



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 284 681**

⑤① Int. Cl.:
C08B 37/00 (2006.01)
A61K 39/102 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **01964789 .0**
⑧⑥ Fecha de presentación : **27.08.2001**
⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **1313771**
⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **28.05.2003**

⑤④ Título: **Epítomos de oligosacáridos del núcleo interno de lipopolisacáridos de *Haemophilus influenzae* como vacunas para la prevención de infecciones por *Haemophilus influenzae*.**

③⑩ Prioridad: **25.08.2000 US 227850 P**

④⑤ Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2007

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2007

⑦③ Titular/es: **Aventis Pasteur Limited
Connaught Campus
1755 Steeles Avenue West
Toronto, Ontario M2R 3T4, CA**

⑦② Inventor/es: **Richards, James, C.;
Cox, Andrew;
Moxon, Richard;
Hood, Derek;
Schweda, Elke, K. H. y
Mansson, Martin**

⑦④ Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 284 681 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

Epítopes de oligosacáridos del núcleo interno de lipopolisacáridos de *Haemophilus influenzae* como vacunas para la prevención de infecciones por *Haemophilus influenzae*.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a mutaciones definidas en la maquinaria biosintética para la expresión de lipopolisacáridos (LPS) en *Haemophilus influenzae*. La invención también se refiere al uso de conjugados de los LPS a partir de cepas mutantes así obtenidas para inducir una respuesta inmune heteróloga contra un amplio intervalo de cepas de *H. influenzae* que provocan enfermedad. Más específicamente, la invención se refiere a vacunas para la prevención de infecciones bacterianas que comprenden lipopolisacáridos centrales de *Haemophilus influenzae*.

15 **Antecedentes de la invención**

Haemophilus influenzae es una causa principal de enfermedad en todo el mundo. Se conocen seis serotipos capsulares ("a" a "f") y un número indeterminado de capas capsulares (no tipificables) de *H. influenzae*. Las cepas capsulares de tipo b están asociadas a enfermedades invasivas, incluyendo meningitis y neumonía, mientras que el *H. influenzae* no tipificable (NTHi) es una causa principal de otitis media en niños e infecciones del tracto respiratorio en adultos. La otitis media es una enfermedad común de la infancia que es responsable de la mayor frecuencia de visitas pediátricas en los Estados Unidos (Stool y col., *Pediatr. Infect. Dis. Suppl.*; 8: S11-S14, 1989).

El desarrollo de una vacuna para las enfermedades de NTHi se ha comprobado que es difícil debido a una falta de entendimiento de los antígenos que confieren inmunidad protectora. Se han enfocado esfuerzos en el desarrollo de una vacuna de NTHi en los antígenos de superficie tales como proteínas de la membrana externa y pelos o fimbria (Kyd y col., *Infect. Immun.*, 63: 2931-2940, 1995; Deich y col., *Vaccine Res.*, 2: 31-39, 1995).

Recientes avances en genética molecular, análisis de estructura molecular e inmunoquímica proporcionan herramientas poderosas que han permitido la identificación de estructuras de carbohidrato como antígenos de vacuna candidatos.

Las bacterias Gram-negativas tienen una membrana externa constituida por componentes incluyendo proteínas, lipoproteínas, fosfolípidos, y glicolípidos. Los glicolípidos comprenden principalmente lipopolisacáridos (LPS) de endotoxinas. Los LPS son moléculas constituidas por a) una parte de Lípido A que consta de un disacárido de glucosalina que está sustituida con grupos fosfatos y ácidos grasos de cadena larga en enlaces éster y amida; b) un polisacárido central que está unido a Lípido A mediante un azúcar de ocho carbonos, Kdo (cetodesoxioctonato), y heptosa, glucosa, galactosa, y N-acetilglucosamina; y, opcionalmente c) cadenas laterales específicas de O constituidas por repetición de unidades de oligosacáridos que, dependiendo del género y especie de bacteria, puede contener manosa, galactosa, D-glucosa, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina, L-ramnosa, y una didesoxihexosa (abecuesa, colitosa, tivelosa, paratosa, trehalosa). Los LPS que carecen de repetición de cadenas laterales O se refieren algunas veces a lipopolisacárido de cadena corta, o a lipooligosacárido (LOS). En esta solicitud el término lipopolisacárido (o LPS) incluye lipopolisacárido de cadena corta y lipooligosacárido (y LOS).

Los determinantes principales antigénicos de bacterias Gram-negativas se cree que residen en la estructura compleja de carbohidratos de los LPS. Estas estructuras de carbohidratos varían significativamente, incluso entre diferentes especies del mismo género de bacterias Gram-negativas, principalmente debido a variaciones en uno o más de la composición de azúcar, la secuencia de oligosacáridos, el enlace entre las unidades monómeras de los oligosacáridos y entre los propios oligosacáridos, y sustituciones/modificaciones de los oligosacáridos (particularmente el oligosacárido terminal). Por esta razón, el desarrollo de una vacuna que tiene un efecto de amplio espectro contra *Haemophilus influenzae* (particularmente contra NTHi) ha sido infructuoso.

