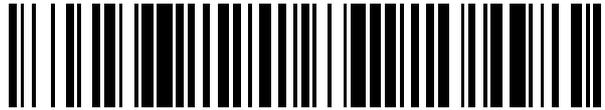


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 398**

51 Int. Cl.:

A61K 47/55 (2007.01)

A61K 39/385 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.06.2014 PCT/IB2014/061944**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.12.2014 WO14195881**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2014 E 14744634 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.02.2019 EP 3003389**

54 Título: **Glucoconjugado de oligosacárido procedente de LOS con la toxina tosferínica de Bordetella pertussis y su aplicación en la profilaxis y el tratamiento de infecciones causadas por Bordetella pertussis**

30 Prioridad:

07.06.2013 PL 40424713

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

04.11.2019

73 Titular/es:

**SIEC BADAWCZA LUKASIEWICZ - PORT POLSKI
OSRODEK ROZWOJU TECHNOLOGII (100.0%)
ul. Stablowicka 147
54-066 Wrocław, PL**

72 Inventor/es:

**KOJ, SABINA;
NIEDZIELA, TOMASZ y
LUGOWSKI, CZESLAW**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 729 398 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

Glucoconjugado de oligosacárido procedente de LOS con la toxina tosferínica de *Bordetella pertussis* y su aplicación en la profilaxis y el tratamiento de infecciones causadas por *Bordetella pertussis*

La presente invención se refiere a un glucoconjugado inmunogénico y no tóxico que comprende un oligosacárido procedente de LOS y una toxina tosferínica de *Bordetella pertussis*, a un método para preparar dicho glucoconjugado, la composición farmacéutica, una composición de vacuna que contiene dicho glucoconjugado y una aplicación del glucoconjugado. El glucoconjugado se prepara como un componente de vacuna para la protección contra infecciones causadas por *Bordetella pertussis*.

La presente invención pertenece al campo del diseño de vacunas antibacterianas de glucoconjugados.

Bordetella pertussis causa la tosferina, una enfermedad altamente contagiosa que afecta el tracto respiratorio, que es especialmente grave en bebés y niños pequeños. A pesar de la inmunización generalizada, en los últimos años el número de incidencias por tosferina ha aumentado [19, 20]. La razón principal del resurgimiento de esta enfermedad prevenible por vacunación es una disminución de la inmunidad inducida por la vacuna y los cambios genéticos en las cepas de *B. pertussis* [11]. La alta reactividad de las vacunas de tosferina de células completas y la mejor comprensión de los mecanismos de la función molecular de los factores de virulencia de *B. pertussis*, que también son sus principales antígenos protectores, han llevado a la introducción de vacunas acelulares que están en continuo desarrollo [21, 31, 41, 63, 68]. Las vacunas contra la tosferina acelulares de uso común contienen toxina tosferínica inactivada, ya que la toxina es el componente más inmunogénico de *B. pertussis* [50, 55]. El toxoide tosferínico (PTd), la difteria (DTd) y los toxoides tetánicos (TTd) se combinaron en una vacuna de 3 componentes (DTaP). La eficacia de esta vacuna contra la tosferina es aproximadamente del 71 % y es menor que para el tétanos y la difteria [69]. Todos los síntomas de las enfermedades del tétanos y la difteria son causados por toxinas, mientras que la patogenia de la tosferina implica múltiples factores de virulencia. Además de las proteínas secretoras de *B. pertussis* (por ejemplo, la toxina tosferínica), las moléculas de superficie, tales como las adhesinas y la endotoxina, están implicadas en la patogenia de la tosferina [18, 37]. Por lo tanto, no solo se requiere una actividad neutralizante de la toxina en la defensa inmunitaria contra la tosferina, sino también una actividad bactericida contra los componentes de la superficie de *B. pertussis* que asegura la destrucción bacteriana. Por lo tanto, además de la actividad neutralizante de la toxina, la actividad bactericida contra los componentes de la superficie de *B. pertussis*, que asegura la destrucción bacteriana, se requiere en la defensa inmunitaria contra la tosferina.

El ataque bactericida contra *B. pertussis* podría dirigirse al lipooligosacárido (LOS) altamente expuesto [73]. Actualmente, los anticuerpos contra LOS se encuentran en los sueros de pacientes con infecciones bacterianas [5, 70]. La endotoxina de *B. pertussis* carece de un antígeno O típico y, por lo tanto, constituye un lipooligosacárido. El LOS de *B. pertussis* está compuesto por un lípido A, un oligosacárido central y un trisacárido distal que es una unidad de oligosacárido única [10]. Entre las cepas de *B. pertussis* también hay cepas que tienen LOS desprovistos del trisacárido terminal, que muestran menor virulencia [9, 14]. De manera similar a los lipopolisacáridos de otras bacterias gramnegativas, el LOS también es un factor importante que muestra la actividad endotóxica [1]. El LOS desempeña un papel en la patogenia de la tosferina que actúa en sinergia con exotoxinas. Por lo tanto, el LOS junto con la citotoxina traqueal (TCT, de sus siglas en inglés) y la toxina tosferínica (PT, de sus siglas en inglés) causan una destrucción de las células ciliadas del tracto respiratorio mediante la activación de la sintasa de óxido nítrico inducida por citocinas (iNOS, de sus siglas en inglés) [15, 37]. El LOS es letal en ratones sensibilizados a histamina. Es pirógeno y mitógeno en cultivos de células del bazo. Activa los macrófagos e induce la producción de TNF- α . La actividad endotóxica del lípido A excluye una aplicación del LOS como componente en las vacunas contra la tosferina. Sin embargo, la eliminación del LOS de las vacunas reduce su eficacia, ya que este componente proporciona propiedades adyuvantes a través de la inducción de interleucina-12 (IL-12) e IL-1 β que promueven las respuestas Th1 y Th17, respectivamente [23, 24, 39].

Sin embargo, ninguno de los fragmentos de azúcar del LOS se han considerado como antígenos de vacunas, ya que no son componentes inmunogénicos. Para superar el problema en el diseño de vacunas que utilizan el LOS, el oligosacárido de hapteno no tóxico se conjugó con una proteína transportadora [27, 28]. El oligosacárido del LOS de *B. pertussis* en su forma completa (OS, oligosacárido central sustituido por un trisacárido distal) es un dodecasacárido ramificado con una estructura única. Es un componente evolutivamente estable que se ha encontrado en su forma inalterada en cepas clínicas, por lo que es un candidato adecuado para la vacuna.

Los conjugados inmunogénicos de OS de *B. pertussis* con hemaglutinina filamentosa (FHA, de sus siglas en inglés) y de OS de *B. pertussis* con albúmina de suero bovino (BSA, de sus siglas en inglés) se han descrito previamente [32, 33, 34, 35, 81, 84]. El fragmento de oligosacárido del LOS de *B. pertussis*, un componente pentasacárido conjugado con toxoide tetánico (OS-TTd) también fue inmunogénico [47]. Todos los conjugados descritos de oligosacárido de *B. pertussis* con una proteína transportadora han inducido una fuerte respuesta inmunitaria específica para el oligosacárido. Además, los anticuerpos producidos mostraron la actividad bactericida específica del LOS presentada en la superficie de *B. pertussis*, lo que lleva a la destrucción de la célula mediada por el complemento [34, 47]. *In vivo*, los anticuerpos bactericidas anti-OS eliminan las bacterias de los individuos infectados [45]. Sin embargo, los portadores de proteínas empleados, es decir, BSA y TTd, sirven como inmunógenos, pero no contribuyen al conjunto

de anticuerpos dirigidos contra *B. pertussis*. La FHA es una adhesina de *B. pertussis* y, al igual que el LOS, es un componente de la superficie. Por lo tanto, las vacunas contra la tosferina mencionadas anteriormente no combinan componentes que podrían producir la respuesta inmunitaria completa, lo que proporciona la eliminación del patógeno del organismo así como la neutralización de sus efectos tóxicos.

5 En el caso de las vacunas contra la tosferina, una composición que induce una respuesta inmunitaria que comprende neutralización de toxinas y actividades bactericidas contra *B. pertussis*, no se ha ideado hasta la fecha. La toxina tosferínica (PT), que es el inmunógeno más potente de *B. pertussis* en su forma inactivada, es un componente esencial de la vacuna contra la tosferina [53, 38, 77]. La PT pertenece a la familia de las toxinas bacterianas de tipo AB y
10 consiste en un protómero A (subunidad S1) que proporciona una actividad enzimática y un oligómero B responsable de la unión a glucoproteínas séricas y células eucariotas (subunidades S2 a S5) [8, 38, 40, 56, 53, 57, 62, 65, 76]. La PT es capaz de iniciar dos tipos de respuestas celulares: los efectos similares a las lectinas del oligómero B y la ribosilación de ADP, que interrumpe una transducción de señales que implica a proteínas de unión a nucleótidos de guanina (proteínas G). El oligómero B se requiere para la unión de la holotoxina a un receptor en la superficie de una célula diana y permite la translocación del dominio catalítico del protómero A en la célula. Los estudios sobre la relación estructura-función de la toxina tosferínica indicaron los restos de aminoácidos implicados en la actividad tóxica. Esta investigación ha permitido obtener el toxoide (PTd), que está inactivado genéticamente mediante alteraciones de los aminoácidos en el sitio activo de la subunidad S1 y/o en los restos del oligómero B implicados en la unión al receptor [25, 46]. Los ensayos clínicos en curso de una vacuna viva atenuada que contiene la PT inactivada genéticamente son prometedores [44]. Sin embargo, debido a los múltiples restos de aminoácidos implicados en la actividad de la toxina, es necesario definir los sitios y, posteriormente, utilizar la modificación para obtener un PTd completamente no tóxico. Los restos de aminoácidos que fueron significativos para las interacciones de la PT incluyen los siguientes restos: His35 y Glu129 de la subunidad S1 y el resto n.º 105 en las subunidades S2 y S3, es decir, Asn105 y Lys105, respectivamente [2, 3, 36, 65]. Alteraciones mínimas en la secuencia de la PT conducen a la destoxificación de la proteína, pero sus propiedades antigénicas permanecen inalteradas [51, 83]. Se puede suponer, que la modificación o el bloqueo de los sitios de la PT que interactúan con los receptores diana, inactivarían la PT. La solicitud de patente US005445817 del 28 de agosto de 1995 describía la inactivación de la toxina tosferínica mediante conjugación con el polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* (Pn14-PT) [82]. Sin embargo, la respuesta inmunitaria generada fue exclusivamente específica para el Pn14.

30 La destoxificación de la PT durante su formación de toxoides puede introducir varias modificaciones y cambios conformacionales en la estructura de la proteína. Los métodos de inactivación de la PT incluyen una manipulación genética mediante sustitución de aminoácidos (Arg9 → Lys y Glu129 → Gly) en la subunidad S1 y modificaciones químicas de la toxina por formaldehído, glutaraldehído, tetranitrometano, peróxido de hidrógeno o una combinación de formaldehído y glutaraldehído [25, 51, 53]. Los efectos de la reacción de destoxificación en la PT no se han definido con precisión. Se han realizado análisis fisicoquímicos, inorgánicos, espectroscópicos y serológicos de los toxoides para determinar los sitios y los efectos de las modificaciones causadas por los métodos utilizados [59, 61, 71, 72, 75, 77]. La PT se puede destoxificar mediante modificaciones en diferentes posiciones de aminoácidos en su subunidad A, oligómero B o ambos. Sin embargo, la investigación sobre el toxoide tosferínico ha indicado que existe una posibilidad de una reversión parcial del toxoide a su forma activa [26, 52]. Esta toxina tosferínica residual en una preparación de vacuna puede causar efectos tóxicos en un organismo inmunizado. La actividad enzimática de la PT revelada en la preparación podría ser responsable de la reactividad manifestada por la hipersensibilidad a la histamina y las reacciones alérgicas.

45 La toxicidad residual de una preparación que contiene toxoide tosferínico se controla para evaluar su seguridad y aceptación como vacuna contra la tosferina. La PT residual en la preparación del PTd puede ser el resultado de una inactivación incompleta de la toxina o su reversión de la toxicidad [26, 52, 79, 80]. La prueba de sensibilización a histamina *in vivo* (HIST, de sus siglas en inglés) es una prueba de seguridad oficial para detectar la actividad residual de la PT en vacunas. Sin embargo, la prueba HIST es una prueba letal y difícil de estandarizar. Como alternativa a HIST, se ha desarrollado un sistema *in vitro* basado en una unión selectiva de la PT a fetuina y la posterior detección con un anticuerpo policlonal para la seguridad de la vacuna contra la tosferina [26]. Este análisis diferencia entre la capacidad de la PT para la unión preferencial a fetuina en comparación con la unión reducida de PTd a fetuina [17]. También se ha desarrollado un sistema para examinar ambas funciones de la PT en función del ensayo de unión de carbohidratos en combinación con el monitoreo de la actividad del protómero A en un ensayo de HPLC acoplado a enzimas (E-HPLC, de sus siglas en inglés) [80]. La actividad enzimática de la PT también se puede estimar durante su interacción con las células CHO como cambios en la morfología de estas células [7, 22]. La última alternativa propuesta se basa en una observación de la translocación y la internalización de la toxina y los toxoides tosferínicos a la célula diana en base al marcaje de inmunofluorescencia directa mediante microscopía confocal [67].

60 Existe una necesidad de una vacuna contra la tosferina que contenga componentes inmunogénicos, pero completamente inactivados de *B. pertussis*.

La limitada eficacia de las vacunas contra la tosferina actualmente utilizadas se debe al hecho de que sus componentes no inducen una respuesta inmunitaria completa. Como se ha mencionado anteriormente, la vacuna contra la tosferina debería proporcionar una inmunidad funcional en forma de neutralización de toxinas, bloqueo de la adherencia bacteriana, opsonización, activación del complemento y destrucción bacteriana [69]. El PTd desempeña un papel

esencial como antígeno para la inducción de anticuerpos que neutralizan la actividad tóxica de la PT. El suero policlonal contra la holotoxina neutraliza su acción tóxica [29, 54]. Sin embargo, se demostró que la vacuna contra la tosferina acelular no tiene actividad bactericida, lo que es necesario para la eliminación inmunitaria de las bacterias del tracto respiratorio [74]. El PTD utilizado en las vacunas es una proteína secretora, que se asocia libremente con la célula y, por lo tanto, no constituye una diana para los anticuerpos bactericidas. Para solucionar este problema, LOS, el principal componente de la superficie de la célula bacteriana, se utilizó como la diana para los anticuerpos bactericidas que pueden reconocer la estructura de la superficie de las bacterias y promover la destrucción de las bacterias en presencia del complemento. Se demostró que los anticuerpos IgG contra los oligosacáridos centrales de las bacterias no encapsuladas eran protectores en los seres humanos e inducían la destrucción bacteriana dependiente del complemento [70, 73, 74]. Los glucoconjugados antitosferínicos mencionados anteriormente incluyen el conjugado OS-tioaminoxilado-BSA que indujo anticuerpos bactericidas en ratones [34] y pentasacárido-TTd que fue inmunogénico en conejos [47]. La parte de pentasacáridos del conjugado es un fragmento aislado del LOS de *B. pertussis* 186 y comprende un trisacárido distal, una heptosa y una anhidromanosa. Se ha demostrado que el conjugado pentasacárido-TTd indujo anticuerpos que fueron capaces de unirse a *B. pertussis* en ensayos de inmunofluorescencia (FACS). Además, utilizando técnicas de STD-RMN, se confirmó que los epítomos que están implicados en el reconocimiento de antígeno-anticuerpo se encuentran en el trisacárido distal y la heptosa.

Los anticuerpos anti-PT producidos en respuesta a una vacuna que contiene solo PTD como antígeno de *B. pertussis*, no destruyen las bacterias, pero neutralizan la actividad de la PT. Sin embargo, la actividad bactericida de los anticuerpos es necesaria para la eliminación completa de las bacterias del hospedador.

En el documento WO 2012/106251 se desvela una composición inmunogénica que se puede utilizar como vacunas contra *Bordetella pertussis*. La composición comprende un conjugado inmunogénico que comprende la proteína transportadora toxoide tosferínica unida por el enlazador Kdo al oligosacárido obtenido a partir de lipopolisacárido de *B. pertussis*. El transportador de toxoides es un derivado no tóxico de una exotoxina bacteriana obtenida mediante modificación genética o tratamiento con formaldehído. Dicho conjugado puede inducir una respuesta antitoxina y una actividad bactericida contra *B. pertussis* [85].

El uso de la toxina tosferínica como transportador en conjugados con oligosacáridos de origen bacteriano para proporcionar una vacuna eficaz, no tóxica y altamente inmunogénica también se describió en el documento WO 94/04195 A1. En este documento, el método adecuado para preparar el conjugado es una aminación reductora que utiliza la condensación mediada por carbodiimida en pH ácido ($\text{pH} < 4$) [86].

El método de aminación reductora utilizado para unir polisacáridos bacterianos a proteínas y toxinas también se describió en el documento WO 2011/110531 A2 [87], así como en Anderson P. et al (1985) [88]. El método implica los pasos posteriores de reacción con peryodato y con agente reductor. El conjugado obtenido mediante este método se puede utilizar en una composición inmunogénica para la prevención o el tratamiento de enfermedades bacterianas. El documento WO 2011/110531 A2 se refiere especialmente a *S. pneumoniae*, *H. influenza*, *N. meningitidis*, *S. aureus*, *S. enterococci*, *Salmonella Vi* y *S. epidermidis* [87, 88]. Como resultado del proceso de conjugación, se observó una reducción de la toxicidad de al menos 100 veces. Sin embargo, la toxicidad residual restante (1 %) aún requería una mayor destoxificación mediante el tratamiento con formaldehído [88].

La técnica anterior muestra, por lo tanto, una necesidad de una vacuna que comprenda componentes inmunogénicos contra *B. pertussis* en forma completamente inactivados.

Sorprendentemente, la presente invención proporciona un componente de vacuna que es inmunogénico y no tóxico al mismo tiempo, incluida la forma en que se recibió.

El objeto de la invención es un método para preparar un glucoconjugado que comprende un oligosacárido (OS) procedente de LOS o su fragmento y la toxina tosferínica (PT) de *B. pertussis* en donde el método comprende:

- a. cultivar *B. pertussis*;
- b. aislar LOS de las bacterias y aislar un OS;
- c. aislar PT del medio de cultivo de *B. pertussis*;
- d. activar OS mediante oxidación o desaminación;
- e. conjuguar el OS activado con la toxina tosferínica a $\text{pH} = 9$ mediante reacción de aminación reductora.
- f. purificar el glucoconjugado OS-PT obtenido,

en donde un contenido del oligosacárido o fragmento del mismo en el glucoconjugado con la PT es del 30-50 %.

Preferentemente, *B. pertussis* se cultiva en medio líquido Stainer-Scholte con adición de (2,6-di-O-metil)-B-ciclodextrina.

Preferentemente, el OS se activa con peryodato sódico.

Preferentemente, la conjugación en el punto e) se lleva a cabo en tampón de borato 0,2 M. El glucoconjugado OS-PT se puede purificar mediante cromatografía.

5 Otro objeto de la invención es un glucoconjugado que comprende un oligosacárido (OS) procedente de LOS o su fragmento y la toxina tosferínica (PT) de *B. pertussis* obtenible en el método como se define anteriormente.

Otro objeto de la invención es una composición farmacéutica que comprende el glucoconjugado como se define anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 Otro objeto de la invención es una composición farmacéutica como se define anteriormente para su uso en la prevención y tratamiento de infecciones causadas por *Bordetella pertussis*.

15 Otro objeto de la invención es una composición de vacuna que comprende el glucoconjugado como se define anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, un adyuvante. Otro objeto de la invención es una composición de vacuna como se define anteriormente para su uso en la prevención de enfermedades causadas por *B. pertussis*.

20 Se desvela un glucoconjugado que comprende el oligosacárido (OS) procedente de LOS o un fragmento del mismo acoplado a la toxina tosferínica (PT) de *B. pertussis* mediante un enlace covalente, en donde el enlace covalente se forma mediante la aminación reductora y,

preferentemente, el OS se aísla de la envoltura de la célula bacteriana o se obtiene mediante síntesis química.

25 El OS puede ser un oligosacárido central (una glucoforma incompleta, R), un trisacárido distal o un fragmento de oligosacárido procedente de LOS aislado mediante degradación específica, especialmente con oxidación y desaminación de peryodato.

El OS se puede seleccionar de los oligosacáridos de fórmula 1, fórmula 2, fórmula 3 o fórmula 4.

30 El OS puede ser un pentasacárido aislado de LOS de *B. pertussis* o su equivalente sintético.

El pentasacárido se puede aislar del LOS de *B. pertussis* 186 mediante desaminación.

35 El OS desvelado puede ser el pentasacárido representado por la fórmula 5.

Un contenido de oligosacárido o fragmento del mismo en el glucoconjugado con la PT puede ser del 30-50 %.

40 La presente invención proporciona un conjugado inmunogénico y no tóxico de oligosacárido procedente de LOS con toxina tosferínica de *B. pertussis*. Este conjugado no muestra ninguna toxicidad residual controlada con el ensayo de unión a fetuina y ninguna interacción en un ensayo con células CHO. La toxina tosferínica se inactivó mediante acoplamiento covalente con oligosacárido LOS. Presumiblemente, en el conjugado, el oligosacárido bloquea la PT en los sitios de unión para fetuina y glucoproteínas de células eucariotas. La PT destoxificada en OS-PT de la presente invención conserva sus propiedades antigénicas e inmunogénicas. El conjugado OS-PT obtenido es un candidato para su uso en la composición de vacuna contra la tosferina, ya que constituye una combinación no tóxica e inmunogénica de los dos componentes de *B. pertussis* y, por lo tanto, genera una respuesta óptima contra la tosferina.

45 El conjugado mencionado anteriormente del oligosacárido con la toxina tosferínica combina componentes de superficie y secretores de *B. pertussis*. Se espera que los anticuerpos generados en respuesta al conjugado del antígeno de superficie, que es LOS, y la PT secretada, neutralicen el efecto tóxico de la PT y sean bactericidas. Una vacuna que contiene el OS-PT debe mejorar la inmunidad contra la tosferina y disminuir el número de incidencias de esta enfermedad. El conjugado OS-PT en la vacuna previene una enfermedad mediante la neutralización de toxinas y la eliminación del patógeno. El conjugado puede ser un componente adicional de una vacuna contra la tosferina acelular compleja que consiste en proteínas secretoras. Una vacuna que comprende el OS-PT induce la producción de anticuerpos bactericidas. Por lo tanto, previene la infección por *B. pertussis* y reduce la propagación de la tosferina entre individuos susceptibles.

50 En resumen, la presente invención demuestra que el oligosacárido de *B. pertussis* acoplado covalentemente a la toxina tosferínica forma un conjugado inmunogénico y no tóxico, y que la conjugación de un oligosacárido con PT inactiva la toxina. El conjugado OS-PT carece de actividad enzimática del protómero A y de las propiedades de unión del oligómero B como se ha demostrado en la invención utilizando ensayos *in vitro*. Las características complementarias de estos dos componentes del conjugado, es decir, un oligosacárido y la toxina tosferínica que son importantes para una vacuna eficaz contra la tosferina, se resumen en la siguiente tabla. El conjugado es una combinación del componente de superficie de *B. pertussis*, que es el LOS, y componente secretor, que es la toxina tosferínica (a). La toxina tosferínica es el inmunógeno de *B. pertussis* más potente. Cuando se conjugaba con un oligosacárido, induce la fuerte respuesta dirigida específicamente a este oligosacárido (b). La toxina tosferínica comprende una variedad de epítopos reconocidos por los linfocitos T y B (c). Por otro lado, un oligosacárido tiene una alta estabilidad térmica y

química, y cuando se acopla a una proteína transportadora es capaz de alcanzar los sitios de acumulación de células inmunitarias que generan una respuesta inmunitaria específica y duradera al oligosacárido (c). El oligosacárido como componente del lipooligosacárido conservado evolutivamente pertenece a los "patrones" reconocidos por el sistema inmunitario innato, cuya activación es esencial para la respuesta inmunitaria completa (d). Los anticuerpos anti-OS de *B. pertussis* generados muestran propiedades protectoras contra las cepas utilizadas en las vacunas actuales, así como contra las cepas clínicas. La variabilidad conformacional de la proteína transportadora permite una mejor exposición al oligosacárido (d). La conjugación del oligosacárido con la toxina tosferínica forma un conjugado no tóxico e inmunogénico, que induce la respuesta inmunitaria y produce anticuerpos con propiedades bactericidas y neutralizantes (e) (Tabla 1).

Tabla 1

Características complementarias de los componentes del conjugado OS-PT no tóxicos e inmunogénicos	
Oligosacárido procedente de LOS	Toxina tosferínica
a) componente de superficie	componente secretor
b) especificidad	inmunogenicidad
c) estabilidad	multivalencia
d) conservador	flexibilidad
e) anticuerpos bactericidas	anticuerpos neutralizantes de toxinas

La invención presenta un conjugado inmunogénico y no tóxico de oligosacáridos procedente de LOS y toxina tosferínica (OS-PT) de *Bordetella pertussis* como una vacuna que protege contra infecciones y enfermedades causadas por *B. pertussis*. El conjugado es capaz de provocar anticuerpos contra ambos componentes, el oligosacárido y la PT. Por lo tanto, induce una producción de anticuerpos específicos de tipo y protectores contra *B. pertussis*. Los anticuerpos generados en respuesta al conjugado neutralizan el efecto tóxico de la PT y tienen actividad bactericida contra *B. pertussis*. Estos anticuerpos promueven una destrucción bacteriana que implica un complemento. Por lo tanto, el conjugado OS-PT induce un efecto protector mediante la neutralización de la toxina y la eliminación de *B. pertussis* del hospedador.

