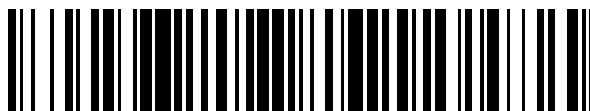


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 648 046**

51 Int. Cl.:

A61K 31/715 (2006.01)

C07K 16/12 (2006.01)

A61K 39/085 (2006.01)

C08B 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.11.2003 PCT/US2003/036358**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.05.2004 WO04043405**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.11.2003 E 03786713 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017 EP 1565478**

54 Título: **Vacuna de polisacárido para infecciones estafilocócicas**

30 Prioridad:

12.11.2002 US 425425 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.12.2017

73 Titular/es:

**THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC.
(100.0%)
75 FRANCIS STREET
BOSTON, MA 02115, US**

72 Inventor/es:

**PIER, GERALD, B. y
MAIRA-LITRAN, TOMAS**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones :

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

ES 2 648 046 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

Vacuna de polisacárido para infecciones estafilocócicas

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a composiciones de polisacárido útiles para inducir inmunidad para la prevención y tratamiento de infecciones estafilocócicas. La invención también se refiere a métodos de preparación y uso de antígenos basados en polisacárido, anticuerpos relacionados y kits diagnósticos, y para inducir inmunidad activa y pasiva usando el material polisacárido y anticuerpos para el mismo.

Antecedentes de la invención

10 Los estafilococos son bacterias Gram-positivas que normalmente habitan y colonizan la piel y las membranas mucosas de los seres humanos. Si la piel o la membrana mucosa llegan a dañarse durante la cirugía u otro traumatismo, los estafilococos pueden tener acceso a los tejidos internos ocasionando el desarrollo de una infección. Si los estafilococos proliferan localmente o entran al sistema linfático o sanguíneo pueden surgir complicaciones infecciosas serias, tales como aquellas asociadas a bacteremia estafilocócica. Estas complicaciones incluyen choque séptico, endocarditis, artritis, osteomielitis, neumonía y abscesos en varios órganos.

15 Los estafilococos incluyen tanto organismos coagulasa positivos, que producen una coagulasa libre, como organismos coagulasa negativos, que no producen esta coagulasa libre. *Staphylococcus aureus* es la forma coagulasa positiva más común de los estafilococos. Generalmente, *S. aureus* ocasiona infección en un sitio local, ya sea extravascular o intravascular, que finalmente puede originar bacteremia. *S. aureus* también es una causa frecuente de osteomielitis aguda y ocasiona infecciones estafilocócicas de neumonía. Además, *S. aureus* es el responsable de aproximadamente el 1-9 % de los casos de meningitis bacteriana y 10-15 % de los abscesos cerebrales.

20 Existen al menos veintiún especies conocidas de estafilococos coagulasa negativos, que incluyen *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. saprophiticus*, *S. cohnii*, *S. xylosus*, *S. simulans* y *S. capitis*. *S. epidermidis* es el agente causante de infección más frecuente asociado a dispositivos de acceso intravenoso, y la cepa clínica más frecuentemente en bacteremias nosocomiales primarias. *S. epidermidis* también está asociado a endocarditis sobre válvula protésica.

25 *Staphylococcus* también es una fuente común de infección bacteriana en animales. Por ejemplo, la mastitis estafilocócica es un problema común en rumiantes tales como ganado vacuno, ovejas y cabras. Generalmente, la enfermedad se trata con antibióticos para reducir la infección, pero el tratamiento es un procedimiento caro y aún así produce pérdida de la producción de leche. Las vacunas más eficaces identificadas hasta la fecha son vacunas de *S. aureus* vivo intacto, administradas por vía subcutánea. Sin embargo, la administración de vacunas vivas se asocia con el riesgo de infección. Por ese motivo, muchos investigadores han intentado producir vacunas de *S. aureus* muerto, y/o aislar polisacáridos capsulares o componentes de la pared celular que induzcan inmunidad contra *S. aureus*. Sin embargo, ninguno de estos intentos ha sido satisfactorio.

Sumario de la invención

35 La presente invención se refiere a métodos y productos útiles para la inmunización de seres humanos y animales contra la infección por estafilococos coagulasa negativos y coagulasa positivos. Se ha descubierto, según la invención, que un polisacárido de superficie, poli-N-acetil-glucosamina (PNAG), de estafilococos tales como *S. aureus* y *S. epidermis*, que está muy poco sustituido con restos de acetato, es altamente inmunogénico *in vivo* y preferentemente provoca anticuerpos que median en la destrucción opsónica y protección de la infección. Por lo tanto, este polisacárido es útil, entre otras cosas, en la generación de respuestas inmunitarias, que incluyen respuestas inmunitarias dependientes de anticuerpo, a estafilococos.

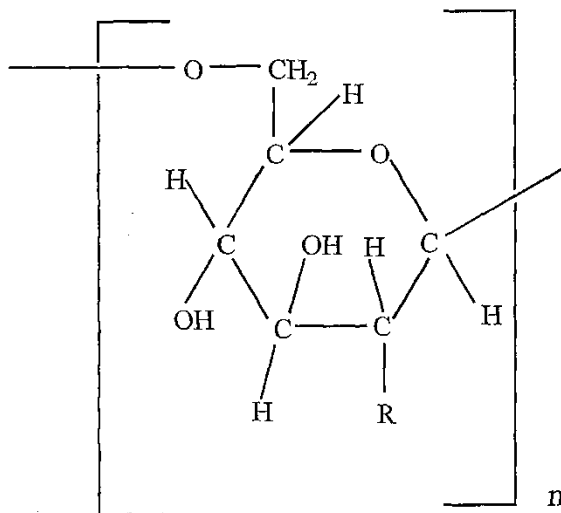
40 En un aspecto, la invención proporciona una composición que comprende un polisacárido aislado que comprende un polímero de β -1,6-glucosamina, que tiene una longitud de al menos cuatro unidades monoméricas, en el que menos del 40 % de los grupos amino de la glucosamina están sustituidos con acetato. En un aspecto, la composición es estéril (por ejemplo, sería adecuada para inyección *in vivo*). En otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende un polisacárido aislado que comprende un polímero de β -1,6-glucosamina, que tiene una longitud de al menos cuatro unidades monoméricas, en el que menos del 40 % de los grupos amino de la glucosamina están sustituidos con acetato, y en el que el polisacárido está conjugado con un compuesto vehículo.

45 Como se usa en toda la descripción, "un polisacárido de la invención" se refiere a un polisacárido estafilocócico de superficie de poli-N-acetil-glucosamina (PNAG) que tiene menos del 40 % de sustituciones de acetato. Este polisacárido se denomina en el presente documento PNAG desacetilada (PNAGd). Se entiende que la PNAGd puede estar parcial o totalmente desacetilada, siempre que el intervalo de acetilación sea de 0 a menos del 40 %. Como se usa en el presente documento, la PNAG nativa es una mezcla de formas de PNAG con grados variables de acetilación. La PNAG nativa puede incluir PNAGd, sin embargo, está presente en una mezcla con formas altamente

acetiladas de PNAG. Como se usa en el presente documento, una forma "altamente acetilada" de PNAG es una PNAG que tiene más del 50 % de sustituciones de acetato.

Igualmente se aplican varias realizaciones a los diversos aspectos de la invención. Estas realizaciones se refieren abajo.

- 5 En una realización, el polisacárido aislado está definido por la siguiente estructura:



- 10 en la que n es un entero superior o igual a cuatro, R está seleccionado del grupo que consiste de -NH-CO-CH₃ y -NH₂, y menos del 40 % de los grupos R son -NH-CO-CH₃. Según algunos aspectos de la invención en las que el polisacárido está conjugado con un compuesto vehículo o un conector unido a un compuesto vehículo, n puede ser 4 o mayor.

- 15 En una realización, el polisacárido tiene un peso molecular de al menos 800 Daltons, mientras que en otras realizaciones, el peso molecular es al menos 1000 Daltons. En realizaciones preferidas, el peso molecular está seleccionado del grupo que consiste en al menos 1200 Daltons, al menos superior a 2000 Daltons, al menos 2500 Daltons, al menos 5000 Daltons, al menos 7500 Daltons, al menos 10.000 Daltons, al menos 25.000 Daltons, al menos 50.000 Daltons, al menos 75.000 Daltons, y al menos 100.000 Daltons. En realizaciones aún adicionales, el peso molecular está seleccionado del grupo que consiste en al menos 125.000 Daltons, al menos 150.000 Daltons, al menos 200.000 Daltons, al menos 250.000 Dalton, al menos 300.000 Daltons, al menos 350.000 Daltons, al menos 400.000 Daltons, al menos 450.000 Daltons, y al menos 500.000 Daltons.

- 20 El polisacárido aislado puede tener una longitud de al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, o al menos seis unidades monoméricas. En otras realizaciones, la longitud del polisacárido está seleccionada del grupo que consiste en al menos 6, al menos 10, al menos 20, al menos 50, al menos 100, al menos 200, al menos 300, al menos 400, y al menos 500 unidades monoméricas.

- 25 En otras realizaciones, menos del 40 %, igual a o menos del 35 %, igual a o menos del 30 %, igual a o menos del 25 %, igual a o menos del 20 %, igual a o menos del 15 %, igual a o menos del 10 %, igual a o menos del 5 %, o igual a o menos del 1 % de los grupos amino de la glucosamina (o grupos R) están sustituidos con acetato. En otras realizaciones, ninguno de los grupos amino de la glucosamina está sustituido con acetato. La PNAGd puede referirse a cualquiera de éstas.

- 30 Por consiguiente, el polisacárido puede ser un polímero heterosustituido en el que los grupos R son una mezcla de sustituciones de acetato (es decir, -NH-CO-CH₃) y grupos amino no sustituidos (es decir, -NH₂), siempre que menos del 40 % de estos grupos estén sustituidos con acetato. El polisacárido también puede ser homosustituido si todos los grupos R son aminas (es decir, ninguno está sustituido con acetato).

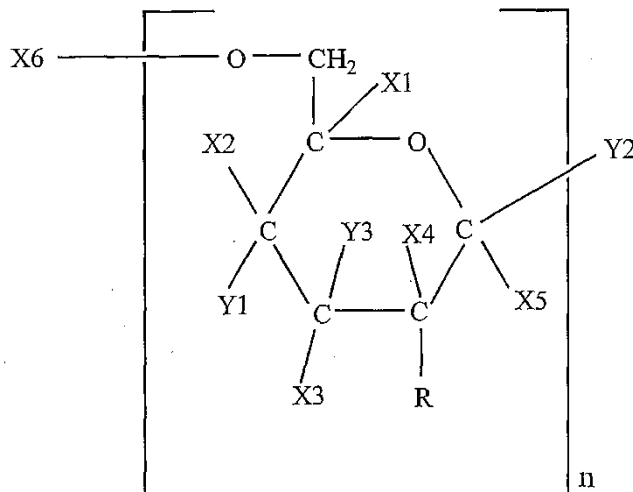
En algunas realizaciones de la invención, el polisacárido aislado puede conjugarse con un compuesto vehículo. El compuesto vehículo puede conjugarse con el polisacárido por medio de un conector. El compuesto vehículo puede ser un vehículo de péptido, pero no se limita a éste.

- 35 En estas y otras realizaciones, la composición que comprende el polisacárido aislado puede comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En algunas realizaciones, la composición es al menos el 90 % pura, al menos el 95 % pura, al menos el 97 % pura, o al menos el 99 % pura (es decir, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 97 % o al menos el 99 % del polisacárido presente en la composición es PNAGd). En otras realizaciones, la composición está sustancialmente

libre de fosfato o ácido teicoico. Preferentemente, la composición está sustancialmente libre de polisacáridos que tienen más del 50 %, más del 75 %, o más del 90 %, de sustitución de acetato en el grupo amino de la glucosamina (R).

En algunas realizaciones, el polisacárido consiste en la siguiente estructura:



5

en la que cada uno de X1, X2, X3, X4, X5 y X6 es o bien H, un compuesto vehículo, o bien un conector unido a un compuesto vehículo; y cada uno de Y1, Y2 y Y3 es o bien OH, un compuesto vehículo, o bien un conector unido a un compuesto vehículo. En algunas realizaciones, solo un compuesto vehículo o conector unido a un compuesto vehículo está conjugado con la estructura. En otras realizaciones, solo uno de X1, X2, X3, X4, X5 o X6 está conjugado con un compuesto vehículo o un conector unido a un compuesto vehículo. En otras realizaciones, solo uno de Y1, Y2 o Y3 está conjugado con un compuesto vehículo o conector unido a un compuesto vehículo. En otras realizaciones más, el compuesto vehículo o conector conjugado con el mismo está conjugado solo en una de las posiciones X1, X2, X3, X4, X5, X6, Y1, Y2 o Y3. El compuesto vehículo puede ser un polisacárido. En otras realizaciones, la molécula vehículo es un polisacárido opcionalmente sustituido, directamente o mediante un conector, con uno o más compuestos vehículos, tales como otros polisacáridos, péptidos y similares. En algunas realizaciones, el polisacárido vehículo no es una N-acetil-beta(β)-1-6-glucosamina. Según algunos aspectos de la invención en la que X es un compuesto vehículo o un conector unido a un compuesto vehículo, n puede ser 4 o mayor.

10

15

La composición proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los polisacáridos de la invención, que pueden usarse como vacunas. Estas composiciones comprenden el polisacárido en una cantidad eficaz para estimular una respuesta inmunitaria, tal como una respuesta inmunitaria específica de antígeno. La composición de vacuna puede comprender también un vehículo y/o un adyuvante farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede contener el polisacárido conjugado con un compuesto vehículo, ya sea directamente o por medio de un conector.

20

25

Otros aspectos de la invención proporcionan métodos de preparación de los polisacáridos de la invención. Estos métodos se describen abajo.

En un aspecto, la invención proporciona un polisacárido aislado preparado según el siguiente método: precipitar con etanol una preparación de polisacárido bruto de una preparación concentrada de cuerpos celulares bacterianos; digerir simultáneamente el polisacárido bruto con lisozima y lisostafina, seguido de digestión secuencial con una nucleasa y proteinasa K para formar una preparación de polisacárido digerido; fraccionar por tamaño la preparación de polisacárido digerido; aislar una fracción de polisacárido acetilado; y desacetilar el polisacárido acetilado para producir un polisacárido desacetilado (es decir, un polisacárido que tiene menos del 40 % de sustitución de acetato).

30

En otro aspecto, la invención también proporciona un antígeno de polisacárido que comprende un polisacárido preparado según el siguiente método: preparar un polisacárido impuro de un cultivo bacteriano; incubar el polisacárido impuro con un ácido o una base para producir un polisacárido semipuro; neutralizar la preparación; e incubar la preparación neutralizada en ácido fluorhídrico. En una realización, el método implica además aislar un polisacárido acetilado de la preparación, y desacetilar el polisacárido acetilado para producir un polisacárido desacetilado. En una realización, el polisacárido acetilado se desacetila químicamente, hasta un grado deseado que es inferior al 40 %. En otra realización, el polisacárido acetilado se desacetila por incubación con una disolución básica, hasta un grado deseado que es inferior al 40 %. En otra realización adicional, el polisacárido acetilado se desacetila enzimáticamente.

35

40

Varias realizaciones se aplican a los métodos anteriores. Algunas de estas realizaciones adicionales se indican abajo. El cultivo bacteriano puede ser un cultivo de *Staphylococcus coagulasa* negativo o coagulasa positivo. El cultivo bacteriano puede ser un cultivo de *Staphylococcus aureus* o un cultivo de *Staphylococcus epidermidis*. En otra realización, la preparación de polisacárido se fracciona por tamaño usando una columna.

- 5 Un ejemplo de una preparación del polisacárido de la invención es como sigue: Se incuba un cultivo bacteriano con una base fuerte o un ácido fuerte para preparar una disolución de ácido o base. La disolución de ácido o base se neutraliza entonces a pH 2 para producir una suspensión de antígeno bruto. La suspensión de antígeno bruto se dializa contra una disolución tal como agua desionizada, y se recoge el antígeno bruto insoluble. El antígeno bruto insoluble puede liofilizarse y luego resuspenderse en un amortiguador. El tampón puede seleccionarse del grupo que
10 consiste de PBS 50 mM y Tris 100 mM con NaCl 150 mM. La base o ácido fuerte puede ser superior a NaOH 1 N o HCl 1 M. En algunas realizaciones, la base o ácido fuerte es NaOH 5 N o HCl 5M. En otra realización, el extracto del cultivo bacteriano se agita en un ácido o base fuerte durante 18-24 horas. Puede repetirse la extracción con base o ácido fuerte. El método implica además tratar la preparación de antígeno para eliminar grupos acetato unidos a amino hasta alcanzar un grado deseado de sustitución de acetato, produciendo así la PNAG desacetilada. La desacetilación puede efectuarse ya sea químicamente o enzimáticamente. Como un ejemplo, la preparación de antígeno puede incubarse a 37 °C durante 2-20 horas en NaOH 1,0 N. La incubación también puede realizarse en bases más débiles durante tiempos más largos o a temperaturas más altas, o en bases más fuertes durante tiempos más cortos o a temperaturas más bajas.

- 20 Los métodos anteriores pueden implicar alternativamente aislar una fracción de la preparación que tiene menos del 40 % de sustituciones de acetato, sin la necesidad de desacetilación adicional.

La invención, en otro aspecto más, proporciona métodos de preparación de composiciones farmacéuticas. En una realización, el polisacárido se combina con un vehículo y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable. En otra realización, el polisacárido se conjuga con un compuesto vehículo, ya sea directamente o a través de un conector, y entonces se combina opcionalmente con un vehículo y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

- 25 Cualquiera de los polisacáridos desacetilados descritos en el presente documento (es decir, PNAGd), puede usarse en los métodos terapéuticos o profilácticos de la invención.

