

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 677 358**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/09** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.09.2011 PCT/IB2011/054069**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.03.2012 WO12035519**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.09.2011 E 11768149 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018 EP 2616099**

54 Título: **Composiciones inmunogénicas**

30 Prioridad:

**31.01.2011 GB 201101665  
16.09.2010 US 383668 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**01.08.2018**

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA (100.0%)  
Rue de l'Institut 89  
1330 Rixensart, BE**

72 Inventor/es:

**BERTI, FRANCESCO;  
CONTORNI, MARIO;  
COSTANTINO, PAOLO;  
FINCO, ORETTA;  
GRANDI, GUIDO;  
MAIONE, DOMENICO y  
TELFORD, JOHN**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 677 358 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Composiciones inmunogénicas

**Campo técnico**

5 Esta invención pertenece al campo de las composiciones inmunogénicas que comprenden productos conjugados de sacáridos capsulares de *Streptococcus agalactiae* y proteínas portadoras. Las composiciones son útiles para la inmunización.

**Técnica anterior**

10 Los sacáridos capsulares de bacterias se han utilizado durante muchos años en vacunas contra bacterias encapsuladas. Puesto que los sacáridos son antígenos independientes de células T, sin embargo, son poco inmunogénicos. La conjugación con un portador puede convertir los antígenos independientes de células T en antígenos dependientes de células T, mejorando así las respuestas de memoria y permitiendo que se desarrolle inmunidad protectora. Las vacunas de sacáridos más eficaces se basan, por lo tanto, en productos glicoconjugados, y la vacuna de producto conjugado prototipo era contra *Haemophilus influenzae* tipo b ('Hib') [p.ej. véase el capítulo 14 de la ref. 84].

15 Otra bacteria para la cual se han descrito vacunas de producto conjugado es *Streptococcus agalactiae*, también conocido como 'estreptococo del grupo B', o simplemente como 'GBS'. La mayor parte de este trabajo ha sido realizado por Dennis Kasper y colaboradores, y se describe en documentos tales como las referencias 1 a 9. Se ha demostrado que las vacunas de producto conjugado para cada uno de los serotipos Ia, Ib, II, III y V de GBS son seguras e inmunogénicas en seres humanos [10]. Lancaster *et al.* [283] describe ensayos en ratones de una vacuna de producto conjugado de GBS que incluye polisacáridos de los serotipos Ia, Ib y III de GBS. Paoletti *et al.* [203] describen una composición tetravalente que comprende polisacáridos capsulares de los serotipos Ia, Ib, II y III GBS conjugados con toxoide tetánico. Sin embargo, sigue existiendo la necesidad de vacunas de producto conjugado de GBS adicionales y mejoradas.

**Descripción de la invención**

25 En un primer aspecto, la invención proporciona una composición inmunogénica que comprende (a) un producto conjugado que es un sacárido capsular de serotipo Ia de GBS conjugado con una proteína portadora; (b) un producto conjugado que es un sacárido capsular de serotipo Ib de GBS conjugado con una proteína portadora; y (c) un producto conjugado que es un polisacárido capsular de serotipo III de GBS conjugado con una proteína portadora en donde (i) cada sacárido capsular de GBS está presente en una cantidad de aproximadamente 5 µg, 10 µg o 20 µg por dosis unitaria, (ii) la proteína portadora en (a), (b) y (c) es toxoide diftérico o CRM197 y (iii) la composición inmunogénica no contiene un coadyuvante de sal de aluminio. Las composiciones se pueden utilizar como vacunas para prevenir la infección por estos serotipos de GBS.

35 En un segundo aspecto, la invención proporciona composiciones inmunogénicas del primer aspecto para su uso como un medicamento, una vacuna y en un método para inmunizar a un paciente contra la infección por GBS que comprende la etapa de administración al paciente, en donde el paciente ha sido preinmunizado con un toxoide diftérico o derivado del mismo.

**Composiciones inmunogénicas**

40 A continuación se describen realizaciones de la invención que comprenden tres o cuatro productos conjugados. De estas composiciones, los autores de la presente invención han descubierto que las composiciones que comprenden un producto conjugado que es un sacárido capsular de serotipo Ib de GBS conjugado con una proteína portadora pueden conferir protección contra el serotipo Ia de GBS además del serotipo Ib de GBS. Esta observación contrasta con la enseñanza de la referencia 11, que sugiere que los productos conjugados de tipo Ib no son capaces de inducir anticuerpos que puedan destruir bacterias de tipo Ia. Por consiguiente, las realizaciones descritas a continuación que comprenden un producto conjugado que es un sacárido capsular de serotipo Ib de GBS conjugado con una proteína portadora pueden ser ventajosas ya que proporcionan una mejor protección contra el serotipo Ia (cuando la composición también comprende un producto conjugado que es un sacárido capsular de serotipo Ia de GBS conjugado con una proteína portadora).

50 Las composiciones inmunogénicas comprenden tres productos conjugados. El primer producto conjugado es un sacárido capsular de serotipo Ia de GBS conjugado con una proteína portadora, mientras que el segundo producto conjugado es un sacárido capsular de serotipo Ib de GBS conjugado con una proteína portadora y el tercer producto conjugado es un sacárido capsular de serotipo III de GBS conjugado con una proteína portadora. Los autores de la presente invención han descubierto que tales composiciones (p.ej., como se ilustra a continuación) son particularmente adecuadas para su uso como vacunas para prevenir la infección por GBS.

55 Las composiciones inmunogénicas pueden comprender cuatro productos conjugados. En una realización, el primer producto conjugado es un sacárido capsular de serotipo Ia de GBS conjugado con una proteína portadora, mientras

que el segundo producto conjugado es un sacárido capsular de serotipo Ib de GBS conjugado con una proteína portadora, el tercer conjugado es un sacárido capsular de serotipo III de GBS conjugado con una proteína portadora y el cuarto conjugado es un sacárido capsular de serotipo V de GBS conjugado con una proteína portadora.

5 Típicamente, las composiciones inmunogénicas descritas anteriormente no comprenderán ningún producto conjugado distinto de los específicamente mencionados, particularmente productos conjugados que comprenden sacáridos capsulares de serotipos de GBS distintos de los mencionados específicamente. Sin embargo, en algunas realizaciones, las composiciones pueden comprender otros productos conjugados, incluyendo productos conjugados que comprenden sacáridos capsulares de otros serotipos de GBS. Por ejemplo, las composiciones pueden comprender un producto conjugado que es un sacárido capsular de serotipo II de GBS conjugado con una proteína portadora. De forma similar, las composiciones pueden comprender un producto conjugado que es un sacárido capsular de serotipo VI de GBS conjugado con una proteína portadora. En otra posibilidad, las composiciones pueden comprender un producto conjugado que es un sacárido capsular de serotipo VIII de GBS conjugado con una proteína portadora.

15 También se describen composiciones inmunogénicas que comprenden cantidades del sacárido o los sacáridos capsular es de 0,1 a 50 µg por dosis unitaria. Típicamente, cada sacárido capsular de GBS está presente en una cantidad de 1 a 30 µg, por ejemplo de 2 a 25 µg, y en particular de 5 a 20 µg. Cantidades adecuadas del sacárido o los sacáridos capsulares pueden incluir 5, 10 y 20 µg por dosis unitaria, particularmente cuando la composición inmunogénica comprende sacáridos capsulares de los serotipos, Ia, Ib y III de GBS. Por lo tanto, las cantidades adecuadas por dosis unitaria de cada sacárido capsular pueden seleccionarse entre las opciones numeradas en las siguientes tablas, en donde la realización relevante se indica mediante la referencia al serotipo o los serotipos de los que derivan el sacárido o los sacáridos capsulares en la composición:

Tabla C - Composiciones inmunogénicas que comprenden tres productos conjugados

Opción de dosificación	Realización			
	Ia, Ib y III	Ia, Ib y V	Ia, III y V	Ib, III y V
1	Ia: 5 µg	Ia: 5 µg	Ia: 5 µg	Ib: 5 µg
	Ib: 5 µg	Ib: 5 µg	III: 5µg	III: 5µg
	III: 5µg	V: 5µg	V: 5µg	V: 5µg
2	Ia: 5 µg	Ia: 5 µg	Ia: 5 µg	Ib: 5 µg
	Ib: 5 µg	Ib: 5 µg	III: 5µg	III: 5 µg
	III: 10 µg	V: 10 µg	V: 10 µg	V: 10 µg
3	Ia: 5 µg	Ia: 5 µg	Ia: 5 µg	Ib: 5 µg
	Ib: 5 µg	Ib: 5 µg	III: 5 µg	III: 5 µg
	III: 20µg	V: 20µg	V: 20µg	V: 20µg
4	Ia: 5 µg	Ia: 5 µg	Ia: 5 µg	Ib: 5 µg
	Ib: 10 µg	Ib: 10 µg	III: 10 µg	III: 10 µg
	III: 5µg	V: 5µg	V: 5µg	V: 5µg
5	Ia: 5 µg	Ia: 5 µg	Ia: 5 µg	Ib: 5 µg
	Ib: 10 µg	Ib: 10 µg	III: 10 µg	III: 10 µg
	III: 10 µg	V: 10 µg	V: 10 µg	V: 10 µg
6	Ia: 5 µg	Ia: 5 µg	Ia: 5 µg	Ib: 5 µg
	Ib: 10 µg	Ib: 10 µg	III: 10 µg	III: 10 µg
	III: 20 µg	V: 20 µg	V: 20 µg	V: 20 µg
7	Ia: 5 µg	Ia: 5 µg	Ia: 5 µg	Ib: 5 µg
	Ib: 20 µg	Ib: 20 µg	III: 20 µg	III: 20 µg
	III: 5 µg	V: 5 µg	V: 5 µg	V: 5 µg
8	Ia: 5 µg	Ia: 5 µg	Ia: 5 µg	Ib: 5 µg

ES 2 677 358 T3

Opción de dosificación	Realización			
	la, lb y III	la, lb y V	la, III y V	lb, III y V
	lb: 20 µg	lb: 20 µg	III: 20 µg	III: 20 µg
	III: 10 µg	V: 10 µg	V: 10 µg	V: 10 µg
9	la: 5 µg	la: 5 µg	la: 5 µg	lb: 5 µg
	lb: 20 µg	lb: 20 µg	III: 20 µg	III: 20 µg
	III: 20 µg	V: 20	V: 20	V: 20 µg
10	la: 10 µg	la: 10 µg	la: 10 µg	lb: 10 µg
	lb: 5 µg	lb: 5 µg	III: 5 µg	III: 5 µg
	III: 5 µg	V: 5 µg	V: 5 µg	V: 5 µg
11	la: 10 µg	la: 10 µg	la: 10 µg	lb: 10 µg
	lb: 5 µg	lb: 5 µg	III: 5 µg	III: 5 µg
	III: 10 µg	V: 10 µg	V: 10 µg	V: 10 µg
12	la: 10 µg	la: 10 µg	la: 10 µg	lb: 10 µg
	lb: 5 µg	lb: 5 µg	III: 5 µg	III: 5 µg
	III: 20 µg	V: 20 µg	V: 20 µg	V: 20 µg
13	la: 10 µg	la: 10 µg	la: 10 µg	lb: 10 µg
	lb: 10 µg	lb: 10 µg	III: 10 µg	III: 10 µg
	III: 5 µg	V: 5 µg	V: 5 µg	V: 5 µg
14	la: 10 µg	la: 10 µg	la: 10 µg	lb: 10 µg
	lb: 10 µg	lb: 10 µg	III: 10 µg	III: 10 µg
	III: 10 µg	V: 10 µg	V: 10 µg	V: 10 µg
15	la: 10 µg	la: 10 µg	la: 10 µg	lb: 10 µg
	lb: 10 µg	lb: 10 µg	III: 10 µg	III: 10 µg
	III: 20 µg	V: 20	V: 20 µg	V: 20 µg
16	la: 10 µg	la: 10 µg	la: 10 µg	lb: 10 µg
	lb: 20 µg	lb: 20 µg	III: 20 µg	III: 20 µg
	III: 5 µg	V: 5 µg	V: 5 µg	V: 5 µg
17	la: 10 µg	la: 10 µg	la: 10 µg	lb: 10 µg
	lb: 20 µg	lb: 20 µg	III: 20 µg	III: 20 µg
	III: 10 µg	V: 10 µg	V: 10 µg	V: 10 µg
18	la: 10 µg	la: 10 µg	la: 10 µg	lb: 10 µg
	lb: 20 µg	lb: 20 µg	III: 20 µg	III: 20 µg
	III: 20 µg	V: 20 µg	V: 20 µg	V: 20 µg
19	la: 20 µg	la: 20 µg	la: 20 µg	lb: 20 µg
	lb: 5 µg	lb: 5 µg	III: 5 µg	III: 5 µg
	III: 5 µg	V: 5 µg	V: 5 µg	V: 5 µg
20	la: 20 µg	la: 20 µg	la: 20 µg	lb: 20 µg
	lb: 5 µg	lb: 5 µg	III: 5 µg	III: 5 µg

Opción de dosificación	Realización			
	Ia, Ib y III	Ia, Ib y V	Ia, III y V	Ib, III y V
	III: 10 µg	V: 10 µg	V: 10 µg	V: 10 µg
21	Ia: 20 µg	Ia: 20 µg	Ia: 20 µg	Ib: 20 µg
	Ib: 5 µg	Ib: 5 µg	III: 5 µg	III: 5 µg
	III: 20 µg	V: 20 µg	V: 20 µg	V: 20 µg
22	Ia: 20 µg	Ia: 20 µg	Ia: 20 µg	Ib: 20 µg
	Ib: 10 µg	Ib: 10 µg	III: 10 µg	III: 10 µg
	III: 5 µg	V: 5 µg	V: 5 µg	V: 5 µg
23	Ia: 20 µg	Ia: 20 µg	Ia: 20 µg	Ib: 20 µg
	Ib: 10 µg	Ib: 10 µg	III: 10 µg	III: 10 µg
	III: 10 µg	V: 10 µg	V: 10 µg	V: 10 µg
24	Ia: 20 µg	Ia: 20 µg	Ia: 20 µg	Ib: 20 µg
	Ib: 10 µg	Ib: 10 µg	III: 10 µg	III: 10 µg
	III: 20 µg	V: 20 µg	V: 20 µg	V: 20 µg
25	Ia: 20 µg	Ia: 20 µg	Ia: 20 µg	Ib: 20 µg
	Ib: 20 µg	Ib: 20 µg	III: 20 µg	III: 20 µg
	III: 5 µg	V: 5 µg	V: 5 µg	V: 5 µg
26	Ia: 20 µg	Ia: 20 µg	Ia: 20 µg	Ib: 20 µg
	Ib: 20 µg	Ib: 20 µg	III: 20 µg	III: 20 µg
	III: 10 µg	V: 10 µg	V: 10 µg	V: 10 µg
27	Ia: 20 µg	Ia: 20 µg	Ia: 20 µg	Ib: 20 µg
	Ib: 20 µg	Ib: 20 µg	III: 20 µg	III: 20 µg
	III: 20 µg	V: 20 µg	V: 20 µg	V: 20 µg

De las opciones de dosificación descritas en la Tabla C, los autores de la presente invención han descubierto que las opciones 1, 14 y 27 son eficaces, cuando la composición inmunogénica comprende: a) un producto conjugado que es un sacárido capsular de serotipo Ia de GBS conjugado con una proteína portadora; b) un producto conjugado que es un sacárido capsular de serotipo Ib de GBS conjugado con una proteína portadora; y c) un producto conjugado que es un sacárido capsular de serotipo III de GBS conjugado con una proteína portadora. Por lo tanto, estas opciones de dosificación son preferidas para su uso en la invención, particularmente para esta realización. Puede ser ventajoso minimizar la cantidad total de sacárido o sacáridos capsulares por dosis unitaria para reducir la posible toxicidad. Por consiguiente, la opción de dosificación 1 es particularmente preferida.

5

10

Es posible minimizar adicionalmente la cantidad de sacárido o sacáridos capsulares por dosis unitaria. Por lo tanto, también se describen cantidades de sacárido o sacáridos capsulares de 0,1 a 5 µg por dosis unitaria. Por ejemplo, una cantidad de 0,1 a 5 µg, p.ej. 0,5, 2,5 o 5 µg, por dosis unitaria, por ejemplo, cada sacárido capsular de GBS puede estar presente en una cantidad de 0,5 a 5 µg, 1 a 4 µg, 2 a 3 µg, o aproximadamente 2,5 µg por dosis unitaria. Tales cantidades por dosis unitaria de cada sacárido capsular se describen en la tabla a continuación:

15

## ES 2 677 358 T3

Tabla C '- Composiciones inmunogénicas que comprenden sacáridos capsulares de los serotipos Ia, Ib y III de GBS

Opción de dosificación	Cantidad de sacárido capsular por dosis unitaria (µg)		
	I a	Ib	III
1	0,5	0,5	0,5
2	0,5	0,5	2,5
3	0,5	0,5	5
4	0,5	2,5	0,5
5	0,5	2,5	2,5
6	0,5	2,5	5
7	0,5	5	0,5
8	0,5	5	2,5
9	0,5	5	5
10	2,5	0,5	0,5
11	2,5	0,5	2,5
12	2,5	0,5	5
13	2,5	2,5	0,5
14	2,5	2,5	2,5
15	2,5	2,5	5
16	2,5	5	0,5
17	2,5	5	2,5
18	2,5	5	5
19	5	0,5	0,5
20	5	0,5	2,5
21	5	0,5	5
22	5	2,5	0,5
23	5	2,5	2,5
24	5	2,5	5

Opción de dosificación	Cantidad de sacárido capsular por dosis unitaria (µg)		
	I a	Ib	III
25	5	5	0,5
26	5	5	2,5
27	5	5	5

De las opciones de dosificación descritas en la Tabla C', los autores de la presente invención contemplan en particular las opciones 1, 14 y 27. En estas opciones, la cantidad de cada sacárido capsular de GBS es la misma (p.ej., en las composiciones con dosis más altas ilustradas a continuación).

5 Tabla D - Composiciones inmunogénicas que comprenden cuatro conjugados

Realización - Ia, Ib, III y V					
Opción de dosificación		Opción de dosificación		Opción de dosificación	
1	Ia: 5 µg Ib: 5 µg III: 5 µg V: 5 µg	28	Ia: 10 µg Ib: 5 µg III: 5 µg V: 5 µg	55	Ia: 20 µg Ib: 5 µg III: 5 µg V: 5 µg
2	Ia: 5 µg Ib: 5 µg III: 5 µg V: 10 µg	29	Ia: 10 µg Ib: 5 µg III: 5 µg V: 10 µg	56	Ia: 20 µg Ib: 5 µg III: 5 µg V: 10 µg
3	Ia: 5 µg Ib: 5 µg III: 5 µg V: 20 µg	30	Ia: 10 µg Ib: 5 µg III: 5 µg V: 20 µg	57	Ia: 20 µg Ib: 5 µg III: 5 µg V: 20 µg
4	Ia: 5 µg Ib: 5 µg III: 10 µg V: 5 µg	31	Ia: 10 µg Ib: 5 µg III: 10 µg V: 5 µg	58	Ia: 20 µg Ib: 5 µg III: 10 µg V: 5 µg
5	Ia: 5 µg Ib: 5 µg III: 10 µg V: 10 µg	32	Ia: 10 µg Ib: 5 µg III: 10 µg V: 10 µg	59	Ia: 20 µg Ib: 5 µg III: 10 µg V: 10 µg
6	Ia: 5 µg Ib: 5 µg III: 10 µg V: 20 µg	33	Ia: 10 µg Ib: 5 µg III: 10 µg V: 20 µg	60	Ia: 20 µg Ib: 5 µg III: 10 µg V: 20 µg
7	Ia: 5 µg Ib: 5 µg III: 20 µg V: 5 µg	34	Ia: 10 µg Ib: 5 µg III: 20 µg V: 5 µg	61	Ia: 20 µg Ib: 5 µg III: 20 µg V: 5 µg
8	Ia: 5 µg Ib: 5 µg III: 20 µg V: 10 µg	35	Ia: 10 µg Ib: 5 µg III: 20 µg V: 10 µg	62	Ia: 20 µg Ib: 5 µg III: 20 µg V: 10 µg
9	Ia: 5 µg Ib: 5 µg III: 20 µg V: 20 µg	36	Ia: 10 µg Ib: 5 µg III: 20 µg V: 20 µg	63	Ia: 20 µg Ib: 5 µg III: 20 µg V: 20 µg

ES 2 677 358 T3

Realización - Ia, Ib, III y V					
Opción de dosificación		Opción de dosificación		Opción de dosificación	
10	Ia: 5 µg Ib: 10 µg III: 5 µg V: 5 µg	37	Ia: 10 µg Ib: 10 µg III: 5 µg V: 5 µg	64	Ia: 20 µg Ib: 10 µg III: 5 µg V: 5 µg
11	Ia: 5 µg Ib: 10 µg III: 5 µg V: 10 µg	38	Ia: 10 µg Ib: 10 µg III: 5 µg V: 10 µg	65	Ia: 20 µg Ib: 10 µg III: 5 µg V: 10 µg
12	Ia: 5 µg Ib: 10 µg III: 5 µg V: 20 µg	39	Ia: 10 µg Ib: 10 µg III: 5 µg V: 20 µg	66	Ia: 20 µg Ib: 10 µg III: 5 µg V: 20 µg
13	Ia: 5 µg Ib: 10 µg III: 10 µg V: 5 µg	40	Ia: 10 µg Ib: 10 µg III: 10 µg V: 5 µg	67	Ia: 20 µg Ib: 10 µg III: 10 µg V: 5 µg
14	Ia: 5 µg Ib: 10 µg III: 10 µg V: 10 µg	41	Ia: 10 µg Ib: 10 µg III: 10 µg V: 10 µg	68	Ia: 20 µg Ib: 10 µg III: 10 µg V: 10 µg
15	Ia: 5 µg Ib: 10 µg III: 10 µg V: 20 µg	42	Ia: 10 µg Ib: 10 µg III: 10 µg V: 20 µg	69	Ia: 20 µg Ib: 10 µg III: 10 µg V: 20 µg
16	Ia: 5 µg Ib: 10 µg III: 20 µg V: 5 µg	43	Ia: 10 µg Ib: 10 µg III: 20 µg V: 5 µg	70	Ia: 20 µg Ib: 10 µg III: 20 µg V: 5 µg
17	Ia: 5 µg Ib: 10 µg III: 20 µg V: 10 µg	44	Ia: 10 µg Ib: 10 µg III: 20 µg V: 10 µg	71	Ia: 20 µg Ib: 10 µg III: 20 µg V: 10 µg
18	Ia: 5 µg Ib: 10 µg III: 20 µg V: 20 µg	45	Ia: 10 µg Ib: 10 µg III: 20 µg V: 20 µg	72	Ia: 20 µg Ib: 10 µg III: 20 µg V: 20 µg
19	Ia: 5 µg Ib: 20 µg III: 5 µg V: 5 µg	46	Ia: 10 µg Ib: 20 µg III: 5 µg V: 5 µg	73	Ia: 20 µg Ib: 20 µg III: 5 µg V: 5 µg
20	Ia: 5 µg Ib: 20 µg III: 5 µg V: 10 µg	47	Ia: 10 µg Ib: 20 µg III: 5 µg V: 10 µg	74	Ia: 20 µg Ib: 20 µg III: 5 µg V: 10 µg
21	Ia: 5 µg Ib: 20 µg III: 5 µg V: 20 µg	48	Ia: 10 µg Ib: 20 µg III: 5 µg V: 20 µg	75	Ia: 20 µg Ib: 20 µg III: 5 µg V: 20 µg
22	Ia: 5 µg Ib: 20 µg III: 10 µg V: 5 µg	49	Ia: 10 µg Ib: 20 µg III: 10 µg V: 5 µg	76	Ia: 20 µg Ib: 20 µg III: 10 µg V: 5 µg

Realización - Ia, Ib, III y V					
Opción de dosificación		Opción de dosificación		Opción de dosificación	
23	Ia: 5 µg Ib: 20 µg III: 10 µg V: 10 µg	50	Ia: 10 µg Ib: 20 µg III: 10 µg V: 10 µg	77	Ia: 20 µg Ib: 20 µg III: 10 µg V: 10 µg
24	Ia: 5 µg Ib: 20 µg III: 10 µg V: 20 µg	51	Ia: 10 µg Ib: 20 µg III: 10 µg V: 20 µg	78	Ia: 20 µg Ib: 20 µg III: 10 µg V: 20 µg
25	Ia: 5 µg Ib: 20 µg III: 20 µg V: 5 µg	52	Ia: 10 µg Ib: 20 µg III: 20 µg V: 5 µg	79	Ia: 20 µg Ib: 20 µg III: 20 µg V: 5 µg
26	Ia: 5 µg Ib: 20 µg III: 20 µg V: 10 µg	53	Ia: 10 µg Ib: 20 µg III: 20 µg V: 10 µg	80	Ia: 20 µg Ib: 20 µg III: 20 µg V: 10 µg
27	Ia: 5 µg Ib: 20 µg III: 20 µg V: 20 µg	54	Ia: 10 µg Ib: 20 µg III: 20 µg V: 20 µg	81	Ia: 20 µg Ib: 20 µg III: 20 µg V: 20 µg

La razón de la masa de un sacárido capsular dado con respecto a la masa del otro o los otros sacáridos capsulares puede variar. Las razones adecuadas (p/p) para cada sacárido capsular se describen como opciones numeradas en las siguientes tablas:

5 Tabla F - Composiciones inmunogénicas que comprenden tres conjugados

Opción de proporción	Realización			
	Ia: Ib: III			
1	1:1:1			
2	1:1:2			
3	1:1:4			
4	1:2:1			
5	1:2:2			
6	1:2:4			
7	1:4:1			
8	1:4:2			
9	1:4:4			
10	2:1:1			
11	2:1:2			
12	2:1:4			
13	2:2:1			
14	2:4:1			
15	4:1:1			
16	4:1:2			

Opción de proporción	Realización			
	la: lb: III			
17	4:1:4			
18	4:2:1			
19	4:4:1			

5 De las opciones de las razones descritas en la Tabla F, los autores de la presente invención han encontrado que la opción 1 es eficaz, cuando la composición inmunogénica comprende: a) un producto conjugado que es un sacárido capsular de serotipo Ia de GBS conjugado con una proteína portadora; b) un producto conjugado que es un sacárido capsular de serotipo Ib de GBS conjugado con una proteína portadora; y c) un producto conjugado que es un sacárido capsular de serotipo III de GBS conjugado con una proteína portadora. Por lo tanto, esta opción de razón se prefiere para su uso en la invención, particularmente para esta realización.

Tabla G - Composiciones inmunogénicas que comprenden cuatro productos conjugados

Realización - Ia, Ib, III y V					
Opción de razón	Ia: Ib: III: V	Opción de razón	Ia: Ib: III: V	Opción de razón	Ia: Ib: III: V
1	1:1:1:1	23	1:4:2:2	45	2:4:2:1
2	1:1:1:2	24	1:4:2:4	46	2:4:4:1
3	1:1:1:4	25	1:4:4:1	47	4:1:1:1
4	1:1:2:1	26	1:4:4:2	48	4:1:1:2
5	1:1:2:2	27	1:4:4:4	49	4:1:1:4
6	1:1:2:4	28	2:1:1:1	50	4:1:2:1
7	1:1:4:1	29	2:1:1:2	51	4:1:2:2
8	1:1:4:2	30	2:1:1:4	52	4:1:2:4
9	1:1:4:4	31	2:1:2:1	53	4:1:4:1
10	1:2:1:1	32	2:1:2:2	54	4:1:4:2
11	1:2:1:2	33	2:1:2:4	55	4:1:4:4
12	1:2:1:4	34	2:1:4:1	56	4:2:1:1
13	1:2:2:1	35	2:1:4:2	57	4:2:1:2
14	1:2:2:2	36	2:1:4:4	58	4:2:1:4
15	1:2:2:4	37	2:2:1:1	59	4:2:2:1
16	1:2:4:1	38	2:2:1:2	60	4:2:4:1
17	1:2:4:2	39	2:2:1:4	61	4:4:1:1
18	1:2:4:4	40	2:2:2:1	62	4:4:1:2
19	1:4:1:1	41	2:2:4:1	63	4:4:1:4
20	1:4:1:2	42	2:4:1:1	64	4:4:2:1
21	1:4:1:4	43	2:4:1:2	65	4:4:4:1
22	1:4:2:1	44	2:4:1:4		

10 Como se comentó anteriormente, la invención se refiere en parte a composiciones inmunogénicas que comprenden adicionalmente un producto conjugado que es un sacárido capsular de serotipo V de GBS conjugado con una

5 proteína portadora. Los autores de la presente invención han descubierto que la respuesta inmunitaria al sacárido capsular de serotipo V de GBS en estas composiciones se puede disminuir si la composición inmunogénica comprende uno o más antígenos adicionales. Sin desear estar limitados por la teoría, se cree que la presencia del antígeno o los antígenos adicionales da como resultado una "interferencia inmunitaria", disminuyendo la respuesta al sacárido capsular de serotipo V de GBS.

10 Los autores de la presente invención han descubierto que se puede mejorar la respuesta al sacárido capsular de serotipo V de GBS en estas composiciones inmunogénicas si la composición comprende un coadyuvante. Esta observación está en contraste con la enseñanza de la referencia 12, que sugiere que los coadyuvantes pueden no mejorar la respuesta inmunitaria a productos conjugados de GBS. El experto en la técnica sería capaz de identificar coadyuvantes que se podrían utilizar en estas composiciones.

15 Los autores de la presente invención también han encontrado que se puede mejorar la respuesta al sacárido capsular de serotipo V de GBS si se aumenta la dosis de este sacárido capsular. En particular, la respuesta al sacárido capsular de tipo V se puede mejorar si la dosis del sacárido capsular de tipo V es mayor que la dosis del sacárido capsular del otro serotipo de GBS. Por consiguiente, en otra realización, la presente invención proporciona una composición inmunogénica que comprende: a) un producto conjugado que es un sacárido capsular de serotipo V de GBS conjugado con una proteína portadora; en donde la dosis del sacárido capsular de tipo V es mayor que la dosis o las dosis totales de los sacáridos capsulares de los otros serotipos de GBS, o es mayor que al menos una de las dosis o la dosis media de los sacáridos capsulares de los otros serotipos de GBS. La dosis del sacárido capsular de tipo V puede ser 1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces mayor. Es típico que la dosis del sacárido capsular de tipo V sea mayor que la dosis media de los sacáridos capsulares de los otros serotipos de GBS. Por consiguiente, esta realización de la invención abarca cualquiera de las composiciones inmunogénicas descritas en la presente memoria que comprenden un producto conjugado que es un sacárido capsular de serotipo V de GBS conjugado con una proteína portadora y comprende adicionalmente productos conjugados que son sacáridos capsulares de los serotipos Ia, Ib y III de GBS conjugados con proteínas portadoras; en donde la dosis del sacárido capsular de tipo V es mayor que la dosis o las dosis totales del sacárido o los sacáridos capsulares del otro o los otros serotipos de GBS, o es mayor que al menos una de las dosis o la dosis media de los sacáridos capsulares de los otros serotipos de GBS.

30 A continuación se tratan los métodos de administración de las composiciones inmunogénicas de la invención. Brevemente, las composiciones inmunogénicas de la invención se pueden administrar en dosis individuales o múltiples. Los autores de la presente invención han descubierto que la administración de una dosis individual de las composiciones inmunogénicas de la invención es eficaz, particularmente cuando la composición inmunogénica comprende sacáridos capsulares de los serotipos Ia, Ib y III de GBS; y más concretamente cuando la composición inmunogénica comprende: a) un producto conjugado que es un sacárido capsular de serotipo Ia de GBS conjugado con una proteína portadora; b) un producto conjugado que es un sacárido capsular de serotipo Ib de GBS conjugado con una proteína portadora; y c) un producto conjugado que es un sacárido capsular de serotipo III de GBS conjugado con una proteína portadora. La administración de una dosis individual es por lo tanto preferida en la invención, particularmente para estas realizaciones.

40 Alternativamente, puede ser eficaz una dosis unitaria seguida de una segunda dosis unitaria. Típicamente, la segunda (o tercera, cuarta, quinta etc.) dosis unitaria es idéntica a la primera dosis unitaria. La segunda dosis unitaria se puede administrar en cualquier momento adecuado después de la primera dosis unitaria, en particular después de 1, 2 o 3 meses. Por ejemplo, cuando la composición inmunogénica comprende sacáridos capsulares de los serotipos Ia, Ib y III de GBS, la segunda dosis unitaria se puede administrar 3 meses después de la primera dosis unitaria. En otro ejemplo, si la composición inmunogénica también comprende sacáridos capsulares de los serotipos V de GBS, la segunda dosis unitaria se puede administrar 1 mes después de la primera dosis unitaria. Típicamente, las composiciones inmunogénicas de la invención se administrarán por vía intramuscular, p.ej. mediante administración intramuscular al muslo o la parte superior del brazo como se describe a continuación.

50 Los autores de la presente invención han descubierto que el uso de composiciones sin coadyuvante añadido es eficaz, particularmente cuando la composición inmunogénica comprende sacáridos capsulares de los serotipos Ia, Ib y III de GBS; y más concretamente cuando la composición inmunogénica comprende: a) un producto conjugado que es un sacárido capsular de serotipo Ia de GBS conjugado con una proteína portadora; b) un producto conjugado que es un sacárido capsular de serotipo Ib de GBS conjugado con una proteína portadora; y c) un producto conjugado que es un sacárido capsular de serotipo III de GBS conjugado con una proteína portadora en donde (i) cada sacárido capsular de GBS está presente en una cantidad de 5 µg, 10 µg o 20 µg por dosis unitaria y (ii) la proteína portadora en (a), (b) y (c) es toxoide diftérico o CRM197. Puede ser ventajoso omitir los coadyuvantes para reducir la posible toxicidad. De acuerdo con esto, se prefieren las composiciones inmunogénicas que no contienen ningún coadyuvante (especialmente que no contienen ningún coadyuvante de sal de aluminio) para su uso en la invención, particularmente para estas realizaciones.

### **El sacárido capsular**

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

que está unido al esqueleto de peptidoglicano.

Los sacáridos capsulares de GBS están químicamente relacionados, pero son antigénicamente muy diferentes. Todos los sacáridos capsulares de GBS comparten el siguiente núcleo trisacárido:



- 5 Los diversos serotipos de GBS difieren en la forma en que se modifica este núcleo. La diferencia entre los serotipos la y III, por ejemplo, surge del uso de GlcNAc (Ia) o Gal (III) en este núcleo para unir núcleos de trisacáridos consecutivos (Figura 1). Los serotipos Ia y Ib tienen ambos un disacárido [ $\alpha\text{-D-NeupNAc}(2 \rightarrow 3)\beta\text{-D-Galp}(1 \rightarrow 3)$ ] unido a GlcNAc en el núcleo, pero el enlace es  $1 \rightarrow 4$  (Ia) o  $1 \rightarrow 3$  (Ib).

- 10 La enfermedad relacionada con GBS surge principalmente de los serotipos Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII y VIII, estando más de 85% causada por cinco serotipos: Ia, Ib, III y V. La invención preferiblemente utiliza un sacárido de tres o más de estos cuatro serotipos, particularmente de serotipos: Ia, Ib y III. Como se muestra en la Figura 2, los sacáridos capsulares de cada uno de estos cuatro serotipos incluyen: (a) un resto de ácido acetil-neuramínico (NeuNAc) terminal (comúnmente denominado ácido siálico), que en todos los casos se une  $2 \rightarrow 3$  a un resto de galactosa; y (b) un resto de *N*-acetil-glucosamina (GlcNAc) dentro del núcleo trisacárido.

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

- Los sacáridos utilizados de acuerdo con la invención pueden estar en su forma nativa, o pueden haber sido modificados. Por ejemplo, el sacárido puede ser más corto que el sacárido capsular nativo, o puede modificarse químicamente. En particular, el sacárido capsular de serotipo V utilizado en la invención se puede modificar como se describe en las ref. 13 y 14. Por ejemplo, está específicamente previsto un sacárido capsular de serotipo V que ha sido sustancialmente desialilado (Figura 3) como se describe en las ref. 13 y 14 para su uso en la presente invención. El sacárido capsular de serotipo V de GBS desialilado se puede preparar tratando el sacárido capsular de serotipo V de GBS purificado en condiciones ligeramente ácidas (p.ej., ácido sulfúrico 0,1 M a 80°C durante 60 minutos) o mediante tratamiento con neuraminidasa, como se describe en la referencia 13. Un método preferido para preparar el sacárido capsular de serotipo V de GBS desialilado, es mediante tratamiento del sacárido purificado con ácido acético 1 M a 81°C +/- 3°C durante 2 h. De este modo, el sacárido utilizado de acuerdo con la invención puede ser un polisacárido capsular sustancialmente completo, como se encuentra en la naturaleza, o puede tener una longitud menor que la natural. Los polisacáridos completos se pueden despolimerizar para proporcionar fragmentos más cortos para su uso en la invención p.ej. mediante hidrólisis en ácido débil, mediante calentamiento, mediante cromatografía de exclusión por tamaño, etc. Se ha informado de que la longitud de la cadena afecta a la inmunogenicidad de los sacáridos de GBS en conejos [4]. En particular, los sacáridos capsulares de serotipo II y/o III utilizados en la invención se pueden despolimerizar como se describe en las ref. 15 y 16. Estos documentos describen la despolimerización parcial de sacáridos capsulares de tipo II y tipo III mediante escisión desaminativa suave a fragmentos antigénicos con restos de 2,5-anhidro-D-manosa reductores terminales. Brevemente, el sacárido capsular se disuelve en NaOH 0,5 N y se calienta a 70°C durante aproximadamente 1-4 h. La duración de esta incubación controla el grado de despolimerización, que puede determinarse por métodos convencionales (p.ej., por HPLC como se describe en la referencia 15). La muestra se enfría en un baño de agua helada antes de añadir ácido acético glacial para llevar el pH a 4. El producto parcialmente desacetilado en N se desamina mediante la adición de NaNO<sub>2</sub> al 5% (p/v) con agitación a 4°C durante 2 h. Los aldehídos libres de los restos de 2,5-anhidro-D-manosa recién formados se pueden utilizar para la conjugación con una proteína portadora, como se describe a continuación.

- Se ha informado sobre la despolimerización del sacárido capsular de serotipo III por endo- $\beta$ -galactosidasa [ref. 1 y 4-6], incluyendo el uso del material despolimerizado para formar productos conjugados con un portador de toxoide tetánico. La ozonólisis de los polisacáridos capsulares de los serotipos III y VIII de GBS también se ha utilizado para la despolimerización [17]. Se prefiere utilizar sacáridos con PM > 30 kDa, y se pueden utilizar polisacáridos capsulares sustancialmente completos. Para el serotipo Ia, se prefiere utilizar polisacáridos con un PM en el intervalo de 150-300 kDa, particularmente 175-275 kDa. Típicamente, se utiliza un sacárido de serotipo Ia con un PM de aproximadamente 200 kDa o aproximadamente 260 kDa. Para el serotipo Ib, se prefiere utilizar polisacáridos con un PM en el intervalo de 150-300 kDa, particularmente 175-250 kDa. Típicamente, se utiliza un sacárido de serotipo Ib con un PM de aproximadamente 200 kDa o aproximadamente 230 kDa. Para el serotipo III, se prefiere utilizar polisacáridos con un PM en el intervalo de 50-200 kDa, particularmente 80-150 kDa. Típicamente, se utiliza un sacárido de serotipo III con un PM de aproximadamente 100 kDa o aproximadamente 140 kDa. Para el serotipo V, también se prefiere utilizar polisacáridos con un PM de hasta ~50 kDa. Típicamente, se utiliza un sacárido de serotipo V con un PM de aproximadamente 100 kDa. Estas masas moleculares se pueden medir mediante filtración en gel con respecto a patrones de dextrano, tales como los disponibles de Polymer Standard Service [18].

- 55 El sacárido se puede modificar químicamente con respecto al sacárido capsular tal como se encuentra en la naturaleza. Por ejemplo, el sacárido puede ser des-O-acetilado (parcial o totalmente), des-N-acetilado (parcial o totalmente), N-propionado (parcial o totalmente), etc. La desacetilación puede ocurrir antes, durante o después de la conjugación, pero preferiblemente se produce antes de la conjugación. Dependiendo del sacárido particular, la desacetilación puede afectar o no la inmunogenicidad. La relevancia de la O-acetilación en sacáridos de GBS en

diversos serotipos se comenta en la referencia 19, y en algunas realizaciones la O-acetilación de restos de ácido siálico en las posiciones 7, 8 y/o 9 se conserva antes, durante y después de la conjugación p.ej. mediante protección/desprotección, mediante re-acetilación, etc. Sin embargo, típicamente el sacárido de GBS utilizado en la presente invención no tiene sustancialmente O-acetilación de restos de ácido siálico en las posiciones 7, 8 y/o 9. En particular, cuando el sacárido de GBS se ha purificado por extracción con álcali como se describe a continuación, la O-acetilación típicamente se pierde (ref. 19). El efecto de la desacetilación etc. puede evaluarse mediante ensayos de rutina.

Los sacáridos capsulares se pueden purificar mediante técnicas conocidas, como se describe en las referencias de la presente memoria, tales como las ref. 2 y 20. Un procedimiento típico implica extracción con álcali, centrifugación, filtración, tratamiento con ARNasa/ADNasa, tratamiento con proteasa, concentración, cromatografía de exclusión por tamaño, ultrafiltración, cromatografía de intercambio aniónico y ultrafiltración adicional. El tratamiento de células de GBS con la enzima mutanolisina, que escinde la pared celular bacteriana para liberar los componentes de la pared celular, también es útil.

Como alternativa, se puede utilizar el procedimiento de purificación descrito en la referencia 21. Esto implica extracción con álcali, tratamiento con etanol/CaCl<sub>2</sub>, precipitación con CTAB y re-solubilización. Un procedimiento alternativo adicional se describe en la referencia 22.

La invención no está limitada a sacáridos purificados de fuentes naturales, sin embargo, y los sacáridos se pueden obtener por otros métodos, tales como síntesis total o parcial.

### Conjugación

La invención implica productos conjugados que son sacáridos capsulares de los serotipos Ia, Ib, III y opcionalmente V de GBS conjugados con una proteína portadora. En general, la conjugación covalente de sacáridos con los portadores potencia la inmunogenicidad de los sacáridos a medida que los convierte de antígenos independientes de células T a antígenos dependientes de células T, permitiendo así el cebado de la memoria inmunológica. La conjugación es particularmente útil para vacunas pediátricas [p.ej. ref. 23] y es una técnica bien conocida [p.ej. revisado en las ref. 24 a 32]. Por lo tanto, los procedimientos de la invención pueden incluir la etapa adicional de conjugar el sacárido purificado con una molécula portadora.

La conjugación de los sacáridos de GBS ha sido ampliamente referida p.ej. véanse las referencias 1 a 9. El procedimiento típico de la técnica anterior para la conjugación de sacáridos de GBS implica típicamente la aminación reductiva de un sacárido purificado a una proteína portadora tal como toxoide tetánico (TT) o CRM197 [2]. La aminación reductiva implica un grupo amino en la cadena lateral de un aminoácido en el portador y un grupo aldehído en el sacárido. Puesto que los sacáridos capsulares de GBS no incluyen un grupo aldehído en su forma natural, éste se genera típicamente antes de la conjugación por oxidación (p.ej., oxidación con peryodato) de una porción (p.ej. entre 5 y 40%, particularmente entre 10 y 30%, preferiblemente aproximadamente 20%) de los restos de ácido siálico del sacárido [2,33]. Las vacunas de producto conjugado preparadas de esta manera han demostrado ser seguras e inmunogénicas en seres humanos para cada uno de los serotipos Ia, Ib, II, III y V de GBS [10]. Típicamente, todos los productos conjugados en las composiciones inmunogénicas de la presente invención se han preparado de esta manera. Sin embargo, cuando la invención utiliza un sacárido capsular de serotipo V que está desialilado, se puede generar un grupo aldehído en este sacárido antes de la conjugación por oxidación (p.ej. oxidación con peryodato) de una porción (p.ej. entre 5 y 40%, particularmente entre 10 y 30%, preferiblemente aproximadamente 20%) de los restos de galactosa del sacárido [14]. Un procedimiento de conjugación alternativo implica el uso de grupos -NH<sub>2</sub> en el sacárido (ya sea a partir de des-N-acetilación, o después de la introducción de aminas) junto con conectores bifuncionales, como se describe en la ref. 34. En algunas realizaciones, uno o más de los productos conjugados en las composiciones inmunogénicas de la presente invención se han preparado de esta manera. Un procedimiento alternativo adicional se describe en las ref. 15 y 16. En este procedimiento, los grupos aldehído libres de los restos de 2,5-anhidro-D-manosa terminales de la despolimerización de sacáridos capsulares de tipo II o tipo III por escisión desaminativa suave se utilizan para la conjugación por aminación reductiva. En algunas realizaciones, uno o más de los productos conjugados en las composiciones inmunogénicas de la presente invención se han preparado de esta manera.

La invención implica el uso de moléculas portadoras, que son toxoide diftérico o CRM197. También se describen proteínas portadoras que incluyen otras toxinas bacterianas o toxoides, tales como toxoide tetánico. También se describen fragmentos de toxinas o toxoides p.ej. fragmento C de toxoide tetánico [35]. El mutante CRM197 de la toxina diftérica [36-38] es particularmente útil en la invención. También se describen en la presente memoria proteínas portadoras, incluyendo la proteína de la membrana externa de *N. meningitidis* [39], péptidos sintéticos [40, 41], proteínas de choque térmico [42,43], proteínas de la tos ferina [44,45], citoquinas [46], linfoquinas [46], hormonas [46], factores de crecimiento [46], albúmina de suero humano (preferiblemente recombinante), proteínas artificiales que comprenden epítomos múltiple de células T CD4<sup>+</sup> humanas de diversos antígenos derivados de patógenos [47] tales como N19 [48], proteína D de *H. influenzae* [49, 50], proteína de superficie neumocócica PspA [51], neumolisina [52], proteínas de captación de hierro [53], toxina A o B de *C. difficile* [54], exoproteína A de *Pseudomonas aeruginosa* recombinante (rEPA) [55], una proteína GBS (véase a continuación, particularmente GBS67) [204], etc.

El anclaje al portador es preferiblemente a través de un grupo  $-NH_2$  p.ej. en la cadena lateral de un resto de lisina en una proteína portadora, o de un resto de arginina, o en el extremo N-terminal. El anclaje también puede ser a través de un grupo  $-SH$  p.ej. en la cadena lateral de un resto de cisteína.

5 Es posible utilizar más de una proteína portadora p.ej. para reducir el riesgo de supresión del portador. Por lo tanto, en la presente memoria se describe el uso de diferentes proteínas portadoras para diferentes serotipos de GBS p.ej. se podrían conjugar sacáridos del serotipo Ia con CRM197, mientras que los sacáridos del serotipo Ib se podrían conjugar con el toxoide tetánico. También es posible utilizar más de una proteína portadora para un antígeno sacárido concreto p.ej. los sacáridos del serotipo III podrían estar en dos grupos, algunos conjugados con CRM197 y otros conjugados con el toxoide tetánico. En general, sin embargo, se prefiere utilizar la misma proteína portadora para todos los sacáridos.

10 Una sola proteína portadora podría portar más de un antígeno sacárido [56, 57]. Por ejemplo, una sola proteína portadora podría tener conjugados sacáridos de los serotipos Ia y Ib. Para lograr este objetivo, se pueden mezclar diferentes sacáridos antes de la reacción de conjugación. En general, sin embargo, se prefiere tener productos conjugados separados para cada serogrupo, mezclándose los diferentes sacáridos después de la conjugación. Los productos conjugados separados pueden basarse en el mismo portador.