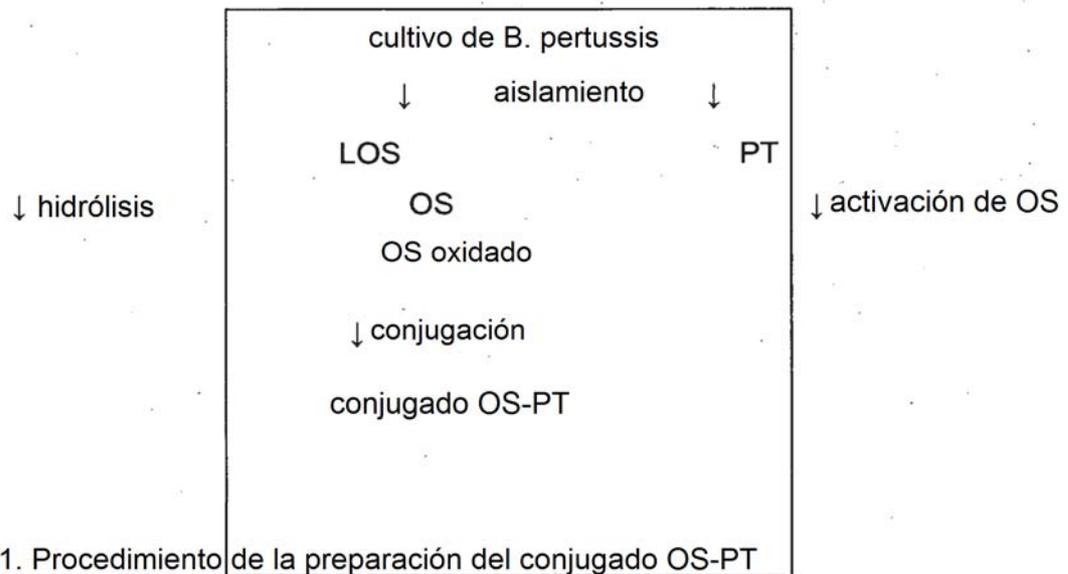
La presente invención se refiere a un conjugado OS-PT en el que el componente PT se hizo no tóxico durante la reacción de acoplamiento. Para la reacción de conjugación, la toxina tosferínica y el oligosacárido LOS se utilizan en cantidades que causan la inactivación de la toxina. Preferentemente, un contenido de un oligosacárido en el glucoconjugado con PT es del 30-50 %. Preferentemente, un contenido de oligosacárido o fragmento del mismo en el glucoconjugado con PT es del 49 %. La inactivación de la PT en la preparación de OS-PT se monitoriza en ensayos *in vitro*, como la prueba ELISA con fetuina y un ensayo utilizando células CHO. Los conjugados OS-PT con la sustitución del 30 y 49 % no fueron activos en la prueba de unión a fetuina y en el ensayo con células CHO.

La invención también proporciona métodos para la preparación del conjugado oligosacárido-toxina tosferínica inmunogénico y no tóxico. Este método permite obtener estos dos componentes del conjugado, que es un oligosacárido procedente de LOS y un portador de proteína, que es una toxina tosferínica, del cultivo de *B. pertussis*, simultáneamente. El posible aislamiento de ambos antígenos de una fuente acelera la preparación de la vacuna. El oligosacárido de la invención se puede obtener mediante síntesis química.

El conjugado oligosacárido-toxina tosferínica de acuerdo la invención se obtiene mediante aminación reductora. La reacción de conjugación se lleva a cabo en tampón borato 0,2 M a pH 9,0.

La presente invención se refiere a un método para la preparación del conjugado del oligosacárido LOS con la toxina tosferínica de *B. pertussis* que comprende las etapas (Esquema 1):

1. El cultivo de *B. pertussis* utilizando medio líquido Stainer - Scholte.
2. Aislamiento de LOS de bacterias y posterior aislamiento de un oligosacárido.
3. Aislamiento de PT del medio de cultivo de *B. pertussis*.
4. Activación de un OS con peryodato sódico, produciendo el OS oxidado.
5. Conjugación de OS oxidado y PT mediante aminación reductora.
6. Purificación del OS-PT mediante cromatografía.



Esquema 1. Procedimiento de la preparación del conjugado OS-PT

5 Siguiendo el procedimiento de preparación del conjugado OS-PT, se determina el contenido de oligosacárido en el conjugado-glucoconjugado obtenido. La incapacidad de OS-PT para unirse a fetuina y ninguna interacción con células CHO se prueba en ensayos *in vitro*.

10 En un aspecto, la vacuna es un conjugado no tóxico e inmunogénico del fragmento de oligosacárido de LOS de *B. pertussis* con toxina tosferínica. El fragmento de oligosacárido LOS de *B. pertussis* de la presente invención puede ser cualquier fragmento de OS que provoque la inactivación de la toxina como resultado de la unión covalente. El fragmento de oligosacárido del LOS de *B. pertussis* utilizado para la conjugación con la toxina tosferínica se puede seleccionar entre los siguientes:

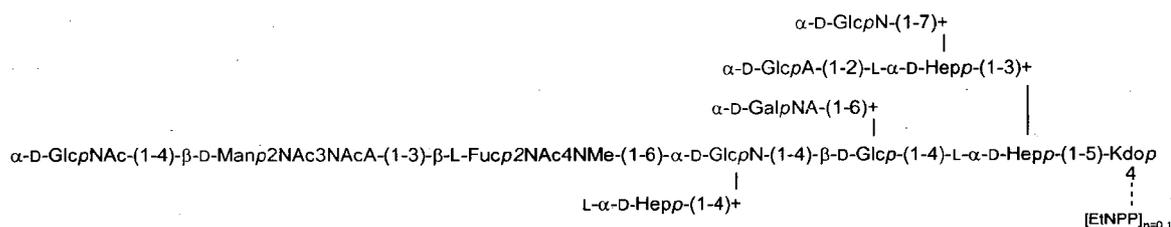
1. un oligosacárido central (una forma incompleta, R)
- 15 2. un trisacárido distal aislado u obtenido mediante síntesis química
3. fragmentos de oligosacáridos procedentes de LOS mediante degradación específica (por ejemplo, desaminación, hidrólisis suave, etc.)

20 En un aspecto de la invención, la vacuna es un conjugado no tóxico e inmunogénico de la toxina tosferínica con un pentasacárido, en donde el pentasacárido se aísla del LOS de *B. pertussis* 186 mediante desaminación o es un equivalente sintético del mismo. La toxina tosferínica y el pentasacárido de LOS se utilizan para la reacción de conjugación en cantidades que causan una sustitución de la proteína que inactiva las toxinas. Sorprendentemente, una sola etapa de efecto de detoxificación se logra sin la necesidad de detoxificación mediante métodos químicos o genéticos. El glucoconjugado del pentasacárido-PT no muestra capacidad de unión en un ELISA con fetuina.

30 La invención proporciona una formulación del conjugado OS-PT para utilizar como una vacuna contra *B. pertussis*. Este conjugado puede constituir un componente adicional de una vacuna contra la tosferina, además de los antígenos de la proteína de *B. pertussis*, que actúa solo mediante la neutralización de toxinas. Los anticuerpos producidos contra los componentes de la vacuna, excepto para LOS, no promueven la destrucción dependiente del complemento. Sin embargo, debido a que muchos factores de virulencia están implicados en la patogénesis de la tosferina, incluido LOS, es esencial una actividad bactericida destructiva directa. Una vacuna que contiene el OS-PT induce la producción de anticuerpos bactericidas y asegura la eliminación de bacterias del hospedador. Por lo tanto, previene la infección por *B. pertussis* y dificulta la propagación de la enfermedad entre individuos susceptibles.

35 El término "oligosacárido" (OS) de la presente invención se refiere a un oligosacárido o sus fragmentos aislados de lipooligosacárido (LOS) de *B. pertussis*. El oligosacárido de la invención también se puede preparar mediante síntesis química. El oligosacárido de *B. pertussis* utilizado para la conjugación con PT es un oligosacárido central sustituido por un trisacárido distal (OS, una forma completa, RS). El OS es un dodecasacárido ramificado que tiene la siguiente estructura (FÓRMULA 1):

40

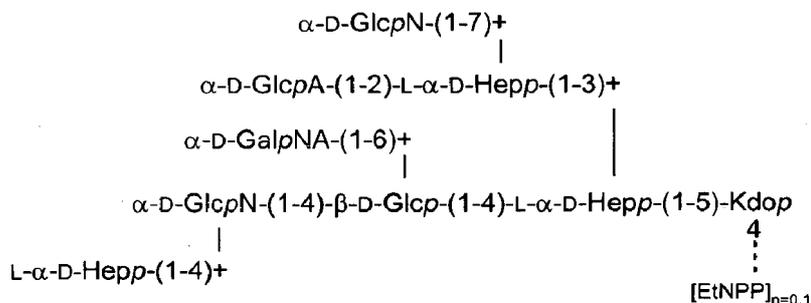


(FÓRMULA 1)

En un aspecto de la invención, la vacuna es un conjugado del fragmento de oligosacárido procedente de LOS y la toxina tosferínica de *B. pertussis*. El "fragmento de oligosacárido" de LOS de *B. pertussis* de la presente invención es cualquier fragmento del OS que provoca la inactivación de la toxina tosferínica mediante un acoplamiento covalente.

5 El fragmento de oligosacárido de LOS de *B. pertussis* utilizado para la conjugación con la toxina tosferínica puede ser cualquier fragmento seleccionado del grupo enumerado a continuación:

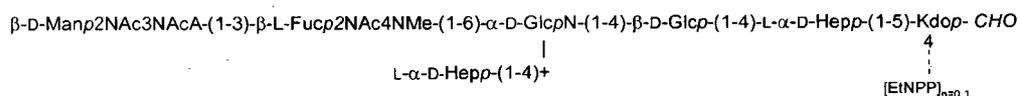
- 10 1. un oligosacárido central (una forma incompleta, R)



(FÓRMULA 2)

- 15 2. un trisacárido distal aislado u obtenido mediante síntesis
 $\alpha\text{-D-Glc}\rho\text{Nac-(1-4)-}\beta\text{-D-Man}\rho\text{2NAc3NAcA-(1-3)-}\beta\text{-L-Fuc}\rho\text{2NAc4NMe}$ (FÓRMULA 3)
 3. fragmentos de oligosacárido procedente de LOS obtenido mediante degradación específica, tales como:

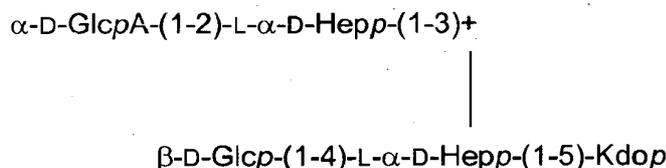
- a) el producto de oxidación de peryodato



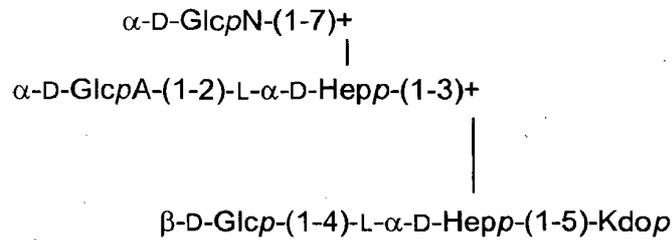
20 (FÓRMULA 4)

- b) el producto de desaminación

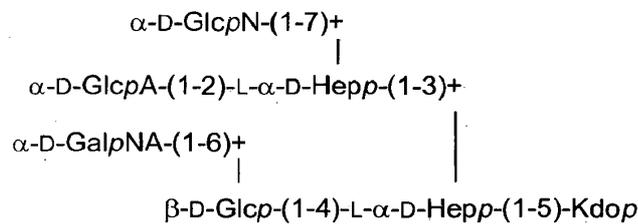
25 Las siguientes estructuras corresponden a fragmentos de oligosacáridos del LOS de *B. pertussis* 186 obtenidos mediante la reacción de desaminación y purificados a partir del pentasacárido que contiene el trisacárido terminal (Método 8). Los siguientes compuestos se han identificado en espectros MALDI-TOF MS de una fracción no soluble que contiene productos de la desaminación de LOS (Figura 12 B).



A)

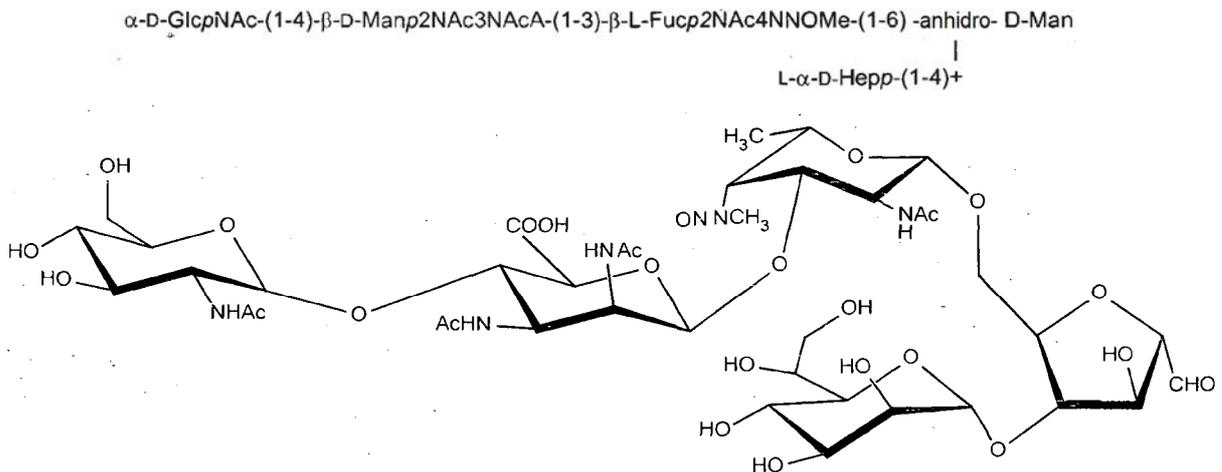


B)



C)

5 En un aspecto de la invención, la vacuna es un conjugado de toxina tosferínica con el pentasacárido aislado mediante desaminación del LOS de *B. pertussis* 186 o un pentasacárido sintético. El pentasacárido incluye epítomos inmunodominantes de LOS, que incluyen el trisacárido terminal y la heptosa terminal. El pentasacárido en la composición de glucoconjugado posee la siguiente estructura (FÓRMULA 5):



10 (FÓRMULA 5)

15 Sobre la base de los datos de la bibliografía [4, 13], se puede suponer que este pentasacárido es un fragmento de azúcar de LOS de *B. pertussis*, que se genera como resultado del procesamiento endosomal de LOS mediante despolimerización desaminativa. El OS desaminado puede ser un fragmento de LOS presentado a los linfocitos T y, por lo tanto, puede inducir la producción de anticuerpos específicos. El LOS despolimerizado puede producir un componente de vacuna óptimo.

20 El acoplamiento del pentasacárido a la toxina tosferínica mediante aminación reductora forma un glucoconjugado no tóxico. Dicho glucoconjugado pentasacárido-PT no es capaz de unirse a fetuina en la prueba ELISA.

El término "lipooligosacárido" de *B. pertussis* indica que la endotoxina de esta bacteria carece de un antígeno O típico, que es el polisacárido específico de O. El LOS no es una molécula polimérica compleja, pero de manera similar a los

lipopolisacáridos (LPS) de otras bacterias Gram-negativas, es un factor de virulencia esencial y un antígeno protector [1, 73]. En el caso de *B. pertussis*, un oligosacárido se expone en la superficie de la célula.

5 El término "conjugado" en esta invención significa un acoplamiento covalente de un oligosacárido de hapteno con una proteína transportadora, que es la toxina tosferínica, para hacer que el OS sea más inmunogénico. La conjugación se utiliza para obtener una formulación que modula la respuesta del anticuerpo al oligosacárido.

10 El término "inmunogénico" significa "inducir una respuesta inmunitaria", tal como una producción de anticuerpos. Un conjugado inmunogénico oligosacárido-proteína transportadora induce la producción de anticuerpos específicos para un oligosacárido. El componente OS del LOS aplicado a la conjugación en la presente invención incluye un trisacárido terminal y heptosa terminal ambos acoplados a una glucosamina que son epítomos reconocidos por sueros de ratones inmunizados con *B. pertussis* [5, 47, 34].

15 La expresión "toxina tosferínica" (PT) se refiere a una exotoxina secretada por *B. pertussis*. La PT es una proteína de peso molecular de aproximadamente 105 kDa y pertenece a las toxinas bacterianas de tipo AB [8, 38, 40, 56, 57, 58, 62, 65, 76]. Consiste en la subunidad A que tiene actividad enzimática y el oligómero B que exhibe actividad de unión a glucoproteínas de células eucariotas y de suero. Estas dos actividades de la PT se monitorizan en la prueba de interacción utilizando las células CHO (la prueba de la actividad del protómero A) y la prueba de unión de fetuina (la prueba de la actividad del oligómero B). La PT en esta invención se puede preparar mediante diversos métodos de aislamiento conocidos en la técnica [49, 60, 64, 66].

20 La invención también proporciona métodos para la preparación del conjugado inmunogénico y no tóxico de un oligosacárido y toxina tosferínica. El oligosacárido se obtiene mediante la extracción de LOS con fenol-agua de acuerdo con el método de Westphal *et al*, seguido de hidrólisis ácida de LOS y procesos de purificación posteriores. La PT se aísla mediante cromatografía de intercambio iónico [49, 66].

25 El conjugado OS-PT no es tóxico ni en el ensayo de unión a fetuina ni en la prueba que utiliza células CHO. Estas pruebas de seguridad se definen como ensayos para la vacuna contra la tosferina. La expresión "pruebas de seguridad para las vacunas contra la tosferina" se refiere a los métodos de monitoreo de la actividad de la PT en las vacunas acelulares y de células completas [79]. La actividad residual de la PT en las vacunas que contienen PTd puede deberse a una inactivación incompleta o a la reversión a la toxicidad. Existen dos métodos para establecer la PT activa en las preparaciones de vacunas: la prueba de sensibilización a histamina (HIST) y una prueba que utiliza células CHO. Estos métodos se utilizan para determinar la actividad biológica de la preparación. Las pruebas de seguridad se utilizan para garantizar que los niveles de PT en las vacunas estén en un nivel aceptable (LOQ, <Límite de cuantificación> para la PT es 8 ng/ml de la preparación de la vacuna) [26]. Un material de referencia internacional de la PT (JNIIH-50) se define como la preparación de la PT estándar (sPT).

35 El conjugado OS-PT se puede obtener utilizando los métodos de conjugación conocidos en la técnica. La expresión "métodos de conjugación conocidos en la técnica" abarca los métodos normalmente utilizados en la preparación de conjugados. Las reacciones de conjugación directa, las reacciones que emplean un enlazador, las reacciones con una activación inicial de una proteína o un oligosacárido son los métodos normalmente utilizados para la conjugación [27, 28, 32, 33, 34, 35]. El conjugado oligosacárido-toxina tosferínica descrito en el presente documento se obtiene mediante la aminación reductora. La reacción de conjugación se lleva a cabo en tampón borato 0,2 M a pH 9,0. La expresión "aminación reductora" como se utiliza en el presente documento significa que durante la reacción se forma un enlace covalente del oligosacárido oxidado LOS con la toxina, seguido de la reducción del enlace creado. El resto Kdo modificado de un oligosacárido reacciona con el grupo amino libre de la proteína para formar un conjugado estable en presencia de un agente reductor. Esta conjugación de un oligosacárido y la toxina tosferínica da como resultado la inactivación de la toxina.

40 Se ha demostrado la incapacidad del glucoconjugado OS-PT para unirse a fetuina y, de manera similar, el glucoconjugado OS-PT no tiene efecto en una interacción con las células CHO. La destoxificación de la toxina tosferínica mediante la unión del oligosacárido es un resultado del bloqueo de los sitios de unión de la proteína. Durante la conjugación, un oligosacárido se puede unir a los grupos amino terminales de las subunidades y al grupo amina de los restos de lisina en el oligómero B. La subunidad S1 enzimáticamente activa no contiene lisina, por lo tanto, el oligosacárido solo se puede unir a su extremo N. El acoplamiento del resto N-terminal de la subunidad S1 con un oligosacárido puede perjudicar su conformación del sitio activo y, por consiguiente, anular su actividad enzimática. Sin embargo, el análisis de espectrometría de masas del OS-PT digerido con tripsina, ha indicado una señal correspondiente al péptido que posee un resto N-terminal no modificado. Esto sugiere que el extremo N de la subunidad S1 no está disponible para el oligosacárido y no se ha producido un acoplamiento del oligómero A con OS (Fig. 9F). Por lo tanto, la modificación del oligómero B, que es un dominio responsable de la actividad de unión a la toxina, parece ser suficiente para destoxificar la proteína. Presumiblemente, el oligómero B modificado no es capaz de unirse al receptor de células CHO (proteína N-glucosilada) y, por consiguiente, no hay liberación del oligómero A y la actividad enzimática no se revela. La investigación reportada sobre la relación estructura-función indicó que la subunidad S3 está implicada en el anclaje de la PT en la membrana con la posterior translocación de la subunidad S1 [56, 57]. Sin embargo, los estudios que utilizaron anticuerpos contra determinantes protectores de la subunidad S2 demostraron que estos anticuerpos inhibían la unión de la PT a fetuina, pero no tenían ningún efecto sobre la

interacción con la célula CHO. En el análisis en profundidad se ha señalado el resto de aminoácidos n.º 105 en las subunidades S2 y S3, como el implicado en la unión a las glucoproteínas en la célula. Como resultado de la conjugación de la PT con un oligosacárido, los sitios de unión en las subunidades S2 y S3 de la PT pueden bloquearse, como lo demuestra la pérdida de interacciones con fetuina y con las células CHO. Los efectos del formaldehído en la PT, que es una reticulación de la proteína mediante modificación de los restos de lisina en la superficie, proporcionan una indicación adicional de que la modificación de los restos de lisina inactiva la PT. Se ha demostrado que la modificación de los sitios funcionales de la PT mediante formaldehído conduce a un toxoide no tóxico [42]. Sin embargo, a pesar de la modificación estructural, el toxoide mantiene su inmunogenicidad y, por lo tanto, induce la respuesta inmunitaria protectora a través de la producción de anticuerpos que neutralizan la toxina. Los grupos ε-amino libres de lisina están implicados en la unión del oligómero B de la toxina a la superficie de la célula diana. La acetamidación de los restos de lisina redujo las actividades dependientes del oligómero B (mitogenicidad, promoción de la linfocitosis, sensibilización a la histamina, adyuvancia y aumento de la permeabilidad vascular) [48].

La conjugación se lleva a cabo en tampón borato a pH 9,0. Las condiciones de reacción son esenciales para la conjugación de OS con PT porque, como se demostró, la PT es inestable en el intervalo de pH 4-8 [82].

El conjugado OS-PT induce la producción de anticuerpos específicos para un oligosacárido. El conjugado OS-PT también induce la producción de anticuerpos anti-PT que neutralizan los efectos tóxicos de *B. pertussis*. La expresión "anticuerpos neutralizantes" significa que la toxina tosferínica en el glucoconjugado agrega los anticuerpos antitoxina a un conjunto de anticuerpos protectores anti-OS. Las propiedades neutralizantes del suero inducidas por el OS-PT mejoran la respuesta protectora contra la tosferina.

Este conjugado combina un componente de superficie, que es el fragmento LOS expuesto de *B. pertussis*, es decir, el OS y una proteína secretora de *B. pertussis* como la PT. Los anticuerpos generados en respuesta al conjugado de la superficie OS y la PT secretora neutralizan el efecto tóxico de la PT y son bactericidas. La actividad de los anticuerpos se ha demostrado utilizando un ensayo de células CHO y un ensayo bactericida. Los anticuerpos anti-OS-PT inhibieron la acción de la PT en las células CHO y mostraron la actividad bactericida en presencia del complemento de conejo. Los anticuerpos fueron capaces de reconocer el LOS en las células de *B. pertussis* y promover la destrucción bacteriana dependiente del complemento. La vacuna que consiste en OS-PT debe proporcionar una respuesta inmunitaria que evite la enfermedad mediante la neutralización de toxinas y mediante la eliminación de las bacterias del tracto respiratorio. Por lo tanto, previene la infección causada por *B. pertussis* y limita la propagación de la enfermedad entre individuos susceptibles. El conjugado puede constituir un componente adicional de una vacuna contra la tosferina acelular que consiste solo en proteínas secretoras, tales como PTd y FHA.

La invención también proporciona una formulación farmacéutica caracterizada por que comprende un conjugado inmunogénico y no tóxico del OS-PT. En una realización, la composición puede contener adyuvantes, estabilizantes y disolventes que son aceptables en las formulaciones de vacuna.

El término "adyuvante" se refiere a una sustancia que potencia la respuesta inmunitaria post-vacuna al antígeno administrado. El mecanismo de acción se basa en retardar la liberación de un antígeno y proporcionar una "señal de peligro" para estimular el sistema inmunitario. Un adyuvante adecuado para la formulación de vacuna pertenece al grupo que consiste en: sales inorgánicas (fosfato de aluminio, fosfato de calcio), hidróxido de aluminio, ISCOM, liposomas, monofosforil lípido A (MPL), dipéptido de muramilo.

La invención proporciona una preparación de un conjugado de oligosacárido-PT inmunogénico y no tóxico para utilizar como una vacuna para la protección contra infecciones causadas por *B. pertussis*.

En la presente invención, se preparó un conjugado inmunogénico y no tóxico de un oligosacárido procedente de LOS de *Bordetella pertussis* 186 con toxina tosferínica como una vacuna para la prevención y el tratamiento de enfermedades causadas por *B. pertussis*. Como es un posible antígeno de vacuna, se han investigado sus propiedades inmunológicas, serológicas e inmunológicas.

Leyendas de las figuras

Fig. 1. Aislamiento de la PT utilizando CM-Sefarosa. La fracción I, tiempo de retención de 245 minutos, corresponde a la PT y la fracción II, tiempo de retención de 335 minutos, corresponde a la FHA.

Fig. 2. Aislamiento del OS oxidado utilizando una filtración en gel, G3000-PW. Las condiciones de flujo fueron: 6 ml/min, H₂O. Las fracciones de la HPLC en tiempos de retención de 16,8 minutos y 20,5 minutos representan el OS oxidado.

Fig. 3. Espectros MALDI-TOF MS de preparaciones de *B. pertussis*: célula completa, LOS, OS y OS oxidado y una tabla de interpretación de señales. Los espectros se obtuvieron utilizando un instrumento Autoflex III, Bruker Daltonics. Se utilizó DHB como matriz.

Fig. 3A. MALDI-TOF MS de células enteras de *B. pertussis* en el intervalo m/z correspondiente a los iones de LOS, registrados en modo lineal de iones negativos.

Fig. 3B. MALDI-TOF MS de LOS de *B. pertussis* 186 registrado en el modo lineal de iones negativos. Fig. 3C. MALDI-TOF MS de LOS de *B. pertussis* 186 registrado en el modo de reflexión de iones negativos.

Fig. 3D. MALDI-TOF MS de OS de *B. pertussis* 186 registrado en el modo de reflexión de iones positivos.

Fig. 3E. Interpretación de los iones correspondientes a las señales de las moléculas observadas en el espectro MALDI-TOF MS de LOS de *B. pertussis* 186 registradas en el modo de reflexión de iones negativos, donde: Hep - heptosa, PPEtN - pirofosforyletanolamina, P - fosfato, Ac - grupo acetilo, H₂O - agua, C₁₄OH - ácido graso; int. - señales con las intensidades más altas.

Fig. 3F. Espectros MALDI-TOF MS del OS y del OS oxidado registrados en el modo lineal de iones negativos. La diferencia de 30 Da (una pérdida del fragmento HCHO) indica que el oligosacárido se oxidó con perodato sódico 0,01 M. La señal en m/z 2279,5 corresponde a la forma oxidada del OS.

Fig. 3G. MALDI-TOF MS de OS oxidado registrado en el modo de lineal de iones positivos. La señal en m/z 2298,4 corresponde a la forma hidratada del OS oxidado. La señal en m/z 1337,8 se atribuyó tentativamente al OS oxidado desprovisto de los restos de Hep, HexNAc, HexN, HexA, HexNA y dos moléculas de agua.

