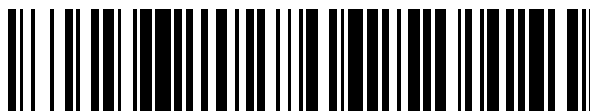


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 611 464**

51 Int. Cl.:

C08B 37/00 (2006.01)

C12P 19/26 (2006.01)

C12P 19/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.1998** **E 10005184 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2016** **EP 2226336**

54 Título: **Polisacárido capsular bacteriano para su uso como vacuna o para su unión a proteínas en vacunas de conjugados**

30 Prioridad:

23.12.1997 US 68608 P

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

09.05.2017

73 Titular/es:

**PFIZER IRELAND PHARMACEUTICALS (100.0%)
Ringaskiddy, Cork, IE**

72 Inventor/es:

**MICHON, FRANCIS y
BLAKE, MILAN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 611 464 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

Polisacárido capsular bacteriano para su uso como vacuna o para su unión a proteínas en vacunas de conjugados

Se reivindica prioridad respecto de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos con número de serie 60/068.608, presentada el 23 de diciembre de 1997.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una composición inmunogénica que comprende polisacáridos capsulares estreptocócicos (PC) del grupo B purificados.

Antecedentes de la invención

10 Las infecciones bacterianas provocadas por bacterias Gram positivas, tales como *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Listeria*, *Erysipelothrix* y *Clostridium*, y por bacterias Gram negativas, tales como *Haemophilus*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, *Neisseria*, y ciertos tipos de *Escherichia coli*, causan una alta morbilidad en todo el mundo. Esto, asociado con la resistencia emergente mostrada por las bacterias a los antibióticos, indica la necesidad de desarrollar vacunas bacterianas.

15 Por ejemplo, los estreptococos, son un género amplio y variado de bacterias Gram positivas que han sido ordenadas en varios grupos basándose en la antigenicidad y la estructura del polisacárido de su pared celular (26, 27). Dos de estos grupos han sido asociados a graves infecciones humanas. Los estreptococos del grupo A provocan una variedad de trastornos infecciosos que incluyen faringitis estreptocócica, fiebre reumática, impétigo causado por estreptococos y septicemia.

20 Los estreptococos del grupo B no se reconocieron como patógenos humanos en los libros de texto de Medicina convencionales hasta principios de la década de 1970. Desde entonces, los estudios han demostrado que los estreptococos del grupo B son importantes patógenos perinatales en los Estados Unidos, así como en países en vías de desarrollo (37). Las infecciones sistémicas por estreptococos del grupo B durante los dos primeros meses de vida afectan a aproximadamente tres de cada 1.000 nacimientos (12), dando como resultado 11.000 casos al año en los Estados Unidos. Estas infecciones provocan síntomas de neumonía congénita, septicemia y meningitis. Un número considerable de estos bebés muere o tiene secuelas neurológicas permanentes. Además, las infecciones por estreptococos del grupo B pueden estar implicadas en la elevada morbilidad relacionada con la gestación que se produce en casi 50.000 mujeres cada año. Otras personas susceptibles a las infecciones por estreptococos del grupo B son aquéllas que tienen una respuesta inmune alterada, bien congénitamente, quimioterapéuticamente o por otras razones.

30 Los estreptococos del grupo B se pueden clasificar además en varios tipos diferentes basándose en el polisacárido capsular bacteriano. Los tipos Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII y VIII son responsables de la mayoría de la patogenicidad debida a la infección por el grupo B, siendo los estreptococos del grupo B de tipo Ia, Ib, II, III y V representantes de más del 90% de todos los casos publicados. Se ha caracterizado la estructura de cada uno de estos diversos tipos de polisacáridos (19–22, 44). De manera similar a los descubrimientos encontrados con otros muchos patógenos bacterianos humanos, los polisacáridos capsulares de los estreptococos del grupo B, cuando se usan en vacunas, pueden proporcionar una protección eficaz frente a infecciones con estas bacterias. Véase 4, 6, 24, 29, 30, 42, 43, 45.

40 Las bacterias Gram negativas también son una causa relevante de enfermedad. Hasta el desarrollo y el uso recientes de vacunas de polisacárido–proteína dirigidas contra las bacterias *Haemophilus influenzae* de tipo b (Hib), las infecciones por bacterias Hib eran responsables de muchos casos de retraso mental en bebés. Las infecciones por *N. meningitidis* y *E. coli* K1 son responsables de la meningitis neonatal. Se han asociado cepas de bacterias Gram negativas, de *E. coli*, con enfermedades graves, incluyendo la muerte por ingestión de carne contaminada con cepas de *E. coli*.

45 La producción a gran escala de vacunas de polisacáridos capsulares y de vacunas de conjugados de polisacáridos capsulares requiere suministros adecuados de polisacáridos capsulares purificados. Los procedimientos de la técnica anterior (40, 42) para aislar polisacáridos capsulares de células bacterianas se basan en el tratamiento de las células con la enzima mutanolisina. La mutanolisina escinde la pared celular bacteriana, lo que libera los componentes celulares. Este procedimiento implica tratar los lisados celulares con enzimas adicionales para eliminar las proteínas y los ácidos nucleicos y purificar mediante precipitación diferencial y cromatografía. Son deseables procedimientos más eficientes, con un mayor rendimiento y más sencillos para obtener polisacáridos capsulares purificados.

50 Por ejemplo, Wessels M. R. y col., 1989, "Isolation and characterization of type IV group B Streptococcus capsular polysaccharide" Infect. Immun. 57(4):1089-1094 (40), describe el aislamiento de polisacáridos capsulares a partir de un serotipo de estreptococo de grupo B (EGB) recientemente identificado en aquel momento usando mutanolisina, seguido de múltiples etapas de purificación adicionales. Específicamente, Wessels y col. (40) estudiaron un serotipo antigénicamente distinto, el tipo IV, aislando y purificando el antígeno del polisacárido capsular a partir de una cepa de EGB de tipo IV prototípica. Los polisacáridos capsulares se liberaron de las

células bacterianas con mutanolisina y se aislaron a partir del sobrenadante de cultivo después de varias etapas, incluyendo centrifugación y diálisis del sobrenadante, tratamiento con DNasa, RNasa y Pronasa y cromatografía en columna. Véase, Wessels y col. (40), página 1090, columna de la izquierda, primer párrafo.

5 De manera similar, Wessels M. R. y col. 1990 "Immunogenicity in animals of a polysaccharide-protein conjugate vaccine against type III group B Streptococcus" J. Clin. Invest. 86(5): 1428-1433 (42) describe el aislamiento del polisacárido capsular de *Streptococcus* de tipo III del grupo B que, cuando se acoplan al toxoide tetánico, protegen a ratones contra la exposición letal con estreptococos de tipo III del grupo B vivos. El aislamiento del polisacárido capsular implicó varias etapas, incluyendo filtración en membrana, precipitación, centrifugación, tratamiento con RNasa, DNasa y Pronasa y fraccionamiento por tamaños. Véase, Wessels y col. (42), página 1429, columna de la izquierda, último párrafo completo.

Además, tal como se ha mencionado anteriormente, cuando se usan polisacáridos capsulares de estreptococos del grupo B en vacunas, pueden proporcionar una protección eficaz frente a infecciones de estas bacterias.

15 Por ejemplo, el documento WO 1994/06467 A1, titulado "Group B streptococcus type II and type V polysaccharide-protein conjugate vaccines" (Brigham & Women's Hospital; Nat Research Council Of Canada), concedido a Jennings y col., publicado el 31 de marzo de 1994, desvela moléculas antigénicas conjugadas en donde se une el polisacárido capsular de estreptococos de tipo II del grupo B a proteínas y se usa en vacunas y procedimientos para inmunizar a mamíferos frente a la infección por estreptococos de tipo II del grupo B (EGB II) y/o estreptococos de tipo V del grupo B (EGB V). También se desvelan vacunas multivalentes que comprenden las moléculas de conjugado, junto con antígenos para otras bacterias patógenas.

20 De manera similar, el documento US 4.413.057 A, titulado "Group B streptococcal capsular polysaccharides" (Merck & Co., Inc.) concedido a Carlo y col., publicado el 1 de noviembre de, 1983, describe polisacáridos específicos de tipo de *Streptococcus* de grupo B de los tipos I1, Ib, II e III, obtenidos a partir de cepas bacterianas cultivadas en un medio de soja y levadura modificado y su uso en la fabricación de vacunas para estreptococos.

25 Tal como se ha mencionado anteriormente, son deseables medios más eficientes, con mayor rendimiento y más sencillos para obtener polisacáridos capsulares purificados.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona una composición inmunogénica que comprende polisacáridos capsulares estreptocócicos de grupo B (PC) según se define en la reivindicación 1. Los PC pueden extraerse de los sobrenadantes bacterianos o de las células bacterianas mediante hidrólisis del enlace lábil a las bases que conecta al PC con otros componentes celulares. Una ventaja del procedimiento de extracción proporcionado en el presente documento es que los PC extraídos están en su mayoría intactos.

35 Un procedimiento para obtener polisacáridos capsulares purificados es mediante la desacetilación de un porcentaje de los grupos N-acetilo de los PC durante la extracción básica para facilitar la separación de los PC de otros componentes celulares. Se puede volver a introducir un porcentaje de los grupos acetilo para proporcionar PC purificados que tengan la misma estructura que las unidades de repetición con respecto a los grupos N-acetilo que un polisacárido nativo o, como alternativa, se puede usar acilación con grupos alquilo modificados para obtener PC modificados.

Los PC se extraen de estreptococos del grupo B (EGB) de los tipos Ia, Ib, II, III, V y VIII.

También se describen PC extraídos de *S. pneumoniae*, preferentemente, extraídos de *S. pneumoniae* de los tipos III, IV y XIV.

40 También se describen PC extraídos de bacterias *Neisseria* o *Escherichia*; preferentemente, extraídos de *Neisseria meningitidis* de tipos B, C, Y o W135 o de *Escherichia coli* K1.

45 La purificación de polisacáridos capsulares bien de sobrenadantes bacterianos o de células bacterianas tal como se describe en el presente documento tiene las siguientes ventajas frente a otros procedimientos: (a) simplicidad (un número mínimo de etapas); (b) eficiencia (rendimiento y pureza elevados); (c) seguridad (por ejemplo, reducción o eliminación del uso de disolventes orgánicos inflamables) y (d) aplicabilidad general para todas las bacterias Gram negativas y Gram positivas.

50 El procedimiento descrito en el presente documento comprende el tratamiento de un extracto concentrado y/o células bacterianas aisladas con una solución básica. Además de extraer los PC, la extracción básica también provoca la desacetilación de los grupos N-acetilo. Se puede variar el grado de la desacetilación ajustando las condiciones de reacción.

Entonces se separan los PC extraídos de los componentes celulares para obtener los PC preferentemente mediante

separación cromatográfica. Se puede volver a introducir alguno o la mayoría de los grupos acetilo para obtener los PC o los PC modificados. La purificación final de los PC se puede conseguir mediante una cromatografía de permeación en gel. Esto proporciona nuevos PC opcionalmente modificados como resultado de las condiciones de extracción básica que son adecuados para su uso como vacunas o vacunas de conjugados.

- 5 En el presente documento se proporciona un procedimiento para producir PC sustancialmente puros que sean capaces de provocar la producción en mamíferos de anticuerpos que sean bactericidas y que protejan a los animales frente a la infección.

También se describe en el presente documento el uso de estos PC en vacunas, bien solos o conjugados con un polipéptido, para proteger a seres humanos o a animales frente a la infección, comúnmente, por esa cepa de bacterias de las que se aislaron los PC. En ciertos casos, el polisacárido usado con esta invención puede inducir la producción de anticuerpos que reaccionen de forma cruzada con otras bacterias patógenas generando de este modo protección frente a la infección por estas otras bacterias.

15 En el presente documento se describe un procedimiento para aislar polisacáridos capsulares de componentes celulares tanto Gram negativos como Gram positivos contenidos bien en sobrenadantes de bacterias Gram negativas o Gram positivas o en células bacterianas Gram negativas o Gram positivas. Estos polisacáridos capsulares se pueden usar posteriormente como vacunas o unidos a polipéptidos para formar moléculas conjugadas que sean útiles como vacunas.