15 Se utilizan típicamente productos conjugados con una razón de sacárido:proteína (p/p) de entre 1:5 (es decir exceso de proteína) y 5:1 (es decir exceso de sacárido), en particular razones entre 1:5 y 2:1. Cuando la invención utiliza un producto conjugado que es un sacárido capsular de serotipo Ia de GBS conjugado con una proteína portadora, la razón de sacárido:proteína (p/p) está típicamente entre aproximadamente 1:1 y 1:2, particularmente aproximadamente 1:1,3. De forma similar, cuando la invención utiliza un producto conjugado que es un sacárido capsular de serotipo Ib de GBS conjugado con una proteína portadora, la razón está típicamente entre aproximadamente 1:1 y 1:2, particularmente aproximadamente 1:1,3. Cuando la invención utiliza un producto conjugado que es un sacárido capsular de serotipo III de GBS conjugado con una proteína portadora, la razón de sacárido:proteína (p/p) está típicamente entre aproximadamente 3:1 y 1:1, particularmente aproximadamente 2:1. Sin embargo, también se puede utilizar un serotipo III de GBS conjugado con una proteína portadora con una razón de sacárido:proteína (p/p) de aproximadamente 1:1 a 1:5, particularmente aproximadamente 1:3,3. Finalmente, cuando la invención utiliza un producto conjugado que es un sacárido capsular de serotipo V de GBS conjugado con una proteína portadora, la razón está típicamente entre aproximadamente 2:1 1: 1, particularmente aproximadamente 1,1: 1. Por lo tanto, es típico un exceso en peso de sacárido, particularmente con cadenas de sacáridos más largas.

20 Las composiciones pueden incluir una pequeña cantidad de portador libre [58]. Cuando una proteína portadora dada está presente tanto en forma libre como conjugada en una composición de la invención, la forma no conjugada es preferiblemente no más de 5% de la cantidad total de la proteína portadora en la composición en su totalidad, y más preferiblemente presente en menos de 2% en peso.

25 Después de la conjugación, se pueden separar los sacáridos libres y conjugados. Existen muchos métodos adecuados, que incluyen cromatografía hidrófoba, ultrafiltración tangencial, diafiltración etc. [véanse también las ref. 59 y 60, etc.]. Un método preferido se describe en la referencia 61.

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

#### 40 **Combinaciones de productos conjugados y otros antígenos**

Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden comprender uno o más antígenos adicionales.

45 El antígeno o los antígenos adicionales pueden comprender adicionalmente productos conjugados de GBS. Los diferentes productos conjugados de GBS pueden incluir diferentes tipos de productos conjugados del mismo serotipo de GBS y/o productos conjugados de diferentes serotipos de GBS. La composición típicamente se producirá preparando productos conjugados separados (p.ej. un producto conjugado diferente para cada serotipo) y a continuación combinando los productos conjugados.

El antígeno o los antígenos adicionales pueden comprender secuencias de aminoácidos de GBS, como se expone a continuación.

50 El antígeno o los antígenos adicionales pueden comprender antígenos de patógenos distintos de GBS. Por lo tanto, las composiciones de la invención pueden comprender adicionalmente uno o más antígenos distintos de GBS, incluyendo antígenos bacterianos, virales o parasitarios adicionales. Estos se pueden seleccionar entre los siguientes:

- un antígeno proteico del serogrupo B de *N. meningitidis*, tal como los de las ref. 62 a 68, siendo especialmente preferida la proteína "287" (véase a continuación) y derivados (p.ej., "ΔG287").
- 55 • una preparación de vesícula de membrana externa (OMV) del serogrupo B de *N. meningitidis*, tal como las

descritas en las ref. 69, 70, 71, 72 etc.

- un antígeno sacárido del serogrupo A, C, W135 y/o Y de *N. meningitidis*, tal como el oligosacárido descrito en la ref. 73 del serogrupo C o los oligosacáridos de la ref. 74.
- un antígeno sacárido de *Streptococcus pneumoniae* [p.ej. ref. 75-77; capítulos 22 y 23 de la ref. 84].
- 5 • un antígeno del virus de la hepatitis A, tal como virus inactivado [p.ej. 78, 79; capítulo 15 de la ref. 84].
- un antígeno del virus de la hepatitis B, tal como los antígenos de superficie y/o núcleo [p.ej. 79, 80; capítulo 16 de la ref. 84].
- un antígeno del virus de la hepatitis C [p.ej. 81].
- 10 • un antígeno de *Bordetella pertussis*, tal como la holotoxina pertussis (PT) y la hemaglutinina filamentosa (FHA) de *B. pertussis*, opcionalmente también combinado con pertactina y/o aglutinógenos 2 y 3 [p.ej. ref. 82 y 83; capítulo 21 de la ref. 84].
- un antígeno diftérico, tal como un toxoide diftérico [p.ej. capítulo 13 de la ref. 84].
- un antígeno tetánico, tal como un toxoide tetánico [p.ej. capítulo 27 de la ref. 84].
- un antígeno sacárido de *Haemophilus influenzae* B [p.ej. capítulo 14 de la ref. 84]
- 15 • un antígeno de *N. gonorrhoeae* [p.ej. 62, 63, 64].
- un antígeno de *Chlamydia pneumoniae* [p.ej. 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91].
- un antígeno de *Chlamydia trachomatis* [p.ej. 92].
- un antígeno de *Porphyromonas gingivalis* [p.ej. 93].
- antígeno o antígenos de polio [p.ej. 94, 95; capítulo 24 de la ref. 84] tal como IPV.
- 20 • antígeno o antígenos de la rabia [p.ej. 96] tal como el virus inactivado liofilizado [p.ej. 97, RabAvert™].
- antígenos de sarampión, parotiditis y/o rubéola [p.ej. capítulos 19, 20 y 26 de la ref. 84].
- antígeno o antígenos de la influenza [p.ej. capítulos 17 y 18 de la ref. 84], tales como las proteínas de superficie de hemaglutinina y/o neuraminidasa.
- un antígeno de *Moraxella catarrhalis* [p.ej. 98].
- 25 • un antígeno de *Streptococcus pyogenes* (estreptococo del grupo A) [p.ej. 99, 100, 101].
- un antígeno de *Staphylococcus aureus* [p.ej. 102].

Cuando se utiliza un antígeno sacárido o carbohidratado, preferiblemente se conjuga con un portador con el fin de potenciar la inmunogenicidad. La conjugación de antígenos sacáridos de *H. influenzae* B, meningocócicos y neumocócicos es bien conocida.

- 30 Los antígenos proteicos tóxicos pueden destoxificarse cuando sea necesario (p.ej. destoxicación de la toxina pertussis por medios químicos y/o genéticos [83]).

35 Cuando se incluye un antígeno diftérico en la composición, también se prefiere incluir antígenos tetánicos y antígenos de la tos ferina. De forma similar, cuando se incluye un antígeno tetánico, también se prefiere incluir antígenos de difteria y tos ferina. De forma similar, cuando se incluye un antígeno de tos ferina, también se prefiere incluir antígenos de difteria y tétanos.

40 Un tipo de composición preferida incluye antígenos adicionales de patógenos de transmisión sexual, tales como: herpesvirus; *N. gonorrhoeae*; *C. trachomatis*; etc. Otro tipo de composición preferida incluye antígenos adicionales que afectan a ancianos y/o individuos inmunocomprometidos, por lo que los antígenos de GBS de la invención se pueden combinar con uno o más antígenos de los siguientes patógenos sin GBS: virus de influenza, *Euterooccus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Neisseria meningitidis*, y virus de parainfluenza.

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

Como alternativa al uso de antígenos proteicos en la composición de la invención, se puede utilizar ácido nucleico que codifica el antígeno [p.ej. ref. 103 a 111]. Los componentes proteicos de las composiciones de la invención pueden ser reemplazados por ácido nucleico (preferiblemente ADN p.ej. en forma de un plásmido) que codifica la proteína.

- 5 En términos prácticos, puede haber un límite superior para la cantidad de antígenos incluidos en las composiciones de la invención. El número de antígenos (incluyendo los antígenos de GBS) en una composición de la invención puede ser inferior a 20, inferior a 19, inferior a 18, inferior a 17, inferior a 16, inferior a 15, inferior a 14, inferior a 13, inferior a 12, inferior a 11, inferior a 10, inferior a 9, inferior a 8, inferior a 7, inferior a 6, inferior a 5, inferior a 4, inferior a 3 o inferior a 2. El número de antígenos de GBS en una composición de la invención puede ser inferior a 6, inferior a 5, inferior a 4, inferior a 3 o inferior a 2.

### **Métodos y usos farmacéuticos**

Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden comprender adicionalmente un portador farmacéuticamente aceptable. Los "portadores farmacéuticamente aceptables" típicos incluyen cualquier portador que no induzca por sí mismo la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición.

15 Los portadores adecuados son típicamente macromoléculas grandes, lentamente metabolizadas tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, sacarosa [112], trehalosa [113], lactosa y agregados lipídicos (tales como gotitas de aceite o liposomas). Tales portadores son bien conocidos por los expertos en la técnica. Las vacunas también pueden contener diluyentes, tales como agua, solución salina, glicerol, etc. Adicionalmente, pueden estar presentes

20 sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponadoras de pH y similares. La solución salina fisiológica estéril libre de pirógenos y tamponada con fosfato es un portador típico. Una discusión detallada de los excipientes farmacéuticamente aceptables está disponible en la referencia 114.

Las composiciones de la invención pueden estar en forma acuosa (es decir soluciones o suspensiones) o en forma seca (p.ej. liofilizado). Si se utiliza una vacuna seca, se reconstituirá en un medio líquido antes de la inyección. La liofilización de vacunas de producto conjugado es conocida en la técnica p.ej. el producto Menjugate™ se presenta

25 en forma liofilizada. Cuando las composiciones inmunogénicas de la invención incluyen productos conjugados que comprenden sacáridos capsulares de más de un serotipo de GBS, es típico que los productos conjugados se preparen por separado, se mezclen y a continuación se liofilicen. De esta manera, se pueden preparar composiciones liofilizadas que comprenden dos, tres o cuatro etc. productos conjugados como se describe en la presente memoria. Para estabilizar los productos conjugados durante la liofilización, se puede preferir incluir un alcohol de azúcar (p.ej. manitol) y/o un disacárido (p.ej. sacarosa o trehalosa) p.ej. entre 1 mg/ml y 30 mg/ml (p.ej. aproximadamente 25 mg/ml) en la composición. El uso de sacarosa se ha recomendado como un estabilizador para vacunas de producto conjugado de GBS (ref. 115). Sin embargo, es típico que el estabilizador de la presente invención sea manitol. Cuando la vacuna seca se reconstituye en un medio líquido antes de la inyección, la

35 concentración de manitol residual generalmente será de aproximadamente 2-20 mg/ml, p.ej. 3,75 mg/ml, 7,5 mg/ml o 15 mg/ml. El uso de manitol es ventajoso porque el manitol es químicamente distinto de las subunidades de monosacáridos de los sacáridos capsulares de GBS. Esto significa que la detección de los sacáridos capsulares, p.ej. para el análisis de control de calidad, puede basarse en la presencia de las subunidades de sacáridos sin interferencia del manitol. Por el contrario, un estabilizador como sacarosa contiene glucosa, que puede interferir en

40 la detección de subunidades de glucosa en los sacáridos.

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

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

Las composiciones de la invención se pueden envasar en forma de dosis unitaria o en forma de dosis múltiple. Para formas de dosis múltiples, se prefieren los viales a las jeringas precargadas. Se pueden establecer rutinariamente volúmenes de dosificación eficaces, pero una dosis humana típica de la composición tiene un volumen de 0,5 ml. p.ej. para inyección intramuscular.

El pH de la composición está preferiblemente entre 6 y 8, preferiblemente aproximadamente 7. El pH estable puede mantenerse mediante el uso de un tampón. Las composiciones inmunogénicas de la invención comprenden típicamente un tampón de dihidrógenofosfato de potasio. El tampón de dihidrógenofosfato de potasio puede comprender dihidrógenofosfato de potasio aproximadamente 1-10 mM, p.ej. 1,25 mM, 2,5 mM o 5,0 mM. La composición puede ser estéril y/o libre de pirógenos. Las composiciones de la invención pueden ser isotónicas con respecto a los seres humanos.

Las composiciones de la invención son inmunogénicas, y más preferiblemente son composiciones de vacunas. Las

vacunas de acuerdo con la invención pueden ser profilácticas (es decir para prevenir la infección) o terapéuticas (es decir para tratar la infección), pero típicamente serán profilácticas. Las composiciones inmunogénicas utilizadas como vacunas comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de uno o varios antígenos, así como cualquier otro componente, según sea necesario. Por "cantidad inmunológicamente eficaz", se entiende que la administración de esa cantidad a un individuo, ya sea en una sola dosis o como parte de una serie, es eficaz para el tratamiento o la prevención. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y las condiciones físicas del individuo que se vaya a tratar, la edad, el grupo taxonómico del individuo que se vaya a tratar (p.ej. primate no humano, primate etc.), la capacidad del sistema inmunitario del individuo para sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseado, la formulación de la vacuna, la evaluación por parte del médico a cargo de la situación médica y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad se encuentre en un intervalo relativamente amplio que se puede determinar a través de ensayos de rutina.

Dentro de cada dosis, la cantidad de un antígeno sacárido individual generalmente estará entre 0,1-50  $\mu\text{g}$  (medida como masa de sacárido), particularmente entre 1-50  $\mu\text{g}$  o 0,5-25  $\mu\text{g}$ , más concretamente 2,5-7,5  $\mu\text{g}$ , p.ej. aproximadamente 1  $\mu\text{g}$ , aproximadamente 2,5  $\mu\text{g}$ , aproximadamente 5  $\mu\text{g}$ , aproximadamente 10  $\mu\text{g}$ , aproximadamente 15  $\mu\text{g}$ , aproximadamente 20  $\mu\text{g}$  o aproximadamente 25  $\mu\text{g}$ . Dentro de cada dosis, la cantidad total de sacáridos capsulares de GBS generalmente será  $\leq 70 \mu\text{g}$  (medida como masa de sacárido), p.ej.  $\leq 60 \mu\text{g}$ . En particular, la cantidad total puede ser  $\leq 40 \mu\text{g}$  (p.ej.  $\leq 30 \mu\text{g}$ ) o  $\leq 20 \mu\text{g}$  (p.ej.  $\leq 15 \mu\text{g}$ ). Los autores de la presente invención han descubierto que estas cantidades totales son eficaces, particularmente cuando la composición inmunogénica comprende: a) un producto conjugado que es un sacárido capsular de serotipo Ia de GBS conjugado con una proteína portadora; b) un producto conjugado que es un sacárido capsular de serotipo Ib de GBS conjugado con una proteína portadora; y c) un producto conjugado que es un sacárido capsular de serotipo III de GBS conjugado con una proteína portadora. Por lo tanto, estas cantidades totales son preferidas para su uso en la invención, particularmente para esta realización. Puede ser ventajoso minimizar la cantidad total de sacárido o sacáridos capsulares por dosis unitaria para reducir la toxicidad potencial. Por consiguiente, se prefiere una cantidad total de  $\leq 20 \mu\text{g}$ , p.ej.  $\leq 15 \mu\text{g}$ ,  $\leq 7,5 \mu\text{g}$  o  $\leq 1,5 \mu\text{g}$ .

El GBS afecta a diversas zonas del cuerpo y, por lo tanto, las composiciones de la invención se pueden preparar de diversas formas. Por ejemplo, las composiciones se pueden preparar como inyectables, como soluciones líquidas o suspensiones. La composición se puede preparar para administración pulmonar p.ej. como inhalador, utilizando un polvo fino o un aerosol. La composición se puede preparar como un supositorio o pesario. La composición se puede preparar para administración nasal, aural u ocular p.ej. como aerosoles, gotas, gel o polvo [p.ej. ref. 116 y 117]. Se ha informado sobre el éxito de la administración nasal de sacáridos neumocócicos [118, 119], sacáridos Hib [120], sacáridos MenC [121] y mezclas de productos conjugados de sacáridos Hib y MenC [122].

Las composiciones de la invención pueden incluir un antimicrobiano, particularmente cuando se envasan en formato de dosis múltiples.

Las composiciones de la invención pueden comprender detergente p.ej. Tween (polisorbato), tal como Tween 80. Los detergentes generalmente están presentes a niveles bajos p.ej.  $<0,01\%$ .

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

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

Las composiciones de la invención se pueden administrar junto con otros agentes inmunorreguladores. Las composiciones pueden incluir uno o más coadyuvantes, pero no contienen un coadyuvante de sal de aluminio. Tales coadyuvantes incluyen, pero no están limitados a:

#### **A. Composiciones que contienen minerales**

Las composiciones que contienen minerales adecuadas para su uso como coadyuvantes en la invención incluyen sales minerales, tales como sales de calcio (o mezclas de las mismas). Las sales de calcio incluyen fosfato de calcio (p.ej. partículas "CAP" descritas en la ref. 123). Se prefiere la adsorción a estas sales. Las composiciones que contienen minerales también se pueden formular como una partícula de sal metálica [124].

#### **B. Emulsiones oleosas**

Las composiciones de emulsiones oleosas adecuadas para su uso como coadyuvantes en la invención incluyen emulsiones de escualeno-agua, tales como MF59 (5% de escualeno, 0,5% de Tween 80 y 0,5% de Span 85, formulados en partículas submicrométricas utilizando un microfluidificador) [véanse también las ref. 125-127]. MF59 se utiliza como coadyuvante en la vacuna de subunidad trivalente del virus de influenza FLUAD™.

Los coadyuvantes particularmente preferidos para su uso en las composiciones son emulsiones submicrométricas de aceite en agua. Las emulsiones de aceite en agua submicrométricas preferidas para su uso en la presente invención son emulsiones de escualeno/agua que opcionalmente contienen cantidades variables de MTP-PE, tales

como una emulsión submicrométrica de aceite en agua que contiene 4-5% p/v de escualeno, 0,25-1,0% p/v Tween 80 (monooleato de polioxietilensorbitán), y/o 0,25-1,0% de Span 85 (trioleato de sorbitán), y, opcionalmente, N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxisforiloxi)-etilamina (MTP-PE). Las emulsiones submicrométricas de aceite en agua, los métodos para fabricar las mismas y los agentes inmunoestimuladores, tales como los muramipéptidos, para su uso en las composiciones, se describen en detalle en las referencias 125 y 128-129. También se pueden utilizar el coadyuvante completo de Freund (CFA) y el coadyuvante incompleto de Freund (IFA) como coadyuvantes en la invención.

### C. Formulaciones de saponina

También se pueden utilizar formulaciones de saponina como coadyuvantes en la invención. Las saponinas son un grupo heterólogo de glucósidos de esterol y glucósidos triterpenoides que se encuentran en la corteza, hojas, tallos, raíces e incluso flores de una amplia gama de especies de plantas. Las saponinas aisladas de la corteza del árbol *Quillaia saponaria* Molina han sido ampliamente estudiadas como coadyuvantes. La saponina también puede obtenerse comercialmente de *Smilax ornata* (zarparrilla), *Gypsophilla paniculata* (velo de novia), y *Saponaria officinalis* (hierba jabonera). Las formulaciones de coadyuvantes de saponina incluyen formulaciones purificadas, tales como QS21, así como formulaciones de lípidos, tales como ISCOM.

Las composiciones de saponina se han purificado utilizando HPLC y RP-HPLC. Se han identificado fracciones específicas purificadas utilizando estas técnicas, incluyendo QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B y QH-C. Preferiblemente, la saponina es QS21. Un método de producción de QS21 se describe en la ref. 130. Las formulaciones de saponina también pueden comprender un esterol, tal como el colesterol [131].

Las combinaciones de saponinas y colesterol se pueden utilizar para formar partículas únicas llamadas complejos inmunoestimuladores (ISCOM). Los ISCOM típicamente también incluyen un fosfolípido tal como fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina. Cualquier saponina conocida puede utilizarse en los ISCOM. Preferiblemente, el ISCOM incluye uno o más de QuilA, QHA y QHC. Los ISCOM se describen con más detalle en las referencias. 131-133. Opcionalmente, los ISCOM pueden estar desprovistos de detergentes adicionales [134].

Se puede encontrar una revisión del desarrollo de coadyuvantes basados en saponina en las ref. 135 y 136.

### D. Virosoomas y partículas de tipo virus

Los virosoomas y las partículas de tipo virus (VLP) también se pueden utilizar como coadyuvantes en la invención. Estas estructuras generalmente contienen una o más proteínas de un virus opcionalmente combinadas o formuladas con un fosfolípido. Generalmente no son patógenos, no se replican y generalmente no contienen el genoma viral nativo. Las proteínas virales pueden producirse de forma recombinante o aislarse de virus completos. Estas proteínas víricas adecuadas para su uso en virosoomas o VLP incluyen proteínas derivadas del virus de la influenza (tales como HA o NA), virus de la hepatitis B (tales como proteínas núcleo o de la cápsida), virus de la hepatitis E, virus del sarampión, virus Sindbis, rotavirus, virus de la enfermedad del pie y la boca, retrovirus, virus de tipo Norwalk, virus del papiloma humano, VIH, fagos de ARN, fagos Q $\beta$  (tales como proteínas de la envoltura), fagos GA, fagos fr, fago AP205 y Ty (tal como la proteína p1 del retrotransposón Ty). Las VLP se comentan adicionalmente en las ref. 137-142. Los virosoomas se comentan adicionalmente, por ejemplo, en la ref. 143.

### E. Derivados bacterianos o microbianos

Los coadyuvantes adecuados para su uso en la invención incluyen derivados bacterianos o microbianos tales como derivados no tóxicos de lipopolisacáridos (LPS) enterobacterianos, derivados de lípido A, oligonucleótidos inmunoestimuladores y toxinas ribosilantes de ADP y derivados destoxificados de los mismos.

Los derivados no tóxicos de LPS incluyen monofosforil lípido A (MPL) y MPL 3 des-O-acilado (3dMPL). 3dMPL es una mezcla de 3 monofosforil lípido A des-O-acilados con 4, 5 o 6 cadenas aciladas. Una forma preferida de "partícula pequeña" de monofosforil lípido 3 Des-O-acilado se describe en la ref. 144. Tales "partículas pequeñas" de 3dMPL son lo suficientemente pequeñas como para ser filtradas de manera estéril a través de una membrana de 0,22  $\mu$ m [144]. Otros derivados de LPS no tóxicos incluyen miméticos de monofosforil lípido A, tales como derivados de aminoalquil glucosaminida fosfato p.ej. RC-529 [145,146].

Los derivados de lípido A incluyen derivados de lípido A de *Escherichia coli* tales como OM-174. OM-174 se describe, por ejemplo, en las ref. 147 y 148.

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

Los CpG pueden incluir modificaciones/análogos de nucleótidos tales como modificaciones fosforotioato y pueden ser de doble hebra o de hebra sencilla. Las referencias 149, 150 y 151 revelan posibles sustituciones análogas p.ej. reemplazo de guanosina por 2'-desoxi-7-desazaguanosina. El efecto coadyuvante de los oligonucleótidos CpG se

analiza adicionalmente en las ref. 152-157.

La secuencia de CpG puede dirigirse a TLR9, tal como el motivo GTCGTT o TTCGTT [158]. La secuencia CpG puede ser específica para inducir una respuesta inmunitaria Th1, tal como un ODN CpG-A, o puede ser más específica para inducir una respuesta de células B, tal como un ODN CpG-B. Los ODN CpG-A y CpG-B se comentan en las ref. 159-161. Preferiblemente, el CpG es un ODN CpG-A.

Preferiblemente, el oligonucleótido CpG está construido de modo que el extremo 5' sea accesible para el reconocimiento del receptor. Opcionalmente, se pueden unir dos secuencias de oligonucleótidos CpG en sus extremos 3' para formar "inmunómeros". Véanse, por ejemplo, las ref. 158 y 162-164.

Las toxinas ribosilantes de ADP bacterianas y los derivados destoxificados de las mismas se pueden utilizar como coadyuvantes en la invención. Preferiblemente, la proteína deriva de *E. coli* (enterotoxina de *E. coli* lábil al calor "LT"), cólera ("CT") o pertussis ("PT"). El uso de toxinas ribosilantes de ADP destoxificadas como coadyuvantes de la mucosa se describe en la ref. 165 y como coadyuvantes parenterales en la ref. 166. La toxina o toxoide está preferiblemente en forma de una holotoxina, que comprende ambas subunidades A y B. Preferiblemente, la subunidad A contiene una mutación destoxificante; preferiblemente la subunidad B no está mutada. Preferiblemente, el coadyuvante es un mutante LT destoxificado tal como LT-K63, LT-R72 y LT-G192. El uso de toxinas ribosilantes de ADP y sus derivados destoxificados, particularmente LT-K63 y LT-R72, como coadyuvantes se puede encontrar en las ref. 167-174. La referencia numérica para las sustituciones de aminoácidos se basa preferiblemente en los alineamientos de las subunidades A y B de las toxinas ribosilantes de ADP expuestas en la ref. 175, incorporada específicamente aquí como referencia en su totalidad.

#### **F. Inmunomoduladores humanos**

Los inmunomoduladores humanos adecuados para su uso como coadyuvantes en la invención incluyen citoquinas, tales como interleuquinas (p.ej. IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 [176], etc.) [177], interferones (p.ej. interferón- $\gamma$ ), factor estimulador de colonias de macrófagos y factor de necrosis tumoral.

#### **G. Bioadhesivos y Mucoadhesivos**

Los bioadhesivos y mucoadhesivos también se pueden utilizar como coadyuvantes en la invención. Los bioadhesivos adecuados incluyen microesferas de ácido hialurónico esterificadas [178] o mucoadhesivos tales como derivados entrecruzados de poli(ácido acrílico), poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, polisacáridos y carboximetilcelulosa. El quitosano y sus derivados también se pueden utilizar como coadyuvantes en la invención [179].

#### **H. Micropartículas**

Las micropartículas también se pueden utilizar como coadyuvantes en la invención. Se prefieren micropartículas (es decir una partícula de ~100 nm a ~150  $\mu$ m de diámetro, más preferiblemente de ~200 nm a ~30  $\mu$ m de diámetro, y lo más preferiblemente de ~500 nm a ~10  $\mu$ m de diámetro) formadas a partir de materiales que son biodegradables y no tóxicos (p.ej. un poli( $\alpha$ -hidroxiácido), un ácido polihidroxibutírico, un poliortoéster, un polianhídrido, una policaprolactona, etc.), con poli(lactida-co-glicolida), opcionalmente tratados para tener una superficie cargada negativamente (p.ej. con SDS) o una superficie cargada positivamente (p.ej. con un detergente catiónico, tal como CTAB).

#### **I. Liposomas**

Los ejemplos de formulaciones de liposomas adecuadas para su uso como coadyuvantes se describen en las ref. 180-182.

#### **J. Formulaciones de éter de polioxietileno y éster de polioxietileno**

Los coadyuvantes adecuados para su uso en la invención incluyen éteres de polioxietileno y ésteres de polioxietileno [183]. Tales formulaciones incluyen adicionalmente tensioactivos de éster de polioxietilensorbitán combinados con un octoxinol [184] así como tensioactivos alquil éteres o ésteres de polioxietileno combinados con al menos un tensioactivo no iónico adicional tal como un octoxinol [185]. Los éteres de polioxietileno preferidos se seleccionan del siguiente grupo: polioxietileno-9-lauril éter (laureth 9), polioxietileno-9-estearil éter, polioxietileno-8-estearil éter, polioxietileno-4-lauril éter, polioxietileno-35-lauril éter, y polioxietileno-23-lauril éter.

#### **K. Polifosfaceno (PCPP)**

Las formulaciones de PCPP se describen, por ejemplo, en las ref. 186 y 187.

#### **L. Muramil péptidos**

Los ejemplos de muramil péptidos adecuados para su uso como coadyuvantes en la invención incluyen N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), y N-

acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanin-2- (1'-2'-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina MTP-PE).

#### **M. Compuestos de Imidazoquinolona.**

Los ejemplos de compuestos de imidazoquinolona adecuados para utilizar coadyuvantes en la invención incluyen Imiquamod y sus homólogos (p.ej. "Resiquimod 3M"), descrito adicionalmente en las ref. 188 y 189.

#### **5 N. Compuestos de tiosemicarbazona.**

Los ejemplos de compuestos de tiosemicarbazona, así como los métodos de formulación, fabricación y escrutinio de compuestos, todos ellos adecuados para su uso como coadyuvantes en la invención, incluyen los descritos en la ref. 190. Las tiosemicarbazonas son particularmente eficaces en la estimulación de células mononucleares de sangre periférica humana para la producción de citoquinas, tales como TNF- $\alpha$ .

#### **10 O. Compuestos Triptantrina.**

Los ejemplos de compuestos de triptantrina, así como los métodos de formulación, fabricación y escrutinio de compuestos todos adecuados para su uso como coadyuvantes en la invención incluyen los descritos en la ref. 191. Los compuestos de triptantrina son particularmente eficaces en la estimulación de células mononucleares de sangre periférica humana para la producción de citoquinas, tales como TNF- $\alpha$ .

15 La invención también puede comprender combinaciones de aspectos de uno o más de los coadyuvantes identificados anteriormente. Por ejemplo, las siguientes combinaciones se pueden utilizar como composiciones coadyuvantes en la invención: (1) una saponina y una emulsión de aceite en agua [192]; (2) una saponina (p.ej. QS21) + un derivado de LPS no tóxico (p.ej. 3dMPL) [193]; (3) una saponina (p.ej. QS21) + un derivado de LPS no tóxico (p.ej. 3dMPL) + un colesterol; (4) una saponina (p.ej. QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + un esteroide) [194]; (5) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite en agua [195]; (6) SAF, que contiene 10% de escualano, 0,4% de Tween 80™, 5% de polímero de bloques plurónico L121, y thr-MDP, microfluidificado en una emulsión submicrométrica o agitado vorticialmente para generar una emulsión de mayor tamaño de partícula. (7) sistema coadyuvante Ribi™ (RAS), (Ribi Immunochem) que contiene 2% de escualano, 0,2% de Tween 80 y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo que consiste en monofosforil A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM), y esqueleto de pared celular (CWS), preferiblemente MPL + CWS (Detox™); y (8) una o más sales minerales + un derivado no tóxico de LPS (tal como 3dMPL).

25 No es necesario que todos los productos conjugados sean adsorbidos, es decir algunos o todos pueden estar libres en solución.

#### **Métodos de tratamiento**

30 La invención también proporciona composiciones inmunogénicas para su uso en un método para elevar una respuesta inmunitaria en un mamífero, que comprende administrar una composición farmacéutica de la invención al mamífero. La respuesta inmunitaria es preferiblemente protectora y preferiblemente implica anticuerpos. El método puede generar una respuesta de refuerzo.

35 El mamífero es preferiblemente un ser humano. Cuando la vacuna es para uso profiláctico, el ser humano es preferiblemente un niño (p.ej. un niño pequeño o lactante) o un adolescente; cuando la vacuna es para uso terapéutico, el ser humano es preferiblemente un adulto. También se puede administrar a adultos una vacuna para niños p.ej. para evaluar la seguridad, la dosificación, la inmunogenicidad, etc. Una clase preferida de seres humanos para el tratamiento son las mujeres en edad fértil (p.ej. adolescentes y mayores). Otra clase preferida son las mujeres embarazadas. Los pacientes de edad avanzada (p.ej. aquellos por encima de 50, 60, 70, 80 o 90 etc. años de edad, particularmente mayores de 65 años de edad), especialmente aquellos que viven en hogares de ancianos donde el riesgo de infección por GBS puede aumentar ([196]), son otra clase preferida de seres humanos para el tratamiento. En algunas realizaciones, el ser humano tiene un nivel indetectable de anticuerpos contra el sacárido capsular de serotipo Ia del GBS antes de la administración de la composición farmacéutica. En otras realizaciones, el ser humano tiene un nivel indetectable de anticuerpos contra el sacárido capsular de serotipo Ib de GBS antes de la administración de la composición farmacéutica. En otras realizaciones, el ser humano tiene un nivel indetectable de anticuerpos contra el sacárido capsular de serotipo III de GBS antes de la administración de la composición farmacéutica. En particular, el ser humano puede tener un nivel indetectable de anticuerpos contra el sacárido capsular de serotipo Ia de GBS y un nivel indetectable de anticuerpos contra el sacárido capsular de serotipo Ib de GBS antes de la administración de la composición farmacéutica. Alternativamente o además, el ser humano puede tener un nivel indetectable de anticuerpos contra el sacárido capsular de serotipo III de GBS antes de la administración de la composición farmacéutica. El nivel o los niveles de anticuerpos contra el sacárido o los sacáridos capsulares se pueden determinar utilizando el ELISA descrito en *Estudio en seres humanos (1)* más abajo. El nivel o los niveles de anticuerpos pueden ser de un mes antes de la administración, particularmente en el plazo del mes anterior a la administración (p.ej. en el plazo de dos semanas, en el plazo de una semana o el día de la administración). Las mujeres con estos niveles indetectables de anticuerpos contra el sacárido o los sacáridos capsulares pueden tener tasas más altas de infección por GBS en sus recién nacidos. Esto se debe a que los niveles más altos de anticuerpos maternos contra los sacáridos capsulares de GBS se correlacionan con un menor

riesgo de enfermedad en los recién nacidos [ref. 197 y 198]. Por consiguiente, la administración a estas mujeres está específicamente prevista en la presente invención.

5 En algunas realizaciones, el paciente ha sido preinmunizado con un toxoide diftérico o un derivado del mismo, p.ej. como se describe a continuación con respecto al segundo aspecto de la invención en la sección *El paciente preinmunizado*. En estas realizaciones, se prefiere que al menos un producto conjugado en la composición inmunogénica sea un sacárido capsular de GBS conjugado con un toxoide diftérico o un derivado del mismo. Los autores de la presente invención han descubierto que la respuesta inmunitaria al sacárido capsular puede mejorarse presentando el sacárido en un toxoide diftérico o un derivado del mismo, cuando el paciente ha sido preinmunizado con un toxoide diftérico o un derivado del mismo. El sacárido capsular conjugado con el toxoide diftérico o derivado del mismo en la composición puede ser, por ejemplo, de serotipo Ia, Ib o III de GBS. En particular, el sacárido capsular puede ser del serotipo III de GBS (como se ilustra a continuación). En estas realizaciones, es típico que todos los sacáridos capsulares de GBS en la composición se conjuguen con un toxoide diftérico o un derivado del mismo. Cuando el portador o el antígeno de preinmunización es un derivado de un toxoide diftérico, ese derivado preferiblemente permanece inmunológicamente reactivo de forma cruzada con Dt, y es preferiblemente CRM197.

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

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

20 Estos usos y métodos son preferiblemente para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad causada por *S. agalactiae*, p.ej. sepsis o bacteriemia neonatal, neumonía neonatal, meningitis neonatal, endometritis, osteomielitis, artritis séptica, etc.

25 El sujeto en el que se previene la enfermedad puede no ser el mismo que el sujeto que recibe el producto conjugado de la invención. Por ejemplo, un producto conjugado se puede administrar a una mujer (antes o durante el embarazo) para proteger a la descendencia (la llamada "inmunización materna" [199-201]).

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

30 Las composiciones preferidas de la invención pueden conferir un título de anticuerpo en un paciente que sea superior al criterio de seroprotección para cada componente antigénico para un porcentaje aceptable de sujetos humanos. Los antígenos con un título de anticuerpos asociado por encima del cual se considera que un anfitrión se seroconvierte contra el antígeno son bien conocidos, y tales títulos son publicados por organizaciones tales como la OMS. Preferiblemente, más de 80% de una muestra estadísticamente significativa de sujetos se seroconvierte, más preferiblemente más de 90%, aún más preferiblemente más de 93% y lo más preferiblemente de 96 a 100%.

35 Las composiciones de la invención generalmente se administrarán directamente a un paciente. La administración directa puede lograrse mediante inyección parenteral (p.ej. subcutáneamente, intraperitonealmente, intravenosamente, intramuscularmente, o al espacio intersticial de un tejido), o mediante administración rectal, oral, vaginal, tópica, transdérmica, intranasal, ocular, aural, pulmonar u otra mucosal. Se prefiere la administración intramuscular al muslo o la parte superior del brazo. La inyección puede ser a través de una aguja (p.ej. una aguja hipodérmica), pero alternativamente puede utilizarse una inyección sin aguja. Una dosis intramuscular típica es de 0,5 ml.

La invención se puede utilizar para provocar inmunidad sistémica y/o mucosal.

45 El tratamiento de dosificación puede ser un programa de dosis unitaria o un programa de dosis múltiple. Se pueden utilizar dosis múltiples en un cronograma de inmunización primaria y/o en un cronograma de inmunización de refuerzo. Un cronograma de dosis primaria puede estar seguido por un cronograma de dosis de refuerzo. El tiempo adecuado entre las dosis de cebado (p.ej. entre 4 y 16 semanas), y entre el cebado y el refuerzo, se puede determinar de forma rutinaria.

### **Antígenos proteicos de GBS**

50 Como se ha mencionado anteriormente, las proteínas GBS se pueden incluir en las composiciones de la invención. Estas se pueden utilizar como proteínas portadoras para productos conjugados de la invención, proteínas portadoras para otros productos conjugados o como antígenos proteicos no conjugados.

55 Los antígenos proteicos de GBS para su uso en la invención incluyen los descritos en las referencias 99 y 202-204. Dos antígenos proteicos de GBS preferidos para su uso en la invención se conocen como: GBS67; y GBS80 [véase la ref. 99]. Otro antígeno proteico de GBS adicionalmente preferido para su uso en la invención se conoce como

Spb1 [véase la ref. 205]. A continuación se proporcionan más detalles de estos tres antígenos.

Las secuencias completas para estas tres proteínas de GBS son SEQ ID NO 1 a 3 de la presente memoria. Las composiciones de la invención pueden incluir así (a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO 1 a 3, y/o (b) un polipéptido que comprende (i) una secuencia de aminoácidos que tiene identidad de secuencia con uno o más de SEQ ID NO 1 a 3 y/o (ii) un fragmento de SEQ ID NO 1 a 3.

Las composiciones de la invención también pueden comprender mezclas de estos antígenos proteicos de GBS.

En particular, las composiciones de la invención pueden incluir:

(a<sub>1</sub>) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 1, y/o (b<sub>1</sub>) un polipéptido que comprende (i) una secuencia de aminoácidos que tiene identidad de secuencia con SEQ ID NO 1 y/o (ii) un fragmento de SEQ ID NO 1; y

(a<sub>2</sub>) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 2, y/o (b<sub>2</sub>) un polipéptido que comprende (i) una secuencia de aminoácidos que tiene identidad de secuencia con SEQ ID NO 2 y/o (ii) un fragmento de SEQ ID NO 2.

De forma similar, las composiciones de la invención pueden incluir:

(a<sub>1</sub>) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 1, y/o (b<sub>1</sub>) un polipéptido que comprende (i) una secuencia de aminoácidos que tiene identidad de secuencia con SEQ ID NO 1 y/o (ii) un fragmento de SEQ ID NO 1; y

(a<sub>2</sub>) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 3, y/o (b<sub>2</sub>) un polipéptido que comprende (i) una secuencia de aminoácidos que tiene identidad de secuencia con SEQ ID NO 3 y/o (ii) un fragmento de SEQ ID NO 3.

Del mismo modo, las composiciones de la invención pueden incluir:

(a<sub>1</sub>) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 2, y/o (b<sub>1</sub>) un polipéptido que comprende (i) una secuencia de aminoácidos que tiene identidad de secuencia con SEQ ID NO 2 y/o (ii) un fragmento de SEQ ID NO 2; y

(a<sub>2</sub>) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 3, y/o (b<sub>2</sub>) un polipéptido que comprende (i) una secuencia de aminoácidos que tiene identidad de secuencia con SEQ ID NO 3 y/o (ii) un fragmento de SEQ ID NO 3.

Las composiciones de la invención pueden incluir:

(a<sub>1</sub>) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 1, y/o (b<sub>1</sub>) un polipéptido que comprende (i) una secuencia de aminoácidos que tiene identidad de secuencia con SEQ ID NO 1 y/o (ii) un fragmento de SEQ ID NO 1;

(a<sub>2</sub>) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 2, y/o (b<sub>2</sub>) un polipéptido que comprende (i) una secuencia de aminoácidos que tiene identidad de secuencia con SEQ ID NO 2 y/o (ii) un fragmento de SEQ ID NO 2; y

(a<sub>3</sub>) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 3, y/o (b<sub>3</sub>) un polipéptido que comprende (i) una secuencia de aminoácidos que tiene identidad de secuencia con SEQ ID NO 3 y/o (ii) un fragmento de SEQ ID NO 3.

Otros tres antígenos proteicos de GBS preferidos para su uso en la invención se conocen como: GBS104; GBS276; y GBS322 [véase la ref. 99]. La secuencia de aminoácidos de GBS104 de tipo salvaje de la cepa 2603 V/R aislada del serotipo V se proporciona en la referencia 21 como SEQ ID NO: 3 en la misma. Cuando las realizaciones de la presente invención se definen en la presente memoria mediante la referencia a SEQ ID NO: 1, las referencias a SEQ ID NO: 1 pueden sustituirse por las referencias a SEQ ID NO: 3 de la referencia 21. La secuencia de aminoácidos de GBS276 de tipo salvaje de la cepa aislada del serotipo V 2603 V/R se proporciona en la referencia 21 como SEQ ID NO: 4 en la misma. Cuando las realizaciones de la presente invención se definen en la presente memoria mediante la referencia a SEQ ID NO: 2, las referencias a SEQ ID NO: 2 pueden sustituirse por las referencias a SEQ ID NO: 4 de la referencia 21. La secuencia de aminoácidos de GBS322 de tipo salvaje de la cepa aislada del serotipo V 2603 V/R se proporciona en la referencia 21 como SEQ ID NO: 5 en la misma. Cuando las realizaciones de la presente invención se definen en la presente memoria mediante referencia a SEQ ID NO: 3, las referencias a SEQ ID NO: 3 pueden sustituirse por las referencias a SEQ ID NO: 5 de la referencia 21.

Dependiendo del SEQ ID NO concreto, el grado de identidad de secuencia en (i) es preferiblemente mayor que 50% (p.ej. 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más). Estos polipéptidos incluyen homólogos, ortólogos, variantes alélicas y mutantes funcionales. Típicamente, 50% de

identidad o más entre dos secuencias polipeptídicas se considera una indicación de equivalencia funcional. La identidad entre polipéptidos se determina preferiblemente mediante el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman implementado en el programa MPSRCH (Oxford Molecular), utilizando una búsqueda de hueco afín con parámetros de *penalización por apertura de hueco* =12 y *penalización por extensión de hueco* =1.

- 5 Dependiendo del SEQ ID NO concreto, los fragmentos de (ii) deben comprender al menos *n* aminoácidos consecutivos de las secuencias y, dependiendo de la secuencia concreta, *n* es 7 o más (p.ej. 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más). El fragmento puede comprender al menos un epítipo de célula T o, preferiblemente, un epítipo de célula B de la secuencia. Los epítipos de células T y B pueden identificarse empíricamente (p.ej. utilizando PEPSCAN [206,207] o métodos similares), o pueden predecirse (p.ej. utilizando el índice antigénico de Jameson-Wolf [208], enfoques basados en matrices [209], TEPITOPE [210], redes neuronales [211], OptiMer y EpiMer [212, 213], ADEPT [214], Tsites [215], carácter hidrófilo [216], índice antigénico [217] o los métodos descritos en la referencia 218 etc.). Otros fragmentos preferidos son SEQ ID NO 1 a 3 sin su resto de aminoácido N-terminal o sin su péptido señal N-terminal. Se puede utilizar la eliminación de uno o más dominios, tales como una región líder o secuencia señal, una región transmembrana, una región citoplásmica o un motivo de anclaje a la pared celular. Los fragmentos preferidos de una proteína concreta se pueden unir a un anticuerpo que se puede unir a la proteína concreta completa p.ej. se puede unir a un anticuerpo que se une a SEQ ID NO: 1, 2 o 3. Algunos fragmentos útiles se proporcionan a continuación (SEQ ID NO 4 a 13).

- Estos polipéptidos pueden, en comparación con SEQ ID NO 1 a 3, incluir uno o más (p.ej. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.) reemplazos de aminoácidos conservativos es decir reemplazos de un aminoácido por otro que tiene una cadena lateral relacionada. Los aminoácidos genéticamente codificados generalmente se dividen en cuatro familias: (1) ácidos es decir aspartato, glutamato; (2) alcalinos es decir lisina, arginina, histidina; (3) no polares es decir alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) polares sin carga es decir glicina, asparragina, glutamina, cistina, serina, treonina, tirosina. La fenilalanina, el triptófano y la tirosina a veces se clasifican conjuntamente como aminoácidos aromáticos. En general, la sustitución de aminoácidos individuales dentro de estas familias no tiene un efecto importante sobre la actividad biológica. Los polipéptidos también pueden incluir uno o más (p.ej. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.) deleciones de un único aminoácido con respecto a SEQ ID NO 1 a 3. Los polipéptidos también pueden incluir uno o más (p.ej. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.) inserciones (p.ej. cada uno de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos) con respecto a SEQ ID NO 1 a 3.

- Los polipéptidos de la invención se pueden preparar de muchas maneras, p.ej. mediante síntesis química (en su totalidad o en parte), mediante la digestión de polipéptidos más largos utilizando proteasas, mediante traducción a partir de ARN, mediante purificación del cultivo celular (p.ej. a partir de la expresión recombinante), a partir del propio organismo (p.ej. después del cultivo bacteriano, o directamente a partir de los pacientes), etc. Un método preferido para la producción de péptidos con menos de 40 aminoácidos de longitud implica síntesis química *in vitro* [219,220]. La síntesis de péptidos en fase sólida es particularmente preferida, tal como los métodos basados en la química tBoc o Fmoc [221]. La síntesis enzimática [222] también se puede utilizar en parte o en su totalidad. Como alternativa a la síntesis química, se puede utilizar síntesis biológica p.ej. los polipéptidos pueden producirse mediante traducción. Esto puede llevarse a cabo *in vitro* o *en vivo*. Los métodos biológicos se restringen en general a la producción de polipéptidos basados en L-aminoácidos, pero se puede utilizar la manipulación de la maquinaria de traducción (p.ej. de las moléculas de aminoacil ARNt) para permitir la introducción de D-aminoácidos (o de otros aminoácidos no naturales, como la yodotirosina o la metilfenilalanina, la azidohomoalanina, etc.) [223]. Sin embargo, cuando se incluyen D-aminoácidos, se prefiere utilizar síntesis química. Los polipéptidos de la invención pueden tener modificaciones covalentes en el extremo C-terminal y/o el extremo N-terminal.

- Si estas proteínas de GBS se incluyen en las composiciones de la invención, pueden adoptar diversas formas (p.ej. nativa, fusiones, glicosilada, no glicosilada, lipidada, no lipidada, fosforilada, no fosforilada, miristoilada, no miristoilada, monomérica, multimérica, particulada, desnaturalizada, etc.). Se utilizan preferiblemente en forma purificada o sustancialmente purificada es decir sustancialmente libres de otros polipéptidos (p.ej. libres de polipéptidos de origen natural), particularmente de otros polipéptidos de GBS o de la célula anfitriona).

