para estas cepas se excedieron en un 10%, lo cual supuso que se facilitara la purificación.

	M781	H36b	090	CJB111
OD _{590nm} final	17,2	20,9	16,5	26,55
Concentración final de biomasa seca (g/L)	7,52	9,12	7,21	11,7
Concentración final de cps (g/L)	1,01	0,35	0,82	0,42
Cantidad de cps producidos (g)	216	75	177	90,3
Proporción cps/biomasa (%)	13,4	3,8	11,4	3,6

Análisis de los controles del proceso interno crítico

[0216] El primer control del proceso interno fue el OD_{590nm} del frasco, antes de la inoculación y se situó en un intervalo de entre 0,80 para la cepa 0,90 y 1,50 para la cepa M781. No se observó ninguna etapa de latencia al principio del cultivo, en el fermentador. El análisis de la pureza del cultivo de los frascos se confirmó mediante la

tinción de Gram que reveló que solo se puede realizar con cocos gram positivos y con el envase colectivo, además del medio del fermentador al final del cultivo que, de manera parecida, reveló que solo se puede realizar con cocos gram positivos. La desactivación del pellet en NaOH 0,8 M se extendió en las placas tras 36 horas de desactivación.

- 5 **[0217]** Los perfiles de las variaciones de los parámetros (PO₂, flujo de aire, flujo de O₂, agitación, pH y temperatura) durante los 4 ensayos fueron comparables al perfil general que se indicó en los pre-ensayos.

Tabla 20: Resultados de los ensayos piloto (purificación de los polisacáridos)

Parametro	Unidad	Limite	Serotipo:			
			la	lb	III	V
			Ensayo	Ensayo	Ensayo	Ensayo
Peso del producto final	g	No disponible	25.9	21.1	28.9	15.5
TGA (peso en seco)	%, p/p	No disponible	93.6	90.9	91.9	90.2
Título de sacárido	µg/mg*	> 850	1030	989	959	1025
Proteinas	µg/mg*	<10	<5	< 5.5	<5	<5
Ácidos nucleicos	µg/mg*	<10	<0.0006	< 0.002	0.007	<0.00006
Grupo de polisacáridos	µg/mg*	<10	<2	< 1.8	<2	<2
Ácido siálico libre	%, m/m	< 1	< 0.8	< 0.9	< 0.9	< 0.15
Conformidad estructural	No disponible	conforme	conforme	conforme	conforme	conforme
Grado de N-acetilación	%	> 80	92	92	90	103
Kd	No disponible	No disponible	0.481	0.330	0.463	0.401
Endotoxinas/sacárido	UI/µg	< 1	< 0.0005	< 0.001	0.0007	0.0003
Antiespumante	µg/mg	< 10	<10	< 10	< 10	nd
*µg/mg de peso en seco						

Tabla 21: Resultados de los ensayos piloto (activación/ conjugación)

Unidad	Limite	Serotipo:				
		la	lb	III	V	
		Ensayo	Ensayo	Ensayo	Ensayo	
Polisacárido trabajado	g	No disponible	6.64	7.19	7.0	5.08
Producto trabajado***	L	No disponible	51	68	49	66
Producto final	Kg	No disponible	3.50	3.89	4.60	1.69
Concentración de sacárido	µg/mL	No disponible	1133	999	489	781
Concentración de proteína	µg/mL	No disponible	427	594	384	678
Grado de glicosilación	No disponible	(1)	2.7	1.7	1.3	1.2
Proteina libre	%, p/p	< 5	< 5	< 3	< 5	< 2
Sacárido libre	%, p/p	< 25	16.2	8.9	19.6	< 1
Ácido siálico libre	%, m/m	< 1	< 0.3	< 0.3	< 0.7	No disponible
pH	No disponible	6.9-7.5	7.2	7.1	7.2	7.2
Identidad / Conformidad*	No disponible	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
NaCNBH ₃	ppm	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2

		Serotipo:		la	lb	III	V
		Unidad	Limite	Ensayo	Ensayo	Ensayo	Ensayo
5	Kd	No disponible	No disponible	0.212	0.220	0.351	0.40
	Endotoxinas/sacárido	UI/mg**	No disponible	1	0.3	0.1	0.24
10	Sacárido total		No disponible	4.0	4.4	2.3	1.3
(1): la and lb: 1.0-3.5; III: 0.5-2.5; V: 0.5-3.0 *mediante RMN; **mg de sacárido; ***como equivalente al volumen de fermentación							

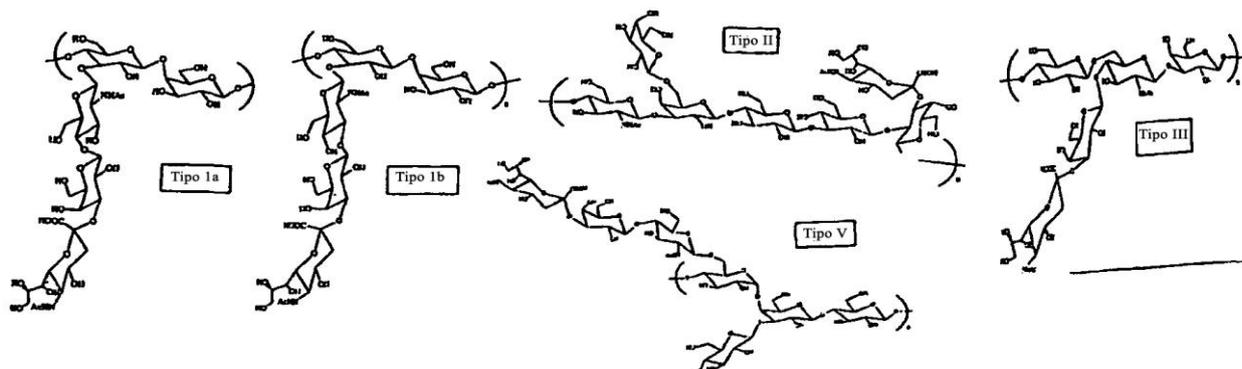
Tabla 22: Pronóstico de los rendimientos para un incremento de 1.000 L (basado en procesos piloto)

Serotipo	Polisacárido previsto a partir de un lote de 1.000 L (según los procesos piloto) (g)	Polisacárido purificado previsto a partir de un lote de cultivo de 1.000 L (según los procesos piloto)(g)	Sacárido glicoconjugado previsto a partir de un lote de cultivo de 1.000 L (según los procesos piloto)(g)	Número de dosis de 20 mg previsto a partir de un lote de 1.000 L (según los procesos piloto)(g) (Millón)	Pronóstico del número de dosis previsto a partir de procesos optimizados (Millón)
la	370	140	84	4.2	>8
lb	370	110	62	3.1	>6
III	370	125	38	1.9	>4
V	370	75	20	1.0	>3

Métodos analíticos relacionados con la fermentación

[0218] *Determinación de la biomasa.* Durante la fermentación, se monitoriza el contenido de la biomasa mediante la medición de la densidad óptica del cultivo, a una longitud de onda de 590nm. Las diluciones de la muestra tienen que prepararse con el fin de marcar un valor de absorbencia dentro del intervalo 0,300-0,600. El peso húmedo de la cosecha se determina tras la centrifugación durante 25 minutos a 16.000 xq.

[0219] *Determinación del contenido del polisacárido capsular.* El polisacárido capsular de serotipo específico de GBS está hecho de una unidad que se repite de los siguientes sacáridos: NANA: N-acetil-ácido neuramínico o ácido siálico ; GLUC glucosa; GAL: galactosa y NAGA: N-acetilglucosamina . El contenido de ácido siálico puede determinarse utilizando el método químico establecido por Svennerholm (Svennerholm L., (1957) Biochem. Biophys. ACTA 24:604-611). La composición de la unidad que se repite difiere del serotipo, así que tiene que aplicarse un factor correctivo diferente para cada serotipo.



Azúcar	FW	serotipo	unidad que se repite gal glunaga sial	FW CP	Proporción NANA/CP	Factor correctivo
		Ia	2:1:1:1	980	0,315	3,17
NANA	309	Ib	2:1:1:1	980	0,315	3,17
GLUC	180	II	3:2:1:1	1304	0,237	4,22
GAL	180	III	1:2:1:1	980	0,313	3,17
NAGA	221	V	2:3:1:1	1304	0,237	4,22

Preparación de la muestra.

[0220]

- Se centrifuga una cantidad de 10 OD. mL (16000 xg, 5 min, 4° C) [estandarización]
- Se lava el pellet con 1mL de PBS y se centrifuga (16000 xg, 5 min, 4° C) [lavado]
- Al pellet se le añaden 500 mcL de NaOH (2 N, 65° C, 1 h) [hidrólisis]
- Tras 1 hora, se neutraliza con 500 mcL HCl (2 N, 4° C) [neutralización]
- Se extraen los restos celulares mediante centrifugación (16000 xg, 30 min, 4° C) [purificación]
- Se esteriliza el sobrenadante mediante filtración (0.22 micrones) [esterilización]
- Se diluyen 100 mL con 900 mL de H₂O [dilución]

[0221] Preparación de una curva estándar. Un cultivo de la cepa COH1-13 (encapsulado) se prepara de la misma manera que en las muestras. La fase de la dilución se caracteriza por la adición de unas cantidades conocidas de una solución madre de ácido siálico para obtener concentraciones finales de 1, 5, 10, 15, 20 y 30 mg/mL. (100 mL sobrenadante + x mL ácido siálico SS + 900-x mL H₂O).

[0222] Reacción química. Materiales iniciales para el reactivo: A = Resorcinol (2%, H₂O); B = CuSO₄.5H₂O (0,1 M, H₂O). El reactivo nuevo se mezcla como sigue: 10 mL A + 0.25 mL B + H₂O (V_{fin} = 20 mL) -> + HCl (37%) (V_{fin} = 100 mL). Una vez mezclado, el reactivo está estable durante 1 semana a 4° C. Se añade 1 mL del reactivo a 1 mL de la muestra diluida y se incuba durante 40 min a 90° C, se marca la absorbencia a 564 nm.

[0223] Cuantificación. Determina la cantidad de NANA en la muestra utilizando para ello una curva estándar.

- Se aplica un factor correctivo del serotipo [contenido específico de CP (mg/LOD)]
- Se multiplica con el OD del cultivo [contenido volumétrico de CP (mcg/mL or mg/L)]
- Se multiplica con el volumen de la cosecha [total producido de CP (mg)]

Ejemplo B – Purificación

[0224] Este ejemplo muestra un protocolo de purificación ejemplar que proporciona niveles mucho más altos de purificación que los que previamente han sido posibles para los polisacáridos capsulares.