Breve descripción de las figuras

- Fig. 1: Espectro de RMN (500 MHz) del polisacárido capsular obtenido de estreptococos del grupo B de tipo Ia registrados en D₂O a 50°C.
- 20 Fig. 2: Espectro de RMN (500 MHz) del polisacárido capsular obtenido de estreptococos del grupo B de tipo Ib registrados en D₂O a 50°C.
- Fig. 3: Espectro de RMN (500 MHz) del polisacárido capsular obtenido de estreptococos del grupo B de tipo II registrados en D₂O a 50°C.
- Fig. 4: Espectro de RMN (500 MHz) del polisacárido capsular obtenido de estreptococos del grupo B de tipo III registrados en D₂O a 50°C.
- 25 Fig. 5: Espectro de RMN (500 MHz) del polisacárido capsular obtenido de estreptococos del grupo B de tipo V registrados en D₂O a 50°C.
- Fig. 6: Inhibición de antisuero de conejo contra PEGBIa sobre placas revestidas con PEGBIa-ASH.
- Fig. 7: Inhibición de antisuero de conejo contra PEGBIb sobre placas revestidas con PEGBIb-ASH.
- 30 Fig. 8: Inhibición de antisuero de conejo contra PEGBII sobre placas revestidas con PEGBII-ASH.
- Fig. 9: Inhibición de antisuero de conejo contra PEGBIII sobre placas revestidas con PEGBIII-ASH.
- Fig. 10: Inhibición de antisuero de conejo contra PEGBV-TT sobre placas revestidas con PEGBV-ASH.
- Fig. 11: Ensamblaje estructural de EGB que representa un peptidoglucano junto con un antígeno subcapsular del grupo (polirramnosa) y un polisacárido capsular (Michon y col., *Biochemistry* 1988,27: 5341-5351). X e Y representan restos de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico, respectivamente. Las flechas abiertas indican los sitios de escisión predichos mediante: lisozima (A), mutanolisina (B), lisostafina (C) o base mediante la hidrólisis de los enlaces de tipo fosfodiéster que unen el polisacárido capsular y la polirramnosa con el peptidoglucano.
- 35 Fig. 12: Ensamblaje estructural de EGB que representa un peptidoglucano junto con un antígeno subcapsular del grupo (polirramnosa) y un polisacárido capsular (Michon y col., *Biochemistry* 1988, 27: 5341-5351). X e Y representan restos de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico, respectivamente. Las flechas abiertas indican los sitios de escisión predichos mediante: lisozima (A), mutanolisina (B), lisostafina (C) o una base mediante la hidrólisis de los enlaces de tipo fosfodiéster que unen el polisacárido capsular con el peptidoglucano o mediante la hidrólisis de los enlaces de tipo fosfodiéster que unen la polirramnosa con el peptidoglucano.

Descripción detallada de la invención

- 45 Esta invención proporciona una composición inmunogénica que comprende polisacáridos capsulares estreptocócicos de grupo B de estreptococos de los tipos Ia, Ib, II, III, IV y V según la reivindicación 1. El procedimiento para obtener los CP usa una hidrólisis básica del enlace lábil a bases que une el PC con los componentes celulares. El procedimiento comprende extraer PC poniendo en contacto las bacterias o una solución que contenga fragmentos bacterianos con una base. Entonces, se pueden recuperar los PC de la base mediante una variedad de procedimientos.
- 50 Las bacterias Gram positivas para su uso según esta invención son estreptococos del grupo B de los tipos Ia, Ib, II, III, IV y V.

Se puede usar una amplia variedad de condiciones para hidrolizar el enlace lábil a bases bien en un disolvente acuoso u orgánico según la invención. Mediante las condiciones de reacción se puede controlar el grado hasta el que también se hidrolizan los enlaces N-acetilo de los hidratos de carbono. La hidrólisis de los grupos N-acetilo es ventajosa para separar los PC del resto de componentes celulares, porque cuanto mayor sea el grado hasta el que se escinden los enlaces N-acetilo, más hidrófilo se vuelve el PC en comparación con el resto de los componentes celulares. Esta diferencia de

polaridad se puede aprovechar para efectuar una separación cromatográfica eficiente. La separación de dos o más componentes de una mezcla basándose en las diferencias de polaridad es ampliamente conocida por los expertos en la técnica.

5 Por ejemplo, mediante el uso de una cromatografía de interacción hidrófoba, los compuestos de hidrofobicidad relativamente superior en comparación con aquellos compuestos que son más hidrófilos se retienen más tiempo en la columna. Por el contrario, mediante el uso de una cromatografía de interacción hidrófila, se retienen más tiempo en la columna los compuestos hidrófilos en comparación con aquellos compuestos que son más hidrófobos. El uso de ambos procedimientos, por consiguiente, permite la eliminación de impurezas que son tanto menos polares como más polares en comparación con el compuesto de interés.

10 Como alternativa, se pueden aprovechar los grupos amino o de ácido carboxílico libres presentes en los PC para facilitar una separación cromatográfica eficiente. La separación de dos o más componentes de una mezcla basándose en las diferencias de carga es ampliamente conocida por los expertos en la técnica. Mediante el uso de una cromatografía de intercambio catiónico, los compuestos que contienen grupos cargados positivamente, tales como aminas protonadas, se retienen más tiempo en la columna que aquellos compuestos que tienen poca o ninguna carga positiva, que pasan a través de la columna de manera relativamente rápida. Por el contrario, mediante el uso de cromatografía de intercambio aniónico, los compuestos cargados negativamente, tales como los ácidos carboxílicos, se retienen en la columna, mientras que aquellos compuestos que tienen poca o ninguna carga negativa pasan a través de la columna de manera relativamente rápida.

20 Tras separar los PC desacetilados del resto de los componentes celulares, se pueden volver a acetilar los grupos amino libres. La variación del reactivo de acetilación y de las condiciones de reacción permite al profesional controlar el grado hasta el que se vuelven a acetilar los grupos amino. Las impurezas introducidas en la etapa de acilación son de un tamaño pequeño en comparación con los PC que se han vuelto a acilar y por tanto, se pueden separar de los PC mediante cromatografía de permeación en gel.

25 La cromatografía de permeación en gel permite, por ejemplo, una separación eficiente de los PC relativamente grandes. Como alternativa, se puede aprovechar la diferencia de polaridad o de carga para purificar los PC de las impurezas restantes.

A. Preparación de polisacáridos capsulares

El aislamiento y la purificación de polisacáridos bacterianos de componentes celulares se puede realizar en cuatro etapas: extracción básica, separación cromatográfica, *N*-acilación y purificación cromatográfica.

30 1. Materiales de partida

Los materiales para extraer los PC se pueden obtener de sobrenadantes bacterianos concentrados de células bacterianas homogeneizadas o de medio acondicionado. Las células se pueden separar mediante centrifugación o microfiltración y el sobrenadante se puede concentrar, comúnmente, 10–15 veces. Preferentemente, los sobrenadantes bacterianos y el medio acondicionado se concentran de modo que los PC estén presentes a una concentración de aproximadamente 5–20 mg/ml. Además, las células sedimentadas se pueden extraer directamente.

2. Extracción básica

40 Para extraer los PC, se pueden poner en contacto el sobrenadante bacteriano concentrado o el medio acondicionado con una variedad de bases. Como alternativa, para extraer los PC, las células bacterianas aisladas también se pueden poner en contacto con una variedad de bases. Los ejemplos no limitantes de bases que se pueden usar según esta invención son NaOH, KOH, LiOH, NaHCO₃, Na₂CO₃, K₂CO₃, KCN, Et₃N, NH₃, H₂N₂H₂, NaH, NaOMe, NaOEt o KO^tBu. Las bases tales como NaOH, KOH, LiOH, NaH, NaOMe o KO^tBu se usan más eficazmente en un intervalo de 0,5 N–5,0 N. Las bases tales como NaHCO₃, Na₂CO₃, K₂CO₃ y KCN se pueden usar a concentraciones tan elevadas como sus solubilidades lo permitan. Las bases orgánicas, tales como Et₃N, se pueden usar a concentraciones medias a elevadas (50–100%), siempre y cuando haya un agente, tal como agua o alcohol, para efectuar la hidrólisis. Las bases tales como NH₃ o H₂N₂H₂ se pueden usar casi a cualquier concentración incluyendo la del 100%. Se pueden usar disolventes tales como agua, alcoholes (preferentemente, C₁–C₄), dimetilsulfóxido, dimetilformamida o mezclas de estos y otros disolventes orgánicos. Las más preferidas son las soluciones de extracción básica que comprenden agua.

50 El intervalo de pH más eficaz para extraer los PC de los componentes celulares es de aproximadamente 9 a 14, siendo el pH óptimo de aproximadamente 12. Aunque la extracción se puede realizar a temperaturas de aproximadamente 4°C, se espera que el aumento de la temperatura hasta preferentemente entre aproximadamente 40 y 100°C y/o la agitación de la mezcla de reacción den como resultado mayores rendimientos. Es preferible usar aproximadamente 1–20 g de pasta celular para aproximadamente 1 litro de reactivo básico. Como alternativa, los sobrenadantes concentrados se diluyen con NaOH 10 N hasta una concentración final de NaOH 2 N en la mezcla de reacción.

3. Separación cromatográfica

Los PC extraídos presentes en el reactivo de extracción básica se pueden separar de las impurezas resultantes de los componentes celulares mediante cromatografía. Los ejemplos no limitantes de los procedimientos de separación cromatográfica son la cromatografía de intercambio iónico (catiónico o aniónico), de interacción hidrófila, de interacción hidrófoba o de permeación en gel. El procedimiento usado en la invención es la cromatografía de interacción hidrófoba (CIH). Más preferida es la cromatografía de interacción hidrófoba sobre fenil-sefarosa, que eliminará la mayoría de los contaminantes de alto peso molecular y activos bajo radiación UV del extracto básico. El polisacárido capsular se eluirá al inicio de la elución de pH alto (pH 10 a pH 8) y de salinidad elevada (2N a 1N), mientras que se retendrán la proteína y los ácidos nucleicos más hidrófobos. Los ejemplos no limitantes del procedimiento cromatográfico de interacción hidrófoba son las resinas de alquil-agarosa o sefarosa, siendo una resina preferida la fenil sefarosa HP (Pharmacia Biothech; Piscataway, NJ). Se puede pre-equilibrar la columna con NaHCO_3 0,5–5,0N y eluirla con un volumen de columna a un caudal de 0,5–50 ml/min. Tras eluir con aproximadamente un volumen de columna de NaHCO_3 , se pueden usar aproximadamente de uno a diez volúmenes de columna de agua para eluir la columna. Entonces, se puede analizar el polisacárido de las fracciones mediante procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Un procedimiento preferido para la detección de polisacárido que contiene ácido siálico es un análisis del orcinol a microescala descrito en los ejemplos.

4. N-acetilación

La separación del polisacárido capsular extraído en condiciones básicas se ayuda de la eliminación durante la extracción de los grupos N-acetilo del ácido siálico y los restos de amino-azúcar de los polisacáridos capsulares estables por el contrario en condiciones básicas.

Opcionalmente, las fracciones mezcladas de la CIH que contienen los polisacáridos capsulares se pueden volver a acetilar hasta el grado deseado usando una variedad de agentes de acetilación. Los ejemplos no limitantes de los agentes de acetilación son anhídrido acético, cloruro de acetilo, acetato de pentafluorofenilo, acetato de 4-nitrofenilo. Véase: Theodora W. Greene y Peter G. M. Wuts, "Protective Groups in Organic Syntheses", 2ª Ed. (1991). El procedimiento preferido consiste en mezclar con anhídrido acético a concentraciones de aproximadamente 0,5M a aproximadamente 2M, siendo las concentraciones preferidas de aproximadamente 0,7M a aproximadamente 1M, para volver a acetilar los grupos amino libres del polisacárido capsular, regenerando así la estructura del polisacárido nativo.

5. Purificación cromatográfica

Entonces se puede realizar la purificación de los PC re-acetilados para producir PC para su uso en la preparación de reactivos inmunológicos tales como antígenos y vacunas. Hay diversos ejemplos de purificación cromatográfica adecuados para su uso con esta invención. Para efectuar la separación de los PC re-acetilados de los componentes de la reacción, se puede usar, por ejemplo, la cromatografía de intercambio iónico (catiónico o aniónico), de interacción hidrófoba, de interacción hidrófila o de permeación en gel. El procedimiento preferido es el uso de la cromatografía de permeación en gel sobre Superdex® (agarosa y dextrano entrecruzados) que eliminará los contaminantes residuales y proporcionará PC purificados. Se prefiere particularmente el Superdex 200 PG, que tiene un intervalo de fraccionamiento (PM) para los dextranos de 1.000–100.000. Los caudales son preferentemente de aproximadamente 0,1 a 10 ml/min usando PBS como eluyente.

Los polisacáridos capsulares producidos mediante los procedimientos de extracción básica de esta invención son nuevos (véanse las Fig. 11 y 12) y mantienen epítomos en sus estructuras nativas (Fig. 5–10). Por consiguiente, los PC preparados según la invención producen anticuerpos que reaccionan de manera cruzada con los PC nativos y las bacterias que los expresan. La obtención de PC mediante los procedimientos según esta invención es superior a los procedimientos de la técnica anterior, debido a (a) la facilidad relativa con la que se llevan a cabo los procedimientos de esta invención; (b) los mayores rendimientos de aislamiento y (c) los mayores rendimientos de conjugación. Además, el ADN y el ARN bacteriano se degradan en la etapa de extracción básica y, por tanto, no están presentes en cantidades apreciables en el producto final generado según esta invención.