#### **GBS67**

- La secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de GBS67 secuenciada a partir de la cepa 2603 V/R de serotipo V se exponen en la ref. 99 como SEQ ID NO 3745 y 3746. La secuencia de aminoácidos es SEQ ID NO: 1 en la presente memoria:

MRKYQKFSKILTLSLFCLSQIPLNTNVLGESTVPENGAQKGLVVKKTDDQNKPLSKATFVLKTTAHPESKIEKVTAELT  
 GEATFDNLI PGDYTLSEETAPEGYKKTNQTWQVKVESNGKTTIQNSGDKNSTIGQNQEELDKQYPPTGIYEDTKESYKL  
 EHVKGSPNGKSEAKAVNPYSSEGEHIREIPEGTLSKRISEVGLAHNKYKIELTVSGKTIKVPVDKQKPLDVFVLDN  
 SNSMNDGPNFQRHNKAKKAAEALGTAVKDI LGANS DNRVALV TYGSDI FDGRSVDVVKGFKEDDKYYGLQTKFTIQTE  
 NYSHKQLTNNAAEEI IKRI PTEAPKAKWGSTNGLTPEQQKEYYLSKVGETFTMKAFMEADDILSQVNRNSQKIIVHVTD  
 GVPTRS YA INNFKLGASYEQFEQMKKNGYLNKSNFLLLTDKPEDIKNGESYFLFPLDSYQTQIISGNLQKLHYLDLNL  
 NYPKGTIYRNGPVKEHGTPTKLYINSLKQKNYDIFNFGIDISGFRQVYNEEYKKNQDGTFFQKLKEEAFKLS DGEITELM  
 RSFSSKPEYYTPIVTSADTSNNEILSKIQQQFETILTKENSIVNGTIEDPMGDKINLQLGNGQTLQPSDYTLQNDGVS  
 MKDGIATGGPNNDGGILKGVKLEYIGNKLYVRGLNLGEGQKVTLTYDVKLDDSFISNKFYDTNGR TTLNPKSEDPNTRL  
 DFPIPKIRDVREYPTITIKNEKKLGEIEFIKVDKDNKLLKLGATFELQEFNEDYKLYLP IKNNNSKVVTGENGKISYK  
 DLKDGKYQLIEAVSPEDYQKITNKPIILTFEVVKGSIKNI IAVNKQISEYHEEGDKHLITNTHI PPKGI IPMTGGKGILS  
 FILIGGAMMSIAGGIYIWKRYKSSDMSIKKD

5 GBS67 contiene una región transmembrana en el extremo C-terminal que está indicada por la región subrayada más cercana al extremo C-terminal de SEQ ID NO: 1 anterior. Se pueden eliminar uno o más aminoácidos de la región transmembrana, o el aminoácido se puede trunca antes de la región transmembrana. Un ejemplo de dicho fragmento de GBS67 se expone a continuación como SEQ ID NO: 4.

MRKYQKFSKILTLSLFCLSQIPLNTNVLGESTVPENGAQKGLVVKKTDDQNKPLSKATFVLKTTAHPESKIEKVTAELT  
 GEATFDNLI PGDYTLSEETAPEGYKKTNQTWQVKVESNGKTTIQNSGDKNSTIGQNQEELDKQYPPTGIYEDTKESYKL  
 EHVKGSPNGKSEAKAVNPYSSEGEHIREIPEGTLSKRISEVGLAHNKYKIELTVSGKTIKVPVDKQKPLDVFVLDN  
 SNSMNDGPNFQRHNKAKKAAEALGTAVKDI LGANS DNRVALV TYGSDI FDGRSVDVVKGFKEDDKYYGLQTKFTIQTE  
 NYSHKQLTNNAAEEI IKRI PTEAPKAKWGSTNGLTPEQQKEYYLSKVGETFTMKAFMEADDILSQVNRNSQKIIVHVTD  
 GVPTRS YA INNFKLGASYEQFEQMKKNGYLNKSNFLLLTDKPEDIKNGESYFLFPLDSYQTQIISGNLQKLHYLDLNL  
 NYPKGTIYRNGPVKEHGTPTKLYINSLKQKNYDIFNFGIDISGFRQVYNEEYKKNQDGTFFQKLKEEAFKLS DGEITELM  
 RSFSSKPEYYTPIVTSADTSNNEILSKIQQQFETILTKENSIVNGTIEDPMGDKINLQLGNGQTLQPSDYTLQNDGVS  
 MKDGIATGGPNNDGGILKGVKLEYIGNKLYVRGLNLGEGQKVTLTYDVKLDDSFISNKFYDTNGR TTLNPKSEDPNTRL  
 DFPIPKIRDVREYPTITIKNEKKLGEIEFIKVDKDNKLLKLGATFELQEFNEDYKLYLP IKNNNSKVVTGENGKISYK  
 DLKDGKYQLIEAVSPEDYQKITNKPIILTFEVVKGSIKNI IAVNKQISEYHEEGDKHLITNTHI PPKGI IPMTGGKGILS

10 GBS67 contiene un motivo aminoacídico indicativo de un ancla a la pared celular, que se muestra en cursiva en SEQ ID NO: 1 anterior. En algunos sistemas de células anfitrionas recombinantes, puede ser preferible eliminar este motivo para facilitar la secreción de una proteína recombinante GBS67 de la célula anfitriona. Por consiguiente, en un fragmento preferido de GBS67 para su uso en la invención, los motivos transmembrana y de ancla a la pared celular se eliminan de GBS67. Un ejemplo de dicho fragmento de GBS67 se expone a continuación como SEQ ID NO: 5.

MRKYQKFSKILTLSLFCLSQIPLNTNVLGESTVPENGAQKGLVVKKTDDQNKPLSKATFVLKTTAHPESKIEKVTAELT  
 GEATFDNLI PGDYTLSEETAPEGYKKTNQTWQVKVESNGKTTIQNSGDKNSTIGQNQEELDKQYPPTGIYEDTKESYKL  
 EHVKGSPNGKSEAKAVNPYSSEGEHIREIPEGTLSKRISEVGLAHNKYKIELTVSGKTIKVPVDKQKPLDVFVLDN  
 SNSMNDGPNFQRHNKAKKAAEALGTAVKDI LGANS DNRVALV TYGSDI FDGRSVDVVKGFKEDDKYYGLQTKFTIQTE  
 NYSHKQLTNNAAEEI IKRI PTEAPKAKWGSTNGLTPEQQKEYYLSKVGETFTMKAFMEADDILSQVNRNSQKIIVHVTD  
 GVPTRS YA INNFKLGASYEQFEQMKKNGYLNKSNFLLLTDKPEDIKNGESYFLFPLDSYQTQIISGNLQKLHYLDLNL  
 NYPKGTIYRNGPVKEHGTPTKLYINSLKQKNYDIFNFGIDISGFRQVYNEEYKKNQDGTFFQKLKEEAFKLS DGEITELM  
 RSFSSKPEYYTPIVTSADTSNNEILSKIQQQFETILTKENSIVNGTIEDPMGDKINLQLGNGQTLQPSDYTLQNDGVS  
 MKDGIATGGPNNDGGILKGVKLEYIGNKLYVRGLNLGEGQKVTLTYDVKLDDSFISNKFYDTNGR TTLNPKSEDPNTRL  
 DFPIPKIRDVREYPTITIKNEKKLGEIEFIKVDKDNKLLKLGATFELQEFNEDYKLYLP IKNNNSKVVTGENGKISYK  
 DLKDGKYQLIEAVSPEDYQKITNKPIILTFEVVKGSIKNI IAVNKQISEYHEEGDKHLITNTHI PPKGI

15 Alternativamente, en algunos sistemas de células anfitrionas recombinantes, puede ser preferible utilizar el motivo de ancla a la pared celular para anclar la proteína expresada de forma recombinante a la pared celular. El dominio extracelular de la proteína expresada se puede escindir durante la purificación o la proteína recombinante se puede dejar anclada a células anfitrionas inactivadas o membranas celulares en la composición final.

20 Se han identificado tres motivos de pilina, que contienen restos de lisina conservados en GBS67. Los restos de lisina conservados están en los restos de aminoácido 478 y 488, en los restos de aminoácido 340 y 342, y en los restos de aminoácido 703 y 717. Se cree que las secuencias de pilina, en particular los restos conservados de lisina, son importantes para la formación de estructuras oligoméricas, de tipo pilus de GBS67. Los fragmentos preferidos de GBS 67 incluyen al menos un resto de lisina conservado. También se han identificado en GBS67 dos cajas E que contienen restos glutámicos conservados. Los fragmentos preferidos de GBS67 incluyen al menos un resto de ácido glutámico conservado.

25 GBS67 contiene varias regiones que se pronostica que forman estructuras alfa helicoidales. Es probable que tales regiones alfa helicoidales formen estructuras de bobina en espiral y pueden estar implicadas en la oligomerización de GBS67. GBS67 también contiene una región que es homóloga al dominio Cna<sub>B</sub> de la proteína de superficie de unión al colágeno *S. aureus* (pfam05738). Ésta puede formar una estructura sándwich

beta. GBS67 contiene una región que es homóloga a un dominio de tipo A de von Willebrand (vWF).

La secuencia de aminoácidos de GBS67 secuenciada a partir de la cepa H36B de serotipo Ib se expone en la ref. 224 como SEQ ID NO 20906. La secuencia de aminoácidos es SEQ ID NO: 24 en la presente memoria:

MRKYQKFSKILTLSLFCLSQIPLNTNVLGESTVPENGAQKGLVVKKTDDQNKPLSKATFVLKPTSHSESKVEKVTTEVT  
 GEATFDNLTTPGDYTLSEETAPEGYKKTQTQWQVKVESNGKTTIQNSDDKKSIEQRQEELDKQYPLTGAYEDTKESYNL  
 EHVKN SIPNGKLEAKAVNPYSSEGEHIREIQEGTLSKRISSEVNDLDHNKYKIELTVSGKSIKTKINKDEPLDVVFLDN  
 SNSMKNNNGKNNKAKKAGEAVETIIKDV LGANVENRAALV TYGSDIFDGR TVKVIKGFKEDPYYGLETSFTVQ TNDYSYK  
 KFTNIAADI IKKIPKEAPEAKWGGTSLGLTPEKKREYDLSKVGETFTMKA FMEADTLLSSIQRKSRKIVH L TDGVPTR  
 SYAINSFVKGSTYANQFERIKEKGYLDKNNYFITDDPEKIKGNESYFLFPLDSYQTQIISGNLQKLHYLDLNLNYPKG  
 TIYRNGPVREHGTPTKLYINSLKQKNYDIFNFGIDISGFRQVYNEDYKKNQDGT FQKLKEEAFELSDGEITELMNSFSS  
 KPEYYTPIVTSADVSNNEILSKIQQQFEKILTKENSIVNGTIEDPMGDKINLHLGNGQTLQPSDYTLQNDGSI  
 ATGGPNNDGGI LKGVKLEYIKNKLYVRGLNLGEGQKVTLTVDV KLDDSFISNKFYDTNGR TTLNPKSEEPD TLRDFPIP  
 KIRDVREYPTITIKNEKKLGEIEFTKVDKDNKLLLKGATFELQEFNEDYKLYLPIKNNNSKVVTGENGKISYKDLKDG  
 KYQLIEAVSPKDYQKITNKPIILTFEVVKGSIQNI IAVNKQISEYHEEGDKHLITNTHIPPKGI *I* PMTGGKGI LSFILIG  
 GAMMSIAGGIYIWKRRHKSSDASIEKD

5

En algunas realizaciones, se puede utilizar esta variante de GBS67. Por consiguiente, cuando las realizaciones de la presente invención se definen en la presente memoria mediante la referencia a SEQ ID NO: 1, las referencias a SEQ ID NO: 1 se pueden sustituir por las referencias a SEQ ID NO: 24.

Al igual que GBS67 secuenciado a partir de la cepa 2603 V/R de serotipo V, GBS67 secuenciado a partir de la cepa H36B de serotipo Ib contiene una región transmembrana en el extremo C-terminal que está indicada por la región subrayada más cercana al extremo C terminal de SEQ ID NO: 24 anterior. Se pueden eliminar uno o más aminoácidos de la región transmembrana, o el aminoácido se puede truncar antes de la región transmembrana. Un ejemplo de dicho fragmento de GBS67 se expone a continuación como SEQ ID NO: 25.

10

MRKYQKFSKILTLSLFCLSQIPLNTNVLGESTVPENGAQKGLVVKKTDDQNKPLSKATFVLKPTSHSESKVEKVTTEVT  
 GEATFDNLTTPGDYTLSEETAPEGYKKTQTQWQVKVESNGKTTIQNSDDKKSIEQRQEELDKQYPLTGAYEDTKESYNL  
 EHVKN SIPNGKLEAKAVNPYSSEGEHIREIQEGTLSKRISSEVNDLDHNKYKIELTVSGKSIKTKINKDEPLDVVFLDN  
 SNSMKNNNGKNNKAKKAGEAVETIIKDV LGANVENRAALV TYGSDIFDGR TVKVIKGFKEDPYYGLETSFTVQ TNDYSYK  
 KFTNIAADI IKKIPKEAPEAKWGGTSLGLTPEKKREYDLSKVGETFTMKA FMEADTLLSSIQRKSRKIVH L TDGVPTR  
 SYAINSFVKGSTYANQFERIKEKGYLDKNNYFITDDPEKIKGNESYFLFPLDSYQTQIISGNLQKLHYLDLNLNYPKG  
 TIYRNGPVREHGTPTKLYINSLKQKNYDIFNFGIDISGFRQVYNEDYKKNQDGT FQKLKEEAFELSDGEITELMNSFSS  
 KPEYYTPIVTSADVSNNEILSKIQQQFEKILTKENSIVNGTIEDPMGDKINLHLGNGQTLQPSDYTLQNDGSI  
 ATGGPNNDGGI LKGVKLEYIKNKLYVRGLNLGEGQKVTLTVDV KLDDSFISNKFYDTNGR TTLNPKSEEPD TLRDFPIP  
 KIRDVREYPTITIKNEKKLGEIEFTKVDKDNKLLLKGATFELQEFNEDYKLYLPIKNNNSKVVTGENGKISYKDLKDG  
 KYQLIEAVSPKDYQKITNKPIILTFEVVKGSIQNI IAVNKQISEYHEEGDKHLITNTHIPPKGI *I* PMTGGKGI LS

15

Al igual que GBS67 secuenciado a partir de la cepa 2603 V/R de serotipo V, GBS67 secuenciado a partir de la cepa H36B de serotipo Ib contiene un motivo aminoacídico indicativo de un ancla a la pared celular, que se muestra en cursiva en SEQ ID NO: 24 anterior. Por consiguiente, en un fragmento preferido de GBS67 para su uso en la invención, los motivos transmembrana y de ancla a la pared celular se eliminan de GBS67. Un ejemplo de tal fragmento de GBS67 se expone a continuación como SEQ ID NO: 26.

MRKYQKFSKILTLSLFCLSQIPLNTNVLGESTVPENGAQKGLVVKKTDDQNKPLSKATFVLKPTSHSESKVEKVTTEVT  
 GEATFDNLTTPGDYTLSEETAPEGYKKTQTQWQVKVESNGKTTIQNSDDKKSIEQRQEELDKQYPLTGAYEDTKESYNL  
 EHVKN SIPNGKLEAKAVNPYSSEGEHIREIQEGTLSKRISSEVNDLDHNKYKIELTVSGKSIKTKINKDEPLDVVFLDN  
 SNSMKNNNGKNNKAKKAGEAVETIIKDV LGANVENRAALV TYGSDIFDGR TVKVIKGFKEDPYYGLETSFTVQ TNDYSYK  
 KFTNIAADI IKKIPKEAPEAKWGGTSLGLTPEKKREYDLSKVGETFTMKA FMEADTLLSSIQRKSRKIVH L TDGVPTR  
 SYAINSFVKGSTYANQFERIKEKGYLDKNNYFITDDPEKIKGNESYFLFPLDSYQTQIISGNLQKLHYLDLNLNYPKG  
 TIYRNGPVREHGTPTKLYINSLKQKNYDIFNFGIDISGFRQVYNEDYKKNQDGT FQKLKEEAFELSDGEITELMNSFSS  
 KPEYYTPIVTSADVSNNEILSKIQQQFEKILTKENSIVNGTIEDPMGDKINLHLGNGQTLQPSDYTLQNDGSI  
 ATGGPNNDGGI LKGVKLEYIKNKLYVRGLNLGEGQKVTLTVDV KLDDSFISNKFYDTNGR TTLNPKSEEPD TLRDFPIP  
 KIRDVREYPTITIKNEKKLGEIEFTKVDKDNKLLLKGATFELQEFNEDYKLYLPIKNNNSKVVTGENGKISYKDLKDG  
 KYQLIEAVSPKDYQKITNKPIILTFEVVKGSIQNI IAVNKQISEYHEEGDKHLITNTHIPPKGI

20

**GBS80**

GBS80 se refiere a una supuesta proteína de la familia de anclas a la superficie de la pared celular. La secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de GBS80 secuenciada a partir de la cepa 2603 V/R aislada del serotipo V se exponen en la ref. 99 como SEQ ID NO 8779 y 8780. La secuencia de aminoácidos se expone a continuación como SEQ ID NO: 2:

25

MKLSKLLFSAAVLTMVAGSTVEPVAQFATGMSIVRAAEVSVQERPAKTTVNIYKLQADSYKSEITSNGGIENKDGEVIS  
 NYAKLGDNVKGLQGVQFKRYKVKTDISVDELKLLTVEAADAKVGTILEEGVSLPQKTNAQGLVVDALDSKSNVRYLYV  
 EDLKNSPSNITKAYAVPFVLELPVANSTGTGFLSEINIYPKNVVTDEPKTDKDVKKLGQDDAGYTI GEEFKWFLKSTIP  
 ANLGDYKFEITDKFADGLTYKSVGKIKIGSKTLNRDEHYTIDEPTVDNQNTLKITFKPEKFKEIAELLKGMTLVKNQD  
 ALDKATANTDDAAFLEIPVASTINEKAVLGKAIENTFELQYDHTPDKADNPKPSNPPRKPEVHTGGKRFVKKDSTETQT  
 LGGAEFDLLASDGTAVKWTDALIKANTNKNYIAGEAVTGQPIKLSHTDGTFEIKGLAYAVDANAEGTAVTYKPKETKA  
 PEGYVIPDKEIEFTVSQTSYNTKPTDITVDSADATPDTIKNNKRPS *IPNTGGIGTAIFVAIGAAVMAFAVKGMKRRTKD*  
 N

5 GBS80 contiene un líder N-terminal o región de secuencia señal que se indica mediante la secuencia subrayada anterior. Se pueden eliminar uno o más aminoácidos de la región líder o secuencia señal de GBS80. Un ejemplo de dicho fragmento de GBS80 se expone a continuación como SEQ ID NO: 6:

AEVSVQERPAKTTVNIYKLQADSYKSEITSNGGIENKDGEVISNYAKLGDNVKGLQGVQFKRYKVKTDISVDELKLLTVE  
 AADAKVGTILEEGVSLPQKTNAQGLVVDALDSKSNVRYLYVEDLKNSPSNITKAYAVPFVLELPVANSTGTGFLSEIN  
 IYPKNVVTDEPKTDKDVKKLGQDDAGYTI GEEFKWFLKSTIPANLGDYKFEITDKFADGLTYKSVGKIKIGSKTLNRD  
 EHYTIDEPTVDNQNTLKITFKPEKFKEIAELLKGMTLVKNQDALDKATANTDDAAFLEIPVASTINEKAVLGKAIENTF  
 ELQYDHTPDKADNPKPSNPPRKPEVHTGGKRFVKKDSTETQTLGGAEFDLLASDGTAVKWTDALIKANTNKNYIAGEAV  
 TGQPIKLSHTDGTFEIKGLAYAVDANAEGTAVTYKPKETKAPEGYVIPDKEIEFTVSQTSYNTKPTDITVDSADATPD  
 TIKNNKRPSIPNTGGIGTAIFVAIGAAVMAFAVKGMKRRTKDN

GBS80 contiene una región transmembrana C-terminal que está indicada por la secuencia subrayada cerca del final de SEQ ID NO: 2 anterior. Se pueden eliminar uno o más aminoácidos de la región transmembrana y/o una región citoplásmica. Un ejemplo de tal fragmento se expone a continuación como SEQ ID NO: 7:

MKLSKLLFSAAVLTMVAGSTVEPVAQFATGMSIVRAAEVSVQERPAKTTVNIYKLQADSYKSEITSNGGIENKDGEVIS  
 NYAKLGDNVKGLQGVQFKRYKVKTDISVDELKLLTVEAADAKVGTILEEGVSLPQKTNAQGLVVDALDSKSNVRYLYV  
 EDLKNSPSNITKAYAVPFVLELPVANSTGTGFLSEINIYPKNVVTDEPKTDKDVKKLGQDDAGYTI GEEFKWFLKSTIP  
 ANLGDYKFEITDKFADGLTYKSVGKIKIGSKTLNRDEHYTIDEPTVDNQNTLKITFKPEKFKEIAELLKGMTLVKNQD  
 ALDKATANTDDAAFLEIPVASTINEKAVLGKAIENTFELQYDHTPDKADNPKPSNPPRKPEVHTGGKRFVKKDSTETQT  
 LGGAEFDLLASDGTAVKWTDALIKANTNKNYIAGEAVTGQPIKLSHTDGTFEIKGLAYAVDANAEGTAVTYKPKETKA  
 PEGYVIPDKEIEFTVSQTSYNTKPTDITVDSADATPDTIKNNKRPS *IPNTG*

10 GBS80 contiene un motivo aminoacídico indicativo de un ancla a la pared celular, que se muestra en cursiva en SEQ ID NO: 2 anterior. En algunos sistemas de células anfitrionas recombinantes, puede ser preferible eliminar este motivo para facilitar la secreción de una proteína GBS80 recombinante de la célula anfitriona. Por lo tanto, las regiones transmembrana y/o citoplásmica y el motivo de ancla de la pared celular se pueden eliminar de GBS80. Un ejemplo de tal fragmento se expone a continuación como SEQ ID NO: 8.

MKLSKLLFSAAVLTMVAGSTVEPVAQFATGMSIVRAAEVSVQERPAKTTVNIYKLQADSYKSEITSNGGIENKDGEVIS  
 NYAKLGDNVKGLQGVQFKRYKVKTDISVDELKLLTVEAADAKVGTILEEGVSLPQKTNAQGLVVDALDSKSNVRYLYV  
 EDLKNSPSNITKAYAVPFVLELPVANSTGTGFLSEINIYPKNVVTDEPKTDKDVKKLGQDDAGYTI GEEFKWFLKSTIP  
 ANLGDYKFEITDKFADGLTYKSVGKIKIGSKTLNRDEHYTIDEPTVDNQNTLKITFKPEKFKEIAELLKGMTLVKNQD  
 ALDKATANTDDAAFLEIPVASTINEKAVLGKAIENTFELQYDHTPDKADNPKPSNPPRKPEVHTGGKRFVKKDSTETQT  
 LGGAEFDLLASDGTAVKWTDALIKANTNKNYIAGEAVTGQPIKLSHTDGTFEIKGLAYAVDANAEGTAVTYKPKETKA  
 PEGYVIPDKEIEFTVSQTSYNTKPTDITVDSADATPDTIKNNKRPS

20 Alternativamente, en algunos sistemas de células anfitrionas recombinantes, puede ser preferible utilizar el motivo de ancla a la pared celular para anclar la proteína expresada de forma recombinante a la pared celular. El dominio extracelular de la proteína expresada se puede escindir durante la purificación o la proteína recombinante se puede dejar anclada a células anfitrionas inactivadas o membranas celulares en la composición final.

En una realización, la región líder o secuencia señal, las regiones transmembrana y citoplásmica y el motivo de ancla a la pared celular se eliminan de la secuencia de GBS80. Un ejemplo de dicho fragmento de GBS80 se expone a continuación como SEQ ID NO: 9:

AEVSVQERPAKTTVNIYKLQADSYKSEITSNGGIENKDGEVISNYAKLGDNVKGLQGVQFKRYKVKTDISVDELKLLTVE  
 AADAKVGTILEEGVSLPQKTNAQGLVVDALDSKSNVRYLYVEDLKNSPSNITKAYAVPFVLELPVANSTGTGFLSEIN  
 IYPKNVVTDEPKTDKDVKKLGQDDAGYTI GEEFKWFLKSTIPANLGDYKFEITDKFADGLTYKSVGKIKIGSKTLNRD  
 EHYTIDEPTVDNQNTLKITFKPEKFKEIAELLKGMTLVKNQDALDKATANTDDAAFLEIPVASTINEKAVLGKAIENTF  
 ELQYDHTPDKADNPKPSNPPRKPEVHTGGKRFVKKDSTETQTLGGAEFDLLASDGTAVKWTDALIKANTNKNYIAGEAV  
 TGQPIKLSHTDGTFEIKGLAYAVDANAEGTAVTYKPKETKAPEGYVIPDKEIEFTVSQTSYNTKPTDITVDSADATPD  
 TIKNNKRPS

25

Un fragmento particularmente inmunogénico de GBS80 se localiza hacia el extremo N-terminal de la proteína, y se proporciona en la presente memoria como SEQ ID NO: 10:

AEVSQERPAKTTVNIYKQLQADSYKSEITSNNGGIENKDGSEVISNYAKLGDNVKGLQGVQFKRYKVKTDISVDELKKLTTV  
EAADAKVGTILEEGVSLPQKTNAQGLVVDALDSKSNVRYLYVEDLKNSPSNITKAYAVPFVLELPVANSTGTGFLSEIN  
IYPKNVVTDEPKTDKDVKKGQDDAGYTI GEEFKWFLKSTIPANLGDYEFKFEITDKFADGLTYKSVGKIKIGSKTLNRD  
EHTYIDEPTVDNQNTLKITFKPEKFKIEAELLKG

**Spb1**

5 La secuencia de Spbl de tipo salvaje de la cepa COH1 de serotipo III es SEQ ID NO: 3 de la presente memoria:

MKKKMIQSLLVASLAFGMVSPVTPPIAFAAETGTITVQDTQKGATYKAYKVFDAEIDNANVSDSNKDGASYLIPOGKEA  
EYKASTDFNSLFTTTTNGGRITYVTKKDTASANEIATWAKSISANTTPVSTVTESENNDGTEVINVSQYGYVVSSTVNNG  
AVIMVTSVTPNATIHEKNTDATWGDGGGKTVDQKTYSVGDTVKYTITYKNAVNYHGTEKQYQYVIKDTMPSASVVDLNE  
GSYEVTITDGSIGNITTLTQGSEKATGKYNLLEENNNFTITIPWAATNTPTGNTQNGANDDFYKGINITITVYTGVLKS  
GAKPGSADLPENTNIATINPNTSNDDPGQKVTVRDQGITIKKIDGSTKASLQGAIFVLKNATGQFLNFNDTNNVEWGTE  
ANATEYTTGADGIITITGLKEGTYYLVEKKAPLGYNLLDNSQKVILGDGATDTTNSDNLLVNPTVENNKGTELPSTGGI  
GTTIFYIIGAILVIGAGIVLVARRRLRS

Spbl de tipo salvaje contiene una región líder o de secuencia señal N-terminal que se indica mediante la secuencia subrayada anterior (aa 1-29). Se pueden eliminar uno o más aminoácidos de la región líder o secuencia señal de Spbl. Un ejemplo de dicho fragmento de Spbl se expone a continuación como SEQ ID NO: 11:

AETGTITVQDTQKGATYKAYKVFDAEIDNANVSDSNKDGASYLIPOGKEAEYKASTDFNSLFTTTTNGGRITYVTKKDTA  
SANEIATWAKSISANTTPVSTVTESENNDGTEVINVSQYGYVVSSTVNNGAVIMVTSVTPNATIHEKNTDATWGDGGGK  
TVDQKTYSVGDTVKYTITYKNAVNYHGTEKQYQYVIKDTMPSASVVDLNEGSYEVTITDGSIGNITTLTQGSEKATGKYN  
LLEENNNFTITIPWAATNTPTGNTQNGANDDFYKGINITITVYTGVLKSGAKPGSADLPENTNIATINPNTSNDDPGQ  
KVTVRDQGITIKKIDGSTKASLQGAIFVLKNATGQFLNFNDTNNVEWGTEANATEYTTGADGIITITGLKEGTYYLVEK  
KAPLGYNLLDNSQKVILGDGATDTTNSDNLLVNPTVENNKGTELPSTGGIGTTIFYIIGAILVIGAGIVLVARRRLRS

La secuencia de Spbl de tipo salvaje contiene un motivo aminoacídico indicativo de un ancla a la pared celular (LPSTG). En algunos sistemas de células anfitrionas recombinantes, puede ser preferible eliminar este motivo para facilitar la secreción de una proteína Spbl recombinante a partir de la célula anfitriona. Por lo tanto, el motivo de ancla a la pared celular y la secuencia C-terminal para este motivo pueden eliminarse de Spbl. Un ejemplo de tal fragmento se expone a continuación como SEQ ID NO: 12:

MKKKMIQSLLVASLAFGMVSPVTPPIAFAAETGTITVQDTQKGATYKAYKVFDAEIDNANVSDSNKDGASYLIPOGKEA  
EYKASTDFNSLFTTTTNGGRITYVTKKDTASANEIATWAKSISANTTPVSTVTESENNDGTEVINVSQYGYVVSSTVNNG  
AVIMVTSVTPNATIHEKNTDATWGDGGGKTVDQKTYSVGDTVKYTITYKNAVNYHGTEKQYQYVIKDTMPSASVVDLNE  
GSYEVTITDGSIGNITTLTQGSEKATGKYNLLEENNNFTITIPWAATNTPTGNTQNGANDDFYKGINITITVYTGVLKS  
GAKPGSADLPENTNIATINPNTSNDDPGQKVTVRDQGITIKKIDGSTKASLQGAIFVLKNATGQFLNFNDTNNVEWGTE  
ANATEYTTGADGIITITGLKEGTYYLVEKKAPLGYNLLDNSQKVILGDGATDTTNSDNLLVNPTVENNKGTE

Alternativamente, en algunos sistemas de células anfitrionas recombinantes, puede ser preferible utilizar el motivo de ancla a la pared celular para anclar la proteína expresada de forma recombinante a la pared celular. El dominio extracelular de la proteína expresada se puede escindir durante la purificación o la proteína recombinante se puede dejar anclada a células anfitrionas inactivadas o membranas celulares en la composición final.

En una realización, la región líder o de secuencia señal, el motivo de ancla a la pared celular y la secuencia C-terminal para este motivo se eliminan de Spbl. Un ejemplo de dicho fragmento de Spbl se expone a continuación como SEQ ID NO: 13:

AETGTITVQDTQKGATYKAYKVFDAEIDNANVSDSNKDGASYLIPOGKEAEYKASTDFNSLFTTTTNGGRITYVTKKDTA  
SANEIATWAKSISANTTPVSTVTESENNDGTEVINVSQYGYVVSSTVNNGAVIMVTSVTPNATIHEKNTDATWGDGGGK  
TVDQKTYSVGDTVKYTITYKNAVNYHGTEKQYQYVIKDTMPSASVVDLNEGSYEVTITDGSIGNITTLTQGSEKATGKYN  
LLEENNNFTITIPWAATNTPTGNTQNGANDDFYKGINITITVYTGVLKSGAKPGSADLPENTNIATINPNTSNDDPGQ  
KVTVRDQGITIKKIDGSTKASLQGAIFVLKNATGQFLNFNDTNNVEWGTEANATEYTTGADGIITITGLKEGTYYLVEK  
KAPLGYNLLDNSQKVILGDGATDTTNSDNLLVNPTVENNKGTE

Una caja E que contiene un resto glutámico conservado también se ha identificado en Spbl (subrayado), con un ácido glutámico conservado en el resto 423 (negrita). El motivo de la caja E puede ser importante para la formación de estructuras oligoméricas de tipo pilus, y los fragmentos útiles de Spbl pueden incluir el resto de ácido glutámico conservado.

La secuencia de Spb1 de tipo salvaje incluye un codón de metionina interno (Met-162) que tiene una Secuencia TAATGGAGCTGT (SEQ ID NO: 14) de 12 unidades aguas arriba que incluye la secuencia núcleo (subrayada) de

una secuencia Shine-Dalgarno. Se ha encontrado que esta secuencia de Shine-Dalgarno inicia la traducción de una secuencia de Spb1 truncada. Para evitar el inicio de la traducción en este sitio, la secuencia de Shine-Dalgarno puede alterarse en una secuencia codificante de Spb1 utilizada para la expresión. Aunque se puede mutar cualquier nucleótido adecuado para evitar la unión al ribosoma, la secuencia incluye un codón de glicina GGA que es parte del núcleo de Shine-Dalgarno y está en marco con el codón de metionina interno. La tercera base en este codón puede mutarse a C, G o T sin cambiar la glicina codificada, evitando así cualquier cambio en la secuencia de Spb1.

Las composiciones de la invención también pueden incluir un polipéptido definido en la referencia [225] por la secuencia de aminoácidos  $\text{NH}_2\text{-W-X-L-Y-Z-CO}_2\text{H}$ , en donde: X es una secuencia de Spb1; L es un conector opcional; e Y es una secuencia de GBS80; W es una secuencia N-terminal opcional; y Z es una secuencia C-terminal opcional. A continuación se proporcionan más detalles de este polipéptido.

Estas composiciones también pueden comprender uno o más de los antígenos proteicos de GBS descritos anteriormente. En particular, las composiciones de la invención pueden incluir (a) un polipéptido de la secuencia de aminoácidos  $\text{NH}_2\text{-W-X-L-Y-Z-CO}_2\text{H}$ ; y B<sub>1</sub>) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 1 como se describió anteriormente, y/o (b<sub>2</sub>) un polipéptido que comprende (i) una secuencia de aminoácidos que tiene identidad de secuencia con SEQ ID NO 1 como se describió anteriormente y/o (ii) un fragmento de SEQ ID NO 1 como se describió anteriormente.

#### **Polipéptido $\text{NH}_2\text{-W-X-L-Y-Z-CO}_2\text{H}$**

Típicamente, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos X-L-Y, en donde: X es una secuencia de Spb1; L es un conector opcional; e Y es una secuencia de GBS80.

#### **X: Secuencia de Spb1**

El radical X es una secuencia de Spb1. Esta secuencia de Spb1, cuando se administra a un sujeto, provoca una respuesta de anticuerpos que comprende anticuerpos que se unen a la proteína Spb1 de tipo salvaje p.ej. a la proteína de *S. agalactiae* que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (la secuencia de tipo salvaje completa de la cepa COH1).

La secuencia de Spb1 puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad a% con SEQ ID NO: 13. El valor de a se puede seleccionar entre 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o más. La secuencia de Spb1 puede comprender SEQ ID NO: 13.

La secuencia de Spb1 puede comprender un fragmento de SEQ ID NO: 3 y/o de SEQ ID NO: 13. El fragmento generalmente incluirá al menos b aminoácidos de SEQ ID NO: 3/13, en donde b se selecciona entre 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 175, 200 o más. El fragmento generalmente incluirá al menos un epítipo de célula T o, preferiblemente, un epítipo de célula B de SEQ ID NO: 3/13. Los epítopos de células T y B pueden identificarse mediante los métodos descritos anteriormente. El SEQ ID NO: 13 es en sí mismo un fragmento de SEQ ID NO: 3, como se explicó anteriormente.

La secuencia de Spb1 puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad a% con SEQ ID NO: 13 y comprende un fragmento de SEQ ID NO: 13, como se definió anteriormente.

El radical X generalmente tendrá al menos c aminoácidos de longitud, donde c se selecciona entre 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400 o más.

El radical X generalmente no tendrá más de d aminoácidos de longitud, donde d se selecciona entre 500, 480, 460, 440, 420, 400, 380, 360, 340, 320, 300, 280, 260, 240, 220, 200 o menos.

El radical X generalmente tendrá entre 300 y 500 aminoácidos de longitud p.ej. 350-480, 400-460, 430-450.

La secuencia de Spb1 de tipo salvaje de la cepa COH1 de serotipo III es SEQ ID NO: 3 anterior. Los derivados específicos de los mismos descritos en la sección "Spb1" anterior son aplicables a la secuencia de Spb1 de esta realización de la invención.

#### **Y: Secuencia de GBS80**

El radical Y es una secuencia de GBS80. Esta secuencia de GBS80, cuando se administra a un sujeto, provoca una respuesta de anticuerpos que comprende anticuerpos que se unen a la proteína GBS80 de tipo salvaje p.ej. a la proteína de *S. agalactiae* que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (la secuencia de tipo salvaje completa de la cepa 2603V/R).

La secuencia de GBS80 puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de e% con SEQ ID NO: 9. El valor de e se puede seleccionar entre 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o más. La secuencia de GBS80 puede comprender SEQ ID NO: 9.

La secuencia de GBS80 puede comprender un fragmento de SEQ ID NO: 2 o de SEQ ID NO: 9. El fragmento

generalmente incluirá al menos  $f$  aminoácidos de SEQ ID NO: 2/9, en donde  $f$  se selecciona entre 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 175, 200 o más. El fragmento generalmente incluirá al menos un epítipo de células T o, preferiblemente, de células B de SEQ ID NO: 2/9. El SEQ ID NO: 9 es en sí mismo un fragmento de SEQ ID NO: 2, como se explicó anteriormente.

- 5 La secuencia de GBS80 puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene, al menos, una identidad de e% con SEQ ID NO: 9 y comprende un fragmento de SEQ ID NO: 9, como se definió anteriormente.

El radical Y generalmente tendrá al menos  $g$  aminoácidos de longitud, donde  $g$  se selecciona de 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 420, 440, 460, 480, 500, 520, 540, 560, 580, 600 o más.

- 10 El radical Y generalmente no será más largo de  $h$  aminoácidos de longitud, donde  $h$  se selecciona entre 600, 580, 560, 540, 520, 500, 480, 460, 440, 420, 400, 380, 360, 340, 320, 300, 280, 260, 240, 220, 200 o menos.

El radical Y generalmente tendrá entre 350-550 aminoácidos de longitud p.ej. 400-520, 450-500, 470-490.

- 15 La secuencia de GBS80 de tipo salvaje de la cepa 2603 V/R aislada del serotipo V es SEQ ID NO: 2 anterior. Los derivados específicos de la misma descritos en la sección "GBS80" más arriba son aplicables a la secuencia de GBS80 de esta realización de la invención.

#### L: Conector

- 20 El polipéptido opcionalmente incluye un radical L para conectar los radicales X e Y. El radical L es típicamente una secuencia de aminoácidos corta p.ej. en el intervalo de 2-40 aminoácidos p.ej. que consiste en 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 aminoácidos.

Los conectores generalmente contienen al menos un resto de glicina, lo que facilita la flexibilidad estructural. El conector puede contener, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más restos de glicina. Las glicinas pueden estar dispuestas para incluir al menos dos glicinas consecutivas en una secuencia de dipéptido Gly-Gly, o una secuencia de oligo-Gly más larga es decir Gly<sub>n</sub> donde  $n = 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$  o más, p.ej. SEQ ID NO: 15:

- 25 GGGG

Los conectores pueden estar codificados por codones encontrados en las secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción. Por ejemplo, una secuencia de 6 unidades que es la diana de una enzima de restricción concreta puede codificar un dipéptido. Por lo tanto, la secuencia de reconocimiento para *Bam*HI (GGATCC) codifica Gly-Ser, por lo que un conector puede incluir una secuencia de dipéptido Gly-Ser. Tales secuencias facilitan la clonación y la manipulación.

- 30

Las secuencias conectoras útiles incluyen SEQ ID NO 15 anterior y SEQ ID NO 16, 17 y 18 a continuación:

GGGGSGGGGSGGGG (SEQ ID NO: 16)

GGGGSGGGGSGGGGSEL (SEQ ID NO: 17)

GSGGGG (SEQ ID NO: 18)

- 35 Sin embargo, los conectores preferidos no incluyen una secuencia que comparta 10 o más aminoácidos contiguos en común con una secuencia polipeptídica humana. Por ejemplo, una secuencia conectora rica en glicina que se puede utilizar en la invención es SEQ ID NO: 16 de 14 unidades. Sin embargo, este polímero de 14mero también se encuentra en una proteína de unión a ARN humana (gi: 8051631) y por lo tanto se evita preferiblemente dentro del radical L.

- 40 **W: Secuencia N-terminal**

El radical X puede estar en el extremo N terminal del polipéptido, pero también es posible que tenga aminoácidos aguas arriba de X. Estos aminoácidos opcionales forman un radical W.

- 45 El radical W es típicamente una secuencia de aminoácidos corta p.ej. en el intervalo de 2-40 aminoácidos p.ej. que consiste en 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 aminoácidos.

Los ejemplos de radicales W son secuencias líder que dirigen el tráfico de proteínas, o comprenden secuencias peptídicas cortas que facilitan la clonación o la purificación (p.ej. etiquetas de histidina es decir His<sub>n</sub>, donde  $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$  o más). Otras secuencias de aminoácidos N-terminales adecuadas serán evidentes para los expertos en la técnica.

- 50 En un polipéptido naciente, el radical W puede proporcionar la metionina N-terminal del polipéptido (formil-metionina,

fMet, en bacterias). Sin embargo, se pueden escindir uno o más aminoácidos del extremo N de un radical W naciente, de modo que el radical W en un polipéptido de la invención no incluya necesariamente una metionina N-terminal.

Los radicales W útiles incluyen SEQ ID NO 19:

5 MAS

**Z: Secuencia C-terminal**

El radical Y puede estar en el extremo C-terminal del polipéptido, pero también es posible que tenga aminoácidos aguas abajo de Y. Estos aminoácidos opcionales forman un radical Z.

10 El radical Z es típicamente una secuencia de aminoácidos corta p.ej. en el intervalo de 2-40 aminoácidos p.ej. que consiste en 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 aminoácidos.

15 Los ejemplos de radicales Z incluyen secuencias para dirigir el tráfico de proteínas, secuencias peptídicas cortas que facilitan la clonación o la purificación (p.ej. que comprende etiquetas de histidina es decir His<sub>n</sub> donde n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más), o secuencias que mejoran la estabilidad de la proteína. Otras secuencias de aminoácidos C-terminales adecuadas serán evidentes para los expertos en la técnica, tales como una glutatión-S-transferasa, tiorredoxina, fragmento de 14 kDa de proteína A de *S. aureus*, un péptido biotilado, una proteína de unión a maltosa, una etiqueta FLAG de enteroquinasa, etc. Un radical Z útil comprende la SEQ ID NO 20:

HHHHHH

**Combinaciones útiles**

20 De los diversos radicales X, Y y L, las combinaciones útiles incluyen, pero no están limitadas a:

SEQ ID	W	X	L	Y	Z
21	19	13	17	9	-
22	19	13	17	9	20
23	19	13	18	9	-

MASAETGTITVQDTQKGATYKAYKVFDAEIDNANVSDSNKDGASYLIPQGKEAEYKASTDFNSLFTTTTNGGRTYVTKK  
 DTASANEIATWAKSISANTTPVSTVTESSNNDGTEVINVSQYGYYYVSSSTVNNGAVIMVTSVTPNATIHEKNTDATWGDG  
 GGKTVDQKTYSVGDTVKYTITYKNAVNYHGTEKVYQYVIKDTMPSASVVDLNEGSYEVTITDGSIGNITTLTQGSEKATG  
 KYNLLEENNNFTITIPWAATNPTGNTQNGANDDFYKGINITVTVYTGVLKSGAKPGSADLPENTNIATINPNTSNDD  
 PGQKVTVRDQGITIKKIDGSTKASLQGAIFVLKNATGQFLNFNDTNNVEWGTANATEYTTGADGIIITITGLKEGTYYL  
 VEKKAPLGYNLLDNSQKVI LGDGATDTTNSDNLNLPVENVNKGTEGGGGSGGGGSGGGGSELAEVSQERPAKTTVNIY  
 KLQADSYKSEITSNGGIENKDGVEISNYAKLGDNVKGLQGVQFKRYKVKTDISVDELKLLTVEAADAKVGTILEEGVS  
 LPQKTNAQGLVVDALDSSKNVRYLYVEDLKNSPSNITKAYAVPFVLELVPVANSTGTGFLSEINIYPKNVVTDEPKTDKD  
 VKKLGQDDAGYTI GEEFKWFLKSTIPANLGDYEKFEITDKFADGLTYKSVGKIKIGSKTLNRDEHYTIDEPTVDNQNTL  
 KITFKPEKFKIEIAELLKGMTLVKNQDALDKATANTDDAAFLIEIPVASTINEKAVLGKAIENTFELQYDHTPDKADNPKP  
 SNPPRKPEVHTGGKRFVKKDSTETQTLGGAEFDLLASDGTAVKWTDALIKANTNKNYIAGEAVTGQPIKLSHTDGTFFE  
 IKGLAYAVDANAEGTAVTYKLETKAPEGYVIPDKEIEFTVSQTSYNTKPTDITVDSADATPDTIKNNKRPS (SEQ  
 ID NO: 21)

MASAETGTITVQDTQKGATYKAYKVFDAEIDNANVSDSNKDGASYLIPQGKEAEYKASTDFNSLFTTTTNGGRTYVTKK  
 DTASANEIATWAKSISANTTPVSTVTESSNNDGTEVINVSQYGYYYVSSSTVNNGAVIMVTSVTPNATIHEKNTDATWGDG  
 GGKTVDQKTYSVGDTVKYTITYKNAVNYHGTEKVYQYVIKDTMPSASVVDLNEGSYEVTITDGSIGNITTLTQGSEKATG  
 KYNLLEENNNFTITIPWAATNPTGNTQNGANDDFYKGINITVTVYTGVLKSGAKPGSADLPENTNIATINPNTSNDD  
 PGQKVTVRDQGITIKKIDGSTKASLQGAIFVLKNATGQFLNFNDTNNVEWGTANATEYTTGADGIIITITGLKEGTYYL  
 VEKKAPLGYNLLDNSQKVI LGDGATDTTNSDNLNLPVENVNKGTEGGGGSGGGGSGGGGSELAEVSQERPAKTTVNIY  
 KLQADSYKSEITSNGGIENKDGVEISNYAKLGDNVKGLQGVQFKRYKVKTDISVDELKLLTVEAADAKVGTILEEGVS  
 LPQKTNAQGLVVDALDSSKNVRYLYVEDLKNSPSNITKAYAVPFVLELVPVANSTGTGFLSEINIYPKNVVTDEPKTDKD  
 VKKLGQDDAGYTI GEEFKWFLKSTIPANLGDYEKFEITDKFADGLTYKSVGKIKIGSKTLNRDEHYTIDEPTVDNQNTL  
 KITFKPEKFKIEIAELLKGMTLVKNQDALDKATANTDDAAFLIEIPVASTINEKAVLGKAIENTFELQYDHTPDKADNPKP  
 SNPPRKPEVHTGGKRFVKKDSTETQTLGGAEFDLLASDGTAVKWTDALIKANTNKNYIAGEAVTGQPIKLSHTDGTFFE  
 IKGLAYAVDANAEGTAVTYKLETKAPEGYVIPDKEIEFTVSQTSYNTKPTDITVDSADATPDTIKNNKRPSHHHHHH

(SEQ ID NO: 22)

MASAETGTITVQDTQKGATYKAYKVFDAEIDNANVSDSNKDGASYLIPQGKEAEYKASTDFNSLFTTTTNGGRTYVTKK  
DTASANEIATWAKSISANTTPVSTVTESSNNDGTEVINVSQYGYVVSSTVNNGAVIMVTSVTPNATIEKNTDATWGDG  
GGKTVQDKTYSVGDVTKYTIITYKNAVNYHGTEKVYQYVIKDTMPSASVVDLNEGSYEVTITDGSIGNITTLTQGSEKATG  
KYNLLEENNNFTITIPWAATNPTGNTQNGANDDDFFYKGINITVITYTGVLSGAKPGSADLPENTNIATINPNTSND  
PGQKVTVRDQITIKKIDGSTKASLOGAIFVLKKNATGQFLNFNDTNNVEWGTANATEYTTGADGIITITGLKEGTYYL  
VEKKAPLGYNLLDNSQKVI LGDGATDTTNSDNLLVNPTVENNKGTEGSGGGGELAEVSQERPACTTVNIYKLQADSYS  
EITSNGGIENKDGVEISNYAKLGDNVKGLQGVQFKRYKVKTDISVDELKLLTVEAADAKVGTILEEGVSLPQKTNAQG  
LVVDALDSKSNVRYLYVEDLKNPSNITKAYAVPFVLEL PVANSTGTGFLSEINIYPKNVVTDEPKTDKDKVKKLQDDA  
GYTIGEEFKWFLKSTIPANLGDYKFEITDKFADGLTYKSVGKIKIGSKTLNRDEHYTIDEPTVDNQNTLKITFKPEKF  
KEIAELLKGMTLVKNQDALDKATANTDDAAFLEIPVASTINEKAVLGKAIENTFELQYDHTPKADNPKPSNPPRKPEV  
HTGGKRFVKKDSSTETQTLGGAEFDLLASDGTAVKWTDALIKANTKNYIAGEAVTGQPIKLSHTDGTFEIKGLAYAVD  
ANAEGTAVTYKLETKAPEGYVIPDKEIEFTVSQTSYNTKPTDITVDSADATPDTIKNNKRPS (SEQ ID NO:23)

5 El polipéptido puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia de  $i\%$  con SEQ ID NO: 21. El valor de  $i$  se puede seleccionar entre 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o más. El polipéptido puede comprender SEQ ID NO: 21.