Fig. 4. Aislamiento del conjugado OS-PT utilizando filtración en gel en la columna G3000-SW a un caudal de 6 ml/min, PBS. La medición se realizó en longitudes de onda: (A) 280 nm y (B) 206 nm. La fracción I (tiempo de retención de ~ 8,3 min) es el conjugado OS-PT con un contenido de oligosacáridos del 49 % y la fracción II (tiempo de retención de 17 min) con el contenido de OS del 30 %. La señal registrada en el espectro a 206 nm con un tiempo de retención de 18,3 minutos corresponde a un OS no conjugado.

Fig. 5. Ensayo de unión a fetuina de PT y el conjugado OS-PT. El OS-PT se evaluó a una concentración 40 veces mayor que la de la PT. Los valores de absorbancia para el conjugado fueron más bajos en comparación con estos para la concentración más baja de la PT.

Fig. 6. Análisis de células CHO para la toxina tosferínica

Fig. 6A. Análisis de interacción de la PT y el OS-PT en las células CHO. A) un control positivo - 62 ng/ml de sPT; B) 156 ng/ml de OS-PT; C) un control negativo; D) 130 µg/ml de OS-PT; E) 0,9 µg/ml de PT. Las observaciones se realizaron utilizando Axio Vert. A1 (Zeiss) con un aumento de lente de 10.

Fig. 6B. Prueba de neutralización de la toxina tosferínica por los anticuerpos anti-OS-PT (suero). a) suero n.º 3239 diluido 1:32; b) suero n.º 3239 diluido 1:4; c) suero n.º 3271 diluido 1:64; d) suero n.º 3271 no diluido, e) un control negativo (células CHO); f) un control positivo (células CHO con PT). Las observaciones se realizaron utilizando Axio Vert. A1 con un aumento de lente de 20.

Fig. 7. Reacciones de los sueros contra el OS-PT obtenido después de la tercera dosis de inmunización de conejos. Reactividades de los sueros numerados: 3239 y 3271 se determinaron mediante ELISA con LOS de *B. pertussis* 186 como un antígeno en fase sólida.

Fig. 8. SDS-PAGE teñida con plata de LOS de *B. pertussis* 186 (A) e inmunotransferencias de LOS con el suero de conjugado anti-OS-PT diluido 1:200 (B)

Fig. 9. Espectros MALDI-TOF MS de PT y el OS-PT. Los espectros se adquirieron en modo de ion positivo (Autoflex III o Ultraflex, Bruker Daltonics).

Fig. 9A. Espectro MALDI-TOF MS de sPT. Se utilizó SA como matriz.

Fig. 9B. Espectro ISD de sPT. Se usó diaminonaftaleno (DA) como matriz. Este análisis permitió la determinación de la secuencia correspondiente al fragmento S4 de la PT. Fig. 9C. Espectro MALDI-TOF MS de la mezcla de péptidos que resulta de la digestión triptica de la PT. Se utilizó HCCA como matriz. Las señales observadas en el espectro corresponden a péptidos procedentes de las subunidades (S1 - S5), tales como: ¹²²MFLGPK¹²⁷ m/z 692,63 - S4; ⁵⁶ALTVAELR⁶³ m/z 872,86 - S2; ¹⁶⁹RIPPENIR¹⁷⁶ m/z 994,97 - S1; ²¹⁷SVASIVGTLVR²²⁷ m/z 1102,09 - S1; ⁶⁴GSGDLQEYLR⁷³ m/z 1137,99 - S1; ⁶⁵GNAELQTYLR⁷⁴ m/z 1165,04 - S3; ⁹³YTEVYLEHR¹⁰¹ m/z 1210,05 - S1; AVFMQQRPLR¹²¹ m/z 1246,16 - S4; ³⁹ALFTQQGGAYGR⁵⁰ m/z 1269,12 - S3; ¹⁰⁰RPSSPMEVMLR¹¹¹ m/z 1360,20 - S4; ⁹²RYTEVYLEHR¹⁰¹ m/z 1366,20 - S1; ¹¹⁴GTGHFIGYIEVVR¹²⁶ m/z 1512,32 - S1; ¹²⁸QLTFEGKPALELIR¹⁴¹ m/z 1615,51 - S4; ^{K79}LGAAASSPDAHVPFCFGK⁹⁶ m/z 1775,50 - S4; 1877,67 - S1; 919,75 - S3; ¹²⁰NTGQPATDHYYSNVTATR¹³⁷ m/z 1996,64 - S2; ¹⁸¹VYHNGITGETTTTEYSNAR¹⁹⁹ m/z 2114,75 - S1; ^{K51}TNMVVTSVAMKPYEVTPT⁶⁹ m/z 2124,74 - S4; ²⁸STPGIVIPPQEQTQHGGPYGR⁴⁹ m/z 2333,05 - S2; ⁴⁴YDSRPPEDVFQNGFTAWGNN DNVLDHLTGR⁷³ m/z 3435,79 - S1.

Esta asignación de restos de aminoácidos de la PT incluye las secuencias de señal y, por lo tanto, difiere de la numeración de la secuencia de la PT presentada en la descripción de la invención.

Fig. 9D. La disociación inducida por láser (LID, de sus siglas en inglés) empleada para la identificación de las secuencias peptídicas de la PT. Por ejemplo, una secuencia: R.NTGQPATDHYYSNVTATR, m/z 1996,641 se identificó y corresponde al fragmento de aminoácido (posición 120-137) de la subunidad S2.

Fig. 9E. Espectro MALDI-TOF MS del OS-PT. Espectros MALDI-TOF MS del OS-PT con contenido de OS variable, 49 % y 30 % (OS-PT I y II, respectivamente). Los espectros de ambos OS-PT, mostraron señales idénticas. Las diferencias entre los espectros del OS-PT y los espectros de la PT indican que las subunidades PT fueron modificadas mediante la conjugación con OS.

Fig. 9F. Espectros MALDI-TOF MS de los péptidos obtenidos de una digestión triptica del OS-PT. Las señales observadas, en m/z 2114,90, 2332,01 y 1033,04 representan los péptidos PT no modificados presentes en las subunidades S1 y S2. Adicionalmente, las secuencias de VYHNGITGETTTTEYSNAR para iones en m/z 2113,902 e YVSQQTR para iones en m/z 881,4620 se identificaron en el OS-PT, lo que significa que estos péptidos no se han modificado durante la conjugación de la PT. Los péptidos se separaron en la columna C₁₈.

Fig. 9G. Tabla de valores m/z para señales, que se observaron en los espectros MALDI-TOF MS de péptidos generados mediante la digestión triptica de la PT y el OS-PT. Los péptidos que contienen una lisina (K) son posibles sitios de la unión de OS. La falta de dichas señales en los espectros del OS-PT y su presencia en los espectros de la PT sugiere que contienen los restos de lisina sustituidos por un oligosacárido. Los restos de lisina en los péptidos que son posibles sitios de sustitución por el OS se designan en la tabla como posibles sitios de glucosilación.

Los posibles sitios de glucosilación son restos de lisina numerados en la secuencia de subunidades de la siguiente manera: S2- 110 y 178; S3- 38 y 133; S4- 61 y 96; S5 - 52 Los posibles sitios de glucosilación también pueden incluir restos de lisina en la posición 121 en la subunidad S3 y en las posiciones 50, 78 y 99 en la subunidad S4, ya que las señales no se observaron, ni en el espectro del OS-PT ni en el espectro de la PT. La falta de señales peptídicas puede deberse a su inestabilidad durante la medición o su mala ionización en las condiciones de medición aplicadas, mientras se utiliza MALDI-TOF MS.

Fig. 10. Espectros de NMR de oligosacáridos de *B. pertussis* 186.

Fig. 10A. Espectros ^1H NMR de oligosacárido de *B. pertussis* 186.

Fig. 10B. Espectros ^1H NMR de oligosacárido oxidado de *B. pertussis* 186.

Fig. 11. Espectros 2D NMR del pentasacárido procedente de LOS de *B. pertussis* 186. Se obtuvieron espectros COSY (A), HSQC (B), HMBC (C). Los datos de desplazamiento químico (D) de los espectros se resumieron en una tabla. Los restos de azúcares en el pentasacárido se designan por las letras A a E como se muestra en el dibujo adjunto.

Fig. 12. Espectros MALDI-TOF MS de los productos de desaminación de LOS.

Fig. 12A. MALDI-TOF MS del pentasacárido aislado de LOS de *B. pertussis* 186. El espectro se registró en modo de iones negativos en el espectrómetro Ultraflex, Bruker Daltonics. Se usó trihidroxiacetofenón (25 mg/ml) como matriz.

Fig. 12B. Espectro MALDI-TOF MS de los productos de desaminación de LOS separados del pentasacárido. Se identificó un fragmento central desprovisto del pentasacárido terminal y del ácido galactosaminurónico con una masa de 1121,35 en forma deshidratada como un ion en m/z 1102,5734 (**). Un fragmento de oligosacárido obtenido después de la escisión del pentasacárido terminal, el ácido galactosaminurónico y la glucosamina, con una masa monoisotópica de 960,28, corresponde al ion en m/z 959,4448 y su forma deshidratada en m/z 941,4750 (***). Los iones en m/z 1558,32, 1478,35, 1332,08, 1252,12 (****) representan el lípido A.

La invención se ilustra mediante la siguiente realización.

Ejemplos

A. El cultivo de *B. pertussis*

B. pertussis 186 se cultivó en medio líquido Stainer-Scholte con una adición de (2,6-di-O-metil)- β -ciclodextrina. El crecimiento se controló mediante biotipificación utilizando MALDI-TOF MS y el método Biotyper MALDI (MBT). El análisis espectral se realizó en el modo de iones positivos, para dar los espectros de la proteína y en el modo de iones negativos para obtener perfiles de endotoxinas (Fig. 3 A, de acuerdo con los documentos P. 400598 y WO2014035270A1). Sobre la base del perfil característico de la proteína MALDI-TOF MS, *B. pertussis* 186 cultivada en medios sólidos y líquidos se ha identificado como *Bordetella pertussis* DSM 4925 en la base de datos de referencia MALDI Biotyper. La cepa *B. pertussis* 186 utilizada en esta invención es una cepa de tipo vacuna utilizada para la inmunización de niños en Polonia.

B. Aislamiento de una toxina tosferínica

La toxina tosferínica, utilizada como componente del glucoconjugado en esta invención, se preparó mediante el aislamiento de los medios de cultivo de *B. pertussis* 186 utilizando un método de cromatografía de intercambio iónico (Método 1) [49, 66]. El método se modificó en su etapa final, mediante la utilización de un tampón con un contenido de glicerol del 50 % durante la diálisis. La adición de glicerol demostró ser necesaria para aislar la PT. En resumen, el método emplea la CM-Sefarosa CL-6B utilizada como resina de intercambio catiónico. La separación se logra mediante la unión de dos proteínas del cultivo de *B. pertussis* 186, PT y FHA a la resina y su posterior elución como fracciones separadas mediante el cambio del pH y la fuerza iónica. El aislamiento de la PT se controló mediante medición de absorbancia UV (Fig. 1). En el cromatograma registrado, la primera fracción con un tiempo de retención de 245 minutos corresponde a la PT, y la segunda fracción con un tiempo de retención de 335 minutos corresponde a la FHA. Las fracciones que contenían la PT reaccionaron con el anticuerpo antitoxina tosferínica en inmunotransferencia. Un cultivo (3,5 litros) de *B. pertussis* 186 produjo 4,26 mg de PT. Se almacenaron a $-75\text{ }^\circ\text{C}$ las fracciones de la PT en un tampón fosfato que contenía NaCl 0,5 M y glicerol al 50 %.

C. Aislamiento del oligosacárido de *B. pertussis* 186

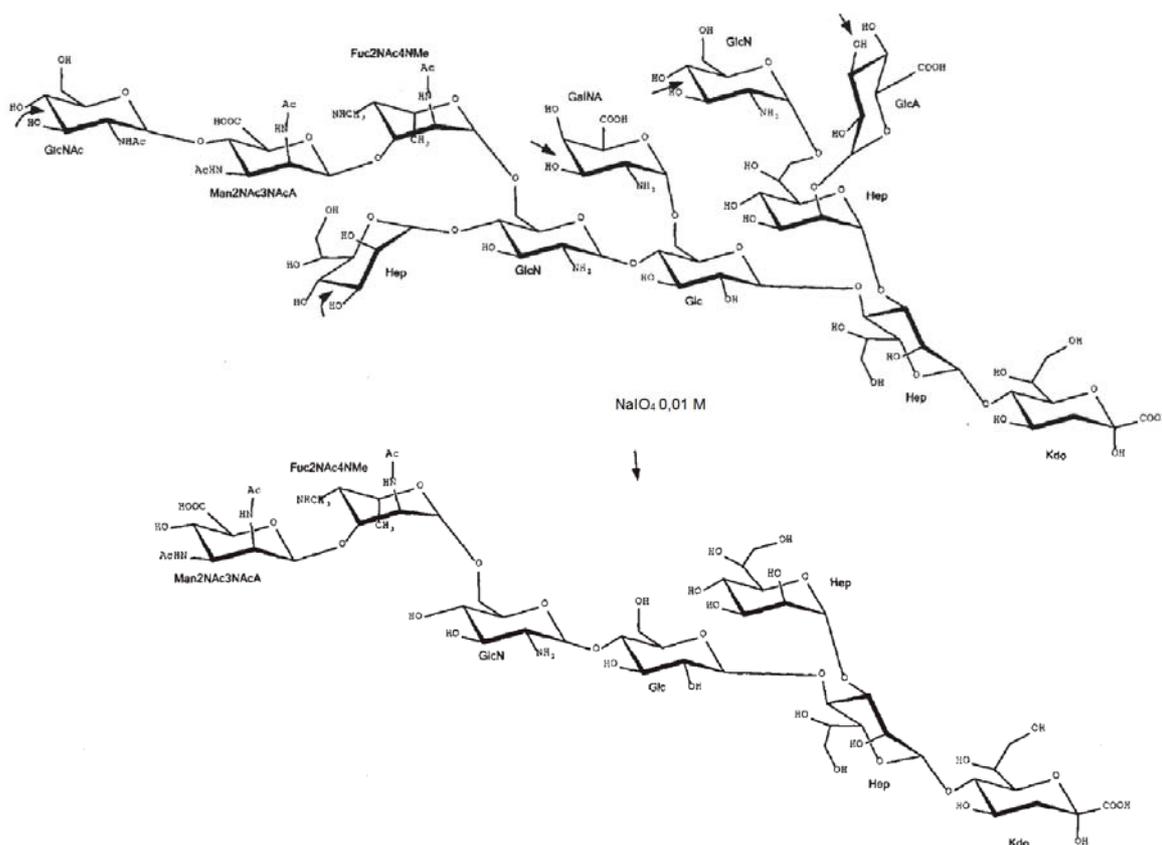
El LOS se aisló de *B. pertussis* 186 mediante extracción con agua-fenol de acuerdo con un método de Westphal *et al.* Luego, se aisló un oligosacárido (OS) del LOS mediante hidrólisis ácida (ácido acético al 1,5 %). El OS se purificó mediante la eliminación de un lípido A durante la ultracentrifugación ($105000 \times g$, 2 h, $4\text{ }^\circ\text{C}$). La espectrometría de masas MALDI-TOF se utilizó para confirmar que las estructuras del LOS aislado (Fig. 3B) y OS son idénticas a las estructuras del LOS y del OS presentes en la superficie de *B. pertussis* (Fig. 3A). Antes de la conjugación con la PT, el oligosacárido se oxidó utilizando peryodato sódico (Método 2). El producto de la reacción se purificó mediante filtración en gel, produciendo las fracciones de OS oxidadas (tiempo de retención de 16,8 y 20,5 min) separadas de una fracción contaminada con un lípido A (tiempo de retención de 13 min) y una fracción que contiene el OS sin el resto de heptosa (tiempo de retención de 21,5 min; Fig. 2). La composición de las fracciones se determinó mediante análisis MALDI-TOF MS (Figura 3 F). La fracción que contiene el OS oxidado se usó para la conjugación.

D. Análisis de LOS y OS de *B. pertussis* 186 mediante espectrometría de masas MALDI-TOF

Las preparaciones obtenidas de bacterias *B. pertussis* 186 y los LOS y OS aislados se analizaron mediante MALDI-TOF MS (Figura 3 A-E). Estos análisis confirmaron que las estructuras de LOS y OS eran idénticas a las estructuras de LOS y OS en la superficie de la célula de *B. pertussis*. Por lo tanto, los métodos utilizados para el aislamiento de OS permiten preservar los epítomos expuestos en la superficie de *B. pertussis*.

Las señales en el intervalo de masas de m/z 2200-2600 corresponden al oligosacárido central del LPS de *B. pertussis* (Fig. 3 B) [10]. Los iones corresponden al dodecasacárido (m/z 2291,63) y sus formas pirofosforilada y pirofosforiletanolamina (m/z 2452,57 y 2497,13). Una señal con la mayor intensidad de iones en m/z 2231,43 indica una pérdida de molécula neutra de CO_2 (-44 Da) y dos moléculas de agua de dodecasacárido con un peso molecular calculado de 2312,337 Da. Algunas glucoformas desprovistas de la heptosa terminal también se identifican entre los grupos iónicos en m/z 2039 y 2231, 2082 y 2274, 2260 y 2452 (Fig. 3 C). El espectro del LOS aislado también revela señales en un intervalo de masas más bajo que corresponde a un lípido A (m/z 1558,95) y en un intervalo de masas más alto que se origina a partir de un lipooligosacárido completo (m/z 4056,65). Los iones moleculares correspondientes a un oligosacárido y el lípido A observados en el espectro del LOS aislado también se encontraron en el espectro de células enteras de *B. pertussis* (Fig. 3 A). Los iones principales observados en el espectro de *B. pertussis* 186 representan un dodecasacárido carente de molécula de CO_2 neutro y dos moléculas de agua (m/z 2230,23), anhidrododecasacárido (m/z 2294,32); anhidrododecasacárido sustituido con un grupo pirofosfato (m/z 2451,55) y el lípido A (m/z 1558,63).

El espectro MALDI-TOF MS del oligosacárido de *B. pertussis* aislado y purificado en resina Dowex H⁺ se registró en el modo de iones positivos. Un ion molecular en m/z 2312,4 correspondió al dodecasacárido (Fig. 3 D). El espectro del OS indica una pérdida de restos de fosfato durante la hidrólisis ácida de LOS pero con la estructura de los azúcares restantes conservada. Los cambios en la ionización del OS podrían atribuirse a una probable pérdida de los grupos fosfato, sin embargo, la estructura del OS aislado era idéntica a la estructura de la parte del azúcar del LOS aislado y del LOS expuesto en la superficie de las células de *B. pertussis* 186 (Figura 3 E, interpretación de las señales).



Esquema 3. Preparación del heptasacárido

La oxidación con peryodato de OS de *B. pertussis* 186 conduce a una mezcla heterogénea de oligosacáridos que difiere en el número de restos de azúcar.

El OS activado se utilizó para la conjugación con toxina tosferínica.

E. Preparación del conjugado OS-PT

El oligosacárido oxidado de *B. pertussis* 186 se usó para la conjugación con la toxina tosferínica mediante aminación reductora (Método 2). El oligosacárido oxidado (20 mg) y la PT (1 mg) se utilizaron para la conjugación. La reacción se realizó en un tampón de borato a pH 9,0.

El conjugado OS-PT se purificó mediante filtración en gel (G3000-SW, Fig. 4). Las fracciones que contenían el conjugado se aislaron y se confirmaron mediante inmunotransferencia, utilizando anticuerpos específicos, es decir, un anticuerpo dirigido contra el conjugado pentasacárido procedente de LOS de *B. pertussis* 186-toxoide tetánico y un anticuerpo contra la toxina tosferínica. La relación total de azúcar a proteína en el conjugado se determinó mediante la medición de la concentración de proteína en combinación con el análisis del contenido de oligosacáridos mediante un método de ácido sulfúrico-fenol.

Se prepararon los conjugados OS-PT, con (1) una concentración de proteína de 0,37 mg/ml (volumen 1,2 ml) y un contenido de oligosacáridos del 49 % y (2) una concentración de proteína de 1 mg/ml (volumen 0,5 ml) y un contenido de oligosacáridos del 30 %. En el cromatograma, la primera fracción con un tiempo de retención de 8,3 minutos representa el conjugado con el contenido máximo del OS (49 %), mientras que la segunda fracción con un tiempo de retención de 17 min corresponde a la PT sustituida en menor medida por OS, aproximadamente el 30 %. Ninguno de los glucoconjugados obtenidos, que difieren en el contenido de oligosacáridos, mostró actividad enzimática de la toxina tosferínica o conservó sus propiedades de unión en pruebas *in vitro*. Las fracciones de glucoconjugado se concentraron y almacenaron a 4 °C con la adición del conservante (meritolato al 0,01 %). El conjugado OS-PT con un contenido del 49 % del OS y la concentración de proteína de 0,37 mg/ml se usó para la inmunización de conejos.

F. Análisis de las actividades biológicas de la PT

Ensayo de unión a fetuina

En los estudios de la PT, se demuestran dos mecanismos de su actividad biológica, la actividad dependiente de subunidad S1 y la actividad dependiente de oligómero B. La toxicidad del conjugado OS-PT se examinó mediante reacción con un receptor específico para la toxina que es fetuina (Método 3) [22]. El análisis se realizó utilizando el ELISA y un anticuerpo que detecta la PT asociado con fetuina (Fig. 5). El análisis ha demostrado que el OS-PT no fue capaz de unirse a fetuina. En el ensayo ELISA, 20 µg/ml de OS-PT mostraron una absorbancia a A_{405nm} de 0,117 que fue inferior a la absorbancia para la toxina tosferínica a la concentración más baja probada (0,97 ng/ml). El análisis indica la ausencia de una toxina activa en la preparación del glucoconjugado. El análisis para el OS-PT que difiere en los contenidos de oligosacáridos (30 % y 49 %) produjo resultados muy similares e indicó la incapacidad de los conjugados para unirse a fetuina.

G. Ensayo de células de CHO

La actividad enzimática de la PT se observa durante una interacción de la PT con las células CHO como una respuesta morfológica de las células [7, 22]. La PT induce el efecto de agrupamiento de células CHO que se inhibe por la presencia de anticuerpos anti-PT utilizados en la concentración neutralizante.

El análisis de toxicidad de OS-PT se basa en el tratamiento de las células CHO con las preparaciones de OS-PT (Método 4, Figura 6A). El cultivo de las células CHO en presencia del OS-PT se comparó con el cultivo de CHO en presencia de solo la PT (control positivo, Figura 6A A) y el cultivo de células CHO sin la PT (control negativo, Figura 6A C). En el caso de las células CHO en presencia de la PT, el efecto de agrupación se observó en un amplio intervalo de concentraciones probadas (0,06 µg/ml a 0,9 µg/ml) tanto para la PT estándar (Fig. 6AA) como para la PT aislada (Fig. 6A E). Por el contrario, el patrón de agrupamiento de las células CHO no se observó para el OS-PT, incluso cuando se aplicó a la concentración más alta de 130 µg/ml (Fig. 6A B y 6 A D). Morfológicamente, las células CHO en presencia del OS-PT son indistinguibles del control negativo. En la prueba de los conjugados OS-PT con las células CHO no se observaron cambios, por lo que indica que el OS-PT no es tóxico para las células CHO.

En la presente invención, se demuestra que mediante la combinación de PT y OS, se prepara un conjugado que no mostró actividad enzimática de la toxina. En el ensayo con células CHO, que es la prueba más sensible, el OS-PT fue al menos 10⁶ veces menos tóxico que la PT. La toxicidad no se observó ni en las concentraciones más altas. La falta de actividad enzimática del OS-PT también sugiere que esta preparación no induce efecto de hipersensibilidad a la histamina como resultado de la reversión de la toxicidad del PTd. También es importante que la inactivación enzimática de los toxoides se correlacione con la falta de trastornos patológicos típicos de la PT, tales como leucocitosis, estimulación de la sensibilidad a la histamina, anafilaxia, hiperinsulinemia [46].

H. Prueba de neutralización de la toxina tosferínica

Se ha demostrado que los anticuerpos obtenidos mediante inmunización de conejos con el conjugado oligosacárido procedente de LOS-toxina tosferínica de *B. pertussis* 186 neutralizan la toxicidad de la PT en la prueba de neutralización de la toxina tosferínica (Método 4, Figura 6B). Se ha observado una inhibición de la actividad de

agrupamiento inducida por la PT para sueros sin diluir y para sueros con una dilución de menos de 8 veces en el caso del suero número 3239 y 4 veces diluida en el caso del suero número 3271. Por ejemplo, utilizando el suero n.º 3239 diluido 32 veces, se observa el efecto de agrupamiento en las células CHO, mientras que no se observa una dilución de 4 veces (Fig. 6B a y 6B b, respectivamente). Del mismo modo, utilizando el suero n.º 3271 diluido 64 veces, el patrón de agrupación es visible, mientras que no se puede observar para el suero sin diluir (Fig. 6B c y 6B d, respectivamente). La pérdida de la capacidad de las células CHO para formar agrupaciones es el resultado de la neutralización de la toxina tosferínica mediante los sueros. Las células CHO sin la sPT (Fig. 6B e) y las células CHO con suero se utilizaron como control negativo. La sPT presente en el cultivo de CHO sin suero se utilizó como control positivo (Fig. 6B f).

I. Producción de anticuerpos protectores anti-OS-PT

La inmunogenicidad del conjugado OS-PT se investigó mediante la inmunización de conejos, seguida de la determinación de los niveles de anticuerpos en los antisueros producidos (Método 5). Los valores de anticuerpos antiglucoconjugados se determinaron mediante ELISA con LOS de *B. pertussis* 186 como un antígeno en fase sólida. Los anticuerpos anti-OS-PT reaccionaron con el LOS (Fig. 7). Las respuestas de anticuerpos específicos con LOS de *B. pertussis* 186 también se mostraron en inmunotransferencia (Fig. 8).

También se ha investigado el nivel de anticuerpos anti-OS-PT que son protectores contra *B. pertussis* en el ensayo bactericida (Método 6). Los valores bactericidas de los sueros correspondientes a la dilución máxima de cada suero a los que se destruyó el 50 % de las colonias bacterianas, fueron 800 y 400 veces (sueros n.º 3271 y 3239), respectivamente.

J. Análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF de preparaciones de PT y OS-PT

Para definir el conjugado OS-PT, se realizó un análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF (Método 7). Se observaron que las señales en los espectros del OS-PT y la PT diferían. Las señales identificadas en la MALDI-TOF MS de la PT corresponden a los pesos moleculares de las subunidades: Subunidad S4 (m/z 12054,84), S3 (m/z 21864,47), S1 (m/z 26220,90), S5 (m/z 11754,57) (Fig. 9 A). La señal para la subunidad S2 no se ha determinado debido a la anchura de señal excesiva de la subunidad S3. Los valores m/z para las subunidades de la PT son consistentes con sus masas calculadas que se establecieron mediante electroforesis y secuenciación. De acuerdo con la secuencia de la PT descrita por Arico y Rappuoli [71], los pesos moleculares (MW, de sus siglas en inglés) de las subunidades son: S1 MW 26219,8, S2 MW 21915,7, S3 MW 21863,9, S4 MW 12053,5, S5 MW 11753,5. Adicionalmente, se ha demostrado, utilizando un experimento de "desintegración en la fuente" (ISD, de sus siglas en inglés), que la caracterización detallada de la PT se apoya en la identificación de la secuencia de aminoácidos de la subunidad S4 (VTPTRMLVCGIAAKLG AAASSPDAHV PFCFGKDLK) (Fig. 9 B). La PT también se caracterizó mediante análisis de fragmentos después de la digestión trípica de la preparación de la PT (Fig. 9 C). El análisis MALDI-TOF MS/MS de los iones precursores seleccionados que se originaron a partir de los fragmentos de la PT proporcionó la información de la secuencia (Fig. 9 D). Se observaron los patrones de fragmentación característicos de los segmentos peptídicos de la PT y se identificaron sus secuencias. Los resultados de la digestión trípica de la PT coincidieron con las observaciones de Tummala *et al* y Williamsson *et al* [71, 72, 75].

El espectro de MALDI-TOF MS del OS-PT no reveló señales correspondientes a las subunidades de la PT que se identificaron en el espectro de la PT. La señal en m/z 33550 puede corresponder al dímero S3-S4 (Fig. 9 E). Diferentes señales en los espectros de la PT y del OS-PT indicaron que las subunidades de la PT se modificaron mediante una unión del oligosacárido. Sin embargo, dichas proteínas glucosiladas generalmente se ionizan con dificultad en MALDI-TOF MS. A pesar de esto, un análisis del OS-PT digerido indicó la presencia de unos pocos péptidos cuyos valores m/z también se observaron en los espectros de fragmentos de la PT (Fig. 9F). Los fragmentos de la PT que no se modificaron durante la conjugación incluyen péptidos en m/z 881,46, 1033,035, 2114,90, 2332,01 y otros péptidos resumidos en la Tabla 2 (Fig. 9 G). Para estos en m/z 881,46 y 2114,90, se determinaron las secuencias y mostraron que los péptidos no se habían modificado mediante la conjugación con el OS. Los péptidos que contienen lisina (K) son posibles sitios de la unión del OS. Por lo tanto, la falta de señales correspondientes a estos péptidos en los espectros del OS-PT y su presencia en los espectros de la PT sugiere que contienen el resto de lisina sustituido con un oligosacárido (posibles sitios de glucosilación, Fig. 9G). Restos de lisina con números en la secuencia de subunidades: S2- 110 y 178; S3 - 38, 121 y 133; S4 - 50, 61, 78, 96 y 99; S5 - 52 constituyen posibles sitios de glucosilación. Adicionalmente, el análisis de espectrometría de masas del OS-PT digerido con tripsina indicó la presencia de una señal que representa un péptido que comprende el extremo N de la PT. Esto sugiere que el aminoácido N-terminal de la subunidad S1 (en el péptido en m/z 1033,035) no está disponible para el oligosacárido durante la conjugación y el OS no se une al oligómero A en el OS-PT (Fig. 9 F). La mayoría de las señales observadas en los espectros del OS-PT digerido corresponden a los péptidos de S1, lo que indica que esta subunidad no está modificada por el OS. La conservación de la estructura S1 es ventajosa para un antígeno de vacuna, ya que el oligómero A es la subunidad más inmunoadaptiva de la PT.

K. Seguimiento de la oxidación de un oligosacárido utilizando NMR

Para definir el glucoconjugado del oligosacárido y la toxina tosferínica de *B. pertussis* 186, se analizó el proceso de oxidación del OS en presencia de peryodato sódico 0,01 M utilizando NMR (Fig. 10). El peryodato sódico a baja concentración rompe un enlace entre dos átomos de carbono adyacentes sustituidos con grupos hidroxilo, preferentemente en el grupo lateral de un resto Kdo del oligosacárido. Posteriormente, forma un grupo aldehído reactivo que puede reaccionar con un grupo amina de una proteína (Esquema 2). Sin embargo, el análisis NMR indicó también una pérdida parcial de la N-acetilglucosamina terminal durante el tratamiento del oligosacárido de LOS de *B. pertussis* 186 con peryodato.

La N-acetilglucosamina terminal se ha identificado sobre la base de los valores de desplazamiento químico típicos para el grupo N-acetilo en los espectros NMR de un oligosacárido que no se trató con peryodato (δ_H 1,99 ppm y δ_C 22,8; Fig. 10 A). Estas resonancias no se observan en los espectros NMR del oligosacárido después de solo 15 minutos de tratamiento con peryodato (Fig. 10 B).

Esta N-acetilglucosamina terminal forma parte de un trisacárido que se considera como el epítipo más inmunodominante del LOS de *B. pertussis*[47]. El glucoconjugado que contiene oligosacárido oxidado sin la GlcNAc terminal puede no proporcionar una respuesta inmunitaria completa. Otro fragmento del LOS de *B. pertussis* 186, a saber, un pentasacárido obtenido mediante desaminación. A medida que la desaminación conserva los epítopos inmunodominantes del LOS, el pentasacárido parece ser un fragmento óptimo de azúcar del LOS de *B. pertussis*. El conjugado pentasacárido procedente de LOS-toxina tosferínica de *B. pertussis* 186 es un aspecto de la presente invención.

L. Análisis de espectroscopía MALDI-TOF MS y NMR del pentasacárido

El pentasacárido aislado del LOS de *B. pertussis* 186 se analizó utilizando técnicas NMR y MALDI-TOF MS. La estructura del fragmento aislado se determinó mediante espectros NMR bidimensionales (COSY, HSQC, HMBC, Fig. 11 A-C), lo que confirma que la estructura del pentasacárido estaba de acuerdo con los datos publicados [47]. El espectro MALDI-TOF MS contenía la señal principal en m/z -1044,738, que corresponde al peso molecular del pentasacárido (Fig. 12). Los datos combinados indican que el pentasacárido se compone de los siguientes azúcares: N-acetilglucosamina (GlcNAc), *L-glicero-D-manoheptosa* (LD-Hep), ácido 2,3-diacetamido-2,3-dideoximanorourónico (Man2NAc3NAcA), 2,5-anhidro-D-manosa (2,5-anhidroMan), 2-acetamido-4-N-nitrosil-N-metil-2,4,6-trideoxi-galactosa (L-Fuc2NAc4NNOMe).

Métodos

La cepa 186 de *B. pertussis* se obtuvo del Laboratorio de Prevención de Infecciones e Infecciones Nosocomiales del Instituto Nacional de Salud Pública (Varsovia, Polonia). Las células de ovario de hámster chino (CHO) se adquirieron en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (Alemania). La Norma para PT (JN1H-5) se obtuvo del Instituto Nacional de Estándares y Control Biológicos (NIBSC, Reino Unido).

Método 1. Aislamiento de la toxina tosferínica

El aislamiento de la toxina tosferínica se llevó a cabo de acuerdo con el método utilizando cromatografía de intercambio iónico en CM-Sefarosa [49, 66]. A un medio de cultivo de *B. pertussis* 186 separado de las células bacterianas mediante centrifugación, se añadió sulfato de amonio sólido (390 g/l) para precipitar las proteínas. Después de la incubación durante 16 horas a 4 °C, la preparación se centrifugó (29000 x g, 30', 4 °C), el sobrenadante se descartó y el precipitado se disolvió en tampón fosfato 50 mM a pH 8,0 que contenía NaCl 1 M. Luego se centrifugó el extracto (17300 x g, 30', 4 °C) y se guardó el sobrenadante. La extracción sobre el precipitado se repitió tres veces. Los extractos se agruparon y se dializaron contra tampón fosfato 50 mM que contenía urea 2 M (tampón A) a pH 8,0. Después de una diálisis de 16 horas, el pH del dializado se ajustó a pH 6,0 con H₃PO₄ 1 M y se aplicó a una CM-Sefarosa CL-6B (1 cm x 16 cm) equilibrada con tampón A a pH 6,0. El proceso de aislamiento se controló mediante la medición de la absorbancia UV (cromatograma, Fig. 1). La columna se lavó con el tampón A de pH 6,0 hasta que se alcanzó el valor inicial estable del valor A₂₈₀ antes de la elución de las proteínas libres. La resina se lavó luego con tampón A de pH 7,4 para eluir la PT de la columna (el tampón se cambió en el minuto 190 de la medición). Después de la elución de la PT, la FHA se eluyó con tampón fosfato 50 mM de pH 8,0 que contenía NaCl 0,5 M (el tampón se cambió en el minuto 300 de la medición). El procedimiento de purificación se realizó a 4 °C. Las fracciones se analizaron utilizando inmunotransferencia con un suero dirigido contra la toxina tosferínica. A continuación, las fracciones concentradas de PT se dializaron contra tampón fosfato 50 mM a pH 8,0 que contenía NaCl 0,5 M y glicerol al 50 %. Las preparaciones de PT se analizaron mediante electroforesis e inmunotransferencia utilizando el anticuerpo antitoxina tosferínica. Las preparaciones de PT se dividieron en alícuotas y se almacenaron a -75 °C.

Método 2. Síntesis y purificación del neoglucoconjugado que contiene oligosacáridos

El oligosacárido se disolvió en una solución acuosa de peryodato sódico 0,01 M (NaIO₄). La reacción se llevó a cabo en la oscuridad a 24 °C durante 1 h. En paralelo, se preparó el control, que era una solución 0,01 M de NaIO₄. Después de una hora de incubación, se agregaron 10 µl de muestra y control a 2 ml de agua y se midió la extinción a una longitud de onda de 225 nm. La reacción de oxidación se detuvo mediante la adición de etilenglicol (30 µl) y se dejó a

24 °C durante 1 hora adicional. El oligosacárido oxidado se purificó por HPLC utilizando cromatografía de tamiz molecular (G3000-PW, TSK). El oligosacárido purificado en su forma oxidada se liofilizó. Posteriormente, se disolvió en 1,5 ml de tampón de borato 0,2 M a pH 9,0 y se añadió a la proteína transportadora. Después de una hora de incubación a 37 °C, se añadieron a la solución 15 mg de cianoborohidruro de sodio (NaBCNH₃) y una gota de cloroformo para evitar el crecimiento bacteriano. La reacción se llevó a cabo durante 14 días a 37 °C. En el 5° y 10° día después del inicio de la reacción, se añadieron porciones adicionales de NaBCNH₃ (10 mg). La mezcla de reacción se fraccionó en una columna G3000-SW equilibrada con solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,5). En las fracciones recogidas, la concentración de proteína se determinó mediante la medición de la absorbancia a una longitud de onda de 280 nm. La presencia de oligosacáridos se determinó mediante la reacción de transferencia por puntos utilizando el suero antiendotoxina obtenido mediante inmunización con una masa bacteriana de *B. pertussis* 186 y con el conjugado pentasacárido procedente de LOS de *B. pertussis* 186-toxoide tetánico. Se determinó el contenido del oligosacárido en el conjugado mediante el método del ácido sulfúrico-fenol. Las fracciones que contenían el conjugado se concentraron mediante ultrafiltración y se almacenaron a 4 °C con una adición de mertiolato (0,01 %).

15 Método 3. Prueba ELISA con una fetuina como antígeno en fase sólida

Las interacciones de PT y OS-PT con fetuina se investigaron de acuerdo con el método descrito por Isbrucker *et al* [26]. Las placas de 96 pocillos (Nunc) se recubrieron con solución de fetuina (5 µg/ml, 100 µl) en tampón carbonato 0,05 M a pH 9,6 y se incubaron durante la noche. Las placas se lavaron cinco veces con TBS (0,1 M) que contenía Tween-20 al 0,1 % y se bloquearon con BSA al 3 % (100 µl) en TBS, durante 1 hora a 37 °C. Después de las etapas de lavado, se añadieron 100 µl de diluciones en serie de OS-PT y PT y se incubaron durante 1 h. Después del lavado, las placas se incubaron con 100 µl de suero antitoxina tosferínica (Abcam) diluido 10000 veces. Los anticuerpos antitoxina unidos se detectaron utilizando anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina (BioRad) diluido 10000 veces durante 90' a 37 °C. Los anticuerpos libres se lavaron con TBS y, posteriormente, se desarrolló un color mediante la adición de p-nitrofenilfosfato (1,5 mg/ml) en tampón de carbonato a pH 9,6 con MgCl₂ 1 mM. La reacción se detuvo después de 100 minutos mediante la adición de 100 µl de NaOH 1M. La absorbancia se midió a λ = 405 nm utilizando un lector Perkin Elmer Mikroplate.

30 Método 4. Ensayo de toxicidad utilizando células CHO

El agrupamiento de las células CHO en presencia de PT y del OS-PT se determinó de acuerdo con el método descrito por Hewlett *et al.* [18]. En resumen, las células CHO se incubaron durante 24 h con diferentes concentraciones del OS-PT (intervalo de 31 pg/ml a 130 µg/ml) y PT (intervalo de 0,06 pg/ml a 0,9 µg/ml). Se observó interacción de las preparaciones con las células CHO. Las células CHO se cultivaron en medio MEMα que contenía suero bovino fetal al 10 %. La formación de grupos de células se monitorizó utilizando el microscopio Axio Vert.A1 (Zeiss).

Prueba de neutralización de la toxina tosferínica

El nivel de anticuerpos que neutralizan la actividad de la toxina tosferínica se investigó en el ensayo de neutralización de la PT [16, 46]. Se mezclaron diluciones dobles de los sueros (25 µl) con 25 µl de toxina (120 pg). Después de una incubación de 3 horas a 37 °C, se añadieron las células CHO (1x10⁴) y se incubaron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 %. Como control positivo, se aplicó sPT al cultivo de CHO sin suero. Las células CHO solas y las células CHO en presencia de sueros sirvieron como controles negativos. El valor neutralizante se definió como la dilución sérica más alta que da como resultado una inhibición completa del efecto de agrupamiento inducido por la toxina nativa.

45 Método 5. Inmunización del conjugado OS-PT

Se inmunizaron por vía subcutánea dos conejos *Termond White* en el cuello con el antígeno OS-PT. La composición de vacuna comprendía el OS-PT (50 µg) con MPL (0,4 mg) como adyuvante. Las inmunizaciones con el neoglucoconjugado se realizaron de acuerdo con el siguiente programa: (i) la primera dosis - día 0, (ii) la segunda dosis - día 21, (iii) la tercera dosis - día 42. La vacunación se llevó a cabo de acuerdo con los procedimientos aprobados por la Comisión de Ética Local de IITD PAN en la Directiva 54/2009. Una vez completada la vacunación, se determinó el nivel de anticuerpos antineoglucoconjugados en los sueros.

55 Método 6. Ensayo bactericida sérico

Los sueros de conejo se inactivaron a 56 °C durante 30 min y se diluyeron 10 veces y 2 veces en PBS con CaCl₂ 0,15 mM, MgCl₂ 0,5 mM y BSA al 0,1 % (tampón A, pH 7,4). *B. pertussis* 186 se diluyó a -300-500 bacterias en 25 µl de tampón A. 140 µl de tampón A se mezclaron con 45 µl de suero, 25 µl de suspensión bacteriana y 15 µl de complemento (un complemento de conejo, Biomed, Lublin). La mezcla de bacterias en el tampón A con complemento y sin suero se usó como control. Después de una incubación durante 60 minutos a 37 °C, se colocaron en placas 100 µl de cada mezcla en agar de carbón que contenía sangre de oveja y se incubaron durante 4 días. Luego se contaron las colonias. El valor bactericida del suero se definió como la dilución más alta a la que se destruyó el 50 % de las colonias bacterianas [30, 39]. El valor más bajo que dio el efecto bactericida deseado se observó para las diluciones de 800 veces y 400 veces.

Método 7. Análisis MALDI -TOF MS

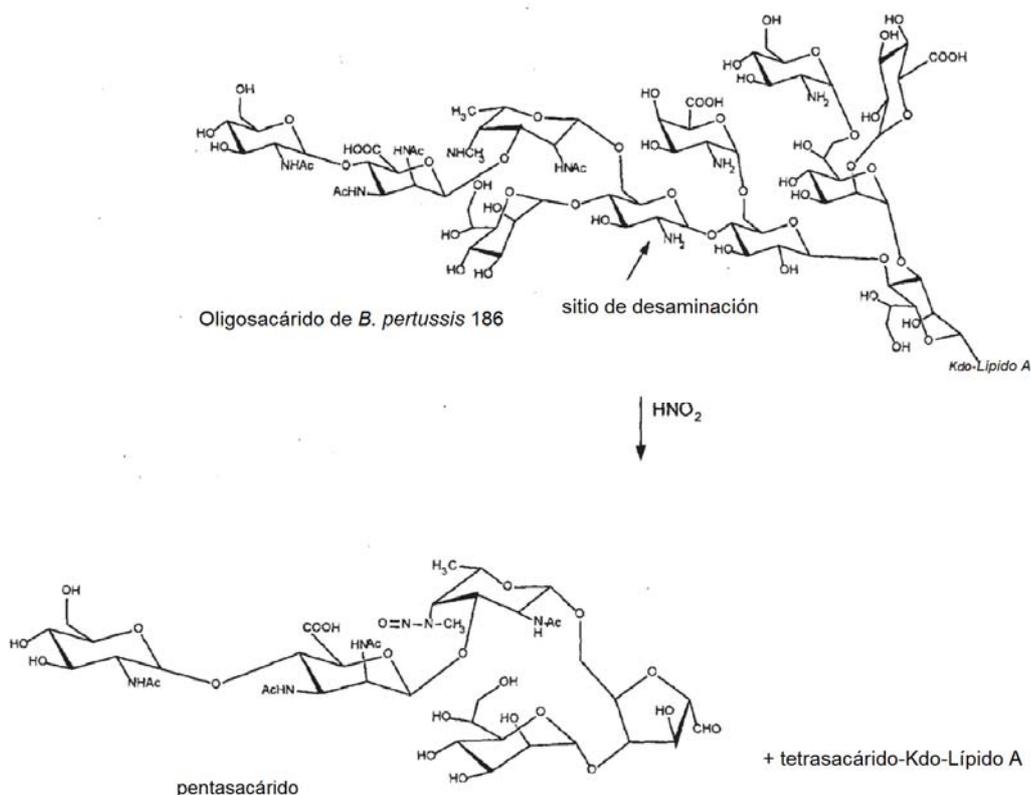
Los análisis MALDI-TOF MS se realizaron en instrumentos Autoflex III y Ultraflex (Bruker Daltonics). Los espectros fueron adquiridos en modos de iones negativos y positivos. Las preparaciones de la PT, los conjugados y los fragmentos de digestión tripticos se mezclaron con matrices apropiadas tales como: ácido sinapínico (SA), dihidroxiacetofenona (DHPA), ácido dihidroxibenzoico (DHB), una mezcla de ácido 2,5-dihroxibenzoico y ácido 2-hidroxi-5-metoxibenzoico (sDHB) y ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (a-HCCA). Las muestras se analizaron sin desalinizar o se desalaron utilizando resina C₄ (Ziptip, Millipore, eluyentes: ACN/TFA al 0,1 % con contenido creciente de ACN: 50, 80, 95 %) o se dializaron frente a TFA al 0,1 % (Microcon, 10 kDa MWCO). Los fragmentos de péptidos se separaron utilizando una columna C₁₈ (Dionex) empleando un gradiente de H₂O/TFA al 0,1 % y ACN/TFA al 0,1 %.

Las preparaciones digeridas se caracterizaron utilizando una tripsina (tripsina modificada de grado de secuenciación, porcino, Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, se disolvieron 20 μ g de proteína en la mezcla de reacción que contenía DTT 2 M, SDS al 0,1 % y se llenaron con tampón Tris-HCl (pH 8,0) hasta el volumen de 0,1 ml. La mezcla se calentó a 95 °C durante 15 minutos. Después del enfriamiento, se añadió una tripsina para lograr una proporción de tripsina:proteína de 1:20 (p/p) y la mezcla se incubó a 37 °C durante 24 horas. La reacción se terminó mediante congelación de la muestra. Los productos de digestión se analizaron directamente mediante MALDI-TOF MS y utilizando la cromatografía de fase inversa (C₁₈, Dionex) interconectada con una espectrometría de masas MALDI-TOF MS (Ultraflex). Las preparaciones se disolvieron en un disolvente inicial A: TFA al 0,1 % en agua. Posteriormente, se aplicó un gradiente lineal a una velocidad de flujo de 300 nl/min, comenzando con el 2 % de disolvente B: TFA al 0,1 % en ACN a 100 % de disolvente B. Los péptidos separados se analizaron mediante MALDI-TOF MS y se sometieron a la fragmentación inducida por láser (LID). La identificación de las secuencias peptídicas se realizó con el software *Biotools* y una base de datos Mascot.

Método 8. Aislamiento del pentasacárido del LOS de *B. pertussis* 186

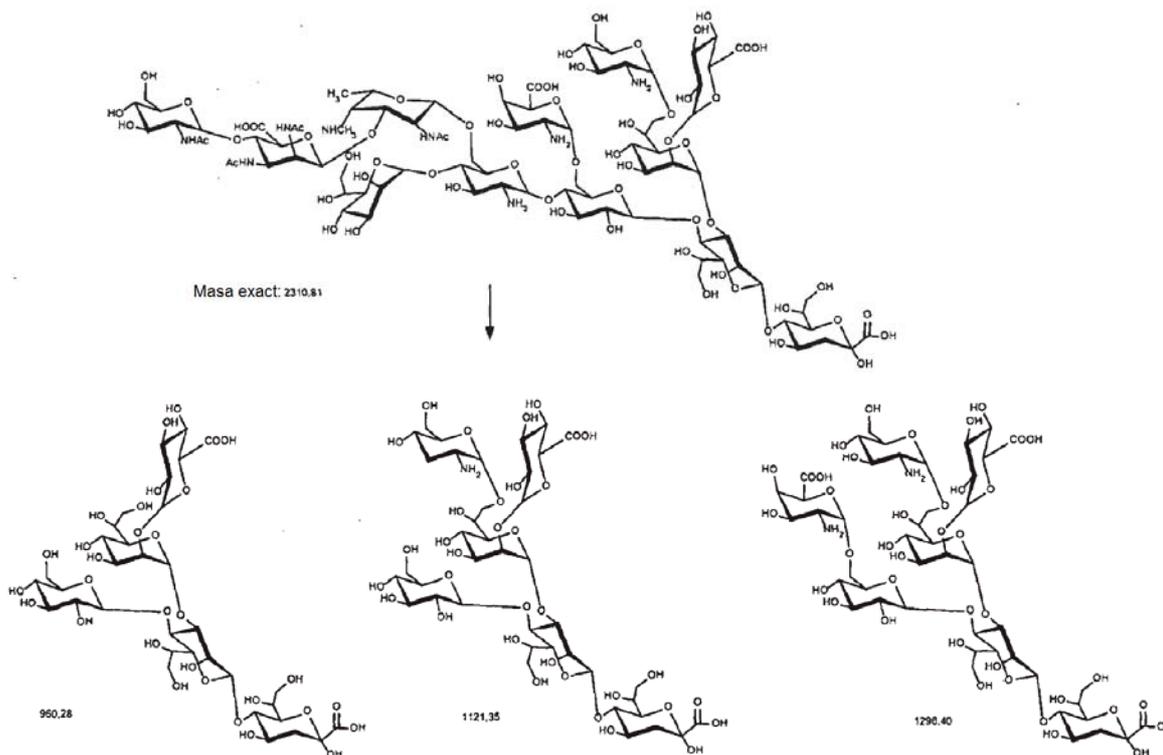
El pentasacárido se obtuvo mediante desaminación del lipooligosacárido de *B. pertussis* 186 (Esquema 3). Se suspendieron 50 mg de LOS en una solución de agua/nitrito de sodio al 5 %/ácido acético al 30 % (1:1:1, v/v/v) y se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente. Los productos de la desaminación de LOS se separaron mediante ultracentrifugación (2 h, 200000 x g, 4 °C).

El sobrenadante se liofilizó y el producto se purificó en una columna de Bio-Gel P-2 (Bio-Rad) en un tampón de piridina/ácido acético/agua, pH 5,6. El rendimiento del aislamiento de pentasacárido fue de ~ 4 mg.



Esquema 4. Preparación del pentasacárido mediante desaminación del LOS de *B. pertussis* 186.

La fracción precipitada del LOS obtenido mediante desaminación contiene una mezcla heterogénea de oligosacáridos centrales que difieren en el número de restos de azúcar (Esquema 4), que fueron identificados mediante MALDI-TOF MS (Fig. 12 B). Durante la desaminación del LOS de *B. pertussis*, los restos de azúcar que contienen grupos amina se pierden. La escisión puede incluir el pentasacárido terminal, el ácido galactosaminurónico y la glucosamina. Un fragmento central desprovisto del pentasacárido terminal y del ácido galactosaminurónico con una masa molecular calculada de 1121,35 Da se identificó como un ion de tipo $[M-H_2O-H]^{-1}$ en m/z 1102,5734 en el espectro del modo de iones negativos (**). Un fragmento de oligosacárido con una masa monoisotópica de 960,28 Da obtenido mediante escisión del pentasacárido terminal, ácido galactosaminurónico y glucosamina corresponde a un ion en m/z 959,4448 y su forma anhidra a 941,4750 (***)



Esquema 5. Productos de desaminación OS de *B. pertussis* 186 que contienen el oligosacárido del núcleo interno (OS se obtuvo después de la hidrólisis ácida del LOS desaminado).

Método 9. Espectroscopia de NMR

Los espectros NMR del pentasacárido aislado se obtuvieron para una solución de 2H_2O al 10 % con un espectrómetro Bruker Avance III 600 MHz (Bruker). Los espectros se adquirieron a 30 °C y se aplicó la secuencia de pulsos WATERGATE.

Bibliografía:

1. Amano, K., Fukushi, K., y Watanabe, M. (1990). Biochemical and immunological comparison of lipopolysaccharides from *Bordetella* species. *J. Gen. Microbiol.* 136, 481-487.
2. Antoine, R., y Loch, C. (1994). The NAD-glycohydrolase activity of the pertussis toxin S1 subunit. Involvement of the catalytic HIS-35 residue. *J. Biol. Chem.* 269, 6450-6457.
3. Antoine, R., Tallett, A., Van Heyningen, S., y Loch, C. (1993). Evidence for a catalytic role of glutamic acid 129 in the NAD-glycohydrolase activity of the pertussis toxin S1 subunit. *J. Biol. Chem.* 268, 24149-24155.
4. Avci F. Y., Li X., Tsuji M., y Kasper D. L. (2012). A novel mechanism for glycoconjugate vaccine activation of the adaptive immune system. *Nat Med.* 17:1602-1609.
5. Le Blay, K., Caroff, M., Blanchard, F., Perry, M.B., y Chaby, R. (1996). Epitopes of *Bordetella pertussis* lipopolysaccharides as potential markers for typing of isolates with monoclonal antibodies. *Microbiology* 142, 971-978.

