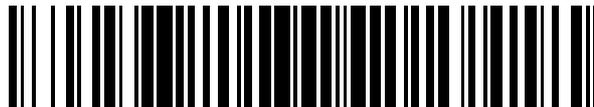


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 560 779**

51 Int. Cl.:

C08B 37/00 (2006.01)

C07K 16/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.09.2009** **E 09752002 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.12.2015** **EP 2328927**

54 Título: **Un procedimiento de unión de lipopolisacáridos bacterianos a una fase sólida**

30 Prioridad:

29.09.2008 PL 38617408

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.02.2016

73 Titular/es:

**INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DO
WIADCZALNEJ POLSKIEJ AKADEMII NAUK
(100.0%)
Ul. Rudolfa Weigla 12
53-114 Wroclaw, PL**

72 Inventor/es:

**LIPINSKI, TOMASZ;
RYBKA, JACEK y
GAMIAN, ANDRZEJ**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 560 779 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

Un procedimiento de unión de lipopolisacáridos bacterianos a una fase sólida

La presente invención se refiere a un procedimiento permanente y no covalente de unión de lipopolisacáridos bacterianos a una fase sólida. Este procedimiento es útil en técnicas de purificación, en particular técnicas de cromatografía, en particular en la purificación de anticuerpos.

Un lipopolisacárido (LPS, endotoxina) es un componente fundamental de la membrana externa de bacterias gramnegativas. Una molécula de LPS consiste en una porción lipídica (lípidos A) que la ancla en la membrana externa, y porciones sacarídicas (núcleo de LPS así como antígeno O-específico), expuestas directamente al entorno externo. Esta molécula es esencial para el crecimiento y la viabilidad del organismo bacteriano, ya que garantiza la integridad del objetivo de la pared y la protege frente a factores perjudiciales externos, tales como pH demasiado bajo o demasiado alto, detergentes, antibióticos, sales biliares o componentes del sistema inmunitario en los taxones superiores. También es un factor decisivo de la virulencia de las bacterias gramnegativas y la relación mutua de las bacterias saprófitas y los organismos huésped [1.2].

El lípido A tiene una única estructura [3], y por tanto, es la porción más conservada del LPS. El esqueleto molecular está formado por un disacárido compuesto de dos moléculas de glucosamina fosforilada (D-GlcN) β 1 \rightarrow 6-ligadas. El disacárido está acilado directamente (O- y N-acilado) con cuatro moléculas de ácidos grasos 3-hidroxi (3-OH 14:0). La acilación adicional de estos grupos -OH proporciona sustituyentes aciloxiacilo. Los aislados de lípido A constituyen raramente una única fracción. Las modificaciones de la estructura basal más frecuentemente consisten en cambios en el número, propiedades y localización de ácidos grasos adicionales (ligados al grupo 3-hidroxi), como sustituyentes polares. Por ejemplo, en salmonela las modificaciones a menudo son no estequiométricas, lo que da lugar a que las preparaciones sean en gran medida heterogéneas. Por ejemplo, en *Salmonella*, una porción de las moléculas contiene una cadena adicional (16:0) acilando el grupo OH del 3-hidroxi unido en la posición 2 a la GlcN, mientras que en otras moléculas una porción de las moléculas adicionales de ácido mirístico está sustituida con 2-hidroxitetradecanoico [4].

El antígeno O-específico es un polisacárido compuesto de unidades de repetición de oligosacáridos de uno a ocho residuos glucídicos. El antígeno O-específico en bacterias que carecen de una pared es el antígeno de superficie principal que garantiza su especificidad serológica. Se caracteriza por su variabilidad extensa. La gran variedad de posibles estructuras dotadas por glúcidos comunes tales como glucosa, manosa y galactosa se potencia en gran medida a través del uso de glúcidos con una longitud de cadena variable, de 4 a 10, formas piranosa y furanosa, varios estereoisómeros y modificaciones químicas tales como desoxi, amino o carboxilo, esterificación, eterificación, acetilación y amidación. Además, también se producen glúcidos ramificados, así como componentes no glucídicos tales como residuos de fosfato y aminoácidos. Las modificaciones más comúnmente observadas de antígenos O-específicos incluyen *O-acetilación*, fosforilación de *O-metilación*. Otros grupos éter incluyen el grupo carboxietilo. Las funcionalidades amina de los aminosacáridos están modificadas más frecuentemente con un acetilo u otros sustituyentes menos típicos [5].