- En otro aspecto, la invención proporciona un método de prevención de una infección estafilocócica en un sujeto, preferentemente un sujeto no roedor. La invención implica administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmunitaria contra *Staphylococcus* de cualquiera de los polisacáridos de la invención. En algunas realizaciones, el *Staphylococcus* es *Staphylococcus aureus*, y en otras el *Staphylococcus* es *Staphylococcus epidermidis*.
30

El sujeto es cualquier sujeto que pueda ser infectado con *Staphylococcus* y preferentemente no es un roedor. En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano y en otras realizaciones el sujeto es un primate, caballo, vaca, cerdo, cabra, oveja, perro o gato.

- 35 En algunas realizaciones, el sujeto está en riesgo de exposición a *Staphylococcus* y en otras realizaciones el sujeto se ha expuesto a *Staphylococcus*. En algunas realizaciones el sujeto es un ser humano mayor de 60 años de edad. El sujeto puede ser uno que está sano. En algunas realizaciones, el sujeto no ha recibido un implante de dispositivo médico.

- 40 Preferentemente, el polisacárido se formula como una vacuna, como se describe en el presente documento o como es conocido en la técnica. En una realización relacionada, el polisacárido se administra con un adyuvante. En otras realizaciones, el polisacárido se administra por vía sistémica al sujeto. El antígeno puede conjugarse con un compuesto vehículo. En algunas realizaciones, el compuesto vehículo es un vehículo de péptido, aunque no se limita a éste.

- 45 Se describe un método de inducción de inmunidad activa a una infección estafilocócica en un sujeto. El método incluye la etapa de administrar a un sujeto una cantidad eficaz para inducir inmunidad activa a una infección estafilocócica de cualquiera de las composiciones que contienen polisacárido anteriores. En una realización, el método es un método de inducción de inmunidad a una infección por *Staphylococcus aureus*. En otra realización, el método es un método de inducción de inmunidad a una infección por *Staphylococcus epidermidis*.

Se describe un método de producción de anticuerpos policlonales o monoclonales.

- 50 El método implica administrar a un sujeto un adyuvante y cualquiera de los polisacáridos de la invención, en una cantidad eficaz para producir anticuerpos específicos para *Staphylococcus*, y aislar los anticuerpos del sujeto. En estos aspectos de la invención, además de otros, el polisacárido se usa como un antígeno. En una realización, el sujeto es un ser humano, mientras que en otras el sujeto es un sujeto no humano tal como un conejo, ratón o rata. El método puede comprender además purificar el anticuerpo.

- 55 También se describe un método de generación de anticuerpos monoclonales, que comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz, para producir anticuerpos específicos para *Staphylococcus*, de un polisacárido aislado de

la invención y un adyuvante, recoger células del bazo del sujeto, fusionar las células del bazo del sujeto con células de mieloma, y recoger la producción de anticuerpos de una subclón de fusión.

Según otro aspecto más de la invención, se proporciona un método de identificación de un anticuerpo monoclonal específico para un polisacárido de la invención. El método implica inducir una respuesta inmunitaria al antígeno en un sujeto no humano, aislar las células productoras de anticuerpo del sujeto, producir células inmortalizadas de las células productoras de anticuerpo, y probar la capacidad de las células inmortalizadas para producir el anticuerpo monoclonal usando un polisacárido de la invención. El método, en una realización, también incluye la etapa de aislar un anticuerpo monoclonal del sobrenadante de las células inmortalizadas.

Además, la invención proporciona una composición que comprende un agente de unión aislado que se une selectivamente a un polisacárido aislado de la invención. En una realización, el agente de unión aislado es un péptido. El péptido puede ser un anticuerpo o un fragmento del mismo. El anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal. El anticuerpo puede ser un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico. En algunas realizaciones importantes, el anticuerpo es un anticuerpo humano. En algunas realizaciones, el agente de unión aislado se une específicamente a PNAGd. En otras realizaciones, el agente de unión aislado se une tanto a PNAGd como a formas altamente acetiladas de PNAG.

En algunas realizaciones, el agente de unión aislado se conjuga con una marca detectable. La marca detectable puede seleccionarse del grupo que consiste de una marca radioactiva, una enzima, una molécula de biotina, una molécula de avidina o un fluorocromo. El agente de unión aislado puede conjugarse con un bactericida tal como un antibiótico.

Según otro aspecto de la invención, se proporciona un método de inducción de inmunidad pasiva a una infección por *Staphylococcus* en un sujeto. La infección puede ser una infección por *Staphylococcus aureus* o una infección por *Staphylococcus epidermidis*, pero no se limita a éstas. El método incluye la etapa de administrar a un sujeto una cantidad eficaz para inducir la opsonización de *Staphylococcus* de uno de los anticuerpos anteriores que se unen a PNAGd.

Los métodos anteriores destinados a la prevención de una infección estafilocócica pueden realizarse en sujetos en riesgo de desarrollar una infección tal. Estos métodos pueden aplicarse similarmente al tratamiento de sujetos que tienen una infección estafilocócica. Los métodos profilácticos y terapéuticos pueden usarse en sujetos que tienen, o están en riesgo de tener, una infección de una especie bacteriana que expresa PNAG nativa.

Se describe un método de tratamiento de un sujeto que tiene una infección por *Staphylococcus*, que comprende administrar un agente de unión aislado que se une a un polisacárido aislado de la invención a un sujeto en una cantidad eficaz para inhibir la infección por *Staphylococcus*. En realizaciones importantes, el agente de unión se une a formas altamente acetiladas de PNAG, así como también a PNAGd.

En una realización, la infección por *Staphylococcus* está seleccionada del grupo que consiste en infecciones por *Staphylococcus epidermidis* e infecciones por *Staphylococcus aureus*. En otra realización, el agente de unión aislado se conjuga con un bactericida tal como un antibiótico.

También se describe un método de evaluación de la capacidad de un polisacárido para proteger contra una infección estafilocócica en un sujeto. El método implica administrar al sujeto una cantidad eficaz del polisacárido, en el que el polisacárido induce inmunidad activa, exponer el sujeto a un *Staphylococcus*, y probar la presencia del *Staphylococcus* en el sujeto.

En otro aspecto más, la invención proporciona un método de identificación de la presencia de PNAGd en una muestra, que comprende poner en contacto la muestra con un agente de unión aislado que se une a PNAGd; y detectar la unión del agente de unión aislado a la muestra. La unión del agente de unión aislado a la muestra indica la presencia de PNAGd en la muestra. Si el agente de unión también se une a PNAG, entonces el método también puede usarse para detectar la presencia de PNAG en la muestra. En una realización, la muestra es una muestra biológica de un sujeto. La muestra biológica puede seleccionarse del grupo que consiste de orina, sangre, pus, piel, esputo, líquido sinovial, linfa y leche. En una realización, el agente de unión aislado se conjuga con una marca detectable tal como aquellas descritas en el presente documento. Una muestra también puede derivar de un hisopo de un dispositivo médico implantable o implantado.

Cada una de las limitaciones de la invención puede englobar varias realizaciones de la invención. Por lo tanto, se anticipa que cada una de las limitaciones de la invención que implica cualquier elemento o combinación de elementos puede incluirse en cada aspecto de la invención.

Breve descripción del listado de secuencias

SEQ ID NO: 1 es la secuencia de nucleótidos del locus *ica* de *S. aureus*, que se ha depositado en GenBank con el número de acceso AF086783.

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 muestra la unión de anticuerpo a PNAG nativa. El anticuerpo se produjo contra PNAG nativa conjugada con toxoide diftérico.

5 La Fig. 2 muestra la unión de anticuerpos a PNAG desacetilada. Los anticuerpos se produjeron contra PNAGd conjugada con toxoide diftérico.

La Fig. 3 muestra títulos de anticuerpo obtenidos en ratones (10 por grupo) inmunizados 3 veces por vía subcutánea, con una semana de separación, con PNAG nativa acoplada al toxoide diftérico (DTm). Los animales se inmunizaron con la dosis indicada en la leyenda. Se obtuvieron muestras de sangre a intervalos semanales de 1-4 semanas después de la inmunización final.

10 La Fig. 4 muestra títulos de anticuerpo obtenidos en ratones (10 por grupo) inmunizados 3 veces por vía subcutánea, con una semana de separación, con PNAGd acoplada a toxoide diftérico (DTm). Los animales se inmunizaron con la dosis indicada en la leyenda. Se obtuvieron muestras de sangre a intervalos semanales de 1-4 semanas después de la inmunización final.

15 La Fig. 5 muestra la destrucción opsónica de cepas estafilocócicas como se indica en la leyenda por anticuerpos de sueros de un conejo inmunizado con PNAGd conjugada con toxoide diftérico (conejo 1). Cada punto muestra el porcentaje medio de destrucción a la dilución indicada.

La Fig. 6 muestra la destrucción opsónica de cepas estafilocócicas como se indica en la leyenda por anticuerpos de sueros de un conejo inmunizado con PNAGd conjugada con toxoide diftérico (conejo 2). Cada punto muestra el porcentaje medio de destrucción a la dilución indicada.

20 La Fig. 7 muestra la destrucción opsónica de cepas estafilocócicas como se indica en la leyenda por anticuerpos de sueros de un conejo inmunizado con PNAG nativa conjugada con toxoide diftérico (conejo 3). Cada punto muestra el porcentaje medio de destrucción a la dilución indicada.

25 La Fig. 8 muestra la destrucción opsónica de cepas estafilocócicas como se indica en la leyenda por anticuerpos de sueros de un conejo inmunizado con PNAG nativa conjugada con toxoide diftérico (conejo 4). Cada punto muestra el porcentaje medio de destrucción a la dilución indicada.

30 La Fig. 9 resume los títulos de la destrucción opsónica de anticuerpos de sueros de los cuatro conejos contra las cepas estafilocócicas indicadas en el eje X. Los conejos son como se describe en las leyendas de las figuras anteriormente. Cada barra muestra el recíproco de la dilución en suero a la cual fueron destruidas $\geq 40\%$ de las bacterias. Las barras <10 indican sueros incapaces de destruir el 40% de las bacterias a una dilución de suero de 1:10.

Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a antígenos de polisacárido derivados de bacterias estafilocócicas, según las reivindicaciones. Estos antígenos son útiles para inducir inmunidad a la infección bacteriana y también para producir anticuerpos para fines de diagnóstico y terapéuticos.

35 La presente invención se basa en parte en el hallazgo de que la poli-N-acetil-glucosamina (PNAG) débilmente acetilada (es decir, desacetilada), referida en la presente como PNAGd, es altamente inmunogénica y así representa un candidato a vacuna adecuado para estimular respuestas inmunitarias protectoras *in vivo*. Una PNAG desacetilada es una que tiene menos del 40% de sus grupos amino sustituidos con acetato. En algunas realizaciones preferidas, hay 35% o menos de sustituyentes de acetato, mientras que en otras hay 15% o menos de sustituyentes acetato.

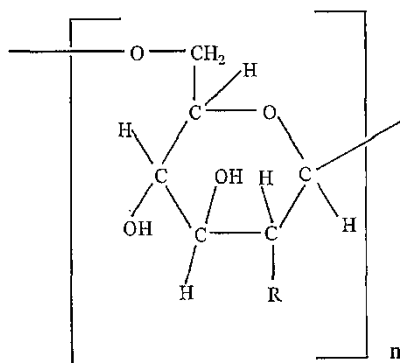
40 Se ha descubierto además, según la invención, que la PNAGd es más capaz de provocar anticuerpos protectores opsónicos que la PNAG nativa. PNAG "nativa" se refiere a la mezcla que existe de forma natural de PNAG con un intervalo de niveles de acetilación que oscilan del $0-100\%$. La PNAGd puede derivar de PNAG nativa usando los métodos de desacetilación descritos en el presente documento. Así, los anticuerpos preparados contra PNAGd son eficaces contra estafilococos tales como *S. aureus* y *S. epidermidis*. Por consiguiente, se ha descubierto según la

45 invención que el grado de acetilación influye en el nivel de respuesta inmunitaria inducida por la administración del antígeno *in vivo*. Los anticuerpos provocados tras la administración de PNAGd reconocen PNAGd y, en realizaciones importantes, también reconocen las formas altamente acetiladas de PNAG.

La invención proporciona composiciones de PNAGd aislada, métodos de aislamiento y en algunos casos purificación de PNAGd. Se describen métodos de uso, que incluyen métodos terapéuticos, profilácticos y de diagnóstico *in vivo*.

50 Como se usa en el presente documento, la PNAGd puede denominarse el antígeno PNAGd. Estos últimos términos pretenden ser intercambiables. La invención también proporciona composiciones farmacéuticas de PNAGd que pueden usarse como vacunas.

En algunos aspectos, PNAGd tiene la siguiente estructura:



donde n es un número entero que oscila de 4 a más de o iguales a 300, R está seleccionado del grupo que consiste en -NH-CO-CH₃ y -NH₂, a condición de que menos del 40 % de los grupos R sean -NH-CO-CH₃. PNAGd tiene un enlace beta (β) 1-6 (es decir, comprende de unidades de glucosamina de monómero unidas juntas por enlaces beta (β) 1-6).

PNAGd puede ser un homopolímero si todos los grupos R están sin sustituir (es decir, R = NH₂). Un homopolímero es uno en el que los grupos R de los restos de glucosamina son idénticos. La PNAGd también puede ser un heteropolímero con una mezcla de grupos NH₂ y NH-CO-CH₃ en la posición R, a la condición de que menos del 40 % de los grupos R estén sustituidos con acetato. Dependiendo de las realizaciones, menos del 40 %, menos del 35 %, menos del 30 %, menos del 25 %, menos del 20 %, menos del 15 %, menos del 10 %, menos del 5 %, o menos del 1 % de los grupos R pueden estar sustituidos con acetato.

El tamaño de la PNAGd varía enormemente y depende de si PNAGd está conjugada con un compuesto vehículo como se describe en el presente documento. En algunos aspectos, el antígeno PNAGd tiene un peso molecular de al menos 100.000 Daltons. En otros aspectos, el antígeno PNAGd tiene un peso molecular de menos de 2000 Daltons. El peso molecular de PNAG puede ser al menos 200 Daltons, o al menos 400 Daltons, o al menos 600 Daltons, o al menos 800 Daltons. Puede usarse PNAGd de peso molecular más bajo según la invención, preferentemente cuando se conjuga con un compuesto vehículo. El tamaño de estas PNAGd puede ser tan pequeño como 2-3 unidades de monómero, pero preferiblemente son de al menos 4-6 unidades de monómero de longitud. Los pesos moleculares correspondientes para éstas son aproximadamente 400, 600, 800, 1000 y 1200 Daltons. Serán típicos polisacáridos de entre 500 y 20.000.000 Daltons.

Como se entenderá, el valor de n en la estructura anterior tiene un impacto sobre el peso molecular del antígeno. Si n es igual o superior a 300, entonces el peso molecular del polisacárido mínimo en la estructura es 60.918 Daltons (300 unidades x 203 Daltons/unidad + 18 Daltons para los sustituyentes en los restos terminales). Si el antígeno tiene un peso molecular mínimo de 100.000 Daltons, entonces o bien el polisacárido tiene más de 300 unidades, o bien el polisacárido está conjugado con un compuesto vehículo que compensa la diferencia en el peso molecular.

La invención proporciona formas tanto que existen de forma natural como sintéticas del antígeno PNAGd. Como se usa en el presente documento, la PNAGd que existe de forma natural es aquella que existe en fuentes naturales, o puede aislarse o derivar de las mismas. Los antígenos PNAGd también se proporcionan en una forma aislada. Un polisacárido aislado, tal como PNAGd aislada, es aquel que ha sido eliminado, y así separado, del entorno en el que existe normalmente. En algunos casos, un polisacárido aislado está separado suficientemente de otros compuestos para ser caracterizado estructural o funcionalmente. Por ejemplo, un polisacárido aislado puede "secuenciarse" con el fin de determinar su composición química.

La PNAGd puede prepararse a partir de cualquier cepa bacteriana que lleve el locus *ica*. Estas cepas incluyen, pero no se limitan a, *S. epidermis* y *S. aureus* y otras cepas (por ejemplo *S. carnosus*) que han sido transformadas con los genes en el locus *ica*. En particular, la PNAGd puede prepararse a partir de cepas específicas que incluyen *S. epidermidis* RP62A (número de ATCC 35984), *S. epidermis* RP12 (número de ATCC 35983), *S. epidermis* M187, *S. carnosus* TM300 (pCN27), *S. aureus* RN4220 (pCN27) y *S. aureus* MN8 mucoide.

Un método implica incubar PNAG impura con una base o ácido para producir una preparación de PNAG semipura, neutralizar la preparación y además tratar la preparación neutralizada para producir la PNAGd.

La PNAG impura nativa puede prepararse mediante una variedad de métodos que incluyen extraer una preparación de PNAG nativa cruda de un cultivo bacteriano que incluye células y sobrenadantes de cultivo libres de células, produciendo el aislamiento de un material enriquecido con PNAG nativa de alto peso molecular de la preparación de PNAG cruda, y obtenida inicialmente por precipitación de una PNAG impura que contiene el material enriquecido con PNAG de alto peso molecular con un disolvente tal como metanol, etanol, acetona o cualquier otro disolvente orgánico conocido para un experto en la materia que sea capaz de causar la precipitación de polisacáridos en disoluciones acuosas. Las etapas de extracción de la preparación de PNAG nativa cruda y aislamiento y

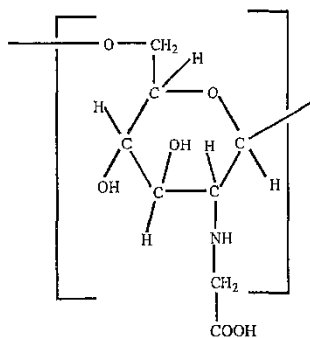
precipitación de la preparación de antígeno de PNAG nativa impura se realizan por cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, aquellos que se incluyen en la patente de EE.UU. N.º 5.055.455. Entonces, este material impuro se purifica y se desacetila para producir la PNAGd de la invención.