El polipéptido puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia de  $i\%$  con SEQ ID NO: 23. El valor de  $i$  se puede seleccionar entre 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o más. El polipéptido puede comprender SEQ ID NO: 23.

Un polipéptido utilizado con la invención puede comprender una secuencia de aminoácidos que:

- 10 (a) es idéntica (es decir 100% idéntica) a SEQ ID NO: 21 o 23;
- (b) comparte identidad de secuencia con SEQ ID NO: 21 o 23;
- (c) tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 (o más) alteraciones de un solo aminoácido (deleciones, inserciones, sustituciones), que pueden estar en ubicaciones separadas o pueden ser contiguas, en comparación con las secuencias de (a) o (b); y
- 15 (d) cuando se alinea SEQ ID 21 o 23 utilizando un algoritmo de alineamiento por pares, cada ventana móvil de  $x$  aminoácidos del extremo N terminal al extremo C terminal (de modo que para un alineamiento que se extiende a  $p$  aminoácidos, donde  $p > x$ , existen  $p-x+1$  de tales ventanas) tiene al menos  $x \cdot y$  aminoácidos alineados idénticos, donde:  $x$  se selecciona entre 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200; y
- 20  $y$  se selecciona de 0,50, 0,60, 0,70, 0,75, 0,80, 0,85, 0,90, 0,91, 0,92, 0,93, 0,94, 0,95, 0,96, 0,97, 0,98, 0,99; y si  $x \cdot y$  no es un número entero, se redondea al número entero más cercano. El algoritmo preferido de alineamiento por pares es el algoritmo de alineamiento global de Needleman-Wunsch [226], que utiliza parámetros por defecto (p.ej. con una penalización de apertura de Hueco = 10,0, y con una penalización de extensión de Hueco = 0,5, utilizando la matriz de puntuación EBLOSUM62). Este algoritmo se implementa convenientemente en herramienta *needle* en el paquete EMBOSS [227].
- 25 Dentro del grupo (c), las deleciones o sustituciones pueden estar en el extremo N-terminal y/o el extremo C-terminal, o pueden estar entre los dos extremos. Por lo tanto, un truncamiento es un ejemplo de una deleción. Los truncamientos pueden implicar la deleción de hasta 40 (o más) aminoácidos en el extremo N-terminal y/o el extremo C-terminal.

30 Las secuencias de Spb1 y GBS80 en los polipéptidos se pueden obtener a partir de una o más cepas de GBS. Por ejemplo, los SEQ ID NO: 21 y 23 incluyen la secuencia de Spb1 de la cepa COH1 y la secuencia de GBS80 de la cepa 2603V/R.

### Polipéptidos

35 Los polipéptidos, o radicales individuales, pueden, en comparación con SEQ ID NO: 2, 3, 9, 10, 13, 21 o 23, incluir uno o más (p.ej. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.) reemplazos de aminoácidos conservativos es decir reemplazos de un aminoácido por otro que tiene una cadena lateral relacionada. Los aminoácidos genéticamente codificados generalmente se dividen en cuatro familias: (1) ácidos es decir aspartato, glutamato; (2) alcalinos es decir lisina, arginina, histidina; (3) no polares es decir alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) polares sin carga es decir glicina, asparragina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. La

40 fenilalanina, el triptófano y la tirosina a veces se clasifican conjuntamente como aminoácidos aromáticos. En general, la sustitución de aminoácidos individuales dentro de estas familias no tiene un efecto importante sobre la actividad biológica. Los polipéptidos pueden tener uno o más (p.ej. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.) deleciones de un solo aminoácido con respecto a una secuencia de referencia. Los polipéptidos también pueden incluir una o más (p.ej. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.) inserciones (p.ej. cada una de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos) con respecto a una secuencia de referencia.

Los polipéptidos se pueden preparar de muchas maneras, como se describió anteriormente. Los polipéptidos también pueden adoptar diversas formas (p.ej. nativa, fusiones, glicosilada, no glicosilada, lipidada, no lipidada, fosforilada, no fosforilada, miristoilada, no miristoilada, monomérica, multimérica, particulada, desnaturalizada, etc.), como se describió anteriormente. Los polipéptidos se proporcionan preferiblemente en forma purificada o sustancialmente purificada, como se describió anteriormente.

El término "polipéptido" se refiere a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados y puede estar interrumpido por no aminoácidos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácido que se ha modificado naturalmente o por intervención; por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, tal como la conjugación con un componente de marcaje. También se incluyen dentro de la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Los polipéptidos pueden aparecer como cadenas simples o cadenas asociadas. Los polipéptidos pueden estar glicosilados de forma natural o no natural (es decir el polipéptido tiene un patrón de glicosilación que difiere del patrón de glicosilación encontrado en el polipéptido natural correspondiente).

Los polipéptidos pueden tener al menos 40 aminoácidos de longitud (p.ej. al menos 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 300, 350, 400, 450, 500 o más). Los polipéptidos pueden ser más cortos que 1100 aminoácidos.

### **Preinmunización**

En un segundo aspecto, la invención proporciona un método para inmunizar a un paciente contra la infección por GBS que comprende la etapa de administración al paciente de un producto conjugado que es un sacárido capsular de GBS conjugado con un toxoide diftérico o derivado del mismo, en donde el paciente ha sido preinmunizado con un toxoide diftérico o derivado del mismo. Los productos conjugados de GBS son los de la composición inmunogénica del primer aspecto de la invención, como se describió anteriormente. En otras palabras, las composiciones inmunogénicas del primer aspecto de la invención se utilizan en el segundo aspecto de la invención. El sacárido capsular conjugado con el toxoide diftérico o derivado del mismo en la composición es de los serotipos Ia, Ib y III de GBS. En este aspecto, todos los sacáridos capsulares de GBS en la composición están conjugados con un toxoide diftérico o un derivado del mismo. Cuando el portador o el antígeno de preinmunización es un derivado de un toxoide diftérico, ese derivado preferiblemente permanece inmunológicamente reactivo de forma cruzada con Dt, y es preferiblemente CRM197. Los autores de la presente invención han descubierto que los productos conjugados que son sacáridos capsulares de GBS conjugados con un toxoide diftérico o derivado del mismo no parecen sufrir supresión epitópica inducida por portador (o "supresión por portador", como se conoce generalmente), particularmente supresión que surge cebado del portador. Como se analiza a continuación, la "supresión por portador" es el fenómeno mediante el cual la preinmunización de un animal con una proteína portadora evita que posteriormente provoque una respuesta inmunitaria contra un nuevo epitopo antigénico que se presenta en ese portador [228]. En contraste con este fenómeno conocido, los autores de la presente invención han descubierto que la respuesta inmunitaria a los productos conjugados de sacárido capsular de GBS-toxoide diftérico o derivado del mismo se puede mejorar de hecho mediante preinmunización con el toxoide diftérico o derivado del mismo.

Como se informa en la referencia 229, donde varios antígenos de vacuna contienen el mismo componente de proteína (que se utiliza como un inmunógeno y/o como una proteína portadora en un producto conjugado), existe la posibilidad de interferencia entre esos antígenos. En la referencia 229, la respuesta inmunitaria contra un antígeno que se conjugó con un portador de toxoide tetánico (Tt) se suprimió mediante la inmunidad preexistente contra Tt.

La referencia 230 informa de cómo una combinación de vacunas D-T-P con una vacuna de producto conjugado de Hib se vio afectada adversamente cuando el portador para el producto conjugado Hib era el mismo que el antígeno tetánico de la vacuna D-T-P. Los autores concluyen que este fenómeno de "supresión por portador", que surge de la interferencia causada por un portador de proteína común, debe tenerse en cuenta cuando se introducen vacunas que incluyen productos conjugados múltiples.

En contraste con las referencias 229 y 230, la referencia 231 informó de que el cebado con toxoide tetánico no tuvo un impacto negativo en la respuesta inmunitaria contra un producto conjugado de Hib-Tt administrado posteriormente, pero se observó supresión en pacientes con anticuerpos anti-Tt adquiridos por vía materna. Sin embargo, en la referencia 232, se informó de un efecto de "supresión epitópica" para un producto conjugado de péptido basado en Tt en pacientes que tenían anticuerpos anti-Tt existentes que resultaban de la vacunación contra el tétanos.

En la referencia 233, se sugirió que un producto conjugado que tenía CRM197 (un mutante destoxificado de toxina diftérica) como portador puede ser ineficaz en niños que no habían recibido previamente toxina diftérica como parte de una vacuna (p.ej. como parte de una vacuna D-T-P o D-T). Este trabajo se desarrolló adicionalmente en la referencia 234, donde se observó que persistía un efecto de cebado del portador por inmunización D-T para inmunización posterior con productos conjugados de Hib.

En la referencia 235, los autores encontraron que la preinmunización con una proteína portadora de toxoide difterico o tetánico reducía el aumento de los niveles de anticuerpos anti-Hib después de una inmunización posterior con el sacárido capsular Hib conjugado con esos portadores, resultando igualmente afectadas IgG1 e IgG2. Las respuestas a las porciones portadoras de los productos conjugados también se suprimieron. Además, se observó una supresión más general no específica de epítipo, ya que se observó que la preinmunización con un producto conjugado afectaba las respuestas inmunitarias tanto frente al portador como frente a las porciones de sacárido de un segundo producto conjugado que se administró cuatro semanas después.

El uso de diferentes proteínas portadoras en una única vacuna de producto conjugado neumocócico multivalente se informa en la referencia 236, utilizándose múltiples portadores para evitar la supresión del portador. Los autores pronostican que existe una carga máxima de una proteína portadora que puede tolerarse en una vacuna de producto conjugado multivalente sin dar lugar a interferencia negativa. En la referencia 237 se informó de que las vacunas de producto conjugado neumocócico que incluyen proteínas portadoras mixtas provocaban, en paralelo a la respuesta antineumocócica, respuestas de refuerzo accidentales a los portadores.

En la referencia 238, una investigación de si los refuerzos de difteria y tétanos podrían administrarse con productos conjugados de serogrupo C meningocócico monovalente, se encontró que los títulos contra el producto conjugado meningocócico se redujeron cuando el portador era portador de toxoide tetánico y el paciente había recibido inmunización previa con una vacuna que contenía tétanos.

Además del problema de cebado con un portador que tiene un impacto negativo en las respuestas inmunitarias contra los productos conjugados de sacáridos, también puede ocurrir lo contrario, es decir la inmunización con un producto conjugado puede tener un impacto negativo en las respuestas inmunitarias contra el portador [239].

Por lo tanto, este segundo aspecto de la invención proporciona un método para inmunizar a un paciente contra la infección por GBS que comprende la etapa de administración al paciente de un producto conjugado que es un sacárido capsular de GBS conjugado con un toxoide diftérico o derivado del mismo, en donde el paciente ha sido preinmunizado con un toxoide diftérico o derivado del mismo. Este aspecto también proporciona un producto conjugado que es un sacárido capsular de GBS conjugado con un toxoide diftérico o derivado del mismo para su uso en la inmunización de un paciente contra la infección por GBS, en donde el paciente ha sido preinmunizado con un toxoide diftérico o un derivado del mismo. Este aspecto proporciona adicionalmente el uso de un producto conjugado que es un sacárido capsular de GBS conjugado con un toxoide diftérico o derivado del mismo en la fabricación de un medicamento para inmunizar a un paciente contra la infección por GBS, en donde el paciente ha sido preinmunizado con un toxoide diftérico o derivado del mismo.

### ***El paciente preinmunizado***

Este paciente que se va a inmunizar ha sido preinmunizado con un toxoide diftérico o derivado del mismo. El toxoide diftérico o derivado del mismo puede haberse administrado como portador en un producto conjugado de un sacárido capsular de un organismo distinto de GBS y un toxoide diftérico o un derivado del mismo. La preinmunización típica habrá incluido: un antígeno de toxoide diftérico; un producto conjugado de sacárido capsular Hib que utiliza un toxoide diftérico o un portador CRM197; y/o un producto conjugado de sacárido capsular neumocócico que utiliza un toxoide diftérico o un portador CRM197.

El paciente habrá recibido al menos una (p.ej. 1, 2, 3 o más) dosis del antígeno o antígenos de preinmunización, y esa dosis (o la más temprana de múltiples dosis) habrá sido administrada al paciente al menos seis (p.ej. 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 36, 48, 60, 120, 180, 240, 300 o más) meses antes de la inmunización con los productos conjugados de GBS de acuerdo con este aspecto de la invención. En un grupo preferido de pacientes, la preinmunización tuvo lugar en el plazo de los 3 años posteriores al nacimiento p.ej. en el plazo de los 2 años posteriores al nacimiento, en el plazo de 1 año posterior al nacimiento, en el plazo de los 6 meses posteriores al nacimiento, o incluso en el plazo de los 3 meses, 2 meses o 1 mes posteriores al nacimiento. Los pacientes adecuados para ser inmunizados de acuerdo con este aspecto de la invención se han descrito anteriormente en la sección *Métodos de tratamiento*.

Cuando el antígeno de preinmunización es un toxoide diftérico, el paciente típicamente habrá recibido el toxoide como antígeno "D" en una preinmunización de D-T-P o D-T. Tales inmunizaciones generalmente se administran a los recién nacidos a las edades de 2, 3 y 4 meses. Cuando la inmunización incluye una vacuna contra la tos ferina, esa vacuna puede ser una vacuna contra la tos ferina de células completas o celular ("Pw"), pero es preferiblemente una vacuna contra la tos ferina acelular ("Pa"). Las vacunas Pa de preinmunización generalmente incluirán uno, dos o tres de los siguientes, antígenos de *B. pertussis* bien conocidos y bien caracterizados: (1) toxoide pertussis ('PT'), destoxificado por medios químicos o por mutagénesis dirigida al sitio p.ej. el mutante '9K/129G' [240]; (2) hemaglutinina filamentosa ('FHA'); (3) pertactina (también conocida como proteína de membrana externa de '69 kiloDalton'). Las vacunas contra la tos ferina acelulares también pueden incluir aglutinógeno 2 y/o aglutinógeno 3. El antígeno "T" en una preinmunización de D-T-P es típicamente un toxoide tetánico.

Cuando el antígeno de preinmunización es un toxoide diftérico, el paciente puede recibir también, o alternativamente, el toxoide como proteína portadora de un producto conjugado de proteína-sacárido. Tales productos conjugados incluyen el producto conjugado HIB "PRP-D" [véase la Tabla 14-7 de la ref. [241] p.ej. el

producto ProHIBIT™.

5 Cuando el antígeno de preinmunización es CRM197, el paciente típicamente habrá sido preinmunizado con un producto conjugado de Hib y/o un producto conjugado neumocócico multivalente. Tales inmunizaciones generalmente se administran a los recién nacidos a las edades de 2, 3 y 4 meses. Los productos conjugados de Hib que utilizan un portador CRM197 incluyen los productos conjugados "HbOC" [Tabla 14-7 de la ref. 241] p.ej. el producto HibTITER™. Los productos conjugados neumocócicos que utilizan un portador CRM197 incluyen las mezclas heptavalentes PCV7 p.ej. la vacuna PrevNar™ [242]. El paciente también puede haber sido preinmunizado con un producto conjugado meningocócico del serogrupo C ('MenC'). Los productos conjugados MenC que utilizan el portador CRM197 incluyen Meninvact™/Menjugate™ [243] y Meningitec™.

10 Cuando la preinmunización era con un antígeno conjugado, el paciente casi inevitablemente también habría recibido una pequeña cantidad de toxoide diftérico libre (o derivado) como resultado de la contaminación de bajo nivel del producto conjugado (p.ej. causado por la hidrólisis del producto conjugado durante el almacenamiento), pero esta pequeña cantidad típicamente no será adecuada para proporcionar una respuesta inmunitaria significativa.

15 El toxoide diftérico es una proteína bien conocida y bien caracterizada [p.ej. véase el capítulo 13 de la ref. 241] que puede obtenerse tratando la exotoxina ribosilante de ADP de *Corynebacterium diphtheriae* con un compuesto químico inactivante, tal como formalina o formaldehído. CRM197 también es bien conocido y está bien caracterizado [244-247], y se ha utilizado ampliamente como portador en vacunas de sacáridos conjugadas. CRM197 y Dt comparten muchos epítomos portadores.

20 El resultado de la preinmunización es que el sistema inmunitario del paciente ha estado expuesto a los antígenos de preinmunización. Para la preinmunización con toxoide diftérico (Dt), esto generalmente significa que el paciente habrá presentado una respuesta de anticuerpos anti-Dt (por lo general para proporcionar un título anti-Dt > 0,01 UI/ml) y poseerá linfocitos B y/o T de memoria específicos para Dt es decir la preinmunización con Dt es típicamente adecuada para provocar una respuesta inmunitaria anamnésica anti-Dt en el paciente. Para la preinmunización en donde Dt (o derivado) es un portador de un sacárido dentro de un producto conjugado, la preinmunización habrá  
25 provocado una respuesta antisacárido y el paciente poseerá linfocitos B y/o T de memoria específicos para el sacárido es decir la preinmunización es típicamente adecuada para provocar una respuesta inmunitaria anamnésica antisacárido en el paciente. La preinmunización fue preferiblemente adecuada para provocar inmunidad protectora en el paciente p.ej. contra la enfermedad de la difteria.

30 Por lo tanto, los pacientes que se van a inmunizar de acuerdo con este aspecto de la invención son distintos de los pacientes en general, ya que son miembros de un subgrupo de la población general cuyos sistemas inmunitarios ya han montado una respuesta inmunitaria a los antígenos de preinmunización, de manera que la inmunización de acuerdo con este aspecto con un producto conjugado de GBS que incluye un portador de toxoide diftérico (o derivado del mismo), provoca una respuesta inmunitaria diferente en el subconjunto que en pacientes que no han montado previamente una respuesta inmunitaria a los antígenos de preinmunización. Se prefieren los pacientes que  
35 han sido preinmunizados con Dt (o derivado) como portador de un producto conjugado (particularmente de un producto conjugado de Hib). Los pacientes particularmente preferidos se han preinmunizado con Dt (o derivado) como portador de un producto conjugado y también con Dt como un inmunógeno no conjugado.

40 Además de haberse preinmunizado con un toxoide diftérico (o derivado), en forma conjugada o no conjugada, el paciente puede haberse preinmunizado con otros antígenos. Tales antígenos incluyen, pero no se limitan a: uno o varios antígenos de tos ferina (véase más arriba); toxoide tetánico - véase más arriba; *Haemophilus influenzae* tipo B - véase más arriba; antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg); poliovirus, tal como una vacuna de poliovirus inactivado (IPV); *Streptococcus pneumoniae* - véase más arriba; virus de la influenza; BCG; antígenos del virus de la hepatitis A; virus del sarampión; virus de la parotiditis; virus de rubéola; virus varicela; etc.

45 El paciente puede o no haberse preinmunizado con uno o más productos conjugados de GBS. En algunas realizaciones preferidas, en el momento en que un paciente recibe por primera vez un producto conjugado de GBS, ya se ha preinmunizado con Dt (o derivado). En otras realizaciones, se administra un producto conjugado de GBS a un paciente que ya ha sido preinmunizado con (i) Dt o un derivado y (ii) un producto conjugado de GBS.

#### **Portadores de toxoide tetánico**

50 También se describe en la presente memoria un método para inmunizar a un paciente contra la infección por GBS que comprende la etapa de administración al paciente de un producto conjugado que es un sacárido capsular de GBS conjugado con un toxoide tetánico o un derivado del mismo, en donde el paciente ha sido preinmunizado con un toxoide tetánico o derivado del mismo. Este método utiliza un producto conjugado que es un sacárido capsular de GBS conjugado con un toxoide tetánico o derivado del mismo para su uso en la inmunización de un paciente contra la infección por GBS, en donde el paciente ha sido preinmunizado con un toxoide tetánico o un derivado del mismo.  
55 Este método proporciona adicionalmente el uso de un producto conjugado que es un sacárido capsular de GBS conjugado con un toxoide tetánico o derivado del mismo en la fabricación de un medicamento para inmunizar a un paciente contra la infección por GBS, en donde el paciente ha sido preinmunizado con un toxoide tetánico o derivado del mismo. Los productos conjugados que son sacáridos capsulares de GBS conjugados con un toxoide tetánico o

un derivado del mismo pueden no sufrir supresión por portador, particularmente supresión que surge del cebado del portador. La respuesta inmunitaria a los productos conjugados de sacárido capsular de GBS-toxoide tetánico o derivados del mismo puede de hecho mejorarse mediante preinmunización con el toxoide tetánico o derivado del mismo.

- 5 El toxoide tetánico es una proteína bien conocida [p.ej. véase el capítulo 27 de la ref. 241], y se puede obtener inactivando la exotoxina ribosilante de ADP de *Clostridium tetani*. Los pacientes típicamente habrán recibido toxoide tetánico como antígeno "T" en una preinmunización D-T-P o D-T, o como proteína portadora en un producto conjugado. Tales productos conjugados incluyen el producto conjugado de Hib 'PRP-T' [véase la Tabla 14-7 de la ref. 241] p.ej. los productos ActHIB™, OmniHIB™ e HIBERIX™.

## 10 **General**

El término "que comprende" abarca "que incluye" así como "que consiste" p.ej. una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional p.ej. X + Y.

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

- 15 La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente" p.ej. una composición que está "sustancialmente libre" de Y puede estar completamente libre de Y. Cuando sea necesario, la palabra "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la invención.

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

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

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

- 30 A menos que se indique lo contrario, la identidad entre las secuencias polipeptídicas se determina preferiblemente mediante el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman implementado en el programa MPSRCH (Oxford Molecular), utilizando una búsqueda de hueco afín con parámetros de *penalización de abertura de hueco* = 12 y *penalización por extensión de hueco* = 1.

## **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 muestra la diferencia entre las estructuras repetitivas en los serotipos Ia y III de GBS.

- 35 La figura 2 muestra las estructuras repetitivas de los sacáridos capsulares en los serotipos, Ia, Ib, II, III y V de GBS.

La Figura 3 muestra la estructura repetitiva de la forma desialilada del sacárido capsular de serotipo V de GBS.

La Figura 4 muestra el efecto del cebado con CRM197 antes de la administración de un producto conjugado de sacárido capsular de serotipo III de GBS y CRM197, con y sin coadyuvante.

## **Modos de llevar a cabo la invención**

### 40 **Producción de producto conjugado**

- 45 Los sacáridos capsulares purificados de los serotipos Ia, Ib y III de *Streptococcus agalactiae* se conjugaron con una proteína portadora mediante oxidación con peryodato seguida de aminación reductiva (ref. 2). El sacárido capsular desialilado purificado del serotipo V de *Streptococcus agalactiae* se conjugó con una proteína portadora mediante oxidación con peryodato seguida de aminación reductiva (ref. 14). La proteína portadora en la mayoría de los casos fue CRM197. El toxoide tetánico se utilizó como proteína portadora cuando se indicó específicamente.

### **Estudio con ratones (1).**

En este estudio, se evaluó el efecto del coadyuvante sobre la eficacia y la inmunogenicidad de los productos conjugados de serotipo Ia, Ib y III de GBS, ya sea como vacunas monovalentes o combinadas, en un modelo de ratón de sensibilización materno-neonatal activo.

- 50 El modelo de ratón de sensibilización materno-neonatal, adaptado de la referencia 248, se utiliza para evaluar la

eficacia en neonatos de anticuerpos específicos adquiridos transplacentariamente de madres activamente vacunadas. Específicamente, los ratones hembra CD-1, con edades comprendidas entre 5-6 semanas de Charles River Laboratories (Calco, Italia), son vacunados por inyección intraperitoneal con dos o tres inmunizaciones los días 1, 21 y eventualmente 35, con o sin coadyuvante. Después de la última inmunización, los ratones se crían y se mantienen hasta el parto. Se utiliza un inóculo de una cepa de GBS (0,05 ml de caldo Todd-Hewitt), letal para 90% de las crías no inmunizadas (100-1000 veces DL50), para sensibilizar los ratones recién nacidos. La sensibilización es por vía intraperitoneal en el plazo de de las 48 horas posteriores al nacimiento. Se registra el número de crías supervivientes a las 72 horas y se comparan las tasas de supervivencia en todos los grupos tratados utilizando la prueba exacta de Fisher. En un grupo de control, las madres reciben PBS por la misma ruta y se utiliza el mismo cronograma de dosificación. Dos semanas después de la última inmunización, se recogen muestras de sangre para la evaluación de la inmunogenicidad utilizando dos ensayos *in vitro* (los ensayos ELISA y de Opsonofagocitosis descritos a continuación).

El ensayo ELISA se realiza para determinar el título de anticuerpos específicos de GBS producidos después de la inmunización. El ELISA también se utiliza para cuantificar la IgG total contra cada antígeno de sacárido capsular. Se analiza el suero de cada ratón individual y se calcula el título medio geométrico (GMT) para cada grupo. Los títulos de anticuerpo para los tipos de sacárido capsular Ia, Ib y III se expresan como unidad ELISA de ratón (UER) y se calculan en base al método de ensayo de la línea de referencia.

El ensayo de Opsonofagocitosis (OPA) se realiza para evaluar el título de anticuerpos inducidos por vacuna capaces de destruir GBS mediado por complemento (utilizando el enfoque descrito en la referencia 249). El ensayo se realiza combinando los siguientes componentes: bacterias, células fagocíticas (PMN extraídos de sangre humana o la línea celular HL-60 diferenciada), complemento y suero inmunitario. Se cultivan en placa alícuotas de la mezcla de reacción antes y después de una incubación de 1 hora a 37°C para determinar las unidades formadoras de colonias (UFC) restantes. La cantidad de destrucción opsonofagocítica (log destrucción) se determina restando el log del número de colonias supervivientes del log del número de UFC presentes en el momento inicial. Se utiliza un suero preinmunitario y un complemento inactivado por calor sin PMN como control negativo. El título bactericida se expresa como una dilución de suero recíproca que conduce a la reducción de 50% de las bacterias.

En este estudio, se inmunizaron ratones hembra CD1 con dos dosis (1 µg cada una) de los tres productos conjugados diferentes en presencia de coadyuvante (hidróxido de aluminio o MF59) los días 0 y 21. Los neonatos se sensibilizaron con cepas de tipo específico como se muestra a continuación en la Tabla 1.

**Tabla 1:** Determinación del nivel de protección y títulos de anticuerpo obtenidos con productos conjugados de serotipo Ia, Ib y III de GBS/IRM197 en presencia de hidróxido de aluminio o MF59 en el modelo de ratón de sensibilización materno-neonatal activo.

Antígeno	Coadyuvante	Títulos de GMT	Cepa de Sensibilización (tipo)	Vivo/Tratado	Supervivencia (%)
CRM-Ia	Al-H	281	A909 (Ia)	77/80	96
CRM-Ia	MF59	1253	A909 (Ia)	66/75	88
PBS	-	-	A909 (Ia)	1/65	1
CRM-Ib	Al-H	1097	7357B (Ib)	65/70	93
CRM-Ib	MF59	7843	7357B (Ib)	47/60	78
PBS	-	-	7357B (Ib)	6/70	8
CRM-III	Al-H	234	COH1 (III)	44/45	98
CRM-III	MF59	898	COH1 (III)	68/80	85
PBS	-	-	COH1 (III)	0/68	0
- No aplicable					

Se lograron altos niveles de protección con las vacunas monovalentes para los tres serotipos con hidróxido de aluminio y MF59. Sin embargo, se obtuvieron tasas de supervivencia ligeramente inferiores con el coadyuvante MF59 incluso en presencia de títulos de anticuerpo más elevados.

En un experimento adicional, los ratones se inmunizaron con tres dosis de combinaciones a 1 µg de cada producto conjugado en presencia de coadyuvante los días 0, 21 y 35. Los neonatos se sensibilizaron con cepas de tipo específico como se muestra a continuación en la Tabla 2.

**Tabla 2:** Determinación del nivel de protección y los títulos de anticuerpo obtenidos con combinaciones de productos conjugados de serotipo Ia, Ib y III de GBS/CRM197 en presencia o ausencia de coadyuvante en el modelo de ratón de sensibilización materno-neonatal activo.

Antígeno	Coadyuvante	Títulos de GMT	Cepa de Sensibilización (tipo)	Vivo/Tratado	Supervivencia (%)
Combo	Al-H	1279	090 (I a)	27/30	90
Combo	MF59	4592	090 (I a)	61/65	94
Combo	Sin coadyuvante	218	090 (I a)	59/77	77
PBS	-	-	090 (I a)	0/70	0
Combo	Al-H	2086	H36B (Ib)	64/70	91
Combo	MF59	5921	H36B (Ib)	65/80	81
Combo	Sin coadyuvante	386	H36B (Ib)	56/70	80
PBS	-	-	H36B (Ib)	6/79	7
Combo	Al-H	596	M781 (III)	30/40	75
Combo	MF59	1978	M781 (III)	70/70	100
Combo	Sin coadyuvante	163	M781 (III)	60/79	76
PBS	-	-	M781 (III)	3/77	4

Combo = CRM197-Ia + CRM197-Ib + CRM197-III; - : No aplicable

- 5 Se lograron altos niveles de protección con las vacunas combinadas en las tres formulaciones en presencia o ausencia de coadyuvante, aunque se obtuvieron títulos de anticuerpo más bajos en ausencia de coadyuvante.

**Estudio con ratones (2)**

10 En este estudio, se evaluó el efecto de la liofilización sobre la eficacia y la inmunogenicidad de los productos conjugados de serotipo Ia, Ib y III/CRM197 en el modelo de ratón de sensibilización materno-neonatal activo. Los ratones se inmunizaron con dos dosis (1 µg cada una) de los tres productos conjugados diferentes, en presencia o ausencia de coadyuvante los días 0 y 21. Los neonatos se sensibilizaron con cepas de tipo específico como se muestra a continuación en la Tabla 3.

15 **Tabla 3:** Determinación del nivel de protección, títulos de anticuerpo y títulos bactericidas alcanzados por los productos conjugados de serotipo Ia, Ib y III/CRM197, cuando se administran a ratones en forma de antígeno líquido o liofilizado en presencia o ausencia de hidróxido de aluminio en el modelo de ratón de sensibilización materno-neonatal activo.

Antígeno	Coadyuvante	Título de GMT	Título bactericida	Cepa de Sensibilización (tipo)	Vivo/Tratado	Supervivencia (%)
CRM-Ia liofilizado	PBS	48	< 100	090 (Ia)	46/78	59
CRM-Ia liofilizado	Al-H	1201	567	090 (Ia)	47/51	92
CRM-Ia Líquido	PBS	14	< 100	090 (Ia)	11/60	18
CRM-Ia Líquido	Al-H	901	436	090 (Ia)	58/60	96
PBS	Al-H	-	-	090 (Ia)	1/57	2
CRM-Ib Liofilizado	PBS	23	366	H36B (Ib)	ND	ND
CRM-Ib Liofilizado	Al-H	172	2146	H36B (Ib)	ND	ND
CRM-Ib Líquido	PBS	27	375	H36B (Ib)	12/40	30

Antígeno	Coadyuvante	Título de GMT	Título bactericida	Cepa de Sensibilización (tipo)	Vivo/Tratado	Supervivencia (%)
CRM-Ib Líquido	Al-H	169	1756	H36B (Ib)	73/78	93
PBS	Al-H	-	-	H36B (Ib)	6/72	8
CRM-III Liofilizado	PBS	59	419	M781 (III)	ND	ND
CRM-III Liofilizado	Al-H	429	1861	M781 (III)	ND	ND
CRM-III Líquido	PBS	127	1707	M781 (III)	48/50	96
CRM-III Líquido	Al-H	198	1100	M781 (III)	44/45	98
PBS	Al-H	-	-	M781 (III)	5/66	7

- No aplicable; ND: no determinado

El procedimiento de liofilización no afectó a la inmunogenicidad de los productos conjugados de GBS. Los títulos de anticuerpo y los títulos bactericidas fueron comparables en ratones que recibieron formulaciones tanto líquidas como liofilizadas.

#### 5 **Estudio con ratones (3)**

En este estudio, se evaluó el efecto de la liofilización sobre la eficacia del producto conjugado de serotipo V/CRM197 en el modelo de ratón de sensibilización materno-neonatal activo. Los ratones se inmunizaron con dos dosis (1, 5 o 10 µg cada una) de los productos conjugados en presencia o ausencia de coadyuvante los días 0 y 21. Los neonatos se sensibilizaron con una cepa de tipo V. Los resultados se muestran en la Tabla 4 a continuación.

- 10 **Tabla 4:** Determinación del nivel de protección logrado por el producto conjugado de serotipo V/CRM197, cuando se administra a ratones en forma de antígeno líquido o liofilizado en presencia o ausencia de hidróxido de aluminio en el modelo de ratón de sensibilización materno-neonatal activo.

Antígeno	Sin coadyuvante	Hidróxido de aluminio
	Muerto/tratado (% de supervivencia)	
CRM-V Liofilizado (1 µg)	20/30 (33)	13/44 (70)
CRM-V Liofilizado (5 µg)	28/39 (28)	31/40 (22)
CRM-V Liofilizado (10 µg)	40/54 (26)	33/49 (33)
CRM-V Líquido (1 µg)	63/70 (10)	19/47 (59)
CRM-V Líquido (5 µg)	29/40 (27)	37/60 (38)
CRM-V Líquido (10 µg)	46/52 (11)	46/70 (34)
Placebo liofilizado	108/119 (9)	70/88 (20)

- 15 El procedimiento de liofilización no afectó a la inmunogenicidad del producto conjugado de GBS. Las tasas de supervivencia fueron comparables en los ratones que recibieron formulaciones tanto líquidas como liofilizadas.

#### **Estudio con ratones (4)**

- 20 En este estudio, se evaluó el efecto de diferentes dosis sobre la eficacia de una mezcla de los productos conjugados de serotipo Ia, Ib, III y V de GBS en el modelo de ratón de sensibilización materno-neonatal activo. Los ratones se inmunizaron con dos dosis de la combinación a 0,2, 1 o 5 µg de cada uno de los productos conjugados de serotipo Ia, Ib, III y V de GBS sin coadyuvante los días 0 y 21. Los neonatos se sensibilizaron con cepas específicas de tipo como se muestra más abajo en la siguiente Tabla 5.

**Tabla 5:** Determinación del nivel de protección obtenido con combinaciones de productos conjugados de serotipo Ia, Ib, III y V de GBS/CRM197 en el modelo de ratón de sensibilización materno-neonatal activo.

Antígeno	Dosis	Cepa de Sensibilización (tipo)			
		090 (I a)	H36B (Ib)	M781 (III)	CJB111 (V)
		Muerto/tratado (% de supervivencia)			
Combo	5 µg cada uno	17/60 (72)	13/70 (81)	18/70 (74)	20/68 (70)
Combo	1 µg cada uno	23/70 (67)	18/70 (74)	6/60 (90)	44/66 (33)
Combo	0.2 µg cada uno	14/51 (72)	25/79 (68)	18/78 (77)	41/60 (32)
PBS	0	57/58 (2)	49/50 (2)	49/50 (2)	45/50 (10)

Combo = CRM197-Ia + CRM197-Ib + CRM197-III + CRM197-V

Una dosis más alta de producto conjugado de serotipo V de GBS elevó el nivel de protección.

5 **Estudio con ratones (5)**

En este estudio, se evaluó el efecto de diferentes números de dosis sobre la eficacia de una mezcla de productos conjugados de serotipo Ia, Ib, III y V de GBS en el modelo de ratón de sensibilización materno-neonatal activo. Los ratones se inmunizaron con una, dos o tres dosis (1 µg de cada producto conjugado) de la combinación en presencia de un coadyuvante de alum. los días 0, 21 y 35, según corresponda. Los neonatos fueron sensibilizados con cepas de tipo específico como se muestra más abajo en la siguiente Tabla 6.

**Tabla 6:** Determinación del nivel de protección obtenido con combinaciones de producto conjugado de serotipo Ia, Ib, III y V de GBS/CRM197 en presencia de coadyuvante en el modelo de ratón de sensibilización materno-neonatal activo.

Antígeno	Dosis	Cepa de Sensibilización (tipo)			
		090 (Ia)	H36B (Ib)	M781 (III)	CJB111 (V)
		Muerto/tratado (% de supervivencia)			
Combo	3	5/80 (94)	4/60 (93)	1/50 (98)	32/70 (54)
Combo	2	6/80 (92)	11/60 (82)	1/70 (98)	42/57 (26)
Combo	1	61/90 (32)	21/50 (58)	4/60 (93)	52/58 (10)
PBS	3	50/50 (0)	49/50 (2)	52/58 (10)	59/60 (2)

Combo = CRM197-Ia + CRM197-Ib + CRM197-III + CRM197-V

15 Los títulos bactericidas se midieron después de la administración de la mezcla de productos conjugados de serotipo Ia, Ib, III y V en este estudio. Los títulos de OPA se muestran a continuación:

	Ia	Ib	III	V
Post-3	515	>900	1174	135
Post-2	<100	455	525	<100
Post-1	<100	182	358	<100

El número de inmunizaciones afectó fuertemente a la respuesta inmunitaria al producto conjugado de serotipo V de GBS.

20 **Estudio con ratones (6)**

En este estudio, se evaluó la eficacia de una mezcla de los productos conjugados de serotipo Ia, Ib, III y V de GBS en comparación con el producto conjugado de serotipo V de GBS solo en el modelo de ratón de sensibilización materno-neonatal activo. Los ratones se inmunizaron con tres dosis de combinaciones a 1 µg de cada producto conjugado o producto conjugado de serotipo V de GBS a 1 µg en presencia de coadyuvante de alum. los días 0, 21 y 35. Los neonatos se sensibilizaron con las cepas de tipo V CJB 111 y 2603 V/R. Los resultados se muestran en la Tabla 7 a continuación.

**Tabla 7:** Determinación del nivel de protección obtenido con combinaciones de producto conjugado de serotipo Ia, Ib, III y V de GBS/CRM197 o producto conjugado de serotipo V de GBS solo en presencia de un coadyuvante en el modelo de ratón de sensibilización materno-neonatal activo.

Antígeno	Cepa de Sensibilización (tipo)	
	CJB111 (V)	2603 V/R (V)
	Muerto/tratado	(% de supervivencia)
CRM197-V	78/253 (69)	9/117 (92)
Combo	218/583 (63)	32/118 (73)
PBS	333/350 (5)	138/149 (6)

Combo = CRM197-Ia + CRM197-Ib + CRM197-III + CRM197-V

- 5 La respuesta inmunitaria al sacárido capsular de serotipo V de GBS disminuyó cuando los productos conjugados de serotipo Ia, Ib y III de GBS también estuvieron presentes en la composición.

**Estudio con ratones (7)**

- 10 En este estudio, se evaluó el efecto del coadyuvante sobre la inmunogenicidad y la eficacia de una mezcla de los productos conjugados serotipo Ia, Ib, III y V de GBS en comparación con el producto conjugado de serotipo V de GBS solo en el modelo de ratón de sensibilización materno-neonatal activo. Los ratones se inmunizaron con tres dosis de combinaciones a 1 µg de cada producto conjugado o producto conjugado de serotipo V de GBS a 1 µg en presencia o ausencia de coadyuvante los días 0, 21 y 35. Los neonatos se sensibilizaron con la cepa de tipo V CJB111. Los resultados se muestran en la Tabla 8 a continuación.

- 15 **Tabla 8:** Determinación del nivel de protección, títulos de anticuerpo y títulos bactericidas obtenidos con combinaciones de producto conjugado de serotipo Ia, Ib, III y V de GBS/CRM197 o producto conjugado de serotipo V de GBS solo en presencia o ausencia de coadyuvante en el modelo de ratón de sensibilización materno-neonatal activo.

Antígeno	Coadyuvante	Título de GMT	Título bactericida	Muerto/tratado (% de supervivencia)
CRM197-V	PBS	83	838	21/68 (69)
Combo	PBS	22	251	62/130 (52)
CRM197-V	Alum.	130	1430	30/80 (62)
Combo	Alum.	59	<100	66/148 (55)
PBS	Alum.	-	-	122/131 (7)

Combo = CRM197-Ia + CRM197-Ib + CRM197-III + CRM197-V; - No aplicable

- 20 Una vez más, la respuesta inmunitaria al sacárido capsular de serotipo V de GBS disminuyó cuando los productos conjugados de serotipo Ia, Ib y III de GBS también estuvieron presentes en la composición. La supervivencia se mejoró mediante la adición de coadyuvante, incluso aunque la adición de coadyuvante al producto conjugado de serotipo V de GBS solo no tuvo este efecto en este experimento.

**Estudio con ratones (8)**

- 25 En este estudio, se evaluó el efecto del aumento de la dosis de producto conjugado de serotipo V de GBS sobre la eficacia de una mezcla de los productos conjugados de serotipo Ia, Ib, III y V de GBS en el modelo de ratón de sensibilización materno-neonatal activo. Los ratones se inmunizaron con dos dosis de combinaciones a 1 µg de cada producto conjugado o dos dosis de combinaciones a 1 µg de los productos conjugados de serotipo Ia, Ib, III de GBS y 5 µg del producto conjugado de serotipo V de GBS en presencia o ausencia de coadyuvante los días 0 y 21. Los neonatos fueron sensibilizados con cepas de tipo específico como se muestra más abajo en la siguiente Tabla 9.

30

**Tabla 9:** Determinación del nivel de protección obtenido con combinaciones de producto conjugado de serotipo Ia, Ib, III y V de GBS/CRM197 en presencia de coadyuvante con diferentes dosis de producto conjugado de serotipo V de GBS en el modelo de ratón de sensibilización materno-neonatal activo.

Antígeno	Coadyuvante	Cepa de Sensibilización (tipo)			
		090 (I a)	H36B (Ib)	M781 (III)	CJB111 (V)
		Muerto/tratado (% de supervivencia)			
Combo	PBS	20/59 (66)	12/50 (76)	1/40 (97)	49/50 (2)
Combo	Alum.	36/50 (28)	10/30 (67)	1/40 (97)	22/40 (45)
Combo plus	PBS	40/40 (0)	23/26 (11)	37/40 (7)	31/38 (18)
Combo plus	Alum.	13/45 (71)	15/40 (62)	0/50 (100)	26/50 (48)

Combo = CRM197-Ia + CRM197-Ib + CRM197-III + CRM197-V (todos a 1 µg)  
 Combo plus = CRM197-Ia + CRM197-Ib + CRM197-III + CRM197-V (todos a 1 µg, excepto para CRM197-V a 5 µg)

- 5 En este experimento, la respuesta inmunitaria al sacárido capsular de serotipo V de GBS en la mezcla se mejoró una vez más mediante la adición de coadyuvante. La respuesta también se mejoró aumentando la dosis de este sacárido capsular en la composición. Sin embargo, la presencia de una alta dosis de sacárido capsular de serotipo V de GBS pareció reducir la respuesta a los sacáridos capsulares de serotipo Ia, Ib y III de GBS. Esta consecuencia se redujo por la adición de coadyuvante.

10 **Estudio con ratones (9)**

En este estudio, se evaluó la eficacia de una mezcla de productos conjugados de serotipo Ia, Ib y III de GBS con proteínas GBS67 y GBS80 en el modelo de ratón de sensibilización materno-neonatal activo. Los ratones se inmunizaron con combinaciones en presencia o ausencia de diversos coadyuvantes diferentes. Los neonatos fueron sensibilizados con cepas de tipo específico como se muestra más abajo en la siguiente Tabla 10.

- 15 **Tabla 10:** Determinación del nivel de protección obtenido con combinaciones de productos conjugados de serotipo Ia, Ib y III de GBS/CRM197 y proteínas GBS67 y GBS80 en el modelo de ratón de sensibilización materno-neonatal activo.

Ag	Coadyuvante	Cepa de Sensibilización (tipo)					
		090 (Ia)	H36B (Ib)	3050 (II)	M781 (III)	CJB111 (V)	JM9130013 (VIII)
		Muerto/tratado (% de supervivencia)					
Combo	Hidróxido de alum./ solución salina	9/60 (85)	6/60 (90)	12/58(79)	0/60 (100)	11/55 (80)	28/56 (50)
Combo	Hidróxido de alum./ PBS	19/78 (76)	5/57 (91)	16/66 (76)	4/53 (92)		55/80 (31)
Combo	MF59	4/60 (93)	12/57 (79)	18/60 (70)	3/77 (96)		45/70 (36)
Combo	Ninguno	13/80 (84)	11/70 (84)	28/60 (53)	14/77 (82)		47/59 (20)
PBS	Hidróxido de alum./ solución salina	60/60 (0)	74/77 (4)	36/56 (36)	73/80 (9)	86/99 (13)	53/69 (23)
PBS	Ninguno	70/70 (0)	73/79 (7)	42/54 (22)	74/77 (4)		63/74 (15)

Combo = CRM197-Ia + CRM197-Ib + CRM197-III + GBS67 + GBS80

- 20 Los títulos de anticuerpo se midieron después de la administración de la mezcla de productos conjugados de serotipo Ia, Ib, III y V y proteínas GBS67 y GBS80 en este estudio. Los resultados de cinco experimentos separados se muestran a continuación:

	Hidróxido de aluminio/solución salina	Hidróxido de aluminio/PBS	MF 59	Sin coadyuvante
GBS 80	<b>45395</b>	<b>50277</b>	<b>15626</b>	<b>3358</b>
GBS 67	<b>25846</b>	<b>29513</b>	<b>9616</b>	<b>4232</b>
Ps Ia	<b>811</b>	<b>711</b>	<b>2190</b>	<b>404</b>
Ps Ib	<b>1929</b>	<b>1277</b>	<b>2571</b>	<b>691</b>
Ps III	<b>862</b>	<b>1043</b>	<b>1314</b>	<b>275</b>

**Estudio con ratones (10)**

5 En este estudio, se evaluó la eficacia de una mezcla de productos conjugados de serotipo Ia, Ib y III de GBS con proteínas GBS67 y GBS80 en el modelo de ratón de sensibilización materno-neonatal activo. Los ratones se inmunizaron con tres dosis de combinaciones en presencia o ausencia de diversos coadyuvantes diferentes los días 0, 21 y 35. Los neonatos se sensibilizaron con cepas de tipo específico como se muestra más abajo en la siguiente Tabla 11.

10 **Tabla 11:** Determinación del nivel de protección obtenido con combinaciones de productos conjugados de serotipo Ia, Ib y III de GBS/CRM197 y proteínas GBS67 y GBS80 en el modelo de ratón de sensibilización materno-neonatal activo.

Antígeno	Coadyuvante	Cepa de Sensibilización (tipo)	
		090 (I a)	M781 (III)
		Muerto/tratado (% de supervivencia)	
Combo	Alum.	4/48 (92)	6/50 (88)
Combo	Alum. + CpG	6/78 (92)	7/8 (91)
Combo	MF59	4/69 (94)	13/55 (76)
Combo	MF59 + CpG	5/66 (92)	6/70 (91)
Combo	PBS	22/60 (63)	13/55 (76)
Combo	PBS + CpG	5/59 (91)	11/66 (83)
PBS	-	69/69 (0)	60/65 (7)

Combo = CRM197-Ia + CRM197-Ib + CRM197-III + CRM197-V

**Estudio con ratones (11)**

15 En este estudio, se evaluó la eficacia de una mezcla de productos conjugados de serotipo Ia, Ib, III y V de GBS con proteína GBS67 y una proteína de fusión Spbl-GBS80 en el modelo de ratón de sensibilización materno-neonatal activo. Los ratones se inmunizaron con la combinación en presencia de coadyuvante. Los neonatos fueron sensibilizados con cepas de tipo específico como se muestra más abajo en la siguiente Tabla 12.