Aislamiento y purificación de los polisacáridos de GBS de los tipos Ia, Ib, III y V

[0225] Los originarios polisacáridos de GBS del tipo V se extrajeron y purificaron a partir de una bacteria, utilizando las siguientes fases del proceso:

[0226] Fermentación bacteriana: una cepa GBS del tipo V (p. ej., CJB111) creció en un medio complejo. Puede utilizarse cualquier método de cultivo, aunque se prefiere el cultivo fermentativo que aquí se divulga.

[0227] Desactivación de la fermentación de la biomasa y extracción de polisacáridos (tratamiento de base): si es necesario, se puede calentar la biomasa para llevarla a temperatura ambiente. Se añadió Hidróxido de sodio (4 M) a la biomasa recuperada para una concentración final de 0.8 M y se mezcló homogéneamente. La suspensión fue posteriormente incubada a 37° C durante 36 horas con la mezcla.

[0228] Neutralización de la biomasa: tras la extracción con el tratamiento de base, se añadió TRIS-base 1 M (121,14 g/mol) para una concentración final de 50 mM (52.6 mL por 1 L de preparado base) y la suspensión se mezcló hasta homogeneizar. Se ajustó el pH de la mezcla a 7,8 con HCl (6 M) (1:1 dilución de ácido concentrado).

5 **[0229] Precipitación alcohólica:** se añadieron 2 M CaCl₂ a la concentración final de 0,1 M (52.6 mL por 1 L de preparado neutralizado) y la suspensión se mezcló hasta la homogeneizar. Se añadió Ethanol (96% (v/v) a la concentración final del 30%(v/v) etanol (428 mL por 1 L) y la suspensión se mezcló hasta homogeneizar.

10 **[0230] Microfiltración tangencial:** se recuperó el sobrenadante de la precipitación alcohólica mediante una microfiltración tangencial en una membrana de celulosa de 0.2 mm (Sartorius Sartocoon Hydrosart 0,1 m²) contra un tampón de diálisis que contenía: NaCl (0,5 M) + CaCl₂ (0,1 M) + 30% de etanol (v/v) tamponado a un pH de 7,8. Se utilizaron diez volúmenes de diálisis para la microfiltración. Se filtró el permeato utilizando para ello un filtro de 0,45/0,2 mm para esterilizar el permeato (filtro Sartorius Sartobran).Nota: como alternativa, el material retenido puede aclararse por centrifugado (reteniendo el fluido sobrenadante) y conservarse a 2-8 ° C.

15 **[0231] Diafiltración tangencial 30kDa:** para eliminar la materia particulada formada durante su almacenamiento, el material se filtró con un filtro de 0,45/0,2 mm (filtro Sartobran).Se diafiltró el material en una membrana de celulosa de 30kDa (Sartorius Sartocoon Hydrosart 0,1 m²) contra 25 volúmenes de TRIS 50 mM + NaCl 0,5 M a un pH de 8,8 y, luego, contra 10 volúmenes de Na₂CO₃ 0,3 M + NaCl 0,3 M tamponados a un pH de 8,8. Ajuste de presión: $P[\text{Pin-Pout}] < 0,7$ bares, $\text{TMP}[(\text{Pin}+\text{Pout})/2] > 1,0$ p.ej., Pin=2 bares, Pout=1 bar).Se filtroesterilizó el material retenido utilizando para ello un filtro de 0,45/0,2 mm (filtro Sartorius Sartobran). Entonces, el material se conservó a 2-8° C (durante un máximo de 15 días) hasta que se volviera a necesitar.

20 **[0232] Filtración de lecho profundo:** se aplicó una filtración de lecho profundo en una cápsula CUNO BioCap 2000 1300 cm² (o filtro CUNO Z-carbono R52SP para preparaciones a pequeña escala) para extraer los contaminantes proteicos residuales. El número de cápsulas o filtros utilizados se especificó en la base de la proporción: 0,5 cm² por mg de proteínas residuales.

25 **[0233] Ejemplo con cápsulas CUNO:** utilizando una bomba peristáltica, se lavó la cápsula con >9,0 L de Na₂CO₃ 300 mM + NaCl 0,3 M, tamponados a un pH de 8,8, a una tasa de flujo de 350 ± 50 mL/min. Si el volumen del material fuera menor de 1,6 L, la suspensión se diluiría a un volumen correcto con Na₂CO₃ 0,3 M + NaCl 0,3 M, tamponados a un pH de 8,8. El material se filtró y el filtro fue posteriormente lavado con 2,5 L de Na₂CO₃ 0,3 M + NaCl 0,3 M, tamponados a un pH de 8,8. Se combinó el material que se obtuvo de las diferentes cápsulas. El material recogido se filtró en nuevas cápsulas (1/5 del número anterior) y se lavó con 2,5 L de Na₂CO₃ 0,3 M + NaCl 0,3 M, tamponados a un pH de 8,8. El material se filtroesterilizó utilizando para ello un filtro de 0,45/0,2 mm (filtro Sartorius Sartobran). El material se conservó a 2-8° C (durante un máximo de 15 días) hasta que se volviera a necesitar.

30 **[0234] Re-N-Acetilación del polisacárido:** El material se diluyó en 2 mg de polisacárido/ mL (estimado mediante una prueba de resorcinol y ácido siálico) con Na₂CO₃ (0,3) M + NaCl (0,3 M), tamponados a un pH de 8,8. La solución madre de anhídrido acético se preparó con las siguientes proporciones: 8,3 mL de anhídrido acético + 8.3 mL de 96% de etanol + 983,4 mL de agua. Se añadió la nueva solución madre de anhídrido acético a la solución de polisacárido diluida en 2 mg/mL para una proporción de >22:1 de anhídrido acético (unidad de polisacárido que se repite). El material se incubó con la mezcla durante 2 horas a temperatura ambiente. Al cabo de dos horas, se comprobó el pH para confirmar que era de ~8.8.

35 **[0235] Purificación del polisacárido re-N acetilado por diafiltración tangencial de 30 kDa:** Para eliminar la partícula formada durante el almacenamiento, se filtra la sustancia con un filtro de 0.45/0.2 mm(filtro Sartobran).Nota: la clarificación por centrifugado también es aceptable. Se dia-filtró la sustancia usando una membrana de celulosa de 30 kDa (Sartocoon Hydrosart 0.1 m²) contra 13 volúmenes de acetato de sodio con un ajuste de presión de $P[\text{Pin-Pout}] < 0.7$ bar, $\text{TMP}[(\text{Pin}+\text{Pout})/2] > 1.0$ (ejemplo Pin=2 bar, Pout=1 bar). Se esterilizó la sustancia con un filtro de 0.45/0.2 mm (filtro Sartorius Sartobran). La sustancia se conservó a 2-8°C hasta el momento de su uso (máximo 15 días).

40 **[0236] Recuperación del polisacárido:** Se añadió CaCl₂ 2 M para obtener una concentración final de 0.1 M (52.6 mL por 1 L de mezcla neutralizada) y se mezcló la suspensión para su homogeneización. Se añadió etanol (96% (v/v)) para una concentración final de 80% (v/v) (ratio de 4 L por 1 L de solución) y se mezcló la suspensión para su homogeneización. Se lavó el precipitado (2-3 veces) con etanol fresco 96% (~50 mL cada uno).El precipitado se recoge mediante centrifugado a 3000 x g durante 10 minutos y es desecado como polvo al vacío.

45 Métodos analíticos

50 **[0237] Ensayos químicos en mojado:** Se determinó el volumen de sacárido mediante el ensayo químico en mojado del ácido siálico (Svennerholm, L. Biochem. Biophys. Acta 1957, 24, 604). La muestra se hidrolizó en HCl a 80° C 90 minutos, neutralizada con NaOH e inyectado en un sistema DIONEX (TM). Se procesan los datos mediante el software CHROMELEON (TM). Se eluyó el sacárido usando un gradiente lineal de 90 en siete minutos: 10 a 60:40

55

60

0.1 M NaOH, 0.1 M NaAcetate: 0,1 M NaOH, 0.5 M NaNO₃ CarboPac PA1 con una columna de protección PA1 con un caudal de 1.0 ml/min.

5 **[0238]** Se determinó el ácido siálico mediante inyección de la muestra de polisacáridos disuelto en agua a 1.0 mg/ml sin hidrolizar la muestra. De este modo fue posible separarlo libremente del ácido siálico vinculado. La figura 29 es una superposición de la muestra de polisacárido y el estándar (línea gris) a 0.5 mg/ml. En la muestra de polisacáridos, el ácido siálico no se detecta. El pico en el paso de regeneración fue el polisacárido no hidrolizado. El ácido siálico libre es un importante parámetro porque está relacionado con la respuesta inmunitaria.

10 **[0239]** El volumen de la proteína residual se determinó mediante una prueba comercial (Pierce) MicroBCA (TM). El volumen del ácido nucleico residual se determinó siguiendo el método publicado por Sheldon, E.L.; et al. Biochem. Biophys. Res. Comm. 1989, 156(1), 474.

15 **[0240]** El volumen de polisacárido residual del Grupo B se obtiene determinando los residuos ramnosa y usando un método basado en el análisis HPAEC-PAD. Ramnosa es un sacárido específico en los carbohidratos del Grupo B que no se encuentra en los polisacáridos tipo y se usó para determinar el volumen de carbohidrato residual contaminante después de la purificación de los polisacáridos capsulares. La muestra analizada GBS polisacárido tipo III se purificó en la figura 30. La muestra no presenta un pico de ramnosa indicando la ausencia de otro carbohidrato contaminante. El cromatograma gris se obtuvo añadiendo ramnosa estándar a la muestra. Las muestras y estándares se hidrolizaron en TFA 2N a 100° C durante 3.0 horas, después se evaporaron in SpeedVac y se reconstituyó con 450 ml de H₂O. El rango de la curva de ramnosa estándar es 1.0 - 10.0 mg/ml. Los parámetros cromatográficos fueron: CarboPac PA1 con una columna de protección PA1 con un caudal de 1.0 ml/min de NaOH 12 mM durante 15 minutos seguido por 5 minutos de regeneración con NaOH 500 mM y después re-equilibrado en NaOH 12mM durante 25 minutos.

25 **[0241]** *Análisis cromatográfico:* los pesos moleculares aproximados de los polisacáridos tipo se estimaron mediante HPLC en un SUPEROSE (TM) 6 HR columna 10/30 (GE Healthcare), equilibrados con PBS y calibrados con dextrano.