5 Las etapas de purificación se logran incubando PNAG impura con enzimas bacterianas que pueden digerir materiales biológicos, que incluyen agentes que rompen la pared celular tales como lisozima, lisostafina y proteinasa K, y enzimas nucleasas como DNasa y RNasa para digerir ADN y ARN. Esto va seguido de una adición de un disolvente que precipitará la PNAG en la disolución, recogida del precipitado y redisolución de la PNAG en una base tal como NaOH o un ácido tal como HCl, seguido de neutralización. La neutralización puede llevarse a cabo usando una base si la etapa de incubación se realizó con un ácido, o con un ácido si la etapa de incubación se realizó con una base. La fracción insoluble del material neutro se trata entonces, por ejemplo, por incubación en ácido fluorhídrico para producir un antígeno PNAG nativo puro, o por redisolución en tampones con un pH < 4,0, seguido de tamiz molecular y/o cromatografía de intercambio iónico.

15 Otro método de aislamiento incluye las etapas de: extraer una suspensión de PNAG cruda de un cultivo bacteriano, incubando la bacteria con una base o ácido fuerte. Preferentemente, la bacteria se agita en la base o ácido fuerte durante al menos 2 horas, y más preferentemente al menos 5, 10, 15, 18 o 24 horas. La base o ácido fuerte puede ser cualquier tipo de base o ácido fuerte, pero preferentemente tiene una concentración de NaOH o HCl al menos 1 M. En algunas realizaciones, la base o ácido fuerte es NaOH 5 M o HCl 5 M. La disolución de ácido o base se somete entonces a centrifugación para recoger los cuerpos celulares. En algunas realizaciones, el procedimiento de extracción se repite varias veces. La disolución de ácido o base resultante se neutraliza a un pH de aproximadamente 7 y luego se dializa para producir PNAG impura insoluble.

La PNAGd puede sintetizarse a partir de polisacáridos que existen de forma natural que están sustituidos con acetato más de 50 %. Por ejemplo, el antígeno PNAGd puede sintetizarse desacetilando un polímero de glucosamina altamente acetilado por medios químicos (por ejemplo, tratamiento con base) o enzimáticos.

25 Los antígenos PNAGd también pueden sintetizarse *de novo* (véase, por ejemplo, Melean et al., Carbohydrate Research, 337:1893-1916, 2002). Los materiales de partida incluyen, pero no se limitan a, poliglucosa (es decir, dextrano), poliglucosaminas como quitina o quitosano, y ácido poliglucosaminourónico. El ácido poligalactosaminourónico también puede usarse para producir el antígeno PNAGd de la invención. También pueden modificarse poliglucosaminas que diversos sustituyentes para producir el antígeno PNAG. Por ejemplo, el polisacárido intercelular adhesina (PIA) es un polímero altamente acetilado de restos de glucosamina unidos en β -1-6. PIA tiene la siguiente estructura:



35 Para aquellos polisacáridos que contienen restos de imina (C-NH), pueden formarse grupos amino libres por técnicas químicas convencionales conocidas para aquellos expertos habituales en la materia. Un método adecuado implica el uso de borohidruro de sodio. El grupo imino puede reducirse con borohidruro de sodio para crear un grupo amino libre. Esto se hace añadiendo más de 5 mg de borohidruro al polisacárido disuelto en agua destilada, mientras que se agita a temperatura ambiente durante 2 horas. Entonces, la mezcla se dializa contra agua y se liofiliza (véase, por ejemplo, DiFabio et al., Biochem J., 1987 15; 244 (1): 27-33).

40 La invención proporciona preparaciones de PNAGd de pureza variable. Como se usa en el presente documento, una "preparación de PNAGd pura" es una preparación de PNAGd que ha sido aislada o sintetizada y que está más del 92 % libre de contaminantes. Estos contaminantes incluyen formas de PNAG fuertemente sustituidas con acetato (es decir, más del 50 % de sustitución de acetato), galactosa, fosfato, ácido teicoico, y similares. En algunas realizaciones, las composiciones de PNAGd están al menos el 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % libres de contaminantes, o están el 100 % libres de contaminantes.

45 Las composiciones de PNAGd también pueden denominarse "sustancialmente libres" de contaminantes. Una composición de PNAGd sustancialmente libre de, por ejemplo, galactosa, indica la presencia de menos del 10 %, preferentemente menos del 5 %, o más preferentemente menos del 1 % de galactosa en una preparación que contiene PNAGd.

El grado de pureza de la composición de PNAGd puede evaluarse mediante cualquier medio conocido en la técnica. Por ejemplo, la pureza puede evaluarse por ensayos de análisis químicos, además de cromatografía de gases y resonancia magnética nuclear, para verificar los aspectos estructurales del material.

Otro contaminante importante de algunas preparaciones de PNAGd puede ser el ácido teicoico que contiene fosfato. La contaminación de ácido teicoico puede interferir con tanto la caracterización química como la inmunogenicidad del antígeno PNAGd de la invención. Los métodos de la invención descritos en el presente documento son capaces de producir una preparación de PNAGd aislada que está sustancialmente libre de ácido teicoico. Una preparación de PNAGd que está sustancialmente libre de ácido teicoico es una que tiene menos del 1,0 % de fosfato, y más preferentemente una que tiene menos del 0,1 % de fosfato. La cantidad de fosfato presente en la muestra puede evaluarse mediante cualquier medio conocido en la técnica. La cantidad de contaminación de fosfato puede evaluarse usando los métodos descritos en Keleti, G. y W. H. Lederer, ((1974) Handbook of Micromethods for the Biological Sciences, Van Nostrand Reinhold Co., Nueva York). Brevemente, la prueba se realiza del siguiente modo: a 100 µg de muestra se añaden 100 µl de una disolución hecha añadiendo juntos 43,5 ml de agua, 6,5 ml de 70 % de ácido perclórico (HClO₄) y 50 ml de ácido sulfúrico 20 N (H₂SO₄). Esto se calienta a 95 °C durante 2 horas en un tubo con una canica en su parte superior. La mezcla se pone entonces en un horno a 165 °C y se calienta durante 2 horas adicionales, luego se enfría a temperatura ambiente. A continuación se añade a la muestra un ml del reactivo 5, preparado por el siguiente método:

Reactivo 1: 1,36 gramos de acetato sódico.3H₂O disuelto en 10 ml de agua.

Reactivo 2: 500 mg de molibdato de amonio disuelto en 20 ml de agua.

Reactivo 3: 2 ml del reactivo 1, 2 ml del reactivo 2 y 16 ml de agua.

Reactivo 4: 2 g de ácido ascórbico disuelto en 20 ml de agua, preparado inmediatamente antes de uso.

Reactivo 5: Añadir en un baño de hielo 9 ml del reactivo 3 y 1 ml del reactivo 4.

Después de añadir el reactivo 5, los tubos se mezclan muy bien y se lee la densidad óptica a 820 nm en un espectrofotómetro. Se usa una curva patrón que consiste de fosfato de sodio monobásico (intervalo de 0,1-5 µg por tubo) para calcular la cantidad de fosfato presente en las muestras de prueba (Lowry, O.H., N.R. Roberts, K.Y. Leiner, M.L. Wu y A.L. Farr. (1954), Biol. Chem. 207,1).

Las composiciones de la invención son útiles en una variedad de aplicaciones diferentes que incluyen el diagnóstico *in vitro*, *in situ* e *in vivo* de estados patológicos, tales como infección. Las composiciones pueden usarse para inmunizar sujetos *in vivo* para prevenir o tratar una infección. Las composiciones también pueden usarse para desarrollar anticuerpos y otros péptidos de unión que son útiles para los mismos fines que las composiciones de PNAGd de la invención. Así, la invención incluye composiciones farmacéuticas que comprenden PNAGd o agentes de unión correspondientes (por ejemplo, anticuerpos), que pueden usarse para fines de vacunación para inducir inmunidad ya sea activa o pasiva en un sujeto en necesidad de la misma. Se describen métodos para generar agentes de unión, tales como anticuerpos que se unen a PNAGd, que pueden usarse para el diagnóstico y tratamiento de infecciones estafilocócicas y afecciones asociadas.

La PNAGd puede usarse en una forma conjugada o no conjugada. En una forma conjugada, la PNAGd puede conjugarse con un compuesto vehículo, ya sea directamente o mediante un conector. La conjugación puede producirse en cualquier posición en la unidad de monómero de glucosamina o en los extremos del polímero.

Un "compuesto vehículo", como se usa en el presente documento, es un compuesto que puede conjugarse con un polisacárido, ya sea directamente o mediante el uso de un conector, y que puede ser inmunológicamente activo o inerte.

Los compuestos vehículo incluyen, pero no se limitan a, proteínas, o péptidos, polisacáridos, ácidos nucleicos, u otros polímeros, lípidos y moléculas pequeñas. Las proteínas incluyen, por ejemplo, proteínas del plasma tales como albúmina de suero, inmunoglobulinas, apolipoproteínas y transferrina; polipéptidos bacterianos tales como TRPLE, β-galactosidasa, polipéptidos tales como proteína gD del herpes, alérgenos, toxoides diftéricos y tetánicos, flagelina de Salmonella, pilina de Haemophilus, proteínas de membrana de 15 kDa, 28-30 kDa y 40 kDa de Haemophilus, proteínas de *Escherichia coli*, enterotoxina de marca de calor ltb, toxina del cólera y proteínas virales que incluyen proteínas de rotavirus VP y de virus respiratorio sincitial f y g. Las proteínas útiles en la invención incluyen cualquier proteína que sea segura para su administración a mamíferos y opcionalmente que sea una proteína transportadora inmunológicamente eficaz.

Los compuestos vehículo que son particularmente útiles para inmunización incluyen proteínas, tales como hemocianina de lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina de bovino o inhibidor de tripsina de soja. Puede usarse similarmente cualquier otro compuesto que sea inmunogénico en la especie de animal que va a inmunizarse.

Se conocen en la técnica muchos métodos de conjugación de un polisacárido con una proteína. En general, el polisacárido debe activarse o hacerse de otro modo susceptible a la conjugación, es decir, debe hacerse que al

menos un resto sea susceptible a la unión covalente con una proteína u otra molécula. Muchos de tales métodos son conocidos en la técnica. Por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 4.356.170, concedida a Jennings, describe el uso de ácido peryódico para generar grupos aldehído sobre el polisacárido y entonces se realiza aminación reductora usando cianoborohidruro. La patente de EE.UU. N.º 4.663.160, concedida a Tsay et al., también usó ácido peryódico para generar grupos aldehído, pero entonces unen el polisacárido con una proteína derivatizada con un resto de 4-12 carbonos (preparado en presencia de un agente de condensación), con una reacción de base de Schiff en presencia de un agente reductor tal como cianoborohidruro. La patente de EE.UU. N.º 4.619.828, concedida a Gordon, usó bromuro de cianógeno para activar el polisacárido y entonces lo conjuga con la proteína por medio de un puente espaciador de 4-8 átomos de carbono. En la patente de EE.UU. N.º 4.808.700, concedida a Anderson y Clements, se modificó un polisacárido para producir al menos un extremo reductor usando escisión oxidativa limitada por peryodato, hidrólisis con glucosidasas, o hidrólisis ácida, y se conjugó con una proteína por medio de aminación reductora en presencia de cianoborohidruro. La patente de EE.UU. N.º 4.711.779, concedida a Porro y Costantino, describió la activación de polisacáridos introduciendo grupos amino primarios en el grupo reductor terminal usando cianoborohidruro de sodio, seguido de conversión a ésteres en presencia de derivados de ácido adípico, y conjugación con un toxoide en presencia de un solvente orgánico tal como sulfóxido de dimetilo. Se conocen en la técnica muchos otros métodos de conjugación.

El compuesto vehículo puede conjugarse con PNAGd mediante un conector o espaciador. Puede acoplarse un polisacárido a un conector o un espaciador mediante cualquier medio conocido en la técnica que incluye, por ejemplo, el uso de un extremo reductor libre del polisacárido para producir un enlace covalente con un espaciador o conector. Puede producirse un enlace covalente convirtiendo un extremo reductor libre de PNAGd en un 1-aminoglucósido libre, que posteriormente puede unirse covalentemente a un espaciador por acilación (Lundquist et al., *J. Carbohydrate Chem.*, 10:377 (1991)). Alternativamente, la PNAGd puede unirse covalentemente al espaciador usando un éster activo de N-hidroxisuccinimida como grupo activado sobre el espaciador (Kochetkov, *Carbohydrate Research*, 146:C1 (1986)). El extremo reductor libre de PNAGd también puede convertirse en una lactona usando yodo e hidróxido de potásico (Isebell et al., *Methods of Carbohydrate Chemistry*, Academic Press, Nueva York (1962)). La lactona puede unirse covalentemente al espaciador por medio de un grupo amino primario sobre el espaciador o conector. El extremo reductor libre de PNAGd también puede unirse covalentemente al conector o espaciador usando aminación reductora.

La invención engloba anticuerpos que se unen a PNAGd. Los anticuerpos pueden ser o bien anticuerpos monoclonales o bien anticuerpos policlonales. Los anticuerpos contra PNAGd se unen a PNAGd y también pueden unirse a formas de PNAG que están más del 50 % acetiladas.

Los anticuerpos policlonales generalmente se producen en animales por inyecciones subcutáneas o intraperitoneales de un antígeno y un adyuvante. Pueden generarse anticuerpos policlonales contra PNAGd inyectando PNAGd en forma conjugada o no conjugada, sola o en combinación con un adyuvante.

Un ejemplo de una preparación de anticuerpo policlonal es como sigue. Se combina PNAGd o una PNAGd conjugada con un adyuvante tal como adyuvante completo de Freund (por ejemplo, 100 µg de conjugado para conejos o ratones en 1-3 volúmenes del adyuvante de Freund), y se inyecta por vía intradérmica en múltiples sitios. Aproximadamente un mes después, los animales se refuerzan con 1/5 - 1/10 de la cantidad original del antígeno, o conjugado de antígeno, en adyuvante, por inyección subcutánea en múltiples sitios. Una o dos semanas después se extrae sangre de los animales y se ensaya el suero para la presencia de anticuerpo. Los animales pueden ser reforzados repetidamente hasta alcanzar mesetas del título de anticuerpo. El animal puede reforzarse con PNAGd sola, PNAGd conjugada o PNAGd conjugada con un compuesto vehículo diferente, con o sin un adyuvante. En algunas realizaciones, los refuerzos pueden comprender PNAG en vez de PNAGd, o pueden contener una mezcla de PNAGd y PNAG.

Además de suministrar una fuente de anticuerpos policlonales, los animales inmunizados pueden usarse para generar anticuerpos monoclonales anti-PNAGd. Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo monoclonal" se refiere a una población homogénea de inmunoglobulinas que se unen al mismo epítipo (es decir, determinante antigénico) de PNAGd. Este epítipo también puede estar presente en formas de PNAG que están más del 50 % acetiladas. Los anticuerpos monoclonales tienen el mismo reordenamiento de gen de Ig y así demuestran especificidad de unión idéntica. Pueden prepararse anticuerpos monoclonales por cualquier método conocido en la técnica, tal como por inmortalización de células del bazo aisladas del animal inmunizado, por ejemplo por fusión con células de mieloma o por transformación con el virus de Epstein Barr, y selección de clonas que expresan el anticuerpo deseado. Otros métodos implican el aislamiento de secuencias del gen de Ig reordenadas y la clonación en líneas celulares inmortalizadas. Los métodos de preparación y uso de anticuerpos monoclonales son muy conocidos en la técnica.

Pueden prepararse anticuerpos monoclonales murinos anti-PNAGd por cualquiera de estos métodos utilizando PNAGd como inmunógeno. La siguiente descripción de un método de desarrollo de un anticuerpo monoclonal anti-PNAGd es a modo de ejemplo y solo se proporciona para fines ilustrativos. Se inmunizan por vía intraperitoneal ratones Balb/c con aproximadamente 75-100 µg de PNAGd purificada en adyuvante completo de Freund. Se administran inyecciones de refuerzo de aproximadamente 25-50 µg de PNAGd en medio incompleto de Freund aproximadamente los días 15 y 35 después de la inyección inicial. En el día 60-65, los ratones reciben inyecciones

de refuerzo de aproximadamente 25 µg de PNAGd en ausencia de adyuvante. La inyección de refuerzo puede comprender alternativamente una preparación de PNAG nativa o una mezcla de PNAGd y PNAG. Tres días después, los ratones se sacrifican y las células del bazo aisladas se fusionan con células de mieloma de murino NS-1 usando polietilenglicol mediante un procedimiento tal como el descrito por Oi (Oi VT: Immunoglobulin-producing hybrid cell lines, en Herzenberg LA (ed): Selected Methods in Cellular Biology, San Francisco, California, Freeman, (1980)). Se seleccionan células de hibridoma usando hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT) y se cultivan en cultivo. Catorce a quince días después de la fusión, las células de hibridoma que producen anticuerpos monoclonales anti-PNAGd se identifican usando un radioinmunoensayo en fase sólida capturando anticuerpos anti-PNAGd del medio acondicionado con anti-IgG de ratón de cabra inmovilizado, seguido de cuantificación de PNAGd o PNAG marcada con ¹²⁵I unido específicamente. Los hibridomas que dan positivo para los anticuerpos contra PNAGd se subclonan por dilución limitante y se vuelven a probar. Entonces se prepara ascitis para los hibridomas en ratones BALB/c sensibilizados a pristano inyectando aproximadamente 1 x 10⁶ células/ratón. Se producen concentrados enriquecidos en los anticuerpos monoclonales seleccionados a partir de líquido ascítico por filtración en gel sobre S-200 y se concentran con NH₄SO₄. Los sedimentos se disuelven en una disolución de almacenamiento apropiada, tal como glicerol 50 % de glicerol/H₂O, y se almacenan a 4 °C.

Como se usa en el presente documento, un "anticuerpo anti-PNAGd" incluye anticuerpos humanizados y fragmentos de anticuerpo, así como también anticuerpos monoclonales y policlonales intactos que se unen a PNAGd y en algunos casos también a formas de PNAG que están más del 50 % acetiladas. Como se usa en el presente documento, un "anticuerpo monoclonal humanizado" es un anticuerpo monoclonal humano o fragmento funcionalmente activo del mismo que tiene al menos regiones humanas constantes, y una región de unión de PNAGd (por ejemplo, una CDR) de un mamífero de una especie diferente a la humana. Un anticuerpo monoclonal anti-PNAGd humanizado intacto en una forma aislada o en una preparación farmacéutica es particularmente adecuado para algunos aspectos de la invención. Los anticuerpos humanizados tienen utilidad clínica particular ya que reconocen específicamente PNAGd y también preferiblemente formas de PNAG nativas, pero no provocarán una respuesta inmunitaria en seres humanos contra el mismo anticuerpo. En una realización preferida, una CDR murina se injerta en la región estructural de un anticuerpo humano para preparar el "anticuerpo humanizado". Véanse, por ejemplo, L. Riechmann et al., Nature 332, 323 (1988); M. S. Neuberger et al., Nature 314, 268 (1985) y EPA 0 239 400 (publicada el 30 de septiembre de 1987).