El núcleo de LPS es el oligosacárido que conecta el lípido A al antígeno O-específico. Una comparación estructural de las estructuras de núcleo conocidas hasta la fecha muestra que, después del lípido A, por tanto, es la parte más conservada del LPS. Se caracteriza por la presencia de dos glúcidos atípicos: ácido 3-desoxi-D-manno-2-octulopiranosónico (Kdo) y heptopiranososa (Hepp). La heptosa se puede producir en ambas formas *h-gliceril-D-mano* (L,D) y *D-gliceril-D-mano* (D,D). La mayoría de las variantes de LPS contienen sólo una forma de la heptosa. Por ejemplo, los núcleos de *E. Coli*, *S. Minnesota* contienen únicamente la forma L,D. Otros pueden contener ambas (*Proteus mirabilis*, *Yersinia enterocolytica*) o sólo D,D heptosa (algunas bacterias fotótrofas). También son conocidas especies que carecen de la heptosa, tales como *Bacteroides fragilis* [184]. Los aminoácidos se encuentran a veces en las preparaciones de núcleo de los oligosacáridos de núcleo. Pueden estar ligados por amida a ácidos urónicos, treonina o *Rhodobacter sphaeroides*. A veces constituyen grupos N-acilo con hexosas, es decir, alanina en *Pseudomonas aeruginosa*, sin embargo, la mayoría de las veces es glicina ligada por éster en oligosacáridos de núcleo.

La gran similitud de estructuras de núcleo en muchas bacterias ha hecho que muchos investigadores estudien las posibilidades de que anticuerpos y sueros puedan reaccionar de forma cruzada entre los LPS de muchas especies de bacterias. La investigación a veces hace uso de mutantes que carecen de antígeno O (rugoso). Se han obtenido sueros antinúcleo policlonales inmunizando animales con células de *E. coli* O111, el mutante Rc, y *S. Enterica*, quimiotipo Re [6]. El lipopolisacárido es el factor principal que induce la inflamación, y por tanto, es un factor importante en la investigación inmunológica. También es una molécula importante en el diagnóstico y es un sustrato para vacunas conjugadas sintéticas.

Son conocidos de la técnica anterior procedimientos de purificación de anticuerpos dirigidos contra epítopos de lipopolisacáridos, que hacen uso de la unión covalente de moléculas de lipopolisacáridos a una fase sólida.

Por ejemplo, el documento FR2660197 divulga el aislamiento de anticuerpos anti-LPS por medio de cromatografía de afinidad. La columna de LPS se caracteriza por acoplamiento covalente por medio de grupos hidracina o amina.

Romanowska *et al.* 1976, FEBS Letters vol. 66, n.º 1 páginas 82-85, divulga una columna de cromatografía de afinidad que comprende LPS, en la que el LPS está acoplado a la columna usando unión covalente activada con CNBr.

Girard *et al.* 1981 Annales de l'Institut Pasteur. Immunologic vol. 132, n.º 2, páginas 211-217 divulga una cromatografía de afinidad usando LPS unido a sefarosa.

El documento WO 00/36419 divulga un ELISA usando LPS unido, en el que el LPS se extrae previamente usando la técnica de fenol caliente.