**Tabla 12:** Determinación del nivel de protección obtenido con combinaciones de producto conjugado de serotipo Ia, Ib, III y V de GBS/CRM197, proteína GBS67 y una proteína de fusión Spbl-GBS80 en el modelo de ratón de sensibilización materno-neonatal activo.

Ag	Coadyuvante	Cepa de Sensibilización (tipo)							
		090 (Ia)	H36B (Ib)	3050 (II)	COH1 (III)	M781 (III)	M732 (III)	CJB111 (V)	JM913 (VII)
		Muerto/tratado (% de supervivencia)							
Combo	Alum.	16/70 (77)	10/70 (86)	7/70 (90)	4/77 (95)	0/60 (100)	19/30 (36)	20/58 (65)	29/50 (42)

Ag	Coadyuvante	Cepa de Sensibilización (tipo)							
		090 (Ia)	H36B (Ib)	3050 (II)	COH1 (III)	M781 (III)	M732 (III)	CJB111 (V)	JM913 (VII)
		Muerto/tratado (% de supervivencia)							
PBS	Alum.	68/68 (0)	37/50 (26)	25/40 (37)	65/69 (6)	37/40 (8)	32/60 (47)	36/40 (10)	33/40 (17)
Combo = CRM197-Ia + CRM197-Ib + CRM197-III + proteína GBS67 + proteína de fusión Spbl-GBS80									

**Estudio con ratones (12)**

5 En este estudio, se evaluó la eficacia de los productos conjugados de serotipo Ia, Ib, III y V de GBS en el modelo de ratón de sensibilización materno-neonatal activo. Los ratones se inmunizaron a 1 µg de cada producto conjugado. Los neonatos fueron sensibilizados con cepas de tipo específico como se muestra más abajo en la siguiente Tabla 13. El experimento se repitió dos veces.

**Tabla 13:** Determinación del nivel de protección obtenido con productos conjugados de serotipo Ia, Ib, III y V de GBS/CRM197 en el modelo de ratón de sensibilización materno-neonatal activo.

Expt	Antígeno	Cepa de Sensibilización (tipo)			
		090 (I a)	H36B (Ib)	M781 (III)	CJB111 (V)
		Muerto/tratado (% de supervivencia)			
1	CRM197-Ia	10/70 (86)	64/70 (9)	76/80 (5)	
	CRM197-Ib	48/94 (51)	12/99 (88)		
	CRM 197-III	69/70 (1)		3/60 (95)	60/68 (12)
	CRM197-V			80/89 (10)	5/100 (95)
	PBS/Alum	50/50 (0)	39/40 (2)	61/69 (12)	10/10 (0)
2	CRM197-Ia	14/78 (82)	68/70 (2)	41/42 (2)	
	CRM197-Ib	66/110 (40)	2/110 (98)		
	CRM197-III	70/80 (12)		1/60 (98)	
	CRM197-V				38/192 (80)
	PBS/Alum	45/45 (0)	57/58 (2)	32/36 (11)	50/58 (14)

10 El producto conjugado que comprende el sacárido capsular de serotipo Ib de GBS confiere protección contra el serotipo Ia de GBS además del serotipo Ib de GBS.

**Estudio con ratones (13)**

15 En este estudio, el sacárido capsular conjugado con la proteína portadora del toxoide tetánico (TT) o la proteína portadora CRM197 se analizaron y compararon para determinar su inmunogenicidad. Se inmunizaron ratones hembra CD1 con dos dosis de 1 µg de productos conjugados de serotipo Ia, Ib y III de GBS con coadyuvante de hidróxido de aluminio los días 0 y 21. Los neonatos se sensibilizaron con tipos de cepas específicos como se muestra más abajo en la siguiente Tabla 14.

**Tabla 14:** Determinación de la protección lograda por el sacárido capsular de serotipo Ia, Ib y III de GBS conjugado con TT o CRM en el modelo de ratón de sensibilización materno-neonatal activo.

Tipo de CPS	Cepa de sensibilización (tipo)	Proteína portadora de Toxoide Tetánico*	Proteína Portadora Crm*	PBS*
Ia	090 (Ia)	78 (52/67)	86 (54/63)	0 (0/59)
Ib	7357B (Ib)	62 (50/80)	73 (71/97)	0 (0/38)
III	COH1 (III)	97 (37/38)	93 (95/102)	2 (1/48)

\*% De supervivencia (vivo/tratado)

5 Las tasas de supervivencia en los grupos inmunizados con productos conjugados de CRM197 de los tres serotipos fueron comparables a las tasas de supervivencia observadas en el grupo inmunizado con productos conjugados de TT. En base a estos resultados, se seleccionó CRM197 como la proteína portadora para su desarrollo ulterior.

#### Estudio con ratones (14)

10 En este estudio, se evaluó el impacto del nivel de oxidación de sacáridos capsulares durante el procedimiento de conjugación covalente sobre la inmunogenicidad. Se obtuvieron varios lotes de productos conjugados de serotipo Ia, Ib y III de GBS con los sacáridos preparados a diferentes porcentajes de oxidación conjugados con TT y/o con CRM197 y sometidos a ensayo en ratones hembra CD1 para determinar su inmunogenicidad. Los ratones se inmunizaron con dos dosis (1 µg cada una) de los tres productos conjugados diferentes en presencia de coadyuvante de hidróxido de aluminio los días 0 y 21. Los neonatos se sensibilizaron con cepas específicas de tipo como se muestra más abajo en la siguiente Tabla 15.

15 **Tabla 15:** Determinación del nivel de protección, títulos de anticuerpo y títulos bactericidas de sacárido capsular de serotipo Ia y III de GBS conjugado con TT o CRM197 y diferente porcentaje de oxidación utilizando el modelo de ratón de sensibilización materno-neonatal activo.

Antígeno	Nivel de oxidación (%)	Títulos de GMT	Cepa de Sensibilización (tipo)	Vivo/Tratado	Supervivencia (%)	Título Bactericida
CRM-Ia	5,1	ND	A909 (Ia)	42/80	52	ND
CRM-Ia	14,2	ND	A909 (Ia)	58/60	97	ND
CRM-Ia	44,7	ND	A909 (Ia)	48/78	61	ND
CRM-Ia	79	ND	A909 (Ia)	6/50	12	ND
PBS	-	-	A909 (Ia)	11/87	13	-
TT- III	3,9	5135	COH1 (III)	66/78	85	575
TT-III	16	7662	COH1 (III)	55/59	93	470
TT-III	20	6850	COH1 (III)	47/48	98	1320
TT-III	55	13290	COH1 (III)	64/70	91	1320
PBS	-	-	COH1 (III)	1/79	1	-
CRM-III	4,3	972	COH1 (III)	64/100	64	127
CRM-III	17,5	812	COH1 (III)	77/83	93	150
CRM-III	40,9	2484	COH1 (III)	98/107	91	183
CRM-III	61,8	8690	COH1 (III)	75/85	88	140
CRM-III	78,9	58629	COH1 (III)	67/80	84	150
PBS	-	-	COH1 (III)	0/73	0	-

- No aplicable

20 Las tasas de supervivencia alcanzaron un pico cuando las madres se inmunizaron con productos conjugados preparados a partir de sacáridos oxidados al 15-20%. Los títulos de anticuerpo aumentaron al aumentar los niveles de oxidación sin ningún impacto en la función. Los títulos bactericidas no aumentaron con títulos de anticuerpo más altos. En base a estos resultados y en experimentos adicionales (datos no mostrados), se definió que el porcentaje óptimo de oxidación de CPS para los tres serotipos estaba entre 10 y 30%.

**Estudios de toxicología reproductiva y del desarrollo en conejos y ratas**

Los resultados de dos especies no mostraron ningún efecto de los productos conjugados de serotipo Ia, Ib y III/CRM197 sobre el desarrollo embrionario o fetal.

5 En conejos, se administró una combinación de los tres productos conjugados con coadyuvante de hidróxido de aluminio mediante inyección intramuscular a una dosis clínica de 20/20/20 µg (basándose en la masa de cada sacárido) los días -35, -21 y -7 con respecto al apareamiento el día 0 (período previo al apareamiento) y los días de gestación 7 y 20 o los días de gestación 7 o 20 solamente. El tratamiento no produjo toxicidad materna, efectos sobre el apareamiento ni evidencia de letalidad embrionaria, fetotoxicidad o teratogenicidad a ningún nivel de dosis.

10 En ratas, tampoco se observó toxicidad materna ni evidencia de efectos sobre la función reproductiva y el desarrollo embriofetal cuando se administró la combinación, y no se observó diferencia entre los grupos a los que se administró la combinación en solución salina frente la combinación en coadyuvante de hidróxido de aluminio en 3 (durante gestación solamente) o 6 (antes de la gestación y durante la gestación) inyecciones. Las inyecciones se administraron los días -35, -21 y -7 con respecto al apareamiento el día 0, así como los días 6, 12 y 17 de gestación o solo los días 6, 12 y 17 de gestación. No hubo ningún efecto sobre la supervivencia de las crías, el estado clínico o el peso corporal de la generación F1 durante el período previo al destete.

**Estudio en seres humanos (1)**

20 Este estudio investigó una vacuna de producto conjugado de sacárido capsular de serotipo Ia de GBS-CRM197 monovalente. A los grupos de ensayo de 10 sujetos se les administraron 1 o 2 inyecciones a dosis de 5, 10 o 20 µg (medidas como masa de sacárido). Los grupos de placebo de 3 y 2 sujetos recibieron 1 y 2 inyecciones de solución salina, respectivamente. Se extrajo sangre de cada sujeto en el escrutinio y un mes después de la primera inyección para el análisis mediante ELISA. Además, a los 3 meses del estudio, a los grupos de 2 inyecciones se les extrajeron sangre en el momento en que recibieron la segunda inyección y a continuación volvieron un mes después para extraer otra muestra de sangre. Se llevaron a cabo extracciones de sangre a los 6, 12 y 24 meses después de la última inyección recibida por el sujeto.

25 El ELISA mide la concentración de anticuerpos específicos contra sacáridos capsulares Ia (o Ib y III en los estudios descritos a continuación) de GBS. Las placas de microtitulación se recubrieron con 1 µg/ml del sacárido de GBS apropiado (conjugado con HSA) y se incubaron con sueros de los sujetos de estudio durante 1 hora a 37°C. Después de 3 lavados, las placas se incubaron con un anticuerpo secundario anti-IgG humana marcado con fosfatasa alcalina (AP) durante 90 minutos a 37°C seguido de 3 lavados adicionales. Se añadió el sustrato (pNPP) a la placa y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La AP cataliza la hidrólisis del sustrato generando una reacción colorimétrica que puede cuantificarse mediante un lector de ELISA a 405 nm (filtro de referencia 650 nm). La evaluación de la concentración de anticuerpo se realizó utilizando una curva patrón. Un resumen de la concentración media geométrica (µg/ml) de anticuerpos anti-Ia para cada grupo se proporciona en la tabla 16 a continuación:

35 **Tabla 16:** Concentraciones medias geométricas (y razones de medias geométricas) para el estudio de vacuna de producto conjugado de sacárido capsular de serotipo Ia de GBS-CRM197 monovalente.

	Placebo N = 3	Placebo + N = 2	GBS Ia 5 N = 10	GBS Ia 5+ N = 10	GBS Ia10 N = 10	GBS Ia10 + N = 10	GBS Ia20 N = 10	GBS Ia20 + N = 10
Valor basal (visita 0)	0,84 (0,12-5,86)	0,16 (0,015-1,77)	1,05 (0,36-3,05)	0,42 (0,14-1,29) N = 9	1,25 (0,38-4,1) N = 8	0,37 (0,1-1,32) N = 7	0,54 (0,19-1,57) N = 10	0,2 (0,07-0,59) N = 10
1 mes después de la última vacunación	0,8 (0,034-19)	0,16 (0,0007-38) N = 1	43 (7,6-240)	5,94 (1,06-33)	7,94 (1,41-45)	14 (2,52-79)	25 (4,45-140)	6,88 (1,12-42) N = 9
1 mes después de la última vacunación hasta el Valor basal (visita 0)	0,96 (0,093-9,92)	1 (0,018-57) N = 1	41 (11-146)	16 (4,05-60) N = 9	10 (2,4-42) N = 8	53 (12-246) N = 7	46 (13-166) N = 10	33 (8,55-127) N = 9
6 meses después de la última vacunación	0,73 (0,05-11)	0,16 (0,0016-17) N = 1	19 (4,43-83)	3,08 (0,71-13)	12 (2,66-50)	7,03 (1,63-30)	14 (3,22-60)	4,21 (0,9-20) N = 9
6 meses después de la última vacunación hasta el Valor basal (visita 0)	0,87 (0,12-6,39)	1 (0,032-31) N = 1	18 (6,14-54)	7,9 (2,5-25) N = 9	13 (3,71-43) N = 8	27 (7,2-98) N = 7	26 (8,67-77) N = 10	20 (6,39-64) N = 9
12 meses después de la última vacunación	0,79 (0,054-12)	0,16 (0,0016-17)	14 (3,3-62)	2,23 (0,51-9,68)	7,28 (1,68-32)	7,17 (1,53-34)	9,96 (2,29-43)	3,24 (0,63-17)

	Placebo N = 3	Placebo + N = 2	GBS la 5 N = 10	GBS la 5+ N = 10	GBS la10 N = 10	GBS la10 + N = 10	GBS la20 N = 10	GBS la20 + N = 10
		N = 1				N = 9		N = 8
12 meses después de la última vacunación hasta el Valor basal (visita 0)	0,94 (0,14-6,46)	1 (0,036-28) N = 1	14 (4,76-39)	5,59 (1,84-17) N = 9	8,02 (2,46-26) N = 8	19 (5,49-68) N = 7	18 (6,43-53)	17 (5,31-56) N = 8
24 meses después de la última vacunación	0,66 (0,043-10)		3,57 (0,59-21) N = 7	2,74 (0,56-13) N = 9	10 (1,74-63) N = 7	5,05 (0,84-30) N = 7	8,63 (1,78-42) N = 9	3,46 (0,65-19) N = 8
24 meses después de la última vacunación hasta el Valor basal (visita 0)	0,79 (0,11-5,95)		7,47 (2-28) N = 7	6,51 (1,9-22) N = 8	7,88 (1,9-33) N = 6	14 (3,26-56) N = 6	14 (4,38-45) N = 9	16 (4,68-55) N = 8
+ dos inyecciones								

En general, los datos de GMC muestran un aumento significativo entre los puntos temporales del valor basal y posteriores (p.ej. GMC oscila de 6 a 43 µg/ml un mes después de la última vacunación) y aunque hubo una disminución a lo largo del tiempo, a los 24 meses del estudio, el grupo de GMC aún es múltiples veces más alto que el valor basal (GMR oscila de 7 a 14 a los 24 meses). A juzgar por la estimación puntual de GMC, el grupo que recibió la dosis de 5 µg como vacunación única tuvo la respuesta global más alta un mes después de la última vacunación.

El número de sujetos con niveles de anticuerpos ≥ 3 µg/ml mostró un número similar de "respondedores" en las diferentes dosis (11, 13 y 12 de 20 para 5, 10 y 20 dosis, respectivamente) y diferentes esquemas de vacunación (18 de 20 para ambos), un mes después de la última vacunación (datos no mostrados). El porcentaje de sujetos con niveles de anticuerpos ≥ 5 µg/ml confirmó las mismas observaciones (datos no mostrados). Estos puntos de corte estaban destinados a permitir que las respuestas se evaluaran en el contexto de posibles correlaciones serológicas de protección (basándose en la referencia 250). Estos datos sugieren que no hay una contribución observable ni por una segunda vacunación ni por una dosis de vacuna más alta. Puesto que no se observó una respuesta a la dosis, es posible que una dosis de 5 µg o menos pueda ser una dosis óptima en una población adulta. No se observó una ventaja sostenida por la administración de 2 inyecciones en comparación con 1 inyección para los grupos que recibieron 5 y 20 µg. El grupo que recibió 10 µg de dosis mostró respuestas pico más altas (1 mes después de la vacunación) después de dos frente a una inyección, pero esta tendencia se revirtió en puntos temporales posteriores (estado estacionario).

El análisis de seguridad se evaluó en función de una serie de criterios diferentes. No se destacaron problemas de seguridad y no se observó una respuesta dependiente de la dosis.

### Estudio en seres humanos (2)

Este estudio investigó las vacunas de producto conjugado de sacárido capsular de serotipo Ib y III de GBS-CRM197 monovalente. A los grupos de ensayo de 10 componentes se les administraron 1 o 2 inyecciones a dosis de 5, 10 o 20 µg (medidas como masa de sacárido). Los grupos de placebo de 3 y 2 sujetos recibieron 1 y 2 inyecciones de solución salina, respectivamente. Se extrajo sangre de cada sujeto en el escrutinio y un mes después de la primera inyección para el análisis mediante ELISA. Además, a los 3 meses del estudio, a los grupos de 2 inyecciones se les extrajo sangre en el momento en que recibieron la segunda inyección y a continuación volvieron un mes después para extraer otra muestra de sangre. Se llevaron a cabo extracciones de sangre a los 6, 12 y 24 meses después de la última inyección recibida por el sujeto. Un resumen de la concentración media geométrica de anticuerpos anti-Ib y III para cada grupo se proporciona en la tabla 17 a continuación.

**Tabla 17:** Media geométrica de las concentraciones (y medias geométricas de las razones) para estudios de vacunas de producto conjugado de sacárido capsular de serotipo III y Ib de GBS-CRM197.

	Placebo	Placebo+	GBS IB 5	GBS Ib 5+	GBS 1b10	GBS 1b10+	GBS 1b20	GBS 1b20+	
	N=2	N=2	N=8	N=10	N=9	N=11	N=9	N=10	
<b>GBS Ib</b>	Valor basal (Visita 0)	0,1 (0,0042-2,38) N=1	0,042 (0,0017-0,99) N=1	0,27 (0,066-1,13) N=5	0,24 (0,08-0,75) N=8	0,088 (0,021-0,36) N=5	0,44 (0,16-1,21) N=10	0,38 (0,11-1,25) N=7	0,2 (0,074-0,55) N=10
	1 mes después de la última inmunización	0,3 (0,0019-47) N=1	0,53 (0,015-19)	1,89 (0,32-11)	11 (1,77-63) N=8	2,63 (0,49-14)	18 (3,82-81)	14 (2,6-76)	10 (2,11-52)
	1 mes después de la última inmunización con respecto al Valor basal (visita 0)		9,64 (0,26-359) N=1	60 (9,78-364) N=4	47 (11-208) N=6	46 (9,13-232) N=5	48 (15-152) N=10	67 (17-267) N=7	56 (17-186) N=9
	6 meses después de la última inmunización	0,091 (0,0051-1,63)	0,3 (0,0051-18) N=1	1,53 (0,36-6,48)	7,52 (2,07-27)	5,45 (1,4-21)	11 (3,09-36)	6,23 (1,6-24)	9,2 (2,53-33)
	6 meses después de la última inmunización con respecto al Valor basal (visita 0)	0,42 (0,031-5,64) N=1		32 (8,56-116) N=4	36 (14-91) N=8	97 (30-310) N=5	28 (12-63) N=10	26 (9,61-69) N=7	47 (20-112) N=9
	12 meses después de la última inmunización	0,091 (0,0054-1,53)	0,4 (0,0074-22) N=1	1,29 (0,31-5,26)	5,77 (1,53-22) N=9	3,24 (0,79-13) N=8	9,52 (2,86-32)	4,98 (1,32-19)	6,67 (1,89-24)
	12 meses después de la última inmunización con respecto al Valor basal (visita 0)	0,42 (0,036-4,85) N=1		22 (6,52-76) N=4	29 (12-75) N=7	45 (13-152) N=4	26 (12-57) N=10	23 (8,96-57) N=7	34 (15-78) N=9
	24 meses después de la última inmunización	0,091 (0,004-2,7)	0,1 (0,0012-8,29) N=1	1,34 (0,28-6,4)	3,8 (0,94-15)	2,58 (0,59-11)	9,49 (2,35-38) N=10	3,22 (0,53-20) N=6	3,92 (0,9-17) N=9
	24 meses después de la última inmunización con respecto al Valor basal (visita 0)			27 (6,49-111) N=4	19 (7,07-53) N=8	53 (15-188) N=5	25 (9,65-64) N=9	15 (3,55-61) N=4	22 (7,95-59) N=8
		N=3	N=2	N=8	N=10	N=10	N=9	N=9	N=10
Valor basal (Visita 0)	0,034 (0,0007-1,55) N=1	0,27 (0,018-3,98)	0,27 (0,057-1,3) N=6	1,64 (0,46-5,86) N=9	0,23 (0,065-0,83) N=9	0,65 (0,18-2,34)	0,89 (0,21-3,77) N=7	1,93 (0,58-6,47) N=10	
<b>GBS III</b>	1 mes después de la última inmunización	0,14 (0,0099-2,11)	0,88 (0,033-24)	13 (2,44-65)	31 (7,07-134)	2,72 (0,63-12)	31 (6,64-147)	22 (4,73-105)	22 (5,03-95)
	1 mes después de la última inmunización con respecto al Valor basal (visita 0)	8,82 (0,64-122) N=1	3,31 (0,51-21)	44 (15-130) N=6	31 (12-84) N=7	10 (4,26-25) N=9	42 (16-106) N=8	63 (23-172) N=7	14 (5,94-34) N=9
	6 meses después de la última inmunización	0,034 (0,0005-2,11) N=1	1,9 (0,031-118) N=1	4,97 (1,04-24) N=7	21 (5,57-76)	2,7 (0,73-9,95)	19 (4,89-77)	18 (4,43-69)	15 (3,84-60) N=9
	6 meses después de la última inmunización con respecto al Valor basal (visita 0)		0,9 (0,086-9,48) N=1	23 (8,85-60) N=6	22 (8,87-52) N=7	11 (5-24) N=9	25 (11-58) N=8	33 (14-80) N=7	9,86 (4,3-23) N=8
	12 meses después de la última inmunización	0,1 (0,01-1,02)	2 (0,036-110) N=1	3,7 (0,81-17) N=7	16 (4,39-55)	2,56 (0,72-9,09)	15 (3,97-57)	13 (3,35-48)	13 (3,05-52) N=8

12 meses después de la última inmunización con respecto al Valor basal (visita 0)	8,82 (0,75-104) N=1	0,4 (0,029-5,51)	0,33 (0,039-2,81) N=3	13 (3,92-41)	0,71 (0,14-3,73) N=5	24 (4,62-127) N=5	11 (2,11-58) N=5	6,15 (1,66-23) N=8
24 meses después de la última inmunización	0,034 (0,0008-1,39) N=1	0,4 (0,029-5,51)	0,33 (0,039-2,81) N=3	13 (3,92-41)	0,71 (0,14-3,73) N=5	24 (4,62-127) N=5	11 (2,11-58) N=5	6,15 (1,66-23) N=8
24 meses después de la última inmunización con respecto al Valor basal (visita 0)	1 (0,092-11) N=1	1,5 (0,28-8,1)	2,45 (0,45-13) N=2	14 (5,57-34) N=7	6,55 (2,25-19) N=5	23 (8,06-68) N=5	13 (4,39-37) N=5	6,21 (2,52-15) N=7
+ dos inyecciones								

Una vez más, no se observó una respuesta a la dosis o ventaja significativas de la administración de dos inyecciones en comparación con una en este pequeño estudio.

5 El análisis de seguridad se evaluó basándose de una serie de criterios diferentes. No se destacaron problemas de seguridad y no se observó una respuesta dependiente de la dosis. Entre los indicadores de reatogenicidad, el dolor en el sitio de la inyección (15 casos de 98 inyecciones para el serotipo Ib y 14 casos de 96 inyecciones para el serotipo III) fue la queja más común en las reacciones locales solicitadas para ambos serotipos, y el dolor de cabeza fue la única en las reacciones sistémicas solicitadas, pero no se observaron diferencias obvias entre el placebo y los individuos vacunados.

10 **Estudio en seres humanos (3)**

15 Este estudio investigó una vacuna de producto conjugado de sacárido capsular de serotipo Ia, Ib y III de GBS-CRM197 trivalente en mujeres sanas no embarazadas. Se estudiaron dos formulaciones de vacunas diferentes, cada una combinando los tres sacáridos en proporciones iguales. Se sometieron a ensayo dos dosis diferentes (5 µg y 20 µg, medidas como masa de cada sacárido, en 0,5 ml) con y sin coadyuvante de alum. El estudio también evaluó los esquemas de 1 y 2 inyecciones intramusculares (con 30 días de diferencia) para cada formulación. La vacuna también incluyó 4,5 mg de cloruro de sodio, 0,34 mg de dihidrogenofosfato de potasio y 7,5 mg de manitol. Los grupos de estudio se resumen en la Tabla 18 a continuación. También se sometió a ensayo un grupo de placebo (dos inyecciones de solución salina al 0,9%, con 30 días de diferencia) con 20 sujetos.

20 **Tabla 18:** Grupos de estudio para el estudio de vacuna de producto conjugado de sacárido capsular de serotipo Ia, Ib y III de GBS-CRM197 trivalente

Variables	1 inyección		2 inyecciones	
	5/5/5 µg	20/20/20 µg	5/5/5 µg	20/20/20 µg
Sin alum.	N = 40	N = 39	N = 40	N = 40
Alum.	N = 40	N = 39	N = 40	N = 40

25 Se extrajo sangre de cada sujeto en el escrutinio y un mes después de la primera inyección para el análisis de inmunogenicidad mediante ELISA. Los grupos de 2 inyecciones recibieron la segunda inyección después de la extracción de sangre en el punto temporal de un mes. También se extrajo sangre de todos los grupos a los 3 meses del estudio. En la tabla 19 a continuación, se proporciona un resumen de la concentración media geométrica de anticuerpos anti-Ia, Ib y III para cada grupo (ajustado para las concentraciones en el momento inicial de anticuerpos y excluyendo el grupo de placebo).

**Tabla 19:** Media geométrica de las concentraciones (y medias geométricas de las razones) para estudios de vacunas de producto conjugado de sacárido capsular de serotipo Ia, Ib y III de GBS-CRM197.

	<b>5 na</b> <b>N=40</b>	<b>5+ sc</b> <b>N=40</b>	<b>20 sc</b> <b>N=38</b>	<b>20+ sc</b> <b>N=39</b>	<b>5 coad.</b> <b>N=40</b>	<b>5+ coad.</b> <b>N=40</b>	<b>20 coad.</b> <b>N=39</b>	<b>20+ coad.</b> <b>N=39</b>		
<b>GBS Ia</b>	Escrutinio	0,71 (0,41-1,21)	0,65 (0,37-1,16)	0,48 (0,27-0,85)	0,49 (0,28-0,87)	0,57 (0,32-1,01)	0,71 (0,4-1,27)	0,59 (0,33-1,05)	0,45 (0,26-0,79)	
	Día 31	13 (7,06-25)	12 (5,99-23)	20 (10-41)	18 (9,41-36)	16 (8,02-30)	16 (4,19-16) N=39	12 (6,12-24)	8,88 (4,57-17)	
	Día 31 hasta el Escrutinio	23 (12-44)	20 (10-40) N=35	34 (17-66) N=34	31 (16-61) N=36	27 (14-52) N=36	14 (7,32-28) N=35	21 (11-41) N=35	15 (7,62-28) N=37	
	Día 61	16 (9,34-28)	15 (8,63-27)	18 (10-33)	23 (13-40)	18 (10-32)	12 (6,79-22)	13 (7,3-23)	11 (6,01-19) N=38	
	Día 61 hasta el Escrutinio	28 (16-47)	26 (15-47) N=35	31 (17-55) N=34	39 (22-69) N=36	31 (18-55) N=36	20 (11-36) N=35	23 (13-40) N=35	18 (10-32) N=36	
	<b>GBS Ib</b>	Escrutinio	0,15 (0,091-0,25) N=37	0,12 (0,072-0,2) N=34	0,1 (0,063-0,17) N=36	0,12 (0,072-0,2) N=37	0,14 (0,082-0,22) N=37	0,11 (0,068-0,19) N=34	0,12 (0,074-0,21) N=34	0,081 (0,048-0,14) N=34
		Día 31	4,92 (2,67-9,06) N=38	4,21 (2,24-7,91) N=39	4,59 (2,51-8,41) N=36	4,12 (2,23-7,6) N=35	3,94 (2,15-7,23) N=39	3,25 (1,73-6,1) N=39	3,31 (1,74-6,28) N=37	2,87 (1,48-5,6) N=36
		Día 31 hasta el Escrutinio	45 (24-85) N=36	35 (18-69) N=33	35 (19-67) N=36	33 (17-63) N=35	34 (18-64) N=36	27 (14-53) N=33	30 (15-59) N=32	19 (9,43-37) N=31
		Día 61	5,17 (3,17-8,45) N=37	5,29 (3,19-8,78) N=34	4,69 (2,84-7,73) N=35	5,35 (3,26-8,76) N=36	4,1 (2,52-6,68) N=37	4,09 (2,47-6,79) N=34	3,74 (2,26-6,22) N=34	3,39 (1,98-5,8) N=32
		Día 61 hasta el Escrutinio	47 (29-78) N=37	46 (27-77) N=34	38 (23-64) N=35	45 (27-75) N=36	35 (21-59) N=37	35 (21-59) N=34	33 (20-56) N=34	24 (14-41) N=32
<b>GBS III</b>	Escrutinio	0,3 (0,16-0,54) N=34	0,16 (0,088-0,29) N=34	0,17 (0,096-0,3) N=37	0,14 (0,078-0,25) N=34	0,18 (0,1-0,34) N=34	0,38 (0,21-0,69) N=34	0,15 (0,082-0,27) N=31	0,24 (0,13-0,43) N=31	
	Día 31	7,82 (4,24-14)	5,48 (3,03-9,91)	8,13 (4,66-14) N=37	8,31 (4,47-15) N=34	5,5 (3-10) N=34	5,36 (2,88-10) N=34	8,51 (4,45-16) N=31	6,03 (3,41-11) N=31	
	Día 31 hasta el Escrutinio	34 (19-63) N=31	25 (14-45) N=32	36 (21-64) N=36	34 (19-62) N=31	26 (14-47) N=30	24 (14-44) N=32	35 (19-66) N=28	29 (16-51) N=34	
	Día 61	7,5 (4,43-13) N=33	8,71 (5,31-14) N=34	8,48 (5,26-14) N=37	9,59 (5,72-16) N=35	5,35 (3,2-8,93) N=31	7,75 (4,58-13) N=33	8,23 (4,77-14) N=32	7,79 (4,74-13) N=35	
	Día 61 hasta el Escrutinio	33 (20-55) N=31	43 (26-70) N=34	39 (25-64) N=36	43 (26-71) N=33	26 (15-43) N=31	33 (20-54) N=33	38 (22-64) N=29	38 (23-62) N=33	

+ - dos inyecciones  
sc - sin coadyuvante  
coad. - con coadyuvante

5 La vacuna fue inmunogénica, induciendo en un porcentaje entre 80% y 100% de los sujetos al menos un aumento de anticuerpos específicos de GBS de 2 veces a través de los diferentes serotipos. Una comparación de las GMC de los ocho grupos no reveló: a) ninguna contribución de una segunda inyección en comparación con una sola inyección; b) ninguna contribución de la inclusión de coadyuvante de alum. en comparación con la ausencia de coadyuvante; y c) ninguna contribución de la dosis más alta de 20/20/20 µg frente a 5/5/5 µg.

10 Más específicamente, no hubo un aumento constante de la respuesta de anticuerpos entre sujetos que recibieron dos inyecciones de vacuna en comparación con aquellos que recibieron solo una inyección de vacuna contra cualquiera de los serotipos de GBS (Ia, Ib o III). Esta falta de contribución de la segunda inyección de vacuna se

observó independientemente de la dosis (5/5/5 o 20/20/20 µg) o la formulación (sin coadyuvante de alum. o con coadyuvante de alum.). Para GBS la, las mediciones de GMC para cada uno de los ocho grupos oscilaron entre 7 y 20 µg/ml el día 61 del estudio. A partir de estos resultados, no se observó contribución de dos inyecciones (intervalo de GMC [7-16 µg/ml]) en comparación con una inyección (intervalo GMC [9-20 µg/ml] (todas las CI del 95% solapantes)). Además, la razón de una frente a dos inyecciones fue de 1,2 [CI del 95% (0,7, 2,0)]. Este resultado indica la equivalencia práctica de una inyección frente a dos (valor p = 0,5). Para GBS Ib, las mediciones de GMC para cada uno de los ocho grupos oscilaron entre 2 y 7 µg/ml el día 61 del estudio. No se observó ninguna contribución de dos inyecciones (intervalo de GMC [2-5 µg/ml]) en comparación con una inyección (intervalo de GMC [4-7 µg/ml] (todas las CI del 95% solapantes)). Esta vez, la razón de una frente a dos inyecciones fue de 1,2 [CI del 95% (0,7, 2,0)]. Una vez más, este resultado indica equivalencia práctica (valor p = 0,5). Para GBS III, las mediciones para cada uno de los ocho grupos oscilaron entre 5 y 13 µg/ml el día 61 del estudio. No se observó ninguna contribución de dos inyecciones (intervalo de GMC [5-11 µg/ml]) en comparación con una inyección (intervalo de GMC [5-13 µg/ml] (todas las CI del 95% solapantes)). La razón de una frente a dos inyecciones fue de 0,94 [CI del 95% (0,55, 1,66)], lo que indica equivalencia (valor p = 0,8).

Del mismo modo, no hubo una contribución adicional a la GMC a partir de la inclusión de alum. en comparación con la ausencia de alum. Esta falta de contribución del coadyuvante de alum. se observó independientemente de la dosis (5/5/5 o 20/20/20 µg) o el número de inyecciones y se observó en los tres serotipos (Ia, Ib y III). Para GBS Ia, la GMC en los ocho grupos osciló entre 7 y 20 µg/ml el día 61 del estudio y no mostró contribución del alum. (intervalo de GMC [7-15 µg/ml] en comparación con la ausencia de alum. (intervalo de GMC [13-16 µg/ml] (todas las CI del 95% solapantes)). La razón de GMC del grupo para el grupo sin alum. en comparación con el grupo con alum. fue de 1,6 [CI del 95% (0,9, 2,6)], lo que sugiere que la respuesta sin alum. es potencialmente mayor con respecto a la formulación de vacuna con alum. (valor p = 0,11). Para GBS Ib, la GMC osciló entre 2-7 µg/ml el día 61 del estudio y no mostró contribución del alum. (intervalo de GMC [2-4] µg/ml] en comparación con la ausencia de alum. (intervalo de GMC [4-7 µg/ml] (todas las CI del 95% solapantes)). La razón de GMC del grupo para el grupo sin alum. en comparación con el grupo con alum. fue de 1,4 [CI del 95% (0,8, 2,4)], lo que implica una equivalencia cercana en los valores de GMC (valor p = 0,2). Para GBS III, GMC osciló entre 5 y 13 µg/ml el día 61 del estudio y no mostró contribución del alum. (intervalo de GMC [5-11 µg/ml] en comparación con la ausencia de alum. (intervalo de GMC [5-13 µg/ml] (todas las CI del 95% solapantes)). La razón de GMC del grupo para el grupo sin alum. en comparación con el grupo con alum. fue de 1,09 [CI del 95% (0,6, 1,9)], lo que implica una equivalencia cercana en los valores de GMC (valor p = 0,7).

Finalmente, los datos permiten una evaluación de las dos dosis (5 frente a 20 µg de cada uno de los tres sacáridos en los productos conjugados). Los resultados sugieren que la dosis más alta (20 µg) no induce una respuesta de anticuerpos más alta. En particular, las razones de GMC para sujetos que reciben 5 µg (en todos los grupos) y los sujetos que reciben 20 µg (en todos los grupos) son 1,2 [CI del 95% (0,7, 2,1)] para GBS Ia; 0,7 [CI del 95% (0,4, 1,2)] para GBS Ib y 1,4 [CI del 95% (0,9, 2,5)] para GBS III. Estas razones son cercanas a 1 y los valores p de la prueba estadística para la igualdad a 1, son >0,15 para los tres serotipos, lo que sugiere que no hay diferencias discernibles en el nivel de anticuerpos inducidos entre los dos regímenes de dosificación.

La seguridad se midió mediante la incidencia de reactogenicidad local y sistémica, los eventos adversos y los eventos adversos graves, así como los resultados de laboratorio clínico. Se encontró que la vacuna trivalente contra GBS era segura y bien tolerada en los ocho grupos de estudio de la vacuna en comparación con el placebo. La seguridad fue evaluada mediante: porcentajes de sujetos con reacciones locales recabadas (es decir dolor en el sitio de inyección, equimosis, eritema, induración e hinchazón) y reacciones sistémicas recabadas (es decir escalofríos, náuseas, malestar general, mialgia, cefalea, fatiga, artralgia, erupción cutánea, fiebre [definida como temperatura axilar  $\geq 38^{\circ}\text{C}$ ], y otras reacciones que ocurren durante los 7 días posteriores a cada vacunación junto con la gravedad de las reacciones; todos los otros eventos adversos referidos desde el día 1 hasta el día 23 después de cada vacunación; porcentajes de sujetos con eventos adversos graves y/o eventos adversos referidos que dieron como resultado el abandono del estudio, por grupo de vacunas hasta el Día 61.

#### **Estudio en seres humanos (4)**

Las respuestas de los sujetos con niveles de anticuerpos (Ab) por debajo de la detección al ingreso al estudio (0,4, 0,084 y 0,068 µg/ml para los serotipos Ia, Ib y III, respectivamente) fueron de particular interés. Este subconjunto de análisis se llevó a cabo sobre los datos del *Estudio en seres humano (3)* anterior. Para cada serotipo, los datos se evaluaron como:

- (a) GMC para cada grupo de inyección/formulación/dosis, y CI del 95% correspondiente
- (b) GMC sobre todos los sujetos que recibieron (i) 1 inyección independientemente de una asignación grupal y esto se comparó con la GMC de todos los sujetos que recibieron 2 inyecciones. De forma similar, la GMC de los sujetos que no recibieron coadyuvante en comparación con la GMC de los sujetos que recibieron alum., así como la GMC de los que recibieron dosis de 5/5/5 µg en comparación con la GMC de todos los sujetos que recibieron 20/20/20 µg. La evaluación se basó en la razón de GMC, junto con la CI del 95% bilateral en torno a la razón calculada.

- (c) Proporción de sujetos con un cambio de al menos 4 veces desde el valor basal, suponiendo la mitad del nivel más bajo de detección (Ild).

En general, aproximadamente 25% y 50% de las mujeres presentaron niveles de Ab por debajo del límite de detección para los serotipos III y Ia/Ib, respectivamente. El porcentaje de sujetos en este subconjunto que logran un aumento  $\geq 4$  veces en el nivel de Ab el día 61 en comparación con el valor basal (donde el valor basal se asigna a la mitad de Ild) oscila entre 64 y 95% (serotipo Ia), 80-100% (serotipo III) y 81-100% (serotipo Ib).

De forma similar a los resultados de la cohorte de estudio completa, los sujetos con niveles indetectables de Ab en el ingreso al estudio tampoco muestran el beneficio adicional de 2 inyecciones (frente a 1 inyección), de una dosis más alta (versus dosis más baja) o de la inclusión de alum. (frente a la ausencia de coadyuvante). La razón de GMC (el día 61) para todos los sujetos que recibieron una inyección frente a los sujetos que recibieron 2 inyecciones fue de 1,1 (0,6-1,8; serotipo Ia), 0,7 (0,3-1,5; serotipo III) y 0,9 (0,5-1,4; serotipo Ib); para todos los sujetos que recibieron una dosificación de 5  $\mu\text{g}$  frente a todos los que recibieron 20  $\mu\text{g}$  fue de 1,3 (0,8-2,1; serotipo Ia), 1,4 (0,7-2,8; serotipo III) y 1,4 (0,9-2,3; serotipo Ib); para todos los sujetos que no recibieron coadyuvante frente a todos los sujetos que recibieron alum. fue de 1,4 (0,8-2,4; serotipo Ia), 1 (0,5-2,0; serotipo III) y 1,7 (1,1-2,7; serotipo Ib)

### 15 **Estudio con ratones (15)**

Los ratones se cebaron con CRM197 y coadyuvante de hidróxido de aluminio o coadyuvante de hidróxido de aluminio solo el día 0 y a continuación se inmunizaron con un producto conjugado de serotipo III de GBS/CRM197 con coadyuvante o sin coadyuvante de hidróxido de aluminio los días 21 y 35. Se extrajo sangre el día 0 y antes la vacunación los días 21 y 35. Se midieron los títulos séricos de IgG/IgM del polisacárido de serotipo III de GBS y la proteína portadora CRM197 a partir de las muestras de sangre.

Como se muestra en la Figura 4, el cebado con el portador CRM197 dio como resultado una respuesta de anticuerpos IgG significativamente mayor al portador después de una y dos dosis de la vacuna (con o sin coadyuvante) en comparación con los ratones no cebados ( $P < 0,0002$ ). El cebado también dio como resultado una buena respuesta de anticuerpos contra el polisacárido de serotipo III de GBS después de dos dosis de vacuna (con o sin coadyuvante). Los ratones no cebados necesitaron el coadyuvante para alcanzar un título de anticuerpo anti-polisacárido comparable al observado en ratones cebados. En ratones no cebados, cuando la vacuna de producto glicoconjugado se administró sin coadyuvante, el título de anticuerpos fue significativamente menor que en los otros grupos ( $P < 0,03$ ).

Por lo tanto, el cebado con CRM197 parece tener una influencia positiva en la posterior respuesta de anticuerpos al componente de sacárido capsular de GBS del producto conjugado, incluso cuando se administra sin un coadyuvante.

### **Estudios en ratas y conejos**

Se llevaron a cabo estudios para evaluar la posible toxicidad reproductiva y para desarrollo de la vacuna de producto conjugado de sacárido capsular de serotipo Ia, Ib y III de GBS-CRM197 trivalente en ratas y conejos.

35 El estudio en ratas se llevó a cabo de acuerdo con la tabla 20 a continuación:

**Tabla 20: Estudio en ratas**

Tratamiento	Dosis de cada antígeno <sup>±</sup> ( $\mu\text{g}$ )	Volumen de dosis SC (mL)	Días de dosificación con respecto al apareamiento el Día 0	Número de animales	
				Sección C (gestación día 21)	Parto natural
Control (solución salina)	0/0/0	0,5	-35, -21, -7, 6, 12, 17	24	24
Vacuna GBS	20/20/20	0,5		24	24
Vacuna GBS	20/20/20	0,5	6, 12, 17	24	24
Vacuna de GBS + alum*	20/20/20	0,5	-35, -21, -7, 6, 12, 17	24	24
Vacuna de GBS + alum*	20/20/20	0,5	6, 12, 17	24	24

<sup>±</sup> para serotipo Ia/Ib/III  
\* hidróxido de aluminio, 2 mg/ml

5 La administración subcutánea de la vacuna trivalente a ratas hembra los días de estudio 1, 15 y 29 (período de preapareamiento) y/o los días de gestación 6, 12 y 17 a una dosis de 20 µg con o sin hidróxido de aluminio no ocasionó toxicidad materna o efectos sobre la función reproductiva o desarrollo embriofetal. No se observaron diferencias entre los grupos tratados con tres o seis inyecciones de la vacuna trivalente con o sin coadyuvante de hidróxido de aluminio. Además, no hubo ningún efecto sobre la supervivencia, el estado clínico o el peso corporal o la capacidad reproductiva de las crías de la generación F1.

El estudio en conejos se llevó a cabo de acuerdo con la tabla 21 a continuación:

**Tabla 21: Estudio en conejos**

Tratamiento	Dosis de cada antígeno <sup>±</sup> (µg)	Volumen de dosis de IM (mL)	Días de dosificación con respecto al apareamiento el Día 0	Número de animales	
				Sección C (día de gestación 29)	Parto natural
Control (solución salina)	0/0/0	0,5	-35, -21, -7, 7, 20	23	25
Vacuna de GBS + alum*	20/20/20	0,5	-35, -21, -7, 7, 20	23	25
Vacuna GBS + alum.	20/20/20	0,5	7, 20	23	25

± para serotipo Ia/Ib/III  
\* hidróxido de aluminio, 2 mg/ml

10 La administración intramuscular de la vacuna trivalente más hidróxido de aluminio a conejos hembra, a una dosis de 20 µg los días de estudio 1, 15 y 29 (período de preapareamiento) y/o los días de gestación 7 y 20, no produjo toxicidad materna, efectos sobre el apareamiento ni evidencia de embrioleta, fetotoxicidad o teratogenicidad. No hubo diferencias entre la generación F1 de adultos control y la tratada con vacuna.

15 Estos estudios demostraron que la vacuna trivalente era inmunogénica y no tenía ningún efecto prenatal o postnatal sobre ratas o conejos preñados o su descendencia.

#### **Estudio de estabilidad**

20 La estabilidad de la vacuna de producto conjugado de sacárido capsular con serotipo Ia, Ib y III de GBS-CRM197 trivalente se midió durante 1 mes de almacenamiento a dos temperaturas diferentes. La vacuna se formuló reuniendo los tres productos glicoconjugados, cada uno presente a 80 µg de sacárido/ml en KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM y manitol al 3%. Se cargaron viales de una sola dosis de 3 ml con 0,3 ml de solución, se taparon parcialmente con un tapón de goma siliconado con bromobutililo y se sometieron a un ciclo de liofilización. Una vez que finalizó el procedimiento de liofilización, los viales se almacenaron a 2-8°C o 36-38°C. Se detectó un ligero aumento en el contenido de sacárido libre (utilizando HPAEC-PAD) tras el almacenamiento a 36-38°C. Sin embargo, en general, la vacuna trivalente fue estable durante el almacenamiento hasta un mes a 2-8°C y a 36-38°C.

25 Se entenderá que la invención se ha descrito únicamente a modo de ejemplo y se pueden hacer modificaciones.

#### **Referencias**

- [1] Paoletti et al. (1990) J Biol Chem 265:18278-83.
- [2] Wessels et al. (1990) J Clin Invest 86:1428-33.
- [3] Paoletti et al. (1992) Infect Immun 60:4009-14.
- 30 [4] Paoletti et al. (1992) J Clin Invest 89:203-9.
- [5] Wessels et al. (1987) Proc Natl Acad Sci USA 84:9170-4.
- [6] Wang et al. (2003) Vaccine 21:1112-7.
- [7] Wessels et al. (1993) Infect Immun 61:4760-6
- [8] Wessels et al. (1995) J Infect Dis 171:879-84.
- 35 [9] Baker et al. (2004) J Infect Dis 189:1103-12.

- [10] Paoletti & Kasper (2003) *Expert Opin Biol Ther* 3:975-84.
- [11] Brigtsen et al. (2002) *JID*, 185 :1277-84.
- [13] WO2006/050341
- [14] Guttormsen et al. (2008) *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(15):5903-8. Epub 31 de marzo de 2008.
- 5 [15] WO96/40795
- [16] Michon et al. (2006) *Clin Vaccine Immunol*. Agosto de 2006;13(8):936-43.
- [17] Patentes de Estados Unidos 6027733 y 6274144.
- [18] [www.polymer.de](http://www.polymer.de)
- [19] Lewis et al. (2004) *PNAS USA* 101:11123-8.
- 10 [20] Wessels et al. (1989) *Infect Immun* 57:1089-94.
- [21] WO2006/082527.
- [22] Solicitud de Patente de Estados Unidos US 61/008,941, titulada "FERMENTATION PROCESSES FOR CULTIVATING STREPTOCOCCI AND PURIFICATION PROCESSES FOR OBTAINING CPS THEREFROM" presentada el 20 de diciembre de 2007 y la solicitud de patente internacional WO 2009/081276.
- 15 [23] Ramsay et al. (2001) *Lancet* 357(9251):195-196.
- [24] Lindberg (1999) *Vaccine* 17 Supl 2: S28-36.
- [25] Buttery & Moxon (2000) *J R Coll Physicians Lond* 34:163-68.
- [26] Ahmad & Chapnick (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:113-33, vii.
- [27] Goldblatt (1998) *J. Med. Microbiol.* 47:563-7.
- 20 [28] Patente europea 0477508.
- [29] Patente de Estados Unidos 5.306.492.
- [30] WO98/42721.
- [31] Dick et al. in *Conjugate Vaccines* (eds. Cruse et al.) Karger, Basel, 1989, 10:48-114.
- [32] *Hermanson Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego (1996) ISBN: 0123423368.
- 25 [33] Patente de Estados Unidos 4356170.
- [34] WO2006/082530.
- [35] WO2005/000346
- [36] Anonymous (Enero 2002) *Research Disclosure*, 453077.
- [37] Anderson (1983) *Infect Immun* 39(1):233-238.
- 30 [38] Anderson et al. (1985) *J Clin Invest* 76(1):52-59.
- [39] EP-A-0372501.
- [40] EP-A-0378881.
- [41] EP-A-0427347.
- [42] WO93/17712
- 35 [43] WO94/03208.
- [44] WO98/58668.
- [45] EP-A-0471177.