Pueden prepararse anticuerpos monoclonales humanos por cualquiera de los métodos conocidos en la técnica, tal como los desvelados en la patente de EE.UU. N.º 5.567.610, concedida a Borrebaeck et al.; la patente de EE.UU. N.º 565.354, concedida a Ostberg; la patente de EE.UU. N.º 5.571.893, concedida a Baker et al.; Kozber, J. Immunol. 133: 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, p. 51-63 (Marcel Dekker, Inc, Nueva York, 1987), y Boerner et al., J. Immunol., 147: 86-95 (1991). Además de los métodos convencionales para preparar anticuerpos monoclonales humanos, tales anticuerpos también pueden prepararse inmunizando animales transgénicos que son capaces de producir anticuerpos humanos (por ejemplo, Jakobovits et al., PNAS USA, 90: 2551 (1993), Jakobovits et al., Nature, 362: 255-258 (1993), Bruggermann et al., Year in Immuno., 7:33 (1993); y la patente de EE.UU. N.º 5.569.825 concedida a Lonberg).

Los siguientes ejemplos de métodos de preparación de anticuerpos monoclonales humanizados que interactúan con PNAGd, y preferentemente también con otras formas de PNAG nativas, son a modo de ejemplo y se proporcionan solo para fines ilustrativos. Pueden construirse anticuerpos monoclonales humanizados, por ejemplo, reemplazando las regiones no CDR de un anticuerpo de mamífero no humano con regiones similares de anticuerpos humanos, mientras que se retienen al mismo tiempo la especificidad epitópica del anticuerpo original. Por ejemplo, CDR no humanas y opcionalmente algunas de las regiones estructurales pueden unirse covalentemente con regiones FR o Fc/pFc' humanas para producir un anticuerpo funcional. Existen en los Estados Unidos entidades que sintetizan comercialmente anticuerpos humanizados a partir de regiones de anticuerpo murinas específicas, tales como Protein Design Labs (Mountain View California), Abgenix y Medarex

La solicitud de patente europea 0239400 proporciona una enseñanza a modo de ejemplo de la producción y uso de anticuerpos monoclonales humanizados, en la que al menos la porción CDR de un anticuerpo murino (u otro mamífero no humano) se incluye en el anticuerpo humanizado. Brevemente, los siguientes métodos son útiles para construir un anticuerpo monoclonal CDR humanizado que incluye al menos una porción de una CDR de ratón. Se prepara un primer vector de expresión replicable que incluye un promotor adecuado operativamente unido a una secuencia de ADN que codifica al menos un dominio variable de una cadena pesada o ligera de Ig, y se prepara el dominio variable que comprende regiones estructurales de un anticuerpo humano y una región CDR de un anticuerpo murino. Opcionalmente, se prepara un segundo vector de expresión replicable que incluye un promotor adecuado operativamente unido a una secuencia de ADN que codifica al menos el dominio variable de una cadena ligera o pesada de Ig humana complementaria, respectivamente. Entonces se transforma una línea de células con los vectores. Preferentemente, la línea celular es una línea celular de mamífero inmortalizada de origen linfóide, tal como una línea celular de mieloma, hibridoma, trioma o cuadroma, o es una célula linfóide normal que ha sido inmortalizada por transformación con un virus. La línea celular transformada se cultiva entonces en condiciones conocidas para aquellos expertos en la materia para producir el anticuerpo humanizado.

Como se expone en la solicitud de patente europea 0239400, varias técnicas son muy conocidas en la técnica para crear los dominios de anticuerpo particulares que van a insertarse en el vector replicable (vectores y técnicas

recombinantes preferidas se tratan abajo en mayor detalle). Por ejemplo, la secuencia de ADN que codifica el dominio puede prepararse por síntesis de oligonucleótidos. Alternativamente, un gen sintético que carece de las regiones CDR, en el que cuatro regiones estructurales están fusionadas junto con sitios de restricción adecuados en las uniones, de tal manera que casetes de CDR subclonados sintéticos bicatenarios o restringidos con extremos cohesivos podrían ligarse en las uniones de las regiones estructurales. Otro método implica la preparación de la secuencia de ADN que codifica el dominio que contiene la CDR variable por mutagénesis dirigida al sitio de oligonucleótido. Cada uno de estos métodos es muy conocido en la técnica. Por lo tanto, aquellos expertos en la materia pueden construir anticuerpos humanizados que contienen una región CDR murina sin destruir la especificidad del anticuerpo para su epítoto.

También pueden obtenerse anticuerpos humanos recuperando linfocitos productores de anticuerpo de la sangre u otros tejidos de seres humanos que producen anticuerpo contra PNAGd. Estos linfocitos pueden tratarse para producir células que crecen por sí solas en el laboratorio bajo condiciones de cultivo apropiadas. Los cultivos celulares pueden cribarse para la producción de anticuerpo contra PNAGd y entonces clonarse. Pueden usarse cultivos clonales para producir anticuerpos monoclonales humanos contra PNAGd, o los elementos genéticos que codifican las porciones variables de la cadena pesada y ligera del anticuerpo pueden clonarse e insertarse en vectores de ácido nucleico para la producción de anticuerpo de tipos diferentes.

También están englobados por la invención fragmentos de anticuerpo de unión de PNAGd. Como es bien conocido conocidos en la técnica, solo una pequeña porción de una molécula de anticuerpo, el paratope, participa en la unión del anticuerpo a su epítoto (véase, en general, Clark, W.R. (1986) *The Experimental Foundations of Modern Immunology* Wiley & Sons, Inc., New York; Roitt, I. (1991) *Essential Immunology*, 7ª Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford). Las regiones pFc' y Fc del anticuerpo, por ejemplo, son efectores de la cascada de complemento, pero no participan en la unión al antígeno. Un anticuerpo del que se ha escindido enzimáticamente la región pFc', o que ha sido producido sin la región pFc', designado un fragmento F(ab')₂, retiene los dos sitios de unión al antígeno de un anticuerpo intacto. Un fragmento F(ab')₂ aislado se denomina un fragmento monoclonal bivalente debido a sus dos sitios de unión al antígeno. Similarmente, un anticuerpo del que se ha escindido enzimáticamente la región Fc, o que ha sido producido sin la región Fc, designado el fragmento Fab, retiene uno de los sitios de unión al antígeno de una molécula de anticuerpo intacto. Procediendo más, los fragmentos Fab consisten en una cadena ligera de anticuerpo unido covalentemente y una porción de la cadena pesada de anticuerpo indicada Fd (región variable de la cadena pesada). Los fragmentos Fd son el principal determinante de la especificidad del anticuerpo (un único fragmento Fd puede asociarse a hasta diez cadenas ligeras diferentes sin alterar la especificidad del anticuerpo), y los fragmentos Fd retienen la capacidad de unión al epítoto en aislamiento.

Los términos Fab, Fc, pFc', F(ab')₂ y Fv se emplean con sus significados inmunológicos estándar [Klein, *Immunology* (John Wiley, New York, NY, 1982); Clark, W.R. (1986) *The Experimental Foundations of Modern Immunology* (Wiley & Sons, Inc., New York); Roitt, I. (1991) *Essential Immunology*, 7th Ed., (Blackwell Scientific Publications, Oxford)]. Los fragmentos de anticuerpo funcionalmente activos bien conocidos incluyen, pero no se limitan a, los fragmentos F(ab')₂, Fab, Fv y Fd de los anticuerpos. Estos fragmentos que carecen del fragmento Fc del anticuerpo intacto se eliminan más rápidamente de la circulación y pueden tener menos unión inespecífica de tejido que un anticuerpo intacto (Wahl et al., *J. Nucl. Med.* 24:316-325 (1983)). Por ejemplo, pueden construirse anticuerpos monocatenarios según los métodos descritos en la patente de EE.UU. N.º 4.946.778 a Ladner et al. Tales anticuerpos monocatenarios incluyen las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas unidas por un resto de conector flexible. También se han informado métodos de obtención de un anticuerpo de un solo dominio ("Fd") que comprende un único dominio variable aislado de cadena pesada (véase, por ejemplo, Ward et al., *Nature* 341:644-646 (1989), que desvela un método de cribado para identificar una región variable de la cadena pesada de anticuerpo (anticuerpo de un único dominio V_H), con afinidad suficiente por su epítoto diana para unirse al mismo en una forma aislada). Métodos de preparación de fragmentos Fv recombinantes basados en secuencias conocidas de la región variable de cadena pesada y cadena ligera de anticuerpo son conocidos en la técnica y han sido descrito, por ejemplo, Moore et al., patente de EE.UU. N.º 4.462.334. Otras referencias que describen el uso y la generación de fragmentos de anticuerpo incluyen, por ejemplo, fragmentos Fab (Tijssen, *Practice and Theory of Enzyme Immunoassays* (Elsevier, Amsterdam, 1985)), fragmentos Fv (Hochman et al., *Biochemistry* 12: 1130 (1973); Sharon et al., *Biochemistry* 15: 1591 (1976); Ehrlich et al., patente de EE.UU. N.º 4.355.023) y porciones de moléculas de anticuerpo (Audilore-Hargreaves, patente de EE.UU. N.º 4.470.925). Así, los expertos en la materia pueden construir fragmentos de anticuerpo de diversas porciones de anticuerpos intactos sin destruir la especificidad de los anticuerpos por el epítoto de PNAGd. Debe entenderse que el epítoto reconocido por anticuerpos anti-PNAGd también puede estar presente en otras formas de PNAG nativas.

Los fragmentos de anticuerpo también engloban "fragmentos de anticuerpo humanizado". Como reconocerá un experto en la materia, tales fragmentos podrían prepararse por escisión enzimática tradicional de anticuerpos humanizados intactos. Sin embargo, si los anticuerpos intactos no son susceptibles a tal escisión debido a la naturaleza de la construcción implicada, las construcciones indicadas pueden prepararse con fragmentos de inmunoglobulina usados como materiales de partida, o si se usan técnicas recombinantes, las secuencias de ADN mismas pueden adecuarse para que codifiquen el "fragmento" deseado que, cuando se expresa, puede combinarse *in vivo* o *in vitro*, por métodos químicos o biológicos, para preparar el fragmento de inmunoglobulina intacto deseado final.

Pueden usarse otros agentes de unión de PNAGd que tienen especificidad de unión por PNAGd en los métodos de diagnóstico descritos. Pueden usarse varios ensayos rutinarios para identificar fácilmente péptidos de unión de PNAGd. Se realizan ensayos de cribado para identificar los péptidos de la invención, por ejemplo, usando procedimientos de presentación en fago tales como aquellos descritos en Hart et al., J. Biol. Chem. 269:12468 (1994). Hart et al. informan de una genoteca de presentación en fago filamentoso para identificar ligandos de péptido novedosos para receptores de células de mamífero. En general, las genoteca de presentación en fago que usan, por ejemplo, el fago M13 o fd, se preparan usando procedimientos convencionales, tales como aquellos descritos en la referencia anterior. Las genotecas presentan inserciones que contienen de 4 a 80 restos de aminoácidos. Las inserciones representan opcionalmente péptidos completamente degenerados o una matriz orientada de péptidos. Se obtienen ligandos que se unen selectivamente a PNAGd seleccionando el fago que expresa sobre su superficie un ligando que se une a PNAGd. Entonces, este fago se somete a varios ciclos de reelección para identificar el fago que expresa el ligando de péptido que tiene las características de unión más útiles. Normalmente, los fagos que presentan las mejores características de unión (por ejemplo, afinidad más alta) se caracterizan adicionalmente por análisis de ácido nucleico para identificar las secuencias de aminoácido particulares de los péptidos expresados sobre la superficie del fago, y la longitud óptima del péptido expresado para lograr una unión óptima a PNAGd.

Alternativamente, tales ligandos de péptido pueden seleccionarse de genotecas combinatorias de péptidos que contienen uno o más aminoácidos. Además, pueden sintetizarse genotecas tales que contengan restos sintéticos no peptídicos que estén menos sujetos a degradación enzimática en comparación con sus homólogos que existen de forma natural.

Para determinar si un péptido se une a PNAGd puede emplearse cualquier ensayo de unión conocido. Por ejemplo, el péptido puede inmovilizarse sobre una superficie y entonces ponerse en contacto con una PNAGd marcada. La cantidad de PNAGd que interacciona con el péptido, o la cantidad que no se une al péptido, puede entonces cuantificarse para determinar si el péptido se une a PNAGd. Una superficie que tiene un anticuerpo anti-PNAGd inmovilizado en la misma puede servir de control positivo. Los ensayos de unión también pueden determinar el grado al que un anticuerpo específico de PNAGd putativo se une a otras formas nativas de PNAG.

Las composiciones de la invención son útiles para muchas aplicaciones *in vivo* e *in vitro*. Por ejemplo, las composiciones de la invención son útiles para producir una respuesta de anticuerpos, por ejemplo, como una vacuna para la inmunización activa de seres humanos y animales para prevenir infección estafilocócica e infecciones causadas por otras especies de bacterias que producen PNAG; como una vacuna para la inmunización de seres humanos o animales para producir anticuerpos anti-PNAGd que pueden administrarse a otros seres humanos o animales para prevenir o tratar infecciones estafilocócicas; como un antígeno para cribar agentes biológicos tales como anticuerpos monoclonales capaces de prevenir la infección estafilocócica, genotecas de genes implicados en la producción de anticuerpos, o peptidomiméticos; como un reactivo de diagnóstico para infecciones estafilocócicas e infecciones causadas por otras especies de bacterias que producen PNAG; y como un reactivo de diagnóstico para determinar el estado inmunológico de seres humanos o animales con respecto a su susceptibilidad a infecciones estafilocócicas e infecciones causadas por otras especies de bacterias que producen PNAG.

Puede usarse PNAGd para proteger a un sujeto contra la infección por bacterias que producen PNAG, induciendo la inmunidad activa para la infección por estafilococos en un sujeto. El método se lleva a cabo administrando al sujeto una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmunitaria, tal como una respuesta de anticuerpo contra estafilococos, de cualquiera de las composiciones de PNAGd de la invención. Como se usa en el presente documento, "inmunidad activa" implica la introducción de un antígeno en un sujeto de forma que el antígeno produzca la diferenciación de algunas células linfoides en células que producen anticuerpo, y en algunos casos de otras células linfoides en células de memoria. Las células de memoria no secretan anticuerpos, sino que incorporan los anticuerpos en su membranas con el fin de detectar el antígeno si se administra al cuerpo otra vez.

El método es útil para inducir inmunidad contra la infección por estafilococos. Como se usa en el presente documento, "estafilococos" se refiere a todas las especies bacterianas estafilocócicas que expresan PNAG. Aunque no pretende quedar ligado a mecanismo particular alguno, se cree que las formas altamente acetiladas de PNAG (es decir, > 50 % acetiladas) no son capaces de provocar la producción de anticuerpos opsonicos protectores al mismo grado que PNAGd. Las bacterias que se clasifican como estafilococos son muy conocidas para aquellos expertos en la materia y se describen en la bibliografía de microbiología. Los estafilococos que expresan PNAG incluyen, pero no se limitan a, *Staphylococcus epidermidis* (que incluye RP62A (N.º de ATCC: 35984), RP12 (N.º de ATCC: 35983), y M187), *Staphylococcus aureus* (que incluye RN4220 (pCN27) y MN8 mucoide), y cepas tales como *Staphylococcus carnosus* transformado con los genes en el locus *ica* (que incluyen TM300 (pCN27)). Otras cepas bacterianas que expresan PNAG pueden ser fácilmente identificadas por aquellos expertos habituales en la materia. Por ejemplo, las bacterias estafilocócicas que expresan el locus *ica* expresarán PNAG. Un experto habitual en la materia puede cribar fácilmente la expresión de ARNm o proteína relacionada con el locus *ica*, ya que la secuencia de ácido nucleico del locus *ica* es conocida (SEQ ID NO: 1 y descrita originalmente por Heilmann, C., O. Schweitzer, C. Gerke, N. Vanittanakom, D. Mack y F. Gotz (1996) Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*, Molec. Microbiol. 20:1083). También pueden identificarse cepas bacterianas que expresan PNAG por microscopía inmunoelectrónica (u otro inmunoensayo) que usa anticuerpos anti-PNAG o anticuerpos anti-PNAGd para detectar la presencia de PNAG sobre la superficie de las bacterias. Además, puede aislarse y analizarse la cápsula de cepas bacterianas usando cromatografía de líquidos y espectroscopía de masas.

Como se usa en el presente documento, un "sujeto" es un mamífero de sangre caliente e incluye, por ejemplo, seres humanos, primates, caballos, vacas, cerdos, cabras, ovejas, perros y gatos. En algunas realizaciones, el sujeto es un sujeto no roedor. Un sujeto no roedor es cualquier sujeto como se ha definido anteriormente, pero que excluye específicamente roedores tales como ratones, ratas y conejos. En algunas realizaciones, el sujeto preferido es un ser humano.