El LPS es un componente bacteriano que tiene potencial como un inmunógeno de vacuna debido a los determinantes antigénicos ("epítopes") que residen en sus estructuras carbohidratos. Sin embargo, la naturaleza química de los LPS disminuye su uso en las formulaciones de vacunas, es decir, la inmunización activa con LPS es inaceptable debido a su toxicidad inherente, en algunos animales, de la parte de Lípido A. Los efectos patofisiológicos inducidos (directa o indirectamente) por el Lípido A de LPS en el torrente sanguíneo incluyen fiebre, leucopenia, leucocitosis, la reacción de Shwartzman, coagulación intravascular diseminada, aborto, y en dosis mayores, choque y muerte.

Se ha establecido que las vacunas compuestas por polisacáridos capsulares son eficaces en la prevención de enfermedades humanas provocadas por las bacterias encapsuladas homólogas. Estos antígenos carbohidratos a menudo son escasamente inmunogénicos en seres humanos debido a la falta de respuesta dependiente de células T. Sin embargo, conjugando el antígeno polisacárido específico a un vehículo de proteína adecuado, la inmunogenicidad del antígeno carbohidrato se puede potenciar en gran medida en pacientes que no responden al polisacárido solo. Las vacunas glicoconjugadas basadas en el polisacárido capsular específico de tipo *H. influenzae* (Hib), por ejemplo Pro-Hibit™, y ActHib™, han probado éxito en el control de enfermedades invasivas de Hib en niños. Las vacunas de Hib de conjugados de polisacárido capsular-proteína no proporcionan protección contra la enfermedad provocada por cepas acapsulares (no tipificables) de *H. influenzae* (es decir, contra la enfermedad provocada por NTHi) debido a que solamente protegen contra infecciones provocadas por cepas de *H. influenzae* que llevan la cápsula de tipo b.

El lipopolisacárido (LPS) es un antígeno de la superficie celular de NTHi. El LPS de *Haemophilus influenzae* se ha encontrado que solamente contiene los componentes del lípido A y oligosacárido (OS). Debido a que el componente del lípido A de LPS es tóxico, se debe destoxificar antes de la conjugación a un vehículo inmunógeno, como se ha descrito anteriormente.

5 Barenkamp y col., (Pediatr. Infect. Dis. J., 9: 333-339, 1990) demostraron que los LPS estimulaban la producción de anticuerpos bactericidas dirigidos contra NTHi. McGehee y col. (Am. Journal Respir. Cell Biol., 1: 201-210, 1989) mostraron que la inmunización pasiva de ratones con anticuerpos monoclonales dirigidos contra LOS a partir de NTHi potenciaba la eliminación pulmonar de NTHi.

10 Green y col., (Vaccines, 94: 125-129, 1994) describen una vacuna de NTHi que comprende un conjugado de oligosacárido de NTHi y la proteína de difteria no tóxica mutante CRM. Sub. 197. El resto del lípido A se retiró se LOS mediante tratamiento con ácido, seguido de la derivatización del Os resultante con dihidrazida de ácido atípico (ADH) y acoplamiento a CRM. Sub. 197. A pesar que Barenkamp y col., muestran que LOS estimulaba la producción de anticuerpos bactericidas contra NTHi; los conjugados de Green y col. Se determinaron que eran escasamente inmunogénicos después de la inyección en ratones. Además, los conjugados no indujeron anticuerpos bactericidas contra NTHi.

15 Gu y col. (Patente de Estados Unidos N° 6.207.157) se refiere a la destoxificación de los LOS de NTHi mediante la eliminación de ácidos grasos unidos a éster de ellos, de manera que puede ser adecuado para la preparación de vacunas. Sin embargo, Gu no describe cualesquiera otras modificaciones de o atributos químicos deseados de los LOS de NTHi.

20 Actualmente no existe ninguna vacuna disponible para proporcionar protección de amplio espectro contra las infecciones provocadas por *Haemophilus influenzae*. De este modo, existe una necesidad de una vacuna que tenga eficacia de amplio espectro contra *Haemophilus influenzae*, particularmente NTHi.

25 Con el fin de utilizar un antígeno para el desarrollo de vacuna, se deben cumplir cuatro criterios esenciales. Es decir el epítipo inmunogénico debe ser:

- 30
1. genéticamente estable;
 2. conservada en todas las cepas clínicamente relevantes a través de las especies;
 - 35 3. accesible (*in vitro* e *in vivo*) a mecanismos inmunes de huéspedes; y
 4. capaz de inducir anticuerpos protectores *in vivo*.

40 existe una necesidad de identificar epítopes de carbohidratos de LPS de *H. influenzae*, particularmente NTHi, que satisface estos criterios.