B. Estructura de los PC extraídos

Los polisacáridos capsulares extraídos mediante el procedimiento de esta invención tienen una estructura única en comparación con los PC extraídos mediante procedimientos anteriores. Los PC se obtienen mediante la hidrólisis catalizada por una base de los enlaces de tipo fosfodiéster que unen los polisacáridos capsulares con la polirramnosa y mediante la hidrólisis catalizada por una base de los enlaces de tipo fosfodiéster que unen la polirramnosa con el peptidoglucano (véase la Figura 11). Según un modelo alternativo para la estructura de la pared celular bacteriana, los mismos PC estructuralmente únicos se obtienen mediante la hidrólisis catalizada por una base de los enlaces de tipo fosfodiéster que unen los polisacáridos capsulares con el peptidoglucano y mediante la hidrólisis catalizada por una base de los enlaces de tipo fosfodiéster que unen la polirramnosa con el peptidoglucano (véase la Figura 12). Los procedimientos de la técnica anterior usan enzimas para escindir diferentes enlaces. Por ejemplo, se ha usado lisozima

para hidrolizar el polímero de *N*-acetilglucosamina/ácido *N*-acetilmurámico. Se ha usado mutanolisina para hidrolizar el enlace entre el polímero de *N*-acetilglucosamina/ácido *N*-acetilmurámico y la parte peptídica, y la lisostafina se ha usado para hidrolizar la parte peptídica de la pared celular bacteriana.

- 5 Las distribuciones de las masas molares absolutas de los polisacáridos capsulares de esta invención son limitadas según lo indicado por los bajos valores de polidispersidad (M_w/M_n) (véase la tabla 2). Esta uniformidad es valiosa para generar productos vacunales consistentes y eficaces.

C. Vacunas

- 10 También se describen preparaciones de vacunas. Se pueden usar los PC aislados que se describen anteriormente como un antígeno para generar anticuerpos que sean reactivos frente a los PC y por lo tanto, reactivos frente al organismo del que se aislaron los PC.

Las vacunas pueden proporcionar una inmunidad activa o pasiva.

Las vacunas para proporcionar una inmunidad activa comprenden un PC purificado tal como se describe en el presente documento. Preferentemente, esta vacuna comprende PC conjugados con al menos un péptido antigénico.

6. Anticuerpos

- 15 Las técnicas para la extracción y el aislamiento de PC descritas anteriormente propician la producción de abundantes cantidades de PC descrito en el presente documento. Esto facilita la generación de anticuerpos reactivos frente a los PC.

- 20 Los anticuerpos dirigidos contra los PC se pueden generar mediante cualquiera de las técnicas que son conocidas en la materia. Según un enfoque, los anticuerpos se pueden generar mediante la administración de una preparación de PC aislados o derivados o fragmentos de los mismos, a un animal hospedador. El animal hospedador puede ser, sin limitación, una rata, ratón, conejo, primate no humano o un ser humano. Preferentemente, el hospedador es un ser humano. Las respuestas inmunológicas se pueden aumentar mediante el uso de adyuvantes que son conocidos en la técnica.

- 25 También se pueden preparar anticuerpos monoclonales dirigidos contra los PC mediante cualquiera de las técnicas que son conocidas en la materia. Según un procedimiento, se usan cultivos de líneas celulares de hibridoma (Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256: 495-497). Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra los PC pueden ser anticuerpos monoclonales humanos, anticuerpos monoclonales quiméricos o anticuerpos monoclonales humanizados creados mediante cualquiera de las técnicas que son conocidas en la materia. Según un enfoque, se pueden generar anticuerpos monoclonales quiméricos que tengan un dominio de unión a antígeno no humano (por ejemplo, de ratón) combinado con una región constante humana (Takeda y col. (1985) *Nature* 314:452). Los anticuerpos humanizados se pueden generar según los procedimientos de Queen y col., Patente de los Estados Unidos n.º: 5.585.089.

- 30 Los anticuerpos dirigidos contra los PC se pueden purificar mediante cualquiera de las técnicas que son conocidas en la materia, incluyendo, pero sin limitación, cromatografía de inmunoabsorción o inmunoafinidad u otros procedimientos cromatográficos (por ejemplo, HPLC). También se pueden purificar anticuerpos como fracciones de inmunoglobulina de suero, plasma o medio de cultivo celular.

- 35 Las moléculas de anticuerpo pueden ser moléculas de inmunoglobulina intactas, moléculas de inmunoglobulina sustancialmente intactas o aquellas partes de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, fragmentos Fab, que contienen el sitio de unión a antígeno.

- 40 Los fragmentos de anticuerpos dirigidos contra los PC se pueden generar mediante cualquiera de las técnicas que son ampliamente conocidas en la materia. (Campbell (1985) "Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology", Vol. 13, Burdon, y col. (eds.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam).

7. Moléculas conjugadas

- 45 Los PC se pueden usar para provocar respuestas de anticuerpos hacia estreptococos del grupo B en un individuo, bien solos o cuando están conjugados con otra molécula inmunogénica, tal como un polipéptido o una proteína. La conjugación del PC con el polipéptido convierte la respuesta inmune hacia el PC, que comúnmente es independiente de las células T, en una que es dependiente de las células T. Por consiguiente, es preferible que el tamaño del polipéptido sea el suficiente como para provocar la conversión de la respuesta de independiente de las células T a dependiente de las células T. Puede ser útil usar polipéptidos de menor tamaño con el fin de proporcionar un segundo inmunógeno.

- 50 Se puede emplear cualquier modo de conjugación para conjugar el componente de PC con el péptido. El procedimiento preferido es aquél descrito en la Patente de los Estados Unidos n.º: 4.356.170, que describe la introducción de grupos aldehído terminales en el polisacárido mediante la escisión oxidativa de los dioles vecinales y el acoplamiento de los

grupos aldehído con los grupos amino peptídicos mediante aminación reductora.

Se entenderá, sin embargo, que las vacunas de conjugados de la invención no se limitan a aquéllas producidas mediante la aminación reductora. Por lo tanto, las vacunas también se pueden producir mediante la conjugación del PC con un péptido usando cualquier procedimiento de unión conocido por los expertos en la técnica, tal como un espaciador de dihidrazida del ácido adípico, según lo descrito por Schneerson, R. y col. (1980) *J. Exp. Med.* 1952:361–476, y en la Patente de los Estados Unidos n.º 4.644.059 o, por ejemplo, la tecnología espaciadora binaria según lo descrito por Marburg, S. y col. (1986) *J. Am. Chem. Soc.* 108: 5282–5287.

Pueden producirse moléculas conjugadas en las que el péptido está ligado al PC a través de uno o más sitios sobre el PC. Por consiguiente, las moléculas conjugadas preparadas tal como se describe en el presente documento, con respecto al componente proteico, pueden ser monómeros, dímeros, trímeros y moléculas muy entrecruzadas en las que el PC entrecruza sobre sí múltiples proteínas.

Los anticuerpos dirigidos contra los PC se pueden usar como una preparación farmacéutica en una aplicación terapéutica o profiláctica para conferir inmunidad pasiva de un individuo hospedador a otro (es decir, para aumentar una respuesta inmune de un individuo contra bacterias Gram negativas o Gram positivas, o para proporcionar una respuesta en individuos inmuno-comprometidos o con el sistema inmune reducido, incluyendo personas que padecen SIDA). La transferencia pasiva de anticuerpos es conocida en la técnica y se puede realizar mediante cualquiera de los procedimientos conocidos. Según un procedimiento, se generan anticuerpos dirigidos contra los PC o los conjugados de los mismos de esta invención en un animal hospedador ("donante") inmunocompetente, se recogen del animal hospedador y se transfunden a un individuo receptor. Por ejemplo, se puede usar un donante humano para generar anticuerpos reactivos contra el PC o el conjugado de PC. Entonces se pueden administrar los anticuerpos en cantidades terapéutica o profilácticamente eficaces a un receptor humano que necesite tratamiento, confiriendo así resistencia en el receptor contra bacterias que están unidas por anticuerpos generados por el componente de polisacárido. (Véase Grossman, M. y Cohen, S. N., en "Basic and Clinical Immunology", VII Ed., (Stites, D. P. y Terr, A. T. eds., Appleton & Lange 1991) Capítulo 58 "Immunization").

Composiciones farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender los PC o las moléculas conjugadas que comprenden los PC y vehículos farmacológicamente aceptables, tales como solución salina, dextrosa, glicerol, etanol o similares. La composición farmacéutica comprende otro resto inmunogénico, tal como un péptido o composiciones que comprenden anticuerpos generados por uno de los PC descritos en el presente documento. La composición también puede comprender adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica del receptor. Dichos adyuvantes pueden estar basados en aluminio, tales como alumbre o adyuvantes de alquilo de cadena larga, tales como estearil-tirosina (véase el documento de los Estados Unidos con n.º de serie 583.372, presentado el 17/9/90; la patente europea EP 0 549 617 B1; Moloney y col., Patente de los Estados Unidos n.º: 4.258.029). Véanse también Jennings y col., Patente de los Estados Unidos n.º 5.683.699 y Paoletti, y col. *J. Infectious Diseases* 1997; 175: 1237–9. Estas composiciones farmacéuticas son particularmente útiles como vacunas.

Para provocar una inmunidad pasiva, la composición farmacéutica puede estar compuesta por anticuerpos policlonales o anticuerpos monoclonales o derivados o fragmentos de los mismos, según lo descrito anteriormente. La cantidad de anticuerpo, fragmento o derivado será una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz según lo determinado mediante técnicas clínicas estándar.

Las preparaciones farmacéuticas se pueden introducir en un individuo mediante procedimientos conocidos en la técnica por su eficacia. Entre las vías de introducción, pero sin limitación, se encuentran la vía intradérmica, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intramuscular, oral e intranasal.

Las composiciones pueden comprender vehículos, tampones o conservantes estándar conocidos por los expertos en la técnica que sean adecuados para vacunas, incluyendo, pero sin limitación, cualquier vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado, tal como solución salina fisiológica u otros líquidos inyectables. También pueden estar presentes los aditivos habituales en las vacunas, por ejemplo, estabilizadores tales como lactosa o sorbitol y adyuvantes para aumentar la respuesta inmunogénica, tales como fosfato, hidróxido o sulfato de aluminio y estearil-tirosina. Las vacunas descritas en el presente documento también se pueden usar como componentes de vacunas multivalentes que generen una respuesta inmune frente a una pluralidad de agentes infecciosos.

Las vacunas descritas en el presente documento se administran en cantidades suficientes para generar la producción de anticuerpos como parte de una respuesta inmunogénica. Las dosis se pueden ajustar basándose en el tamaño, el peso o la edad del individuo que recibe la vacuna. Se puede controlar la respuesta de anticuerpos en un individuo analizando el título o la actividad bactericida de los anticuerpos y, si fuera necesario, se puede aplicar una dosis de refuerzo para aumentar la respuesta. Comúnmente, una sola dosis para un niño es de aproximadamente 10 µg de vacuna de conjugado por dosis o de aproximadamente 0,5 µg–20 µg/kilogramo. Los adultos reciben una dosis de aproximadamente

0,5 µg–20 µg/kilogramo de vacuna de conjugado. Para la vacuna de PC, una dosis común es de aproximadamente 25 µg de cada PC individual por dosis. Es decir, una vacuna frente a estreptococos del grupo B podría comprender 25 µg de cada uno de los PC de cada uno de los nueve serotipos.

D. Kits de diagnóstico

5 Los PC descritos en el presente documento o los derivados o fragmentos de los mismos, se pueden usar para producir kits de diagnóstico más seguros que no incorporen toxinas, tales como la toxina de la neumolisis, pero que sigan indicando la presencia de anticuerpos dirigidos contra bacterias Gram positivas. La presencia de dichos anticuerpos puede indicar una exposición previa al patógeno y predecir aquéllos individuos que pueden ser resistentes a la infección. El kit de diagnóstico puede comprender al menos uno de los PC o de los derivados o fragmentos de los mismos y los reactivos adecuados para la detección de una reacción de los anticuerpos cuando los PC modificados o sus derivados o fragmentos se mezclan con una muestra que contiene anticuerpo dirigido contra bacterias Gram positivas. Las reacciones de los anticuerpos se pueden identificar mediante cualquiera de los procedimientos descritos en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, un ensayo ELISA. Dicho conocimiento es importante y puede evitar una vacunación innecesaria.

10 Como alternativa, el kit de diagnóstico puede comprender además un soporte sólido o una perla magnética o una matriz plástica y al menos uno de los PC descritos en el presente documento o derivados o fragmentos de los mismos.

15 En algunos casos, puede ser preferible que los PC o los derivados o los fragmentos estén marcados. Los agentes de marcaje son ampliamente conocidos en la técnica. Los agentes de marcaje incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, identificadores de radiactividad, quimioluminiscencia, bioluminiscencia, luminiscencia u otras “etiquetas” de identificación para un análisis conveniente. Se pueden recoger y purificar muestras de fluidos corporales o de tejidos (por ejemplo, sangre, suero, saliva) y aplicarlos al kit de diagnóstico. Los PC, sus derivados o fragmentos pueden estar purificados o no purificados, y pueden estar compuestos de una mezcla de moléculas.