Puede administrarse PNAGd a cualquier sujeto capaz de inducir una respuesta inmunitaria, tal como una respuesta de anticuerpo a un antígeno. El antígeno es especialmente adecuado para inducir inmunización activa contra la infección sistémica causada por estafilococos en un sujeto capaz de producir una respuesta inmunitaria y en riesgo de desarrollar una infección estafilocócica. Un sujeto capaz de producir una respuesta inmunitaria y en riesgo de desarrollar una infección estafilocócica es un mamífero que posee un sistema inmunitario que está en riesgo de ser expuesto a estafilococos ambientales. Por ejemplo, los pacientes hospitalizados están en riesgo de desarrollar infección estafilocócica como resultado de exposición a las bacterias en ambiente del hospital. Poblaciones en riesgo particularmente alto de desarrollar infección por *S. aureus* incluyen, por ejemplo, pacientes con enfermedad renal en diálisis e individuos sometidos a cirugía de alto riesgo. Poblaciones en alto riesgo de desarrollar infección por *S. epidermidis* también incluyen, por ejemplo, pacientes con dispositivos médicos permanentes, tales como líneas intravenosas (por ejemplo, líneas centrales) o prótesis (por ejemplo, prótesis de reemplazo de cadera o rodilla), debido a que las cepas clínicas frecuentemente son muy adherentes a las superficies de plástico debido a su material extracelular (denominado biopelícula o limo). En algunas realizaciones, el sujeto es un sujeto que ha recibido un implante de dispositivo médico, y en otras realizaciones el sujeto es uno que no ha recibido un implante de dispositivo médico pero puede estar programado que reciba uno. Sujetos en alto riesgo de desarrollar infección por *S. epidermidis* incluyen además, por ejemplo, recién nacidos prematuros y pacientes que reciben quimioterapia.

Puede administrarse PNAGd al sujeto en una cantidad eficaz para inducir una respuesta de anticuerpo. Como se usa en el presente documento, una "cantidad eficaz para inducir una respuesta inmunitaria (por ejemplo, una respuesta de anticuerpo)", es una cantidad de PNAGd que es suficiente para (i) ayudar al sujeto a producir su propia protección inmunitaria, por ejemplo, induciendo la producción de anticuerpos anti-PNAGd en el sujeto (que pueden reconocer tanto PNAGd como formas altamente acetiladas de PNAG), induciendo la producción de células de memoria, y posiblemente una reacción de linfocitos citotóxicos, etc., o (ii) prevenir que ocurra la infección por estafilococos en un sujeto que se expone a estafilococos.

En algunas realizaciones preferidas, la cantidad eficaz de una vacuna de PNAGd para estimular una respuesta inmunitaria es una cantidad de vacuna de PNAGd que es capaz de provocar la producción de anticuerpos que son reactivos de forma cruzada con al menos dos especies de *Staphylococcus*, por ejemplo *S. aureus* y *S. epidermidis*.

Un experto habitual en la materia puede evaluar si una cantidad de PNAGd es suficiente para inducir inmunidad activa por métodos rutinarios conocidos en la técnica. Por ejemplo, la capacidad de un antígeno específico para producir anticuerpo en un mamífero puede evaluarse cribando anticuerpos en un ratón u otro sujeto usando el antígeno PNAGd.

Los anticuerpos anti-PNAGd de la invención son útiles para inducir inmunización pasiva en un sujeto previniendo el desarrollo de infección sistémica en aquellos sujetos en riesgo de exposición a agentes infecciosos. El método para inducir la inmunidad pasiva para la infección por estafilococos tales como *Staphylococcus aureus* se realiza administrando a un sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-PNAGd para inducir una respuesta inmunitaria a los estafilococos, por ejemplo, produciendo la opsonización de estafilococos tales como *Staphylococcus aureus*. Como se usa en el presente documento, "inmunidad pasiva" implica la administración de anticuerpos a un sujeto, en la que los anticuerpos son producidos en un sujeto diferente (incluyendo sujetos de la misma especie y diferentes), de forma que los anticuerpos se unan a la superficie de las bacterias y produzcan que las bacterias sean fagocitadas.

El anticuerpo anti-PNAGd puede administrarse a cualquier sujeto en riesgo de desarrollar una infección estafilocócica para inducir inmunidad pasiva, y en algunas realizaciones puede ser particularmente adecuado para sujetos incapaces de inducir inmunidad activa a PNAGd. Como la vacunación con PNAGd podría no ser completamente eficaz en sujetos inmunocomprometidos en alto riesgo, estos sujetos se beneficiarán del tratamiento con preparaciones de anticuerpo producidas contra estafilococos, tales como *Staphylococcus aureus*. Un sujeto que es incapaz de inducir una respuesta inmunitaria es un sujeto inmunocomprometido (por ejemplo, un paciente que recibe quimioterapia, paciente con SIDA, etc.), o un sujeto que aún no ha desarrollado un sistema inmunitario (por ejemplo, un recién nacido prematuro).

El anticuerpo anti-PNAGd puede administrarse a un sujeto en riesgo de desarrollar una infección estafilocócica para prevenir que el agente infeccioso se multiplique en el cuerpo o para destruir el agente infeccioso. El anticuerpo anti-PNAG también puede administrarse a un sujeto que ya tiene una infección causada por estafilococos, para prevenir que el agente infeccioso se multiplique en el cuerpo o para destruir el agente infeccioso.

El anticuerpo anti-PNAGd de la invención se administra al sujeto en una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmunitaria a estafilococos, tales como *Staphylococcus aureus*. Como se usa en el presente documento, "una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmunitaria a estafilococos" es una cantidad de anticuerpo anti-PNAGd

que es suficiente para (i) prevenir que ocurra la infección por estafilococos en un sujeto que se expone a estafilococos; (ii) inhibir el desarrollo de la infección, es decir, detener o retardar su desarrollo; o (iii) aliviar la infección, es decir, erradicación de las bacterias en sujetos infectados.

5 Usando procedimientos rutinarios conocidos para aquellos expertos habituales en la materia, puede determinarse si una cantidad de anticuerpo anti-PNAGd es una "cantidad eficaz para inducir una respuesta inmunitaria a estafilococos", en un ensayo de opsonización *in vitro* que es predictivo del grado de opsonización de un anticuerpo. Un anticuerpo que opsoniza una bacteria estafilocócica es aquél que cuando se añade a una muestra de bacterias estafilocócicas produce la fagocitosis de las bacterias. Un ensayo de opsonización puede ser un ensayo colorimétrico, un ensayo quimioluminiscente, un ensayo fluorescente o de captación de radiomarca, un ensayo bactericida mediada por célula, u otro ensayo que mida el potencial opsónico de un material. Puede usarse el siguiente ensayo de opsonización para determinar una cantidad eficaz de anticuerpo anti-PNAGd. El anticuerpo anti-PNAGd se incuba con bacterias estafilocócicas y una célula fagocítica eucariota, y opcionalmente proteínas complementarias. La capacidad opsónica del anticuerpo anti-PNAG se determina basándose en la cantidad de estafilococos que permanecen después de la incubación. Esto puede llevarse a cabo comparando el número de estafilococos supervivientes entre dos ensayos similares, solo uno de las cuales incluye la inmunoglobulina opsonizante. Una reducción en el número de estafilococos en comparación con incubación con la inmunoglobulina no específica de control, indica opsonización.

Los métodos descritos también son útiles para inducir inmunización pasiva a estafilococos en un sujeto, administrando al sujeto una cantidad eficaz para inducir opsonización de estafilococos de un anticuerpo anti-dPNAG_{puro}. Como se usa en el presente documento, un anticuerpo anti-dPNAG_{puro} es un anticuerpo que interacciona específicamente con un antígeno PNAGd puro de la invención e induce opsonización de estafilococos coagulasa negativos o coagulasa positivos, pero que puede no interaccionar con una preparación impura de PNAGd. Como se trata anteriormente, las preparaciones de PNAGd impuras pueden ser contaminadas con ácido teicoico u otras impurezas que pueden interferir con la inmunogenicidad del antígeno. Un experto habitual en la materia puede identificar fácilmente si un anticuerpo anti-PNAGd es un anticuerpo anti-dPNAG_{puro} usando ensayos de unión rutinarios. Por ejemplo, puede inmovilizarse un anticuerpo anti-PNAGd sobre una superficie y entonces ponerse en contacto con una preparación de PNAGd impura marcada, o una preparación de PNAGd pura marcada. Entonces puede cuantificarse la cantidad de preparación de PNAGd (preparación pura frente a impura) que interacciona con el anticuerpo o la cantidad que no se une al anticuerpo, para determinar si el anticuerpo se une a una preparación de PNAGd impura. En realizaciones importantes, el anticuerpo anti-dPNAG_{puro} es eficaz contra estafilococos coagulasa negativos y coagulasa positivos o contra cualquier organismo microbiano apropiado que exprese PNAGd o PNAG altamente acetilada sobre su superficie.

Puede formularse antígeno PNAGd como una vacuna. Un medio vehículo adecuado para formular una vacuna incluye disolución salina tamponada con fosfato (pH 7,4) o gel de fosfato de aluminio 0,125 M suspenso en disolución salina tamponada con fosfato a pH 6, y otros medios convencionales. Generalmente, las vacunas contienen de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 µg, y preferentemente aproximadamente 10-50 µg del antígeno para provocar niveles eficaces de anticuerpo en mamíferos de sangre caliente. Cuando el PNAGd se administra como una vacuna puede incluir opcionalmente un adyuvante.

El término "adyuvante" pretende incluir cualquier sustancia que se incorpora o se administra simultáneamente con PNAGd, que potencia la respuesta inmunitaria en el sujeto. Los adyuvantes incluyen, pero no se limitan a, compuestos de aluminio, por ejemplo, geles, hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio, y adyuvante completo o incompleto de Freund (por ejemplo, en el que el antígeno PNAGd se incorpora en la fase acuosa de una emulsión estabilizada de agua en aceite de parafina). El aceite de parafina puede sustituirse con diferentes tipos de aceites, por ejemplo, escualeno o aceite de cacahuete. Otros materiales con propiedades de adyuvante incluyen BCG (*Mycobacterium tuberculosis* atenuado), fosfato de calcio, levamisol, isoprinosina, polianiones (por ejemplo, poli-A:U), lentinano, toxina pertusis, lípido A, saponinas, QS-21 y péptidos, por ejemplo, dipéptido de muramilo. También pueden usarse como adyuvantes sales de tierras raras, por ejemplo, lantano y cerio. La cantidad de adyuvantes depende del sujeto y el antígeno PNAGd particular usado (por ejemplo, el nivel de sustitución de acetato), y puede ser fácilmente determinada por un experto en la materia sin excesiva experimentación.

En general, cuando se administran para fines terapéuticos, las formulaciones de la invención se aplican en disoluciones farmacéuticamente aceptables. Tales preparaciones pueden contener rutinariamente concentraciones farmacéuticamente aceptables de sal, agentes de tamponamiento, conservantes, vehículos compatibles, adyuvantes y opcionalmente otros componentes terapéuticos.

Las composiciones de la invención puede administrarse en sí mismas (puras) o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Cuando se usan en medicina, las sales deben ser farmacéuticamente aceptables, pero pueden usarse convenientemente sales no farmacéuticamente aceptables para preparar sales farmacéuticamente aceptables, y no se excluyen del alcance de la invención. Tales sales farmacológica y farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, aquellas preparadas a partir de los siguientes ácidos: clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, p-toluenosulfónico, tartárico, cítrico, metanosulfónico, fórmico, malónico, succínico, naftaleno-2-sulfónico y bencenosulfónico. Por tanto, pueden

prepararse sales farmacéuticamente aceptables como sales de metal alcalino o alcalinotérreo, tales como las sales de sodio, potasio o calcio del grupo ácido carboxílico.

5 Agentes de tamponamiento adecuados incluyen: ácido acético y una sal (1-2 % p/v); ácido cítrico y una sal (1-3 % p/v); ácido bórico y una sal (0,5-2,5 % p/v); y ácido fosfórico y una sal (0,8-2 % p/v), Conservantes adecuados incluyen cloruro de benzalconio (0,003-0,03 % p/v); clorobutanol (0,3-0,9 % p/v); parabenos (0,01-0,25 % p/v) y timerosal (0,004-0,02 % p/v).

10 La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas para uso médico que comprenden PNAGd junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables y opcionalmente otros componentes terapéuticos. El término "vehículo farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento y se describe más completamente abajo, significa una o más cargas, diluyentes o sustancias de encapsulación sólidas o líquidas compatibles que son adecuados para administración a un ser humano u otro animal. En la presente invención, el término "vehículo" indica un componente orgánico o inorgánico, natural o sintético, con el cual se combina el principio activo para facilitar la administración. Los componentes de las composiciones farmacéuticas también son capaces de ser mezclados con PNAGd y entre sí, de modo que no haya interacción que deteriorara sustancialmente la eficiencia farmacéutica deseada.

15 Composiciones adecuadas para administración parenteral comprenden convenientemente una preparación acuosa estéril del polisacárido, que puede ser isotónica con la sangre del receptor. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están agua, disolución de Ringer y disolución isotónica de cloruro de sodio. Además, convencionalmente se emplean aceites no volátiles como disolvente o medio de suspensión. Para este fin puede emplearse cualquier aceite no volátil suave, incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos. Además, en la preparación de inyectables encuentran uso ácidos grasos tales como ácido oleico. Formulaciones de vehículo adecuadas para administraciones subcutáneas, intramusculares, intraperitoneales, intravenosas, etc., pueden encontrarse en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA.

20 Las preparaciones de la invención se administran en cantidades efectivas. Una cantidad eficaz, como se trata anteriormente, es aquella cantidad de PNAGd o anticuerpo anti-PNAGd que sola, o junto con dosis adicionales, inducirá inmunidad activa u opsonización de las bacterias infecciosas, respectivamente. Se cree que serán eficaces dosis que oscilan de 1 nanogramo/kilogramo a 100 miligramos/kilogramo, dependiendo del modo de administración. Se cree que el intervalo preferido está entre 500 nanogramos y 500 microgramos/kilogramo, y lo más preferentemente entre 1 microgramo y 100 microgramos/kilogramo. La cantidad absoluta dependerá de una variedad de factores que incluyen si la administración se realiza en un sujeto de alto riesgo aún no infectado con las bacterias, o en un sujeto que ya tiene la infección, el tratamiento concurrente, el número de dosis y los parámetros individuales del paciente que incluyen edad, estado físico, tamaño y peso. Estos son factores muy conocidos para aquellos expertos habituales en la materia y pueden ser tratados con no más que experimentación rutinaria. Generalmente se prefiere usar una dosis máxima, es decir, la dosis segura más alta según el criterio médico sensato.

30 Se contemplan dosis múltiples de las composiciones farmacéuticas de la invención. Generalmente, los esquemas de inmunización implican la administración de una dosis alta de un antígeno, seguida de dosis posteriores más bajas de antígeno después de un período de espera de varias semanas. También se pueden administrar más dosis. El programa de dosificación para inmunización pasiva sería bastante diferente, con administración más frecuente si fuera necesario. Puede usarse cualquier régimen que produzca una respuesta inmunitaria potenciada a la infección bacteriana y/o posterior protección de la infección. Intervalos de tiempo deseados para la administración de dosis múltiples de una PNAGd particular pueden ser determinados por un experto habitual en la materia empleando no más que experimentación de rutina.

45 Está disponible una variedad de vías de administración. El modo particular seleccionado dependerá, por supuesto, de la PNAGd particular seleccionada, la afección particular que está tratándose y la dosificación requerida para eficacia terapéutica. Los métodos, en términos generales, pueden ponerse en práctica usando cualquier modo de administración que sea médicamente aceptable, que significa cualquier modo que produzca niveles eficaces de una respuesta inmunitaria sin causar efectos adversos clínicamente inaceptables. Modos preferidos de administración son las vías parenterales. El término "parenteral" incluye inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal e intraesternal, o técnicas de infusión. Otras vías incluyen, pero no se limitan a, oral, nasal, dérmica, sublingual y local.

50 Las composiciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse por cualquiera de los métodos muy conocidos en la técnica de la farmacia. Todos los métodos incluyen la etapa de poner la PNAGd o un agente de unión de PNAGd en asociación con un vehículo que constituye uno o más componentes accesorios. En general, las composiciones se preparan poniendo íntima y uniformemente el polímero en asociación con un vehículo líquido, un vehículo sólido finamente dividido, o ambos, y luego si fuera necesario, dando forma al producto. El polímero puede almacenarse liofilizado.

Otros sistemas de administración pueden incluir sistemas de administración de liberación controlada, liberación retardada o liberación sostenida. Tales sistemas pueden evitar administraciones repetidas de los polisacáridos de la invención, aumentando la conveniencia para el sujeto y el médico. Están disponibles muchos tipos de sistemas de

administración de liberación y son conocidos para aquellos expertos habituales en la materia. Incluyen sistemas basados en polímero tales como ácido poliláctico y poliglicólico, polianhídridos y policaprolactona; sistemas no poliméricos que son lípidos que incluyen esteroides tales como colesterol, ésteres de colesterol y ácidos grasos o grasas neutras tales como mono-, di- y triglicéridos; sistemas de liberación de hidrogel; sistemas silásticos; sistemas basados en péptido; recubrimientos de cera, comprimidos por compresión usando aglutinantes y excipientes convencionales; implantes parcialmente fusionados y similares. Ejemplos específicos incluyen, pero no se limitan a: (a) sistemas de erosión en los que el polisacárido está contenido en una forma dentro de una matriz, encontrado en las patentes de EE.UU. N.º 4.452.775 (Kent); 4.667.014 (Nestor y otros); y 4.748.034 y 5.239.660 (Leonard), y (b) sistemas de difusión en los que un componente activo penetra a una velocidad controlada a través de un polímero, encontrado en las patentes de EE.UU. N.º 3.832.253 (Higuchi et al.) y 3.854.480 (Zaffaroni). Además, puede usarse un sistema de administración de hardware basado en bomba, algunos de los cuales están adaptados para implantación.

También se apreciará por aquellos expertos habituales en la materia que los antígenos PNAG de la presente invención pueden tener propiedades de adyuvante por sí solos. En la medida que los polisacáridos descritos en la presente potencian respuestas inmunitarias humanas, pueden usarse como adyuvantes en combinación con otros materiales.