5 Uno de los conceptos de prevención y tratamiento de septicemia provocada por bacterias gramnegativas estipula la producción de anticuerpos con reacción cruzada ampliamente frente a lipopolisacáridos de muchas bacterias. Condicionado a la obtención de estos es encontrar epítomos compartidos frecuentes dentro del LPS, tales como los que constituyen los componentes no glucídicos de lipopolisacáridos. A menudo estos componentes se producen en particular en la porción de núcleo de LPS. Estos comprenden fosfatos, pirofosfatos, etanolamina, pirofosfoetanolamina, grupos acilo y otros. A menudo, están en cantidades no estequiométricas, y a menudo son químicamente lábiles. Dichos grupos se pierden fácilmente durante la extracción de LPS y posteriores modificaciones químicas, lo que complica la determinación de su importancia biológica y la producción de anticuerpos frente a los epítomos que los contienen. La investigación del solicitante ha dado como resultado el descubrimiento de glicina como sustituyente no glucídico de lipopolisacáridos. La glicina está conectada con el oligosacárido de núcleo y se produce comúnmente en LPS. Se han obtenido datos significativos que sugieren que participa en la formación del epítomo presente en los lipopolisacáridos de muchas bacterias gramnegativas. La glicina está presente en la porción de núcleo y, cuando es una parte del epítomo común, puede ser un sustrato para una vacuna de amplio espectro [7].

20 En un entorno acuoso, el lipopolisacárido forma una suspensión opalescente, ya que es una sustancia insoluble debido a la naturaleza lipídica de las moléculas, reticulado además por la actividad de las funcionalidades fosfato y amina con iones metálicos. Se puede obtener un incremento de la solubilidad y la producción de LPS en forma de una solución homogénea y transparente por medio de varios procedimientos, a través de la retirada de metales bivalentes. En la presente invención, se obtuvo LPS soluble en el procedimiento descrito. También son conocidos otros procedimientos, tales como electrodiálisis usada para producir varias sales de LPS [9], el uso de un quelante tal como EDTA o Chelex gel para mejorar las separaciones electroforéticas de LPS y la retirada de iones paramagnéticos durante el registro de RMN de espectros de RMN [10].

En vista de la técnica anterior mencionada anteriormente, el problema técnico objetivo con necesidad de una solución es el de obtener un procedimiento de producción de anticuerpos y sueros que puedan reaccionar de forma cruzada con los LPS de muchas especies bacterianas.

30 Los procedimientos existentes de inmovilización de LPS por medio de procedimientos químicos, tales como la unión a gel de Sepharose 4B activado con bromocianato [8], provocan que las estructuras lábiles responsables de la actividad biológica se degraden.

El objetivo de la presente invención es obtener estructuras lábiles responsables de la actividad biológica de endotoxinas, que permitan la producción de anticuerpos específicos frente a endotoxinas naturales, purificados en columnas que contienen endotoxinas naturales.

35 Los anticuerpos purificados en columnas que contienen endotoxinas naturales no sólo son útiles en el diagnóstico y aislamiento de estructuras de LPS naturales, sino también como reactivos únicos para la investigación inmunológica. Las columnas de afinidad producidas por medio del procedimiento de acuerdo con la presente invención hacen posible la producción de anticuerpos altamente específicos hasta el momento no disponibles y únicos con un amplio intervalo de actividad. Finalmente, las columnas de afinidad de acuerdo con la presente invención hacen posible el aislamiento de fagos específicos y preparaciones de fagos específicos para receptores inmovilizados. Hasta la fecha una herramienta de este tipo no ha estado disponible debido a la degradación de los receptores de fagos lábiles durante la inmovilización.

45 El objeto de la presente invención es un procedimiento de producción de un lecho para cromatografía de afinidad sin moléculas unidas de forma no covalente y estable de un lipopolisacárido lábil bacteriano, caracterizado por que el lipopolisacárido se transforma en una forma soluble en agua, los iones metálicos bivalentes se retiran de la preparación de LPS, en primer lugar mediante el tratamiento con un detergente y a continuación con un quelante que retira iones metálicos bivalentes; la preparación del lipopolisacárido soluble se transforma en una forma ácida en un disolvente orgánico e se inmoviliza en esta solución en el lecho que posee una fase sólida modificada con grupos hidrófobos, en el que las moléculas de lipopolisacárido interaccionan de forma hidrófoba con cadenas alifáticas, mientras que los sitios libres de fase sólida con LPS inmovilizado se bloquean con BSA.

El siguiente objeto de la presente invención es el uso de un lecho de este tipo para la producción de anticuerpos anti-LPS.