6. Bobbitt J. M. (1956). Periodate oxidation of carbohydrate. *Adv Carbohydrate Chem.* 48:1-41.
- 5 7. Burns, D.L., Kenimer, J.G., y Manclark, C.R. (1987). Role of the A subunit of pertussis toxin in alteration of Chinese hamster ovary cell morphology. *Infect Immun* 55, 24-28.
8. Burns, D.L., Hausman, S.Z., Lindner, W., Robey, F.A., y Manclark, C.R. (1987). Structural characterization of pertussis toxin A subunit. *J. Biol. Chem.* 262, 17677-17682.
- 10 9. Caroff, M., Chaby, R., Karibian, D., Perry, J., Deprun, C., y Szabo, L. (1990). Variations in the carbohydrate regions of *Bordetella pertussis* lipopolysaccharides: electrophoretic, serological, and structural features. *J Bacteriol* 172, 1121-1128.
- 15 10. Caroff, M., Brisson, J., Martin, A., y Karibian, D. (2000). Structure of the *Bordetella pertussis* 1414 endotoxin. *FEBS Lett.* 477, 8-14.
11. Cherry, J.D. (2012). Why Do Pertussis Vaccines Fail? *Pediatrics* 129, 968-970.
- 20 12. Connelly, C.E., Sun, Y., y Carbonetti, N.H. (2012). Pertussis toxin exacerbates and prolongs airway inflammatory responses during *Bordetella pertussis* infection. *Infect. Immun.* 80, 4317-4332.
13. Duan J., Avci F. Y., y Kasper D. L. (2008) Microbial carbohydrate depolymerization by antigen-presenting cells: Deamination prior to presentation by the MHC II pathway. *PNAS.* 105:5183-5188.
- 25 14. Dur, A., Caroff, M., Chaby, R., y Szabo, L. (1978). Novel Type of Endotoxin Structure Present in *Bordetella pertussis*. Isolation of Two Different Polysaccharides Bound to Lipid A. *Eur J Biochem* 84, 579-589.
- 30 15. Flak, T.A., y Goldman, W.E. (1999). Signalling and cellular specificity of airway nitric oxide production in pertussis. *Cellular Microbiology* 1, 51-60.
16. Gillenius, P., Jäättmä E., Askelöf P., Granström M., y Tiru M. (1985) The Standardization of an Assay for Pertussis Toxin and Antitoxin in Microplate Culture of Chinese Hamster Ovary Cells. *Journal of biological standardization.* 13, 61-66.
- 35 17. Gomez, S.R., Xing, D.K.-L., Corbel, M.J., Coote, J., Parton, R., y Yuen, C.-T. (2006). Development of a carbohydrate binding assay for the B-oligomer of pertussis toxin and toxoid. *Anal. Biochem.* 356, 244-253.
- 40 18. De Gouw, D., Diavatopoulos, D.A., Bootsma, H.J., Hermans, P.W.M., y Mooi, F.R. (2011). Pertussis: a matter of immune modulation. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 441-474.
19. Gzyl, A., Augustynowicz, E., Rabczenko, D., Gniadek, G., y Slusarczyk, J. (2004a). Pertussis in Poland. *Int J Epidemiol* 33, 358-365.
- 45 20. Gzyl, A., Gniadek, G., Augustynowicz, E., Rabczenko, D., Husejnow, B., Zawadka, M., y Slusarczyk, J. (2004b). [Increase in the incidence of pertussis and quality of whole-cell pertussis component of the DTP vaccine produced in Poland. Part II. Consistency of control and production]. *Przegl Epidemiol* 58, 641-648.
21. Heininger, U. (2001). Recent progress in clinical and basic pertussis research. *Eur. J. Pediatr.* 160, 203-213.
- 50 22. Hewlett, E.L., Sauer, K.T., Myers, G.A., Cowell, J.L., y Guerrant, R.L. (1983). Induction of a novel morphological response in Chinese hamster ovary cells by pertussis toxin. *Infect Immun* 40, 1198-1203.
23. Higgins, S.C., Jarnicki, A.G., Lavelle, E.C., y Mills, K.H.G. (2006). TLR4 Mediates Vaccine-Induced Protective Cellular Immunity to *Bordetella pertussis*: Role of IL-17-Producing T Cells. *J Immunol* 177, 7980-7989.
- 55 24. Higgs, R., Higgins, S.C., Ross, P.J., y Mills, K.H.G. (2012). Immunity to the respiratory pathogen *Bordetella pertussis*. *Mucosal Immunol* 5, 485-500.
25. Ibsen, P.H. (1996). The effect of formaldehyde, hydrogen peroxide and genetic detoxification of pertussis toxin on epitope recognition by murine monoclonal antibodies. *Vaccine* 14, 359-368.
- 60 26. Isbrucker, R.A., Bliu, A., y Prior, F. (2010). Modified binding assay for improved sensitivity and specificity in the detection of residual pertussis toxin in vaccine preparations. *Vaccine* 28, 2687-2692.
- 65 27. Jennings, H.J., y Lugowski, C. (1981). Immunochemistry of groups A, B, and C meningococcal polysaccharide-tetanus toxoid conjugates. *J Immunol* 127, 1011-1018.

28. Jennings, H.J., Lugowski, C., y Ashton, F.E. (1984). Conjugation of meningococcal lipopolysaccharide R-type oligosaccharides to tetanus toxoid as route to a potential vaccine against group B *Neisseria meningitidis*. *Infection and Immunity* 43, 407-412.
- 5
29. Kaslow, H.R., y Burns, D.L. (1992). Pertussis toxin and target eukaryotic cells: binding, entry, and activation. *FASEB J.* 6, 2684-2690.
- 10
30. Kaslow, H.R., Lim, L.K., Moss, J., y Lesikar, D.D. (1987). Structure-activity analysis of the activation of pertussis toxin. *Biochemistry* 26, 123-127.
- 15
31. Kimura, M., y Kuno-Sakai, H. (1990). Developments in pertussis immunisation in Japan. *Lancet* 336, 30-32.
32. Kubler-Kielb, J. (2011). Conjugation of LPS-derived oligosaccharides to proteins using oxime chemistry. *Methods Mol. Biol.* 751, 317-327.
- 20
33. Kubler-Kielb, J., Vinogradov, E., Ben-Menachem, G., Pozsgay, V., Robbins, J.B., y Schneerson, R. (2008). Saccharide/protein conjugate vaccines for *Bordetella* species: preparation of saccharide, development of new conjugation procedures, and physico-chemical and immunological characterization of the conjugates. *Vaccine* 26, 3587-3593.
- 25
34. Kubler-Kielb, J., Vinogradov, E., Lagergård, T., Ginzberg, A., King, J.D., Preston, A., Maskell, D.J., Pozsgay, V., Keith, J.M., Robbins, J.B., et al. (2011). Oligosaccharide conjugates of *Bordetella pertussis* and *bronchiseptica* induce bactericidal antibodies, an addition to pertussis vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 4087-4092.
- 30
35. Kubler-Kielb, J., y Pozsgay, V. (2005). A New Method for Conjugation of Carbohydrates to Proteins Using an Aminoxy-Thiol Heterobifunctional Linker. *J. Org. Chem.* 70, 6987-6990.
- 35
36. Lobet, Y., Feron, C., Dequesne, G., Simoen, E., Hauser, P., y Locht, C. (1993). Site-specific alterations in the B oligomer that affect receptor-binding activities and mitogenicity of pertussis toxin. *J. Exp. Med.* 177, 79-87.
- 40
37. Locht, C. (1999). Molecular aspects of *Bordetella pertussis* pathogenesis. *Int. Microbiol.* 2, 137-144.
38. Locht, C., Coutte, L., y Mielcarek, N. (2011). The ins and outs of pertussis toxin. *FEBS J.* 278, 4668-4682.
- 40
39. Mahon, B.P., Ryan, M.S., Griffin, F., y Mills, K.H. (1996). Interleukin-12 is produced by macrophages in response to live or killed *Bordetella pertussis* and enhances the efficacy of an acellular pertussis vaccine by promoting induction of Th1 cells. *Infect. Immun.* 64, 5295-5301.
- 45
40. Mangmool, S., y Kurose, H. (2011). Gi/o Protein-Dependent and -Independent Actions of Pertussis Toxin (PTX). *Toxins* 3, 884-899.
- 45
41. Marzouqi, I., Richmond, P., Fry, S., Wetherall, J., y Mukkur, T. (2010). Development of improved vaccines against whooping cough: current status. *Hum Vaccin* 6, 543-553.
- 50
42. Metz, B., Kersten, G., F. A., Jong A., Meiring H., Hove J. Identification of formaldehyde-induced modification in proteins: reactions with diphteria toxin.
- 50
43. McQuillen, D.P., Gulati, S., y Rice, P.A. (1994). Complement-mediated bacterial killing assays. In *Methods in Enzymology*, P.M.B. Virginia L. Clark, ed. (Academic Press), páginas 137-147.
- 55
44. Mielcarek, N., Debie, A.-S., Raze, D., Bertout, J., Rouanet, C., Younes, A.B., Creusy, C., Engle, J., Goldman, W.E., y Locht, C. (2006). Live attenuated *B. pertussis* as a single-dose nasal vaccine against whooping cough. *PLoS Pathog.* 2, e65. Doi:10.1371/journal.ppat.0020065.
- 60
45. Mountzouros, K.T., Kimura, A., y Cowell, J.L. (1992). A bactericidal monoclonal antibody specific for the lipooligosaccharide of *Bordetella pertussis* reduces colonization of the respiratory tract of mice after aerosol infection with *B. pertussis*. *Infect. Immun.* 60, 5316-5318.
- 65
46. Nencioni, L., Pizza, M., Bugnoli, M., De Magistris, T., Di Tommaso, A., Giovannoni, F., Manetti, R., Marsili, I., Matteucci, G., y Nucci, D. (1990). Characterization of genetically inactivated pertussis toxin mutants: candidates for a new vaccine against whooping cough. *Infect Immun* 58, 1308-1315.
47. Niedziela, T., Letowska, I., Lukasiewicz, J., Kaszowska, M., Czarnańska, A., Kenne, L., y Lugowski, C. (2005). Epitope of the vaccine-type *Bordetella pertussis* strain 186 lipooligosaccharide and antiendotoxin activity of antibodies directed against the terminal pentasaccharide-tetanus toxoid conjugate. *Infect. Immun.* 73, 7381-7389.

- 5 48. Nogimori, K., Tamura, M., Yajima, M., Ito, K., Nakamura, T., Kajikawa, N., Maruyama, Y., y Ui, M. (1984). Dual mechanisms involved in development of diverse biological activities of islet-activating protein, pertussis toxin, as revealed by chemical modification of lysine residues in the toxin molecule. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)* 801, 232-243.
49. Ozcengiz, E., Kiliç, K., Büyüktanir, O., y Günalp, A. (2004). Rapid purification of pertussis toxin (PT) and filamentous hemagglutinin (FHA) by cation-exchange chromatography. *Vaccine* 22, 1570-1575.
- 10 50. Pichichero, M. E., Rennels, M.B., Edwards, K.M., Blatter, M.M., Marshall, G.S., Bologna, M., Wang, E., y Mills, E. (2005). Combined tetanus, diphtheria, and 5-component pertussis vaccine for use in adolescents and adults. *JAMA* 293, 3003-3011.
- 15 51. Pizza, M., Covacci, A., Bartoloni, A., Perugini, M., Nencioni, L., De Magistris, M., Villa, L., Nucci, D., Manetti, R., Bugnoli, M., et al. (1989). Mutants of pertussis toxin suitable for vaccine development. *Science* 246, 497-500.
52. Quentin-Millet, M.J., Arminjon, F., Danve, B., Cadoz, M., y Armand, J. (1988). Acellular pertussis vaccines: evaluation of reversion in a nude mouse model. *Journal of Biological Standardization* 16, 99-108.
- 20 53. Sato, H., y Sato, Y. (1999). Experience with Diphtheria Toxoid-Tetanus Toxoid-Acellular Pertussis Vaccine in Japan. *Clinical Infectious Diseases* 28, S124-S130.
54. Sato, H., Sato, Y, Ito, A., y Ohishi, I. (1987). Effect of monoclonal antibody to pertussis toxin on toxin activity. *Infect. Immun.* 55, 909-915.
- 25 55. Sato, Y., Arai, H., y Suzuki, K. (1974). Leukocytosis-Promoting Factor of *Bordetella pertussis* III. Its Identity with Protective Antigen. *Infect Immun* 9, 801-810.
56. Schmidt, M.A., y Schmidt, W. (1989). Inhibition of pertussis toxin binding to model receptors by antipeptide antibodies directed at an antigenic domain of the S2 subunit. *Infect Immun* 57, 3828-3833.
- 30 57. Schmidt, M.A., Raupach, B., Szulczynski, M., y Marzillier, J. (1991). Identification of linear B-cell determinants of pertussis toxin associated with the receptor recognition site of the S3 subunit. *Infect Immun* 59, 1402-1408.
- 35 58. Schmitt, C.K., Meysick, K.C., y O'Brien, A.D. (1999). Bacterial toxins: friends or foes? *Emerg Infect Dis* 5, 224-234.
59. Seabrook, R.N., Atkinson, T., y Irons, L.I. (1991). A spectroscopic and conformational study of pertussis toxin. *Eur J Biochem* 198, 741-747.
- 40 60. Sekura, R.D., Fish, F., Manclark, C. R., Meade, B., y Zhang, YL. (1983). Pertussis toxin. Affinity purification of a new ADP-ribosyltransferase. *J. Biol. Chem.* 258, 14647-14651.
- 45 61. Sekura, R.D., Zhang, Y.L., Roberson, R., Acton, B., Trollfors, B., Tolson, N., Shiloach, J., Bryla, D., Muir-Nash, J., y Koeller, D. (1988). Clinical, metabolic, and antibody responses of adult volunteers to an investigational vaccine composed of pertussis toxin inactivated by hydrogen peroxide. *J. Pediatr.* 113, 806-813.
62. Sheu, G.C., Wo, Y.Y., y Lu, C.H. (1997). Preparation and characterization of Pertussis toxin subunits. *ISSN* 30, 182-193.
- 50 63. Sheu, G.C., Wo, Y.Y., Yao, S.M., Chou, F.Y, Hsu, T.C., Ju, C.L., Cheng, Y., Chang, S.N., y Lu, C.H. (2001). Characteristics and potency of an acellular pertussis vaccine composed of pertussis toxin, filamentous hemagglutinin, and pertactin. *J Microbiol Immunol Infect* 34, 243-251.
- 55 64. Skelton, S.K., y Wong, K.H. (1990). Simple, efficient purification of filamentous hemagglutinin and pertussis toxin from *Bordetella pertussis* by hydrophobic and affinity interaction. *J. Clin. Microbiol.* 28, 1062-1065.
- 65 65. Stein, P.E., Boodhoo, A., Armstrong, G.D., Cockle, S.A., Klein, M.H., y Read, R. J. (1994). The crystal structure of pertussis toxin. *Structure* 2, 45-57.
- 60 66. Tamura, M., Nogimori, K., Murai, S., Yajima, M., Ito, K., Katada, T., Ui, M., y Ishii, S. (1982). Subunit structure of islet-activating protein, pertussis toxin, in conformity with the A-B model. *Biochemistry* 21, 5516-5522.
- 65 67. Tan, Y, Fleck, R.A., Asokanathan, C., Yuen, C.-T., Xing, D., Zhang, S., y Wang, J. (2013). Confocal microscopy study of pertussis toxin and toxoids on CHO-cells. *Hum Vaccin Immunother* 9.

68. Tefon, B.E., Maass, S., Ozcengiz, E., Becher, D., Hecker, M., y Ozcengiz, G. (2011). A comprehensive analysis of *Bordetella pertussis* surface proteome and identification of new immunogenic proteins. *Vaccine* 29, 3583-3595.
- 5 69. Trollfors, B., Taranger, J., Lagergård, T., Lind, L., Sundh, V., Zackrisson, G., Lowe, C.U., Blackwelder, W., y Robbins, J.B. (1995). A Placebo-Controlled Trial of a Pertussis-Toxoid Vaccine. *N Eng J Med* 333, 1045-1050.
70. Trollfors, B., Lagergård, T., Taranger, J., Bergfors, E., Schneerson, R., y Robbins, J.B. (2001). Serum immunoglobulin G antibody responses to *Bordetella pertussis* lipooligosaccharide and *B. parapertussis* lipopolysaccharide in children with pertussis and parapertussis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8, 1015-1017.
- 10 71. Tummala, M., Hu, P., Lee, S.-M., Robinson, A., y Chess, E. (2008). Characterization of pertussis toxin by LC-MS/MS. *Anal. Biochem.* 374, 16-24.
72. Tummala, M., Lee, S.-M., Chess, E., y Hu, P. (2010). Characterization of pertussis toxoid by two-dimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 401, 295-302.
- 15 73. Weiss, A.A., Mobberley, P.S., Fernandez, R.C., y Mink, C.M. (1999). Characterization of Human Bactericidal Antibodies to *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 67, 1424-1431.
- 20 74. Weiss, A.A., Patton, A. K., Millen, S.H., Chang, S.-J., Ward, J.I., y Bernstein, D.I. (2004). Acellular pertussis vaccines and complement killing of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* 72, 7346-7351.
75. Williamson, Y.M., Moura, H., Schieltz, D., Rees, J., Woolfitt, A.R., Pirkle, J.L., Sampson, J.S., Tondella, M.L., Ades, E., Carlone, G., et al. (2010). Mass spectrometric analysis of multiple pertussis toxins and toxoids. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010, 942365.
- 25 76. Witvliet, M.H., Burns, D.L., Brennan, M.J., Poolman, J.T., y Manclark, C.R. (1989). Binding of pertussis toxin to eucaryotic cells and glycoproteins. *Infect Immun* 57, 3324-3330.
- 30 77. Wong, K.H., y Skelton, S.K. (1988). New, practical approach to detecting antibody to pertussis toxin for public health and clinical laboratories. *J Clin Microbiol* 26, 1316-1320.
78. Woodward M. P, Young W. W., and Bloodgood R. A. (1985) Detection of monoclonal antibodies specific for carbohydrate epitopes using peroxidate oxidation. *JIM* 78, 143-153.
- 35 79. Xing, D., Das, R.G., Newland, P., y Corbel, M. (2002). Comparison of the bioactivity of reference preparations for assaying *Bordetella pertussis* toxin activity in vaccines by the histamine sensitisation and Chinese hamster ovary cell tests: assessment of validity of expression of activity in terms of protein concentration. *Vaccine* 20, 3535-3542.
- 40 80. Xing, D., Yuen, C.-T., Asokanathan, C., Rigsby, P., y Horiuchi, Y. (2012). Evaluation of an *in vitro* assay system as a potential alternative to current histamine sensitization test for acellular pertussis vaccines. *Biologicals* 40, 456-465.
- 45 81. EP0471954A2 Alan, K., Michel, B., y L, C.J. (1991). Immunogenic Conjugates Of Nontoxic Oligosaccharide Derived From *Bordetella Pertussis* Lipooligosaccharide.
82. US005445817 Schneerson, R., Levi, L., Robbins, J. (1995) Pertussis toxin used as a carrier protein with noncharged saccharides in conjugate vaccines
- 50 83. US006168928B1 Read, R., Stein, P., E., Cockle, S. A., Oomen, R., Loosmore S., Klein M., Armstrong G. D., Hazes, B., (2001) Modification of pertussis toxin.
84. Documento US20100158937A1 KUBLER-KIELB, J. [US], POZSGAY, V. [US], LAGERGARD, T. [SE], BEN-MENACHEM, G. [US], SCHNEERSON, R. [US], VINOGRADOV, E. [CA], y GINZBERG, A. [US] (2010). METHODS FOR CONJUGATION OF OLIGOSACCHARIDES OR POLYSACCHARIDES TO PROTEIN CARRIERS THROUGH OXIME LINKAGES VIA 3-DEOXY-D-MANNO-OCTULSONIC ACID (US).
- 55 85. Documento WO94/04195A1 Schneerson, R., Levi, L., Robbins, J. (1994) Pertussis toxin used as a carrier protein with noncharged saccharides in conjugate vaccines
- 60 86. Documento WO2012/106251 Kubler-Kielb, J., Schneerson, R., Robbins, J.B., Ginzberg, A., Lagergård, T., Vinogradov, E., Maskell, D., Preston, A. (2012), Pertussis Vaccine.
- 65 87. Documento WO2011/110531 Biemans, R. L., Duvivier, P., Gavard, O. F. N. (2011) Conjugation process.

88. Anderson, P., Pichichero, M. E., Insel, R.A. (1985) Immunogens consisting of oligosaccharides from the capsule of *Haemophilus influenzae* type b coupled to diphtheria toxoid or the toxin protein CRM 197. *J Clin Invest.* 76(1), 52-59.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para preparar un glucoconjugado que comprende un oligosacárido (OS) procedente de LOS o su fragmento y la toxina tosferínica (PT) de *B. pertussis* en donde el método comprende:
- a. cultivar *B. pertussis*;
 - b. aislar LOS de las bacterias y aislar un OS;
 - c. aislar PT del medio de cultivo de *B. pertussis*;
 - d. activar OS mediante oxidación o desaminación;
 - 10 e. conjuguar el OS activado con la toxina tosferínica a pH = 9 mediante reacción de aminación reductora.
 - f. purificar el glucoconjugado OS-PT obtenido,
- en donde un contenido del oligosacárido o fragmento del mismo en el glucoconjugado con la PT es del 30-50 %.
- 15 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que *B. pertussis* se cultiva en medio líquido Stainer-Scholte con adición de (2,6-di-O-metil)-B-ciclodextrina.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que el OS se activa con peryodato sódico.
- 20 4. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que la conjugación en el punto e) se lleva a cabo en tampón borato 0,2 M.
5. Un glucoconjugado que comprende un oligosacárido (OS) procedente de LOS o su fragmento y la toxina tosferínica (PT) de *B. pertussis* obtenible en el método como se define en las reivindicaciones 1-4.
- 25 6. Una composición farmacéutica que comprende el glucoconjugado como se define en la reivindicación 5 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 30 7. Una composición farmacéutica como se define en la reivindicación 6 para su uso en la prevención y tratamiento de infecciones causadas por *Bordetella pertussis*.
8. Una composición de vacuna que comprende el glucoconjugado como se definió en la reivindicación 5 y un vehículo farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, un adyuvante.
- 35 9. Una composición de vacuna como se definió en la reivindicación 8 para su uso en la prevención de enfermedades causadas por *B. pertussis*.

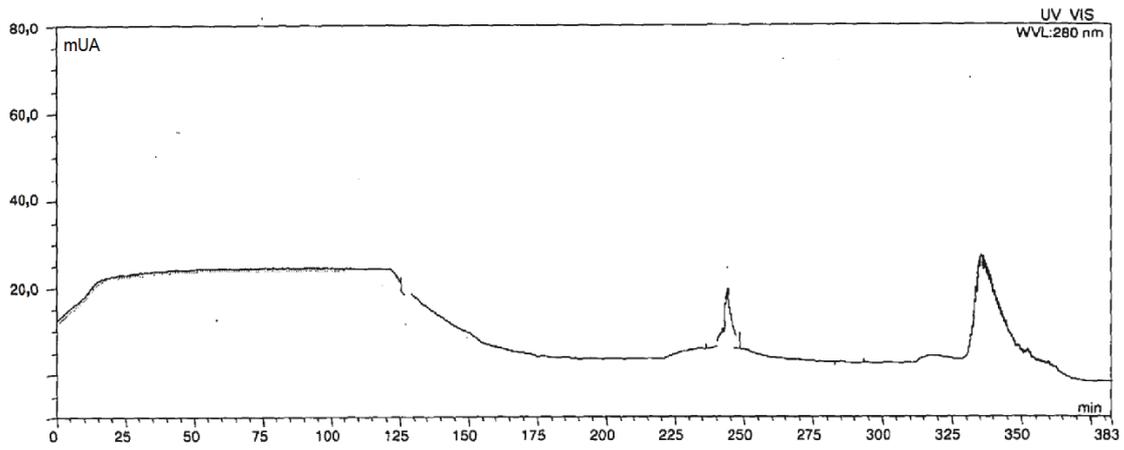


Fig. 1.

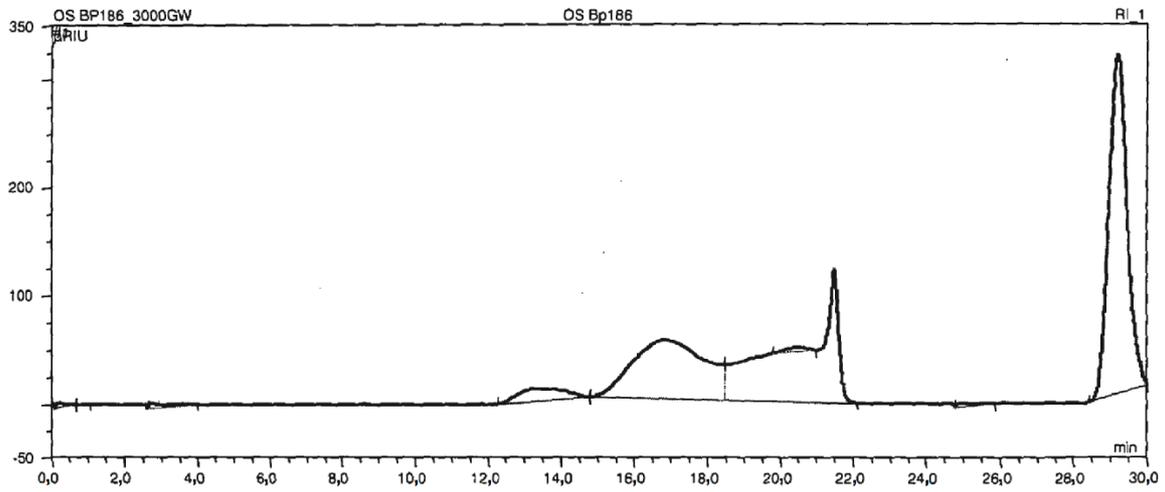


Fig. 2.