Sumario de la invención

45 La presente descripción se refiere a la inmunidad proporcionada por las moléculas activadoras de las células b derivadas de lipopolisacárido (LPS) de *H. influenzae*, comprendiendo dichas moléculas uno o más epítopes de una parte de oligosacáridos de núcleo interno conservado del lipopolisacárido. También se describe una estrategia para identificar y caracterizar dichos epítopes que son representativos de los LPS expresados por cepas de *H. influenzae* a través de los aislamientos que provocan enfermedad. También se describen procedimientos para obtener tales epítopes, tanto sintéticamente como mediante técnicas de ingeniería genética, y conjugados de moléculas que comprenden dichos epítopes con vehículos adecuados, opcionalmente en formulaciones de liposomas.

En un aspecto, la invención proporciona un resto lipopolisacárido aislado de acuerdo con la reivindicación 1.

55 En un aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica para comprender el resto de lipopolisacárido de la invención de la reivindicación 1.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente al resto de lipopolisacárido de la reivindicación 1.

60 En otro aspecto, la invención proporciona el uso de una composición farmacéutica de la invención para la preparación de un medicamento en el tratamiento de una enfermedad provocada por infección con *Haemophilus influenzae*.

65 También se proporciona un glicoconjugado que comprende el resto de lipopolisacárido de la invención, de acuerdo con la reivindicación 18.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para la producción y recogida de un anticuerpo de reactividad cruzada contra *Haemophilus influenzae* que comprende: (a) generar anticuerpos para el resto de lipo-

ES 2 284 681 T3

polisacárido descrito anteriormente, (b) ensayar dichos anticuerpos contra una pluralidad de cepas de *Haemophilus influenzae*, y (c) seleccionar aquellos anticuerpos que son de reactividad cruzada.

5 La presente invención también proporciona cepas de *Haemophilus influenzae* Rd lic1lps A y 1003 lic1lpsA, depositadas bajo los números de acceso ISAC 250801-1 e ISAC 250801-2, respectivamente.

En otro aspecto, la invención también proporciona un procedimiento para preparar un resto de lipopolisacárido de acuerdo con la reivindicación 12.

10 La invención también proporciona, en un aspecto adicional, una composición de vacuna que comprende uno o más glicoconjugados de acuerdo con la invención y un adyuvante.

Breve descripción de las figuras

15 La Figura A es un diagrama del resto triheptosilo de núcleo interno conservado de lipopolisacárido de *Haemophilus influenzae*.

La Figura B es una verificación estructural de la forma de alto peso molecular RM 118.

20 La Figura C es un esquema para la conjugación de una vacuna a una proteína vehículo.

Figura 1. Los patrones de migración en gel electroforética después de T-SDS-PAGE de LPS purificado a partir de RM 118 de tipo salvaje y cepas mutadas en genes supuestos de glicosiltransferasa. RM 118 corresponde al LPS de tipo salvaje y los mutantes isogénicos se enumeran mediante el gen de LPS relevante.

25 Figura 2. IEP-EM de ión negativo del LPS O-desacilado del mutante lpsA de RM 118 de *H. influenzae* que muestra iones doble y triplemente cargados de la glicofoma Hex 1 principal (ESTRUCTURA 3).

30 Figura 3. Espectro ¹H RMN del LPS O-desacilado del mutante lpsA de la cepa RM 118 de *H. influenzae* que muestra la región de protón α -anomérico entre 5,0 y 6,0 ppm. Se indican las resonancias anoméricas correspondientes a Hep 3,4-disustituida (HepI), Hep 6-PEtn sustituida (HepII), Hep terminal (HepIII) y α -GlcN fosforilada en la región del Lípido A.

35 Figura 4. Análisis de electroforesis capilar de la actividad de LgtD en la cepa RM 118 de *H. influenzae*. Panel A, Señal 1 es una mezcla de reacción completa que usa el gránulo 100.000 x g de un sonicado como fuente de enzima; la señal 2 es similar a la mezcla de reacción en 1, excepto que no se encuentra UDP-GalNAc; la señal 3 es una mezcla de reacción completa del RM 118 : LgtD mutante; la señal 4 es similar a la señal 3 excepto que no se encuentra UDP-GalNAc. El pico A es una impureza en la preparación de FCHASE-P^k, el pico b es FCHASE-Globotetraosa, el pico c es FCHASE-P^k. El panel B, señal 1 es el producto purificado por TLC a partir de una reacción como se describe para el Panel A señal 1. La señal 2 es el mismo material que la señal 1, pero tratada con β -hexosaminidasa.

40 Figura 5. IEP-EM de ion negativo de la región de ion molecular triplemente cargado del LPS O-desacilado del mutante lgtF de RM 118 de *H. influenzae*. Se indican los picos que aparecen de la Hex 2 (β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glcp), Hex 3 (α -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glcp), y Hex 3-HexNAc (β -D-GalpNAc-(1 \rightarrow 3)- α -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glcp).