30 **[0242]** *Análisis RMN:* las muestras de los polisacáridos purificados se prepararon mediante la disolución del polvo en 1 mL de óxido de deuterio (D₂O, Aldrich) con una concentración uniforme. Se transfirieron las alícuotas (750 µL) de las muestras a los tubos RMN de 5-mm (Wilmad). Los experimentos de 1H RMN se registraron a 25° C en el espectrómetro Bruker 600 MHz y se utilizó una sonda de banda ancha de 5-mm (Bruker). Se utilizó el paquete informático XWINRMN (Bruker) para la toma de datos y para su procesamiento. Se recogió el espectro 1-D protón RMN utilizando para ello un experimento estándar *one-pulse* con 32 escáneres. El transmisor se estableció en la frecuencia H₂O (4,79 ppm). Los espectros 1H RMN se obtuvieron en materia cuantitativa utilizando para ello un tiempo total de reciclaje para asegurar una completa recuperación de cada señal (5 x tiempo de relajación longitudinal, T₁).

40 **[0243]** Se registraron los espectros de RMN 2-D en correlación homo y hetero para asignar los perfiles de RMN 1-D protón (véanse las figuras 25-28). El punto máximo de la asignación se confirmó también mediante la comparación con los datos publicados: Michon, F.; Chalifour, R.; Feldman, R.; Wessels, M.; Kasper, D.L.; Gamian, A.; Pozsgay, V.; Jennings, H.J. Infect Immun 1991, 59, 1690 y artículos relacionados.

45 *Resultados y discusión*

50 **[0244]** Este procedimiento proporciona una sencilla novedad, un método rápido y efectivo para purificar los polisacáridos tipo a partir de la bacteria del *Streptococo*. Resulta beneficioso que el proceso no implique el uso de tratamientos con ADNsa, RNAsa y proteasa. Los productos se recuperan con altos rendimientos mientras que todos los principales contaminantes potenciales (proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos del Grupo B) descienden por debajo del 1% p/p. El nuevo método de purificación puede utilizarse para la elaboración de materiales clínicos y comerciales derivados de estos polisacáridos capsulares.

55 **[0245]** La pureza del producto fue confirmada según se indica en la tabla 24.

60

65

Tabla 24 - resumen de la pureza de los polisacáridos de GBS, tipos: Ia, Ib, III y V (4 ensayo químico por vía húmeda de ácido siálico; 2 MicroBCA kit de ensayo comercial de proteína; 3 ensayo de ácido nucleico, 4 ensayo del polisacárido del grupo B)

Tipo PS	1 Contenido de PS (µg/mg polvo)	2 Contenido de proteína residual (µg/mg polvo)	3 Contenido de ácido nucleico residual (µg/mg polvo)	4 Contenido de PS residual grupo B (µg/mg polvo)
Tipo Ia 090	935	3	<10	<10
Tipo Ib H36B	757	9	<10	<10
Tipo III M781	746	1	<10	<10
Tipo V CJB111	785	3	<10	<10

[0246] El peso medio molecular para el tipo de polisacáridos, estimado mediante cromatografía por exclusión de tamaño, fue de -200 Kda para los tipos Ia, Ib y <100 Kda para los tipos III y IV. La identidad estructural de los polisacáridos de GBS de los tipos Ia, Ib, III y V fue confirmada por espectroscopia 1H RMN (figuras 25-28).

Ejemplo C – Purificación

[0247] Este ejemplo muestra otro protocolo ejemplar de purificación que proporciona niveles mucho más altos de purificación que los que previamente han sido posibles para los polisacáridos capsulares.

Aislamiento y purificación de los polisacáridos de GBS de los tipos Ia, Ib, III y V

[0248] Los originarios polisacáridos de GBS del tipo V se extrajeron y purificaron a partir de una bacteria, utilizando las siguientes fases del proceso:

[0249] *Fermentación bacteriana*: una cepa GBS del tipo V (p. ej., CJB111) creció en un medio complejo. Puede utilizarse cualquier método de cultivo, aunque se prefiere el cultivo fermentativo que aquí se divulga.

[0250] *Desactivación de la fermentación de la biomasa y extracción de polisacáridos (tratamiento de base)*: si es necesario, se puede calentar la biomasa para llevarla a temperatura ambiente. Se añadió Hidróxido de sodio (4 M) a la biomasa recuperada para una concentración final de 0.8 M y se mezcló homogéneamente. La suspensión fue posteriormente incubada a 37° C durante 36 horas con la mezcla.

[0251] *Neutralización de la biomasa*: tras la extracción con el tratamiento de base, se añadió TRIS-base 1 M (121,14 g/mol) para una concentración final de 50 mM (52.6 mL por 1 L de preparado base) y la suspensión se mezcló hasta homogeneizar. Se ajustó el pH de la mezcla a 7,8 con HCl (6 M) (1:1 dilución de ácido concentrado).

[0252] *Precipitación alcohólica*: se añadieron 2 M CaCl₂ a la concentración final de 0,1 M(52.6 mL por 1 L de preparado neutralizado) y la suspensión se mezcló hasta la homogeneizar. Se añadió Ethanol (96% (v/v) a la concentración final del 30%(v/v) etanol (428 mL por 1 L) y la suspensión se mezcló hasta homogeneizar.

[0253] *Microfiltración tangencial*: se recuperó el sobrenadante de la precipitación alcohólica mediante una microfiltración tangencial en una membrana de celulosa de 0.2 mm (Sartorius Sartocoon Hydrosart 0,1 m²) contra un tampón de diálisis que contenía: NaCl (0,5 M) + CaCl₂ (0,1 M) + 30% de etanol (v/v) tamponado a un pH de 7,8. Se utilizaron diez volúmenes de diálisis para la microfiltración. Se filtró el permeato utilizando para ello un filtro de 0,45/0,2 mm para esterilizar el permeato (filtro Sartorius Sartobran).Nota: como alternativa, el material retenido puede aclararse por centrifugado (reteniendo el fluido sobrenadante) y conservarse a 2-8 ° C.

[0254] *Diafiltración tangencial 30kDa*: para eliminar las partículas finas formadas durante su almacenamiento,se filtró la sustancia con un filtro de 0.45/0.2 mm (filtro Sartobran).Se purificó el material con un primer paso de diafiltración usando una membrana celulosa de 30 kDa (Sartorius Sartocoon Hydrosart 0.6 m²) contra 20 volúmenes de TRIS 50 mM, NaCl 0.5 M a un PH de 8.8 y después contra 10 volúmenes de fosfato Na 10 mM a un pH de 7.2. Ajuste de presión Pin=3 bar, Pout=1 bar. Se diluyó el retenido del primer paso de diafiltración a 10 kg y después se le trató con ácido acético/solución de acetato de sodio a un pH de 4.0(2 L). La suspensión obtenida de este tratamiento se filtró usando cápsulas de GFPlus 0.45 mm(Sartorius) para tratar de eliminar el precipitado y luego se filtró una vez más usando un filtro de membrana de 0.2 mm(Sartobran Sartorius). El pH se mantuvo en un valor de 4.4 6 0.1. El producto filtrado se diafiltró después de nuevo contra Na₂CO₃ 0.3M, NaCl 0.3 M a un pH de 8.8. Después de la filtración posterior usando un filtro de 0.45/0.2, el material se conservó a 2-8° C (durante un máximo de 15 días) hasta el momento de su uso.

[0255] *Filtración adherente con cápsulas CUNO*: la filtración se realizó usando cartuchos CUNO Z-Carbón R53SLP8. Usando un bomba peristáltica, se unieron los cartuchos a un recipiente exclusivo y después se lavaron con >20.0 L

de WFI con un caudal de 580 6 40 mL/min. Luego los cartuchos se lavaron con >20.0 L de Na₂CO₃ 0.3 M, NaCl 0.3 M a un pH de 8.8 con el mismo caudal. Si el volumen de la sustancia fuera menor de 20 L, entonces se diluiría al volumen deseado con Na₂CO₃ 0.3 M, NaCl 0.3 M amortiguado a un Ph de 8.8. La sustancia después se filtró y se recogió en una bolsa estéril. El recipiente se llenó con 20 L de Na₂CO₃ 0.3 M, NaCl 0.3 M a un pH de 8 h llevando la filtración a recoger 6 L de producto filtrado. La sustancia se filtró luego usando un filtro de 0.45/0.2 mm. La sustancia se conservó a 2-8 °C (durante un máximo de 15 días) hasta el momento de su uso.

[0256] Acetilación Re-N de polisacárido: la sustancia Z-Carbón filtrada se trató con anhídrido acético/ solución de etanol para permitir una acetilación Re-N. La mezcla reactiva necesaria para tratar 1 L de solución de polisacárido se preparó usando las siguiente proporciones: 4,15 Ml de anhídrido acético+ 4.15 L de etanol 96%. La solución de la reacción se incubó bajo agitación durante 2 horas a temperatura ambiente. Se revisó el pH al final de las dos horas para verificar que era alrededor de 7.

[0257] Purificación del polisacárido re-N-acetilado mediante diafiltración tangencial 30 kDa: el material se diafiltró en membranas de celulosa 30 kDa(0,1 m² Sartocoon Hydrosart) contra 13 volúmenes de fosfato de potasio 10 mM a un pH de 7,2 con unos ajustes de presión de P[Pin-Pout]<0,7 bares, TMP[(Pin+Pout)/2]>1,0 (p. ej., Pin=2 bares, Pout=1 bar). Entonces, se filtró el material utilizando para ello un filtro de 0,45/0,2 mm. El material se conservó a -20° C hasta que fuera necesario.