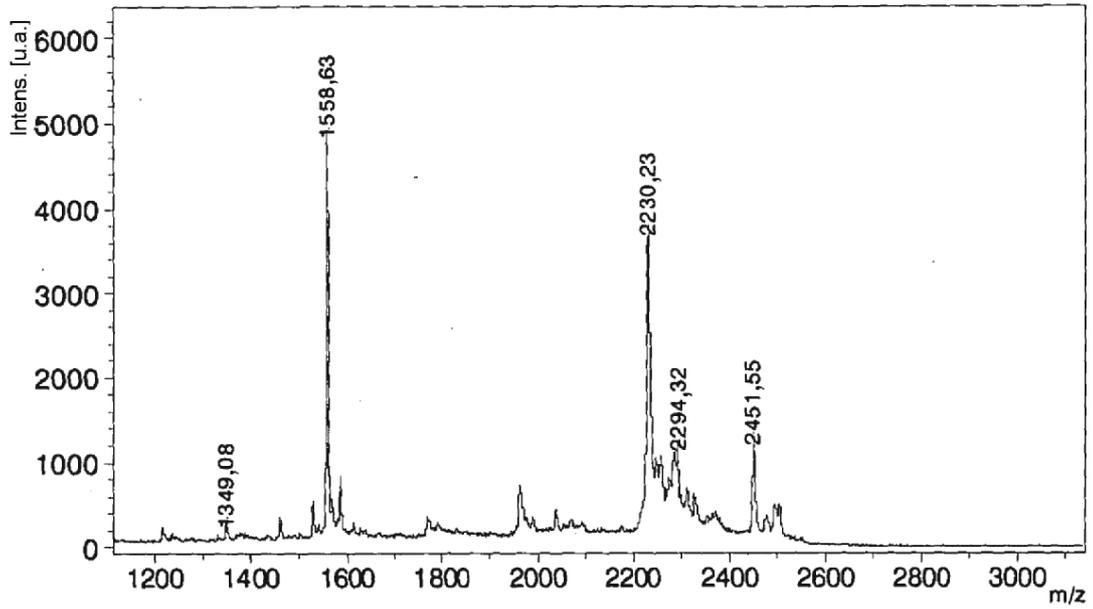


Fig. 3A

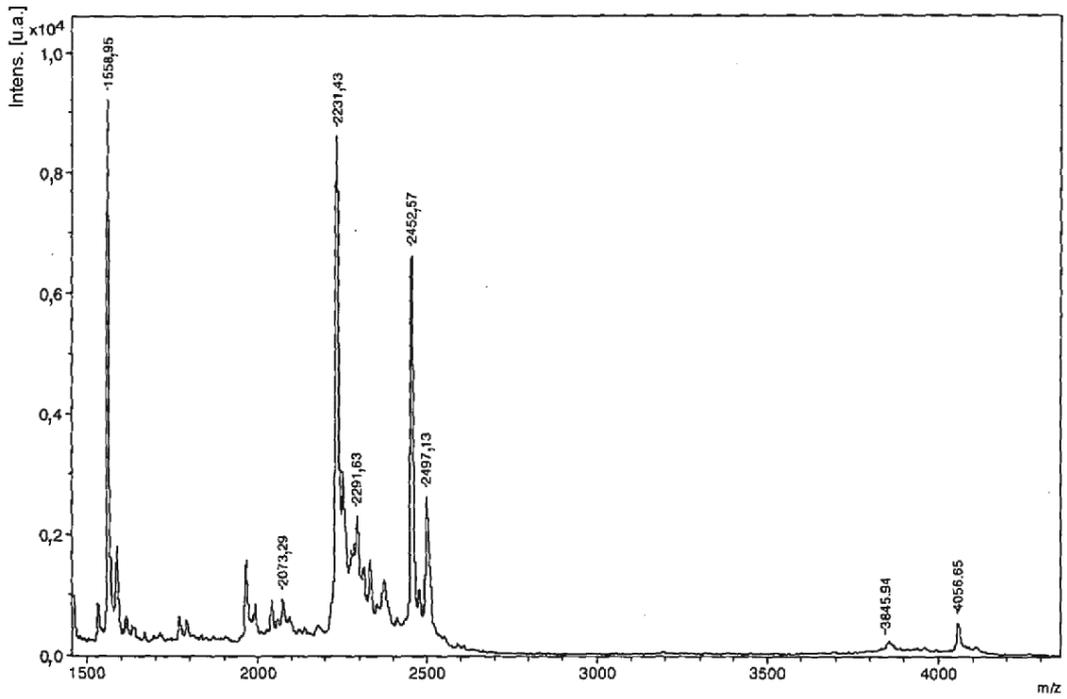


Fig. 3B

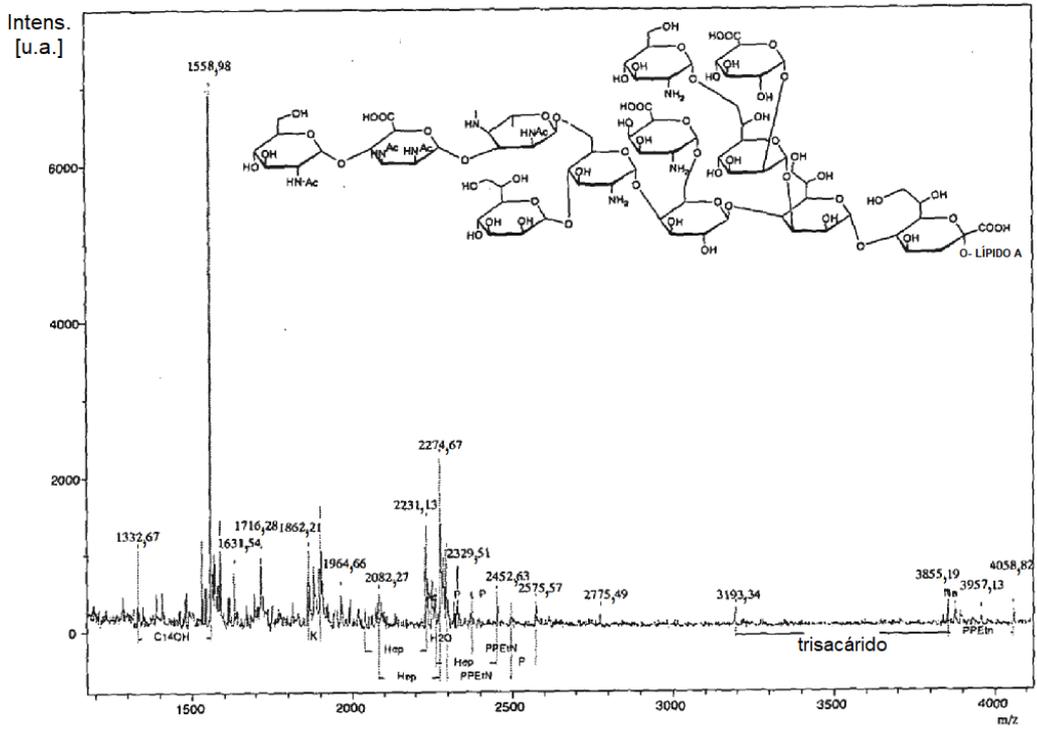


Fig. 3C

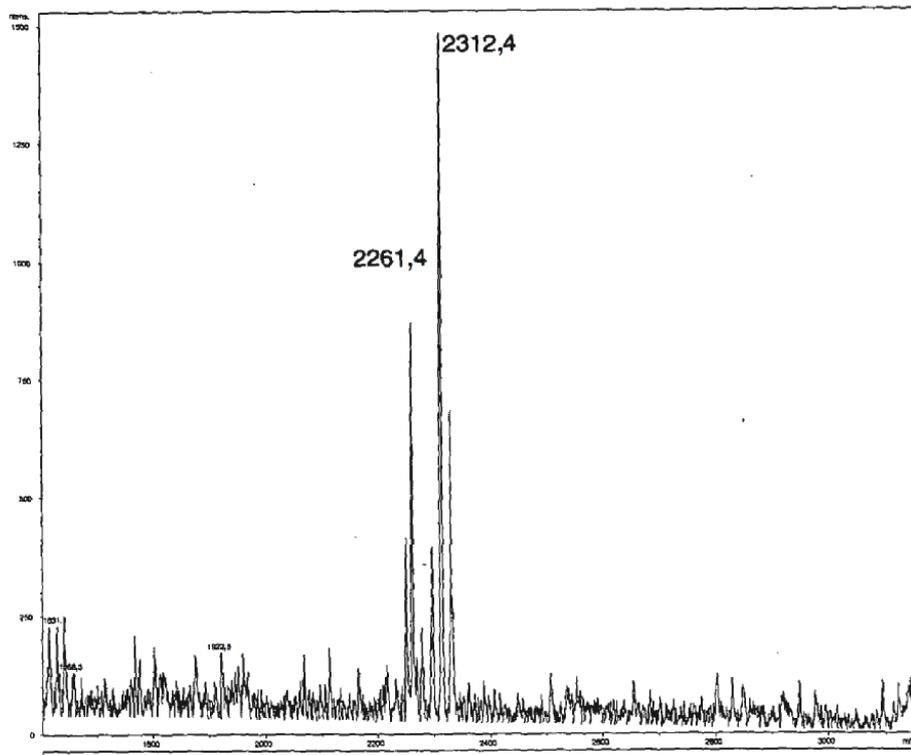


Fig. 3D

l.p	Valor observado de m/z	Interpretación
1	2312,337	OS
2	1631,54 int.	OS-trisacárido
3	1862,21	OS - 2H ₂ O - Hep - Kdo
4	1879,84	OS - 2H ₂ O - Hep - GlcNAc
5	1899,66	OS - 2H ₂ O - Hep - GlcNAc + Na
6	1964,66	OS-(Hep+HexA+HexN)
7	2039,78	OS -COOH-H ₂ O - Hep
8	2082,27	OS - 2H ₂ O - Hep
9	2231,13 int.	OS - COOH-H ₂ O
10	2250,02 int.	OS - H ₂ O - COOH
11	2260,22	OS - H ₂ O + 2P - Hep
12	2274,67 int.	OS - 2H ₂ O
13	2283,66	OS - H ₂ O + 2P - Hep + Na
14	2294,10 int.	OS - H ₂ O
15	2239,51	OS - H ₂ O + P - Ac
16	2316,79	OS - H ₂ O + Na
17	2329,51	OS + H ₂ O
18	2374,33 int.	OS - H ₂ O + P
19	2452,63 int.	OS - H ₂ O + 2P
20	2496,51 int.	OS - H ₂ O + PPEtn
21	2575,57	OS - H ₂ O + P + PPEtn

Fig. 3E

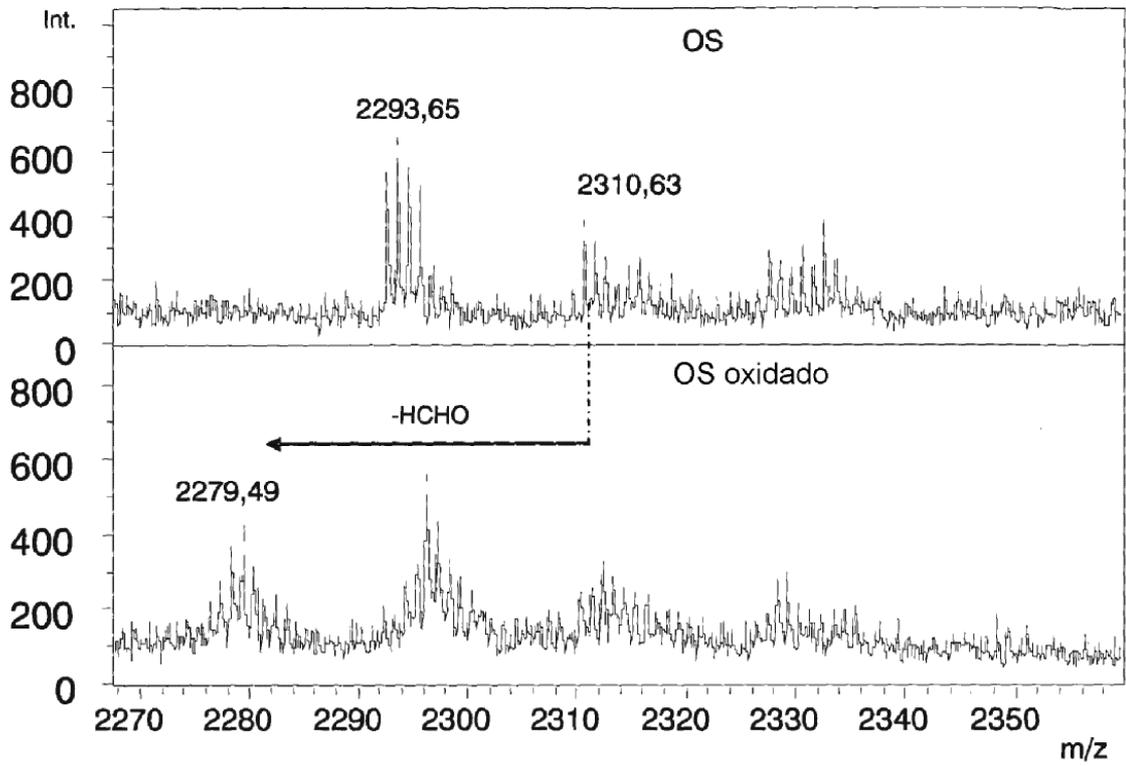


Fig. 3F

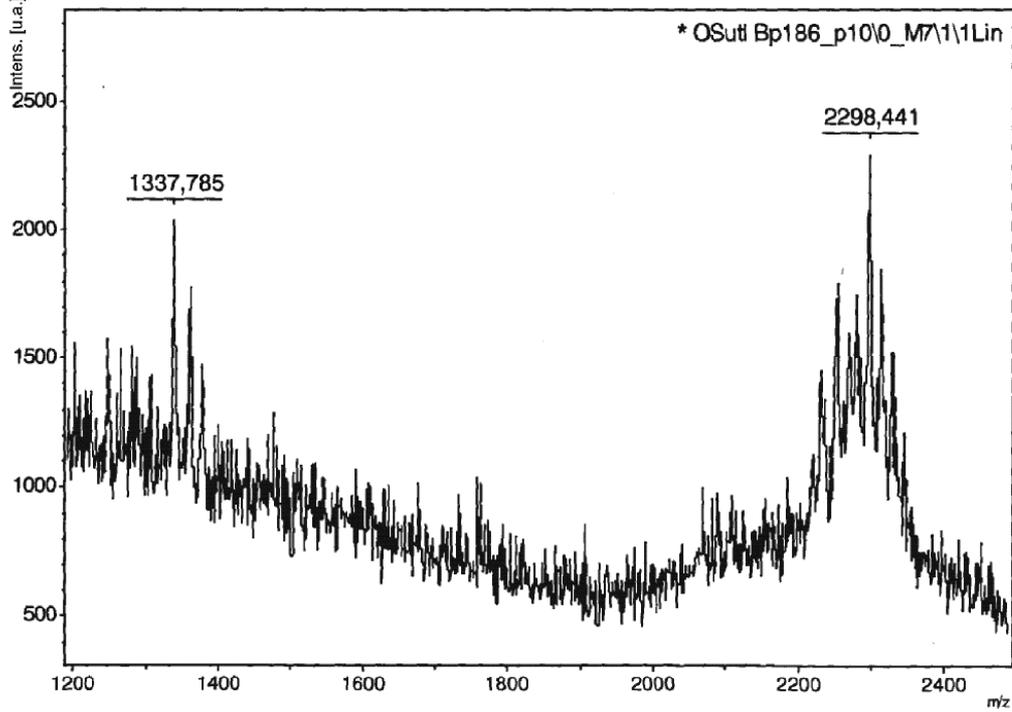


Fig. 3G

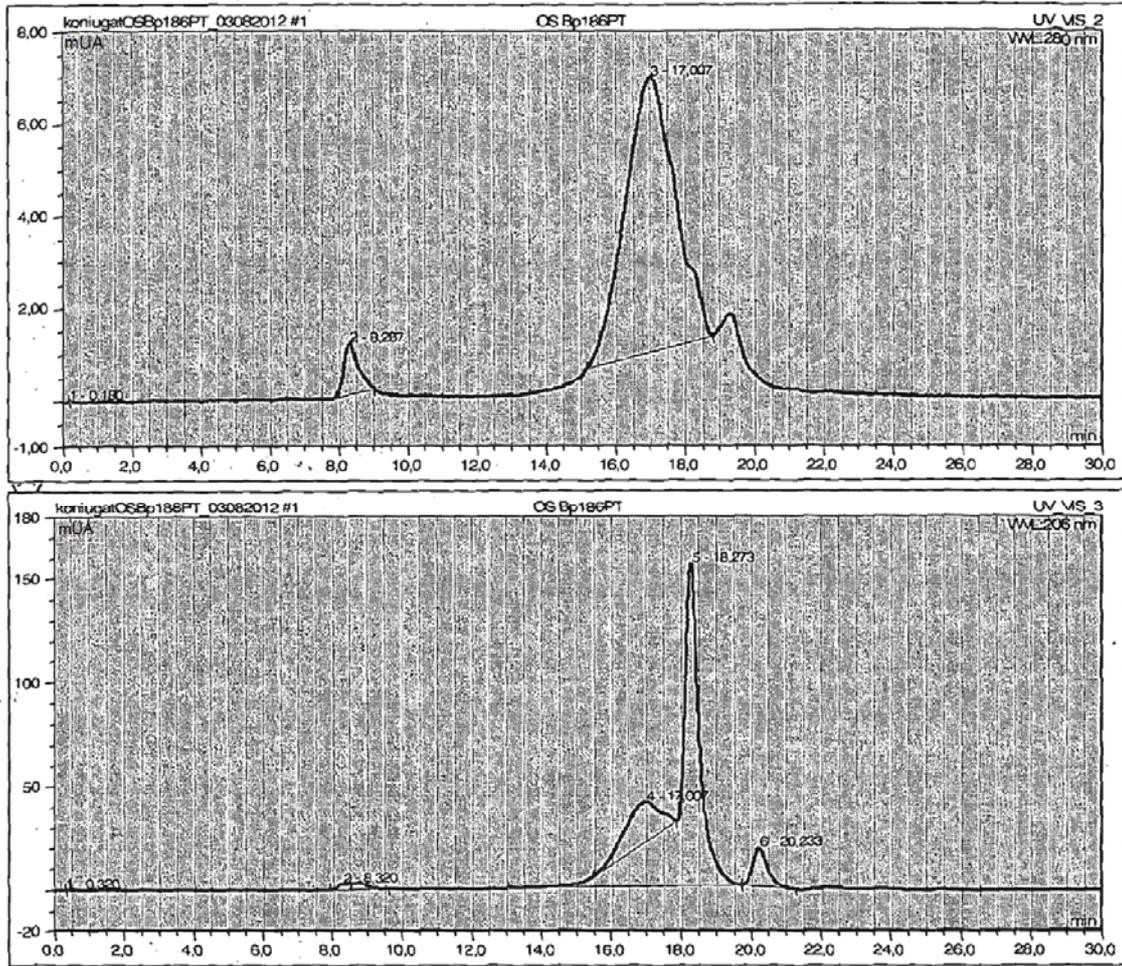


Fig. 4

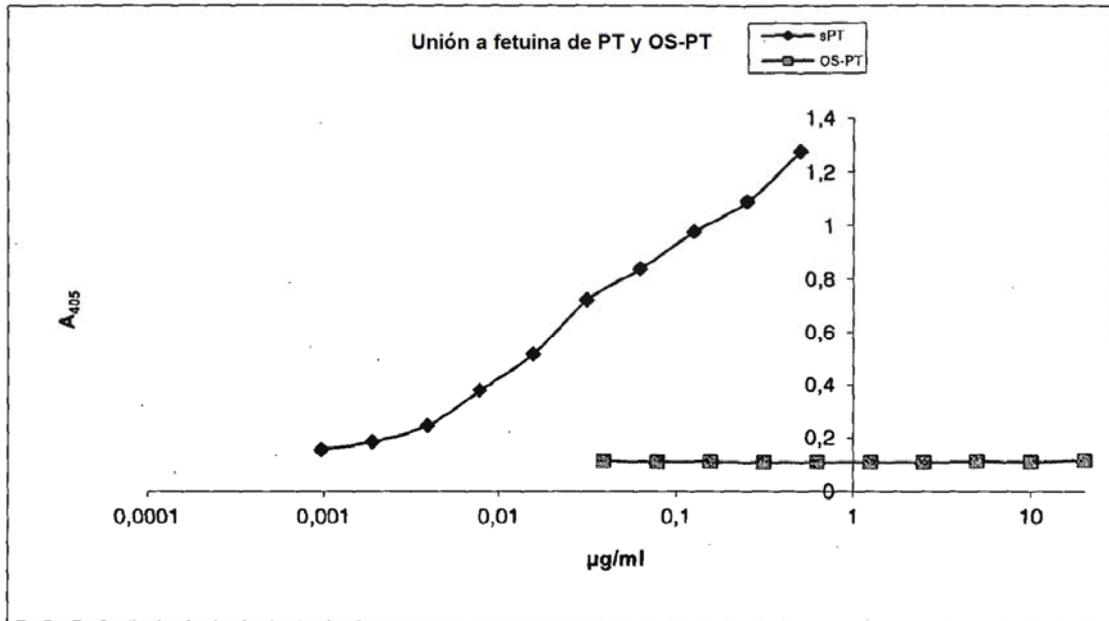


Fig. 5.