20 Las matrices sólidas se conocen y encuentran disponibles en la técnica e incluyen, pero sin limitación, poliestireno, polietileno, polipropileno, policarbonato o cualquier material plástico sólido en forma de tubos de ensayo, perlas, micropartículas, varillas medidoras, placas o similares. Además, las matrices incluyen, pero sin limitación, membranas, placas de microvaloración de 96 pocillos, tubos de ensayo y tubos Eppendorf. En general, dichas matrices comprenden cualquier superficie a la que se pueda unir un agente de unión a ligandos o una superficie que por sí misma proporcione un sitio de acoplamiento a ligandos.

25 Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar la presente invención, pero no deben ser considerados, bajo ningún concepto, como restrictivos del alcance de la misma. Los expertos en la técnica reconocerán que es posible realizar numerosos cambios y sustituciones sin alejarse del espíritu ni del ámbito de la invención.

Ejemplos

A. Cepas bacterianas, medios de crecimiento y condiciones de cultivo

30 La cepa de estreptococos del grupo B de tipo Ib H36b (ATCC 12401) fue obtenida de la Colección Americana de Cultivos Tipo (Rockville, MD). El resto de las cepas usadas, 090 (tipo Ia), 18RS21 (tipo II), M781 (tipo III) y 1169–NT I (tipo V), fueron proporcionadas amablemente por D. L. Kasper, Harvard Medical School. Las *Neisseria meningitidis* de tipo a, C, Y y W135 fueron proporcionadas amablemente por Carl Frasch de CBER, FDA, y la *Escherichia coli* K1 fue proporcionada amablemente por Willie Vann de CBER, FDA.

35 Cada una de las cepas de estreptococos del grupo B fue cultivada individualmente en líquido de diálisis (membrana con un límite de peso molecular nominal (NMWL) de 10.000), un sistema de casetes Pellicon (Millipore Corp., Bedford, MA) de caldo Columbia al 3,5% (Difco Laboratories, Inc., Detroit, MI) complementado con glucosa al 6%. Se usaron 150 ml de cultivo de siembra desarrollado durante 8 h en un matraz de agitación Erlenmeyer a 37°C para inocular un fermentador de 20 litros Bioflo IV (New Brunswick Scientific Co., Edison, NJ) llenado con 14 litros de caldo (véase lo anterior). Se mantuvo el cultivo de fermentación a 37°C, ajustado de manera continua hasta un pH 7,1 con la adición de NaOH 10N y aireado a 1,5 l/min. Se cosecharon las células tras 17 h mediante microfiltración a través de un cartucho de fibra hueca de porosidad de 0,2 µm MiniKros (Microgon, Inc., Laguna Hills, CA). El sobrenadante del cultivo se mantuvo en condiciones estériles a 4°C hasta que se continuó con su procesamiento. Los sedimentos celulares finales se obtuvieron por centrifugación de células separadas a 9.000 rpm en un rotor GSA de Sorvall (DuPont Clinical & Instruments Div., Wilmington, DE) durante 50 min.

B. Procedimiento general para producir polisacáridos capsulares

1. Extracción y cromatografía de interacción hidrófoba

Se suspendieron los sedimentos en cuatro volúmenes de NaOH 1N usando el peso húmedo en gramos de la pasta celular como un volumen. Se incubó la suspensión a 37°C durante una noche. Se retiraron los restos celulares mediante centrifugación durante 30 min a 12.000 rpm en un rotor GSA de Sorvall. Tras la neutralización con HCl concentrado (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ), se diafiltró el sobrenadante frente a NaHCO₃ 2N (pH 9,6) usando una membrana con un NMWL de 10.000 de Pellicon. Entonces se cargó el concentrado resultante sobre una columna 26/60 XK de Pharmacia empacitada con fenil-sefariosa HP (Pharmacia Biotech; Piscataway, NJ), se pre-equilibró con NaHCO₃ 2N, usando el sistema de cromatografía preparativa de Pharmacia descrito más adelante. Primero se eluyó la columna a 4 ml/min con un volumen de columna de NaHCO₃ 2N seguido por dos volúmenes de columna de agua. Se analizaron las fracciones en cuanto al polisacárido (*infra*) y se mezclaron las que contenían polisacárido capsular.

También se purificaron polisacáridos capsulares de los sobrenadantes del cultivo. Tras la eliminación de las células, se concentró el caldo de 10–15 veces (Pellicon, usando membrana con un NMWL de 10.000) y se diafiltró frente a 10 volúmenes de agua. Al concentrado resultante, se añadió NaOH 10N hasta una concentración final de 1M. Se incubó esta solución a 37°C durante una noche y se neutralizó con HCl concentrado. El procesamiento continuó según lo descrito anteriormente para la extracción celular.

Para un lote de polisacárido capsular de tipo III, se extrajeron conjuntamente las células y el sobrenadante del cultivo como se explica a continuación. Se concentró y se diafiltró el sobrenadante del cultivo, separado de las células, y se trató el concentrado con una base según lo descrito anteriormente. Se suspendió el sedimento celular en cuatro volúmenes del concentrado tratado con la base, y se siguió procesando según lo descrito anteriormente para la extracción celular (véase lo anterior).

2. Re-N-acetilación

Debido a que la exposición del polisacárido a las condiciones de extracción descritas anteriormente libera los grupos N-acetilo de los polisacáridos, se volvieron a N-acetilar los polisacáridos mediante la adición en gotas de anhídrido acético (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI) a las fracciones mezcladas a una concentración final de 0,8M. Se agitó esta mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 1 h y se mantuvo a un pH 9 con la adición de NaOH 10N. Entonces se aumentó el pH de la reacción hasta 13, y se continuó con la reacción durante 30 min más. Se diafiltró la solución que contenía polisacárido capsular re-N-acetilado frente a agua usando un sistema de casetes Minitan (membrana NMWL 10.000, Millipore) y se liofilizó el concentrado. Se volvió a disolver el concentrado liofilizado en PBS (pH 7,4) y se purificó mediante cromatografía de permeación en gel sobre Superdex 200 PG (*infra*). Las fracciones que contenían polisacárido se mezclaron, se diafiltraron frente a agua (*supra*) y se liofilizó el concentrado para producir PC purificado.

3. Cromatografía de permeación en gel

La cromatografía analítica de permeación en gel (GPC) se realizó sobre un sistema de FPLC de Pharmacia dotado de un detector ultravioleta UV-1 de Pharmacia (con un filtro de 280 nm), un refractómetro diferencial R401 de Waters Corp. (Milford, MA) y una columna 10/30 6 HR de Superosa de Pharmacia (agarosa en perlas muy entrecruzada). Se eluyó la columna a 0,5 ml/min con PBS, pH 7,4. Se usó dextrano (aprox. 2×10^6 de peso molecular; Sigma Chem Co., St. Louis, MO) para determinar el volumen hueco (V_0) y se usó azida de sodio para determinar el volumen total del lecho (V_t). Los volúmenes de elución relativos se expresan como $K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$, en la que V_e es el volumen de elución del perfil de RI. La GPC preparativa se realizó sobre un sistema de Pharmacia que comprendía los detectores anteriormente mencionados, una bomba P-50, un colector de fracciones FRAC-100, un controlador GP-250 Plus y una columna 26/100 XK empacitada con Superdex 200 PG (Pharmacia). La columna se eluyó con PBS a 1 ml/min.

C. Análisis de los polisacáridos

1. Determinación de la masa molar

Las distribuciones de las masas molares absolutas de los polisacáridos se determinaron mediante GPC analítica con la detección mediante fotometría de difusión de luz láser multiangular en línea y refractometría diferencial (GPC-MALLS/RI). Este procedimiento se realizó en un sistema de cromatografía en fase líquida que constaba de una bomba de HPLC PU-980 de Jasco (Easton, MD), una válvula de inyección modelo 7125 de Rheodyne (Cotati, CA) y una columna 10/30 6 HR de Superosa equilibrada con PBS y con un caudal de 0,5 ml/min. La fase móvil se preparó en agua de pureza ultra alta (Stephens Scientific, Riverdale, NJ) y se filtró a través de un filtro en línea de diámetro de 25 mm (Millipore) dotado de una membrana de 0,22 mm de tipo GV de Millipore. Se disolvieron las muestras de polisacáridos (1–2 mg) a una concentración de 10 mg/ml en la fase móvil y se centrifugaron las soluciones resultantes durante 2 a 3 min a 14.000 rpm en un microcentrifugador para eliminar la materia en partículas antes de la inyección. Los efluentes de la columna se analizaron directamente con un fotómetro de difusión de luz láser de triple ángulo fijo miniDAWN en línea (Wyatt

Technology Corp., Santa Bárbara, CA) acoplado a un refractómetro diferencial modelo 1047A de Hewlett–Packard. La salida de la señal analógica del refractómetro se conectó al miniDAWN a través de un canal de entrada auxiliar. Se recogieron los datos de difusión de la luz y se procesaron con los programas informáticos ASTRette y EASI de Wyatt. Se calculó la superficie máxima con los programas informáticos de Wyatt como la suma total de las superficies de 200–300 divisiones trapezoides o “rodajas” en el intervalo completo de un máximo. A partir de la superficie así obtenida, se calcularon las masas molares medias en peso y las masas molares medias en número (M_p y M_n , respectivamente) de un polisacárido obtenido mediante la elución de un máximo dado. El incremento del índice de refracción específico (dn/dc) para todos los polisacáridos fue determinado en 0,140 ml/g usando el refractómetro HP 1047A en línea. Este valor era comparable a los valores obtenidos previamente para otros polisacáridos (7, 8, 38).

10 2. Espectroscopia de RMN

Se registraron espectros de ^1H -RMN unidimensionales de las muestras de polisacáridos (4–5 mg/ml) en D_2O (Aldrich) a 500 MHz en un espectrómetro AMX 500 de Bruker Instruments (Billerica, MA). Los datos espectrales se obtuvieron a 50°C y los desplazamientos químicos se relacionaron con 2,2,3,3-tetradeuterio-3-(trimetilsilil)propionato externo (Aldrich) en D_2O .

15 3. Análisis químicos

Se determinó el contenido de polisacáridos en los efluentes de la columna preparativa y en los polisacáridos purificados mediante una modificación del análisis con orcinol a microescala de Reuter y Schauer (35) para el ácido siálico. En síntesis, se añadieron 100 μl de muestra o de control que contenían 1–1,5 μg de patrón de NeuAc o hasta 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de polisacárido capsular purificado a 100 μl de reactivo de orcinol (35) en un tubo de microcentrifugación de 1,5 ml. Se mezclaron las muestras bien y se calentaron en un baño de agua hirviendo durante 15 min. Una vez enfriadas las muestras en agua con hielo durante 5 min, se añadieron 500 μl de alcohol isoamílico (Fluka Chemical Co., Ronkonkoma, NY) a cada muestra. Se mezcló bien la muestra y se centrifugó en un microcentrifugador a 3.000 rpm durante 2–3 min. Se repitió este procedimiento para garantizar la extracción completa del cromóforo en el alcohol. Se transfirió una porción de 200 μl de la fase alcohólica de cada muestra a una placa de microvaloración de poliestireno de unión baja y fondo plano de 96 pocillos (Coming Costar Corp., Cambridge, MA), y se leyó a 560 nm en un lector de microplacas Emax de Molecular Devices (Menlo Park, CA). A partir del contenido de ácido siálico, se obtuvo la pureza de las preparaciones de los polisacáridos finales, usando los siguientes pesos fórmula: 314,3 g/mol para el residuo de NeuAc terminal; 1.004 g/mol para la unidad de repetición de los PC de tipo Ia, Ib o III; 1.328 g/mol para la unidad de repetición de los PC de tipo II o V.

30 Se determinó el contenido proteico de las muestras que contenían 1–2 mg de polisacárido capsular por ml en PBS mediante el procedimiento de Bradford (9) usando reactivo Coomassie Plus de Pierce (Rockford, IL) e IgG de caballo como patrón. Se determinó el contenido de ácido nucleico mediante una fotometría UV directa a 260 nm. Las mediciones fotométricas para estos análisis se realizaron con un espectrofotómetro de modelo UV160U de Shimadzu (Shimadzu Scientific Inst., Columbia, MD).