20 REFERENCIAS ADICIONALES

1. Ada & Isaacs (2003) Clin Microbiol Infect 9:79-85.
2. Shen et al. (2001) Vaccine 19:850-61.
3. Palazzi et al. (2004) J. Infect. Dis. 190:558-64.
4. Merritt et al (2000) J. Biotech. 81:189-97.
5. Dassy & Fournier (1996) Infect. Immunol. 64:2408-14.
6. Suarez et al. (2001) Appl. Env. Microbiol. 67:969-71.
7. Wicken et al. (1983) J. Bact. 153:84-92.
8. Paoletti et al. (1996) Infect. Immunol. 64:1220-26.
9. Ross et al. (1999) J. Bact. 181:5389-94.
10. Paoletti et al. (1999) J. Infect. Dis. 180:892-95.
11. Terleckyj et al. (1975) Infect. Immunol. 11:649-55.
12. Willett & Morse (1966) J. Bacteriol. 91(6):2245-50.
13. Merritt et al. (1978) J. Clin. Microbiol. 8:105-07.
14. WO95/29986.
15. WO98/32873.
16. Frash (1990) p. 123-145 of Advances in Biotechnological Processes vol. 13 (eds. Mizrahi & Van Wezel).
17. EP 0072513.
18. UK 0502096.1 (patent application); WO2006/082527.
19. US 6248570.
20. Deng et al. (2000) J. Biol. Chem. 275:7497-7504.
21. Inzana (1987) Infect. Immun. 55:1573-79.
22. Ramsay et al. (2001) Lancet 357(9251):195-96.
23. Lindberg (1999) Vaccine 17 Suppl. 2:S28-36.
24. Buttery & Moxon (2000) J R Coll Physicians Land 34:163-68.
25. Ahmad & Chapnick (1999) Infect. Dis. Clin. North Am. 13:113-33, vii.
26. Goldblatt (1998) J. Med. Microbiol. 47:563-7.
27. EP 0477508.
28. US 5306492.
29. WO98/42721.
30. Dick et al. in Conjugate Vaccines (eds. Cruse et al.) Karger, Basel, 1989, 10:48-114.
31. Hermanson Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego (1996) ISBN: 0123423368.
32. Anonymous (Jan 2002) Research Disclosure, 453077.
33. Anderson (1983) Infect. Immun. 39(1):233-8.
34. Anderson et al. (1985) J. Clin. Invest. 76(1):52-59.
35. EP 0372501A.
36. EP 0378881A.
37. EP 0427347A.
38. WO93/17712.
39. WO94/03208.
40. WO98/58668.
41. EP 0471177A.
42. WO91/01146.
43. Falugi et al. (2001) Eur. J. Immunol. 31:3816-24.
44. Baraldo et al. (2004) Infect. Immun. 72:4884-87.
45. EP 0594610A.

46. WO00/56360.
 47. WO02/091998.
 48. Kuo et al. (1995) *Infect. Immun.* 63:2706-13.
 49. WO01/72337.
 5 50. WO00/61761.
 51. WO04/041157.
 52. WO99/42130.
 53. WO04/011027.
 54. Lees et al. (1996) *Vaccine* 14:190-98.
 10 55. WO95/08348.
 56. US 4882317.
 57. US 4695624.
 58. Porro et al. (1985) *Mol. Immunol.* 22:907-19.
 59. EP 0208375A.
 15 60. WO00/10599.
 61. Gever et al. *Med. Microbiol. Immunol.*, 165:171-288 (1979).
 62. US 4057685.
 63. US 4673574; US 4761283; US 4808700.
 64. US 4459286.
 20 65. US 4965338.
 66. US 4663160.
 67. US 4761283.
 68. US 4356170.
 69. Lei et al. (2000) *Dev. Biol. (Basel)* 103:259-64.
 25 70. WO00/38711; US 6146902.
 71. Wessels et al. (1998) *Infect. Immun.* 66:2186-92.
 72. Lamb et al. (2000) *Dev. Biol. (Basel)* 103:251-58.
 73. Lamb et al. (2000) *Journal of Chromatography A* 894:311-18.
 74. D'Ambra et al. (2000) *Dev. Biol. (Basel)* 103:241-42.
 30 75. Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20th edition, ISBN: 0683306472.
 76. *Vaccine Design*. (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.
 77. WO00/23105.
 78. WO90/14837.
 79. US 5057540.
 35 80. WO96/33739.
 81. EP 0109942A.
 82. WO96/11711.
 83. WO00/07621.
 84. Barr et al. (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:247-71.
 40 85. Sjolander et al. (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:321-38.
 86. Niikura et al. (2002) *Virology* 293:273-80.
 87. Lenz et al. (2001) *J. Immunol.* 166:5346-55.
 88. Pinto et al. (2003) *J. Infect. Dis.* 188:327-38.
 89. Gerber et al. (2001) *Virology* 75:4752-60.
 45 90. WO03/024480.
 91. WO03/024481.
 92. Gluck et al. (2002) *Vaccine* 20:B10- B16.
 93. EP 0689454A.
 94. Johnson et al. (1999) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9:2273-78.
 50 95. Evans et al. (2003) *Expert Rev. Vaccines* 2:219-29.
 96. Meraldi et al. (2003) *Vaccine* 21:2485-91.
 97. Pajak et al. (2003) *Vaccine* 21:836-42.
 98. Kandimalla et al. (2003) *Nucleic Acids Research* 31:2393-2400.
 99. WO02/26757.
 55 100. WO99/62923.
 101. Krieg (2003) *Nature Medicine* 9:831-35.
 102. McCluskie et al. (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32:179-85.
 103. WO98/40100.
 104. US 6207646.
 60 105. US 6239116.
 106. US 6429199.
 107. Kandimalla et al. (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (part 3):654-58.
 108. Blackwell et al. (2003) *J. Immunol.* 170:4061-68.
 109. Krieg (2002) *Trends Immunol.* 23:64-65.
 65 110. WO01/95935.
 111. Kandimalla et al. (2003) *BBRC* 306:948-53.

112. Bhagat et al. (2003) *BBRC* 300:853-61.
 113. WO03/035836.
 114. WO95/17211.
 115. WO98/42375.
- 5 116. Beignon et al. (2002) *Infect. Immun.* 70:3012-19.
 117. Pizza et al. (2001) *Vaccine* 19:2534-41.
 118. Pizza et al. (2000) *Int. J. Med. Microbiol.* 290:455-61.
 119. Scharton-Kersten et al. (2000) *Infect. Immun.* 68:5306-13.
- 10 120. Ryan et al. (1999) *Infect Immun.* 67:6270-80.
 121. Partidos et al. (1999) *Immunol. Lett.* 67:209-16.
 122. Peppoloni et al. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:285-293.
 123. Pine et al. (2002) *J. Control Release* 85:263-70.
 124. Domenighini et al. (1995) *Mol. Microbiol.* 15:1165-67.
- 15 125. WO99/40936.
 126. WO99/44636.
 127. Singh et al. (2001) *J. Cont. Release* 70:267-76.
 128. WO99/27960.
 129. US 6090406.
 130. US 5916588.
- 20 131. EP 0626169A.
 132. WO99/52549.
 133. WO01/21207.
 134. WO01/21152.
 135. Andrianov et al. (1998) *Biomaterials* 19:109-15.
- 25 136. Payne et al. (1998) *Adv. Drug Delivery Review* 31:185-96.
 137. Stanley (2002) *Clin. Exp. Dermatol.* 27:571-77.
 138. Jones (2003) *Curr. Opin. Investing. Drugs* 4:214-18.
 139. WO99/11241.
 140. WO94/00153.
- 30 141. WO98/57659.
 142. EP 0835318, EP 0735898 and EP 0761231 (patent applications).
 143. Almeida & Alpar (1996) *J. Drug Targeting* 3:455-67.
 144. Agarwal & Mishra (1999) *Indian J. Exp. Biol.* 37:6-16.
 145. *Vaccines* (2004) eds. Plotkin & Orenstein. ISBN 0-7216-9688-0.
- 35 146. Bell (2000) *Pediatr. Infect. Dis. J.* 19:1187-88.
 147. Iwarson (1995) *APMIS* 103:321-26.
 148. Gerlich et al. (1990) *Vaccine* 8 Suppl:S63-68 & 79-80.
 149. Gustafsson et al. (1996) *N. Engl. J. Med.* 334:349-55.
 150. Rappuoli et al. (1991) *TIBTECH* 9:232-38.
- 40 151. Sutter et al. (2000) *Pediatr. Clin. North Am.* 47:287-308.
 152. Zimmerman & Spann (1999) *Am. Fam. Physician* 59:113-18, 125-26.
 153. McMichael (2000) *Vaccine* 19 Suppl 1:S101-107.
 154. Schuchat (1999) *Lancet* 353(9146):51-56.
 155. WO02/34771.
- 45 156. Dale (1999) *Infect. Dis. Clin. North Am.* 13:227-43, viii.
 157. Ferretti et al. (2001) *PNAS USA* 98:4658-63.
 158. Kuroda et al. (2001) *Lancet* 357(9264):1225-40, 1218-19.
 159. Kanra et al. (1999) *The Turkish Journal of Pediatrics* 42:421-27.
 160. Ravenscroft et al. (2000) *Dev. Biol. (Basel)* 103: 35-47.
- 50 161. WO97/00697.
 162. WO02/00249.
 163. WO96/37222; US 6333036.
 164. WO00/15255.
 165. Svennerholm (1957) *Biochem. Biophys. ACTA* 24:604-11.
- 55 166. Rubens et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:7208-12.
 167. Group B Streptococcal infections; Edward, M.S., and C.J. Baker, *Infections diseases of the fetus and the newborn infants*, 2001, pp.1091-1156.
 168. Group B streptococcal disease in non pregnant adults; Farley, M.M., *Clinical Infections diseases*, 2001, 33:556-561.
- 60 169. Vaccination against Group B Streptococcus; Health Paul T. and Feldman Robert G. *Expert Rev. Vaccines* 4(2), 2005, 207-218.
 170. Prevention of perinatal group B streptococcal disease: a public health perspective; Schumat A. Witmey C.G., Zangwill K.M., *Centers for Disease Control and prevention*, 1996, MMWE 45 (RR-7), 1-24.
 171. Correlation of maternal antibody deficiency with susceptibility to neonatal group B Streptococcal infection; Baker C.J., Kasper D.L., *N. England J. Med.*, 1976, 294/753-6.
- 65 172. Regulation of cell component production by growth rate in the Group B Streptococcus; Robin A. Ross, Lawrence