Preferentemente, el objeto de la presente invención es un uso, caracterizado por que el lecho se usa para purificar anticuerpos frente a epítomos de LPS lábiles.

55 Esta descripción revela un procedimiento de producción de una matriz de afinidad compuesta de una fase sólida conjugada de forma no covalente pero permanente con LPS, que se puede usar en el aislamiento de anticuerpos, en particular los dirigidos frente a epítomos que contienen componentes lábiles tales como glicina.

Preferentemente, un lecho de este tipo puede tener otros usos que hacen uso de LPS unido no covalentemente a una fase sólida sin la pérdida de sustituyentes lábiles. Las matrices de lipopolisacáridos inmovilizados no covalentemente son útiles en muchas aplicaciones en biotecnología, medicina, farmacología y diagnóstico. La inmovilización de endotoxinas naturales es esencial en casos en los que es necesario conservar los enlaces lábiles de ácidos siálicos, residuos acetilo, ésteres de fosfato y otros. Dichos grupos lábiles se producen en las endotoxinas de *Neisseria*, *Haemophilus*, *Shigella* y muchas otras, usados como sustratos en vacunas conjugadas. Las columnas de afinidad producidas de acuerdo con la presente invención se usan en el aislamiento rápido de anticuerpos, lo que hace posible realizar todo el procedimiento de preparación de la columna y la purificación de los anticuerpos en varias horas. Dichas columnas se usan en la preparación en una única fase de anticuerpos antiendotoxina mono-específicos así como monoclonales, así como antiglicolípido. El procedimiento de preparación de columnas de acuerdo con la presente invención no requiere reactivos no seguros tales como bromocianato. El procedimiento de acuerdo con la presente invención es sencillo, económico, eficaz, económico y seguro, y proporciona un producto estable y no tóxico listo para su uso inmediato y aplicación tecnológica, así como para comercialización amplia.

El quid de la presente invención es un procedimiento de formación de una fase sólida modificada con LPS de forma no covalente, en condiciones que no dañan los sustituyentes lábiles. Los sustituyentes lábiles de las endotoxinas a menudo interactúan con anticuerpos y fagos, por tanto, los epítomos lábiles son componentes de vacunas y diagnósticos. Los epítomos lábiles son determinantes importantes usados en la construcción de vacunas conjugadas. Los lipopolisacáridos son insolubles y forman una suspensión en un entorno acuoso. La novedad de la presente invención consiste en la producción de lipopolisacáridos solubles y algunos disolventes orgánicos, garantizando la inmovilización del LPS en un gel. El procedimiento divulgado consiste en la transformación del LPS en una forma soluble en agua y también en disolventes orgánicos, así como la inmovilización de un LPS de este tipo en una fase sólida. El procedimiento de transformación del lipopolisacárido en la forma activa consiste en hacer reaccionar el LPS con factores lo que facilita inicialmente la disociación de complejos de LPS en agua, y a continuación de la retirada de iones metálicos bivalentes de la preparación de LPS usando un quelante, así como la transformación del lipopolisacárido en una forma soluble en el disolvente orgánico. De forma inesperada, se determinó que sólo la forma soluble de LPS se inmoviliza de forma fuerte y estable en un gel hidrófobo. El LPS natural no se inmoviliza eficazmente y se une mal al gel, y por tanto, se eluye fácilmente y probablemente forma agregados superestructurales en una solución acuosa. Se determinó que la forma soluble en el disolvente orgánico garantiza la inmovilización de un LPS de este tipo en una fase sólida modificada con cadenas de alquilo. Hasta la fecha, se inmovilizó el LPS usando procedimientos químicos, que degradan las estructuras lábiles responsables de la actividad biológica, tales como el procedimiento de unión a Sepharose 4B activado por bromocianato [8]. La novedad de la presente invención consiste además en el uso de BSA para bloquear los sitios libres en el gel. Esta proteína es un vehículo de ácido graso natural usando en ensayos de ELISA. En la presente invención, se usó con éxito para bloquear de forma permanente y estable sitios libres en la matriz de afinidad. Debido a esta propiedad de BSA, las cadenas alifáticas de LPS se unen de forma estable al gel, estabilizando adicionalmente el sistema de cromatografía LPS-C18. Un elemento significativo de la presente invención también es la observación de que el LPS soluble en DMSO, agua, u otro disolvente orgánico esté inmovilizado en el gel exactamente en el mismo entorno de DMSO u otro disolvente orgánico.