35 D. Rendimientos

En la Tabla 1, se muestran los rendimientos del polisacárido capsular obtenido a partir de los diversos serotipos de estreptococos del grupo B. Para todos los serotipos, el polisacárido purificado de los sedimentos celulares superó al de los sobrenadantes del cultivo, variando de un rendimiento 4 veces mayor para el tipo II a un rendimiento 60 veces mayor para el tipo Ib. A modo de comparación, en la Tabla 1, se proporcionan los rendimientos a partir del sobrenadante, así como a partir de las células, como los miligramos de polisacárido por litro de cultivo (mg/l). De este modo, si se consideran fermentaciones de 14 litros, los rendimientos totales a partir de las células variaron de 1,1 g para el tipo Ia a 0,6 g para el tipo II, mientras que los rendimientos totales a partir de los sobrenadantes variaron de 150 mg para el tipo II a 14 mg para el tipo Ib. Cuando se procesaron conjuntamente las células y el sobrenadante de una fermentación de tipo III, el rendimiento, 63 mg/l o 0,9 g totales, fue similar al obtenido únicamente a partir de los sedimentos celulares. La variación entre las cepas de estreptococos del grupo B estudiadas en las proporciones de las producciones aisladas de los polisacáridos capsulares a partir de las células con respecto a las de las obtenidas a partir de los sobrenadantes sugiere las diferentes tendencias entre los serotipos para liberar polisacáridos capsulares en las presentes condiciones de crecimiento. Las cantidades de los polisacáridos capsulares asociados a las células purificados mediante este procedimiento se aproximan a las cantidades encontradas a partir de las fermentaciones por lotes de las cepas de estreptococos del grupo B de los tipos Ia, III, IV, V y VI, deducibles a partir de los niveles de ácido siálico unido a las células (usado como marcador de polisacáridos capsulares) según lo publicado por von Hunoistein y col. (39). Cabría esperar que condiciones de extracción más rigurosas (por ejemplo, una base más fuerte, una temperatura mayor o la agitación de la mezcla de extracción) mejoren los rendimientos de los polisacáridos capsulares unidos a las células.

TABLA 1

Rendimientos de polisacárido capsular de estreptococo del grupo B		
Serotipo	Rendimiento a partir de sobrenadante (mg/l) ^A	Producción a partir de los sedimentos celulares (mg/l) ^A
la	4	79
lb	1	64
II	11	42
III ^B	4	65
V	5	65

^A Los rendimientos se expresan en mg de polisacárido capsular purificado final por litro de cultivo de crecimiento.
^B Cuando se procesaron conjuntamente el caldo y las células, los estreptococos del grupo B de tipo III produjeron 63 mg/l.

RESULTADOS

A. Análisis de los polisacáridos purificados

5 Para cada uno de los serotipos de estreptococos del grupo B estudiado, la espectrometría de ¹H-RMN unidimensional de las preparaciones de polisacáridos de ambos orígenes confirmó su identidad con los datos espectrales publicados previamente para los respectivos polisacáridos de cada tipo (41,44). Además, los espectros de RMN para todas estas preparaciones indicaron niveles muy bajos de contaminación. En las Figuras 1–5, se muestran los espectros de RMN representativos de los cinco polisacáridos de estreptococos del grupo B. Los niveles de ácidos nucleicos, detectados mediante fotometría UV directa a 260 nm, no superaron el 1% en masa, mientras que la proteína, analizada mediante el procedimiento de Bradford (9), no fue detectable en ninguna de las preparaciones de polisacáridos por encima del límite inferior de detección de este análisis (1 µg/ml). Las purezas de todos los polisacáridos, calculadas a partir de su contenido de ácido siálico, estimado mediante un análisis con orcinol a microescala modificado (35), fueron del aproximadamente 100%. Por consiguiente, para todas las preparaciones de polisacáridos obtenidas mediante el procedimiento descrito anteriormente, los datos espectrales y fotométricos coinciden con polisacáridos capsulares muy purificados con una contaminación mínima por proteínas o ácidos nucleicos.

B. Tamaño molecular de los polisacáridos

En la Tabla 2, se proporcionan los volúmenes relativos de elución (como K_{AV}) de los polisacáridos purificados sobre Superosa 6, tomados de los máximos de sus perfiles de GPC detectados por RI.

En análisis separados, se determinaron las distribuciones de las masas molares absolutas de los polisacáridos mediante GPC-MALLS/RI. Este procedimiento permite la estimación directa de la masa molar de macromoléculas, independientemente de parámetros cromatográficos tales como el caudal o el volumen de retención, y sin la necesidad de patrones secundarios cuyas propiedades hidrodinámicas puedan variar enormemente del analito de interés. La utilidad de la GPC-MALLS/RI como procedimiento de caracterización está bien establecida para los polisacáridos de interés farmacéutico (7, 8, 10, 17, 25). Las distribuciones de las masas molares se presentan habitualmente como la masa molar media en peso (M_p) y la polidispersidad (M_p/M_N), que es indicadora de la amplitud de la distribución. Como la polidispersidad se aproxima a la unidad, la distribución de las masas molares se aproxima a la homogeneidad.

En la Tabla 2, se proporcionan los datos de las masas molares para los polisacáridos de estreptococos del grupo B purificados. Para cada uno de los serotipos, las distribuciones de las masas molares para las preparaciones de polisacáridos de ambos orígenes fueron similares. Las masas molares medias en peso de estas preparaciones variaron de 92 kg/ml para los polisacáridos capsulares asociados a células del tipo V a 318 kg/ml para los polisacáridos capsulares de tipo la purificados del sobrenadante de cultivos. Las distribuciones de todas las preparaciones fueron limitadas, según lo indicado por sus bajos valores de polidispersidad ($M_p/M_N \leq 1,6$). Estos valores fueron comparables con los obtenidos mediante análisis similares de polisacáridos capsulares de varios serotipos de *S. pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* de tipo b (7, 17).

35

TABLA 2

Caracterización bioquímica y biofísica de los polisacáridos capsulares de estreptococos del grupo B purificados					
Serotipo	K _{av}	M _p (kg/ml) ^A	Polidispersidad M _p /M _N	Contenido de ácido nucleico (%)	Contenido de proteína (%)
Ia (S) ^B	0,005	318	1,35	0,23	0,21
Ia (C) ^C	0,010	311	1,31	0,15	< 0,01
Ib (S)	0,191	170	1,20	0,95	< 0,01
Ib (C)	0,150	218	1,61	0,33	< 0,01
II (S)	0,152	246	1,46	0,13	< 0,01
II (C)	0,115	289	1,46	0,12	< 0,01
III (S)	0,343	ND	ND	0,58	< 0,01
III (C)	0,268	108	1,24	0,10	< 0,01
III (S + C)	0,272	104	1,22		
V (S)	0,257	92	1,28	0,26	0,27
V (C)	0,156	179	1,15	0,17	0,09
V (C)	0,241	99	1,20		

^A Los datos de masas molares se determinaron mediante GPC-MALLS/RI
^B (S) indica que el polisacárido fue purificado de sobrenadantes
^C (C) indica que el polisacárido fue purificado de sedimentos celulares

5 Consideradas junto con los datos espectrales de RMN, las distribuciones de masas molares indican que, para cada serotipo, las diferencias entre los polisacáridos purificados de sobrenadantes o de sedimentos celulares (así como de ambas fuentes combinadas, para el tipo III) no son relevantes. Como los espectros de RMN para las preparaciones de cada serotipo indican que son químicamente idénticas, también se prevé que el comportamiento inmunoquímico de estas preparaciones sea idéntico. Por lo tanto, la decisión de combinar el sobrenadante de los cultivos con las células para la extracción solo se basa en la contribución que se espera que el sobrenadante haga a la producción (Tabla 1). Por tanto, puede ser preferible usar un extracto combinado de tipo II.

10 ANÁLISIS INMUNOQUÍMICOS

A. ELISA de inhibición competitiva

15 Se revistieron pasivamente placas de microvaloración (Nunc Polysorp) bien con PEGB_{Ia}-ASH, PEGB_{Ib}-ASH, PEGB_{II}-ASH, PEGB_{III}-ASH o PEGB_V-ASH (100 ng de polisacárido en 100 µl a cada pocillo) diluido en PBS (fosfato de sodio 50nM, NaCl 150mM, pH = 7,4) durante 1 h a 37°C. Una vez lavadas las placas con PBS + Tween 20 al 0,05% (PBS-Tween, pH = 7,4), se bloquearon con 150 µl/pocillo de PBS + albúmina de suero bovino al 0,1%. Tras el post-revestimiento, se volvieron a lavar las placas y se almacenaron a 4°C hasta su uso.

20 Se valoraron por separado antisueros de conejo contra estreptococos del grupo B de células enteras dirigidos contra PEGB_{Ia}, PEGB_{Ib}, PEGB_{II} y PEGB_{III} (Dennis Kasper) en placas revestidas con PEGB_{Ia}-ASH, PEGB_{Ib}-ASH, PEGB_{II}-ASH y PEGB_{III}-ASH, respectivamente. De manera similar, se valoró antisuero de conejo contra PEGB_V-TT en una placa revestida con PEGB_V-ASH. Se eligió la dilución correspondiente a aproximadamente un 50% de la señal máxima como la apropiada para los estudios de inhibición.

25 Se diluyeron los antisueros en PBS-Tween. Se diluyeron los inhibidores cinco veces en serie en tampón que contenía los antisueros diluidos. A continuación, se añadieron 100 µl de estas muestras a los pocillos de las placas de microvaloración revestidas por duplicado y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h. Tras lavarlas, se añadieron a cada pocillo 100 µl de conjugado de cabra frente a inmunoglobulina de conejo-rábano picante (Kirkegaard & Perry) diluido en PBS-Tween según las instrucciones del fabricante. Se incubaron las placas a temperatura ambiente y luego se volvieron a lavar. Se añadieron los 100 µl de sustrato TMB microwell (n.º de cat. 50-76-04, Kirkegaard & Perry) a cada pocillo. Se detuvo la reacción tras 5 min mediante la adición de 100 µl de solución de detención de un componente (n.º de cat. 50-85-04, Kirkegaard & Perry) y se leyó la absorbancia a 450 nm. La inhibición se determinó como el porcentaje de señal

máxima conseguida con el antisuero diluido en ausencia de cualquier inhibidor.

B. Resultados

5 En las Figuras 5–10, se representan las curvas de inhibición de la unión para cada antisuero de EGB específico de tipo Ia, Ib, II, III, V con sus antígenos de P capsulares homólogos, respectivamente. Según lo demostrado por estas curvas, cada antígeno de P bien extraído del sobrenadante de cultivo o del caldo, resultó tener propiedades de inhibición similares que indican su equivalencia antigénica. Por lo tanto, el procedimiento empleado para generar estos polisacáridos capsulares no afecta a su antigenicidad.

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica que comprende un polisacárido capsular estreptocócico de grupo B purificado, en el que el polisacárido estreptocócico del grupo B purificado se produce mediante un proceso que comprende

- 5 - proporcionar para la extracción células bacterianas aisladas, sobrenadantes bacterianos concentrados a partir de células bacterianas homogeneizadas o de medio acondicionado o células sedimentadas que comprenden un polisacárido capsular estreptocócico del grupo B;
- 10 - extraer el polisacárido capsular a partir de los componentes celulares, en el que los componentes celulares incluyen ácidos nucleicos y proteínas poniendo en contacto las células bacterianas aisladas, los sobrenadantes bacterianos concentrados procedentes de las células bacterianas homogeneizadas o el medio acondicionado o las células sedimentadas con un reactivo básico seleccionado entre las bases NaOH, KOH, LiOH, NaH, NaOMe o KOtBu, en el que las bases se usan en un intervalo de 0,5 N a 5,0 N y en el que se degradan el ADN y el ARN bacterianos;
- separar mediante cromatografía de interacción hidrófoba (CIH) el polisacárido capsular extraído de las impurezas resultantes de los componentes celulares que comprenden proteínas y ácidos nucleicos; y
- recuperar el polisacárido capsular purificado;

15 en la que el polisacárido capsular estreptocócico del grupo B se selecciona entre el grupo que consiste en PC de tipo Ia, PC de tipo Ib, PC de tipo II, PC de tipo III y PC de tipo V y en la que:

el PC de tipo Ia, después de dicha etapa de separación, tiene

- 20 K_{av} en el intervalo de 0,010 – 0,005
 M_w en el intervalo de 318 – 311 (kg/mol)
 M_w/M_n en el intervalo de 1,35 – 1,31;

el PC de tipo Ib, después de dicha etapa de separación, tiene

- 25 K_{av} en el intervalo de 0,191 – 0,150
 M_w en el intervalo de 218 – 170 (kg/mol)
 M_w/M_n en el intervalo de 1,61 – 1,20;

el PC de tipo II, después de dicha etapa de separación, tiene

- 30 K_{av} en el intervalo de 0,152 – 0,115
 M_w en el intervalo de 289 – 246 (kg/mol)
 M_w/M_n en el intervalo de 1,46;

el PC de tipo III, después de dicha etapa de separación, tiene

- 35 K_{av} en el intervalo de 0,343 – 0,268
 M_w en el intervalo de 108 – 104 (kg/mol)
 M_w/M_n en el intervalo de 1,24 – 1,22;

el PC de tipo V, después de dicha etapa de separación, tiene

- K_{av} en el intervalo de 0,257 – 0,156
 M_w en el intervalo de 179 – 92 (kg/mol)
 M_w/M_n en el intervalo de 1,28 – 1,15.