- C. Madoff, and Lawrence C. Paoletti, *Journal of Bacteriology*, Oct 1999, Vol. 181, W17, pp. 5389-94.
173. Cell growth rate regulates expression of GBS type III capsular polysaccharide; Lawrence C. Paoletti, Robin A. Ross, and Kenneth D. Johnson, *Infection and Immunity*, April 1996, Vol. 64, No. 4, pp. 1220-1226.
- 5 174. Growth of Several Cariogenic strains of oral streptococci in a Chemically defined Medium; B.Terleckyj, N.P. Willett and G.D. Shockman, *Infection and Immunity*, April 1975, Vol. 11, No. 4, pp. 649-55.
175. The sialic acids; George W. Jourdian, Lawrence Dean, and Saul Roseman, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol 246, No. 2, Issue of January 25, 1971, pp. 480-85.
176. Quantitative estimation of sialic acids / a colorimetric resorcinol hydrochloric acid method; Lars Svennerholm, *Biochimica and Biophysica Acta*, 1957, Vol.24.
- 10 177. Yeast extract: production, properties and components; Rolf Sommer, Paper given at the 9th International Symposium of Yeasts, Sydney, August 1996.
178. Pigment production by *Streptococcus agalactiae* in Quasi-Defined Media; Fraile et al., *Applied and Environmental Microbiology*, Jan. 22/01, Vol. 67, No. 1, pp. 473-74.
- 15 179. Requirement for growth of *Streptococcus agalactiae* in a chemically defined medium; Norman P. Willet, Guy F. Morse and Sharon A. Carlisle, *Journal of Bacteriology*, October 1967, Vol 94(n°4), pp. 1247-48.
180. Tettelin et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 10.1 073/pnas. 182380799.
181. International patent application WO02/34771.
- 20 182. Terpe et al., "Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems", *Appl Microbiol Biotechnol* (2003) 60:523-533.
183. WO99/27961.
184. WO02/074244.
185. WO02/064162.
186. WO03/028760.
- 25 187. Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20th ed., ISBN: 0683306472.
188. *Vaccine design: the subunit and adjuvant approach* (1995) Powell & Newman. ISBN 0-306-44867-X.
189. WO00/23105.
190. WO00/07621.
- 30 191. Barr, et al., "ISCOMs and other saponin based adjuvants", *Advanced Drug Delivery Reviews* (1998) 32:247-271.
- See also Sjolander, et al., "Uptake and adjuvant activity of orally delivered saponin and ISCOM vaccines", *Advanced Drug Delivery Reviews* (1998) 32:321-338.
192. Niikura et al., "Chimeric Recombinant Hepatitis E Virus-Like Particles as an Oral Vaccine Vehicle Presenting Foreign Epitopes", *Virology* (2002) 293:273-280.
- 35 193. Lenz et al., "Papillomavirus-Like Particles Induce Acute Activation of Dendritic Cells", *Journal of Immunology* (2001) 5246-5355.
194. Pinto, et al., "Cellular Immune Responses to Human Papillomavirus (HPV)-16 L1 Healthy Volunteers Immunized with Recombinant HPV-16 L1 Virus Like Particles", *Journal of Infectious Diseases*(2003) 188:327-338.
195. Gerber et al., "Human Papillomavirus Virus-Like Particles Are Efficient Oral Immunogens when Co-administered with *Escherichia coli* Heat-Labile Enterotoxin Mutant R192G or CpG", *Journal of Virology* (2001) 75(10):4752-4760.
- 40 196. Gluck et al., "New Technology Platforms in the Development of Vaccines for the Future", *Vaccine* (2002) 20:B10-B16.
197. Johnson et al. (1999) *BioorgMed Chem Lett* 9:2273-2278
198. Meraldi et al., "OM-174, a New Adjuvant with a Potential for Human Use, Induces a Protective Response with Administered with the Synthetic C-Terminal Fragment 242-310 from the circumsporozoite protein of *Plasmodium berghei*", *Vaccine* (2003) 21:2485-2491.
- 45 199. Pajak, et al., "The Adjuvant OM-174 induces both the migration and maturation of murine dendritic cells in vivo", *Vaccine* (2003) 21:836-842.
200. Kandimalla, et al., "Divergent synthetic nucleotide motif recognition pattern: design and development of potent immunomodulatory oligodeoxyribonucleotide agents with distinct cytokine induction profiles", *Nucleic Acids Research* (2003) 31(9): 2393-2400.
- 50 201. Krieg, "CpG motifs: the active ingredient in bacterial extracts?", *Nature Medicine* (2003) 9(7): 831-835.
202. McCluskie, et al., "Parenteral and mucosal prime-boost immunization strategies in mice with hepatitis B surface antigen and CpG DNA", *FEMS Immunology and Medical Microbiology* (2002) 32:179-185.
203. Kandimalla, et al., "Toll-like receptor 9: modulation of recognition and cytokine induction by novel synthetic CpG DNAs", *Biochemical Society Transactions* (2003) 31 (part 3): 654-658.
- 55 204. Blackwell, et al., "CpG-A-Induced Monocyte IFN-gamma-Inducible Protein-10 Production is Regulated by Plasmacytoid Dendritic Cell Derived IFN-alpha", *J. Immunol.* (2003) 170(8):4061-4068.
205. Krieg, "From A to Z on CpG", *TRENDS in Immunology* (2002) 23(2): 64-65.
- 60 206. Kandimalla, et al., "Secondary structures in CpG oligonucleotides affect immunostimulatory activity", *BBRC* (2003) 306:948-953.
207. Kandimalla, et al., "Toll-like receptor 9: modulation of recognition and cytokine induction by novel synthetic CpG DNAs", *Biochemical Society Transactions* (2003) 31(part 3):664-658.
208. Bhagat et al., "CpG penta and hexadeoxyribonucleotides as potent immunomodulatory agents" *BBRC* (2003) 300:853-861.
- 65 209. Singh et al. (2001) *J. Cont. Rele.* 70:267-276.

210. WO99/27960.
 211. WO99/52549.
 212. WO01/21207.
 213. WO01/21152.
- 5 214. Andrianov et al., "Preparation of hydrogel microspheres by coacervation of aqueous polyphosphazene solutions", *Biomaterials* (1998) 19(1-3):109-115.
 215. Payne et al., "Protein Release from Polyphosphazene Matrices", *Adv. Drug. Delivery Review* (1998) 31(3):185-196.
 216. Stanley, "Imiquimod and the imidazoquinolones: mechanism of action and therapeutic potential" *Clin Exp Dermatol* (2002) 27(7):571-577.
- 10 217. Jones, "Resiquimod 3M", *Curr Opin Investig Drugs* (2003) 4(2):214-218.
 218. WO99/11241.
 219. WO98/57659.
- 15 220. European patent applications 0835318, 0735898 and 0761231.
 221. Ramsay et al. (2001) *Lancet* 357(9251): 195-196.
 222. Lindberg (1999) *Vaccine* 17 Suppl 2:S28-36.
 223. Buttery & Moxon (2000) *J R Coll Physicians Lond* 34:163-168.
 224. Ahmad & Chapnick (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13: 113 133, vii.
 225. Goldblatt (1998) *J. Med. Microbiol.* 47:563-567.
- 20 226. European patent 0 477 508.
 227. US Patent No. 5,306,492.
 228. International patent application WO98/42721.
 229. *Conjugate Vaccines* (eds. Cruse et al.) ISBN 3805549326, particularly vol. 10:48-114.
 230. Hermanson (1996) *Bioconjugate Techniques* ISBN: 0123423368 or 012342335X.
- 25 231. Research Disclosure, 453077 (Jan 2002)
 232. EP-A-0372501
 233. EP-A-0378881
 234. EP-A-0427347
 235. WO93/17712
- 30 236. WO94/03208
 237. WO98/58668
 238. EP-A-0471177
 239. WO00/56360
 240. WO91/01146
- 35 241. WO00/61761
 242. WO01/72337
 243. Robinson & Torres (1997) *Seminars in Immunology* 9:271-283.
 244. Donnelly et al. (1997) *Annu Rev Immunol* 15:617-648.
 245. Scott-Taylor & Dalgleish (2000) *Expert Opin Investig Drugs* 9:471-480.
- 40 246. Apostolopoulos & Plebanski (2000) *Curr Opin Mol. Ther* 2:441-447.
 247. Ilan (1999) *Curr Opin Mol. Ther* 1:116-120.
 248. Dubensky et al. (2000) *Mol. Med* 6:723-732.
 249. Robinson & Pertmer (2000) *Adv Virus Res* 55: 1-74.
 250. Donnelly et al. (2000) *Am JRespir Crit Care Med* 162(4 Pt 2):S190-193.
- 45 251. Davis (1999) *Mt. Sinai J. Med.* 66:84-90.
 252. *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel et al., eds., 1987) Supplement 30.
 253. Smith & Waterman (1981) *Rev. Appl. Math.* 2: 482-489.
 254. U.S. Patent No. 6,372,223.
 255. WO00/15251.
- 50 256. WO01/22992.
 257. Hehme et al. (2004) *Virus Res.* 103(1-2):163-71.
 258. U.S. Patent No. 6,355,271.
 259. WO00/23105.
 260. *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).
- 55 261. U.S. Patent No. 5,057,540.
 262. WO05/02620.
 263. WO96/33739.
 264. EP-A-0109942.
- 60 265. U.S. Pat. No. 4,578,269.
 266. WO96/11711.
 267. U.S. Pat. No. 6,352,697.
 268. WO00/07621 and U.S. Pat. No. 6,506,386.
 269. WO04/04762.
- 65 270. Barr et al. (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:247-271.
 271. Sjolander et al (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:321-338.

272. Pizza et al. (2000) *Int J Med Microbiol* 290:455-461.
 273. WO95/17211.
 274. WO98/42375.
 5 275. Singh et al. (2001) *J Cont Release* 70:267-276.
 276. WO99/27960.
 277. U.S. Pat. No. 6,090,406.
 278. U.S. Pat. No. 5,916,588.
 279. EP-A-0626169.
 10 280. WO99/52549.
 281. WO01/21207.
 282. WO01/21152.
 283. WO02/72012.
 284. Signorelli and Hadden (2003) *Int Immunopharmacol* 3(8):1177-86.
 285. WO04/64715.
 15 286. Cooper (1995) *Pharm Biotechnol* 6:559-80.
 287. *Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols* (Volume 42 of *Methods in Molecular Methods* series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.
 288. WO05/89837.
 289. U.S. Pat. No. 6,692,468.
 20 290. WO00/07647.
 291. WO99/17820.
 292. U.S. Pat. No. 5,971,953.
 293. U.S. Pat. No. 4,060,082.
 294. EP-A-0520618.
 25 295. WO98/01174.
 296. WO90/14837.
 297. Podda and Del Giudice (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:197-203.
 298. Podda (2001) *Vaccine* 19:2673-2680.
 299. Allison and Byars (1992) *Res Immunol* 143:519-25.
 30 300. Hariharan et al. (1995) *Cancer Res* 55:3486-9.
 301. WO95/11700.
 302. U.S. Pat. No. 6,080,725.
 303. WO05/097181.
 304. Han et al. (2005) *Impact of Vitamin E on Immune Function and Infectious Diseases in the Aged at Nutrition, Immune functions and Health EuroConference, Paris, 9-10 June 2005.*
 35 305. U.S. Patent No. 6,630,161.
 306. WO02/097072.
 307. Hayden et al. (1998) *J Clin Invest* 101(3):643-9.
 308. Tassignon et al. (2005) *J Immunol Meth* 305:188-98.
 40 309. Myers et al. (1990) pages 145-156 of *Cellular and molecular aspects of endotoxin reactions.*
 310. Ulrich (2000) Chapter 16 (pages 273-282) of reference 108.
 311. Johnson et al. (1999) *J Med Chem* 42:4640-9.
 312. Baldrick et al. (2002) *Regulatory Toxicol Pharmacol* 35:398-413.
 313. U.S. Pat. No. 4,680,338.
 45 314. U.S. Pat. No. 4,988,815.
 315. WO92/15582.
 316. Stanley (2002) *Clin Exp Dermatol* 27:571-577.
 317. Wu et al. (2004) *Antiviral Res.* 64(2):79-83.
 318. Vasilakos et al. (2000) *Cell Immunol.* 204(1):64-74.
 50 319. U.S. Pat. No. 4689338, 4929624, 5238944, 5266575, 5268376, 5346905, 5352784, 5389640, 5395937, 5482936, 5494916, 5525612, 6083505, 6440992, 6627640, 6656938, 6660735, 6660747, 6664260, 6664264, 6664265, 6667312, 6670372, 6677347, 6677348, 6677349, 6683088, 6703402, 6743920, 6800624, 6809203, 6888000 and 6924293.
 320. Jones (2003) *Curr Opin Investig Drugs* 4:214-218.
 55 321. WO2004/060308.
 322. WO2004/064759.
 323. U.S. Pat. No. 6,924,271.
 324. U.S. Patent App. No. 2005/0070556.
 325. U.S. Pat. No. 5,658,731.
 60 326. U.S. Pat. No. 5,011,828.
 327. WO2004/87153.
 328. U.S. Pat. No. 6,605,617.
 329. WO02/18383.
 330. WO2004/018455.
 65 331. WO03/082272.
 332. PCT/US2005/022769.