- [46] WO91/01146
- [47] Falugi et al. (2001) *Eur J Immunol* 31:3816-24.
- [48] Baraldo et al. (2004) *Infect Immun* 72:4884-87.
- [49] EP-A-0594610.
- 5 [50] WO00/56360.
- [51] WO02/091998.
- [52] Kuo et al. (1995) *Infect Immun* 63:2706-13.
- [53] WO01/72337
- [54] WO00/61761.
- 10 [55] WO00/33882
- [56] WO99/42130.
- [57] WO2004/011027.
- [58] WO96/40242.
- [59] Lei et al. (2000) *Dev Biol (Basel)* 103:259-264.
- 15 [60] WO00/38711; Patente de Estados Unidos 6.146.902.
- [61] Solicitud de patente internacional PCT/IB2008/02690, 'CONJUGATE PURIFICATION', que reivindica prioridad sobre GB-0713880.3 (NOVARTIS AG), publicada como WO 2009/010877.
- [62] WO99/24578.
- [63] WO99/36544.
- 20 [64] WO99/57280.
- [65] WO00/22430.
- [66] Tettelin et al. (2000) *Science* 287:1809-1815.
- [67] WO96/29412.
- [68] Pizza et al. (2000) *Science* 287:1816-1820.
- 25 [69] WO01/52885.
- [70] Bjune et al. (1991) *Lancet* 338(8775):1093-1096.
- [71] Fukasawa et al. (1999) *Vaccine* 17:2951-2958.
- [72] Rosenqvist et al. (1998) *Dev. Biol. Stand.* 92:323-333.
- [73] Costantino et al. (1992) *Vaccine* 10:691-698.
- 30 [74] WO03/007985.
- [75] Watson (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:331-332.
- [76] Rubin (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:269-285, v.
- [77] Jedrzejewski (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65:187-207.
- [78] Bell (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:1187-1188.
- 35 [79] Iwarson (1995) *APMIS* 103:321-326.
- [80] Gerlich et al. (1990) *Vaccine* 8 Supl:S63-68 & 79-80.
- [81] Hsu et al. (1999) *Clin Liver Dis* 3:901-915.

- [82] Gustafsson et al. (1996) *N. Engl. J. Med.* 334:349-355.
- [83] Rappuoli et al. (1991) *TIBTECH* 9:232-238.
- [84] *Vaccines* (2004) eds. Plotkin & Orenstein. ISBN 0-7216-9688-0.
- [85] WO02/02606.
- 5 [86] Kalman et al. (1999) *Nature Genetics* 21:385-389.
- [87] Read et al. (2000) *Nucleic Acids Res* 28:1397-406.
- [88] Shirai et al. (2000) *J. Infect. Dis.* 181(Supl 3):S524-S527.
- [89] WO99/27105.
- [90] WO00/27994.
- 10 [91] WO00/37494.
- [92] WO99/28475.
- [93] Ross et al. (2001) *Vaccine* 19:4135-4142.
- [94] Sutter et al. (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:287-308.
- [95] Zimmerman & Spann (1999) *Am Fam Physician* 59:113-118, 125-126.
- 15 [96] Dreesen (1997) *Vaccine* 15 Supl:S2-6.
- [97] *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 16 de enero de 1998;47(1):12, 19.
- [98] McMichael (2000) *Vaccine* 19 Supl 1:5101-107.
- [99] WO02/34771.
- [100] Dale (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:227-43, viii.
- 20 [101] Ferretti et al. (2001) *PNAS USA* 98: 4658-4663.
- [102] Kuroda et al. (2001) *Lancet* 357(9264):1225-1240; véanse también las páginas 1218-1219.
- [103] Robinson & Torres (1997) *Seminars in Immunology* 9:271-283.
- [104] Donnelly et al. (1997) *Annu Rev Immunol* 15:617-648.
- [105] Scott-Taylor & Dalglish (2000) *Expert Opin Investing Drugs* 9:471-480.
- 25 [106] Apostolopoulos & Plebanski (2000) *Curr Opin Mol Ther* 2:441-447.
- [107] Ilan (1999) *Curr Opin Mol Ther* 1:116-120.
- [108] Dubensky et al. (2000) *Mol Med* 6:723-732.
- [109] Robinson & Pertmer (2000) *Adv Virus Res* 55:1-74.
- [110] Donnelly et al. (2000) *Am T Respir Crit Care Med* 162(4 Pt 2):S190-193.
- 30 [111] Davis (1999) *Mt. Sinai J. Med.* 66:84-90.
- [112] Paoletti et al. (2001) *Vaccine* 19:2118-2126.
- [113] WO00/56365.
- [114] Gennaro (2000) Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*. 20ª edición, ISBN: 0683306472.
- [115] Paoletti (2001) *Vaccine* 19(15-16):2118-26.
- 35 [116] Almeida & Alpar (1996) *J. Drug Targeting* 3:455-467.
- [117] Agarwal & Mishra (1999) *Indian J Exp Biol* 37:6-16.
- [118] WO00/53221.

- [119] Jakobsen et al. (2002) *Infect Immun* 70:1443-1452.
- [120] Bergquist et al. (1998) *APMIS* 106:800-806.
- [121] Baudner et al. (2002) *Infect Immun* 70:4785-4790.
- [122] Ugozzoli et al. (2002) *J Infect Dis* 186:1358-1361.
- 5 [123] Patente de Estados Unidos 6355271.
- [124] WO00/23105.
- [125] WO90/14837.
- [126] Podda (2001) *Vaccine* 19:2673-80.
- [127] Frey et al. (2003) *Vaccine* 21:4234-7.
- 10 [128] US Patent 6,299,884.
- [129] US Patent 6,451,325.
- [130] Patente de Estados Unidos 5.057.540.
- [131] WO96/33739.
- [132] EP-A-0109942.
- 15 [133] WO96/11711.
- [134] WO00/07621.
- [135] Barr et al. (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:247-271.
- [136] Sjolander et al. (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:321-338.
- [137] Niikura et al. (2002) *Virology* 293:273-280.
- 20 [138] Lenz et al. (2001) *J Immunol* 166:5346-5355.
- [139] Pinto et al. (2003) *J Infect Dis* 188:327-338.
- [140] Gerber et al. (2001) *Virology* 75:4752-4760.
- [141] WO03/024480
- [142] WO03/024481
- 25 [143] Gluck et al. (2002) *Vaccine* 20:B10-B16.
- [144] EP-A-0689454.
- [145] Johnson et al. (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.
- [146] Evans et al. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:219-229.
- [147] Meraldi et al. (2003) *Vaccine* 21:2485-2491.
- 30 [148] Pajak et al. (2003) *Vaccine* 21:836-842.
- [149] Kandimalla et al. (2003) *Nucleic Acids Research* 31:2393-2400.
- [150] WO02/26757.
- [151] WO99/62923.
- [152] Krieg (2003) *Nature Medicine* 9:831-835.
- 35 [153] McCluskie et al. (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32:179-185.
- [154] WO98/40100.
- [155] Patente de Estados Unidos 6.207.646.

- [156] Patente de Estados Unidos 6.239.116.  
 [157] Patente de Estados Unidos 6.429.199.  
 [158] Kandimalla et al. (2003) Biochemical Society Transactions 31 (parte 3):654-658.  
 [159] Blackwell et al. (2003) J Immunol 170:4061-4068.
- 5 [160] Krieg (2002) Trends Immunol 23:64-65.  
 [161] WO01/95935.  
 [162] Kandimalla et al. (2003) BBRC 306:948-953.  
 [163] Bhagat et al. (2003) BBRC 300:853-861.  
 [164] WO03/035836.
- 10 [165] WO95/17211.  
 [166] WO98/42375.  
 [167] Beignon et al. (2002) Infect Immun 70:3012-3019.  
 [168] Pizza et al. (2001) Vaccine 19:2534-2541.  
 [169] Pizza et al. (2000) Int J Med Microbiol 290:455-461.
- 15 [170] Scharon-Kersten et al. (2000) Infect Immun 68:5306-5313.  
 [171] Ryan et al. (1999) Infect Immun 67:6270-6280.  
 [172] Partidos et al. (1999) Immunol Lett 67:209-216.  
 [173] Peppoloni et al. (2003) Expert Rev Vaccines 2:285-293.  
 [174] Pine et al. (2002) J Control Release 85:263-270.
- 20 [175] Domenighini et al. (1995) Mol Microbiol 15:1165-1167.  
 [176] WO99/40936.  
 [177] WO99/44636.  
 [178] Singh et al] (2001) J Cont Release 70:267-276.  
 [179] WO99/27960.
- 25 [180] Patente de Estados Unidos 6.090.406  
 [181] Patente de Estados Unidos 5.916.588  
 [182] EP-A-0626169.  
 [183] WO99/52549.  
 [184] WO01/21207.
- 30 [185] WO01/21152.  
 [186] Andrianov et al. (1998) Biomaterials 19:109-115.  
 [187] Payne et al. (1998) Adv Drug Delivery Review 31:185-196.  
 [188] Stanley (2002) Clin Exp Dermatol 27:571-577.  
 [189] Jones (2003) Curr Opin Investing Drugs 4:214-218.
- 35 [190] WO04/60308  
 [191] WO04/64759.  
 [192] WO99/11241.

- [193] WO94/00153.
- [194] WO98/57659.
- [195] Solicitudes de patente europea 0835318, 0735898 y 0761231.
- [196] Hennings et al. (2001) *J Infect Dis.* 183(7):1138-42. Epub 1 de marzo de 2001.
- 5 [197] Lin et al. (2001) *J Infect Dis.* 184(8):1022-8.
- [198] Lin et al. (2004) *J Infect Dis.* 190(5):928-34
- [199] Glezen & Alpers (1999) *Clin. Infect. Dis.* 28:219-224
- [200] Madoff et al. (1994) *J Clin Invest* 94:286-92.
- [201] Paoletti et al. (1994) *Infect Immun* 62:3236-43.
- 10 [202] WO03/093306.
- [203] WO2004/018646.
- [204] WO2004/041157.
- [205] Adderson et al. (2003) *Infection and Immunity* 71(12):6857-6863.
- [206] Geysen et al. (1984) *PNAS USA* 81:3998-4002.
- 15 [207] Carter (1994) *Methods Mol Biol* 36:207-23.
- [208] Jameson, BA et al. 1988, *CABIOS* 4(1):181-186.
- [209] Raddrizzani & Hammer (2000) *Brief Bioinform* 1(2):179-89.
- [210] De Lalla et al. (1999) *J. Immunol.* 163:1725-29.
- [211] Brusica et al. (1998) *Bioinformatics* 14(2):121-30
- 20 [212] Meister et al. (1995) *Vaccine* 13(6):581-91.
- [213] Roberts et al. (1996) *AIDS Res Hum Retroviruses* 12(7):593-610.
- [214] Maksyutov & Zagrebelnaya (1993) *Comput Appl Biosci* 9(3):291-7.
- [215] Feller & de la Cruz (1991) *Nature* 349(6311):720-1.
- [216] Hopp (1993) *Peptide Research* 6:183-190.
- 25 [217] Welling et al. (1985) *FEBS Lett.* 188:215-218.
- [218] Davenport et al. (1995) *Immunogenetics* 42:392-297.
- [219] Bodanszky (1993) *Principles of Peptide Synthesis* (ISBN: 0387564314).
- [220] Fields et al. (1997) *Meth Enzymol* 289: Solid-Phase Peptide Synthesis. ISBN: 0121821900.
- [221] Chan & White (2000) *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis*. ISBN: 0199637245.
- 30 [222] Kullmann (1987) *Enzymatic Peptide Synthesis*. ISBN: 0849368413.
- [223] Ibba (1996) *Biotechnol Genet Eng Rev* 13:197-216.
- [224] WO2006/069200
- [225] Solicitud de patente del Reino Unido 0802503.3, titulada "HYBRID POLYPEPTIDE" presentada el 11 de febrero de 2008, y solicitud de patente internacional WO2009/101403.
- 35 [226] Needleman & Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48, 443-453.
- [227] Rice et al. (2000) *Trends Genet* 16:276-277.
- [228] Herzenberg et al. (1980) *Nature* 285: 664-667.

- [229] Schutze et al. (1985) J Immunol 135:2319-2322.
- [230] Dagan et al. (1998) Infect Immun 66:2093-2098.
- [231] Barington et al. (1994) Infect Immun 62:9-14.
- [232] Di John et al. (1989) Lancet 2(8677):1415-8.
- 5 [233] Granoff et al. (1993) Vaccine Supl1: S46-51.
- [234] Granoff et al. (1994) JAMA 272:1116-1121.
- [235] Barington et al. (1993) Infect Immun 61:432-438.
- [236] Patente de Australia 748716 (concedida a partir de WO98/51339).
- [237] Olander et al. (2001) Vaccine 20:336-341.
- 10 [238] Burrage et al. (2002) Infect Immun 70:4946-4954.
- [239] Hoppenbrouwers et al. (1999) Vaccine 17:2588-98.
- [240] Podda et al. (1991) Vaccine 9:741-745.
- [241] Vaccines. (eds. Plotkin & Orenstein). 4ª edición, 2004, ISBN: 0-7216-9688-0
- [242] Darkes & Plosker (2002) Paediatr Drugs 4:609-630.
- 15 [243] Jones (2001) Curr Opin Investing Drugs 2:47-49
- [244] Del Guidice et al. (1998) Molecular Aspects of Medicine 19:1-70.
- [245] Anonymous (Jan 2002) Research Disclosure, 453077.
- [246] Anderson (1983) Infect Immun 39(1):233-238.
- [247] Anderson et al. (1985) J Clin Invest 76(1):52-59.
- 20 [248] Rodewald et al. (1992) J Infect Dis. 166(3):635-9.
- [249] Baltimore et al. (1977) J Immunol. 118(2):673-8
- [250] Lin et al. (2001) J Infect Dis. 184(8):1022-8.
- [253] Lancaster et al. (2009), Meningitis and Septicaemia in Children and Adults, Royal Society of Medicine, London, [www.meningitis.org/conference#sthash.6RAnxqST.dpuf](http://www.meningitis.org/conference#sthash.6RAnxqST.dpuf)
- 25 **Listado de secuencias**
- <110> Novartis AG
- <120> Composiciones inmunogénicas
- <130> P056312WO
- <140> PCT/IB2011/\_
- 30 <141> 2011-09-16
- <150> US 61/383,668
- <151> 2010-09-16
- <150> GB 1101665.6
- <151> 2011-01-31
- 35 <160> 26
- <170> SeqWin2010, versión 1.0
- <210> 1
- <211> 901
- <212> PRT
- 40 <213> Streptococcus agalactiae serotipo V cepa 2603 V/R

ES 2 677 358 T3

<400> 1

Met Arg Lys Tyr Gln Lys Phe Ser Lys Ile Leu Thr Leu Ser Leu Phe  
 1 5 10 15

Cys Leu Ser Gln Ile Pro Leu Asn Thr Asn Val Leu Gly Glu Ser Thr  
 20 25 30

Val Pro Glu Asn Gly Ala Lys Gly Lys Leu Val Val Lys Lys Thr Asp  
 35 40 45

Asp Gln Asn Lys Pro Leu Ser Lys Ala Thr Phe Val Leu Lys Thr Thr  
 50 55 60

Ala His Pro Glu Ser Lys Ile Glu Lys Val Thr Ala Glu Leu Thr Gly  
 65 70 75 80

Glu Ala Thr Phe Asp Asn Leu Ile Pro Gly Asp Tyr Thr Leu Ser Glu  
 85 90 95

Glu Thr Ala Pro Glu Gly Tyr Lys Lys Thr Asn Gln Thr Trp Gln Val  
 100 105 110

Lys Val Glu Ser Asn Gly Lys Thr Thr Ile Gln Asn Ser Gly Asp Lys  
 115 120 125

Asn Ser Thr Ile Gly Gln Asn Gln Glu Glu Leu Asp Lys Gln Tyr Pro  
 130 135 140

Pro Thr Gly Ile Tyr Glu Asp Thr Lys Glu Ser Tyr Lys Leu Glu His  
 145 150 155 160

Val Lys Gly Ser Val Pro Asn Gly Lys Ser Glu Ala Lys Ala Val Asn  
 165 170 175

Pro Tyr Ser Ser Glu Gly Glu His Ile Arg Glu Ile Pro Glu Gly Thr  
 180 185 190

Leu Ser Lys Arg Ile Ser Glu Val Gly Asp Leu Ala His Asn Lys Tyr  
 195 200 205

ES 2 677 358 T3

Lys Ile Glu Leu Thr Val Ser Gly Lys Thr Ile Val Lys Pro Val Asp  
 210 215 220  
 Lys Gln Lys Pro Leu Asp Val Val Phe Val Leu Asp Asn Ser Asn Ser  
 225 230 235 240  
 Met Asn Asn Asp Gly Pro Asn Phe Gln Arg His Asn Lys Ala Lys Lys  
 245 250 255  
 Ala Ala Glu Ala Leu Gly Thr Ala Val Lys Asp Ile Leu Gly Ala Asn  
 260 265 270  
 Ser Asp Asn Arg Val Ala Leu Val Thr Tyr Gly Ser Asp Ile Phe Asp  
 275 280 285  
 Gly Arg Ser Val Asp Val Val Lys Gly Phe Lys Glu Asp Asp Lys Tyr  
 290 295 300  
 Tyr Gly Leu Gln Thr Lys Phe Thr Ile Gln Thr Glu Asn Tyr Ser His  
 305 310 315 320  
 Lys Gln Leu Thr Asn Asn Ala Glu Glu Ile Ile Lys Arg Ile Pro Thr  
 325 330 335  
 Glu Ala Pro Lys Ala Lys Trp Gly Ser Thr Thr Asn Gly Leu Thr Pro  
 340 345 350  
 Glu Gln Gln Lys Glu Tyr Tyr Leu Ser Lys Val Gly Glu Thr Phe Thr  
 355 360 365  
 Met Lys Ala Phe Met Glu Ala Asp Asp Ile Leu Ser Gln Val Asn Arg  
 370 375 380  
 Asn Ser Gln Lys Ile Ile Val His Val Thr Asp Gly Val Pro Thr Arg  
 385 390 395 400  
 Ser Tyr Ala Ile Asn Asn Phe Lys Leu Gly Ala Ser Tyr Glu Ser Gln  
 405 410 415  
 Phe Glu Gln Met Lys Lys Asn Gly Tyr Leu Asn Lys Ser Asn Phe Leu  
 420 425 430  
 Leu Thr Asp Lys Pro Glu Asp Ile Lys Gly Asn Gly Glu Ser Tyr Phe  
 435 440 445  
 Leu Phe Pro Leu Asp Ser Tyr Gln Thr Gln Ile Ile Ser Gly Asn Leu  
 450 455 460  
 Gln Lys Leu His Tyr Leu Asp Leu Asn Leu Asn Tyr Pro Lys Gly Thr  
 465 470 475 480  
 Ile Tyr Arg Asn Gly Pro Val Lys Glu His Gly Thr Pro Thr Lys Leu  
 485 490 495  
 Tyr Ile Asn Ser Leu Lys Gln Lys Asn Tyr Asp Ile Phe Asn Phe Gly  
 500 505 510  
 Ile Asp Ile Ser Gly Phe Arg Gln Val Tyr Asn Glu Glu Tyr Lys Lys  
 515 520 525  
 Asn Gln Asp Gly Thr Phe Gln Lys Leu Lys Glu Glu Ala Phe Lys Leu  
 530 535 540  
 Ser Asp Gly Glu Ile Thr Glu Leu Met Arg Ser Phe Ser Ser Lys Pro

ES 2 677 358 T3

545					550						555					560
Glu	Tyr	Tyr	Thr	Pro	Ile	Val	Thr	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Asn	Asn	Glu	
				565					570					575		
Ile	Leu	Ser	Lys	Ile	Gln	Gln	Gln	Phe	Glu	Thr	Ile	Leu	Thr	Lys	Glu	
			580					585					590			
Asn	Ser	Ile	Val	Asn	Gly	Thr	Ile	Glu	Asp	Pro	Met	Gly	Asp	Lys	Ile	
		595					600					605				
Asn	Leu	Gln	Leu	Gly	Asn	Gly	Gln	Thr	Leu	Gln	Pro	Ser	Asp	Tyr	Thr	
	610					615					620					
Leu	Gln	Gly	Asn	Asp	Gly	Ser	Val	Met	Lys	Asp	Gly	Ile	Ala	Thr	Gly	
625					630					635					640	
Gly	Pro	Asn	Asn	Asp	Gly	Gly	Ile	Leu	Lys	Gly	Val	Lys	Leu	Glu	Tyr	
				645					650					655		
Ile	Gly	Asn	Lys	Leu	Tyr	Val	Arg	Gly	Leu	Asn	Leu	Gly	Glu	Gly	Gln	
			660					665					670			
Lys	Val	Thr	Leu	Thr	Tyr	Asp	Val	Lys	Leu	Asp	Asp	Ser	Phe	Ile	Ser	
		675					680					685				
Asn	Lys	Phe	Tyr	Asp	Thr	Asn	Gly	Arg	Thr	Thr	Leu	Asn	Pro	Lys	Ser	
	690					695					700					
Glu	Asp	Pro	Asn	Thr	Leu	Arg	Asp	Phe	Pro	Ile	Pro	Lys	Ile	Arg	Asp	
705					710					715					720	
Val	Arg	Glu	Tyr	Pro	Thr	Ile	Thr	Ile	Lys	Asn	Glu	Lys	Lys	Leu	Gly	
				725					730					735		
Glu	Ile	Glu	Phe	Ile	Lys	Val	Asp	Lys	Asp	Asn	Asn	Lys	Leu	Leu	Leu	
			740					745					750			
Lys	Gly	Ala	Thr	Phe	Glu	Leu	Gln	Glu	Phe	Asn	Glu	Asp	Tyr	Lys	Leu	
		755					760					765				
Tyr	Leu	Pro	Ile	Lys	Asn	Asn	Asn	Ser	Lys	Val	Val	Thr	Gly	Glu	Asn	
	770					775						780				
Gly	Lys	Ile	Ser	Tyr	Lys	Asp	Leu	Lys	Asp	Gly	Lys	Tyr	Gln	Leu	Ile	
785					790					795					800	
Glu	Ala	Val	Ser	Pro	Glu	Asp	Tyr	Gln	Lys	Ile	Thr	Asn	Lys	Pro	Ile	
				805					810					815		
Leu	Thr	Phe	Glu	Val	Val	Lys	Gly	Ser	Ile	Lys	Asn	Ile	Ile	Ala	Val	
			820					825						830		
Asn	Lys	Gln	Ile	Ser	Glu	Tyr	His	Glu	Glu	Gly	Asp	Lys	His	Leu	Ile	
		835					840					845				
Thr	Asn	Thr	His	Ile	Pro	Pro	Lys	Gly	Ile	Ile	Pro	Met	Thr	Gly	Gly	
	850					855						860				
Lys	Gly	Ile	Leu	Ser	Phe	Ile	Leu	Ile	Gly	Gly	Ala	Met	Met	Ser	Ile	
865					870						875				880	
Ala	Gly	Gly	Ile	Tyr	Ile	Trp	Lys	Arg	Tyr	Lys	Lys	Ser	Ser	Asp	Met	
				885					890					895		

Ser Ile Lys Lys Asp  
900

<210> 2

<211> 554

<212> PRT

5 <213> Streptococcus agalactiae serotipo V cepa 2603 V/R

<400> 2

Met Lys Leu Ser Lys Lys Leu Leu Phe Ser Ala Ala Val Leu Thr Met  
1 5 10 15

Val Ala Gly Ser Thr Val Glu Pro Val Ala Gln Phe Ala Thr Gly Met  
20 25 30

Ser Ile Val Arg Ala Ala Glu Val Ser Gln Glu Arg Pro Ala Lys Thr  
35 40 45

Thr Val Asn Ile Tyr Lys Leu Gln Ala Asp Ser Tyr Lys Ser Glu Ile  
50 55 60

Thr Ser Asn Gly Gly Ile Glu Asn Lys Asp Gly Glu Val Ile Ser Asn  
65 70 75 80

Tyr Ala Lys Leu Gly Asp Asn Val Lys Gly Leu Gln Gly Val Gln Phe  
85 90 95

Lys Arg Tyr Lys Val Lys Thr Asp Ile Ser Val Asp Glu Leu Lys Lys  
100 105 110

Leu Thr Thr Val Glu Ala Ala Asp Ala Lys Val Gly Thr Ile Leu Glu  
115 120 125

Glu Gly Val Ser Leu Pro Gln Lys Thr Asn Ala Gln Gly Leu Val Val  
130 135 140

Asp Ala Leu Asp Ser Lys Ser Asn Val Arg Tyr Leu Tyr Val Glu Asp  
145 150 155 160

Leu Lys Asn Ser Pro Ser Asn Ile Thr Lys Ala Tyr Ala Val Pro Phe  
165 170 175

Val Leu Glu Leu Pro Val Ala Asn Ser Thr Gly Thr Gly Phe Leu Ser  
180 185 190

Glu Ile Asn Ile Tyr Pro Lys Asn Val Val Thr Asp Glu Pro Lys Thr  
195 200 205

Asp Lys Asp Val Lys Lys Leu Gly Gln Asp Asp Ala Gly Tyr Thr Ile  
210 215 220

Gly Glu Glu Phe Lys Trp Phe Leu Lys Ser Thr Ile Pro Ala Asn Leu  
225 230 235 240

Gly Asp Tyr Glu Lys Phe Glu Ile Thr Asp Lys Phe Ala Asp Gly Leu  
245 250 255

Thr Tyr Lys Ser Val Gly Lys Ile Lys Ile Gly Ser Lys Thr Leu Asn  
260 265 270

Arg Asp Glu His Tyr Thr Ile Asp Glu Pro Thr Val Asp Asn Gln Asn  
275 280 285

Thr Leu Lys Ile Thr Phe Lys Pro Glu Lys Phe Lys Glu Ile Ala Glu  
290 295 300

ES 2 677 358 T3

Leu Leu Lys Gly Met Thr Leu Val Lys Asn Gln Asp Ala Leu Asp Lys  
 305 310 315 320

Ala Thr Ala Asn Thr Asp Asp Ala Ala Phe Leu Glu Ile Pro Val Ala  
 325 330 335

Ser Thr Ile Asn Glu Lys Ala Val Leu Gly Lys Ala Ile Glu Asn Thr  
 340 345 350

Phe Glu Leu Gln Tyr Asp His Thr Pro Asp Lys Ala Asp Asn Pro Lys  
 355 360 365

Pro Ser Asn Pro Pro Arg Lys Pro Glu Val His Thr Gly Gly Lys Arg  
 370 375 380

Phe Val Lys Lys Asp Ser Thr Glu Thr Gln Thr Leu Gly Gly Ala Glu  
 385 390 395 400

Phe Asp Leu Leu Ala Ser Asp Gly Thr Ala Val Lys Trp Thr Asp Ala  
 405 410 415

Leu Ile Lys Ala Asn Thr Asn Lys Asn Tyr Ile Ala Gly Glu Ala Val  
 420 425 430

Thr Gly Gln Pro Ile Lys Leu Lys Ser His Thr Asp Gly Thr Phe Glu  
 435 440 445

Ile Lys Gly Leu Ala Tyr Ala Val Asp Ala Asn Ala Glu Gly Thr Ala  
 450 455 460

Val Thr Tyr Lys Leu Lys Glu Thr Lys Ala Pro Glu Gly Tyr Val Ile  
 465 470 475 480

Pro Asp Lys Glu Ile Glu Phe Thr Val Ser Gln Thr Ser Tyr Asn Thr  
 485 490 495

Lys Pro Thr Asp Ile Thr Val Asp Ser Ala Asp Ala Thr Pro Asp Thr  
 500 505 510

Ile Lys Asn Asn Lys Arg Pro Ser Ile Pro Asn Thr Gly Gly Ile Gly  
 515 520 525

Thr Ala Ile Phe Val Ala Ile Gly Ala Ala Val Met Ala Phe Ala Val  
 530 535 540

Lys Gly Met Lys Arg Arg Thr Lys Asp Asn  
 545 550

<210> 3

<211> 502

<212> PRT

5 <213> Streptococcus agalactiae serotipo III cepa COH1

<400> 3

Met Lys Lys Lys Met Ile Gln Ser Leu Leu Val Ala Ser Leu Ala Phe  
 1 5 10 15

Gly Met Ala Val Ser Pro Val Thr Pro Ile Ala Phe Ala Ala Glu Thr  
 20 25 30

Gly Thr Ile Thr Val Gln Asp Thr Gln Lys Gly Ala Thr Tyr Lys Ala  
 35 40 45

Tyr Lys Val Phe Asp Ala Glu Ile Asp Asn Ala Asn Val Ser Asp Ser

ES 2 677 358 T3

50						55										60
Asn	Lys	Asp	Gly	Ala	Ser	Tyr	Leu	Ile	Pro	Gln	Gly	Lys	Glu	Ala	Glu	
65					70					75					80	
Tyr	Lys	Ala	Ser	Thr	Asp	Phe	Asn	Ser	Leu	Phe	Thr	Thr	Thr	Thr	Asn	
				85					90					95		
Gly	Gly	Arg	Thr	Tyr	Val	Thr	Lys	Lys	Asp	Thr	Ala	Ser	Ala	Asn	Glu	
			100				105						110			
Ile	Ala	Thr	Trp	Ala	Lys	Ser	Ile	Ser	Ala	Asn	Thr	Thr	Pro	Val	Ser	
		115					120						125			
Thr	Val	Thr	Glu	Ser	Asn	Asn	Asp	Gly	Thr	Glu	Val	Ile	Asn	Val	Ser	
		130				135						140				
Gln	Tyr	Gly	Tyr	Tyr	Tyr	Val	Ser	Ser	Thr	Val	Asn	Asn	Gly	Ala	Val	
145					150					155					160	
Ile	Met	Val	Thr	Ser	Val	Thr	Pro	Asn	Ala	Thr	Ile	His	Glu	Lys	Asn	
				165					170					175		
Thr	Asp	Ala	Thr	Trp	Gly	Asp	Gly	Gly	Gly	Lys	Thr	Val	Asp	Gln	Lys	
			180					185					190			
Thr	Tyr	Ser	Val	Gly	Asp	Thr	Val	Lys	Tyr	Thr	Ile	Thr	Tyr	Lys	Asn	
		195					200						205			
Ala	Val	Asn	Tyr	His	Gly	Thr	Glu	Lys	Val	Tyr	Gln	Tyr	Val	Ile	Lys	
		210				215					220					
Asp	Thr	Met	Pro	Ser	Ala	Ser	Val	Val	Asp	Leu	Asn	Glu	Gly	Ser	Tyr	
225					230					235					240	
Glu	Val	Thr	Ile	Thr	Asp	Gly	Ser	Gly	Asn	Ile	Thr	Thr	Leu	Thr	Gln	
				245					250					255		
Gly	Ser	Glu	Lys	Ala	Thr	Gly	Lys	Tyr	Asn	Leu	Leu	Glu	Glu	Asn	Asn	
			260					265					270			
Asn	Phe	Thr	Ile	Thr	Ile	Pro	Trp	Ala	Ala	Thr	Asn	Thr	Pro	Thr	Gly	
		275					280						285			
Asn	Thr	Gln	Asn	Gly	Ala	Asn	Asp	Asp	Phe	Phe	Tyr	Lys	Gly	Ile	Asn	
		290				295					300					
Thr	Ile	Thr	Val	Thr	Tyr	Thr	Gly	Val	Leu	Lys	Ser	Gly	Ala	Lys	Pro	
305					310					315					320	
Gly	Ser	Ala	Asp	Leu	Pro	Glu	Asn	Thr	Asn	Ile	Ala	Thr	Ile	Asn	Pro	
				325					330					335		
Asn	Thr	Ser	Asn	Asp	Asp	Pro	Gly	Gln	Lys	Val	Thr	Val	Arg	Asp	Gly	
			340					345					350			
Gln	Ile	Thr	Ile	Lys	Lys	Ile	Asp	Gly	Ser	Thr	Lys	Ala	Ser	Leu	Gln	
		355					360					365				
Gly	Ala	Ile	Phe	Val	Leu	Lys	Asn	Ala	Thr	Gly	Gln	Phe	Leu	Asn	Phe	
		370				375					380					
Asn	Asp	Thr	Asn	Asn	Val	Glu	Trp	Gly	Thr	Glu	Ala	Asn	Ala	Thr	Glu	
385					390					395					400	

ES 2 677 358 T3

Tyr Thr Thr Gly Ala Asp Gly Ile Ile Thr Ile Thr Gly Leu Lys Glu  
 405 410 415

Gly Thr Tyr Tyr Leu Val Glu Lys Lys Ala Pro Leu Gly Tyr Asn Leu  
 420 425 430

Leu Asp Asn Ser Gln Lys Val Ile Leu Gly Asp Gly Ala Thr Asp Thr  
 435 440 445

Thr Asn Ser Asp Asn Leu Leu Val Asn Pro Thr Val Glu Asn Asn Lys  
 450 455 460

Gly Thr Glu Leu Pro Ser Thr Gly Gly Ile Gly Thr Thr Ile Phe Tyr  
 465 470 475 480

Ile Ile Gly Ala Ile Leu Val Ile Gly Ala Gly Ile Val Leu Val Ala  
 485 490 495

Arg Arg Arg Leu Arg Ser  
 500

<210> 4  
 <211> 869  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos de GBS67 secuenciada a partir de Streptococcus agalactiae serotipo V cepa 2603 V/R truncada antes de la región transmembrana C-terminal

10 <400> 4  
 Met Arg Lys Tyr Gln Lys Phe Ser Lys Ile Leu Thr Leu Ser Leu Phe  
 1 5 10 15

Cys Leu Ser Gln Ile Pro Leu Asn Thr Asn Val Leu Gly Glu Ser Thr  
 20 25 30

Val Pro Glu Asn Gly Ala Lys Gly Lys Leu Val Val Lys Lys Thr Asp  
 35 40 45

Asp Gln Asn Lys Pro Leu Ser Lys Ala Thr Phe Val Leu Lys Thr Thr  
 50 55 60

Ala His Pro Glu Ser Lys Ile Glu Lys Val Thr Ala Glu Leu Thr Gly  
 65 70 75 80

Glu Ala Thr Phe Asp Asn Leu Ile Pro Gly Asp Tyr Thr Leu Ser Glu  
 85 90 95

Glu Thr Ala Pro Glu Gly Tyr Lys Lys Thr Asn Gln Thr Trp Gln Val  
 100 105 110

Lys Val Glu Ser Asn Gly Lys Thr Thr Ile Gln Asn Ser Gly Asp Lys  
 115 120 125

Asn Ser Thr Ile Gly Gln Asn Gln Glu Glu Leu Asp Lys Gln Tyr Pro  
 130 135 140

Pro Thr Gly Ile Tyr Glu Asp Thr Lys Glu Ser Tyr Lys Leu Glu His  
 145 150 155 160

Val Lys Gly Ser Val Pro Asn Gly Lys Ser Glu Ala Lys Ala Val Asn  
 165 170 175

Pro Tyr Ser Ser Glu Gly Glu His Ile Arg Glu Ile Pro Glu Gly Thr

ES 2 677 358 T3

				180						185					190				
Leu	Ser	Lys	Arg	Ile	Ser	Glu	Val	Gly	Asp	Leu	Ala	His	Asn	Lys	Tyr				
		195						200				205							
Lys	Ile	Glu	Leu	Thr	Val	Ser	Gly	Lys	Thr	Ile	Val	Lys	Pro	Val	Asp				
	210					215					220								
Lys	Gln	Lys	Pro	Leu	Asp	Val	Val	Phe	Val	Leu	Asp	Asn	Ser	Asn	Ser				
225					230					235									240
Met	Asn	Asn	Asp	Gly	Pro	Asn	Phe	Gln	Arg	His	Asn	Lys	Ala	Lys	Lys				
				245					250					255					
Ala	Ala	Glu	Ala	Leu	Gly	Thr	Ala	Val	Lys	Asp	Ile	Leu	Gly	Ala	Asn				
			260					265					270						
Ser	Asp	Asn	Arg	Val	Ala	Leu	Val	Thr	Tyr	Gly	Ser	Asp	Ile	Phe	Asp				
		275						280				285							
Gly	Arg	Ser	Val	Asp	Val	Val	Lys	Gly	Phe	Lys	Glu	Asp	Asp	Lys	Tyr				
	290					295					300								
Tyr	Gly	Leu	Gln	Thr	Lys	Phe	Thr	Ile	Gln	Thr	Glu	Asn	Tyr	Ser	His				
305					310					315					320				
Lys	Gln	Leu	Thr	Asn	Asn	Ala	Glu	Glu	Ile	Ile	Lys	Arg	Ile	Pro	Thr				
				325					330					335					
Glu	Ala	Pro	Lys	Ala	Lys	Trp	Gly	Ser	Thr	Thr	Asn	Gly	Leu	Thr	Pro				
			340					345					350						
Glu	Gln	Gln	Lys	Glu	Tyr	Tyr	Leu	Ser	Lys	Val	Gly	Glu	Thr	Phe	Thr				
		355					360				365								
Met	Lys	Ala	Phe	Met	Glu	Ala	Asp	Asp	Ile	Leu	Ser	Gln	Val	Asn	Arg				
	370					375					380								
Asn	Ser	Gln	Lys	Ile	Ile	Val	His	Val	Thr	Asp	Gly	Val	Pro	Thr	Arg				
385					390					395					400				
Ser	Tyr	Ala	Ile	Asn	Asn	Phe	Lys	Leu	Gly	Ala	Ser	Tyr	Glu	Ser	Gln				
				405					410					415					
Phe	Glu	Gln	Met	Lys	Lys	Asn	Gly	Tyr	Leu	Asn	Lys	Ser	Asn	Phe	Leu				
			420					425					430						
Leu	Thr	Asp	Lys	Pro	Glu	Asp	Ile	Lys	Gly	Asn	Gly	Glu	Ser	Tyr	Phe				
		435					440					445							
Leu	Phe	Pro	Leu	Asp	Ser	Tyr	Gln	Thr	Gln	Ile	Ile	Ser	Gly	Asn	Leu				
	450					455					460								
Gln	Lys	Leu	His	Tyr	Leu	Asp	Leu	Asn	Leu	Asn	Tyr	Pro	Lys	Gly	Thr				
465					470					475					480				
Ile	Tyr	Arg	Asn	Gly	Pro	Val	Lys	Glu	His	Gly	Thr	Pro	Thr	Lys	Leu				
				485					490					495					
Tyr	Ile	Asn	Ser	Leu	Lys	Gln	Lys	Asn	Tyr	Asp	Ile	Phe	Asn	Phe	Gly				
		500						505					510						
Ile	Asp	Ile	Ser	Gly	Phe	Arg	Gln	Val	Tyr	Asn	Glu	Glu	Tyr	Lys	Lys				
		515					520					525							

ES 2 677 358 T3

Asn Gln Asp Gly Thr Phe Gln Lys Leu Lys Glu Glu Ala Phe Lys Leu  
 530 535 540

Ser Asp Gly Glu Ile Thr Glu Leu Met Arg Ser Phe Ser Ser Lys Pro  
 545 550 555 560

Glu Tyr Tyr Thr Pro Ile Val Thr Ser Ala Asp Thr Ser Asn Asn Glu  
 565 570 575

Ile Leu Ser Lys Ile Gln Gln Gln Phe Glu Thr Ile Leu Thr Lys Glu  
 580 585 590

Asn Ser Ile Val Asn Gly Thr Ile Glu Asp Pro Met Gly Asp Lys Ile  
 595 600 605

Asn Leu Gln Leu Gly Asn Gly Gln Thr Leu Gln Pro Ser Asp Tyr Thr  
 610 615 620

Leu Gln Gly Asn Asp Gly Ser Val Met Lys Asp Gly Ile Ala Thr Gly  
 625 630 635 640

Gly Pro Asn Asn Asp Gly Gly Ile Leu Lys Gly Val Lys Leu Glu Tyr  
 645 650 655

Ile Gly Asn Lys Leu Tyr Val Arg Gly Leu Asn Leu Gly Glu Gly Gln  
 660 665 670

Lys Val Thr Leu Thr Tyr Asp Val Lys Leu Asp Asp Ser Phe Ile Ser  
 675 680 685

Asn Lys Phe Tyr Asp Thr Asn Gly Arg Thr Thr Leu Asn Pro Lys Ser  
 690 695 700

Glu Asp Pro Asn Thr Leu Arg Asp Phe Pro Ile Pro Lys Ile Arg Asp  
 705 710 715 720

Val Arg Glu Tyr Pro Thr Ile Thr Ile Lys Asn Glu Lys Lys Leu Gly  
 725 730 735

Glu Ile Glu Phe Ile Lys Val Asp Lys Asp Asn Asn Lys Leu Leu Leu  
 740 745 750

Lys Gly Ala Thr Phe Glu Leu Gln Glu Phe Asn Glu Asp Tyr Lys Leu  
 755 760 765

Tyr Leu Pro Ile Lys Asn Asn Asn Ser Lys Val Val Thr Gly Glu Asn  
 770 775 780

Gly Lys Ile Ser Tyr Lys Asp Leu Lys Asp Gly Lys Tyr Gln Leu Ile  
 785 790 795 800

Glu Ala Val Ser Pro Glu Asp Tyr Gln Lys Ile Thr Asn Lys Pro Ile  
 805 810 815

Leu Thr Phe Glu Val Val Lys Gly Ser Ile Lys Asn Ile Ile Ala Val  
 820 825 830

Asn Lys Gln Ile Ser Glu Tyr His Glu Glu Gly Asp Lys His Leu Ile  
 835 840 845

Thr Asn Thr His Ile Pro Pro Lys Gly Ile Ile Pro Met Thr Gly Gly  
 850 855 860

Lys Gly Ile Leu Ser  
 865

<210> 5

<211> 858

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de GBS67 secuenciada a partir de Streptococcus agalactiae serotipo V cepa 2603 V/R que carece de restos de anclaje a la transmembrana y la pared celular

<400> 5

ES 2 677 358 T3

Met Arg Lys Tyr Gln Lys Phe Ser Lys Ile Leu Thr Leu Ser Leu Phe  
1 5 10 15

Cys Leu Ser Gln Ile Pro Leu Asn Thr Asn Val Leu Gly Glu Ser Thr  
20 25 30

Val Pro Glu Asn Gly Ala Lys Gly Lys Leu Val Val Lys Lys Thr Asp  
35 40 45

Asp Gln Asn Lys Pro Leu Ser Lys Ala Thr Phe Val Leu Lys Thr Thr  
50 55 60

Ala His Pro Glu Ser Lys Ile Glu Lys Val Thr Ala Glu Leu Thr Gly  
65 70 75 80

Glu Ala Thr Phe Asp Asn Leu Ile Pro Gly Asp Tyr Thr Leu Ser Glu  
85 90 95

Glu Thr Ala Pro Glu Gly Tyr Lys Lys Thr Asn Gln Thr Trp Gln Val  
100 105 110

Lys Val Glu Ser Asn Gly Lys Thr Thr Ile Gln Asn Ser Gly Asp Lys  
115 120 125

Asn Ser Thr Ile Gly Gln Asn Gln Glu Glu Leu Asp Lys Gln Tyr Pro  
130 135 140

Pro Thr Gly Ile Tyr Glu Asp Thr Lys Glu Ser Tyr Lys Leu Glu His  
145 150 155 160

Val Lys Gly Ser Val Pro Asn Gly Lys Ser Glu Ala Lys Ala Val Asn  
165 170 175

Pro Tyr Ser Ser Glu Gly Glu His Ile Arg Glu Ile Pro Glu Gly Thr  
180 185 190

Leu Ser Lys Arg Ile Ser Glu Val Gly Asp Leu Ala His Asn Lys Tyr  
195 200 205

Lys Ile Glu Leu Thr Val Ser Gly Lys Thr Ile Val Lys Pro Val Asp  
210 215 220

Lys Gln Lys Pro Leu Asp Val Val Phe Val Leu Asp Asn Ser Asn Ser  
225 230 235 240

Met Asn Asn Asp Gly Pro Asn Phe Gln Arg His Asn Lys Ala Lys Lys  
245 250 255

Ala Ala Glu Ala Leu Gly Thr Ala Val Lys Asp Ile Leu Gly Ala Asn  
260 265 270

Ser Asp Asn Arg Val Ala Leu Val Thr Tyr Gly Ser Asp Ile Phe Asp  
275 280 285

ES 2 677 358 T3

Gly Arg Ser Val Asp Val Val Lys Gly Phe Lys Glu Asp Asp Lys Tyr  
 290 295 300  
 Tyr Gly Leu Gln Thr Lys Phe Thr Ile Gln Thr Glu Asn Tyr Ser His  
 305 310 315 320  
 Lys Gln Leu Thr Asn Asn Ala Glu Glu Ile Ile Lys Arg Ile Pro Thr  
 325 330 335  
 Glu Ala Pro Lys Ala Lys Trp Gly Ser Thr Thr Asn Gly Leu Thr Pro  
 340 345 350  
 Glu Gln Gln Lys Glu Tyr Tyr Leu Ser Lys Val Gly Glu Thr Phe Thr  
 355 360 365  
 Met Lys Ala Phe Met Glu Ala Asp Asp Ile Leu Ser Gln Val Asn Arg  
 370 375 380  
 Asn Ser Gln Lys Ile Ile Val His Val Thr Asp Gly Val Pro Thr Arg  
 385 390 395 400  
 Ser Tyr Ala Ile Asn Asn Phe Lys Leu Gly Ala Ser Tyr Glu Ser Gln  
 405 410 415  
 Phe Glu Gln Met Lys Lys Asn Gly Tyr Leu Asn Lys Ser Asn Phe Leu  
 420 425 430  
 Leu Thr Asp Lys Pro Glu Asp Ile Lys Gly Asn Gly Glu Ser Tyr Phe  
 435 440 445  
 Leu Phe Pro Leu Asp Ser Tyr Gln Thr Gln Ile Ile Ser Gly Asn Leu  
 450 455 460  
 Gln Lys Leu His Tyr Leu Asp Leu Asn Leu Asn Tyr Pro Lys Gly Thr  
 465 470 475 480  
 Ile Tyr Arg Asn Gly Pro Val Lys Glu His Gly Thr Pro Thr Lys Leu  
 485 490 495  
 Tyr Ile Asn Ser Leu Lys Gln Lys Asn Tyr Asp Ile Phe Asn Phe Gly  
 500 505 510  
 Ile Asp Ile Ser Gly Phe Arg Gln Val Tyr Asn Glu Glu Tyr Lys Lys  
 515 520 525  
 Asn Gln Asp Gly Thr Phe Gln Lys Leu Lys Glu Glu Ala Phe Lys Leu  
 530 535 540  
 Ser Asp Gly Glu Ile Thr Glu Leu Met Arg Ser Phe Ser Ser Lys Pro  
 545 550 555 560  
 Glu Tyr Tyr Thr Pro Ile Val Thr Ser Ala Asp Thr Ser Asn Asn Glu  
 565 570 575  
 Ile Leu Ser Lys Ile Gln Gln Gln Phe Glu Thr Ile Leu Thr Lys Glu  
 580 585 590  
 Asn Ser Ile Val Asn Gly Thr Ile Glu Asp Pro Met Gly Asp Lys Ile  
 595 600 605  
 Asn Leu Gln Leu Gly Asn Gly Gln Thr Leu Gln Pro Ser Asp Tyr Thr  
 610 615 620  
 Leu Gln Gly Asn Asp Gly Ser Val Met Lys Asp Gly Ile Ala Thr Gly  
 625 630 635 640