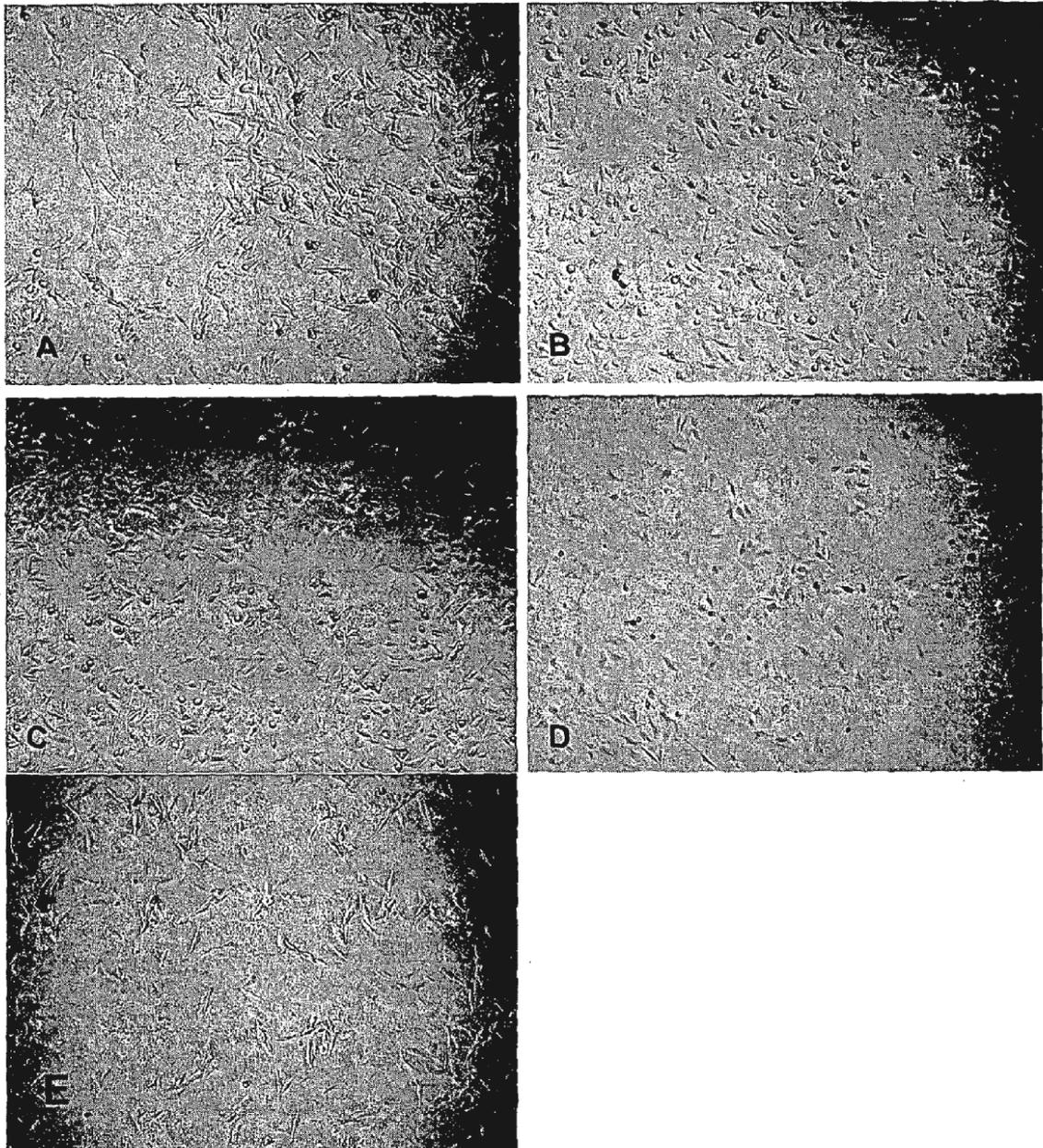


Fig. 6A

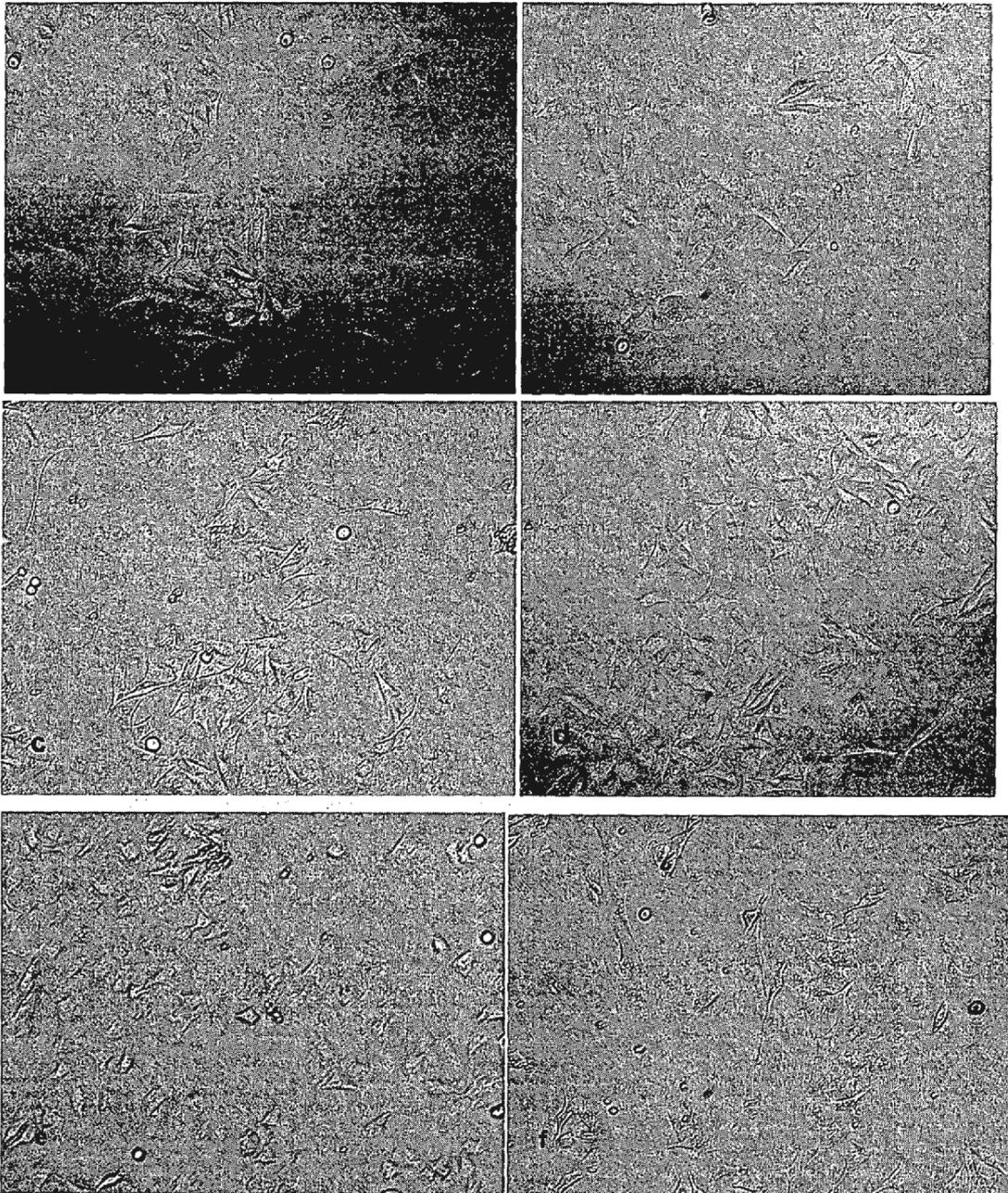


Fig. 6B

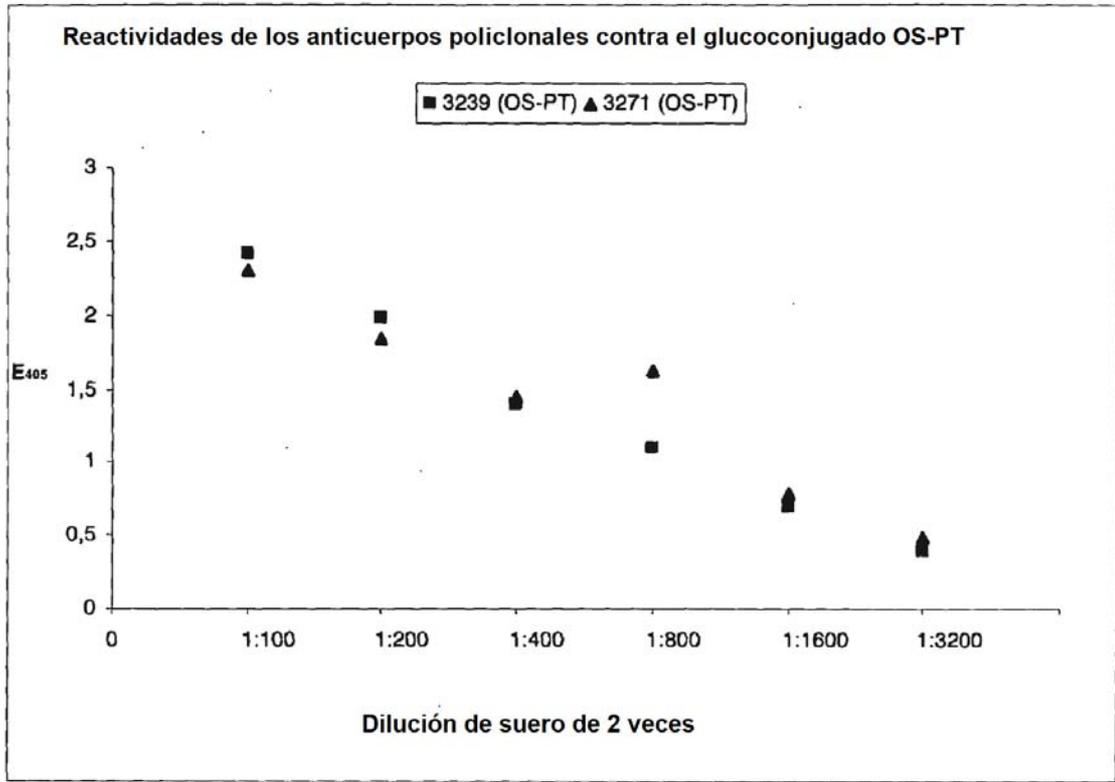


Fig. 7



Fig. 8

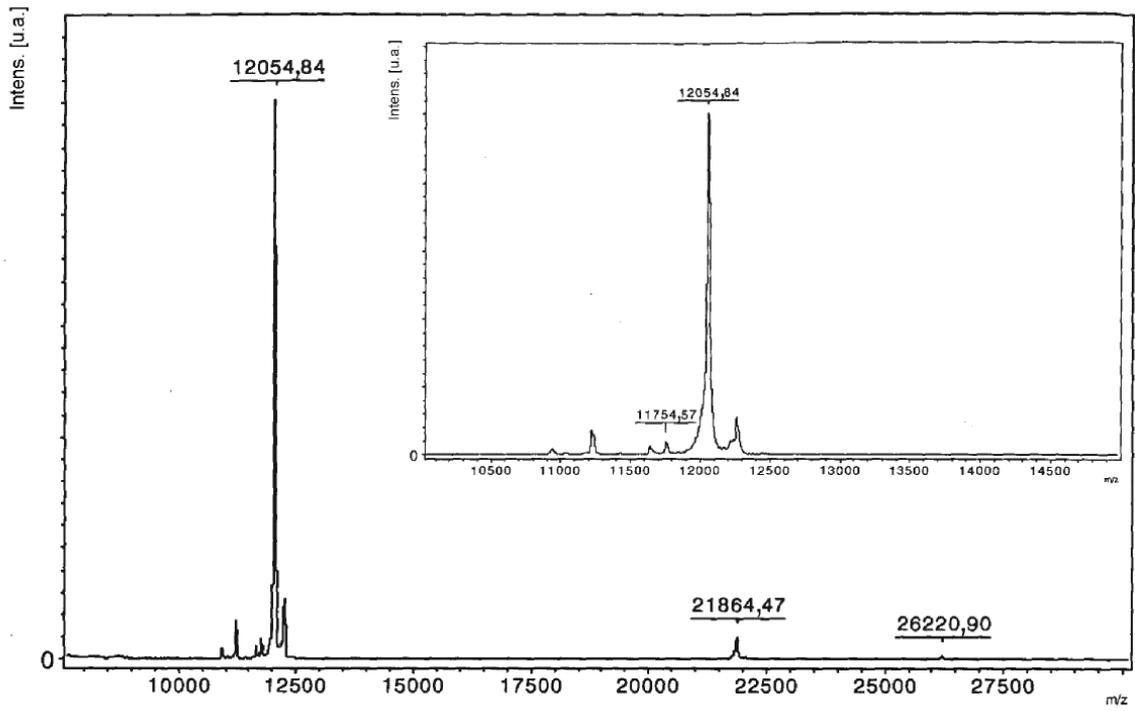


Fig. 9A

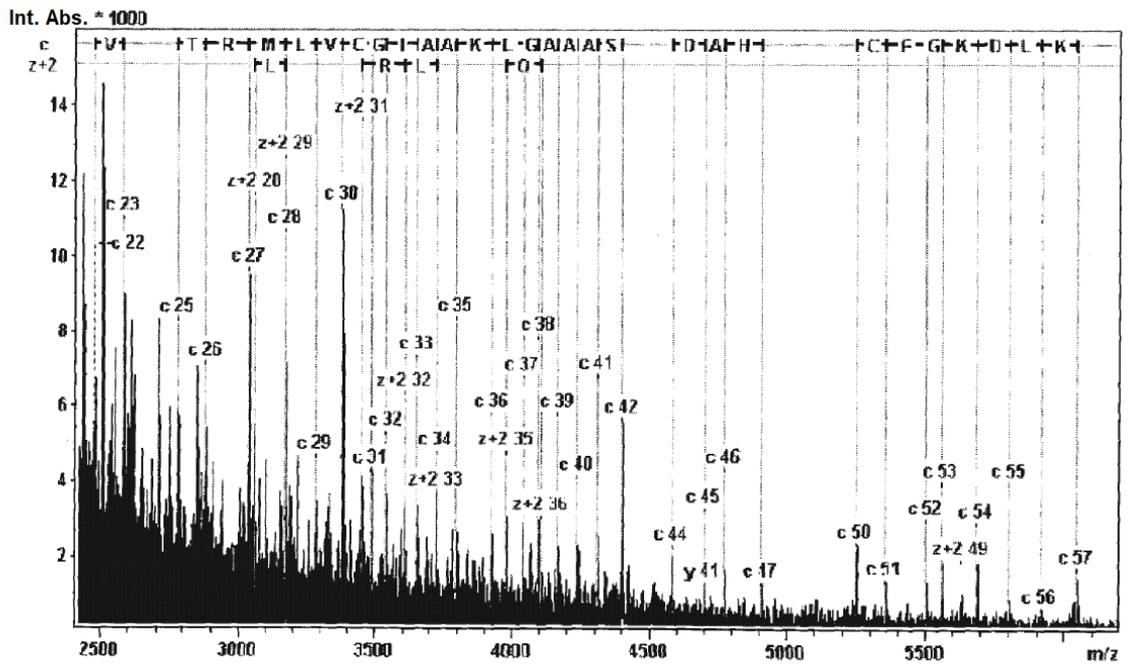


Fig. 9B

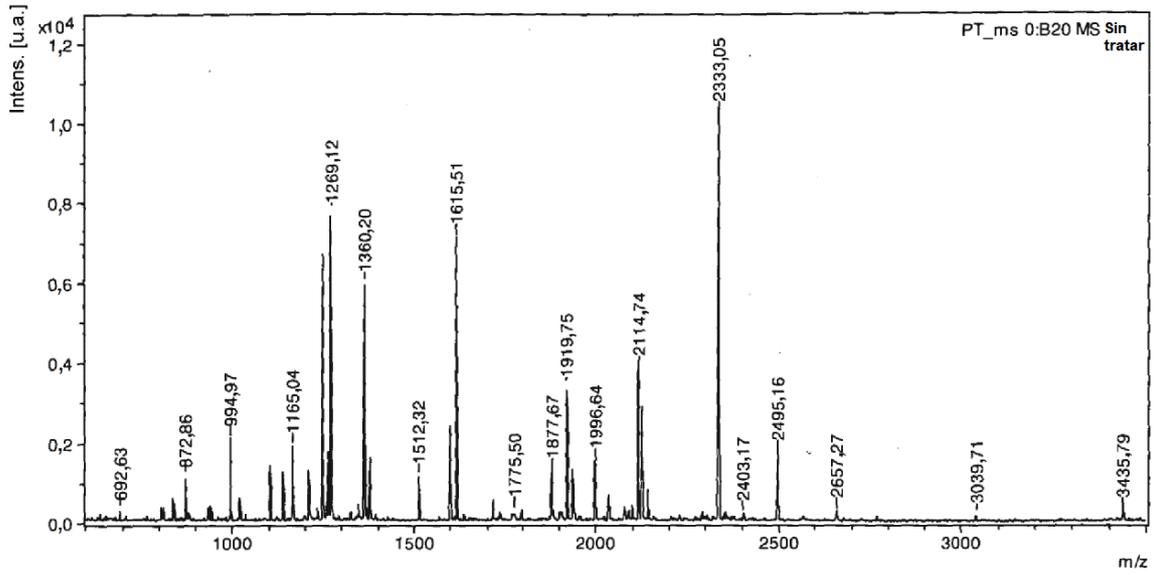


Fig. 9C

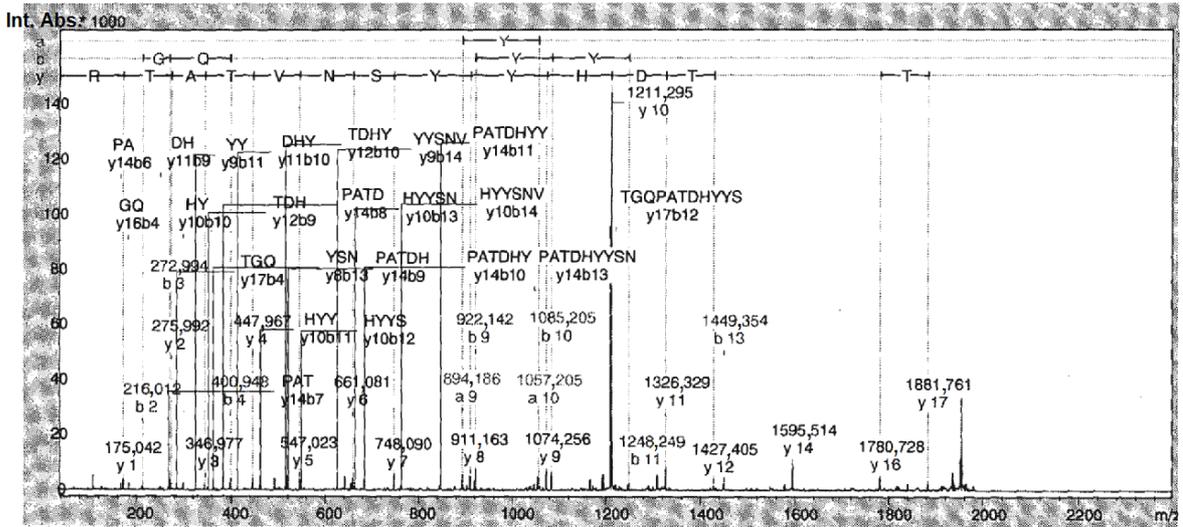


Fig. 9D

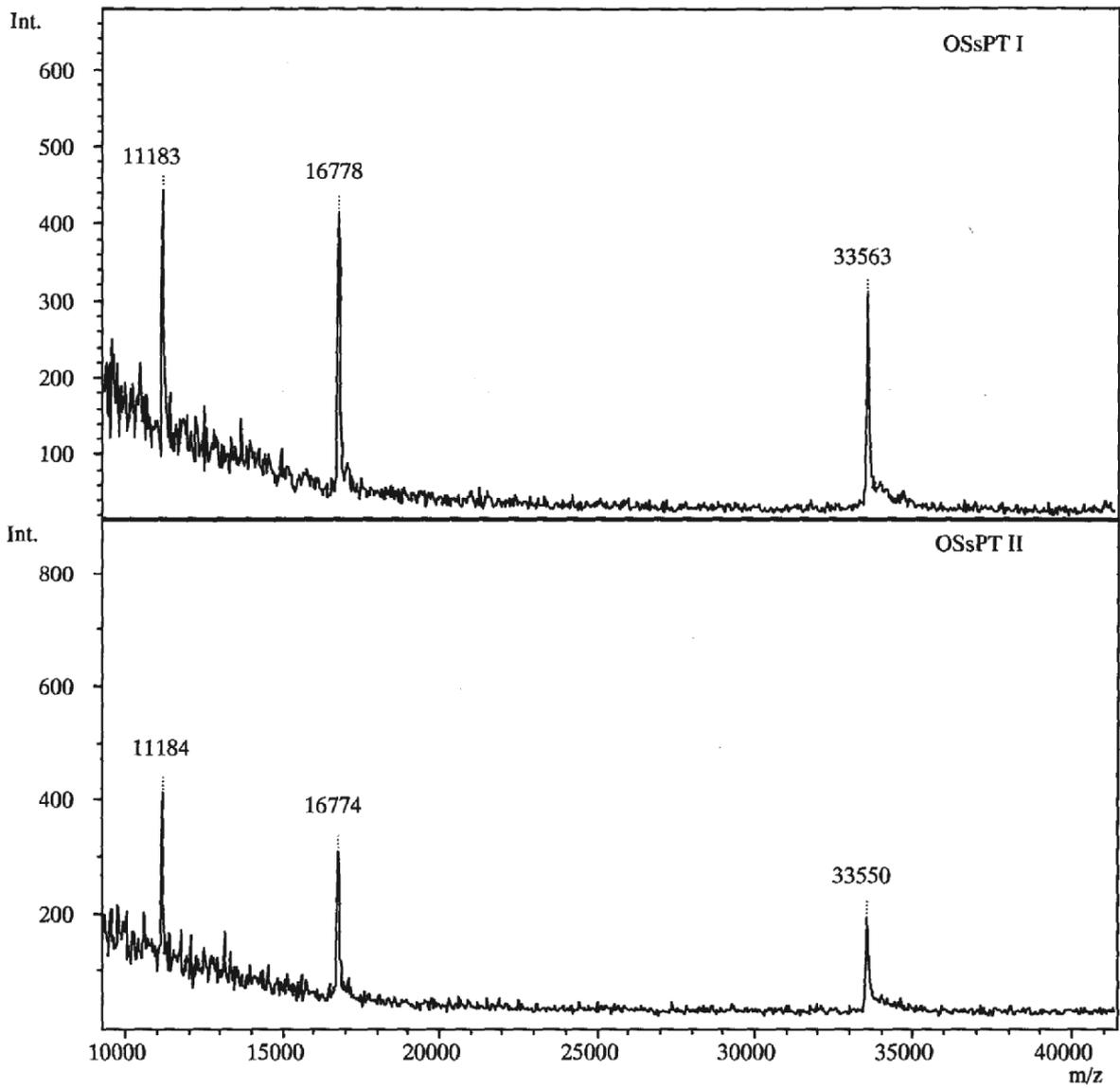


Fig. 9E

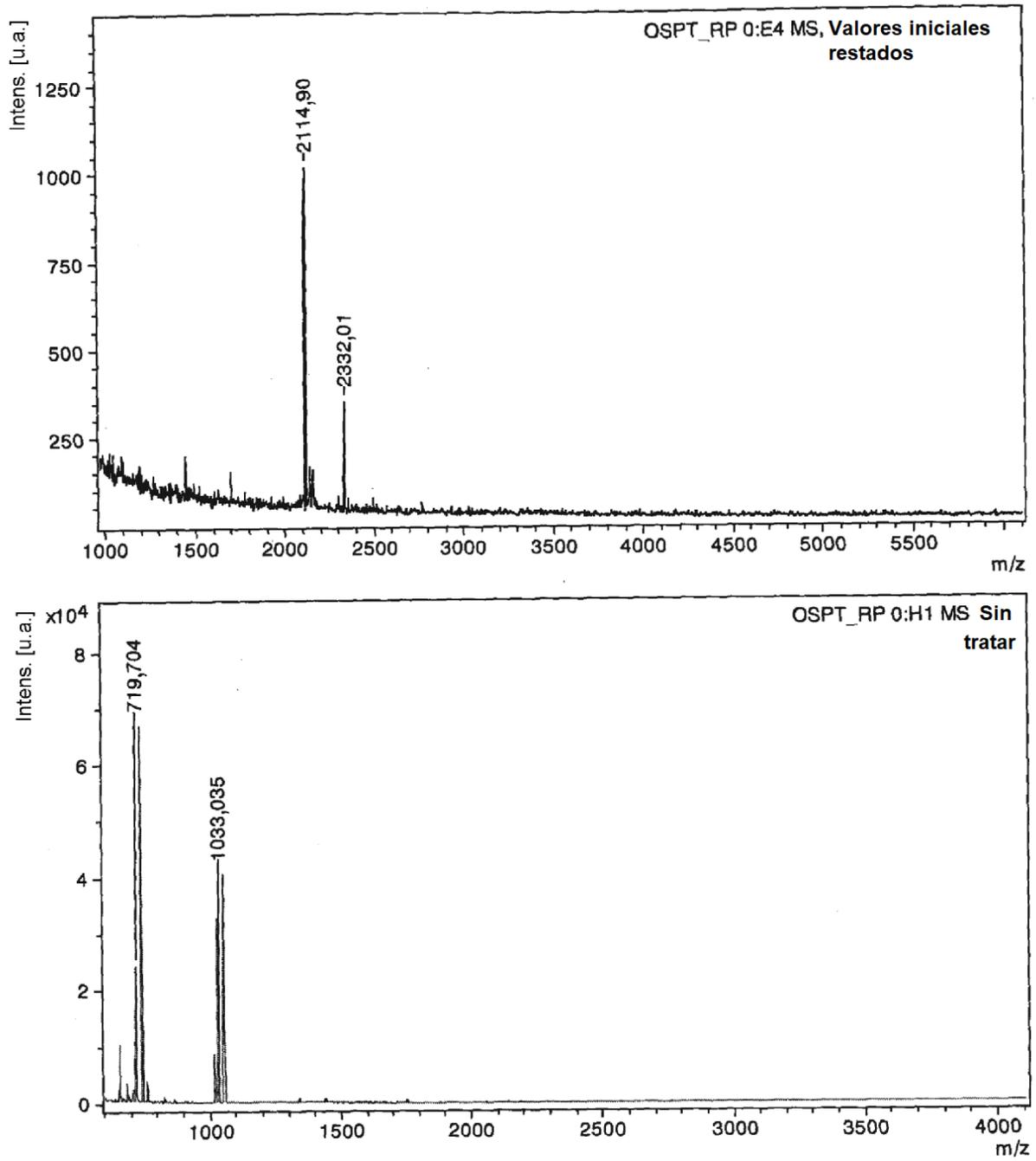


Fig. 9F

Tabla 2

S1 MH ⁺	N.º	secuencia	valores observados de m/ z en los espectros LC-MALDI MS de sPT	valores observados de m/ z en los espectros LC-MALDI MS de OSPT
3434,5784	44-73	YDSRPPEDVFQNGFTAWGN NDNVLDHLTGR	3435,79	-
1033,495	35-43	DDPPATVYR	1033,50	1033,04
2767,1542	127- 151	ADNNFYGAASSYFEYVDTYG DNAGR	-	-
2113,9785	181- 199	VYHNGITGETTTTEYSNAR	2114,45	2113,91
1912,9037	253- 269	AGEAMVLVYYESIAYSF	-	-
1876,9915	152- 168	ILAGALATYQSEYLAHR	1877,671	-
1790,7974	74-91	SCQVGSSNSAFVSTSSSR	1791,74	-
1552,6696	239- 252	QAESSEAMAAWSER	1551,67	-
1511,7641	114- 126	GTGHFIGYIYEVV	1512,32	-
1209,5898	93- 101	YTEVYLEHR	1209,62	1209,58
1119,5471	228- 238	MAPVIGACMAR	1120,58	-
1062,488	102- 110	MQEAVEAER	1063,48	-
1019	207- 215	ANPNPYTSR	1019,51	-
881	200- 206	YVSQQTR	882,59	-
838,478	170- 176	IPPENIR	838,45	839,48
175		R	-	-
1101,663	217- 227	SVASIVGTLVR	1101,67	-
910	35-43	DDPPATVYR	-	-

ES 2 729 398 T3

994,579	169-176	RIPPENIR	994,58	-
1365,691	92-101	RYTEVYLEHR	1365,67	1365,69
S2				
3382,4290	197-226	K ¹⁹⁷ EEQYYDYEDATFETYALT GISICNPGSSLC	-	-
2332,2043	28-49	STPGIVIPPQEIQHGGPYG R	2333,04	2331,95
2366,1703	78-99	GWSIFALYDGTYLGGEYGGVI K	-	-
2113,2314	7-26	FLCHLLSVLPLALLGSHVAR	-	-
1995,9155	120-137	NTGQPATDHYYSNVTATR	1995,93	1996,31
1579,7420	153-168	SGQPVIGACTSPYDGK	-	-
1497,8497	179-191	K ¹⁷⁹ MLYLIYVAGISVR	1498,86	- posible sitio de glucosilación
1137,5534	64-73	GSGDLQEYLR	1137,55	-
1077,5211	100-110	K ¹⁰⁰ DGTPGGAFDLK	1078,48	- posible sitio de glucosilación
1073,5118	111-119	TTFCIMTTR	1072,11	-
992,4295	169-175	YWSMYSR	992,42	-
877,4738	138-145	LLSSTNSR	877,48	-
872,5200	56-63	ALTVAELR	872,52	-
807,4545	146-152	LCAVFVR	807,47	-
631,3232	1-5	MPIDR	-	-

ES 2 729 398 T3

569,3405	192-196	VHVSK	-	-
512,2939	74-77	HVTR	-	-
S3				
3379,4657	198-227	EEQYYDYEDATFQTYALTGIS LCNPAASIC	-	-
990,635	29-38	VAPGIVIPPK	990,65	- posible sitio de glucosilación
2834,4399	75-100	QITPGWSIYGLYDGTYLQAY GGIIK	-	-
1609,7275	154-169	DGQSVIGACASPYEGR	1609,73	-
1529,8218	180-192	LLYMIYMSGLAVR	1527,46	-
1337,6120	122-133	K ¹²² TGQPAADHYYSK	1337,62	- posible sitio de glucosilación; la eliminación de ¹³³ K abolió la citotoxicidad de PT en células CHO [32]
1268,6382	39-50	K ³⁹ ALFTQQGGAYGR	1268,64	1268,71
1218,6075	112-121	K ¹¹² ETFCITTIYK	-	-
1164,6007	65-74	GNAELQTYLR	1164,60	1164,5
1163,5843	101-111	K ¹⁰¹ DAPPGAGFIYR	-	-
883,3978	172-178	DMYDALR	882,59	-
872,5200	57-64	ALTVAELR	872,52	-
861,4788	139-146	LLASTNSR	861,09	-
807,4545	147-153	LCAVFVR	807,77	-
732,4073	1-6	MLINNK	733,20	-

647,2930	51-56	CPNGTR	-	-
569,3405	193-197	VHVSK	-	-
547,3198	134-138	K ¹³⁴ VTATR	-	-
S4				
932,545 H+	43-50	DVPYVLVK	-	-
2124,0827	51-69	K ⁵¹ TNMVVTSVAMKPYEVTPT R	2124,08	posible sitio de glucosilación
1774,8581	79-96	K ⁷⁹ LGAAASSPDAHVPFCFGK	1775,5	posible sitio de glucosilación
1614,9213	128-141	K ¹²⁸ QLTFEGKPALELIR	1615,51	1614,8
1359,6871	100-111	K ¹⁰⁰ RPGSSPMEVMLR	1360,20	posible sitio de glucosilación
1245,6884	112-121	AVFMQQRPLR	1245,69	-
905,4947	70-78	MLVCGIAAK	-	-
753,3270	142-148	MVECSGK	-	-
692,3800	122-127	MFLGPK	692,40	-
S5				
1744,927 H+	27-42	IYSPADVAGLPTHLYK	-	-
3220,5428	104-133	IALTVEDSPYPGTPGDILLELQI CPLNGYCE	-	-
3070,4073	74-101	ACLSDAGHEHDTWFDTMLGF AISAYALK	-	-
1503,6719	57-69	NQEFCLTAFMSGR	-	-

1162,6466	43-52	NFTVQELALK	1162,56	- posible sitio de glucosilación
726,4508	4-10	QAGLPLK	-	-