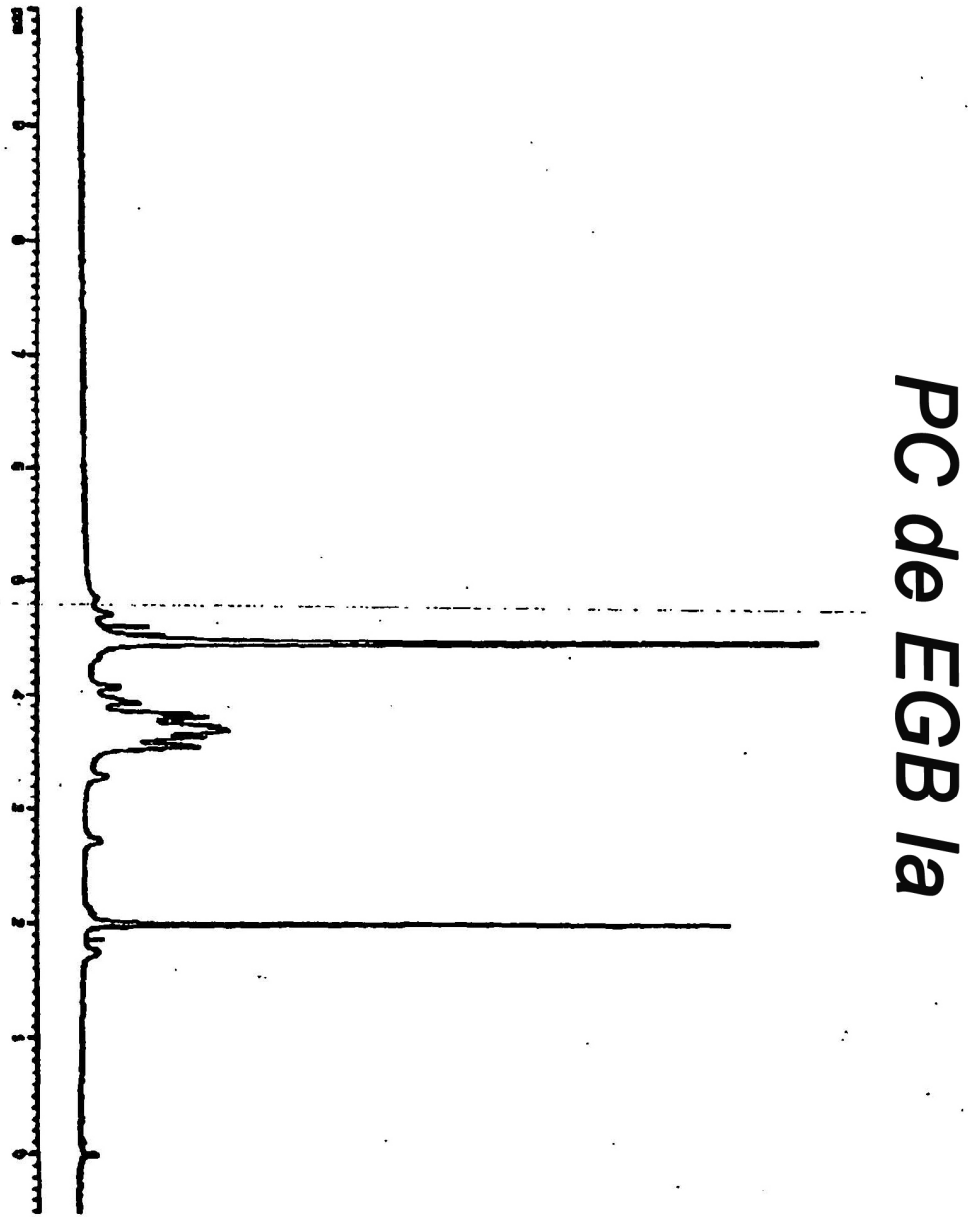


FIGURA 1

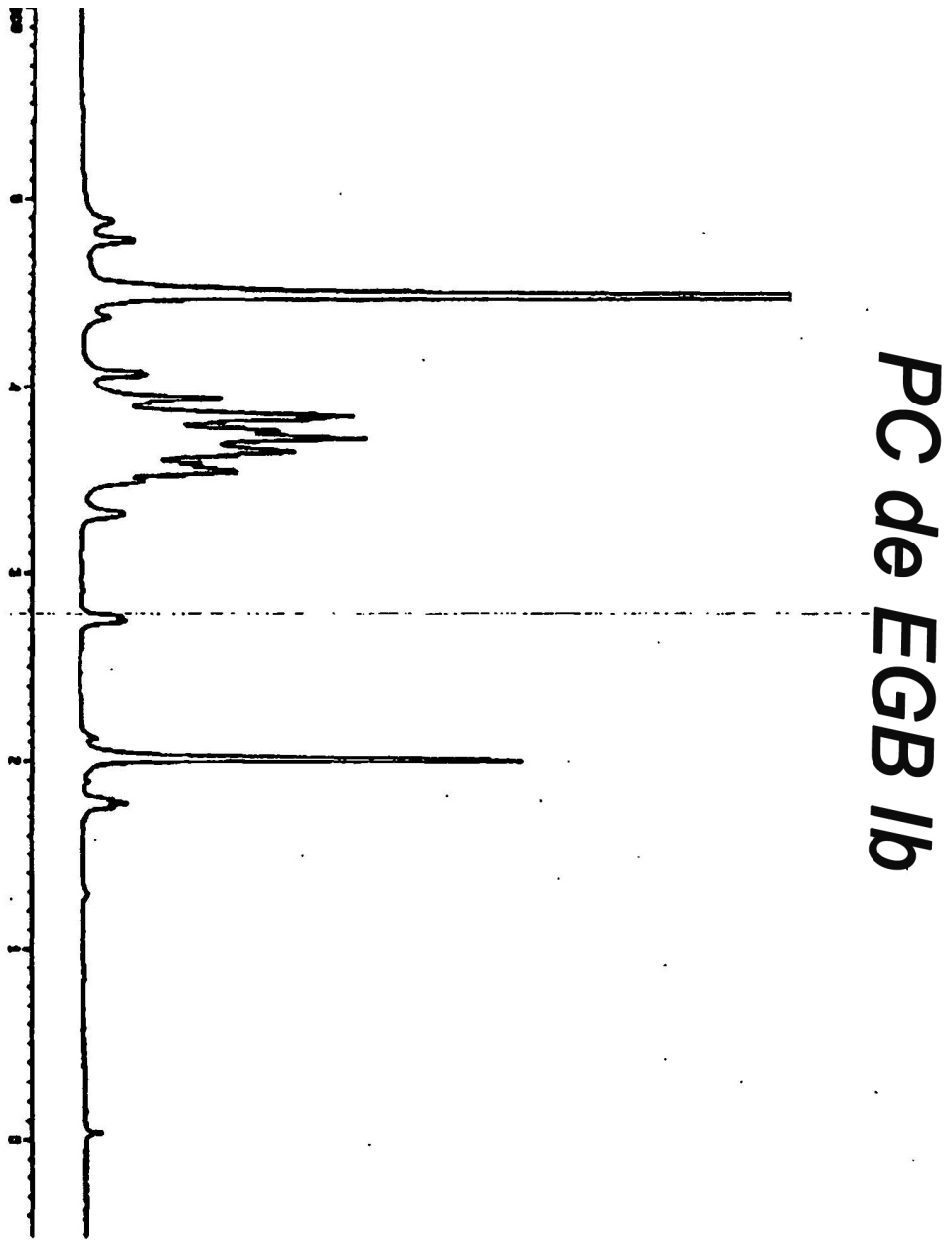


FIGURA 2

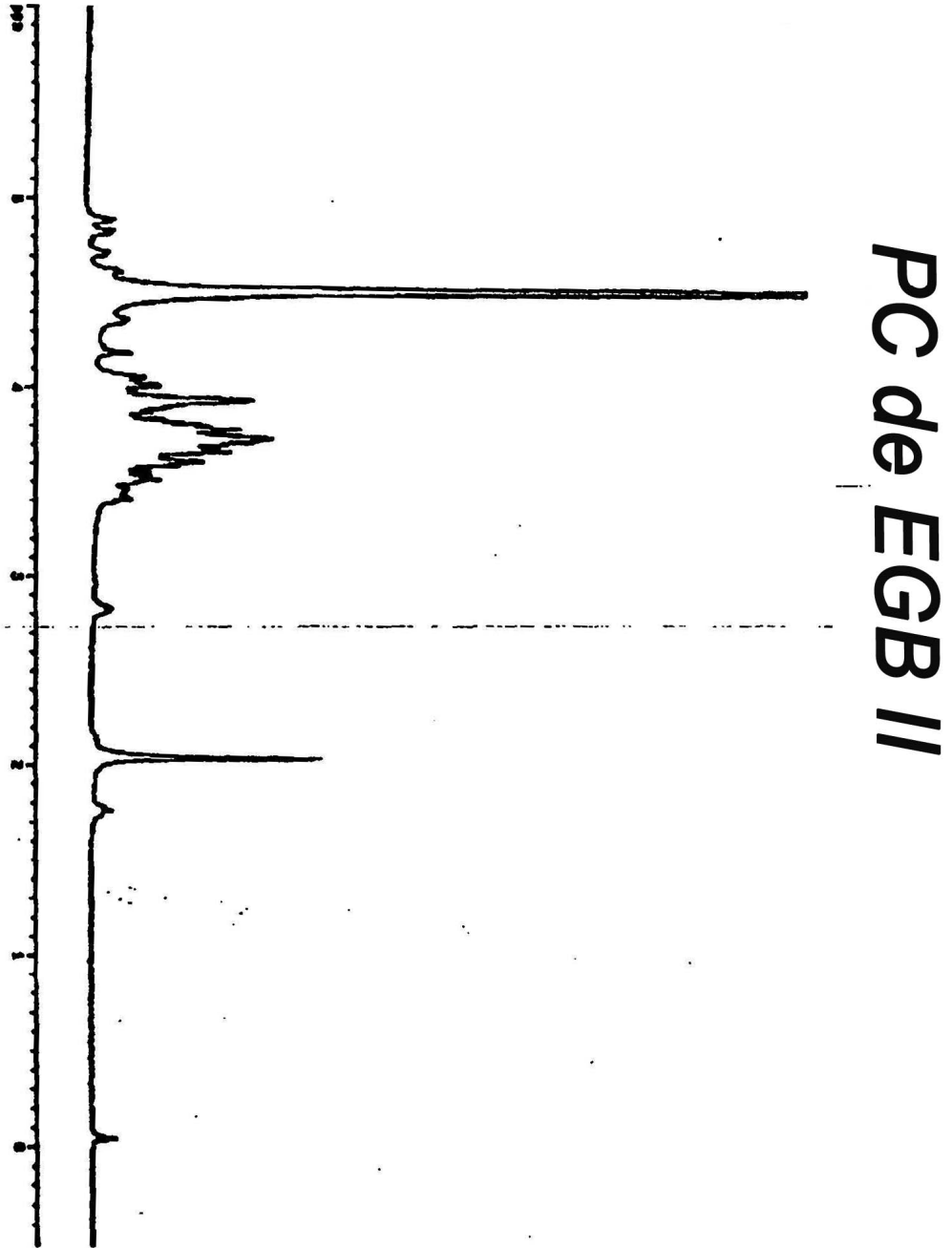


FIGURA 3

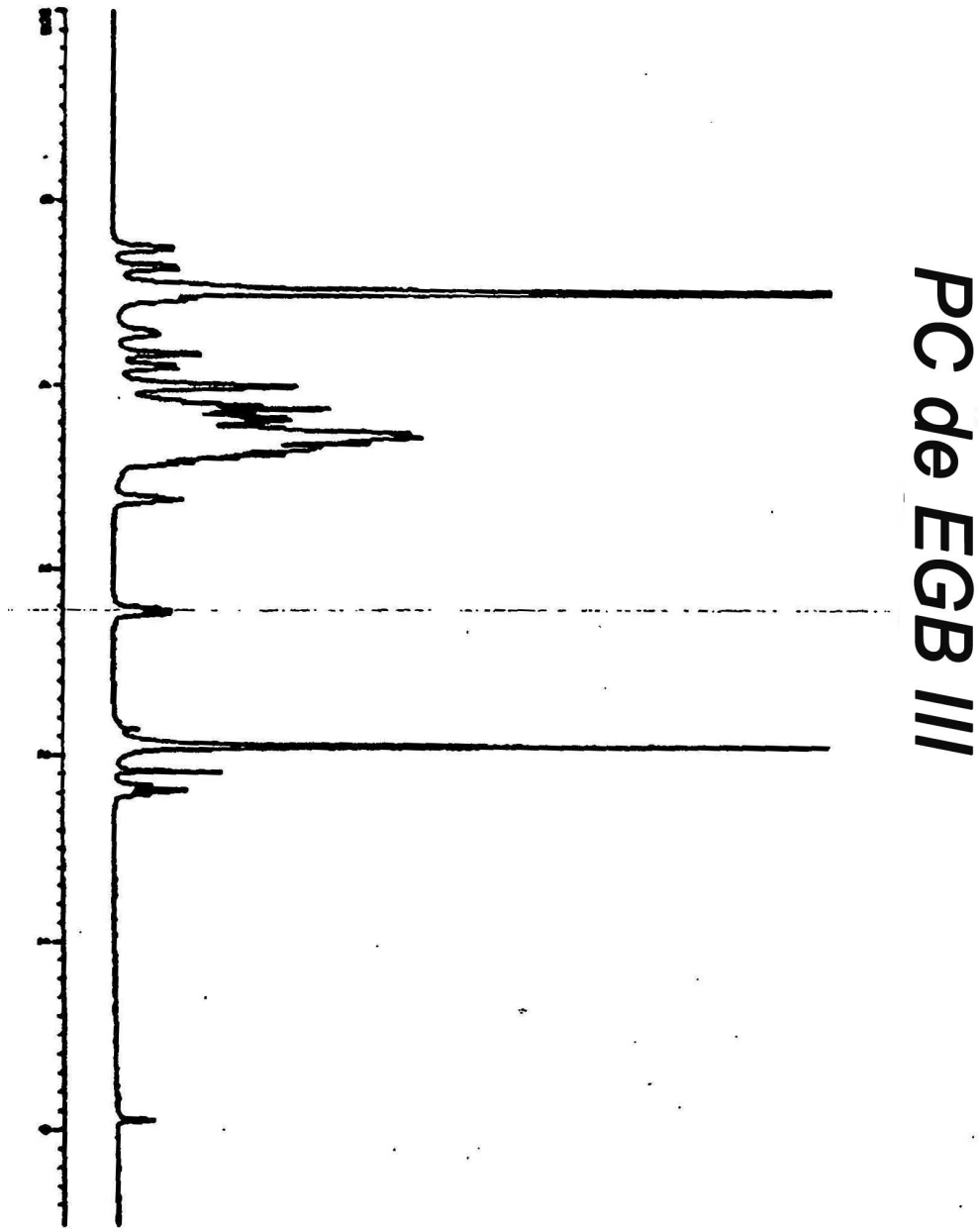


FIGURA 4

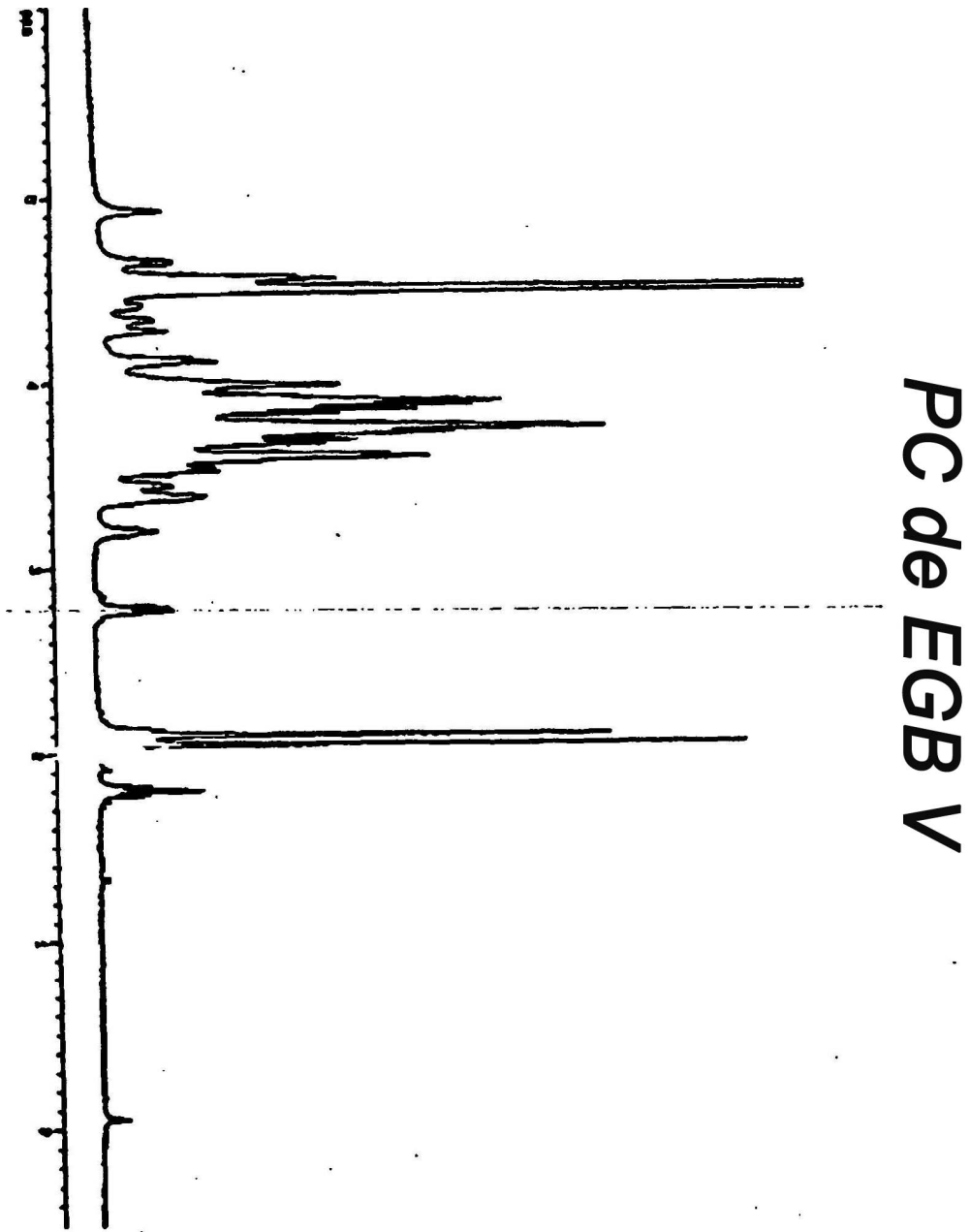


FIGURA 5

Inhibición de antisuero de conejo contra GBSPIa sobre placa reversita de GBSPIa-ASH