45 Figura 6. Una representación esquemática de la estructura de LPS de la cepa RM 118 de *H. influenzae* basándose en los resultados del análisis de Risberg y col., (16). Se muestra el sitio propuesto de acción en la biosíntesis de LPS de los loci caracterizados en este estudio, unidos por flechas al enlace sacárido relevante. Los loci de fase variable están subrayados. Representado en la estructura de LPS: KDO, ácido 2-ceto-3-desoxioctulosónico; Hep, L-glicero-D-mano-heptosa; Glc, D-glucosa; Gal, D-galactosa, GalNAc, N-acetilgalactosamina; PEtn, fosfoetanolamina; P, fosfato; Pcho, fosfocolina. Para los restos de heptosa, enumerados de arriba abajo son heptosa I, heptosa II después heptosa III.

55 Figura 7. Genes implicados en la extensión de cadena del núcleo interno de LPS de la cepa Rd⁻ de *H. influenzae*. Los genes orf3 y lic2b en el locus lic2 controlan la extensión de la cadena desde Hep II en las cepas de tipo b: estos genes no se encuentran en la cepa Rd⁻. Lic1 controla la incorporación de PCho.

60 Figura 8. Parte del espectro de IEP-EM de ión negativo del LPS O-desacilado de la cepa 486 de NTHi. Se indican las composiciones propuestas de las glicofomas principales. Los aductos con sodio se indican mediante un asterisco (*).

Figura 9. Estructura de la principal glicofoma de LPS Hex1 observada en NTHi 285.

65 Figura 10. Estructura tentativa de la principal glicofoma de LPS en NTHi 1158.

Figura 11. El cromatograma en Biogel P-4 de LPS (100 mg) de NTHi 176 después de la hidrólisis ácida suave. Se indican Fr.1 (1 mg), Fr.2 (10 mg) y Fr.3 (6,4 mg).

Figura 12. Espectro de ^1H RMN a 270 MHz de Fr.2 derivado de NTHi 176 (a) y Fr.3 (b).

Figura 13. Partes del espectro de 2D NOESY a 500 MHz de Fr.2 de NTHi 176.

5 Figura 14. Estructuras de oligosacáridos derivados de NTHi 176 LPS.

Figura 15. Estructura de la glicofoma de LPS que contiene NeuAc principal de NTHi 486.

Descripción detallada de la invención

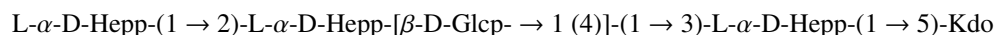
10

El lipopolisacárido (LPS) es un antígeno de superficie expuesta esencial y característico de *H. influenzae*. (Como se ha descrito anteriormente, los términos lipopolisacárido y LPS como se usan en esta memoria descriptiva abarcan lipopolisacárido de cadena corta y lipooligosacárido (LOS)). Las cepas de *H. influenzae* expresan poblaciones heterogéneas de LPS de bajo peso molecular que puede mostrar diversidad antigénica extensiva entre múltiples epítopes de oligosacárido. Las estructuras de carbohidratos de LPS de *H. influenzae* descritas por el solicitante en esta memoria descriptiva pueden proporcionar una fuente de antígenos protectores cuando se presentan al sistema inmune humano de una manera apropiada, por ejemplo, como un conjugado de proteína o en una formulación de liposomas. Los anticuerpos contra ciertos LPS de NTHi han mostrado actividad bactericida *in vitro* (Sun y col., Vaccine 18: 1264-1272). Un estudio reciente (Gu y col., patente de Estados Unidos N° 6.207.157 ha indicado que la inmunización con conjugados a base de LPS puede reducir la incidencia de otitis media inducida por NTHi debida a una cepa homóloga en un modelo animal. El LPS probó utilidad como un candidato de vacuna en el estudio de los solicitantes, sorprendentemente, porque se identificaron antígenos de carbohidratos expresados en superficie que poseen epítopes de oligosacáridos que son genética y fisiológicamente estables, que se conservan a través de una gama de cepas clínicamente relevantes, y que son accesibles para los mecanismos de eliminación de huésped.

25

Las regiones carbohidrato de las moléculas de LPS de *H. influenzae* proporcionan dianas para el reconocimiento por las respuestas inmunes de huésped. La expresión de ciertos epítopes de oligosacáridos se sabe que contribuyen a la patogénesis de infecciones por *H. influenzae*. La determinación de la estructura es crucial para entender la biología de LPS de *H. influenzae* y su papel en la virulencia bacteriana. Los LPs de *H. influenzae* comprenden una mezcla heterogénea de moléculas que constan de un resto oligosacárido variable y un componente del Lípido A que se ancla a la membrana (Zamze, S. E., y Moxon, E. R. (1987) J. Gen. Microbiol. 133, 1443-14511). Basándose en los experimentos descritos en esta memoria descriptiva, se desarrolló un modelo estructural para LPS de *Haemophilus* constituido por 3 restos de núcleo interno triheptosilo conservado que se une mediante un resto cetodesoxioctonato fosforilado a un componente de Lípido A. En todas las cepas investigadas por el solicitante hasta la fecha este resto triheptosilo consta del siguiente elemento estructural.