Pueden administrarse los antígenos PNAGd y anticuerpos anti-PNAGd de la invención conjuntamente con otro fármaco antibacteriano (es decir, bactericida), o en forma de combinaciones antibacterianas o con otros antígenos bacterianos o anticuerpos antibacterianos. Una combinación de antibióticos antibacterianos es una mezcla de cualquiera de las composiciones de la invención con un fármaco antibacteriano. El uso de antibióticos en el tratamiento de infección bacteriana es rutinario. El uso de antígenos para inducir inmunización activa y anticuerpos para inducir inmunización pasiva también es rutinario. En esta realización, un vehículo de administración común (por ejemplo, comprimido, implante, disolución inyectable, etc.) podría contener tanto la composición útil en presente invención como el fármaco antibiótico antibacteriano y/o antígeno o anticuerpo. Alternativamente, el fármaco antibiótico antibacteriano y/o antígeno o anticuerpo pueden dosificarse por separado. El agente antibacteriano (por ejemplo, un antibiótico) también puede conjugarse con PNAGd o con un anticuerpo anti-PNAGd.

Los fármacos antibióticos antibacterianos son muy conocidos e incluyen: penicilina G, penicilina V, ampicilina, amoxicilina, bacampicilina, ciclacilina, epicilina, hetacilina, pivampicilina, metilicina, nafcilina, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina, flucloxacilina, carbenicilina, ticarcilina, avlocilina, mezlocilina, piperacilina, amdinocilina, cefalexina, cefradina, cefadroxilo, cefaclor, cefazolina, cefuroxima axetilo, cefamandol, cefonicid, cefoxitin, cefotaxima, ceftizoxima, cefinenoxina, ceftriaxona, moxalactam, cefotetan, cefoperazona, ceftazidima, imipenem, clavulanato, timentin, sulbactam, neomicina, eritromicina, metronidazol, cloranfenicol, clindamicina, lincomicina, vancomicina, trimetoprim-sulfametoxazol, aminoglucósidos, quinolonas, tetraciclinas y rifampinas (véase Goodman and Gilman's, Pharmacological Basics of Therapeutics, 8ª ed., 1993, McGraw Hill Inc.).

Otros antígenos de polisacárido y anticuerpos son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, los siguientes antígenos de polisacárido, y/o anticuerpos para los mismos, pueden administrarse conjuntamente con el antígeno PNAGd y/o anticuerpo para el mismo: antígeno Vi de la cápsula de *Salmonella typhi* (Szu, S. C., X. Li, A. L. Stone y J. B. Robbins, Relation between structure and immunologic properties of the Vi capsular polysaccharide, Infection and Immunity 59:4555-4561 (1991)); cápsula K5 de *E. coli* (Vann, W., M. A. Schmidt, B. Jann y K. Jann, The structure of the capsular polysaccharide (K5 antigen) of urinary tract infective Escherichia coli, O10:K5:H4. A polymer similar to desulfoheparin, European Journal of Biochemistry 116:359-364, (1981)); cápsula de tipo 5 de *Staphylococcus aureus* (Fournier, J.-M., K. Hannon, M. Moreau, W. W. Karakawa y W. F. Vann, Isolation of type 5 capsular polysaccharide from Staphylococcus aureus, Ann. Inst. Pasteur/Microbiol. (Paris). 138:561-567, (1987)); expolisacárido II de *Rhizobium meliloti* (Glazebrook, J. y G. C. Walker, A novel expolisaccharide can function in place of the calcofluor-binding expolisaccharide in nodulation of alfalfa by Rhizobium meliloti, Cell, 65:661-672 (1989)); estreptococos del grupo B de tipo III (Wessels, M. R., V. Pozsgay, D. L. Kasper y H. J. Jennings, Structure and immunochemistry of an oligosaccharide repeating unit of the capsular polysaccharide of type III group B Streptococcus, Journal of Biological Chemistry, 262:8262-8267 (1987)); cadena lateral O-específica Fisher 7 de *Pseudomonas aeruginosa* (Knirel, Y. A., N. A. Paramonov, E. V. Vinogradov, A. S. Shashkov, B. A. N. K. Kochetkov, E. S. Stanislavsky y E. V. Kholodkova, Somatic antigens of *Pseudomonas aeruginosa*; The structure of O-specific polysaccharide chains of lipopolysaccharides of *P. aeruginosa* 03 (Lanyi), 025 (Wokatsch) and Fisher immunotypes 3 and 7, European Journal of Biochemistry, 167:549, (1987)); cadena lateral O-específica de *Shigella sonnei* (Kenne, L., B. Lindberg y K. Petersson, Structural studies of the O-specific side-chains of the Shigella sonnei phase I lipopolysaccharide, Carbohydrate Research, 78:119-126, (1980)); cápsula de tipo I de *S. pneumoniae* (Lindberg, B., Lindqvist, B., Lonngren, J., Powell, D. A., Structural studies of the capsular polysaccharide from Streptococcus pneumoniae type 1, Carbohydrate Research, 78:111-117 (1980)); y antígeno del grupo de *Streptococcus pneumoniae* (Jennings, H. J., C. Lugowski y N. M. Young, Structure of the complex polysaccharide C-substance from Streptococcus pneumoniae type 1, Biochemistry, 19:4712-4719 (1980)).

Otros antígenos no polipeptídicos y anticuerpos para los mismos son muy conocidos para aquellos expertos en la materia y pueden usarse conjuntamente con las composiciones de PNAGd de la invención.

Los antígenos PNAGd y anticuerpos también son útiles en ensayos de diagnóstico para determinar un estado inmunológico de un sujeto o muestra, o pueden usarse como reactivos en inmunoensayos. Por ejemplo, los anticuerpos pueden usarse para detectar la presencia en una muestra de una bacteria que tiene PNAG sobre la superficie. Si la bacteria está presente en la muestra, entonces los anticuerpos pueden usarse para tratar al sujeto infectado. Los anticuerpos también pueden usarse para cribar bacterias para la presencia de antígeno PNAG y para aislar antígeno PNAGd o PNAG y bacterias que contienen el antígeno PNAGd o PNAG de mezclas complejas.

Pueden llevarse a cabo los ensayos anteriormente descritos y cualquier otro ensayo conocido en la técnica marcando la PNAGd o anticuerpos y/o inmovilizando la PNAGd o anticuerpos sobre una matriz insoluble. Los métodos analíticos y de diagnóstico para usar PNAGd y/o sus anticuerpos usan al menos uno de los siguientes reactivos: análogo de analito marcado, análogo de analito inmovilizado, componente de unión marcado, componente de unión inmovilizado y conjugados estéricos. La marca usada puede ser cualquier funcionalidad detectable que no interfiere con la unión del analito y su componente de unión. Se conocen numerosas marcas para tal uso en inmunoensayos. Por ejemplo, compuestos que pueden detectarse directamente, tales como fluorocromo, marcas quimioluminiscentes y radiactivas, además de compuestos que pueden detectarse mediante reacción o derivatización, tales como enzimas. Ejemplos de estos tipos de marcas incluyen los radioisótopos ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H y ^{131}I , fluoróforos tales como quelatos de tierras raras o fluoresceína, y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferasas como luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (patente de EE.UU. N.º 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalavinadionas, peroxidasa de rábano (HRP), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas tales como glucosa oxidasas, galactosa oxidasas y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Oxidasas heterocíclicas tales como uricasa y xantina oxidasas, acopladas a una enzima que usa peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de colorante, tal como HRP, lactoperoxidasa, o microperoxidasa, biotina avidina, marcas de espín, marcas de bacteriófago y radicales libres estables.

Las marcas pueden conjugarse con PNAGd o anticuerpo anti-PNAGd por métodos conocidos para aquellos expertos habituales en la materia. Por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 3.940.475 y 3.645.090, demuestran la conjugación de fluoróforos y enzimas con anticuerpos. Otros ensayos que se usan comúnmente con antígeno y anticuerpo, y que pueden usarse según la invención, incluyen los ensayos de competencia y sándwich.

La invención incluye un método de preparación de antígeno PNAGd, produciendo una célula hospedera que expresa PNAG, introduciendo un locus *ica* en una célula, aislando el antígeno PNAG de una célula tal, y desacetilando el antígeno para formar PNAGd. Puede prepararse una célula hospedera de PNAG transfactando, transduciendo o transformando una célula con el ácido nucleico que codifica el gen *ica* (SEQ ID NO: 1). La célula puede ser una célula eucariota o procariota, pero es preferiblemente una célula bacteriana. La célula puede ser un estafilococo que no expresa naturalmente PNAG.

En una realización, el ácido nucleico *ica* está operativamente unido a una secuencia de expresión de gen que dirige la expresión del ácido nucleico *ica* dentro de una célula eucariota o procariota. La "secuencia de expresión de gen" es cualquier secuencia de nucleótidos reguladora, tal como una secuencia de promotor o combinación de promotor-potenciador, que facilita la transcripción y traducción eficiente del ácido nucleico *ica* al que se une operativamente. La secuencia de expresión de gen puede ser, por ejemplo, un promotor de mamífero o viral, tal como un promotor constitutivo o inducible. Promotores constitutivos de mamífero incluyen, pero no se limitan a, los promotores para los siguientes genes: hipoxantina fosforribosil transferasa (HPTR), adenosina desaminasa, piruvato cinasa y β -actina. Promotores virales a modo de ejemplo que funcionan constitutivamente en las células incluyen, por ejemplo, promotores del virus simio, virus del papiloma, adenovirus, virus de inmunodeficiencia humana (VIH), virus del sarcoma de Rous, citomegalovirus, las repeticiones terminales largas (LTR) del virus de la leucemia de Moloney, y otros retrovirus, y el promotor de timidina cinasa del virus del herpes simple. Otros promotores constitutivos son conocidos para aquellos expertos habituales en la materia. Los promotores útiles como secuencias de expresión de gen de la invención también incluyen promotores inducibles. Los promotores inducibles se expresan en presencia de un agente inductor. Por ejemplo, el promotor de metalotioneína es inducido para promover la transcripción y traducción en presencia de ciertos iones metálicos. Otros promotores inducibles son conocidos para aquellos expertos habituales en la materia.

En general, la secuencia de expresión de gen debe incluir, según sea necesario, secuencias 5' no transcriptoras y 5' no traductoras, implicadas en el inicio de la transcripción y la traducción, respectivamente. Tales secuencias 5' no transcriptoras incluirán una región de promotor que incluye una secuencia de promotor para el control de la transcripción del ácido nucleico *ica* unido operativamente. Las secuencias de expresión de gen opcionalmente incluyen secuencias de potenciador o secuencias de activador en la dirección según se desee.

Se dice que la secuencia de ácido nucleico *ica* y la secuencia de expresión de gen están "unidas operativamente" cuando están unidas covalentemente de tal forma que la transcripción y/o traducción de la secuencia codificante *ica* quede bajo la influencia o el control de la secuencia de expresión de gen. Si se desea que la secuencia *ica* sea traducida en una proteína funcional, se dice que dos secuencias de ADN están unidas operativamente si la inducción de un promotor en la secuencia de expresión de gen 5' produce la transcripción de la secuencia *ica* y si la naturaleza del enlace entre las dos secuencias de ADN (1) no produce la introducción de una mutación de desplazamiento de marco, (2) no interfiere con la capacidad de la región promotora para dirigir la transcripción de la secuencia *ica*, o (3) no interfiere con la capacidad del transcrito de ARN correspondiente que va a traducirse en una proteína. Así, una

secuencia de expresión de gen estaría unida operativamente a una secuencia de ácido nucleico *ica* si la secuencia de expresión de gen fuera capaz de efectuar la transcripción de esa secuencia de ácido nucleico *ica* de forma que el transcrito resultante pudiera ser traducido en la proteína o polipéptido deseado.

El ácido nucleico *ica* de la invención puede administrarse a la célula hospedera solo o en asociación con un vector. En su sentido más amplio, un "vector" es cualquier vehículo capaz de facilitar: (1) la administración de una molécula de ácido nucleico que contiene los genes del locus *ica* que codifica las proteínas implicadas en la síntesis de PNAG, o (2) la captación de una molécula de ácido nucleico que contiene los genes en el locus *ica* que codifican proteínas implicadas en la síntesis de PNAG por una célula diana. Preferentemente, los vectores transportan la molécula *ica* a la célula diana con degradación reducida con respecto al grado de degradación que resultaría en ausencia del vector. En general, los vectores útiles en la invención se dividen en dos clases: vectores biológicos y vectores químicos/físicos. Los vectores biológicos son útiles para la administración/captación de ácidos nucleicos *ica* a/por una célula diana. Los vectores químicos/físicos son útiles para la administración/captación de ácidos nucleicos *ica* o polipéptidos de *ica* a/por una célula diana.

Vectores biológicos incluyen, pero no se limitan a, plásmidos, fagémidos, virus, otros vehículos derivados de fuentes virales o bacterianas que han sido manipuladas por inserción o incorporación de las secuencias de ácido nucleico de la invención, y fragmentos de ácido nucleico libres que se pueden unir a las secuencias de ácido nucleico de la invención. Los vectores virales son un tipo preferido de vector biológico e incluyen, pero no se limitan a, secuencias de ácido nucleico de los siguientes virus: retrovirus tales como: virus de leucemia murina de Moloney; virus del sarcoma murino de Harvey; virus del tumor mamario murino; virus del sarcoma de Rous; adenovirus; virus adenoasociado; virus de tipo SV40; virus del poliovirus; virus de Epstein-Barr; virus del papiloma; virus del herpes; virus de la variolovacuna; virus de la poliomielitis; y virus de ARN, tales como cualquier retrovirus. Pueden emplearse fácilmente otros vectores no nombrados, pero conocidos en la técnica.

Los vectores virales preferidos se basan en virus eucariotas no citopáticos en los que los genes no esenciales se han sustituido con el gen de interés. Los virus no citopáticos incluyen retrovirus, cuyo ciclo vital implica la transcripción inversa de ARN genómico viral en ADN, con integración proviral posterior en el ADN celular del hospedador. En general, los retrovirus son deficientes de replicación (es decir, capaces de dirigir la síntesis de las proteínas deseadas, pero incapaces de fabricar una partícula infecciosa). Protocolos convencionales para producir retrovirus deficientes en la replicación (que incluyen las etapas de incorporación de material genético exógeno en un plásmido, transfección de una línea celular revestida con plásmido, producción de retrovirus recombinantes por la línea celular de encapsidación, recogida de partículas virales del medio de cultivo de tejido, e infección de las células blanco con partículas virales), son proporcionados por Kriegler, M., "Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual" W. H. Freeman Co., Nueva York (1990), y Murry, E. J. Ed. "Methods in Molecular Biology", vol. 7, Humana Press, Inc., Clifton, Nueva Jersey (1991).

Otro virus preferido para ciertas aplicaciones es el virus adenoasociado, un virus de ADN bicatenario. El virus adenoasociado puede ser manipulado para ser deficiente en la replicación y es capaz de infectar una amplia gama de tipos y especies de células. Además, tiene ventajas tales como estabilidad al calor y disolventes lipídicos; altas frecuencias de transducción en células de diversos linajes; y ausencia de inhibición de superinfección, permitiendo así series múltiples de transducciones. Supuestamente, el virus adenoasociado puede integrarse en ADN celular humano de manera específica de sitio, minimizando así la posibilidad de mutagénesis insercional y la variabilidad de la expresión del gen insertado. Además, las infecciones con virus adenoasociado no mutado han sido seguidas en cultivo de tejido durante al menos 100 pases en ausencia de presión selectiva, que implica que la integración genómica del virus adenoasociado es un evento relativamente estable. El virus adenoasociado también puede funcionar de forma extracromosómica.

Además de los vectores biológicos, pueden usarse vectores químicos/físicos para administrar una molécula *ica* a una célula diana y facilitar así la captación. Como se usa en el presente documento, un "vector químico/físico" se refiere a una molécula natural o sintética, distinta de aquellas derivadas de fuentes bacteriológicas o virales, capaz de administrar la molécula *ica* a una célula.

Un vector químico/físico preferido de la invención es un sistema de dispersión coloidal. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen sistemas basados en lípido que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. Un sistema coloidal preferido de la invención es un liposoma. Los liposomas son vasos de membrana artificiales que son útiles como vector de administración *in vivo* o *in vitro*. Se ha mostrado que vasos unilaminares grandes (LUV), que oscilan en tamaño de 0,2 - 4,0 μm , pueden encapsular macromoléculas grandes. Pueden encapsularse ARN, ADN y viriones intactos dentro del interior acuoso y administrarse a las células en una forma biológicamente activa (Fraleley et al., Trends Biochem. Sci., (1981) 6:77). Con el fin de que un liposoma sea un vector eficiente de transferencia génica, deben estar presentes una o más de las siguientes características: (1) encapsulación del gen de interés con alta eficiencia con retención de la actividad biológica; (2) administración del contenido acuoso de la vesícula al citoplasma de la célula diana con alta eficiencia; y (3) expresión exacta y eficaz de la información genética.

Están disponibles comercialmente liposomas de Gibco BRL, por ejemplo como LIPOFECTIN™ y LIPOFECTACE™, que se forman de lípidos catiónicos tales como cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)-propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA)

y bromuro de dimetil-dioctadecilamonio (DDAB). Métodos de preparación liposomas son muy conocidos en la técnica y se han descrito en muchas publicaciones. Los liposomas también han sido revisados por Gregoriadis, G. en Trends in Biotechnology, (1985) 3:235-241.

También pueden usarse agentes de compactación, solos o en combinación con un vector biológico o químico/físico de la invención. Como se usa en el presente documento, un "agente de compactación" se refiere a un agente tal como histona, que neutraliza las cargas negativas sobre el ácido nucleico y así permite la compactación del ácido nucleico en un gránulo fino. La compactación del ácido nucleico facilita la captación del ácido nucleico en la célula diana. Los agentes de compactación pueden usarse solos, es decir, para administrar la molécula *ica* en una forma que es más eficientemente captada por la célula, o, más preferentemente, en combinación con uno o más de los vectores anteriormente descritos.

Otras composiciones a modo de ejemplo que pueden usarse para facilitar la captación por una célula diana de los ácidos nucleicos *ica* incluyen fosfato de calcio y otros mediadores químicos de transporte intracelular, composiciones de microinyección, electroporación y composiciones de recombinación homóloga (por ejemplo, para integrar el ácido nucleico *ica* en una localización preseleccionada dentro del cromosoma de la célula diana).

Los siguientes ejemplos se incluyen para fines de ilustración y no pretenden limitar el alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Purificación de PNAGd.