Fig. 9G

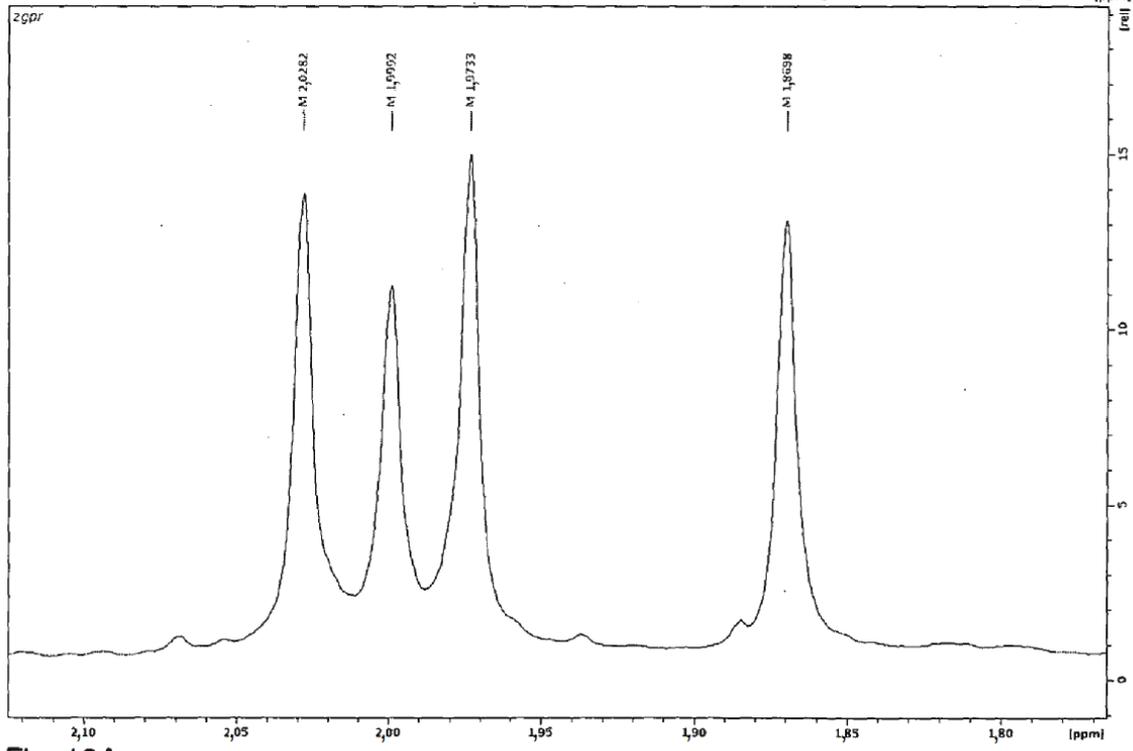
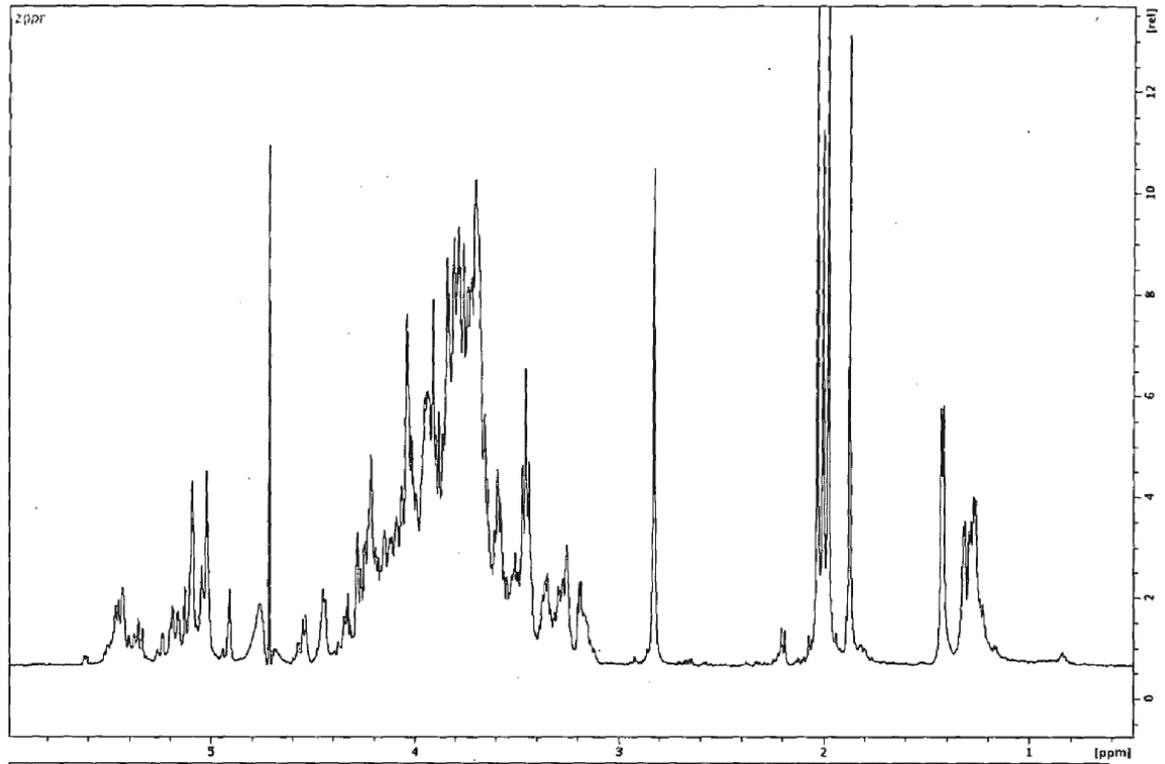


Fig. 10A

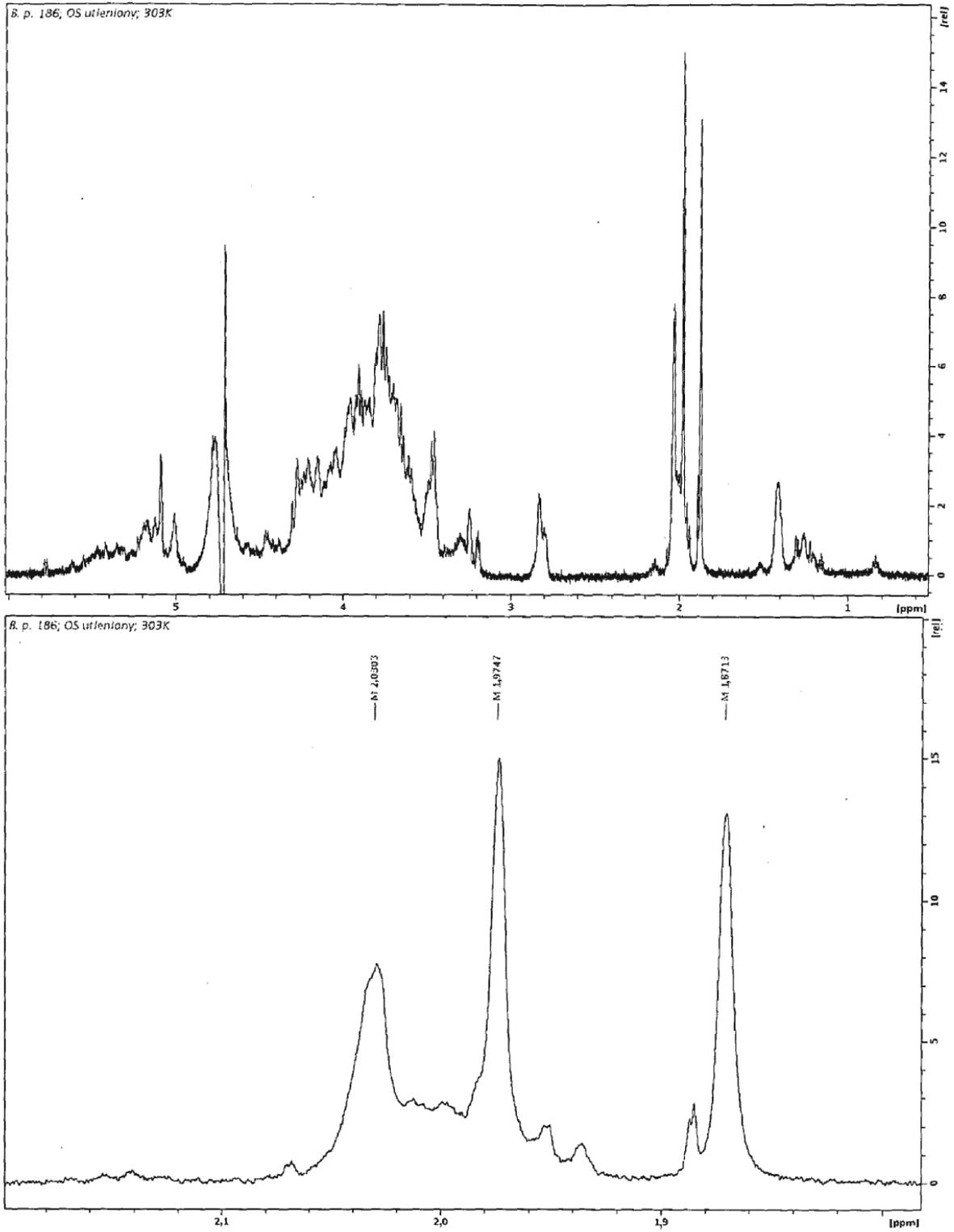
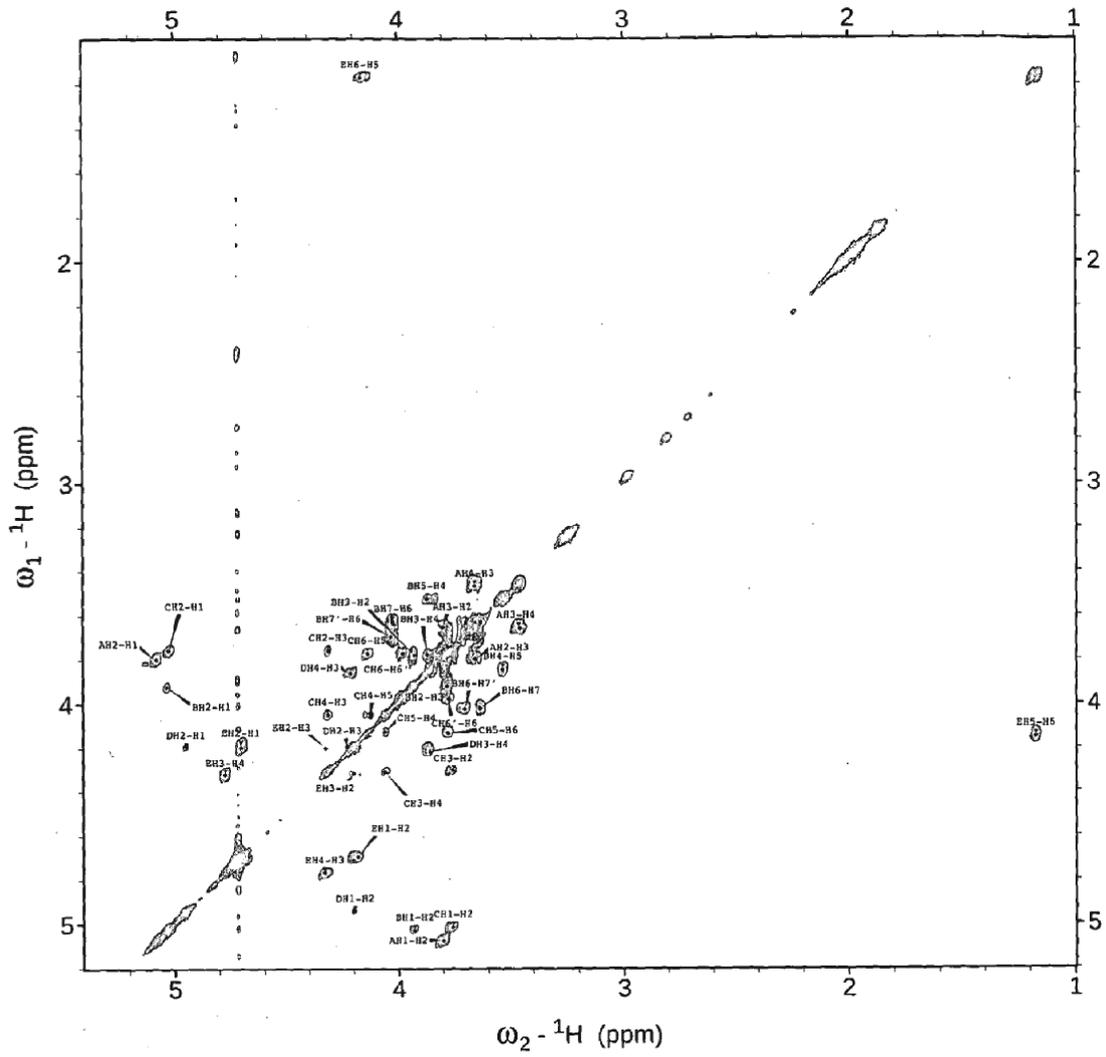


Fig. 10B



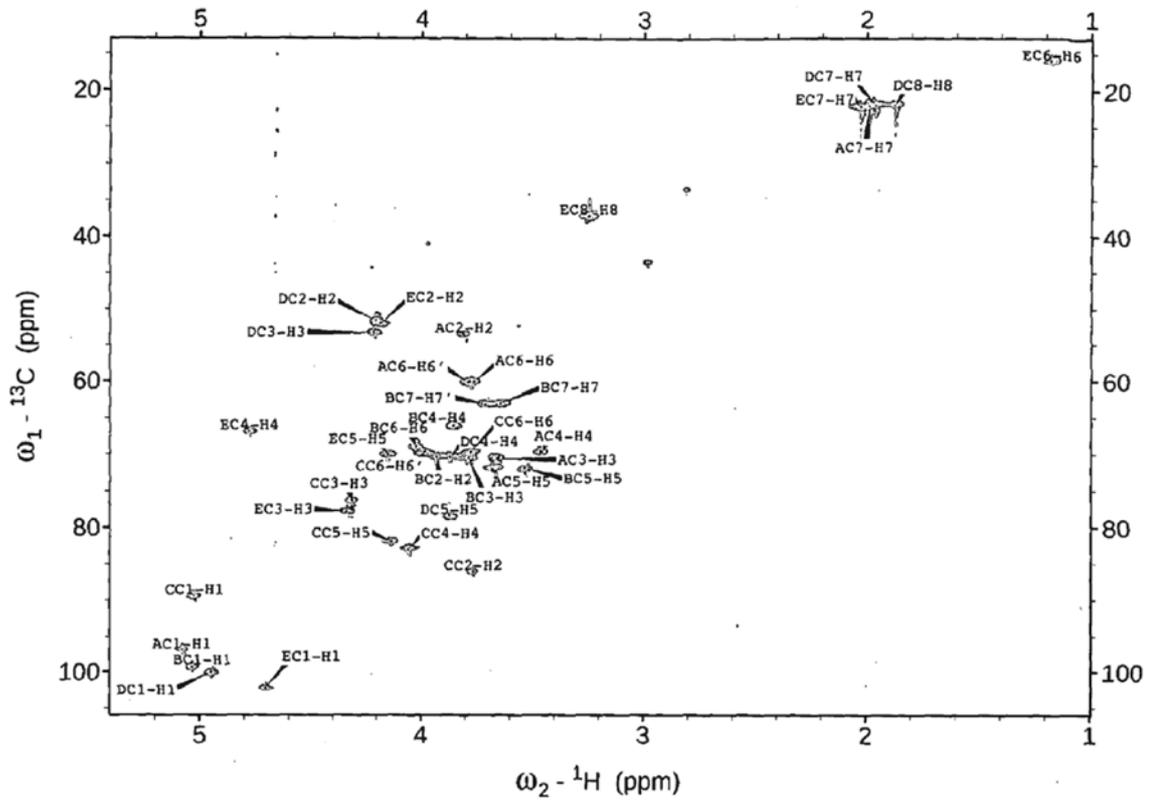


Fig. 11B

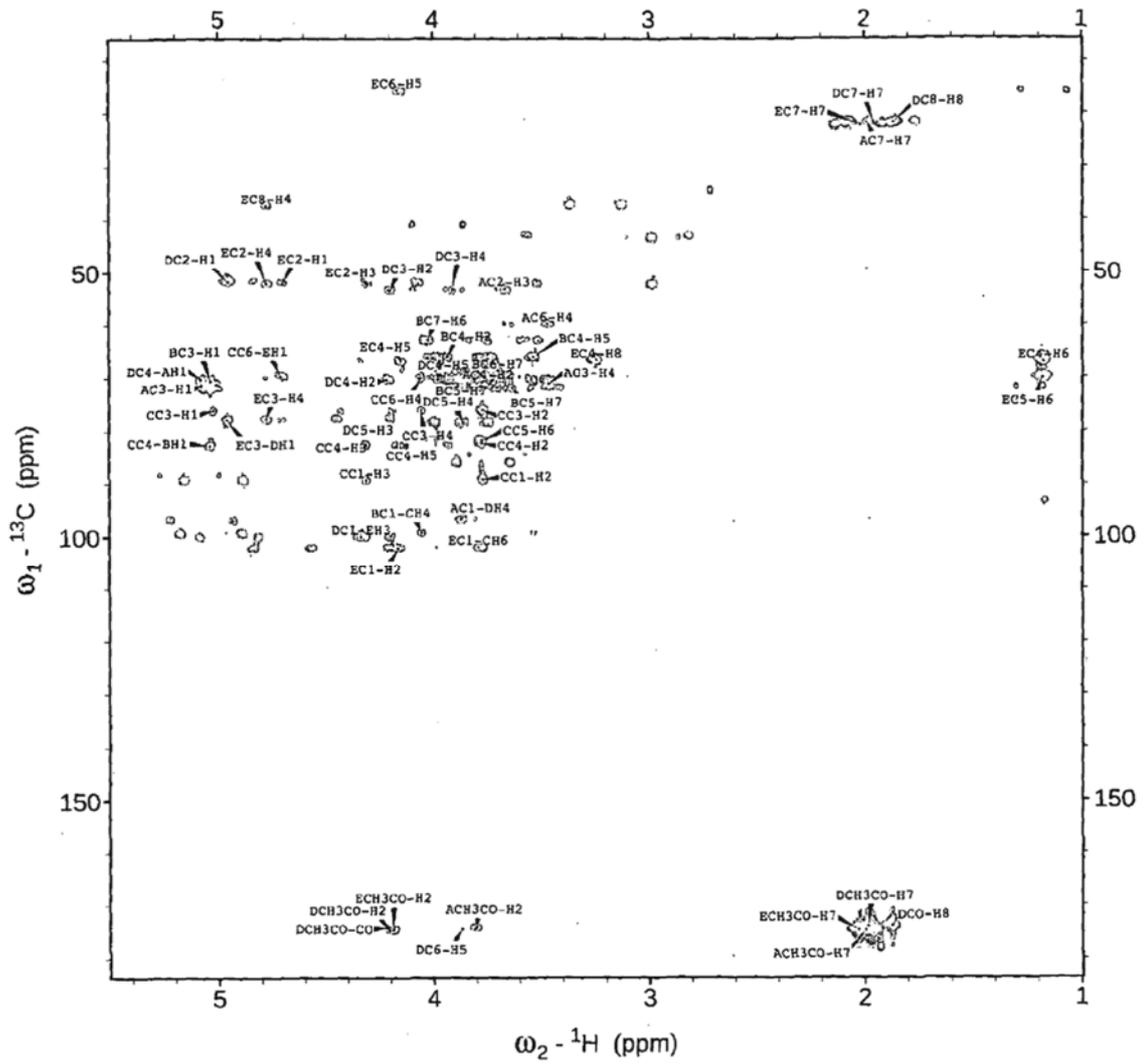


Fig. 11C

	H1/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6, H6'/C6	H7, H7'/C7 CH ₃ CO	H8, H8'/C8 CH ₃ N
A	5,079	3,803	3,659	3,463	3,681	3,761 3,789	1,99	-
	96,8	53,42	71,09	70,03	72,01	60,08	21,99 174,5	-
B	5,035	3,927	3,782	3,86	3,526	4,023	3,703 3,648	-
	99,28	70,34	70,6	66,14	71,91	68,88	63,07	-
C	5,022	3,762	4,312	4,055	4,128	3,777 3,981		-
	89,31	86,03	76,23	82,7	81,87	69,89	-	-
D	4,951	4,2	4,215	3,871	3,905	-	1,966	1,868
	100	51,75	53,44	70,41	78,26	174,5	21,94 174,4	21,98 174,4(CO)
E	4,702	4,186	4,325	4,774	4,156	1,175	2,025	3,244
	102,1	52,19	77,82	66,9	70,04	15,85	22,3 174,7	37,22

Fig. 11D

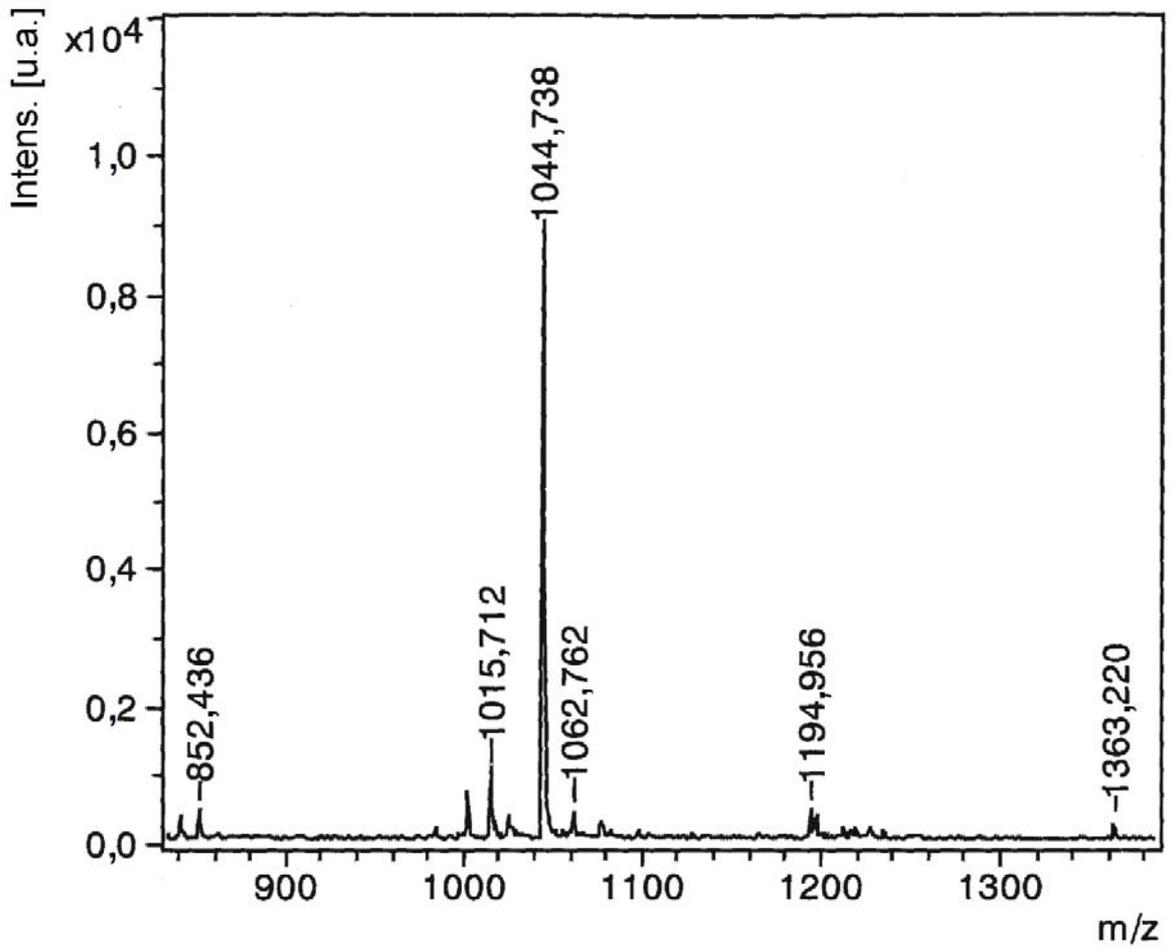


Fig. 12A

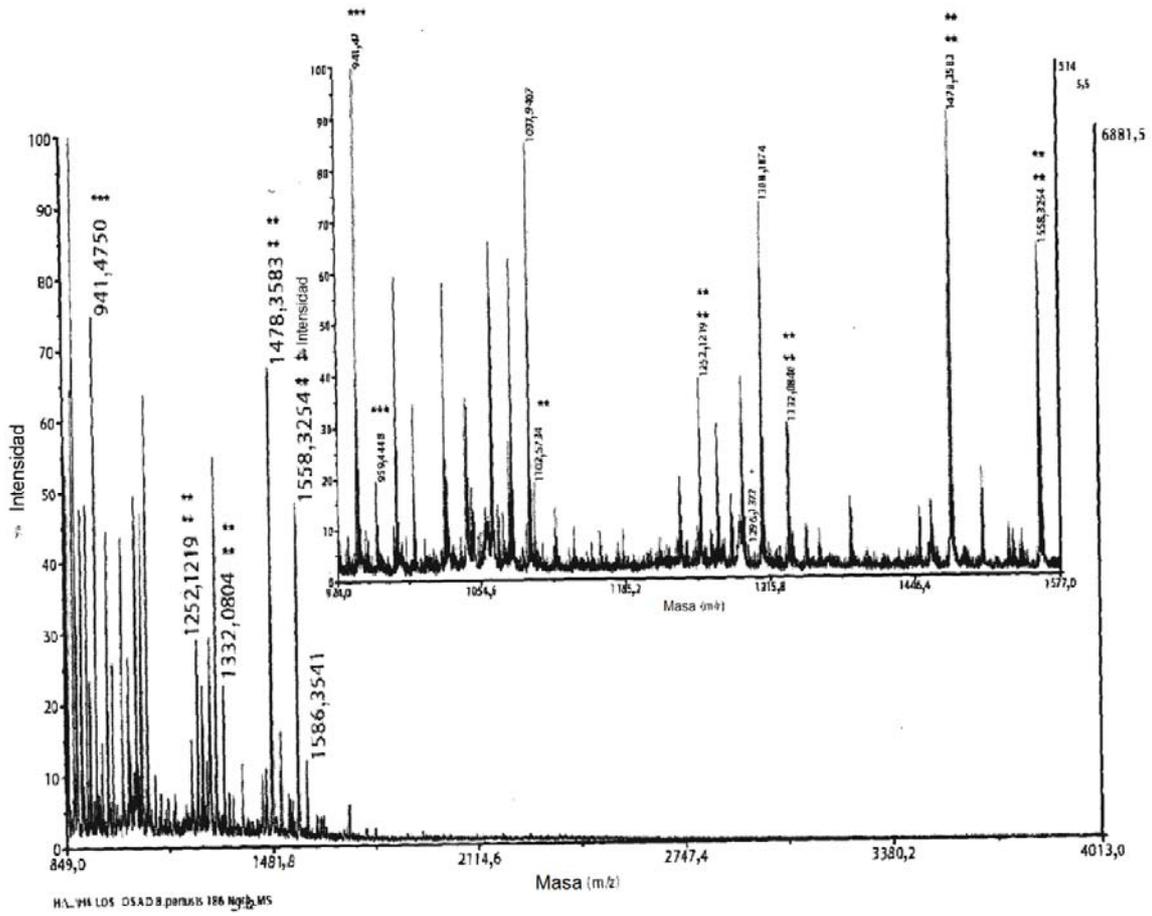


Fig. 12B