ES 2 677 358 T3

Gly Pro Asn Asn Asp Gly Gly Ile Leu Lys Gly Val Lys Leu Glu Tyr  
 645 650 655

Ile Gly Asn Lys Leu Tyr Val Arg Gly Leu Asn Leu Gly Glu Gly Gln  
 660 665 670

Lys Val Thr Leu Thr Tyr Asp Val Lys Leu Asp Asp Ser Phe Ile Ser  
 675 680 685

Asn Lys Phe Tyr Asp Thr Asn Gly Arg Thr Thr Leu Asn Pro Lys Ser  
 690 695 700

Glu Asp Pro Asn Thr Leu Arg Asp Phe Pro Ile Pro Lys Ile Arg Asp  
 705 710 715 720

Val Arg Glu Tyr Pro Thr Ile Thr Ile Lys Asn Glu Lys Lys Leu Gly  
 725 730 735

Glu Ile Glu Phe Ile Lys Val Asp Lys Asp Asn Asn Lys Leu Leu Leu  
 740 745 750

Lys Gly Ala Thr Phe Glu Leu Gln Glu Phe Asn Glu Asp Tyr Lys Leu  
 755 760 765

Tyr Leu Pro Ile Lys Asn Asn Asn Ser Lys Val Val Thr Gly Glu Asn  
 770 775 780

Gly Lys Ile Ser Tyr Lys Asp Leu Lys Asp Gly Lys Tyr Gln Leu Ile  
 785 790 795 800

Glu Ala Val Ser Pro Glu Asp Tyr Gln Lys Ile Thr Asn Lys Pro Ile  
 805 810 815

Leu Thr Phe Glu Val Val Lys Gly Ser Ile Lys Asn Ile Ile Ala Val  
 820 825 830

Asn Lys Gln Ile Ser Glu Tyr His Glu Glu Gly Asp Lys His Leu Ile  
 835 840 845

Thr Asn Thr His Ile Pro Pro Lys Gly Ile  
 850 855

<210> 6

<211> 517

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de GBS80 secuenciada a partir de Streptococcus agalactiae serotipo V cepa 2603 V/R que carece de la región de la secuencia señal o líder N-terminal

<400> 6

Ala Glu Val Ser Gln Glu Arg Pro Ala Lys Thr Thr Val Asn Ile Tyr  
 1 5 10 15

Lys Leu Gln Ala Asp Ser Tyr Lys Ser Glu Ile Thr Ser Asn Gly Gly  
 20 25 30

Ile Glu Asn Lys Asp Gly Glu Val Ile Ser Asn Tyr Ala Lys Leu Gly  
 35 40 45

Asp Asn Val Lys Gly Leu Gln Gly Val Gln Phe Lys Arg Tyr Lys Val  
 50 55 60

10

ES 2 677 358 T3

Lys Thr Asp Ile Ser Val Asp Glu Leu Lys Lys Leu Thr Thr Val Glu  
65 70 75 80

Ala Ala Asp Ala Lys Val Gly Thr Ile Leu Glu Glu Gly Val Ser Leu  
85 90 95

Pro Gln Lys Thr Asn Ala Gln Gly Leu Val Val Asp Ala Leu Asp Ser  
100 105 110

Lys Ser Asn Val Arg Tyr Leu Tyr Val Glu Asp Leu Lys Asn Ser Pro  
115 120 125

Ser Asn Ile Thr Lys Ala Tyr Ala Val Pro Phe Val Leu Glu Leu Pro  
130 135 140

Val Ala Asn Ser Thr Gly Thr Gly Phe Leu Ser Glu Ile Asn Ile Tyr  
145 150 155 160

Pro Lys Asn Val Val Thr Asp Glu Pro Lys Thr Asp Lys Asp Val Lys  
165 170 175

Lys Leu Gly Gln Asp Asp Ala Gly Tyr Thr Ile Gly Glu Glu Phe Lys  
180 185 190

Trp Phe Leu Lys Ser Thr Ile Pro Ala Asn Leu Gly Asp Tyr Glu Lys  
195 200 205

Phe Glu Ile Thr Asp Lys Phe Ala Asp Gly Leu Thr Tyr Lys Ser Val  
210 215 220

Gly Lys Ile Lys Ile Gly Ser Lys Thr Leu Asn Arg Asp Glu His Tyr  
225 230 235 240

Thr Ile Asp Glu Pro Thr Val Asp Asn Gln Asn Thr Leu Lys Ile Thr  
245 250 255

Phe Lys Pro Glu Lys Phe Lys Glu Ile Ala Glu Leu Leu Lys Gly Met  
260 265 270

Thr Leu Val Lys Asn Gln Asp Ala Leu Asp Lys Ala Thr Ala Asn Thr  
275 280 285

Asp Asp Ala Ala Phe Leu Glu Ile Pro Val Ala Ser Thr Ile Asn Glu  
290 295 300

Lys Ala Val Leu Gly Lys Ala Ile Glu Asn Thr Phe Glu Leu Gln Tyr  
305 310 315 320

Asp His Thr Pro Asp Lys Ala Asp Asn Pro Lys Pro Ser Asn Pro Pro  
325 330 335

Arg Lys Pro Glu Val His Thr Gly Gly Lys Arg Phe Val Lys Lys Asp  
340 345 350

Ser Thr Glu Thr Gln Thr Leu Gly Gly Ala Glu Phe Asp Leu Leu Ala  
355 360 365

Ser Asp Gly Thr Ala Val Lys Trp Thr Asp Ala Leu Ile Lys Ala Asn  
370 375 380

Thr Asn Lys Asn Tyr Ile Ala Gly Glu Ala Val Thr Gly Gln Pro Ile  
385 390 395 400

Lys Leu Lys Ser His Thr Asp Gly Thr Phe Glu Ile Lys Gly Leu Ala

ES 2 677 358 T3

405 410 415  
 Tyr Ala Val Asp Ala Asn Ala Glu Gly Thr Ala Val Thr Tyr Lys Leu  
 420 425 430  
 Lys Glu Thr Lys Ala Pro Glu Gly Tyr Val Ile Pro Asp Lys Glu Ile  
 435 440 445  
 Glu Phe Thr Val Ser Gln Thr Ser Tyr Asn Thr Lys Pro Thr Asp Ile  
 450 455 460  
 Thr Val Asp Ser Ala Asp Ala Thr Pro Asp Thr Ile Lys Asn Asn Lys  
 465 470 475 480  
 Arg Pro Ser Ile Pro Asn Thr Gly Gly Ile Gly Thr Ala Ile Phe Val  
 485 490 495  
 Ala Ile Gly Ala Ala Val Met Ala Phe Ala Val Lys Gly Met Lys Arg  
 500 505 510  
 Arg Thr Lys Asp Asn  
 515

<210> 7

<211> 525

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de GBS80 secuenciada a partir de Streptococcus agalactiae serotipo V cepa 2603 V/R que carece de los aminoácidos de la región transmembrana y secuencia abajo C-terminal

<400> 7

Met Lys Leu Ser Lys Lys Leu Leu Phe Ser Ala Ala Val Leu Thr Met  
 1 5 10 15  
 Val Ala Gly Ser Thr Val Glu Pro Val Ala Gln Phe Ala Thr Gly Met  
 20 25 30  
 Ser Ile Val Arg Ala Ala Glu Val Ser Gln Glu Arg Pro Ala Lys Thr  
 35 40 45  
 Thr Val Asn Ile Tyr Lys Leu Gln Ala Asp Ser Tyr Lys Ser Glu Ile  
 50 55 60  
 Thr Ser Asn Gly Gly Ile Glu Asn Lys Asp Gly Glu Val Ile Ser Asn  
 65 70 75 80  
 Tyr Ala Lys Leu Gly Asp Asn Val Lys Gly Leu Gln Gly Val Gln Phe  
 85 90 95  
 Lys Arg Tyr Lys Val Lys Thr Asp Ile Ser Val Asp Glu Leu Lys Lys  
 100 105 110  
 Leu Thr Thr Val Glu Ala Ala Asp Ala Lys Val Gly Thr Ile Leu Glu  
 115 120 125  
 Glu Gly Val Ser Leu Pro Gln Lys Thr Asn Ala Gln Gly Leu Val Val  
 130 135 140  
 Asp Ala Leu Asp Ser Lys Ser Asn Val Arg Tyr Leu Tyr Val Glu Asp  
 145 150 155 160  
 10 Leu Lys Asn Ser Pro Ser Asn Ile Thr Lys Ala Tyr Ala Val Pro Phe

ES 2 677 358 T3

				165						170					175
Val	Leu	Glu	Leu	Pro	Val	Ala	Asn	Ser	Thr	Gly	Thr	Gly	Phe	Leu	Ser
			180					185					190		
Glu	Ile	Asn	Ile	Tyr	Pro	Lys	Asn	Val	Val	Thr	Asp	Glu	Pro	Lys	Thr
		195					200					205			
Asp	Lys	Asp	Val	Lys	Lys	Leu	Gly	Gln	Asp	Asp	Ala	Gly	Tyr	Thr	Ile
	210					215					220				
Gly	Glu	Glu	Phe	Lys	Trp	Phe	Leu	Lys	Ser	Thr	Ile	Pro	Ala	Asn	Leu
225					230					235					240
Gly	Asp	Tyr	Glu	Lys	Phe	Glu	Ile	Thr	Asp	Lys	Phe	Ala	Asp	Gly	Leu
				245					250					255	
Thr	Tyr	Lys	Ser	Val	Gly	Lys	Ile	Lys	Ile	Gly	Ser	Lys	Thr	Leu	Asn
			260					265						270	
Arg	Asp	Glu	His	Tyr	Thr	Ile	Asp	Glu	Pro	Thr	Val	Asp	Asn	Gln	Asn
		275					280					285			
Thr	Leu	Lys	Ile	Thr	Phe	Lys	Pro	Glu	Lys	Phe	Lys	Glu	Ile	Ala	Glu
	290					295					300				
Leu	Leu	Lys	Gly	Met	Thr	Leu	Val	Lys	Asn	Gln	Asp	Ala	Leu	Asp	Lys
305					310					315					320
Ala	Thr	Ala	Asn	Thr	Asp	Asp	Ala	Ala	Phe	Leu	Glu	Ile	Pro	Val	Ala
				325					330						335
Ser	Thr	Ile	Asn	Glu	Lys	Ala	Val	Leu	Gly	Lys	Ala	Ile	Glu	Asn	Thr
			340					345					350		
Phe	Glu	Leu	Gln	Tyr	Asp	His	Thr	Pro	Asp	Lys	Ala	Asp	Asn	Pro	Lys
		355					360					365			
Pro	Ser	Asn	Pro	Pro	Arg	Lys	Pro	Glu	Val	His	Thr	Gly	Gly	Lys	Arg
		370				375					380				
Phe	Val	Lys	Lys	Asp	Ser	Thr	Glu	Thr	Gln	Thr	Leu	Gly	Gly	Ala	Glu
385					390					395					400
Phe	Asp	Leu	Leu	Ala	Ser	Asp	Gly	Thr	Ala	Val	Lys	Trp	Thr	Asp	Ala
				405					410					415	
Leu	Ile	Lys	Ala	Asn	Thr	Asn	Lys	Asn	Tyr	Ile	Ala	Gly	Glu	Ala	Val
			420					425					430		
Thr	Gly	Gln	Pro	Ile	Lys	Leu	Lys	Ser	His	Thr	Asp	Gly	Thr	Phe	Glu
		435					440					445			
Ile	Lys	Gly	Leu	Ala	Tyr	Ala	Val	Asp	Ala	Asn	Ala	Glu	Gly	Thr	Ala
	450					455					460				
Val	Thr	Tyr	Lys	Leu	Lys	Glu	Thr	Lys	Ala	Pro	Glu	Gly	Tyr	Val	Ile
465					470					475					480
Pro	Asp	Lys	Glu	Ile	Glu	Phe	Thr	Val	Ser	Gln	Thr	Ser	Tyr	Asn	Thr
				485					490					495	
Lys	Pro	Thr	Asp	Ile	Thr	Val	Asp	Ser	Ala	Asp	Ala	Thr	Pro	Asp	Thr
			500					505					510		
Ile	Lys	Asn	Asn	Lys	Arg	Pro	Ser	Ile	Pro	Asn	Thr	Gly			
		515					520					525			

ES 2 677 358 T3

<210> 8  
 <211> 520  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos de GBS80 secuenciada a partir de Streptococcus agalactiae serotipo V cepa 2603 V/R que carece de las regiones transmembrana y citoplásmica y del motivo de anclaje a la pared celular

<400> 8  
 Met Lys Leu Ser Lys Lys Leu Leu Phe Ser Ala Ala Val Leu Thr Met  
 1 5 10 15  
 Val Ala Gly Ser Thr Val Glu Pro Val Ala Gln Phe Ala Thr Gly Met  
 20 25 30  
 Ser Ile Val Arg Ala Ala Glu Val Ser Gln Glu Arg Pro Ala Lys Thr  
 35 40 45  
 Thr Val Asn Ile Tyr Lys Leu Gln Ala Asp Ser Tyr Lys Ser Glu Ile  
 50 55 60  
 Thr Ser Asn Gly Gly Ile Glu Asn Lys Asp Gly Glu Val Ile Ser Asn  
 65 70 75 80  
 Tyr Ala Lys Leu Gly Asp Asn Val Lys Gly Leu Gln Gly Val Gln Phe  
 85 90 95  
 Lys Arg Tyr Lys Val Lys Thr Asp Ile Ser Val Asp Glu Leu Lys Lys  
 100 105 110  
 Leu Thr Thr Val Glu Ala Ala Asp Ala Lys Val Gly Thr Ile Leu Glu  
 115 120 125  
 Glu Gly Val Ser Leu Pro Gln Lys Thr Asn Ala Gln Gly Leu Val Val  
 130 135 140  
 Asp Ala Leu Asp Ser Lys Ser Asn Val Arg Tyr Leu Tyr Val Glu Asp  
 145 150 155 160  
 Leu Lys Asn Ser Pro Ser Asn Ile Thr Lys Ala Tyr Ala Val Pro Phe  
 165 170 175  
 Val Leu Glu Leu Pro Val Ala Asn Ser Thr Gly Thr Gly Phe Leu Ser  
 180 185 190  
 Glu Ile Asn Ile Tyr Pro Lys Asn Val Val Thr Asp Glu Pro Lys Thr  
 195 200 205  
 Asp Lys Asp Val Lys Lys Leu Gly Gln Asp Asp Ala Gly Tyr Thr Ile  
 210 215 220  
 Gly Glu Glu Phe Lys Trp Phe Leu Lys Ser Thr Ile Pro Ala Asn Leu  
 225 230 235 240  
 Gly Asp Tyr Glu Lys Phe Glu Ile Thr Asp Lys Phe Ala Asp Gly Leu  
 245 250 255  
 Thr Tyr Lys Ser Val Gly Lys Ile Lys Ile Gly Ser Lys Thr Leu Asn  
 260 265 270

10

ES 2 677 358 T3

Arg Asp Glu His Tyr Thr Ile Asp Glu Pro Thr Val Asp Asn Gln Asn  
 275 280 285

Thr Leu Lys Ile Thr Phe Lys Pro Glu Lys Phe Lys Glu Ile Ala Glu  
 290 295 300

Leu Leu Lys Gly Met Thr Leu Val Lys Asn Gln Asp Ala Leu Asp Lys  
 305 310 315 320

Ala Thr Ala Asn Thr Asp Asp Ala Ala Phe Leu Glu Ile Pro Val Ala  
 325 330 335

Ser Thr Ile Asn Glu Lys Ala Val Leu Gly Lys Ala Ile Glu Asn Thr  
 340 345 350

Phe Glu Leu Gln Tyr Asp His Thr Pro Asp Lys Ala Asp Asn Pro Lys  
 355 360 365

Pro Ser Asn Pro Pro Arg Lys Pro Glu Val His Thr Gly Gly Lys Arg  
 370 375 380

Phe Val Lys Lys Asp Ser Thr Glu Thr Gln Thr Leu Gly Gly Ala Glu  
 385 390 395 400

Phe Asp Leu Leu Ala Ser Asp Gly Thr Ala Val Lys Trp Thr Asp Ala  
 405 410 415

Leu Ile Lys Ala Asn Thr Asn Lys Asn Tyr Ile Ala Gly Glu Ala Val  
 420 425 430

Thr Gly Gln Pro Ile Lys Leu Lys Ser His Thr Asp Gly Thr Phe Glu  
 435 440 445

Ile Lys Gly Leu Ala Tyr Ala Val Asp Ala Asn Ala Glu Gly Thr Ala  
 450 455 460

Val Thr Tyr Lys Leu Lys Glu Thr Lys Ala Pro Glu Gly Tyr Val Ile  
 465 470 475 480

Pro Asp Lys Glu Ile Glu Phe Thr Val Ser Gln Thr Ser Tyr Asn Thr  
 485 490 495

Lys Pro Thr Asp Ile Thr Val Asp Ser Ala Asp Ala Thr Pro Asp Thr  
 500 505 510

Ile Lys Asn Asn Lys Arg Pro Ser  
 515 520

<210> 9

<211> 483

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de GBS80 secuenciada a partir de Streptococcus agalactiae serotipo V cepa 2603 V/R que carece de la región de la secuencia señal o líder, las regiones transmembrana y citoplásmica y el motivo de anclaje a la pared celular

10 <400> 9

Ala Glu Val Ser Gln Glu Arg Pro Ala Lys Thr Thr Val Asn Ile Tyr  
 1 5 10 15

Lys Leu Gln Ala Asp Ser Tyr Lys Ser Glu Ile Thr Ser Asn Gly Gly  
 20 25 30

ES 2 677 358 T3

Ile Glu Asn Lys Asp Gly Glu Val Ile Ser Asn Tyr Ala Lys Leu Gly  
35 40 45

Asp Asn Val Lys Gly Leu Gln Gly Val Gln Phe Lys Arg Tyr Lys Val  
50 55 60

Lys Thr Asp Ile Ser Val Asp Glu Leu Lys Lys Leu Thr Thr Val Glu  
65 70 75 80

Ala Ala Asp Ala Lys Val Gly Thr Ile Leu Glu Glu Gly Val Ser Leu  
85 90 95

Pro Gln Lys Thr Asn Ala Gln Gly Leu Val Val Asp Ala Leu Asp Ser  
100 105 110

Lys Ser Asn Val Arg Tyr Leu Tyr Val Glu Asp Leu Lys Asn Ser Pro  
115 120 125

Ser Asn Ile Thr Lys Ala Tyr Ala Val Pro Phe Val Leu Glu Leu Pro  
130 135 140

Val Ala Asn Ser Thr Gly Thr Gly Phe Leu Ser Glu Ile Asn Ile Tyr  
145 150 155 160

Pro Lys Asn Val Val Thr Asp Glu Pro Lys Thr Asp Lys Asp Val Lys  
165 170 175

Lys Leu Gly Gln Asp Asp Ala Gly Tyr Thr Ile Gly Glu Glu Phe Lys  
180 185 190

Trp Phe Leu Lys Ser Thr Ile Pro Ala Asn Leu Gly Asp Tyr Glu Lys  
195 200 205

Phe Glu Ile Thr Asp Lys Phe Ala Asp Gly Leu Thr Tyr Lys Ser Val  
210 215 220

Gly Lys Ile Lys Ile Gly Ser Lys Thr Leu Asn Arg Asp Glu His Tyr  
225 230 235 240

Thr Ile Asp Glu Pro Thr Val Asp Asn Gln Asn Thr Leu Lys Ile Thr  
245 250 255

Phe Lys Pro Glu Lys Phe Lys Glu Ile Ala Glu Leu Leu Lys Gly Met  
260 265 270

Thr Leu Val Lys Asn Gln Asp Ala Leu Asp Lys Ala Thr Ala Asn Thr  
275 280 285

Asp Asp Ala Ala Phe Leu Glu Ile Pro Val Ala Ser Thr Ile Asn Glu  
290 295 300

Lys Ala Val Leu Gly Lys Ala Ile Glu Asn Thr Phe Glu Leu Gln Tyr  
305 310 315 320

Asp His Thr Pro Asp Lys Ala Asp Asn Pro Lys Pro Ser Asn Pro Pro  
325 330 335

Arg Lys Pro Glu Val His Thr Gly Gly Lys Arg Phe Val Lys Lys Asp  
340 345 350

Ser Thr Glu Thr Gln Thr Leu Gly Gly Ala Glu Phe Asp Leu Leu Ala  
355 360 365

Ser Asp Gly Thr Ala Val Lys Trp Thr Asp Ala Leu Ile Lys Ala Asn  
370 375 380

ES 2 677 358 T3

Thr Asn Lys Asn Tyr Ile Ala Gly Glu Ala Val Thr Gly Gln Pro Ile  
 385 390 395 400  
 Lys Leu Lys Ser His Thr Asp Gly Thr Phe Glu Ile Lys Gly Leu Ala  
 405 410 415  
 Tyr Ala Val Asp Ala Asn Ala Glu Gly Thr Ala Val Thr Tyr Lys Leu  
 420 425 430  
 Lys Glu Thr Lys Ala Pro Glu Gly Tyr Val Ile Pro Asp Lys Glu Ile  
 435 440 445  
 Glu Phe Thr Val Ser Gln Thr Ser Tyr Asn Thr Lys Pro Thr Asp Ile  
 450 455 460  
 Thr Val Asp Ser Ala Asp Ala Thr Pro Asp Thr Ile Lys Asn Asn Lys  
 465 470 475 480

Arg Pro Ser

<210> 10

<211> 271

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Un fragmento particularmente inmunogénico de GBS80 ubicado hacia el extremo N de la proteína

<400> 10

Ala Glu Val Ser Gln Glu Arg Pro Ala Lys Thr Thr Val Asn Ile Tyr  
 1 5 10 15  
 Lys Leu Gln Ala Asp Ser Tyr Lys Ser Glu Ile Thr Ser Asn Gly Gly  
 20 25 30  
 Ile Glu Asn Lys Asp Gly Glu Val Ile Ser Asn Tyr Ala Lys Leu Gly  
 35 40 45  
 Asp Asn Val Lys Gly Leu Gln Gly Val Gln Phe Lys Arg Tyr Lys Val  
 50 55 60  
 Lys Thr Asp Ile Ser Val Asp Glu Leu Lys Lys Leu Thr Thr Val Glu  
 65 70 75 80  
 Ala Ala Asp Ala Lys Val Gly Thr Ile Leu Glu Glu Gly Val Ser Leu  
 85 90 95  
 Pro Gln Lys Thr Asn Ala Gln Gly Leu Val Val Asp Ala Leu Asp Ser  
 100 105 110  
 Lys Ser Asn Val Arg Tyr Leu Tyr Val Glu Asp Leu Lys Asn Ser Pro  
 115 120 125  
 Ser Asn Ile Thr Lys Ala Tyr Ala Val Pro Phe Val Leu Glu Leu Pro  
 130 135 140  
 Val Ala Asn Ser Thr Gly Thr Gly Phe Leu Ser Glu Ile Asn Ile Tyr  
 145 150 155 160  
 Pro Lys Asn Val Val Thr Asp Glu Pro Lys Thr Asp Lys Asp Val Lys  
 165 170 175

10

ES 2 677 358 T3

Lys Leu Gly Gln Asp Asp Ala Gly Tyr Thr Ile Gly Glu Glu Phe Lys  
 180 185 190

Trp Phe Leu Lys Ser Thr Ile Pro Ala Asn Leu Gly Asp Tyr Glu Lys  
 195 200 205

Phe Glu Ile Thr Asp Lys Phe Ala Asp Gly Leu Thr Tyr Lys Ser Val  
 210 215 220

Gly Lys Ile Lys Ile Gly Ser Lys Thr Leu Asn Arg Asp Glu His Tyr  
 225 230 235 240

Thr Ile Asp Glu Pro Thr Val Asp Asn Gln Asn Thr Leu Lys Ile Thr  
 245 250 255

Phe Lys Pro Glu Lys Phe Lys Glu Ile Ala Glu Leu Leu Lys Gly  
 260 265 270

<210> 11

<211> 473

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de Spbl a partir de Streptococcus agalactiae serotipo III cepa COH1 que carece de la región de la secuencia señal o líder N-terminal

<400> 11

Ala Glu Thr Gly Thr Ile Thr Val Gln Asp Thr Gln Lys Gly Ala Thr  
 1 5 10 15

Tyr Lys Ala Tyr Lys Val Phe Asp Ala Glu Ile Asp Asn Ala Asn Val  
 20 25 30

Ser Asp Ser Asn Lys Asp Gly Ala Ser Tyr Leu Ile Pro Gln Gly Lys  
 35 40 45

Glu Ala Glu Tyr Lys Ala Ser Thr Asp Phe Asn Ser Leu Phe Thr Thr  
 50 55 60

Thr Thr Asn Gly Gly Arg Thr Tyr Val Thr Lys Lys Asp Thr Ala Ser  
 65 70 75 80

Ala Asn Glu Ile Ala Thr Trp Ala Lys Ser Ile Ser Ala Asn Thr Thr  
 85 90 95

Pro Val Ser Thr Val Thr Glu Ser Asn Asn Asp Gly Thr Glu Val Ile  
 100 105 110

Asn Val Ser Gln Tyr Gly Tyr Tyr Tyr Val Ser Ser Thr Val Asn Asn  
 115 120 125

Gly Ala Val Ile Met Val Thr Ser Val Thr Pro Asn Ala Thr Ile His  
 130 135 140

Glu Lys Asn Thr Asp Ala Thr Trp Gly Asp Gly Gly Gly Lys Thr Val  
 145 150 155 160

Asp Gln Lys Thr Tyr Ser Val Gly Asp Thr Val Lys Tyr Thr Ile Thr  
 165 170 175

Tyr Lys Asn Ala Val Asn Tyr His Gly Thr Glu Lys Val Tyr Gln Tyr  
 180 185 190

10 Val Ile Lys Asp Thr Met Pro Ser Ala Ser Val Val Asp Leu Asn Glu



ES 2 677 358 T3

1		5		10		15													
Gly	Met	Ala	Val	Ser	Pro	Val	Thr	Pro	Ile	Ala	Phe	Ala	Ala	Glu	Thr				
		20						25					30						
Gly	Thr	Ile	Thr	Val	Gln	Asp	Thr	Gln	Lys	Gly	Ala	Thr	Tyr	Lys	Ala				
		35					40					45							
Tyr	Lys	Val	Phe	Asp	Ala	Glu	Ile	Asp	Asn	Ala	Asn	Val	Ser	Asp	Ser				
	50					55					60								
Asn	Lys	Asp	Gly	Ala	Ser	Tyr	Leu	Ile	Pro	Gln	Gly	Lys	Glu	Ala	Glu				
	65				70					75					80				
Tyr	Lys	Ala	Ser	Thr	Asp	Phe	Asn	Ser	Leu	Phe	Thr	Thr	Thr	Thr	Asn				
				85					90						95				
Gly	Gly	Arg	Thr	Tyr	Val	Thr	Lys	Lys	Asp	Thr	Ala	Ser	Ala	Asn	Glu				
			100					105						110					
Ile	Ala	Thr	Trp	Ala	Lys	Ser	Ile	Ser	Ala	Asn	Thr	Thr	Pro	Val	Ser				
		115					120						125						
Thr	Val	Thr	Glu	Ser	Asn	Asn	Asp	Gly	Thr	Glu	Val	Ile	Asn	Val	Ser				
	130					135					140								
Gln	Tyr	Gly	Tyr	Tyr	Tyr	Val	Ser	Ser	Thr	Val	Asn	Asn	Gly	Ala	Val				
	145				150					155					160				
Ile	Met	Val	Thr	Ser	Val	Thr	Pro	Asn	Ala	Thr	Ile	His	Glu	Lys	Asn				
				165					170					175					
Thr	Asp	Ala	Thr	Trp	Gly	Asp	Gly	Gly	Gly	Lys	Thr	Val	Asp	Gln	Lys				
			180					185					190						
Thr	Tyr	Ser	Val	Gly	Asp	Thr	Val	Lys	Tyr	Thr	Ile	Thr	Tyr	Lys	Asn				
		195					200						205						
Ala	Val	Asn	Tyr	His	Gly	Thr	Glu	Lys	Val	Tyr	Gln	Tyr	Val	Ile	Lys				
	210					215					220								
Asp	Thr	Met	Pro	Ser	Ala	Ser	Val	Val	Asp	Leu	Asn	Glu	Gly	Ser	Tyr				
	225				230					235					240				
Glu	Val	Thr	Ile	Thr	Asp	Gly	Ser	Gly	Asn	Ile	Thr	Thr	Leu	Thr	Gln				
				245					250					255					
Gly	Ser	Glu	Lys	Ala	Thr	Gly	Lys	Tyr	Asn	Leu	Leu	Glu	Glu	Asn	Asn				
			260					265					270						
Asn	Phe	Thr	Ile	Thr	Ile	Pro	Trp	Ala	Ala	Thr	Asn	Thr	Pro	Thr	Gly				
		275					280					285							
Asn	Thr	Gln	Asn	Gly	Ala	Asn	Asp	Asp	Phe	Phe	Tyr	Lys	Gly	Ile	Asn				
	290					295					300								
Thr	Ile	Thr	Val	Thr	Tyr	Thr	Gly	Val	Leu	Lys	Ser	Gly	Ala	Lys	Pro				
	305				310					315					320				
Gly	Ser	Ala	Asp	Leu	Pro	Glu	Asn	Thr	Asn	Ile	Ala	Thr	Ile	Asn	Pro				
				325					330					335					
Asn	Thr	Ser	Asn	Asp	Asp	Pro	Gly	Gln	Lys	Val	Thr	Val	Arg	Asp	Gly				
			340					345					350						

ES 2 677 358 T3

Gln Ile Thr Ile Lys Lys Ile Asp Gly Ser Thr Lys Ala Ser Leu Gln  
355 360 365

Gly Ala Ile Phe Val Leu Lys Asn Ala Thr Gly Gln Phe Leu Asn Phe  
370 375 380

Asn Asp Thr Asn Asn Val Glu Trp Gly Thr Glu Ala Asn Ala Thr Glu  
385 390 395 400

Tyr Thr Thr Gly Ala Asp Gly Ile Ile Thr Ile Thr Gly Leu Lys Glu  
405 410 415

Gly Thr Tyr Tyr Leu Val Glu Lys Lys Ala Pro Leu Gly Tyr Asn Leu  
420 425 430

Leu Asp Asn Ser Gln Lys Val Ile Leu Gly Asp Gly Ala Thr Asp Thr  
435 440 445

Thr Asn Ser Asp Asn Leu Leu Val Asn Pro Thr Val Glu Asn Asn Lys  
450 455 460

Gly Thr Glu  
465

<210> 13

<211> 438

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de Spbl from Streptococcus agalactiae serotipo

III cepa COH1 que carece de la región de la secuencia señal o líder, el resto de anclaje a la pared celular y la secuencia C terminal a este motivo

10 <400> 13

Ala Glu Thr Gly Thr Ile Thr Val Gln Asp Thr Gln Lys Gly Ala Thr  
1 5 10 15

Tyr Lys Ala Tyr Lys Val Phe Asp Ala Glu Ile Asp Asn Ala Asn Val  
20 25 30

Ser Asp Ser Asn Lys Asp Gly Ala Ser Tyr Leu Ile Pro Gln Gly Lys  
35 40 45

Glu Ala Glu Tyr Lys Ala Ser Thr Asp Phe Asn Ser Leu Phe Thr Thr  
50 55 60

Thr Thr Asn Gly Gly Arg Thr Tyr Val Thr Lys Lys Asp Thr Ala Ser  
65 70 75 80

Ala Asn Glu Ile Ala Thr Trp Ala Lys Ser Ile Ser Ala Asn Thr Thr  
85 90 95

Pro Val Ser Thr Val Thr Glu Ser Asn Asn Asp Gly Thr Glu Val Ile  
100 105 110

Asn Val Ser Gln Tyr Gly Tyr Tyr Tyr Val Ser Ser Thr Val Asn Asn  
115 120 125

Gly Ala Val Ile Met Val Thr Ser Val Thr Pro Asn Ala Thr Ile His  
130 135 140

Glu Lys Asn Thr Asp Ala Thr Trp Gly Asp Gly Gly Gly Lys Thr Val  
145 150 155 160

ES 2 677 358 T3

Asp Gln Lys Thr Tyr Ser Val Gly Asp Thr Val Lys Tyr Thr Ile Thr  
 165 170 175

Tyr Lys Asn Ala Val Asn Tyr His Gly Thr Glu Lys Val Tyr Gln Tyr  
 180 185 190

Val Ile Lys Asp Thr Met Pro Ser Ala Ser Val Val Asp Leu Asn Glu  
 195 200 205

Gly Ser Tyr Glu Val Thr Ile Thr Asp Gly Ser Gly Asn Ile Thr Thr  
 210 215 220

Leu Thr Gln Gly Ser Glu Lys Ala Thr Gly Lys Tyr Asn Leu Leu Glu  
 225 230 235 240

Glu Asn Asn Asn Phe Thr Ile Thr Ile Pro Trp Ala Ala Thr Asn Thr  
 245 250 255

Pro Thr Gly Asn Thr Gln Asn Gly Ala Asn Asp Asp Phe Phe Tyr Lys  
 260 265 270

Gly Ile Asn Thr Ile Thr Val Thr Tyr Thr Gly Val Leu Lys Ser Gly  
 275 280 285

Ala Lys Pro Gly Ser Ala Asp Leu Pro Glu Asn Thr Asn Ile Ala Thr  
 290 295 300

Ile Asn Pro Asn Thr Ser Asn Asp Asp Pro Gly Gln Lys Val Thr Val  
 305 310 315 320

Arg Asp Gly Gln Ile Thr Ile Lys Lys Ile Asp Gly Ser Thr Lys Ala  
 325 330 335

Ser Leu Gln Gly Ala Ile Phe Val Leu Lys Asn Ala Thr Gly Gln Phe  
 340 345 350

Leu Asn Phe Asn Asp Thr Asn Asn Val Glu Trp Gly Thr Glu Ala Asn  
 355 360 365

Ala Thr Glu Tyr Thr Thr Gly Ala Asp Gly Ile Ile Thr Ile Thr Gly  
 370 375 380

Leu Lys Glu Gly Thr Tyr Tyr Leu Val Glu Lys Lys Ala Pro Leu Gly  
 385 390 395 400

Tyr Asn Leu Leu Asp Asn Ser Gln Lys Val Ile Leu Gly Asp Gly Ala  
 405 410 415

Thr Asp Thr Thr Asn Ser Asp Asn Leu Leu Val Asn Pro Thr Val Glu  
 420 425 430

Asn Asn Lys Gly Thr Glu  
 435

<210> 14  
 <211> 12  
 <212> DNA  
 5 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia de nucleótidos secuencia arriba del codón de metionina interno de Spbl de tipo salvaje, que contiene la secuencia de Shine-Dalgarno en el núcleo

<400> 14

taatggagct gt 12  
 <210> 15  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Conector  
 <400> 15  
 Gly Gly Gly Gly  
 1  
 10 <210> 16  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 15 <223> Conector  
 <400> 16  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 1 5 10  
 <210> 17  
 <211> 17  
 20 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Conector  
 <400> 17  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu  
 1 5 10 15  
 25 **Leu**  
 <210> 18  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 30 <220>  
 <223> Conector  
 <400> 18  
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 1 5  
 35 <210> 19  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> resto W  
 40 <400> 19  
**Met Ala Ser**  
 1  
 <210> 20  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 45 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> resto Z

<400> 20  
His His His His His His  
1 5

5 <210> 21  
<211> 941  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Combinación de restos W, X, L e Y

<400> 21  
Met Ala Ser Ala Glu Thr Gly Thr Ile Thr Val Gln Asp Thr Gln Lys  
1 5 10 15  
Gly Ala Thr Tyr Lys Ala Tyr Lys Val Phe Asp Ala Glu Ile Asp Asn  
20 25 30  
Ala Asn Val Ser Asp Ser Asn Lys Asp Gly Ala Ser Tyr Leu Ile Pro  
35 40 45  
Gln Gly Lys Glu Ala Glu Tyr Lys Ala Ser Thr Asp Phe Asn Ser Leu  
50 55 60  
Phe Thr Thr Thr Thr Asn Gly Gly Arg Thr Tyr Val Thr Lys Lys Asp  
65 70 75 80  
Thr Ala Ser Ala Asn Glu Ile Ala Thr Trp Ala Lys Ser Ile Ser Ala  
85 90 95  
Asn Thr Thr Pro Val Ser Thr Val Thr Glu Ser Asn Asn Asp Gly Thr  
100 105 110  
Glu Val Ile Asn Val Ser Gln Tyr Gly Tyr Tyr Tyr Val Ser Ser Thr  
115 120 125  
Val Asn Asn Gly Ala Val Ile Met Val Thr Ser Val Thr Pro Asn Ala  
130 135 140  
Thr Ile His Glu Lys Asn Thr Asp Ala Thr Trp Gly Asp Gly Gly Gly  
145 150 155 160  
Lys Thr Val Asp Gln Lys Thr Tyr Ser Val Gly Asp Thr Val Lys Tyr  
165 170 175  
Thr Ile Thr Tyr Lys Asn Ala Val Asn Tyr His Gly Thr Glu Lys Val  
180 185 190  
Tyr Gln Tyr Val Ile Lys Asp Thr Met Pro Ser Ala Ser Val Val Asp  
195 200 205  
Leu Asn Glu Gly Ser Tyr Glu Val Thr Ile Thr Asp Gly Ser Gly Asn  
210 215 220  
Ile Thr Thr Leu Thr Gln Gly Ser Glu Lys Ala Thr Gly Lys Tyr Asn  
225 230 235 240

ES 2 677 358 T3

Leu Leu Glu Glu Asn Asn Asn Phe Thr Ile Thr Ile Pro Trp Ala Ala  
 245 250 255  
 Thr Asn Thr Pro Thr Gly Asn Thr Gln Asn Gly Ala Asn Asp Asp Phe  
 260 265 270  
 Phe Tyr Lys Gly Ile Asn Thr Ile Thr Val Thr Tyr Thr Gly Val Leu  
 275 280 285  
 Lys Ser Gly Ala Lys Pro Gly Ser Ala Asp Leu Pro Glu Asn Thr Asn  
 290 295 300  
 Ile Ala Thr Ile Asn Pro Asn Thr Ser Asn Asp Asp Pro Gly Gln Lys  
 305 310 315 320  
 Val Thr Val Arg Asp Gly Gln Ile Thr Ile Lys Lys Ile Asp Gly Ser  
 325 330 335  
 Thr Lys Ala Ser Leu Gln Gly Ala Ile Phe Val Leu Lys Asn Ala Thr  
 340 345 350  
 Gly Gln Phe Leu Asn Phe Asn Asp Thr Asn Asn Val Glu Trp Gly Thr  
 355 360 365  
 Glu Ala Asn Ala Thr Glu Tyr Thr Thr Gly Ala Asp Gly Ile Ile Thr  
 370 375 380  
 Ile Thr Gly Leu Lys Glu Gly Thr Tyr Tyr Leu Val Glu Lys Lys Ala  
 385 390 395 400  
 Pro Leu Gly Tyr Asn Leu Leu Asp Asn Ser Gln Lys Val Ile Leu Gly  
 405 410 415  
 Asp Gly Ala Thr Asp Thr Thr Asn Ser Asp Asn Leu Leu Val Asn Pro  
 420 425 430  
 Thr Val Glu Asn Asn Lys Gly Thr Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 435 440 445  
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Leu Ala Glu Val Ser Gln Glu  
 450 455 460  
 Arg Pro Ala Lys Thr Thr Val Asn Ile Tyr Lys Leu Gln Ala Asp Ser  
 465 470 475 480  
 Tyr Lys Ser Glu Ile Thr Ser Asn Gly Gly Ile Glu Asn Lys Asp Gly  
 485 490 495  
 Glu Val Ile Ser Asn Tyr Ala Lys Leu Gly Asp Asn Val Lys Gly Leu  
 500 505 510  
 Gln Gly Val Gln Phe Lys Arg Tyr Lys Val Lys Thr Asp Ile Ser Val  
 515 520 525  
 Asp Glu Leu Lys Lys Leu Thr Thr Val Glu Ala Ala Asp Ala Lys Val  
 530 535 540  
 Gly Thr Ile Leu Glu Glu Gly Val Ser Leu Pro Gln Lys Thr Asn Ala  
 545 550 555 560  
 Gln Gly Leu Val Val Asp Ala Leu Asp Ser Lys Ser Asn Val Arg Tyr  
 565 570 575  
 Leu Tyr Val Glu Asp Leu Lys Asn Ser Pro Ser Asn Ile Thr Lys Ala  
 580 585 590

ES 2 677 358 T3

Tyr Ala Val Pro Phe Val Leu Glu Leu Pro Val Ala Asn Ser Thr Gly  
 595 600 605  
 Thr Gly Phe Leu Ser Glu Ile Asn Ile Tyr Pro Lys Asn Val Val Thr  
 610 615 620  
 Asp Glu Pro Lys Thr Asp Lys Asp Val Lys Lys Leu Gly Gln Asp Asp  
 625 630 635 640  
 Ala Gly Tyr Thr Ile Gly Glu Glu Phe Lys Trp Phe Leu Lys Ser Thr  
 645 650 655  
 Ile Pro Ala Asn Leu Gly Asp Tyr Glu Lys Phe Glu Ile Thr Asp Lys  
 660 665 670  
 Phe Ala Asp Gly Leu Thr Tyr Lys Ser Val Gly Lys Ile Lys Ile Gly  
 675 680 685  
 Ser Lys Thr Leu Asn Arg Asp Glu His Tyr Thr Ile Asp Glu Pro Thr  
 690 695 700  
 Val Asp Asn Gln Asn Thr Leu Lys Ile Thr Phe Lys Pro Glu Lys Phe  
 705 710 715 720  
 Lys Glu Ile Ala Glu Leu Leu Lys Gly Met Thr Leu Val Lys Asn Gln  
 725 730 735  
 Asp Ala Leu Asp Lys Ala Thr Ala Asn Thr Asp Asp Ala Ala Phe Leu  
 740 745 750  
 Glu Ile Pro Val Ala Ser Thr Ile Asn Glu Lys Ala Val Leu Gly Lys  
 755 760 765  
 Ala Ile Glu Asn Thr Phe Glu Leu Gln Tyr Asp His Thr Pro Asp Lys  
 770 775 780  
 Ala Asp Asn Pro Lys Pro Ser Asn Pro Pro Arg Lys Pro Glu Val His  
 785 790 795 800  
 Thr Gly Gly Lys Arg Phe Val Lys Lys Asp Ser Thr Glu Thr Gln Thr  
 805 810 815  
 Leu Gly Gly Ala Glu Phe Asp Leu Leu Ala Ser Asp Gly Thr Ala Val  
 820 825 830  
 Lys Trp Thr Asp Ala Leu Ile Lys Ala Asn Thr Asn Lys Asn Tyr Ile  
 835 840 845  
 Ala Gly Glu Ala Val Thr Gly Gln Pro Ile Lys Leu Lys Ser His Thr  
 850 855 860  
 Asp Gly Thr Phe Glu Ile Lys Gly Leu Ala Tyr Ala Val Asp Ala Asn  
 865 870 875 880  
 Ala Glu Gly Thr Ala Val Thr Tyr Lys Leu Lys Glu Thr Lys Ala Pro  
 885 890 895  
 Glu Gly Tyr Val Ile Pro Asp Lys Glu Ile Glu Phe Thr Val Ser Gln  
 900 905 910  
 Thr Ser Tyr Asn Thr Lys Pro Thr Asp Ile Thr Val Asp Ser Ala Asp  
 915 920 925  
 Ala Thr Pro Asp Thr Ile Lys Asn Asn Lys Arg Pro Ser

930

935

940

<210> 22  
 <211> 947  
 <212> PRT

5

ES 2 677 358 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Combinación de restos W, X, L, Y y Z

<400> 22

Met	Ala	Ser	Ala	Glu	Thr	Gly	Thr	Ile	Thr	Val	Gln	Asp	Thr	Gln	Lys
1				5					10					15	
Gly	Ala	Thr	Tyr	Lys	Ala	Tyr	Lys	Val	Phe	Asp	Ala	Glu	Ile	Asp	Asn
			20					25					30		
Ala	Asn	Val	Ser	Asp	Ser	Asn	Lys	Asp	Gly	Ala	Ser	Tyr	Leu	Ile	Pro
		35					40					45			
Gln	Gly	Lys	Glu	Ala	Glu	Tyr	Lys	Ala	Ser	Thr	Asp	Phe	Asn	Ser	Leu
	50					55					60				
Phe	Thr	Thr	Thr	Thr	Asn	Gly	Gly	Arg	Thr	Tyr	Val	Thr	Lys	Lys	Asp
65					70					75					80
Thr	Ala	Ser	Ala	Asn	Glu	Ile	Ala	Thr	Trp	Ala	Lys	Ser	Ile	Ser	Ala
				85					90					95	
Asn	Thr	Thr	Pro	Val	Ser	Thr	Val	Thr	Glu	Ser	Asn	Asn	Asp	Gly	Thr
			100					105					110		
Glu	Val	Ile	Asn	Val	Ser	Gln	Tyr	Gly	Tyr	Tyr	Tyr	Val	Ser	Ser	Thr
		115					120					125			
Val	Asn	Asn	Gly	Ala	Val	Ile	Met	Val	Thr	Ser	Val	Thr	Pro	Asn	Ala
	130					135					140				
Thr	Ile	His	Glu	Lys	Asn	Thr	Asp	Ala	Thr	Trp	Gly	Asp	Gly	Gly	Gly
145					150					155					160
Lys	Thr	Val	Asp	Gln	Lys	Thr	Tyr	Ser	Val	Gly	Asp	Thr	Val	Lys	Tyr
				165					170					175	
Thr	Ile	Thr	Tyr	Lys	Asn	Ala	Val	Asn	Tyr	His	Gly	Thr	Glu	Lys	Val
			180					185					190		
Tyr	Gln	Tyr	Val	Ile	Lys	Asp	Thr	Met	Pro	Ser	Ala	Ser	Val	Val	Asp
		195					200					205			
Leu	Asn	Glu	Gly	Ser	Tyr	Glu	Val	Thr	Ile	Thr	Asp	Gly	Ser	Gly	Asn
	210					215					220				
Ile	Thr	Thr	Leu	Thr	Gln	Gly	Ser	Glu	Lys	Ala	Thr	Gly	Lys	Tyr	Asn
225					230					235					240
Leu	Leu	Glu	Glu	Asn	Asn	Asn	Phe	Thr	Ile	Thr	Ile	Pro	Trp	Ala	Ala
				245					250					255	
Thr	Asn	Thr	Pro	Thr	Gly	Asn	Thr	Gln	Asn	Gly	Ala	Asn	Asp	Asp	Phe
			260					265					270		
Phe	Tyr	Lys	Gly	Ile	Asn	Thr	Ile	Thr	Val	Thr	Tyr	Thr	Gly	Val	Leu
		275					280					285			