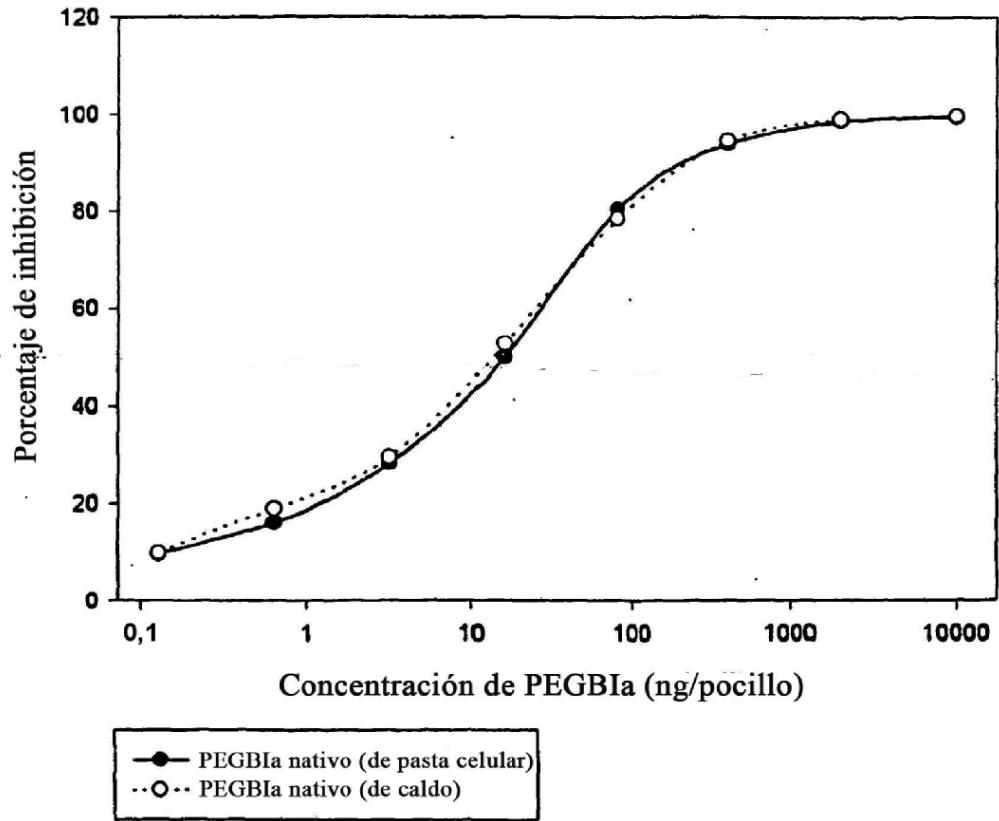


FIGURA 6

Inhibición de antisuero de conejo contra PEGBIb sobre placa revestida de PEGBIb-ASH

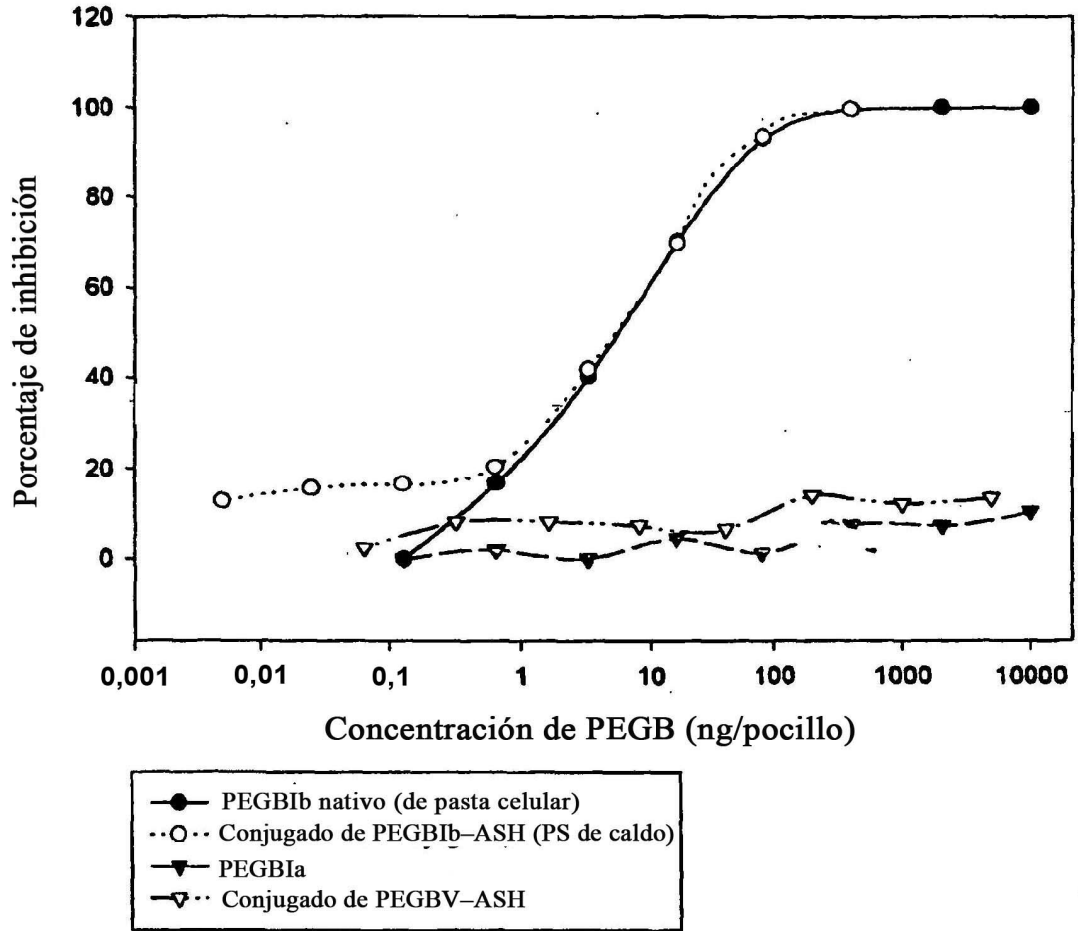


FIGURA 7

Inhibición de antisuero de conejo contra PEGBII sobre placa revestida de PEGBII-ASH