Se ha descubierto según la invención que puede producirse PNAGd de cualquier cepa bacteriana que exprese el locus *ica*. Específicamente, éstas incluyen *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* y otras cepas estafilocócicas tales como *Staphylococcus carnosus* transformado con los genes en el locus *ica*. Pueden usarse las siguientes cepas específicas según la invención para purificar PNAG que incluyen *S. epidermidis* RP62A (N.º de ATCC: 35984), *S. epidermidis* RP12 (N.º de ATCC: 35983), *Staphylococcus epidermidis* M187, *S. carnosus* TM300 (pCN27), *S. aureus* RN4220 (pCN27) y *S. aureus* MN8 mucoide.

El siguiente es un método que puede usarse para producir PNAGd a partir de estafilococos que contienen el locus *ica*.

El material de partida se prepara a partir de cultivos de estafilococos que expresan los genes *ica* cultivando las bacterias del siguiente modo: El polisacárido se prepara a partir de cultivos de 16 litros de medio de crecimiento bacteriano. Un medio preferido es un medio definido químicamente (CDM) basado en RPMI-1640 AUTO-MOD, una preparación de RPMI modificada para permitir la esterilización en autoclave (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.). El CDM se complementa con aminoácidos adicionales, vitaminas y nucleótidos para ajustar su concentración a la encontrada en otro CDM (Hussain, M., J.G.M. Hastings, and P.J. White, 1991, A chemically defined medium for slime production by coagulase-negative Staphylococci. J. Med. Microbiol. 34:143-147). El medio también se complementa con sacarosa y glucosa hasta una concentración final del 1 %.

Se inoculan cultivos líquidos con una única colonia de una cepa de bacteria productora de polisacárido. La cepa preferida se designa *Staphylococcus aureus* MN8m, una cepa que es un sobreproductor constitutivo del polisacárido. Se toma una única colonia de una placa de agar de soja tríptica, o placa similar de medio de crecimiento bacteriano, y se cultiva a 37 °C. También son aceptables temperaturas de 10-42 °C. Los cultivos líquidos se incuban a 37 °C durante 1-96 horas mientras se agita continuamente y se lava con oxígeno a una velocidad de 2 litros/min. El pH se mantiene a 7,0 durante todo el periodo de crecimiento mediante la adición de NaOH 10 N mediante un titulador de pH. Al final del periodo de crecimiento, los cuerpos celulares se sedimentan a 9000 g durante 30 minutos, y el sobrenadante se concentra a ~500 ml mediante filtración de flujo tangencial (membranas de corte de peso molecular de 10.000-500.000). Se añaden dos volúmenes de etanol para precipitar la preparación de polisacárido bruto. El precipitado se recupera por centrifugación, resuspensión en agua y diálisis durante la noche contra agua destilada. El antígeno es insoluble. El antígeno bruto insoluble se suspende en 50 ml de disolución salina tamponada con fosfato (PBS, fosfato 0,1 M, cloruro sódico 0,15 M) para ser digerido con la lisozima (0,5 mg) y lisostafina (0,5 mg) durante 0,5 a 16 h a 37 °C. Las suspensiones de antígeno se tratan adicionalmente con nucleasas (0,5 mg) a 37 °C durante 0,5-16 h, seguido de incubación durante 0,5-16 h con proteinasa K (5 mg) a 37-56 °C. Después de la diálisis y liofilización, los extractos secados se disuelven en HCl 5 M y el pH se ajusta a 2 con NaOH 4 N. Se aplican alícuotas de veinte ml de esta disolución a una columna de 5x88 cm rellena de Sephacryl S-300 (Pharmacia, Piscataway, NJ) usando tampón HCl 0,1 N/NaCl 0,15 M, con el polisacárido eluido identificado por absorción óptica a 206 nm. Las fracciones que corresponden al polisacárido que representan un intervalo continuo de tamaños moleculares se reúnen por separado, se dializan contra agua y se liofilizan. Alternativamente, puede realizarse fraccionamiento por tamaño con una variedad de procedimientos alternativos conocidos en la técnica, tales como el uso de membranas de diafiltración.

Puede ajustarse el nivel de acetilación tratando químicamente el polisacárido nativo. Así, se aísla polisacárido con >50 % de acetato y se desacetila para lograr el nivel de acetilación deseado. El tratamiento es una disolución básica conocida para eliminar los grupos acetato unidos con amino de la glucosamina. Un medio preferido es la incubación a 37 °C durante 2-20 horas en NaOH 1,0 M. Son igual de eficaces disoluciones más débiles y tiempos de incubación

más largos o temperaturas más altas, o disoluciones más fuertes con tiempos de incubación más cortos o temperaturas más bajas. Generalmente, cualquier tratamiento que eleve el pH por encima de 10 sería eficaz bajo la temperatura apropiada.

5 También existen medios enzimáticos para desacetilar el antígeno. Éstos incluyen enzimas desacetilantes tales como aquellas relacionadas con cloranfenicol desacetilasa y el producto del gen *icaB*.

Ejemplo 2: Preparación de vacuna de conjugado PNAGd-toxoide diftérico (DTm).

10 Se acopló covalentemente DTm a PNAGd purificada por aminación reductiva. Primero se introdujeron grupos aldehído sobre la superficie del toxoide diftérico (DTm) por tratamiento de la proteína con glutaraldehído como se describe en la etapa 1 a continuación. Posteriormente, el DTm activado se hizo reaccionar con PNAGd, mediante sus grupos amino libres en presencia del agente reductor cianoborohidruro de sodio, como se describe en la etapa 2 más adelante.

Etapa 1: Activación de DTm con glutaraldehído

15 Se dializaron 10 mg de DTm (disolución de 4,86 mg/ml en tampón HEPES 20 mM, NaCl 50 mM, pH 8) contra tampón de carbonato 0,1 M (pH 10) durante 3 horas (h) a temperatura ambiente usando un casete de diálisis de MWCO de 10 kDa. Cuando la disolución de proteína se intercambió completamente con el tampón carbonato, se agregó glutaraldehído hasta una concentración final de 1,25 % y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Esto produjo DTm activado, que se intercambió con disolución salina tamponada de fosfato (PBS, pH 7,4), y se concentró hasta aproximadamente 10 mg/ml por ultrafiltración usando una membrana de filtración de MWCO de 10 kDa.

Etapa 2: Acoplamiento de DTm activado con PNAG

20 Se purificó PNAG como se describe en Maira et al. (Maira-Litrán T, Kropec A, Abeygunawardana C, Joyce J, Mark III G, Goldmann DA y Pier GB. *Immunochemical properties of the staphylococcal poly-N-acetyl glucosamine surface polysaccharide*. *Infect. Immun.* 2002; 70: 4433-4440). Una fracción de este material, designada PNAG-II por Maira et al., se usó para preparar la PNAG desacetilada (PNAGd). La PNAG nativa se disolvió hasta una concentración de 2 mg/ml en NaOH 5 M y se incubó a 37 °C con agitación. Después de 18 h, la muestra se puso en una suspensión de hielo y se dejó enfriar a $\leq 10^{\circ}\text{C}$. También se enfrió sobre hielo HCl 5 N y se añadió en alícuotas de 0,5 ml hasta que la disolución alcanzó el pH neutro. La disolución de PNAGd se dializó entonces durante la noche contra agua destilada, en un casete de diálisis de corte de peso molecular de 10 KiloDaltons (MWCO de 10K) y se liofilizó. Este procedimiento dio PNAGd que tiene 15-20 % de sustituciones de acetato.

30 Se disolvió PNAGd purificada (10 mg) en 0,25 ml de HCl 5 M, se neutralizó con un volumen igual de NaOH 5 M y el volumen final se ajustó a 2 ml con PBS. Las disoluciones de PNAGd son insolubles a pH neutro pero permanecen completamente solubles a pH ligeramente ácido o básico. Por lo tanto, para garantizar la solubilidad, el pH de las disoluciones de PNAGd se ajustó a 9,0. Se mezcló PNAGd (10 mg) con 1 ml de una disolución de 10 mg/ml de DTm activado en PBS, y el pH de la reacción se ajustó a 7,5. Se añadieron a la mezcla doscientos mg de cianoborohidruro de sodio purificado y la reacción se dejó proceder en la oscuridad durante 14 h a 37 °C con mezcla. Después de este tiempo, la mezcla de reacción se intercambió por diálisis con tampón carbonato 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 10 (casete de diálisis de MWCO de 10 kDa), y el conjugado de alto peso molecular se purificó de los componentes no acoplados con una columna Superase 6 grado preparativa por cromatografía de filtración en gel. El conjugado PNAGd-DTm se dializó contra tampón HEPES 20 mM, NaCl 50 mM, pH 8 y se guardó congelado a -2 °C.

Ejemplo 3: Preparación de vacuna de conjugado PNAG nativa-DTm.

45 Se acopló covalentemente PNAG nativa (en este caso que tenía 95 %-100 % de sustituciones de acetato) con DTm purificado usando el agente de cianilación orgánico tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridinio (CDAP) para activar los grupos hidroxilo del polisacárido como se describe en la etapa 1 a continuación. Posteriormente se acopló la PNAG activada con CDAP con DTm como se describe en la etapa 2 más adelante, sin la necesidad de moléculas espaciadoras adicionales.

Etapa 1: Activación de PNAG con CDAP

50 Se disolvieron 10 mg de PNAG purificada en 150 microlitros de HCl 5 M, se neutralizó con un volumen igual de NaOH 5 M y se diluyó hasta 1 ml con tampón borato, pH 9,2. CDAP se enrasó a una concentración de 100 mg/ml en acetonitrilo y se guardó a -20 °C durante hasta 1 mes. Se añadieron lentamente con pipeta 200 microlitros de CDAP (que contienen 20 mg) en una disolución previamente agitada con vórtice de PNAG-II (Maira et al., *Infect. Immun.* 2002, 70:4433:4440) en tampón borato (la adición rápida del co-disolvente orgánico precipita el polisacárido), y la reacción se dejó proceder durante dos minutos.

Etapa 2: Acoplamiento de PNAG activada con CDAP con DTm

Se dializaron 5 mg de DTm (disolución madre en tampón HEPES 20 mM, NaCl 50 mM, pH 8) contra tampón borato, pH 9,2, durante 3 h, con un casete de diálisis de MWCO de 10 kDa. Después de la activación de PNAG con CDAP se añadieron inmediatamente 5 mg de DTm y la mezcla se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 3 h con agitación. Después de este tiempo, el conjugado de alto peso molecular se purificó de los componentes no acoplados con una columna Superase 6 grado preparativa por cromatografía de filtración en gel. Se reunieron las fracciones que contenían conjugado PNAG-DTm, se concentraron y se guardaron congeladas a -20 °C.

Ejemplo 4: Producción de antisuero en conejos.

Se produjeron anticuerpos contra PNAG-DTm o contra PNAGd-DTm purificada en conejos blancos de Nueva Zelanda por inmunización subcutánea con dos dosis de 10 µg de polisacárido conjugado emulsionado para la primera dosis en adyuvante completo de Freund y para la segunda dosis en adyuvante incompleto de Freund, seguido una semana después de tres inyecciones intravenosas de antígeno en disolución salina, cada una con tres días de separación. Los conejos se sangraron cada dos semanas y los sueros se probaron por ELISA. Las curvas de unión obtenidas por ELISA de dos conejos representativos inmunizados con bien conjugados de PNAG o bien PNAGd- DTm se muestran en las Fig. 1 y 2. Los títulos se determinaron como se describe por Maira et al. (Maira-Litrán T, Kropec A, Abeygunawardana C, Joyce J, Mark III G, Goldmann DA, y Pier GB. Immunochemical properties of the staphylococcal poly-N-acetyl glucosamine surface polysaccharide. Infect. Immun. 2002; 70: 4433-4440).

Ejemplo 5: Inmunogenicidad de PNAG-DTm y PNAGd-DTm en ratones.

Se inmunizaron por vía subcutánea grupos de 10 ratones (Swiss Webster; hembras, 5-7 semanas de edad), con una semana de separación, con 1,5, 0,75 o 0,15 µg de polisacárido conjugado PNAG-DTm y PNAGd- DTm en 0,1 ml de PBS, y se sangraron semanalmente durante cuatro semanas después de la 3ª inmunización. Se inmunizaron grupos de control con una mezcla de polisacárido no conjugado y proteína en la misma relación. Los títulos de los ratones inmunizados con los conjugados nativos y desacetilados se muestran en las Fig. 3 y 4, respectivamente. Los grupos de control no desarrollaron título a ninguna de las dosis usadas.

Ejemplo 6: Actividad de destrucción opsónica de antisueros de conejo producidos contra PNAG y PNAGd conjugadas con toxoide tetánico

Se inmunizaron 2 conejos con PNAG conjugada con toxoide diftérico, y se inmunizaron dos conejos con PNAGd conjugada con toxoide diftérico, como se ha descrito anteriormente. La actividad de destrucción opsónica se determinó usando el método descrito por Maira et al. (Maira-Litrán T, Kropec A, Abeygunawardana C, Joyce J, Mark III G, Goldmann DA, y Pier GB. Immunochemical properties of the Staphylococcal poly-N-acetyl glucosamine surface polysaccharide. Infect. Immun. 2002; 70:4433-4440). El título se determinó y se definió como la dilución en suero a la que ≥ 40 % de las bacterias fueron destruidas. Las curvas de unión de los 4 antisueros de conejo contra una variedad cepas estafilocócicas se muestran en las Fig. 5-8. La cepa M187 es una cepa de *S. epidermidis*; las otras son cepas de *S. aureus*. En la Fig. 9 se muestran comparaciones de títulos.

Equivalentes

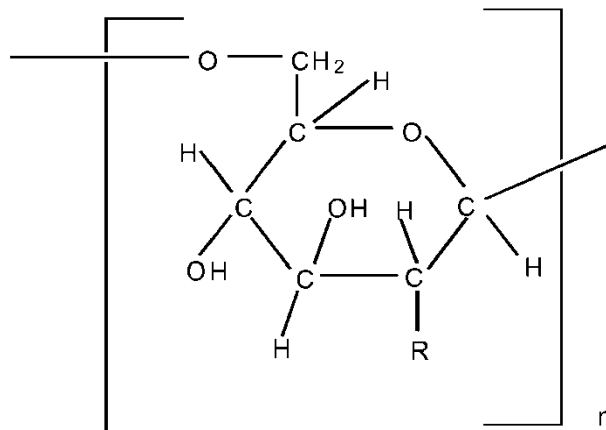
Se considera que la memoria descriptiva anteriormente descrita es suficiente para permitir a un experto en la materia poner en práctica la invención. La presente invención no debe limitarse en alcance por los ejemplos proporcionados, ya que los ejemplos están previstos como una simple ilustración de un aspecto de la invención y otras realizaciones funcionalmente equivalentes están dentro del alcance de la invención.

40

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende

un polisacárido aislado que comprende un polímero de β -1,6-glucosamina, que tiene una longitud de al menos cuatro unidades monoméricas, un peso molecular de al menos 2500 Daltons y una estructura de



5

en la que n es un número entero que es al menos cuatro, R está seleccionado del grupo que consiste en $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$ y $-\text{NH}_2$, a condición de que menos del 40 % de los grupos R sean $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$, en la que la composición es estéril.

10 2. La composición según la reivindicación 1, en la que el polisacárido aislado comprende un polímero de β -1,6-glucosamina conjugado con un compuesto vehículo.

3. La composición según la reivindicación 1 o 2, en la que menos del 35 %, menos del 30 %, menos del 25 %, menos del 20 %, menos del 15 %, menos del 10 %, o menos del 5 % de los grupos R son $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$, o ninguno de los grupos R es $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$.

15 4. La composición según la reivindicación 1 o 2, en la que n es un número entero seleccionado del grupo que consiste en al menos 6, al menos 10, al menos 20, al menos 50, al menos 100, al menos 200, al menos 300, al menos 400 y al menos 500.

5. La composición según la reivindicación 1 o 2, en la que el polisacárido aislado es un polímero heterosustituido.

20 6. La composición según la reivindicación 1 o 2, en la que el polisacárido aislado tiene un peso molecular seleccionado del grupo que consiste en al menos 5000 Daltons, al menos 7500 Daltons, al menos 10.000 Daltons, al menos 25.000 Daltons, al menos 50.000 Daltons, al menos 75.000 Daltons, al menos 100.000 Daltons, al menos 125.000 Daltons, al menos 150.000 Daltons, al menos 200.000 Daltons, al menos 250.000 Daltons, al menos 300.000 Daltons, al menos 350.000 Daltons, al menos 400.000 Daltons, al menos 450.000 Daltons, y al menos 500.000 Daltons.

25 7. La composición según la reivindicación 1 o 2, en la que la composición tiene una pureza seleccionada del grupo que consiste en al menos el 90 % de pureza, al menos el 95 % de pureza, al menos el 97 % de pureza, y al menos el 99 % de pureza.

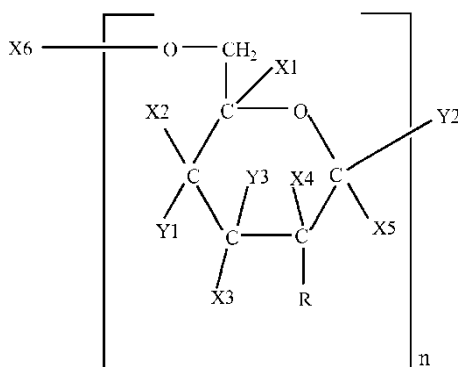
8. La composición según la reivindicación 2, en la que el polisacárido aislado está conjugado con el compuesto vehículo mediante un conector.

9. La composición según la reivindicación 2, en la que el compuesto vehículo es un vehículo de péptido.

30 10. La composición según la reivindicación 1 o 2, que comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

11. La composición según la reivindicación 1 o 2, en la que el polisacárido aislado se formula como una vacuna.

12. La composición según la reivindicación 2, en la que el polisacárido aislado consiste en la siguiente estructura:



5 en la que cada uno de X1, X2, X3, X4, X5 y X6 es o bien H, un compuesto vehículo, o bien un conector unido a un compuesto vehículo; y cada uno de Y1, Y2 y Y3 es o bien OH, un compuesto vehículo, o bien un conector unido a un compuesto vehículo, en la que solo un compuesto vehículo o conector unido a un compuesto vehículo está conjugado con el polisacárido aislado.