30



40

Adicionalmente, en cada cepa investigada por el solicitante hasta la fecha, el resto heptosa unido en 1,2 (Hep II) está sustituido con un resto fosfoetanolamina en la posición 6.

45

Cada uno de los restos heptosa dentro de la región del núcleo interno puede proporcionar un sitio para la elongación por las cadenas de oligosacáridos que contienen hexosa o para la unión de sustituyentes no carbohidrato. Los datos publicados (H. Masoud y col., Biochem. 36: 2091-2103, 1997; Risberg y col., Eur. J. Biochem. 261: 171-180, 1999) indican que el resto heptosa distal (Hep III) en este resto de núcleo interno conservado puede estar sustituido con un resto $\beta\text{-D-Glcp}$ o $\beta\text{-D-Galp}$ en la posición O-2. Son también posibles las sustituciones en Hep II, específicamente con una $\alpha\text{-D-Glucosa}$ o una $\alpha\text{-D-Glucosa}$ sustituida en la posición 3. El resto $\beta\text{-D-glucosa}$ que está 1,4 unido al resto heptosa proximal (Hep I) puede él mismo estar además sustituido con una $\beta\text{-D-glucosa}$, una $\beta\text{-D-galactosa}$, una heptosa (incluyendo L-glicero-D-mano-heptosa y D-glicero-D-mano-heptosa), o los oligosacáridos de las mismas. Adicionalmente a estos restos de azúcar, las extensiones de la cadena de oligosacárido pueden comprender $\beta\text{-D-galactosa}$, $\beta\text{-D-glucosamina}$, $\beta\text{-D-galactosamina}$, y ácido 5-N-acetilneuramínico (ácido siálico).

50

55

El grado de sustitución, y extensión de cadena del resto triheptosilo varía dentro y entre las cepas (Masoud, H., Moxon, E. R., Martín, A., Krajcarski, D., y Richards, J. C. (1996) Biochem. 36, 2091-2103; Risberg, A., Masoud, H., Martín, A., Moxon, E. R., y Schweda, E. K. H. (1999)(1999) Eur. J. Biochem. 261, 171-180). Los sustituyentes que contienen fosfato que incluyen grupos fosfato libre (P), fosfoetanolamina (PEtn), pirofosfoetanolamina (PPEtn), y fosfocolina (PCHO) contribuyen a la variabilidad estructural de estas moléculas. Además, los sustituyentes éster (incluyendo O-acetilo y O-glicilo) también contribuyen a la variabilidad estructural de LPS. Son posibles otras modificaciones de LPS tales como la adición de restos de ácido siálico. Los oligosacáridos sialilados se encuentran comúnmente en el tejido de mamíferos y esta modificación se cree que mejora el mimetismo de las estructuras de tejido humano.

60

65

Los estudios estructurales detallados de LPS de mutantes definidos de la cepa RM 7004 de tipo b (Scheweda, E. K. M., Hegedus, O. E., Borrell, S., Lindberg, A. A., Weiser, J. W., Makell, D. J., y Moxon, E. R. (1993) Carbohydr. Res. 246, 319-330; Scheweda, E. K. H., Jansson, P. E., Moxon, E. R., y Lindberg, A. A. (1995) Carbohydr. Res. 272, 213-224), variantes transformadas de la cepa RM 118 derivada del tipo d (Risberg, A., Scheweda, E. K. H., y Jansson, P. E. (1997) Eur. J. Biochem. 243, 701-707; Risberg, A., Alvelius, G., y Scheweda, E. K. H. (1999) Eur. J. Biochem.

265, 1067-1074), y mutantes transposones de la cepa a2 del tipo b (Phillips, N. J., McLaughlin, R., Miller, T. J., Apicella, M. A. y Gibson, B. W. (1996) *Biochem. 35*, 5937-5947) proporcionan evidencia adicional para la presencia de un resto de núcleo interno trisacárido que contiene heptosa en LPS de *H. influenzae*. Se ha enseñado previamente (Risberg y col., *Eur. J. Biochem. 261*: 171-180, 1999) la estructura de un LPS de la cepa RM 118 de *H. influenzae* que contiene globotetraosa (β -D-GalpNAc-(1 \rightarrow 3)- α -D-galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glcp) (Risberg, A., Masoud, H., Martín A., Richards, J. C., Moxon, E. R. y Scheweda, E. K. H. (1999) *Eur. J. Biochem. 261*, 171-180), la cepa (Rd) para la que se ha determinado la secuencia del genoma completa (Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O., Clayton, R. A., Kirkness, E. F., Kerlavage; A. R., Butt, C.J., Tomb, J-F., Dogherty, B. A., Merrick, J. M., McKenney, K., Sutton, G., Fitzhugh, W., Fields, C., Gocayne, J. D., Scott, J. Shirley, R., Liu, L-I., Glodek, A., Kelley, J. M., Weidman, J. F., Phillips, C. A., Spriggs, T., Hedblom, E., Cotton, M. D., Utterback, T. R., Hanna, M. C., Nguyen, D. T., Saudek, D. M., Brandon, R. C., Fine, L. D., Fritcman, J. L., Fuhrmann, J. L., Geoghagen, N. S. M., Gnhem, C. L., McDonald, L. A., Small, K. V., Fraser, C. M., Smith, H. C., y venter, J. C. (1995) *Science 269*, 496-512). En este estudio, se identificaron tres poblaciones principales de glicofomas de LPS, conteniendo todas un grupo PCho \rightarrow 6)- β -D-Glcp fuera de la Hep unida al resto Kdo (Hep I), pero diferenciándose en la longitud de las cadenas de oligosacáridos fuera de la Hep distal (Hep III) del elemento del núcleo interno. Además de las glicofomas de LPS que expresan una cadena lateral de globotetraosa totalmente unida, glicofomas secuencialmente truncadas que contienen globósido (α -D-galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glcp) y lactosa (β -D-galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glcp) se han caracterizado (Risberg, A., H., Martín, A., Richards, J. C., Moxon, E. R., y Schweda, E. K. H. (1999) *Eur. J. Biochem. 261*, 171-180).