Preferentemente, el factor que potencia la disociación de complejos de lipopolisacáridos en agua es un detergente tal como un dodecilsulfato (SDS).

Preferentemente, el factor que retira iones bivalentes reticulando el lipopolisacárido, es ácido etilendiaminotetraacético (ácido versénico, EDTA), una matriz en fase sólida tal como Chelex o electrodiálisis.

Preferentemente, la forma soluble del lipopolisacárido natural consiste en sus sales (es decir, sal de sodio o terbutilamina), una forma ácida del lipopolisacárido: LPS H⁺ o un lipopolisacárido modificado químicamente (es decir, N-acetilado).

Preferentemente, los disolventes usados para disolver una forma apropiada del lipopolisacárido es agua, metanol, dimetilsulfóxido, diclorometano o acetonitrilo.

Preferentemente, la fase sólida para inmovilizar el LPS soluble es un gel de sílice con grupos alquilo unidos covalentemente, preferentemente grupos octadecilo.

El procedimiento de transformación del lipopolisacárido en la forma soluble como un sustrato para la cromatografía de afinidad engloba la retirada de iones metálicos bivalentes de la preparación de lipopolisacárido, en el que la preparación de lipopolisacárido en primer lugar se trata con un detergente, preferentemente un detergente iónico tal como dodecilsulfato, y a continuación se trata con un quelante que retira los iones metálicos bivalentes, preferentemente una sustancia tal como un ácido policarboxílico (es decir, EDTA) o una matriz de tipo Chelex basada en una resina sintética, u otro procedimiento que da lugar a la retirada de iones metálicos bivalentes de la preparación (es decir, electrodiálisis).

Preferentemente, durante la retirada del detergente y quelante, el lipopolisacárido se separa de la solución por precipitación usando un disolvente orgánico, preferentemente etanol, y a continuación la preparación de LPS soluble precipitada se seca sin liofilización.

El lipopolisacárido se transforma en su forma ácida, en la que la solución del lipopolisacárido soluble se trata con un

factor que reemplaza iones metálicos monovalentes (Na^+ , K^+) en la sal de LPS neutra con protones ácidos (H^+), preferentemente en una matriz de intercambio iónico basada en una resina sintética.

Preferentemente, se forma una solución homogénea del lipopolisacárido en un disolvente polar, en particular un disolvente orgánico, en el que la forma ácida del LPS se disuelve en el disolvente orgánico, preferentemente, agua o dimetilsulfóxido (DMSO).

La preparación de la fase sólida con el lipopolisacárido inmovilizado se caracteriza por que el lipopolisacárido modificado se disuelve en el disolvente, preferentemente, agua o DMSO, se une a la fase sólida que posee una superficie modificada con grupos hidrófobos, preferentemente cadenas de alquilo tales como cadenas octadecilo (C_{18}) a través de interacciones hidrófobas entre las cadenas de ácidos grasos del lipopolisacárido y los grupos hidrófobos de la fase sólida.

Durante la producción de la fase sólida con el lipopolisacárido inmovilizado, el LPS modificado, preferentemente disuelto en un disolvente, preferentemente, agua o DMSO, se une a la fase sólida a través de la adición de la matriz a la solución de LPS.

Durante la producción de la fase sólida con el lipopolisacárido inmovilizado, la fase sólida con el LPS inmovilizado preferentemente se bloquea con BSA.

Ejemplos de la transformación de preparaciones de endotoxina en una forma soluble en disolventes orgánicos, de la unión de una forma de este tipo a una fase sólida, y el uso del resultante de una fase de afinidad de este tipo en la purificación de anticuerpos anti-LPS.

Ejemplo 1.