333. Johnson et al. (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.
 334. Evans et al. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:219-229.
 335. Andrianov et al. (1998) *Biomaterials* 19:109-115.
 336. Payne et al. (1998) *Adv Drug Delivery Review* 31:185-196.
 5 337. Thompson et al. (2003) *Methods in Molecular Medicine* 94:255-266.
 338. Kandimalla et al. (2003) *Nucleic Acids Research* 31:2393-2400.
 339. WO02/26757.
 340. WO99/62923.
 341. Krieg (2003) *Nature Medicine* 9:831-835.
 10 342. McCluskie et al. (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32:179-185.
 343. WO98/40100.
 344. U.S. Pat. No. 6,207,646.
 345. U.S. Pat. No. 6,239,116.
 346. U.S. Pat. No. 6,429,199.
 15 347. Kandimalla et al. (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (part 3):654-658.
 348. Blackwell et al. (2003) *J Immunol* 170:4061-4068.
 349. Krieg (2002) *Trends Immunol* 23:64-65.
 350. WO01/95935.
 351. Kandimalla et al. (2003) *BBRC* 306:948-953.
 20 352. Bhagat et al. (2003) *BBRC* 300:853-861.
 353. WO03/035836.
 354. WO01/22972.
 355. Thompson et al. (2005) *J Leukoc Biol* 78: 'The low-toxicity versions of LPS, MPL® adjuvant and RC529, are efficient adjuvants for CD4+ T cells'.
 25 356. UK patent application GB A 2220211.
 357. WO 94/21292.
 358. WO94/00153.
 359. WO95/17210.
 360. WO96/26741.
 30 361. WO93/19780.
 362. WO03/011223.
 363. Meraldi et al. (2003) *Vaccine* 21:2485-2491.
 364. Pajak et al. (2003) *Vaccine* 21:836-842.
 365. U.S. Pat. No. 6,586,409.
 35 366. Wong et al. (2003) *J Clin Pharmacol* 43(7):735-42.
 367. U.S. Pat. App. No. 2005/0215517.

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

- 5 1. Un método para purificar un polisacárido capsular a partir del *Streptococo agalactiae* que se compone de una fase de filtración en la que se utiliza un filtro adherente, donde el método no incluye una fase de tratamiento con detergente catiónico para precipitar el polisacárido capsular, seguida de una fase de resolubilización del polisacárido capsular.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, donde el filtro adherente es un filtro adherente de proteína.
3. El método de la reivindicación 1, donde el filtro adherente es un filtro de carbono.
4. El método de la reivindicación 3, donde el filtro de carbono contiene carbono activado e inmovilizado en una matriz.
- 15 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la fase de filtración en la que se utiliza un filtro adherente viene precedida por las siguientes fases:
 - 20 i) precipitación alcohólica de las proteínas contaminantes y/o los ácidos nucleicos y
 - ii) diafiltración.
6. El método de la reivindicación 5, donde la diafiltración es una diafiltración de flujo tangencial.
7. El método de la reivindicación 6, donde se realizan dos ciclos de diafiltración de flujo tangencial y el material retenido del primer ciclo de diafiltración se trata con una solución de acetato ácido acético/sodio entre el primer y el segundo ciclo.
- 25 8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde la fase de filtración en la que se utiliza un filtro adherente viene seguida por las siguientes fases:
 - 30 iv) Re-N-acetilación,
 - v) Diafiltración.
9. El método de la reivindicación 8, donde la diafiltración es una diafiltración de flujo tangencial.
- 35 10. El método de la reivindicación 9, donde se realizan dos ciclos de diafiltración de flujo tangencial y donde el material retenido del primer ciclo de diafiltración se trata con una solución de acetato ácido acético/sodio entre el primer y el segundo ciclo.
- 40 11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-10 donde el *Streptococo agalactiae* se selecciona a partir de los serotipos 1a, 1b, 3, 4 y 5.
12. El método de la reivindicación 11, donde el *Streptococo agalactiae* se selecciona a partir de las cepas 090, 7357, H36b, DK21, M781, 2603 y CJB111.
- 45 13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, donde la filtración en la que se utiliza un filtro adherente viene seguida por otra filtración en la que se utiliza un filtro de 0.45/0.2 mm.
14. Un método para conjugar un polisacárido capsular a partir del *Streptococo agalactiae*, con una proteína portadora, donde el método se compone de:
 - 50 a) el método de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, seguido de
 - b) conjugación del sacárido con una proteína portadora.
- 55 15. El método de la reivindicación 14, donde la proteína portadora es el toxoide de difteria, el toxoide del tétano o el CRM 197, mutante de la toxina de la difteria.
16. El método de las reivindicaciones 14 ó 15, donde el conjugado se obtiene mediante la oxidación del polisacárido seguida de una aminación reductora con la proteína.
- 60 17. El método de cualquiera de las reivindicaciones 14-16, donde el conjugado tiene una proporción de sacárido proteína (p/p) de entre 1,5 y 5,1.
- 65 18. El método de cualquiera de las reivindicaciones 14-17 que se compone, adicionalmente, de la fase de mezcla de los conjugados individuales preparados a partir de uno o más de los *Streptococos* del Grupo B de los serogrupos Ia, Ib, o II, para proporcionar un preparado polivalente.

19. El método de cualquiera de las reivindicaciones 14-18 que se compone, adicionalmente, de la fase de mezcla de los conjugados individuales para proporcionar un preparado bivalente, trivalente, tetravalente, pentavalente, hexavalente, heptavalente o undecavalente.

5 20. El método de cualquiera de las reivindicaciones 14-19, donde se combina el conjugado con un portador farmacéuticamente aceptable.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIGURA 1

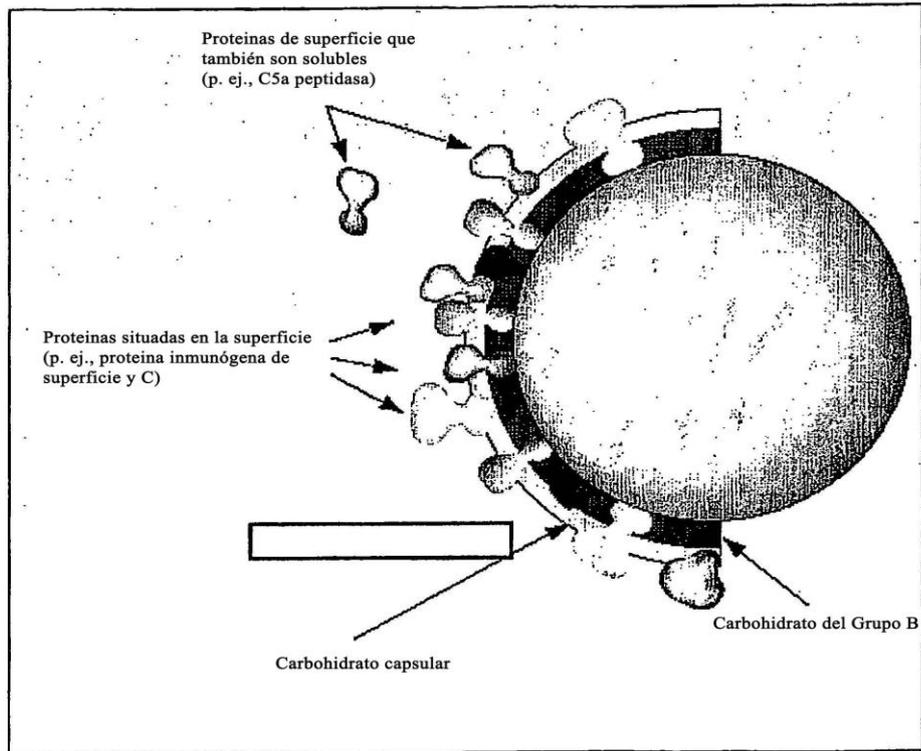


FIGURA 2

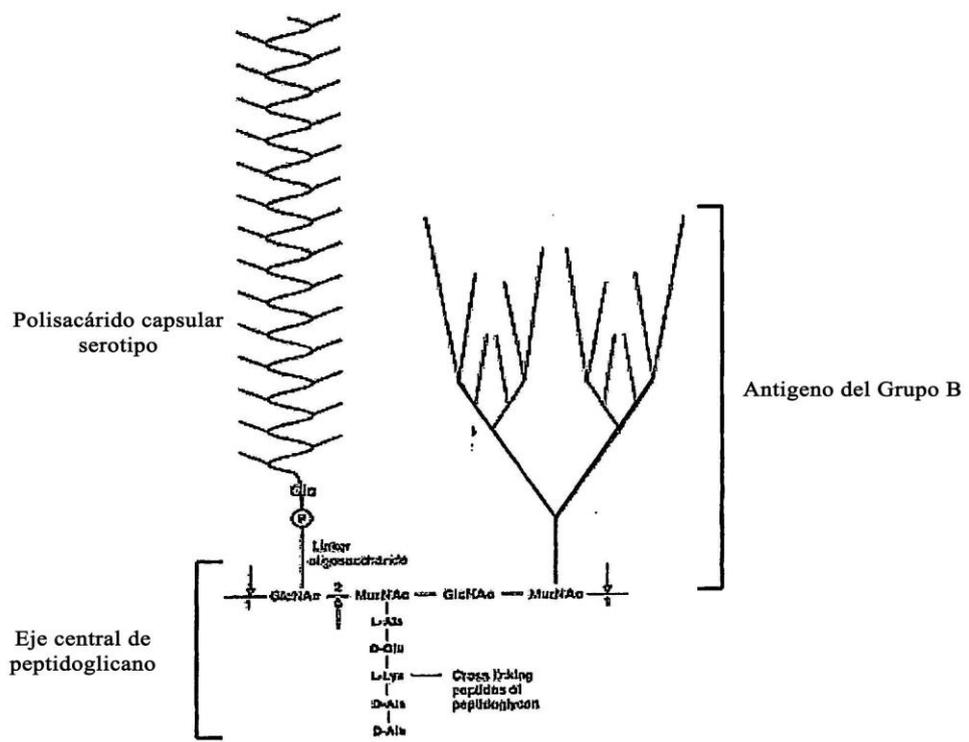
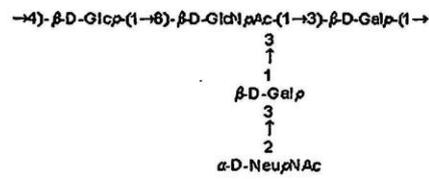
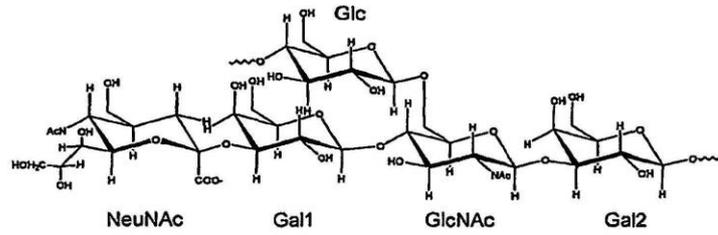