20 La disponibilidad de la secuencia del genoma completa de la cepa Rd de *H. influenzae* facilitaba un estudio comprensivo de los loci múltiples biosintéticos de LPS en cepas Hi representativas.

Las cepas no tipificables se obtuvieron del Prof. estola como parte de un estudio de cohorte de otitis media finlandesa y se obtienen aislados principalmente del oído interno de niños. Estas cepas se describen adicionalmente en D. W. Hood y col., *Mol. Microbiol. 33*: 679-792, 1999. Se enviaron cepas de otitis media de 102 NTHi a Richard Goldstein en Boston a incluir en una inspección de la diversidad de sobre 600 cepas capsulazas de *H. influenzae* y de NTHi, obtenidas de alrededor del mundo y durante un período de 35 años, mediante análisis de ribotipificación. Cuando se dibujó un dendrograma a partir de los resultados del ribotipificado, los aislados de otitis media de NTHi se encontraron que estaban presentes en casi todas las ramas obtenidas. Las 25 cepas representativas se seleccionaron entre ramas que se extienden sobre el dendrograma y de este modo representan la diversidad conocida asociada a la especie de *H. influenzae*. Se incluyen en las 25 cepas algunas seleccionadas entre el mismo racimo que permite una determinación de la diversidad de los aislamientos estrechamente relacionados.

35 Muchas funciones de genes predichas estaban correlacionadas con las etapas particulares en la síntesis del LPS mediante análisis de la estructura de LPS de las cepas mutantes apropiadas (Hood, D. W., Deadman, M. E., Allen, T., Masoud, H., Martín, A., Brisson, J. R., Fleischmann, R., Venter, J. C., Richards, J. C., y Moxon, E. R. (1996) *Mol. Microbiol. 22*, 951-965). La base genética para la expresión de la estructura de globotetraosa no se ha reseñado previamente.

40 Como se describe en un ejemplo, el solicitante empleó una estrategia de huella estructural para determinar y comparar las estructuras de LPS obtenidas de una serie de mutantes definidos en los genes biosintéticos de LPS en la cepa RM 118 de *H. influenzae*. (Para una descripción de la cepa RM 118, véase Risberg y col., 1999, *supra*.) Mediante el examen de LPS de las cepas en las que están activados genes específicos, el solicitante presenta la evidencia definitiva que conduce a la identificación de las glicosiltransferasas implicadas en la biosíntesis de la región del núcleo interno de la molécula de LPS. El solicitante también ha identificado los genes implicados en el conjunto de la cadena lateral de lactosa dializada, como se describe adicionalmente más adelante. Además, las funciones transferasa de los genes implicados en la adición de Neu5Ac α -2,3 unida (lic3A), α -1,4-unida Galp (lgtC) y β -1,3-unida-GalpNAc (lgtD) proporcionando las estructuras de globotriosa y globotetraosa, respectivamente, se determinaron de manera ambigua mediante ensayos enzimáticos con aceptores sintéticos. esto es el primer estudio para identificar un plan detallado genético para la biosíntesis de un resto de oligosacárido de LPS para una cepa de *H. influenzae*.