En este ejemplo, se fabricó un lecho de afinidad de cromatografía para la purificación de anticuerpos frente al lipopolisacárido rugoso de la cepa de *E. coli* K12 C600. Se disolvió una muestra del LPS liofilizado de *E. coli* K12 C600 (20 mg) en 2 ml de SDS al 2 %, y a continuación se añadieron 0,5 ml de EDTA 0,2 M. Después de 10 min, se centrifugó durante 20 min a 5000 rpm. Se desechó el precipitado, y se complementó la solución de LPS con 4 volúmenes de etanol, se enfrió a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ y se volvió a centrifugar (5000 rpm, 20 min). Se suspendió el precipitado formado en una mezcla de etanol:agua 3:1, se volvió a centrifugar (5000 rpm, 20 min), se repitió el procedimiento dos veces. Después de la centrifugación final, se secó el precipitado en un desecador. Se disolvió el precipitado seco en agua (2 ml) y se pasó a través de una columna de Dowex 50W - X8 (2 ml) equilibrada con iones H^+ , después de esto se aclaró la columna agua MiliQ hasta que se obtuvo un eluato neutro. Se liofilizó el eluato recogido y a continuación se disolvió en DMSO (5 ml). Se complementó la solución preparada con gel de sílice CIS, se incubó durante 18 horas con mezclado continuo. Se eluyó lipopolisacárido no unido con DMSO y a continuación con metanol al 50 %.

Ejemplo 2.

Este ejemplo se refiere a la producción de un lecho de afinidad para cromatografía para la purificación de anticuerpos frente al lipopolisacárido de *E. coli* K12 C600, en la que el factor que retira el factor usado para retirar iones metálicos bivalentes del LPS de la preparación de LPS fue un gel Chelex equilibrado con iones Na^+ . Se disolvió una muestra del LPS liofilizado de *E. coli* K12 C600 (20 mg) en 2 ml de SDS al 2 %, se centrifugó (20 min, 5000 rpm), y se pasó a través de una columna (1 ml) de Chelex, que a continuación se aclaró con 5 ml de agua. La precipitación con etanol así como el resto del procedimiento fueron como en el ejemplo 1.

Ejemplo 3.

Este ejemplo se refiere a la producción de un lecho de cromatografía de afinidad para la purificación de anticuerpos frente al lipopolisacárido de *E. coli* K12 C600, donde la fase sólida para la unión del lipopolisacárido fue el gel octyl-Sepharose CL-4B, mientras que el resto del procedimiento fue idéntico al del ejemplo 1.

Ejemplo 4.

Este ejemplo se refiere a la producción de un lecho de cromatografía de afinidad para la purificación de anticuerpos frente al lipopolisacárido de *E. coli* K12 C600, donde la forma soluble del lipopolisacárido fue la sal de terc-butilamina (TEA) del LPS, mientras que el resto del procedimiento fue idéntico al del ejemplo 1.

Ejemplo 5.

Este ejemplo se refiere a la producción de un lecho de cromatografía de afinidad para la purificación de anticuerpos frente al lipopolisacárido de *E. coli* K12 C600, donde se disolvió la forma soluble del lipopolisacárido en metanol y a continuación se realizó el procedimiento de unión del LPS a un lecho de C18 de gel de sílice, y el resto del procedimiento fue idéntico al del ejemplo 1.

Ejemplo 6.

Este ejemplo se refiere a la producción de lechos para cromatografía de afinidad para la purificación de anticuerpos, en

la que se realizó la producción de una forma soluble de los lipopolisacáridos usando dos lipopolisacáridos de *H. Alvei* PCM 1186 y *H. Alvei* PCM 1189, el resto del procedimiento fue idéntico al del ejemplo 1.

5 Se empaquetaron los lechos restantes en metanol al 50 % en dos columnas de 0,5 x 5,0 cm (1 cm³). Se aclararon las columnas con agua y PBS, después de esto se aclaró cada una con 10 ml de BSA al 1 % en PBS y a continuación PBS hasta que no se pudo detectar nada de absorbancia a $\lambda = 280$ nm.