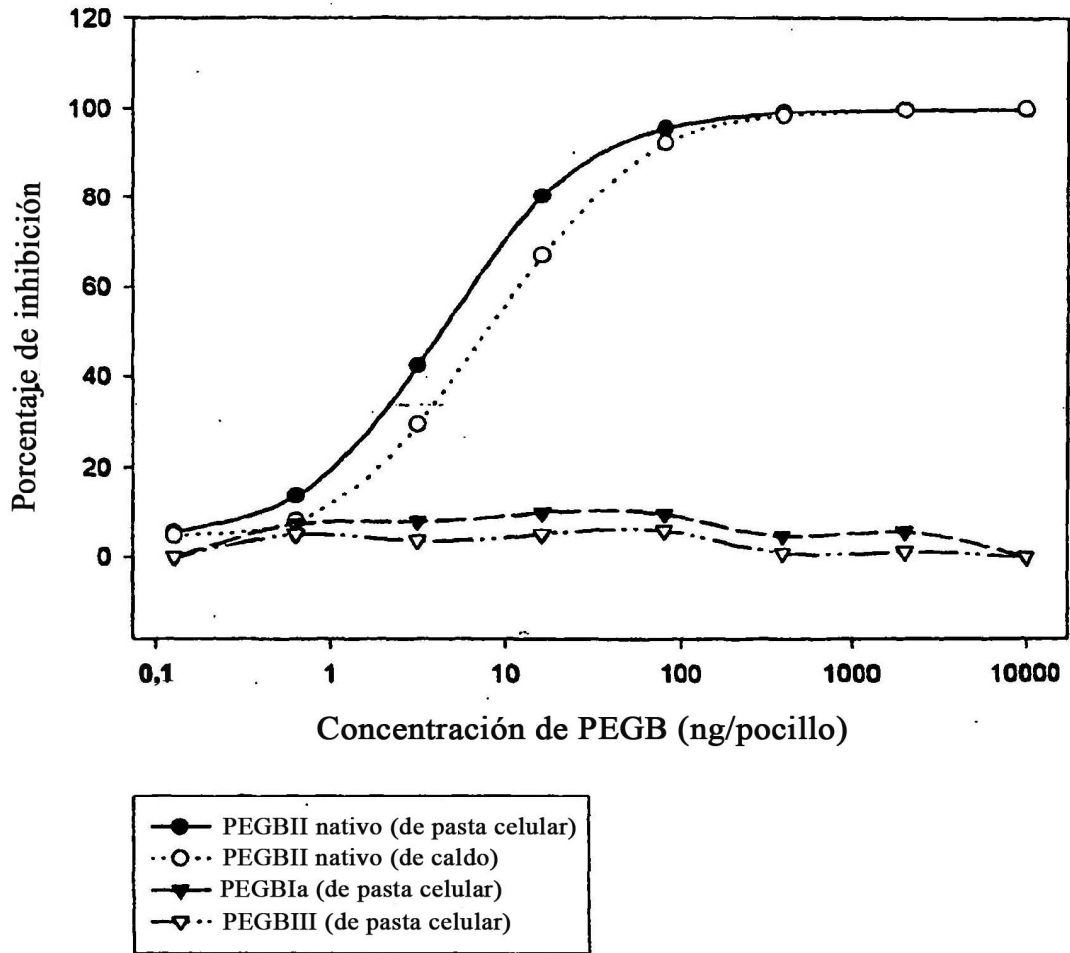


FIGURA 8

Inhibición de antisuero de conejo contra PEGBIII sobre placa revestida de PEGBIII-ASH

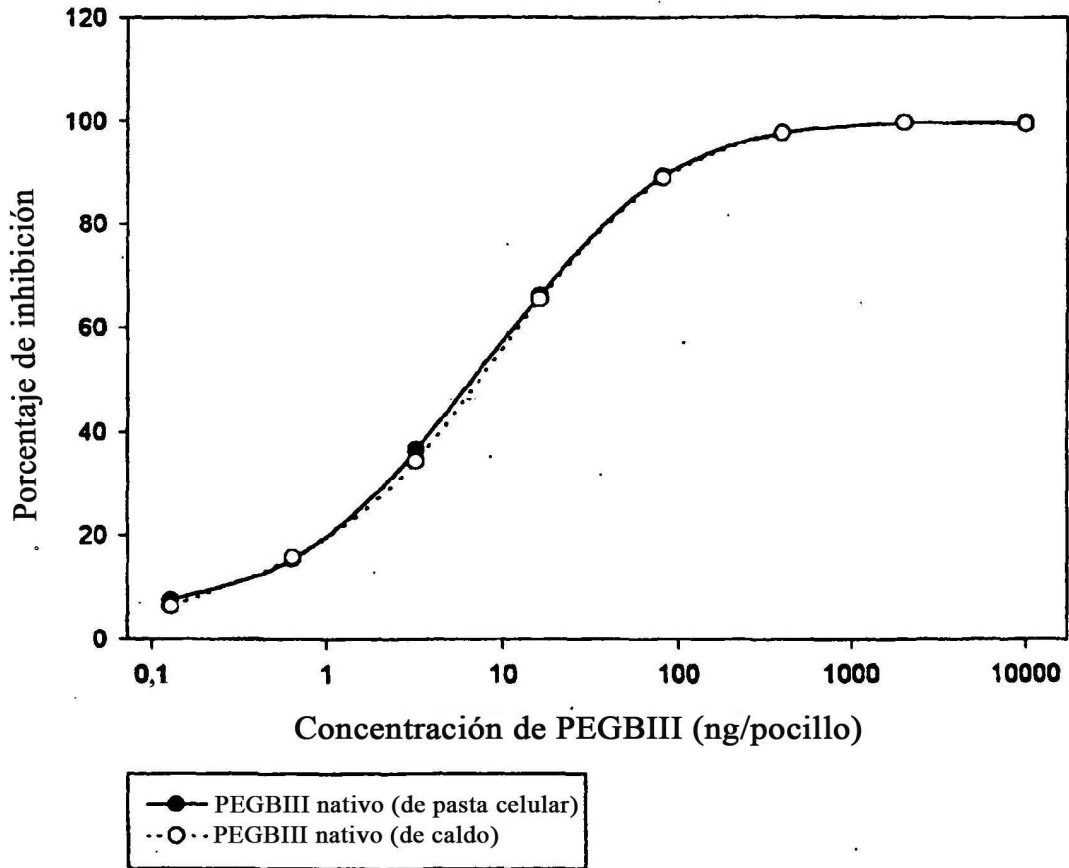


FIGURA 9

Inhibición de antisuero de conejo contra PEGBV-TT sobre placa revestida de PEGBV-ASH

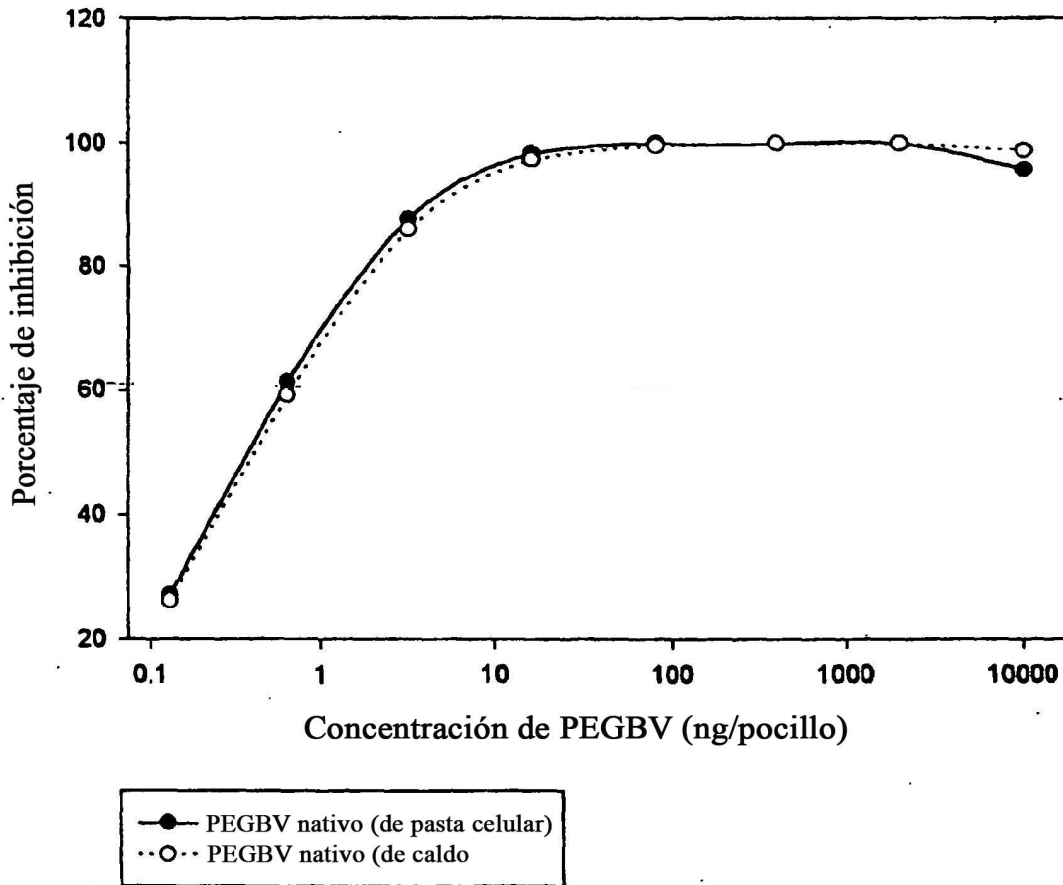


FIGURA 10

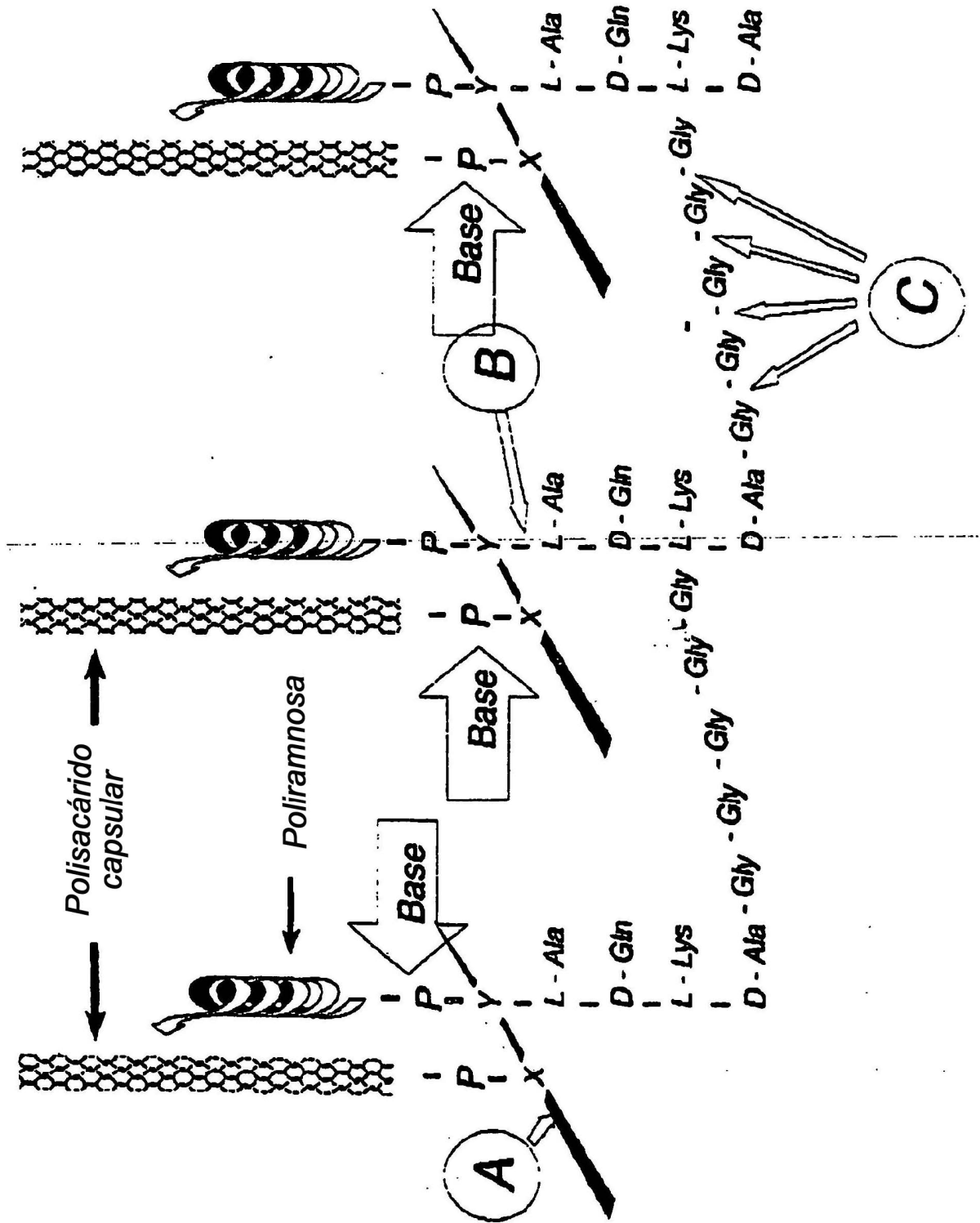


FIGURA 12