En la investigación del inventor del núcleo interno de LPS de *H. influenzae*, intentos para eliminar Kdo, el primer azúcar añadido al Lípido A, han fracasado repetidamente presumiblemente ya que Kdo se requiere para completar la síntesis del Lípido A y de esta manera probablemente esencial para la viabilidad celular. La función de Kdo transferasa de kdtA se ha demostrado mediante experimentos de complementación en *E. coli* (White, K. A., y Raetz, C. R. H. (1998) *FASEB J. 12*, L44). Los estudios del solicitante indican que opsx, rfaF y orfH son los genes que codifican las enzimas que añaden la primera, segunda y tercera heptosas (Hep I, Hep II, y Hep III), respectivamente, al Kdo para formar el núcleo interno. OpsX tiene alguna homología a las heptosil transferasas de las bacterias entéricas (Hood, D. W., Deadman, M. E., Allen, T., Masoud, H., Martín, A., Brisson, J. R., Fleischmann, R., venter, J. C., Richards, J. C., y Moxon, E. R., (1996) *Mol. Microbiol. 22*, 951-965) y corresponde a un gen responsable de la adición de Hep I a kdo. El rfaF mutante tiene un gen opsx funcional y su LPS tiene una sola Hep unida a Kdo-Lípido A. El gen rfaF de RM 118 (Rd) tiene homología a otras heptosil transferasas (Allen, A. G., Isobe, T., y Maskell, D. J., (1998) *J. bacterial. 180*, 35-40). LPS de RM 118 orfH que tiene genes opsx y rfaA funcionales comprenden estructuras que contienen dos restos heptosa (estructuras 1 y 2). Los datos en análisis estructurales de LPS de los mutantes RM 118 opsx, rfaF, y orfH es consistente con los obtenidos con las mismas mutaciones en las cepas RM 153 de tipo b (también conocidas como cepa Eagan) y RM 7004 (Hood, D. W., Deadman, M. E., Allen, T., Masoud, H., Martín, A., Brisson, J. R., Fleischmann, R., Venter, J. C., Richards, J. C. y Moxon, E. R. *Mol. Microbiol. 22*, 951-965). En las cepas de tipo b opsx, rfaF y orfH se proponen como los genes que codifican las Hep I, Hep II y Hep III transferasas respectivamente.

El solicitante ha mostrado que LPS de *H. influenzae* tiene el resto del núcleo interno de triheptosilo anteriormente mencionado en el que cada resto heptosa proporciona un punto para la elongación por las cadenas de oligosacáridos (Masoud, H., Moxon, E. R., Martín, A., Richards, A., Krajcarski, D., y Richards, J. C. (1996) *Biochem.* 36, 2091-2103; Risberg, A., Masoud, H., Martín, A., Richards, J. C., Moxon, E. R. y Schweda, E. K. H. (1999) *Eur. J. Biochem.* 261, 171-180). Cada uno de los genes *IpsA*, *lic2A*, *lic3A*, *IgtC*, *IgtD* e *IgtF* codifican las enzimas glicosiltransferasa en al elongación de oligosacáridos.

Los resultados indican que el producto génico *IpsA* juega un papel en el control de la extensión de la cadena de oligosacáridos desde Hep III. Una mutación en el gen *IpsA* produce un LPS truncado en el que Hep III está desprovista de extensiones de la cadena de oligosacáridos. El análisis de IEP-EM de LPS O-desacilado derivado de RM 118AlpSA indicaba una glicofoma que contiene Pcho que contiene un solo resto hexosa como la especie principal de LPS (Estructura 2), confirmando que Hep I puede estar sustituida en la ausencia de la extensión de hexosa desde hep III. Los mutantes *lic2A*, *IgtC* y *IgtD* que contienen un gen *IpsA* funcional son capaces de añadir un resto β -D-Glcp en un enlace 1,2 para iniciar la extensión de la cadena desde Hep III (tabla 4). *IpsA* es un homólogo del gen que codifica una glicosiltransferasa en *Pasteurella haemolytica* (Potter, M. D. y Lo, R. Y. (1995) *FEMS Microbiol. Lett.* 129, 75-81), cuya proteína tiene homología con el grupo de galactosiltransferasas tipificadas por *Lic2A* y *LgtB* de *Haemophilus* y *Neisseria* respectivamente. en la cepa RM 153, también se encontró que LPS de un mutante *IpsA* carecía de cualquier extensión de cadena desde la tercera heptosa (Hood, D. W., Deadman, M. E., Allen, T., Masoud, H., Martín, A., Brisson, J. R., Fleischmann, R., Venter, J. C., Richards, J. C., y Moxon, E. R. (1996) *Mol. Microbiol.* 22, 951-965). Además, el solicitante ha confirmado que los mutantes de *IpsA* en varias cepas de NTHi carecen de extensiones de cadenas desde Hep III. De este modo, *IpsA* es la transferasa para la adición del primer azúcar a Hep III en la biosíntesis de LPS de *H. influenzae*.

Los mutantes RM 118*lic2A* mostraban una glicofoma de hex 2 que contiene Pcho como una especie de LPS principal (estructura 4) y RM 118 *IgtC*, que contiene un gen *lic2A* funcional, elabora LPS que contiene una cadena lateral de lactosa en Hep III (estructura 5). Esto es consistente con la implicación del gen *lic2A* para añadir la unidad β -D-galp en un enlace 1,4 al resto terminal β -D-Glcp unido a hep III. Los homólogos de *Lic2A* en las cepas de tipo b RM 153 y RM 7004 se ha mostrado que están implicadas en la expresión del epítipo p^k que contienen digalactósido (el globósido trisacárido que tiene la estructura α -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glcp). El papel de *lic2A*, en la expresión de fase variable de este epítipo se ha demostrado previamente (High, N. J., Deadman, M. E., y Moxon, E. R. (1993) *Mol. Microbiol.* 9, 1275-1282). Las comparaciones de homología con otras secuencias del banco de datos apoyan la función de *Lic2A* como una β -galactosiltransferasa. De manera importante tiene una homología significativa con las proteínas *LgtB* y *LgtE* de *Neisseria*, ambas son galactosil transferasas (Wakarchuk, W. Martín, A., Jennings, M. P., Moxon, E. R., y Richards, J. C. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 19166-1917).