10 Antes de la cromatografía de afinidad, se aislaron inmunoglobulinas de sueros anti-LPS por precipitación de ácido de amonio. Se realizó la precipitación como sigue: Se diluyeron 5 ml de suero anti-*Hafnia alvei* 1186 o anti-*Hafnia alvei* PCM 1189 de conejo en 10 ml de PBS. Con mezclado constante, se añadieron gota a gota 4,8 g de sulfato de amonio. Después de que se añadiera lo último de esto, se incubó el suero durante 60 minutos en un baño de agua con hielo. Se centrifugó el precipitado a 10000 g y 5 °C durante 30 minutos. Se disolvió el precipitado en 5 ml de PBS y se dializó a 4 °C en PBS así como en PBS con azida de sodio al 0,02 %.

15 A continuación, se purificaron los anticuerpos precipitados por cromatografía de afinidad. Se cargaron las preparaciones dializadas de los anticuerpos precipitados apropiados en columnas que contenían la fase sólida con LPS natural unido. Se eluyeron las proteínas no unidas con PBS (fracción 1), se eluyeron los anticuerpos con una afinidad por el antígeno usando KSCN 3 M en PBS (fracción 2). Se dializaron las fracciones n.º 2 de ambas columnas frente a PBS y se condensaron usando ultrafiltración.

20 Se evaluó la especificidad de los anticuerpos usando un ensayo ELISA en el que se recubrieron las placas de prueba con los lipopolisacáridos de *H. Alvei* PCM 1186 y *H. Alvei* PCM 1189 y se midió la afinidad de ambos anticuerpos para los LPS inmovilizados (fracciones n.º 2 tras cromatografía en ambas columnas). Los anticuerpos mostraron una alta afinidad para lipopolisacáridos en sistemas homogéneos (respectivamente, anticuerpo a-1186 para el LPS de *H. Alvei* PCM 1186 así como anticuerpo a-1189 para el LPS de *H. Alvei* PCM 1189), mientras que no se observó reactividad cruzada de los anticuerpos con estos lipopolisacáridos.

Ejemplo 7.

25 Este ejemplo se refiere a la purificación de anticuerpos específicos frente a epítomos de lipopolisacáridos que contienen sustituyentes lábiles de glicina. Se usaron dos preparaciones del lipopolisacárido de *E. coli* K12 C600: uno natural y uno con la glicina retirada (el lipopolisacárido disuelto en agua a una tasa de 0,5 mg/ml se sometió a amoniaco en agua, pH 12, durante 12 horas a temperatura ambiente, y a continuación se purificó en un gel Sefadex G-25 Superfine en agua y se liofilizó). El procedimiento para la producción de un lecho de cromatografía de afinidad para la purificación de anticuerpos es idéntico al del ejemplo 1. Se empaquetaron los geles resultantes suspendidos en metanol al 50 % en dos columnas de 0,5 x 5,0 cm (1 cm³). Se aclararon las columnas con agua y PBS, después de esto se aclaró cada una con 10 ml de BSA al 1 % en PBS y a continuación PBS hasta que no se pudo detectar nada de absorbancia a $\lambda = 280$ nm.

30 Se realizó la precipitación como sigue: Se diluyeron 5 ml de suero de conejo frente a *E. coli* K12 C600 en 10 ml de PBS. Con mezclado constante, se añadieron gota a gota 9,6 g de sulfato de amonio. Después de que se añadiera lo último de esto, se incubó el suero durante 60 minutos en un baño de agua con hielo con mezclado constante. Se centrifugó el precipitado a 3000 g y 5 °C durante 30 minutos. Se disolvió el precipitado en 5 ml de PBS y se dializó a 4 °C en PBS.

35 Se cargó la preparación dializada del anticuerpo precipitado en una columna que contenía el LPS natural unido. Se eluyeron las proteínas no unidas con PBS (fracción 1), se eluyeron los anticuerpos con una afinidad débil por el antígeno usando KSCN 3 M en PBS (fracción 2). Se eluyeron los anticuerpos con alta afinidad con KSCN 3 M y PBS (fracción 3). Se dializó la fracción 3 frente a PBS, se concentró usando ultrafiltración y se cargó en una columna con una fase sólida unida con LPS desglicinado. Se realizó la cromatografía como se describe anteriormente. Los anticuerpos de la fracción 1, que no se unieron a LPS desglicinado poseían una afinidad por los epítomos que contenían glicina.