FIGURA 3B

Tipo III (M781)



Tipo V (CJB111)

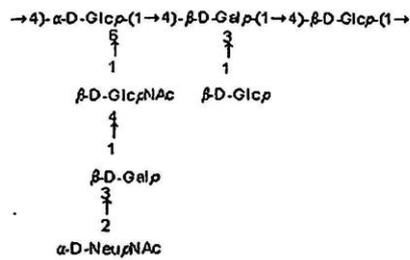
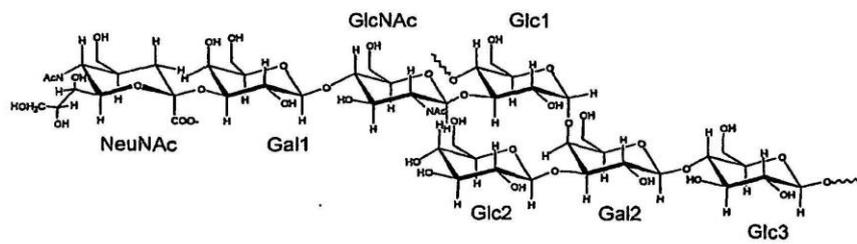


FIGURA 4

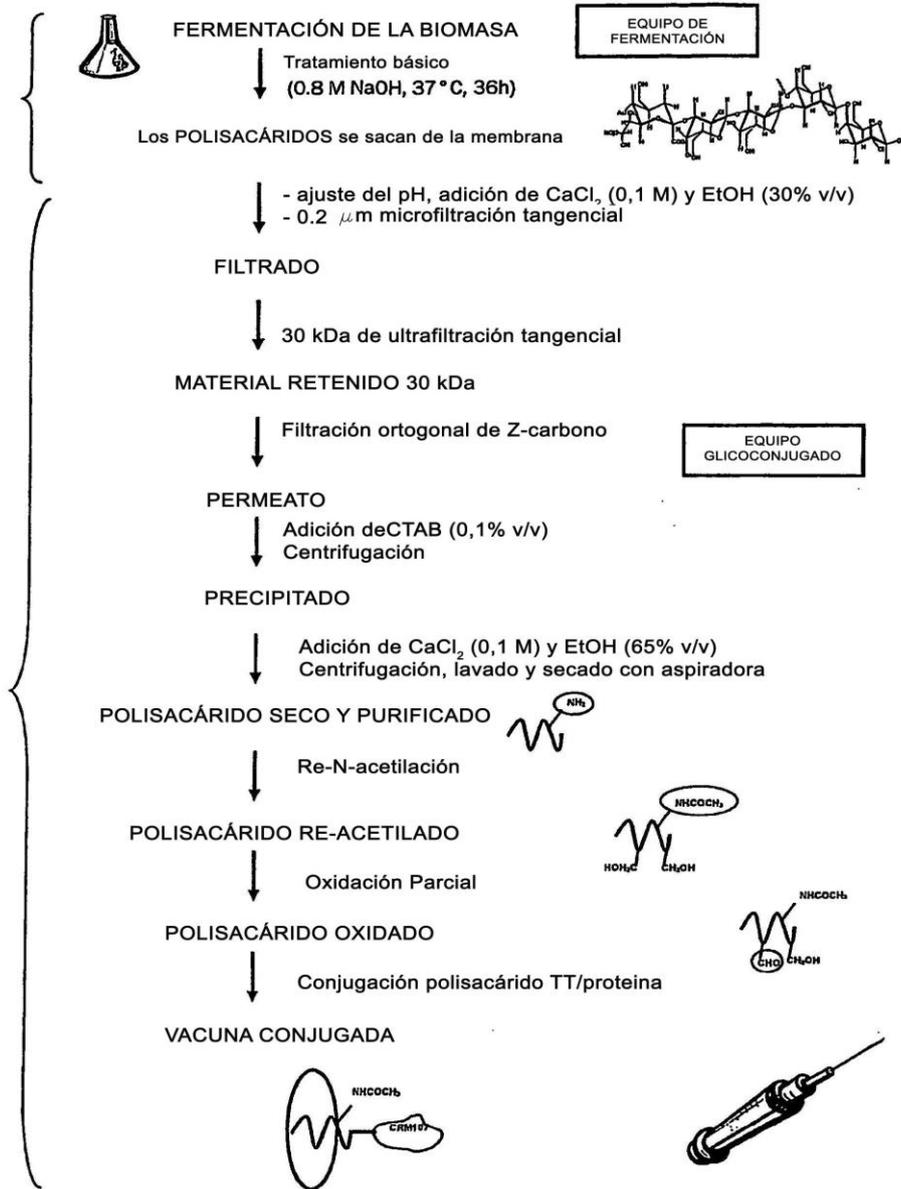
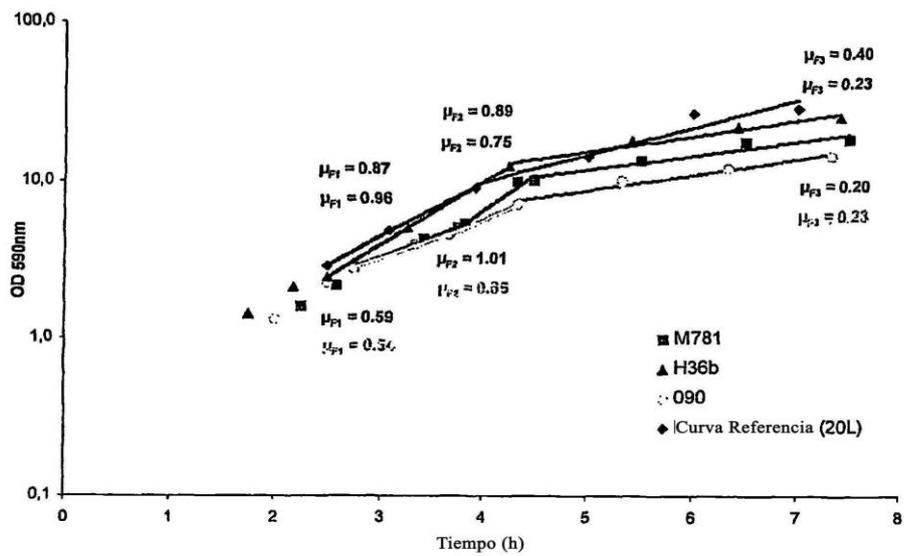
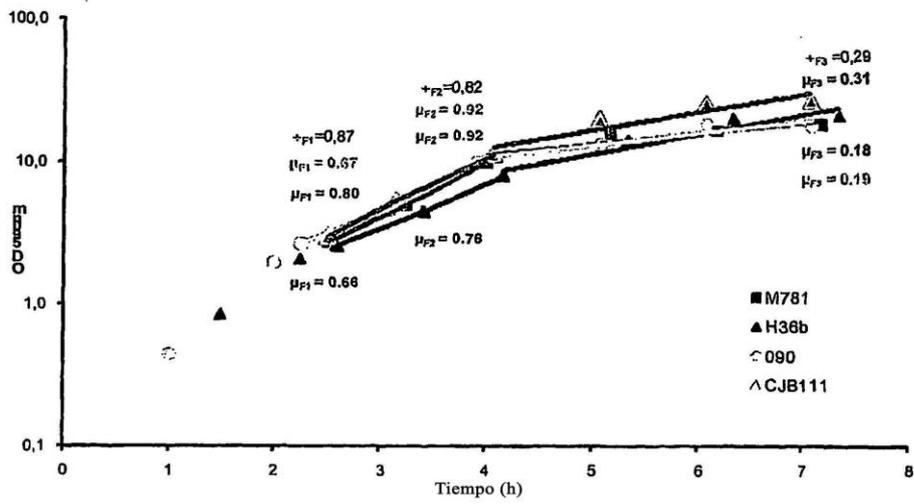


FIGURA 22



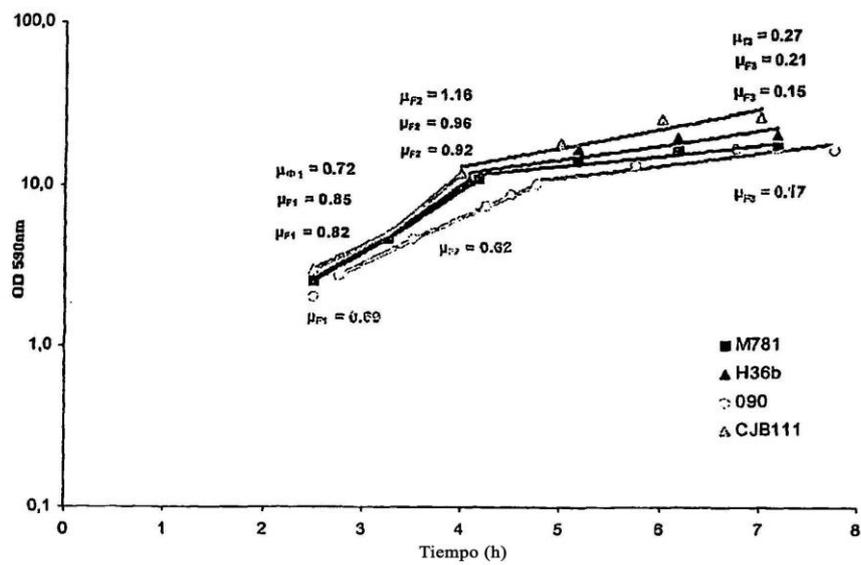
Perfiles de OD_{590nm} en los primeros pre-ensayos de fermentaciones