13. Un método de preparación del polisacárido aislado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende o bien:

(a) precipitar con etanol una preparación de polisacárido bruto de una preparación concentrada de cuerpos celulares bacterianos;

10 digerir simultáneamente el polisacárido bruto con lisozima y lisostafina, seguido de digestión secuencial con una nucleasa y proteinasa K para formar una preparación de polisacárido digerido;

fraccionar por tamaño la preparación de polisacárido digerido;

aislar una fracción de polisacárido acetilado; y

15 desacetilar la fracción de polisacárido acetilado para producir un polisacárido que tiene menos del 40 % de sustitución de acetato; o

(b) preparar un polisacárido impuro de un cultivo bacteriano;

incubar el polisacárido impuro con un ácido o una base para producir una preparación de polisacárido semipuro;

neutralizar la preparación;

20 incubar la preparación neutralizada en ácido fluorhídrico;

aislar un polisacárido acetilado de la preparación; y desacetilar el polisacárido acetilado para producir un polisacárido que tiene menos del 40 % de sustituciones de acetato; y en cuyo caso opcionalmente aislar de la preparación un polisacárido que tiene menos del 40 % de sustituciones de acetato.

14. El método según la reivindicación 13, en el que el cultivo bacteriano es

25 (a) un cultivo de *Staphylococcus coagulasa* negativo,

(b) un cultivo de *Staphylococcus aureus*, o

(c) un cultivo de *Staphylococcus epidermidis*.

15. El método según la reivindicación 13(a) o 13(b), en el que el polisacárido acetilado es

(a) químicamente desacetilado,

30 (b) químicamente desacetilado por incubación con una disolución básica, o

(c) enzimáticamente desacetilado.

16. El método según la reivindicación 13(a), en el que la preparación de polisacárido se fracciona por tamaño usando una columna.

17. El método según la reivindicación 13, que comprende además formular el polisacárido aislado como una vacuna.

18. Una composición farmacéutica que comprende el polisacárido aislado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en una cantidad eficaz para estimular una respuesta inmunitaria, en un vehículo farmacéuticamente aceptable.
19. La composición farmacéutica según la reivindicación 18, que comprende además un adyuvante.
- 5 20. La composición farmacéutica según la reivindicación 18, en la que la respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria específica de antígeno.
21. Un polisacárido aislado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para su uso en el tratamiento o la prevención de una infección por bacterias que producen PNAG en un sujeto no roedor que comprende inducir una respuesta inmunitaria contra bacterias que producen PNAG.
- 10 22. El polisacárido aislado para su uso según la reivindicación 21, en el que las bacterias que producen PNAG son
- (a) *Staphylococcus*,
 - (b) *Staphylococcus aureus*, o
 - (c) *Staphylococcus epidermidis*.
23. El polisacárido aislado para su uso según la reivindicación 21, en la que el sujeto no roedor
- 15
- (a) es un sujeto humano,
 - (b) está seleccionado del grupo que consiste en primates, caballos, vacas, cerdos, cabras, ovejas, perros y gatos,
 - (c) está en riesgo de exposición a *Staphylococcus*,
 - (d) se ha expuesto a *Staphylococcus*, o
- 20
- (e) está en riesgo de exposición a *Staphylococcus* y no ha recibido un implante de dispositivo médico.
24. El polisacárido aislado para su uso según la reivindicación 21, en el que el polisacárido aislado
- (a) se usa conjuntamente con un adyuvante,
 - (b) se formula como una vacuna,
 - (c) se formula para administración sistémica,
- 25
- (d) está conjugado con un compuesto vehículo, o
 - (e) está conjugado con un compuesto vehículo de péptido.
25. El polisacárido aislado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para su uso en terapia.
26. Uso de un polisacárido aislado según la reivindicación 1 o 2 para generar anticuerpos monoclonales.
- 30 27. Uso de un polisacárido aislado según la reivindicación 1 o 2 para identificar un anticuerpo monoclonal que se une al polisacárido y que se une a PNAG que tiene más del 50 % de sustituciones de acetato.
28. Una composición que comprende un anticuerpo aislado o fragmento del mismo, que se une al polisacárido aislado según la reivindicación 1 o 2, y a PNAG que tiene más del 50 % de sustituciones de acetato.
29. La composición según la reivindicación 28, en la que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 35 30. Anticuerpos aislados o fragmentos de los mismos que se unen a PNAGd y PNAG que tienen más del 50 % de sustituciones de acetato y que se producen usando el polisacárido aislado según la reivindicación 1 o la reivindicación 2.
31. La composición según la reivindicación 28 o la reivindicación 30, en la que los anticuerpos aislados o fragmentos de los mismos son
- (a) anticuerpos policlonales,
- 40
- (b) anticuerpos humanizados o anticuerpos quiméricos, o
 - (c) anticuerpos humanos.

32. La composición según la reivindicación 28 o la reivindicación 30, en la que los anticuerpos aislados o fragmentos de los mismos están conjugados con
- (a) una marca detectable,
 - (b) un bactericida,
 - 5 (c) una marca detectable que está seleccionada del grupo que consiste en una marca radiactiva, una enzima, una molécula de biotina, una molécula de avidina y un fluorocromo, o
 - (d) el bactericida que es un antibiótico.
33. Un método de identificación de la presencia en una muestra de PNAGd y/o PNAG que comprende
- 10 poner en contacto la muestra con los anticuerpos aislados o fragmentos de los mismos según la reivindicación 28 o la reivindicación 30, y
- detectar la unión de los anticuerpos aislados o fragmentos de los mismos a la muestra, en el que la unión de los anticuerpos aislados o fragmentos de los mismos indica que PNAGd y/o PNAG está presente en la muestra.
34. El método según la reivindicación 33, en el que la muestra
- 15 (a) es una muestra biológica de un sujeto, o
- (b) es una muestra biológica seleccionada del grupo que consiste en orina, sangre, pus, piel, esputo, líquido sinovial, linfa y leche.
35. El método según la reivindicación 33, en el que los anticuerpos aislados o fragmentos de los mismos están conjugados con una marca detectable.
- 20 36. El método según la reivindicación 33, en el que el método es un método de identificación de la presencia de una bacteria que expresa PNAG en la muestra.
37. El anticuerpo aislado o fragmento del mismo según la reivindicación 28 o la reivindicación 30, para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar una infección por bacterias que producen PNAG.
38. El anticuerpo aislado o fragmento del mismo según la reivindicación 37, en el que la infección es
- 25 (a) una infección por *Staphylococcus*, o
- (b) está seleccionado del grupo que consiste en infección por *Staphylococcus epidermidis* e infección por *Staphylococcus aureus*.
39. El anticuerpo aislado o fragmento del mismo según la reivindicación 37, en el que el anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo está conjugado con o bien
- 30 (a) un bactericida, o bien
- (b) un bactericida que es un antibiótico.

Figura 1

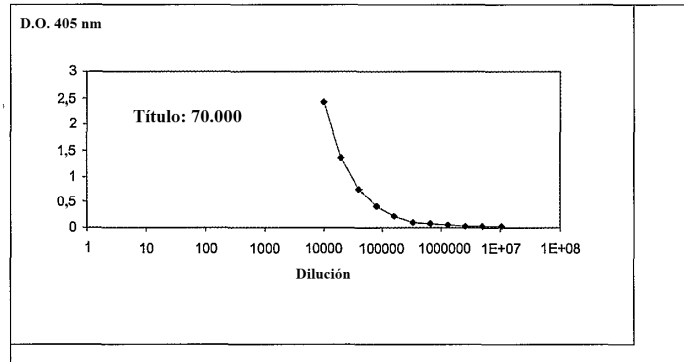


Figura 2

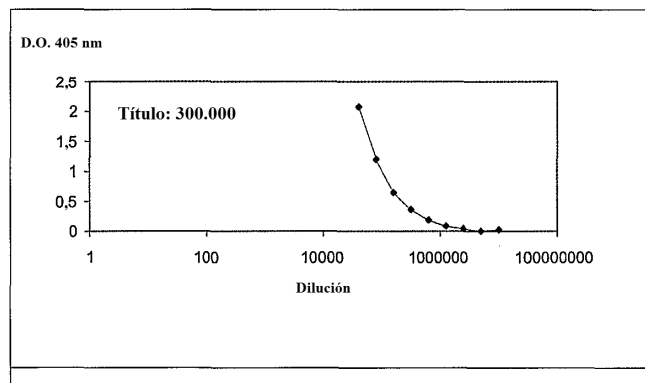


Figura 3

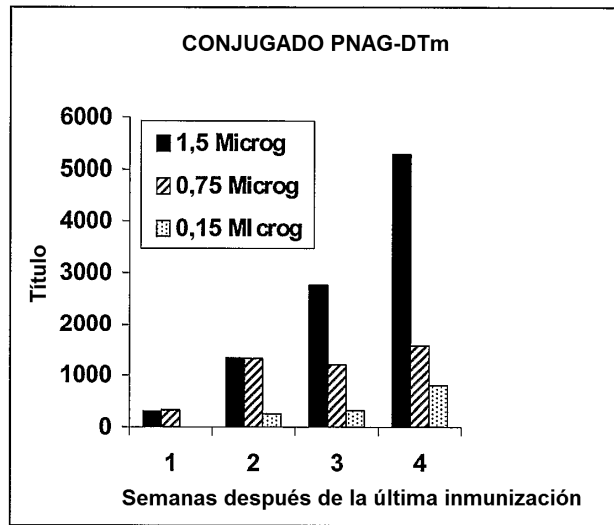


Figura 4

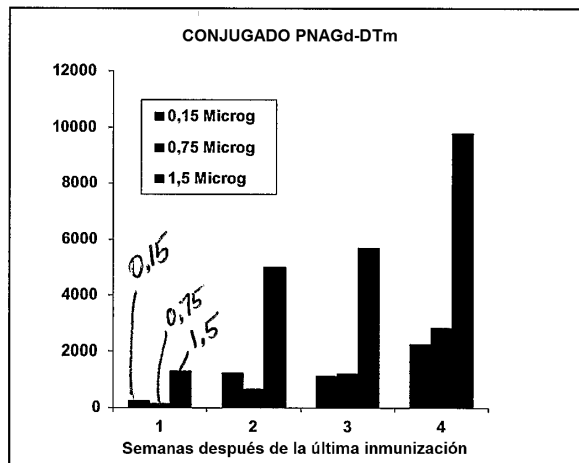


Figura 5

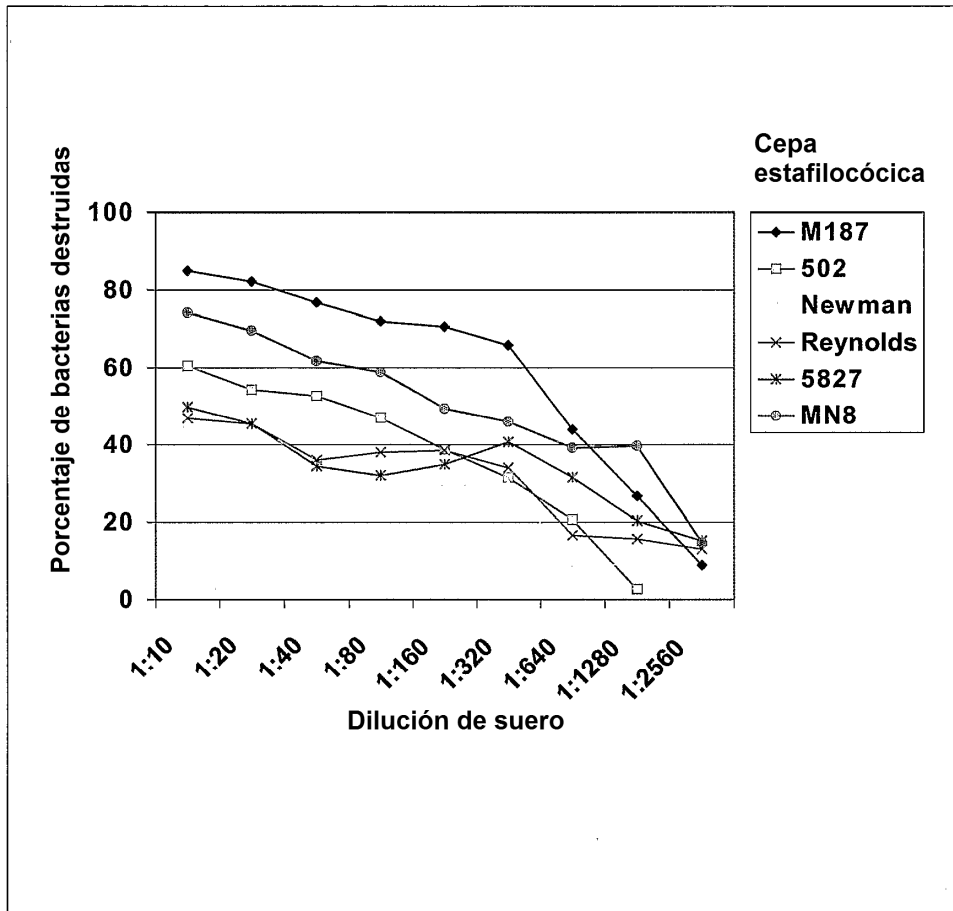


Figura 6

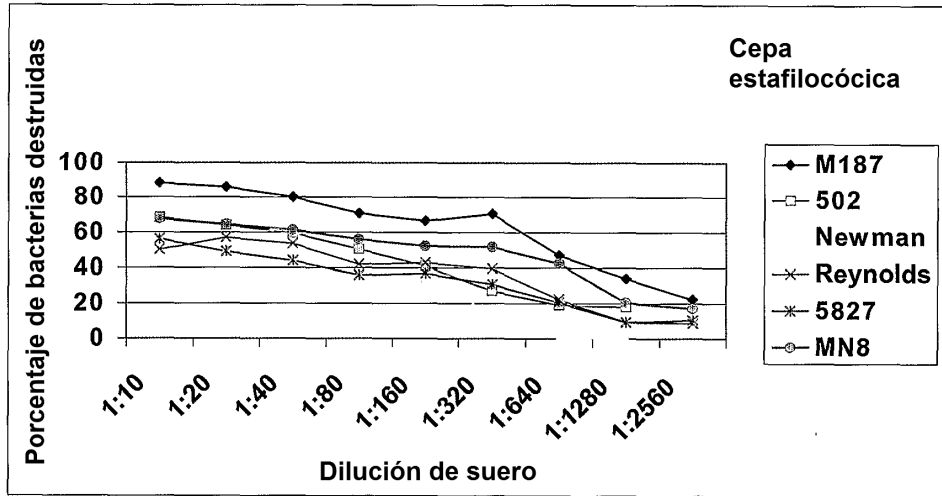


Figura 7

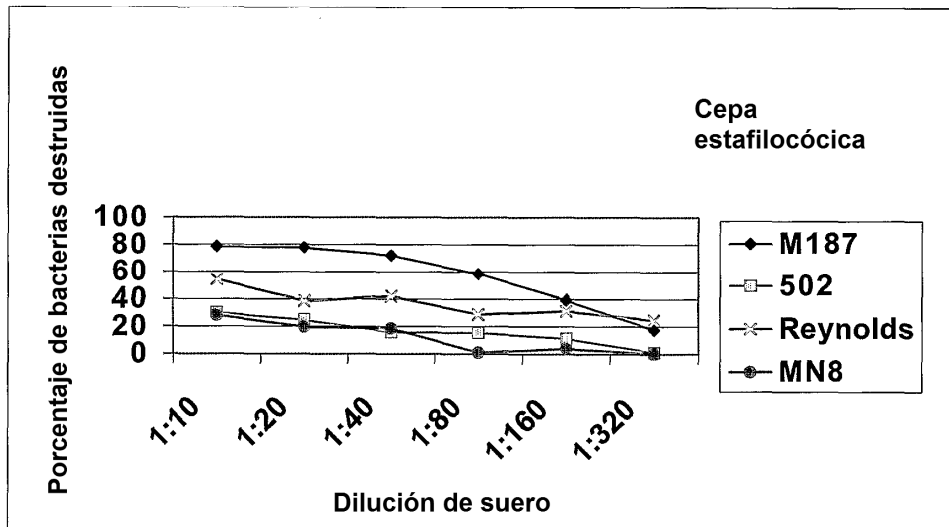


Figura 8

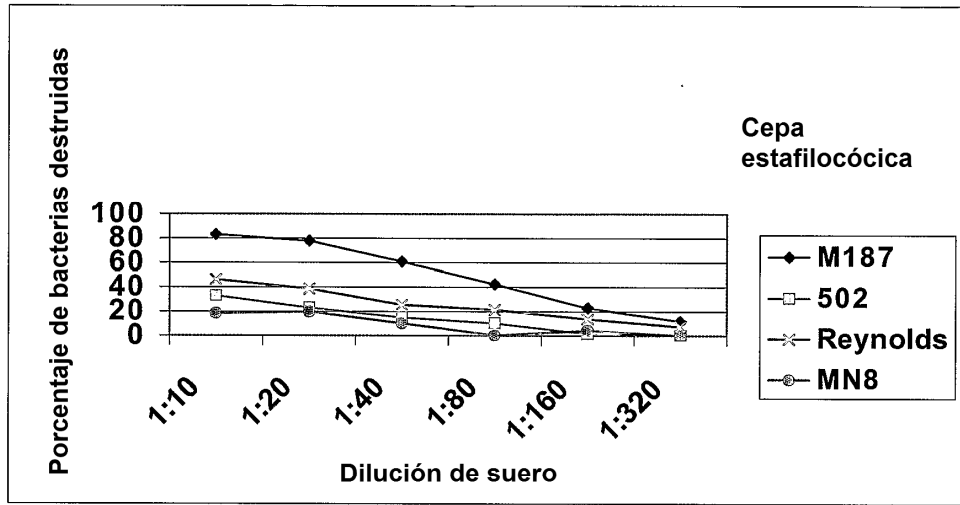


Figura 9