Bibliografía

1. Schletter J., Heine H., Ulmer A.J., Rietschel E.T. (1995), Molecular mechanisms of endotoxin activity. *Arch Microbiol*, 164, 383-389.
- 45 2. Rietschel E.T., Kirikae T., Schade F.U., Ulmer A.J., Holst O., Brade H., Schmidt G., Mamat U., Grimmecke H.D., Kusumoto S. (1993), The chemical structure of bacterial endotoxin in relation to bioactivity. *Immunobiology*, 187, 169-190.
3. Rietschel E.T., Wollenweber H.W., Russa R., Brade H., Zahringer U. (1984), Concepts of the chemical structure of lipid A. *Rev Infect Dis*, 6, 432-438.
- 50 4. Zahringer U., Lindner B., Rietschel E.T. (1994), Molecular structure of lipid A, the endotoxic center of bacterial lipopolysaccharides. *Adv Carbohydr Chem Biochem*, 50, 211-276.
5. Wilkinson S.G. (1996), Bacterial lipopolysaccharides themes and variations. *Prog Lipid Res*, 35, 283-343.
6. Rietschel E.T., Brade H., Holst O., Brade L., Muller L.S., Mamat U., Zahringer U., Beckmann F., Seydel U., Brandenburg K., Ulmer A.J., Mattern T., Heine H., Schletter J., Loppnow H., Schonbeck U., Flad H.D., Hauschildt

- S., Schade U.F., Di Padova F., Kusumoto S., Schumann R.R. (1996), Bacterial endotoxin: Chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification. *Curr Top Microbiol Immunol*, 216, 39-81.
7. Gamian A., Mieszala M., Boratynski J., A method wytwarzania szczepionki koniugatowej o szerokiej swoistosci przeciwbakteryjnej, Zgl. Pat. Nr 328280 z dn. 31. 08. 1998 r.. Patent PL nr 192872 z dnia 27. 03. 2006.
- 5 8. Romanowska E, Lugowski C, Mulczyk M. (1976), Lipopolysaccharide immunoabsorbents and their application to affinity chromatography of O-antibodies and specific phages. *FEBS Lett*, 66, 82-85.
9. Galanos C., Luderitz O. (1975), Electrodialysis of lipopolysaccharides and their conversion to uniform salt forms, *Eur J Biochem*, 54, 603-610.
10. Mansson M., Bauer S.H.J., Hood D.W., Richards J.C., Moxon E.R., Schweda E.K.H. (2001), A new structural type for *Haemophilus influenzae* lipopolysaccharide. Structural analysis of the lipopolysaccharide from nontypeable *Haemophilus influenzae* strain 486, *Eur J Biochem*, 268, 2148-2159.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de producción de un lecho para cromatografía de afinidad con moléculas de un lipopolisacárido lábil bacteriano unidas de forma no covalente y estable, caracterizado por que el lipopolisacárido se transforma en una forma soluble en agua que comprende la retirada de iones metálicos bivalentes de la preparación de LPS, en primer lugar mediante el tratamiento con un detergente y a continuación con un quelante que retira iones metálicos bivalentes; la preparación del lipopolisacárido soluble se transforma en una forma ácida en un disolvente orgánico y se inmoviliza en esta solución en el lecho que posee una fase sólida modificada con grupos hidrófobos, en el que las moléculas de lipopolisacárido interaccionan de forma hidrófoba con cadenas alifáticas, mientras que los sitios libres de la fase sólida con el LPS inmovilizado se bloquean con BSA.
2. Uso del lecho producido de acuerdo con la reivindicación 1 para la producción de anticuerpos contra lipopolisacáridos.
3. El uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el lecho se usa para la purificación de anticuerpos contra epítomos lábiles de lipopolisacáridos.