FIGURA 23



Perfiles del OD_{590nm} en los segundos pre-ensayos de fermentaciones

FIGURA 24



Perfiles del OD_{590nm} en los ensayos de fermentaciones

FIGURA 25

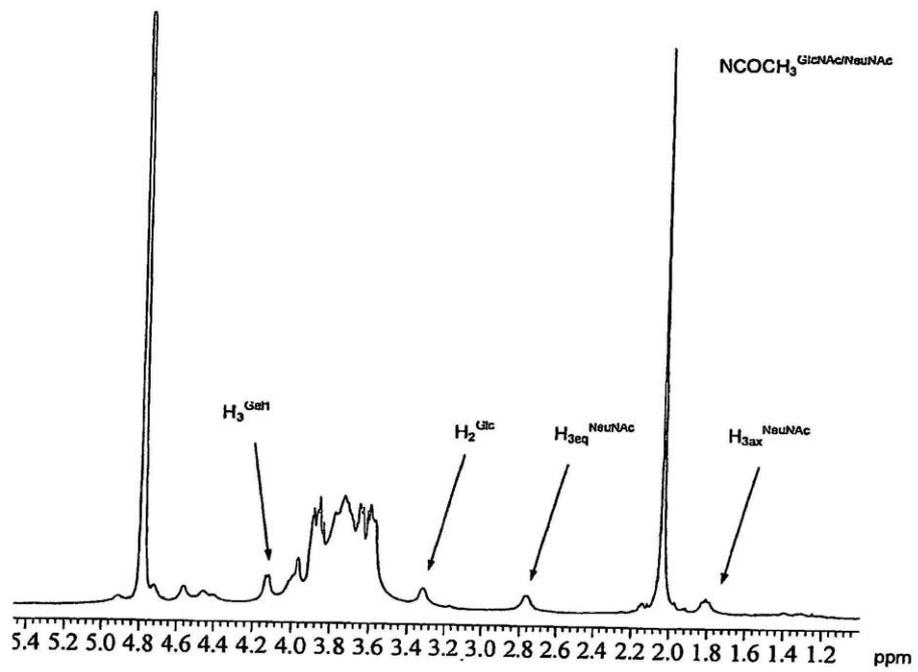


FIGURA 26

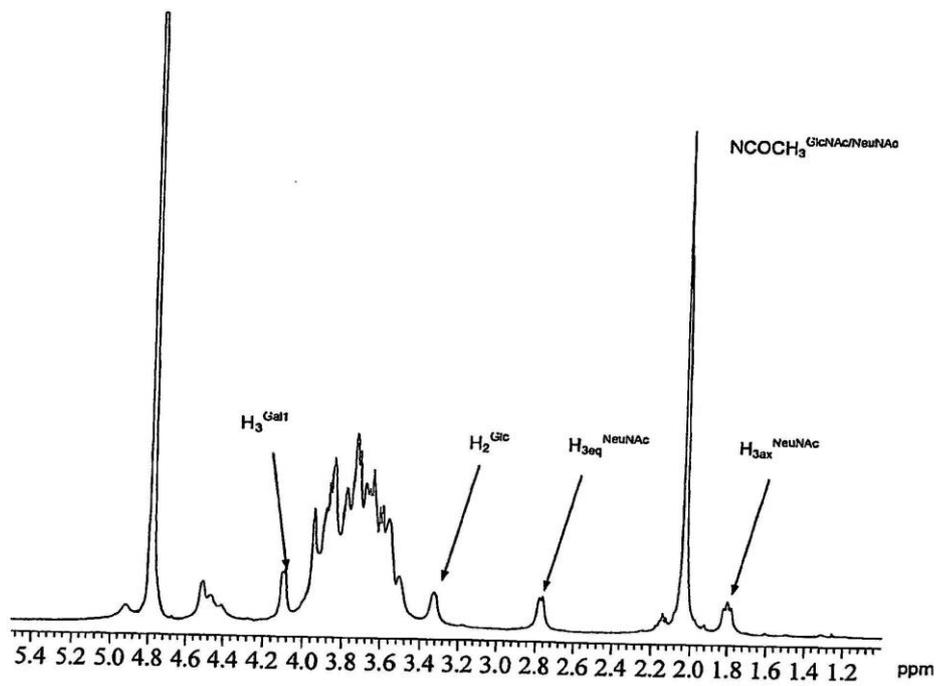


FIGURA 27

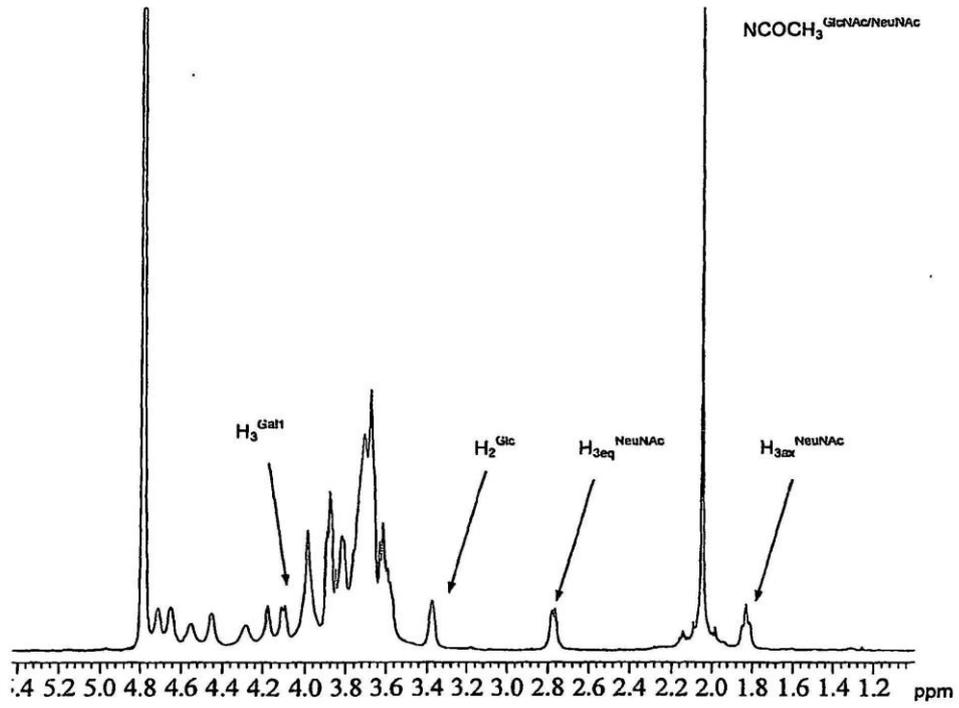


FIGURA 28

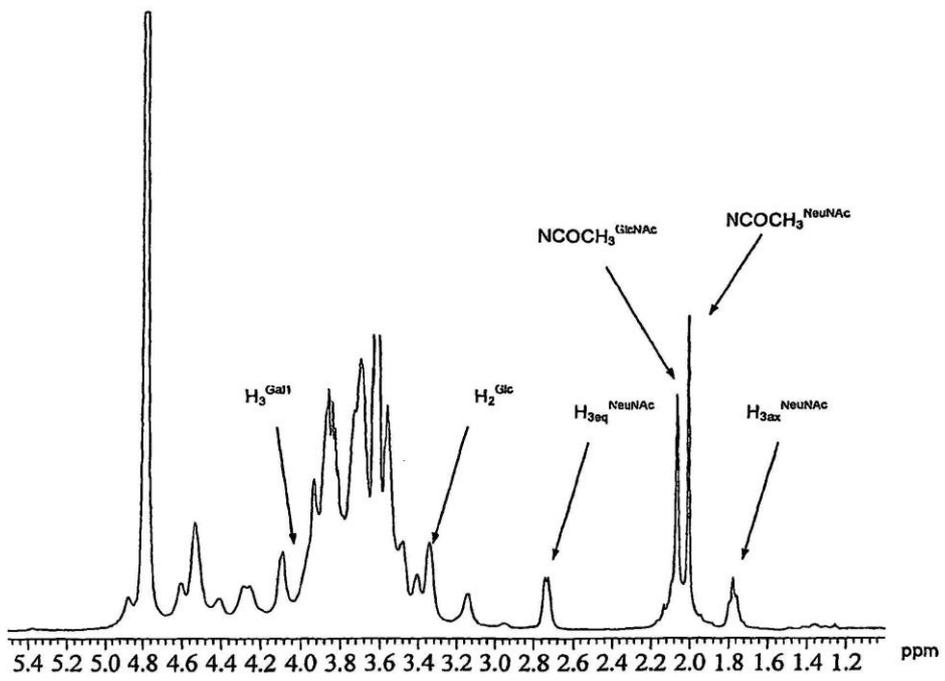


FIGURA 29

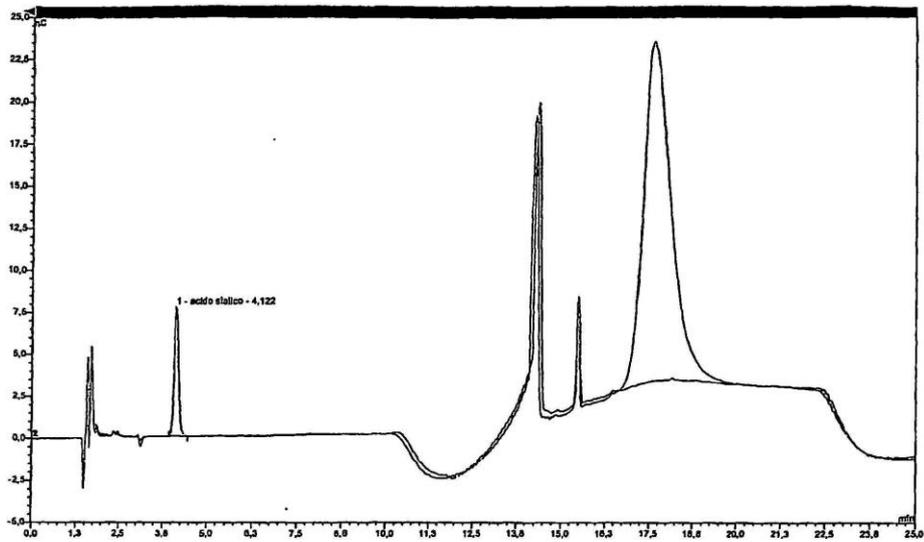


FIGURA 30