ES 2 677 358 T3

Lys Ser Gly Ala Lys Pro Gly Ser Ala Asp Leu Pro Glu Asn Thr Asn  
 290 295 300  
 Ile Ala Thr Ile Asn Pro Asn Thr Ser Asn Asp Asp Pro Gly Gln Lys  
 305 310 315 320  
 Val Thr Val Arg Asp Gly Gln Ile Thr Ile Lys Lys Ile Asp Gly Ser  
 325 330 335  
 Thr Lys Ala Ser Leu Gln Gly Ala Ile Phe Val Leu Lys Asn Ala Thr  
 340 345 350  
 Gly Gln Phe Leu Asn Phe Asn Asp Thr Asn Asn Val Glu Trp Gly Thr  
 355 360 365  
 Glu Ala Asn Ala Thr Glu Tyr Thr Thr Gly Ala Asp Gly Ile Ile Thr  
 370 375 380  
 Ile Thr Gly Leu Lys Glu Gly Thr Tyr Tyr Leu Val Glu Lys Lys Ala  
 385 390 395 400  
 Pro Leu Gly Tyr Asn Leu Leu Asp Asn Ser Gln Lys Val Ile Leu Gly  
 405 410 415  
 Asp Gly Ala Thr Asp Thr Thr Asn Ser Asp Asn Leu Leu Val Asn Pro  
 420 425 430  
 Thr Val Glu Asn Asn Lys Gly Thr Glu Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 435 440 445  
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Leu Ala Glu Val Ser Gln Glu  
 450 455 460  
 Arg Pro Ala Lys Thr Thr Val Asn Ile Tyr Lys Leu Gln Ala Asp Ser  
 465 470 475 480  
 Tyr Lys Ser Glu Ile Thr Ser Asn Gly Gly Ile Glu Asn Lys Asp Gly  
 485 490 495  
 Glu Val Ile Ser Asn Tyr Ala Lys Leu Gly Asp Asn Val Lys Gly Leu  
 500 505 510  
 Gln Gly Val Gln Phe Lys Arg Tyr Lys Val Lys Thr Asp Ile Ser Val  
 515 520 525  
 Asp Glu Leu Lys Lys Leu Thr Thr Val Glu Ala Ala Asp Ala Lys Val  
 530 535 540  
 Gly Thr Ile Leu Glu Glu Gly Val Ser Leu Pro Gln Lys Thr Asn Ala  
 545 550 555 560  
 Gln Gly Leu Val Val Asp Ala Leu Asp Ser Lys Ser Asn Val Arg Tyr  
 565 570 575  
 Leu Tyr Val Glu Asp Leu Lys Asn Ser Pro Ser Asn Ile Thr Lys Ala  
 580 585 590  
 Tyr Ala Val Pro Phe Val Leu Glu Leu Pro Val Ala Asn Ser Thr Gly  
 595 600 605  
 Thr Gly Phe Leu Ser Glu Ile Asn Ile Tyr Pro Lys Asn Val Val Thr  
 610 615 620  
 Asp Glu Pro Lys Thr Asp Lys Asp Val Lys Lys Leu Gly Gln Asp Asp  
 625 630 635 640

ES 2 677 358 T3

Ala Gly Tyr Thr Ile Gly Glu Glu Phe Lys Trp Phe Leu Lys Ser Thr  
645 650 655

Ile Pro Ala Asn Leu Gly Asp Tyr Glu Lys Phe Glu Ile Thr Asp Lys  
660 665 670

Phe Ala Asp Gly Leu Thr Tyr Lys Ser Val Gly Lys Ile Lys Ile Gly  
675 680 685

Ser Lys Thr Leu Asn Arg Asp Glu His Tyr Thr Ile Asp Glu Pro Thr  
690 695 700

Val Asp Asn Gln Asn Thr Leu Lys Ile Thr Phe Lys Pro Glu Lys Phe  
705 710 715 720

Lys Glu Ile Ala Glu Leu Leu Lys Gly Met Thr Leu Val Lys Asn Gln  
725 730 735

Asp Ala Leu Asp Lys Ala Thr Ala Asn Thr Asp Asp Ala Ala Phe Leu  
740 745 750

Glu Ile Pro Val Ala Ser Thr Ile Asn Glu Lys Ala Val Leu Gly Lys  
755 760 765

Ala Ile Glu Asn Thr Phe Glu Leu Gln Tyr Asp His Thr Pro Asp Lys  
770 775 780

Ala Asp Asn Pro Lys Pro Ser Asn Pro Pro Arg Lys Pro Glu Val His  
785 790 795 800

Thr Gly Gly Lys Arg Phe Val Lys Lys Asp Ser Thr Glu Thr Gln Thr  
805 810 815

Leu Gly Gly Ala Glu Phe Asp Leu Leu Ala Ser Asp Gly Thr Ala Val  
820 825 830

Lys Trp Thr Asp Ala Leu Ile Lys Ala Asn Thr Asn Lys Asn Tyr Ile  
835 840 845

Ala Gly Glu Ala Val Thr Gly Gln Pro Ile Lys Leu Lys Ser His Thr  
850 855 860

Asp Gly Thr Phe Glu Ile Lys Gly Leu Ala Tyr Ala Val Asp Ala Asn  
865 870 875 880

Ala Glu Gly Thr Ala Val Thr Tyr Lys Leu Lys Glu Thr Lys Ala Pro  
885 890 895

Glu Gly Tyr Val Ile Pro Asp Lys Glu Ile Glu Phe Thr Val Ser Gln  
900 905 910

Thr Ser Tyr Asn Thr Lys Pro Thr Asp Ile Thr Val Asp Ser Ala Asp  
915 920 925

Ala Thr Pro Asp Thr Ile Lys Asn Asn Lys Arg Pro Ser His His His  
930 935 940

His His His  
945

<210> 23  
<211> 932  
<212> PRT

ES 2 677 358 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Combinación de restos W, X, L y Y

<400> 23

Met	Ala	Ser	Ala	Glu	Thr	Gly	Thr	Ile	Thr	Val	Gln	Asp	Thr	Gln	Lys
1				5					10					15	
Gly	Ala	Thr	Tyr	Lys	Ala	Tyr	Lys	Val	Phe	Asp	Ala	Glu	Ile	Asp	Asn
			20					25					30		
Ala	Asn	Val	Ser	Asp	Ser	Asn	Lys	Asp	Gly	Ala	Ser	Tyr	Leu	Ile	Pro
		35					40					45			
Gln	Gly	Lys	Glu	Ala	Glu	Tyr	Lys	Ala	Ser	Thr	Asp	Phe	Asn	Ser	Leu
	50					55					60				
Phe	Thr	Thr	Thr	Thr	Asn	Gly	Gly	Arg	Thr	Tyr	Val	Thr	Lys	Lys	Asp
65					70					75					80
Thr	Ala	Ser	Ala	Asn	Glu	Ile	Ala	Thr	Trp	Ala	Lys	Ser	Ile	Ser	Ala
				85					90					95	
Asn	Thr	Thr	Pro	Val	Ser	Thr	Val	Thr	Glu	Ser	Asn	Asn	Asp	Gly	Thr
			100					105					110		
Glu	Val	Ile	Asn	Val	Ser	Gln	Tyr	Gly	Tyr	Tyr	Tyr	Val	Ser	Ser	Thr
		115					120					125			
Val	Asn	Asn	Gly	Ala	Val	Ile	Met	Val	Thr	Ser	Val	Thr	Pro	Asn	Ala
	130					135					140				
Thr	Ile	His	Glu	Lys	Asn	Thr	Asp	Ala	Thr	Trp	Gly	Asp	Gly	Gly	Gly
145					150					155					160
Lys	Thr	Val	Asp	Gln	Lys	Thr	Tyr	Ser	Val	Gly	Asp	Thr	Val	Lys	Tyr
				165					170					175	
Thr	Ile	Thr	Tyr	Lys	Asn	Ala	Val	Asn	Tyr	His	Gly	Thr	Glu	Lys	Val
			180					185					190		
Tyr	Gln	Tyr	Val	Ile	Lys	Asp	Thr	Met	Pro	Ser	Ala	Ser	Val	Val	Asp
		195					200					205			
Leu	Asn	Glu	Gly	Ser	Tyr	Glu	Val	Thr	Ile	Thr	Asp	Gly	Ser	Gly	Asn
	210					215					220				
Ile	Thr	Thr	Leu	Thr	Gln	Gly	Ser	Glu	Lys	Ala	Thr	Gly	Lys	Tyr	Asn
225					230					235					240
Leu	Leu	Glu	Glu	Asn	Asn	Asn	Phe	Thr	Ile	Thr	Ile	Pro	Trp	Ala	Ala
				245					250					255	
Thr	Asn	Thr	Pro	Thr	Gly	Asn	Thr	Gln	Asn	Gly	Ala	Asn	Asp	Asp	Phe
			260					265					270		
Phe	Tyr	Lys	Gly	Ile	Asn	Thr	Ile	Thr	Val	Thr	Tyr	Thr	Gly	Val	Leu
		275					280					285			
Lys	Ser	Gly	Ala	Lys	Pro	Gly	Ser	Ala	Asp	Leu	Pro	Glu	Asn	Thr	Asn
	290					295					300				
Ile	Ala	Thr	Ile	Asn	Pro	Asn	Thr	Ser	Asn	Asp	Asp	Pro	Gly	Gln	Lys
305					310					315					320

ES 2 677 358 T3

Val Thr Val Arg Asp Gly Gln Ile Thr Ile Lys Lys Ile Asp Gly Ser  
 325 330 335  
 Thr Lys Ala Ser Leu Gln Gly Ala Ile Phe Val Leu Lys Asn Ala Thr  
 340 345 350  
 Gly Gln Phe Leu Asn Phe Asn Asp Thr Asn Asn Val Glu Trp Gly Thr  
 355 360 365  
 Glu Ala Asn Ala Thr Glu Tyr Thr Thr Gly Ala Asp Gly Ile Ile Thr  
 370 375 380  
 Ile Thr Gly Leu Lys Glu Gly Thr Tyr Tyr Leu Val Glu Lys Lys Ala  
 385 390 395 400  
 Pro Leu Gly Tyr Asn Leu Leu Asp Asn Ser Gln Lys Val Ile Leu Gly  
 405 410 415  
 Asp Gly Ala Thr Asp Thr Thr Asn Ser Asp Asn Leu Leu Val Asn Pro  
 420 425 430  
 Thr Val Glu Asn Asn Lys Gly Thr Glu Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu  
 435 440 445  
 Leu Ala Glu Val Ser Gln Glu Arg Pro Ala Lys Thr Thr Val Asn Ile  
 450 455 460  
 Tyr Lys Leu Gln Ala Asp Ser Tyr Lys Ser Glu Ile Thr Ser Asn Gly  
 465 470 475 480  
 Gly Ile Glu Asn Lys Asp Gly Glu Val Ile Ser Asn Tyr Ala Lys Leu  
 485 490 495  
 Gly Asp Asn Val Lys Gly Leu Gln Gly Val Gln Phe Lys Arg Tyr Lys  
 500 505 510  
 Val Lys Thr Asp Ile Ser Val Asp Glu Leu Lys Lys Leu Thr Thr Val  
 515 520 525  
 Glu Ala Ala Asp Ala Lys Val Gly Thr Ile Leu Glu Glu Gly Val Ser  
 530 535 540  
 Leu Pro Gln Lys Thr Asn Ala Gln Gly Leu Val Val Asp Ala Leu Asp  
 545 550 555 560  
 Ser Lys Ser Asn Val Arg Tyr Leu Tyr Val Glu Asp Leu Lys Asn Ser  
 565 570 575  
 Pro Ser Asn Ile Thr Lys Ala Tyr Ala Val Pro Phe Val Leu Glu Leu  
 580 585 590  
 Pro Val Ala Asn Ser Thr Gly Thr Gly Phe Leu Ser Glu Ile Asn Ile  
 595 600 605  
 Tyr Pro Lys Asn Val Val Thr Asp Glu Pro Lys Thr Asp Lys Asp Val  
 610 615 620  
 Lys Lys Leu Gly Gln Asp Asp Ala Gly Tyr Thr Ile Gly Glu Glu Phe  
 625 630 635 640  
 Lys Trp Phe Leu Lys Ser Thr Ile Pro Ala Asn Leu Gly Asp Tyr Glu  
 645 650 655  
 Lys Phe Glu Ile Thr Asp Lys Phe Ala Asp Gly Leu Thr Tyr Lys Ser  
 660 665 670

ES 2 677 358 T3

Val Gly Lys Ile Lys Ile Gly Ser Lys Thr Leu Asn Arg Asp Glu His  
675 680 685

Tyr Thr Ile Asp Glu Pro Thr Val Asp Asn Gln Asn Thr Leu Lys Ile  
690 695 700

Thr Phe Lys Pro Glu Lys Phe Lys Glu Ile Ala Glu Leu Leu Lys Gly  
705 710 715 720

Met Thr Leu Val Lys Asn Gln Asp Ala Leu Asp Lys Ala Thr Ala Asn  
725 730 735

Thr Asp Asp Ala Ala Phe Leu Glu Ile Pro Val Ala Ser Thr Ile Asn  
740 745 750

Glu Lys Ala Val Leu Gly Lys Ala Ile Glu Asn Thr Phe Glu Leu Gln  
755 760 765

Tyr Asp His Thr Pro Asp Lys Ala Asp Asn Pro Lys Pro Ser Asn Pro  
770 775 780

Pro Arg Lys Pro Glu Val His Thr Gly Gly Lys Arg Phe Val Lys Lys  
785 790 795 800

Asp Ser Thr Glu Thr Gln Thr Leu Gly Gly Ala Glu Phe Asp Leu Leu  
805 810 815

Ala Ser Asp Gly Thr Ala Val Lys Trp Thr Asp Ala Leu Ile Lys Ala  
820 825 830

Asn Thr Asn Lys Asn Tyr Ile Ala Gly Glu Ala Val Thr Gly Gln Pro  
835 840 845

Ile Lys Leu Lys Ser His Thr Asp Gly Thr Phe Glu Ile Lys Gly Leu  
850 855 860

Ala Tyr Ala Val Asp Ala Asn Ala Glu Gly Thr Ala Val Thr Tyr Lys  
865 870 875 880

Leu Lys Glu Thr Lys Ala Pro Glu Gly Tyr Val Ile Pro Asp Lys Glu  
885 890 895

Ile Glu Phe Thr Val Ser Gln Thr Ser Tyr Asn Thr Lys Pro Thr Asp  
900 905 910

Ile Thr Val Asp Ser Ala Asp Ala Thr Pro Asp Thr Ile Lys Asn Asn  
915 920 925

Lys Arg Pro Ser  
930

<210> 24  
<211> 896  
<212> PRT

5 <213> Streptococcus agalactiae serotipo lb cepa H36B

<400> 24  
Met Arg Lys Tyr Gln Lys Phe Ser Lys Ile Leu Thr Leu Ser Leu Phe  
1 5 10 15

Cys Leu Ser Gln Ile Pro Leu Asn Thr Asn Val Leu Gly Glu Ser Thr  
20 25 30

Val Pro Glu Asn Gly Ala Lys Gly Lys Leu Val Val Lys Lys Thr Asp

ES 2 677 358 T3

	35		40		45														
Asp	Gln	Asn	Lys	Pro	Leu	Ser	Lys	Ala	Thr	Phe	Val	Leu	Lys	Pro	Thr				
50						55					60								
Ser	His	Ser	Glu	Ser	Lys	Val	Glu	Lys	Val	Thr	Thr	Glu	Val	Thr	Gly				
65					70					75					80				
Glu	Ala	Thr	Phe	Asp	Asn	Leu	Thr	Pro	Gly	Asp	Tyr	Thr	Leu	Ser	Glu				
				85					90					95					
Glu	Thr	Ala	Pro	Glu	Gly	Tyr	Lys	Lys	Thr	Thr	Gln	Thr	Trp	Gln	Val				
			100					105					110						
Lys	Val	Glu	Ser	Asn	Gly	Lys	Thr	Thr	Ile	Gln	Asn	Ser	Asp	Asp	Lys				
		115					120					125							
Lys	Ser	Ile	Ile	Glu	Gln	Arg	Gln	Glu	Glu	Leu	Asp	Lys	Gln	Tyr	Pro				
		130				135					140								
Leu	Thr	Gly	Ala	Tyr	Glu	Asp	Thr	Lys	Glu	Ser	Tyr	Asn	Leu	Glu	His				
145					150					155					160				
Val	Lys	Asn	Ser	Ile	Pro	Asn	Gly	Lys	Leu	Glu	Ala	Lys	Ala	Val	Asn				
				165					170					175					
Pro	Tyr	Ser	Ser	Glu	Gly	Glu	His	Ile	Arg	Glu	Ile	Gln	Glu	Gly	Thr				
			180					185					190						
Leu	Ser	Lys	Arg	Ile	Ser	Glu	Val	Asn	Asp	Leu	Asp	His	Asn	Lys	Tyr				
		195					200					205							
Lys	Ile	Glu	Leu	Thr	Val	Ser	Gly	Lys	Ser	Ile	Ile	Lys	Thr	Ile	Asn				
		210				215					220								
Lys	Asp	Glu	Pro	Leu	Asp	Val	Val	Phe	Val	Leu	Asp	Asn	Ser	Asn	Ser				
225					230					235					240				
Met	Lys	Asn	Asn	Gly	Lys	Asn	Asn	Lys	Ala	Lys	Lys	Ala	Gly	Glu	Ala				
				245				250						255					
Val	Glu	Thr	Ile	Ile	Lys	Asp	Val	Leu	Gly	Ala	Asn	Val	Glu	Asn	Arg				
			260					265					270						
Ala	Ala	Leu	Val	Thr	Tyr	Gly	Ser	Asp	Ile	Phe	Asp	Gly	Arg	Thr	Val				
		275					280					285							
Lys	Val	Ile	Lys	Gly	Phe	Lys	Glu	Asp	Pro	Tyr	Tyr	Gly	Leu	Glu	Thr				
		290				295					300								
Ser	Phe	Thr	Val	Gln	Thr	Asn	Asp	Tyr	Ser	Tyr	Lys	Lys	Phe	Thr	Asn				
305					310					315					320				
Ile	Ala	Ala	Asp	Ile	Ile	Lys	Lys	Ile	Pro	Lys	Glu	Ala	Pro	Glu	Ala				
				325					330					335					
Lys	Trp	Gly	Gly	Thr	Ser	Leu	Gly	Leu	Thr	Pro	Glu	Lys	Lys	Arg	Glu				
			340					345					350						
Tyr	Asp	Leu	Ser	Lys	Val	Gly	Glu	Thr	Phe	Thr	Met	Lys	Ala	Phe	Met				
		355					360					365							
Glu	Ala	Asp	Thr	Leu	Leu	Ser	Ser	Ile	Gln	Arg	Lys	Ser	Arg	Lys	Ile				
		370				375					380								

ES 2 677 358 T3

Ile Val His Leu Thr Asp Gly Val Pro Thr Arg Ser Tyr Ala Ile Asn  
385 390 395 400

Ser Phe Val Lys Gly Ser Thr Tyr Ala Asn Gln Phe Glu Arg Ile Lys  
405 410 415

Glu Lys Gly Tyr Leu Asp Lys Asn Asn Tyr Phe Ile Thr Asp Asp Pro  
420 425 430

Glu Lys Ile Lys Gly Asn Gly Glu Ser Tyr Phe Leu Phe Pro Leu Asp  
435 440 445

Ser Tyr Gln Thr Gln Ile Ile Ser Gly Asn Leu Gln Lys Leu His Tyr  
450 455 460

Leu Asp Leu Asn Leu Asn Tyr Pro Lys Gly Thr Ile Tyr Arg Asn Gly  
465 470 475 480

Pro Val Arg Glu His Gly Thr Pro Thr Lys Leu Tyr Ile Asn Ser Leu  
485 490 495

Lys Gln Lys Asn Tyr Asp Ile Phe Asn Phe Gly Ile Asp Ile Ser Gly  
500 505 510

Phe Arg Gln Val Tyr Asn Glu Asp Tyr Lys Lys Asn Gln Asp Gly Thr  
515 520 525

Phe Gln Lys Leu Lys Glu Glu Ala Phe Glu Leu Ser Asp Gly Glu Ile  
530 535 540

Thr Glu Leu Met Asn Ser Phe Ser Ser Lys Pro Glu Tyr Tyr Thr Pro  
545 550 555 560

Ile Val Thr Ser Ala Asp Val Ser Asn Asn Glu Ile Leu Ser Lys Ile  
565 570 575

Gln Gln Gln Phe Glu Lys Ile Leu Thr Lys Glu Asn Ser Ile Val Asn  
580 585 590

Gly Thr Ile Glu Asp Pro Met Gly Asp Lys Ile Asn Leu His Leu Gly  
595 600 605

Asn Gly Gln Thr Leu Gln Pro Ser Asp Tyr Thr Leu Gln Gly Asn Asp  
610 615 620

Gly Ser Ile Met Lys Asp Ser Ile Ala Thr Gly Gly Pro Asn Asn Asp  
625 630 635 640

Gly Gly Ile Leu Lys Gly Val Lys Leu Glu Tyr Ile Lys Asn Lys Leu  
645 650 655

Tyr Val Arg Gly Leu Asn Leu Gly Glu Gly Gln Lys Val Thr Leu Thr  
660 665 670

Tyr Asp Val Lys Leu Asp Asp Ser Phe Ile Ser Asn Lys Phe Tyr Asp  
675 680 685

Thr Asn Gly Arg Thr Thr Leu Asn Pro Lys Ser Glu Glu Pro Asp Thr  
690 695 700

Leu Arg Asp Phe Pro Ile Pro Lys Ile Arg Asp Val Arg Glu Tyr Pro  
705 710 715 720

Thr Ile Thr Ile Lys Asn Glu Lys Lys Leu Gly Glu Ile Glu Phe Thr  
725 730 735

ES 2 677 358 T3

Lys Val Asp Lys Asp Asn Asn Lys Leu Leu Leu Lys Gly Ala Thr Phe  
 740 745 750

Glu Leu Gln Glu Phe Asn Glu Asp Tyr Lys Leu Tyr Leu Pro Ile Lys  
 755 760 765

Asn Asn Asn Ser Lys Val Val Thr Gly Glu Asn Gly Lys Ile Ser Tyr  
 770 775 780

Lys Asp Leu Lys Asp Gly Lys Tyr Gln Leu Ile Glu Ala Val Ser Pro  
 785 790 795 800

Lys Asp Tyr Gln Lys Ile Thr Asn Lys Pro Ile Leu Thr Phe Glu Val  
 805 810 815

Val Lys Gly Ser Ile Gln Asn Ile Ile Ala Val Asn Lys Gln Ile Ser  
 820 825 830

Glu Tyr His Glu Glu Gly Asp Lys His Leu Ile Thr Asn Thr His Ile  
 835 840 845

Pro Pro Lys Gly Ile Ile Pro Met Thr Gly Gly Lys Gly Ile Leu Ser  
 850 855 860

Phe Ile Leu Ile Gly Gly Ala Met Met Ser Ile Ala Gly Gly Ile Tyr  
 865 870 875 880

Ile Trp Lys Arg His Lys Lys Ser Ser Asp Ala Ser Ile Glu Lys Asp  
 885 890 895

<210> 25

<211> 864

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de GBS67 secuenciada a partir de Streptococcus agalactiae serotipo Ib cepa H36B truncada antes de la región transmembrana C-terminal

<400> 25

Met Arg Lys Tyr Gln Lys Phe Ser Lys Ile Leu Thr Leu Ser Leu Phe  
 1 5 10 15

Cys Leu Ser Gln Ile Pro Leu Asn Thr Asn Val Leu Gly Glu Ser Thr  
 20 25 30

Val Pro Glu Asn Gly Ala Lys Gly Lys Leu Val Val Lys Lys Thr Asp  
 35 40 45

Asp Gln Asn Lys Pro Leu Ser Lys Ala Thr Phe Val Leu Lys Pro Thr  
 50 55 60

Ser His Ser Glu Ser Lys Val Glu Lys Val Thr Thr Glu Val Thr Gly  
 65 70 75 80

Glu Ala Thr Phe Asp Asn Leu Thr Pro Gly Asp Tyr Thr Leu Ser Glu  
 85 90 95

Glu Thr Ala Pro Glu Gly Tyr Lys Lys Thr Thr Gln Thr Trp Gln Val  
 100 105 110

Lys Val Glu Ser Asn Gly Lys Thr Thr Ile Gln Asn Ser Asp Asp Lys  
 115 120 125

10

ES 2 677 358 T3

Lys Ser Ile Ile Glu Gln Arg Gln Glu Glu Leu Asp Lys Gln Tyr Pro  
 130 135 140  
 Leu Thr Gly Ala Tyr Glu Asp Thr Lys Glu Ser Tyr Asn Leu Glu His  
 145 150 155 160  
 Val Lys Asn Ser Ile Pro Asn Gly Lys Leu Glu Ala Lys Ala Val Asn  
 165 170 175  
 Pro Tyr Ser Ser Glu Gly Glu His Ile Arg Glu Ile Gln Glu Gly Thr  
 180 185 190  
 Leu Ser Lys Arg Ile Ser Glu Val Asn Asp Leu Asp His Asn Lys Tyr  
 195 200 205  
 Lys Ile Glu Leu Thr Val Ser Gly Lys Ser Ile Ile Lys Thr Ile Asn  
 210 215 220  
 Lys Asp Glu Pro Leu Asp Val Val Phe Val Leu Asp Asn Ser Asn Ser  
 225 230 235 240  
 Met Lys Asn Asn Gly Lys Asn Asn Lys Ala Lys Lys Ala Gly Glu Ala  
 245 250 255  
 Val Glu Thr Ile Ile Lys Asp Val Leu Gly Ala Asn Val Glu Asn Arg  
 260 265 270  
 Ala Ala Leu Val Thr Tyr Gly Ser Asp Ile Phe Asp Gly Arg Thr Val  
 275 280 285  
 Lys Val Ile Lys Gly Phe Lys Glu Asp Pro Tyr Tyr Gly Leu Glu Thr  
 290 295 300  
 Ser Phe Thr Val Gln Thr Asn Asp Tyr Ser Tyr Lys Lys Phe Thr Asn  
 305 310 315 320  
 Ile Ala Ala Asp Ile Ile Lys Lys Ile Pro Lys Glu Ala Pro Glu Ala  
 325 330 335  
 Lys Trp Gly Gly Thr Ser Leu Gly Leu Thr Pro Glu Lys Lys Arg Glu  
 340 345 350  
 Tyr Asp Leu Ser Lys Val Gly Glu Thr Phe Thr Met Lys Ala Phe Met  
 355 360 365  
 Glu Ala Asp Thr Leu Leu Ser Ser Ile Gln Arg Lys Ser Arg Lys Ile  
 370 375 380  
 Ile Val His Leu Thr Asp Gly Val Pro Thr Arg Ser Tyr Ala Ile Asn  
 385 390 395 400  
 Ser Phe Val Lys Gly Ser Thr Tyr Ala Asn Gln Phe Glu Arg Ile Lys  
 405 410 415  
 Glu Lys Gly Tyr Leu Asp Lys Asn Asn Tyr Phe Ile Thr Asp Asp Pro  
 420 425 430  
 Glu Lys Ile Lys Gly Asn Gly Glu Ser Tyr Phe Leu Phe Pro Leu Asp  
 435 440 445  
 Ser Tyr Gln Thr Gln Ile Ile Ser Gly Asn Leu Gln Lys Leu His Tyr  
 450 455 460  
 Leu Asp Leu Asn Leu Asn Tyr Pro Lys Gly Thr Ile Tyr Arg Asn Gly  
 465 470 475 480

ES 2 677 358 T3

Pro Val Arg Glu His Gly Thr Pro Thr Lys Leu Tyr Ile Asn Ser Leu  
 485 490 495  
 Lys Gln Lys Asn Tyr Asp Ile Phe Asn Phe Gly Ile Asp Ile Ser Gly  
 500 505 510  
 Phe Arg Gln Val Tyr Asn Glu Asp Tyr Lys Lys Asn Gln Asp Gly Thr  
 515 520 525  
 Phe Gln Lys Leu Lys Glu Glu Ala Phe Glu Leu Ser Asp Gly Glu Ile  
 530 535 540  
 Thr Glu Leu Met Asn Ser Phe Ser Ser Lys Pro Glu Tyr Tyr Thr Pro  
 545 550 555 560  
 Ile Val Thr Ser Ala Asp Val Ser Asn Asn Glu Ile Leu Ser Lys Ile  
 565 570 575  
 Gln Gln Gln Phe Glu Lys Ile Leu Thr Lys Glu Asn Ser Ile Val Asn  
 580 585 590  
 Gly Thr Ile Glu Asp Pro Met Gly Asp Lys Ile Asn Leu His Leu Gly  
 595 600 605  
 Asn Gly Gln Thr Leu Gln Pro Ser Asp Tyr Thr Leu Gln Gly Asn Asp  
 610 615 620  
 Gly Ser Ile Met Lys Asp Ser Ile Ala Thr Gly Gly Pro Asn Asn Asp  
 625 630 635 640  
 Gly Gly Ile Leu Lys Gly Val Lys Leu Glu Tyr Ile Lys Asn Lys Leu  
 645 650 655  
 Tyr Val Arg Gly Leu Asn Leu Gly Glu Gly Gln Lys Val Thr Leu Thr  
 660 665 670  
 Tyr Asp Val Lys Leu Asp Asp Ser Phe Ile Ser Asn Lys Phe Tyr Asp  
 675 680 685  
 Thr Asn Gly Arg Thr Thr Leu Asn Pro Lys Ser Glu Glu Pro Asp Thr  
 690 695 700  
 Leu Arg Asp Phe Pro Ile Pro Lys Ile Arg Asp Val Arg Glu Tyr Pro  
 705 710 715 720  
 Thr Ile Thr Ile Lys Asn Glu Lys Lys Leu Gly Glu Ile Glu Phe Thr  
 725 730 735  
 Lys Val Asp Lys Asp Asn Asn Lys Leu Leu Leu Lys Gly Ala Thr Phe  
 740 745 750  
 Glu Leu Gln Glu Phe Asn Glu Asp Tyr Lys Leu Tyr Leu Pro Ile Lys  
 755 760 765  
 Asn Asn Asn Ser Lys Val Val Thr Gly Glu Asn Gly Lys Ile Ser Tyr  
 770 775 780  
 Lys Asp Leu Lys Asp Gly Lys Tyr Gln Leu Ile Glu Ala Val Ser Pro  
 785 790 795 800  
 Lys Asp Tyr Gln Lys Ile Thr Asn Lys Pro Ile Leu Thr Phe Glu Val  
 805 810 815  
 Val Lys Gly Ser Ile Gln Asn Ile Ile Ala Val Asn Lys Gln Ile Ser  
 820 825 830  
 Glu Tyr His Glu Glu Gly Asp Lys His Leu Ile Thr Asn Thr His Ile  
 835 840 845  
 Pro Pro Lys Gly Ile Ile Pro Met Thr Gly Gly Lys Gly Ile Leu Ser  
 850 855 860

ES 2 677 358 T3

<210> 26  
 <211> 853  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos de GBS67 secuenciada a partir de Streptococcus agalactiae serotipo Ib cepa H36B que carece de restos de anclaje a la transmembrana y la pared celular

<400> 26  
 Met Arg Lys Tyr Gln Lys Phe Ser Lys Ile Leu Thr Leu Ser Leu Phe  
 1 5 10 15  
 Cys Leu Ser Gln Ile Pro Leu Asn Thr Asn Val Leu Gly Glu Ser Thr  
 20 25 30  
 Val Pro Glu Asn Gly Ala Lys Gly Lys Leu Val Val Lys Lys Thr Asp  
 35 40 45  
 Asp Gln Asn Lys Pro Leu Ser Lys Ala Thr Phe Val Leu Lys Pro Thr  
 50 55 60  
 Ser His Ser Glu Ser Lys Val Glu Lys Val Thr Thr Glu Val Thr Gly  
 65 70 75 80  
 Glu Ala Thr Phe Asp Asn Leu Thr Pro Gly Asp Tyr Thr Leu Ser Glu  
 85 90 95  
 Glu Thr Ala Pro Glu Gly Tyr Lys Lys Thr Thr Gln Thr Trp Gln Val  
 100 105 110  
 Lys Val Glu Ser Asn Gly Lys Thr Thr Ile Gln Asn Ser Asp Asp Lys  
 115 120 125  
 Lys Ser Ile Ile Glu Gln Arg Gln Glu Glu Leu Asp Lys Gln Tyr Pro  
 130 135 140  
 Leu Thr Gly Ala Tyr Glu Asp Thr Lys Glu Ser Tyr Asn Leu Glu His  
 145 150 155 160  
 Val Lys Asn Ser Ile Pro Asn Gly Lys Leu Glu Ala Lys Ala Val Asn  
 165 170 175  
 Pro Tyr Ser Ser Glu Gly Glu His Ile Arg Glu Ile Gln Glu Gly Thr  
 180 185 190  
 Leu Ser Lys Arg Ile Ser Glu Val Asn Asp Leu Asp His Asn Lys Tyr  
 195 200 205  
 Lys Ile Glu Leu Thr Val Ser Gly Lys Ser Ile Ile Lys Thr Ile Asn  
 210 215 220  
 Lys Asp Glu Pro Leu Asp Val Val Phe Val Leu Asp Asn Ser Asn Ser  
 225 230 235 240  
 Met Lys Asn Asn Gly Lys Asn Asn Lys Ala Lys Lys Ala Gly Glu Ala  
 245 250 255

10

ES 2 677 358 T3

Val Glu Thr Ile Ile Lys Asp Val Leu Gly Ala Asn Val Glu Asn Arg  
260 265 270

Ala Ala Leu Val Thr Tyr Gly Ser Asp Ile Phe Asp Gly Arg Thr Val  
275 280 285

Lys Val Ile Lys Gly Phe Lys Glu Asp Pro Tyr Tyr Gly Leu Glu Thr  
290 295 300

Ser Phe Thr Val Gln Thr Asn Asp Tyr Ser Tyr Lys Lys Phe Thr Asn  
305 310 315 320

Ile Ala Ala Asp Ile Ile Lys Lys Ile Pro Lys Glu Ala Pro Glu Ala  
325 330 335

Lys Trp Gly Gly Thr Ser Leu Gly Leu Thr Pro Glu Lys Lys Arg Glu  
340 345 350

Tyr Asp Leu Ser Lys Val Gly Glu Thr Phe Thr Met Lys Ala Phe Met  
355 360 365

Glu Ala Asp Thr Leu Leu Ser Ser Ile Gln Arg Lys Ser Arg Lys Ile  
370 375 380

Ile Val His Leu Thr Asp Gly Val Pro Thr Arg Ser Tyr Ala Ile Asn  
385 390 395 400

Ser Phe Val Lys Gly Ser Thr Tyr Ala Asn Gln Phe Glu Arg Ile Lys  
405 410 415

Glu Lys Gly Tyr Leu Asp Lys Asn Asn Tyr Phe Ile Thr Asp Asp Pro  
420 425 430

Glu Lys Ile Lys Gly Asn Gly Glu Ser Tyr Phe Leu Phe Pro Leu Asp  
435 440 445

Ser Tyr Gln Thr Gln Ile Ile Ser Gly Asn Leu Gln Lys Leu His Tyr  
450 455 460

Leu Asp Leu Asn Leu Asn Tyr Pro Lys Gly Thr Ile Tyr Arg Asn Gly  
465 470 475 480

Pro Val Arg Glu His Gly Thr Pro Thr Lys Leu Tyr Ile Asn Ser Leu  
485 490 495

Lys Gln Lys Asn Tyr Asp Ile Phe Asn Phe Gly Ile Asp Ile Ser Gly  
500 505 510

Phe Arg Gln Val Tyr Asn Glu Asp Tyr Lys Lys Asn Gln Asp Gly Thr  
515 520 525

Phe Gln Lys Leu Lys Glu Glu Ala Phe Glu Leu Ser Asp Gly Glu Ile  
530 535 540

Thr Glu Leu Met Asn Ser Phe Ser Ser Lys Pro Glu Tyr Tyr Thr Pro  
545 550 555 560

Ile Val Thr Ser Ala Asp Val Ser Asn Asn Glu Ile Leu Ser Lys Ile  
565 570 575

Gln Gln Gln Phe Glu Lys Ile Leu Thr Lys Glu Asn Ser Ile Val Asn  
580 585 590

Gly Thr Ile Glu Asp Pro Met Gly Asp Lys Ile Asn Leu His Leu Gly

ES 2 677 358 T3

	595					600					605				
Asn	Gly	Gln	Thr	Leu	Gln	Pro	Ser	Asp	Tyr	Thr	Leu	Gln	Gly	Asn	Asp
	610					615					620				
Gly	Ser	Ile	Met	Lys	Asp	Ser	Ile	Ala	Thr	Gly	Gly	Pro	Asn	Asn	Asp
625					630					635					640
Gly	Gly	Ile	Leu	Lys	Gly	Val	Lys	Leu	Glu	Tyr	Ile	Lys	Asn	Lys	Leu
				645					650					655	
Tyr	Val	Arg	Gly	Leu	Asn	Leu	Gly	Glu	Gly	Gln	Lys	Val	Thr	Leu	Thr
			660					665					670		
Tyr	Asp	Val	Lys	Leu	Asp	Asp	Ser	Phe	Ile	Ser	Asn	Lys	Phe	Tyr	Asp
		675					680					685			
Thr	Asn	Gly	Arg	Thr	Thr	Leu	Asn	Pro	Lys	Ser	Glu	Glu	Pro	Asp	Thr
	690					695					700				
Leu	Arg	Asp	Phe	Pro	Ile	Pro	Lys	Ile	Arg	Asp	Val	Arg	Glu	Tyr	Pro
705					710					715					720
Thr	Ile	Thr	Ile	Lys	Asn	Glu	Lys	Lys	Leu	Gly	Glu	Ile	Glu	Phe	Thr
				725					730					735	
Lys	Val	Asp	Lys	Asp	Asn	Asn	Lys	Leu	Leu	Leu	Lys	Gly	Ala	Thr	Phe
			740					745					750		
Glu	Leu	Gln	Glu	Phe	Asn	Glu	Asp	Tyr	Lys	Leu	Tyr	Leu	Pro	Ile	Lys
		755					760					765			
Asn	Asn	Asn	Ser	Lys	Val	Val	Thr	Gly	Glu	Asn	Gly	Lys	Ile	Ser	Tyr
	770					775					780				
Lys	Asp	Leu	Lys	Asp	Gly	Lys	Tyr	Gln	Leu	Ile	Glu	Ala	Val	Ser	Pro
785					790					795					800
Lys	Asp	Tyr	Gln	Lys	Ile	Thr	Asn	Lys	Pro	Ile	Leu	Thr	Phe	Glu	Val
				805					810					815	
Val	Lys	Gly	Ser	Ile	Gln	Asn	Ile	Ile	Ala	Val	Asn	Lys	Gln	Ile	Ser
			820					825					830		
Glu	Tyr	His	Glu	Glu	Gly	Asp	Lys	His	Leu	Ile	Thr	Asn	Thr	His	Ile
		835					840					845			
Pro	Pro	Lys	Gly	Ile											
	850														

## REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica que comprende: (a) un producto conjugado que es un sacárido capsular de serotipo Ia del Grupo B de *Streptococcus* conjugado con una proteína portadora; (b) un producto conjugado que es un sacárido capsular de serotipo Ib del Grupo B de *Streptococcus* conjugado con una proteína portadora; y (c) un producto conjugado que es un polisacárido capsular de serotipo III del Grupo B de *Streptococcus* conjugado con una proteína portadora en donde (i) cada sacárido capsular de GBS está presente en una cantidad de aproximadamente 5 µg, 10 µg o 20 µg por dosis unitaria, (ii) la proteína portadora en (a), (b) y (c) es toxoide diftérico o CRM197 y (iii) la composición inmunogénica no contiene un coadyuvante de sal de aluminio.
2. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las cantidades de sacáridos capsulares de serotipo Ia, Ib y III del Grupo B de *Streptococcus* por dosis unitaria son aproximadamente 5 µg, 5 µg y 5 µg.
3. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde la razón de las masas de los sacáridos capsulares de serotipo Ia, Ib y III del Grupo B de *Streptococcus* es 1:1:1.
4. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que comprende adicionalmente:
- d) un producto conjugado que es un sacárido capsular de serotipo V del Grupo B de *Streptococcus* conjugado con una proteína portadora.
5. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la composición es para administración en una dosis unitaria.
6. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el producto o los productos conjugados se pueden obtener por aminación reductiva de grupos aldehído generados antes de la conjugación mediante oxidación de entre 10 y 30% de los restos de ácido siálico de los sacáridos.
7. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el sacárido o los sacáridos capsulares del grupo B de *Streptococcus* no tienen sustancialmente O-acetilación de restos de ácido siálico en las posiciones 7, 8 y/o 9.
8. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición es para administración intramuscular.
9. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición comprende adicionalmente: (a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO 1 a 3, y/o (b) un polipéptido que comprende (i) un secuencia de aminoácidos que tiene 90% de identidad de secuencia o más con uno o más de SEQ ID NO 1 a 3 y/o (ii) un fragmento de SEQ ID NO 1 a 3.
10. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición comprende manitol para estabilizar el producto o los productos conjugados.
11. La composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes para su uso como medicamento.
12. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-10 o para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la composición es una vacuna para su uso en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad causada por *S. agalactiae*.
13. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-10 o para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 11 o 12, en donde la composición es para su administración a seres humanos seleccionados entre mujeres en edad fértil, mujeres embarazadas y pacientes de edad avanzada.
14. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-10 o para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 11-13, en donde la composición es para su administración a un paciente que ha sido preinmunizado con un toxoide diftérico o un derivado del mismo.

FIGURA 1

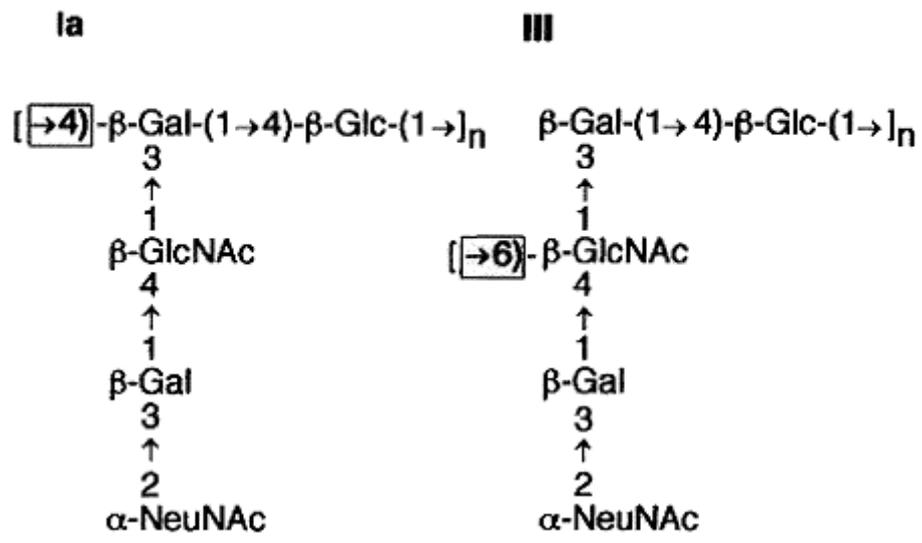
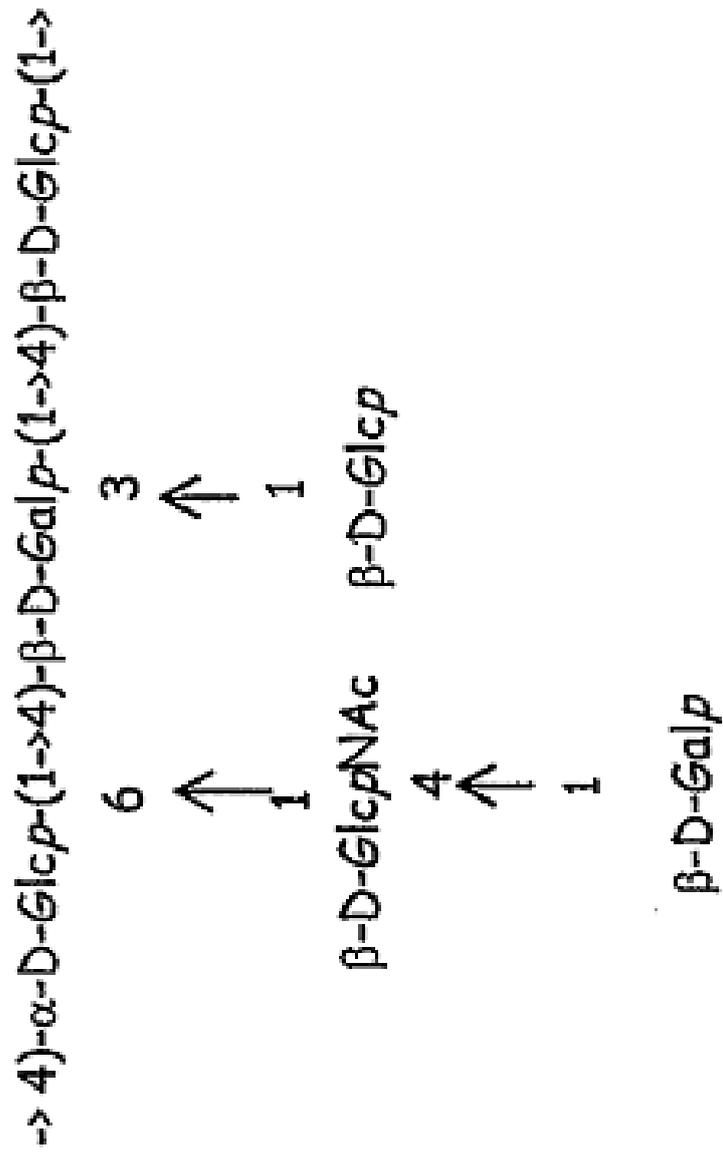


FIGURA 2

<p><b>Ia</b></p>	$  \begin{array}{c}  [ \rightarrow 4 ] - \beta - D - Glcp - ( 1 \rightarrow 4 ) - \beta - D - Galp - ( 1 \rightarrow )_n \\  \uparrow 3 \\    1 \\  \beta - D - GlcpNAc \\  \uparrow 4 \\    1 \\  \beta - D - Galp \\  \uparrow 3 \\    2 \\  \alpha - D - NeupNAc  \end{array}  $
<p><b>Ib</b></p>	$  \begin{array}{c}  [ \rightarrow 4 ] - \beta - D - Glcp - ( 1 \rightarrow 4 ) - \beta - D - Galp - ( 1 \rightarrow )_n \\  \uparrow 3 \\    1 \\  \beta - D - GlcpNAc \\  \uparrow 3 \\    1 \\  \beta - D - Galp \\  \uparrow 3 \\    2 \\  \alpha - D - NeupNAc  \end{array}  $
<p><b>II</b></p>	$  \begin{array}{c}  [ \rightarrow 4 ] - \beta - D - GlcpNAc - ( 1 \rightarrow 3 ) - \beta - D - Galp - ( 1 \rightarrow 4 ) - \beta - D - Glcp - ( 1 \rightarrow 3 ) - \beta - D - Glcp - ( 1 \rightarrow 2 ) - \beta - D - Galp - ( 1 \rightarrow )_n \\  \uparrow 6 \qquad \qquad \qquad \uparrow 3 \\    1 \qquad \qquad \qquad   2 \\  \beta - D - Galp \qquad \qquad \qquad \alpha - D - NeupNAc  \end{array}  $
<p><b>III</b></p>	$  \begin{array}{c}  \rightarrow 4 ] - \beta - D - Glcp - ( 1 \rightarrow 6 ) - \beta - D - GlcpNAc - ( 1 \rightarrow 3 ) - \beta - D - Galp - ( 1 \rightarrow ) \\  \uparrow 4 \\    1 \\  \beta - D - Galp \\  \uparrow 3 \\    2 \\  \alpha - D - NeupNAc  \end{array}  $
<p><b>V</b></p>	$  \begin{array}{c}  \rightarrow 4 ] - \alpha - D - Glcp - ( 1 \rightarrow 4 ) - \beta - D - Galp - ( 1 \rightarrow 4 ) - \beta - D - Glcp - ( 1 \rightarrow ) \\  \uparrow 6 \qquad \qquad \qquad \uparrow 3 \\    1 \qquad \qquad \qquad   1 \\  \beta - D - GlcpNAc \quad \beta - D - Glcp \\  \uparrow 4 \qquad \qquad \qquad \uparrow 1 \\    1 \\  \beta - D - Galp \\  \uparrow 3 \\    2 \\  \alpha - D - NeupNAc  \end{array}  $

**FIGURA 3**



**FIGURA 4**