El análisis estructural de LPS de una cepa RM 118, mutada en *IgtC*, confirmó la pérdida de α -D-galp que soporta la función α -galactosil transferasa para este gen. Un homólogo de este gen en *N. meningitidis* se ha demostrado que es una α -galactosil transferasa (Gotschlich, E. C. (1994) *J. Exp. Med.* 180, 2181-2190; White, K. A., y Raetz, C. R. H. (1998) *FASEB J.* 12, L44; Wakarchuk, W. W., Cunningham, A. M., Watson, D. C. y Young, N. M. 1998. El papel de los residuos básicos pareados en al expresión de galactosiltransferasas recombinantes activas del patógeno bacteriano *Neisseria meningitidis*. *Protein Eng.* 11: 295-302; Wakarchuk y col., 1998, *Protein Engineering*) *IgtC* de *H. influenzae* tiene una repetición de tetranucleótidos asociada (5'-GACA-3') justo dentro del extremo 5' y el marco de lectura (44) y / por lo tanto contribuye al fenotipo variable del oligosacárido en RN 118 LPS. Correspondientemente, el mutante *IgtD* y la cepa precursora que contienen un gen *IgtC* funcional son capaces de añadir un α -D-Galp en un enlace 1,4 al β -D-galp terminal del epítipo de lactosa (Estructura 6). La función de *LgtC* se confirmó mediante la demostración de la actividad α -galactosiltransferasa con la proteína *LgtC* recombinante y un aceptor FCHASE-Lac sintético. De esto se deduce que el gen *IgtC* codifica la α -galactosiltransferasa específica para la síntesis del α -D-galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-galp de la glicofoma de LPS RM 118 Hex4 (Figura 6).

El gen *IgtD* de *H. influenzae* es un homólogo de dos genes de *Neisseria*, *IgtA* y *IgtD*, que añaden GlcNAc y GalNAc respectivamente LPS de *N. gonorrhoeae* (Gotschlich, E. C. (1994) *J. Exp. Med.* 180, 2181-2190). El producto génico *IgtA* ha demostrado que es una glicosil transferasa en *N. meningitidis* (Wakarchuk, W., Martín, A., Jennings, M. P., Moxon, E. R., y Richards, J. C. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 19166-1917). Existe una homología significativa entre los genes *IgtA* y *IgtD* de *Neisseria* y la mejor coincidencia de las bases de datos de RM 118 HI1578 es al gen *IgtD* de *N. gonorrhoeae*. Los ensayos de enzimas con extractos de RM 118 y el mutante *IgtD* de RM118 establecía la presencia de la actividad de la β -D-galpNAc transferasa. La cepa precursora RM 118 que contiene un gen *IgtD* funcional es capaz de elaboración de la unidad globotetraosa completa que es indicativa de su papel en la adición de β -D-GalpNAc terminal. El gen *IgtD* se ha investigado previamente (llamado *IgtA* en 6) y se encontró que no estaba presente en las cepas de tipo b RM 153 y RM 7004. Correspondientemente, el LPS elaborado por la cepa RM 153 no contiene un resto GalNAc (Masoud, H., Moxon, E. R., Martín, A., Krajcarski, D., y Richards, J. C. (1996) *Biochem.* 36, 2091-2103). Muchas cepas de NTHi se ha encontrado que contienen el gen *LgtD* y las cadenas laterales del oligosacárido de LPS de estas cepas se ha encontrado que contienen un resto GalNAc.

Es digno de mención que, mientras las actividades de glicosiltransferasa codificadas por los genes que implican la adición de los restos distales de las cadenas laterales de oligosacáridos globotetraosa (*IgtD*) y globósido se puede confirmar en un ensayo enzimático con el aceptor sintético apropiado, los experimentos para ensayar la actividad transferasa de los genes implicados en al síntesis del resto lactosa (*lic2A* y *IpsA*) no tenían éxito. Es probable que las dos últimas enzimas tengan más especificidades rigurosas que requieren que el aceptor de azúcar esté unido a los

restos heptosa del núcleo interno, evitando con lo cual el reconocimiento de los aceptores FHASE-glicósido sintético sencillo.

5 La caracterización del conjunto inicial de genes y cepas mutantes disponibles para el estudio de la biosíntesis de LPS de RM 118 no proporcionó candidato obvio responsable para la adición de la unidad -D-GGlc para Hep I. Los genes de LPS candidatos adicionales se investigaron investigando la secuencia del genoma de la cepa Rd para coincidencias de baja homología a los genes que añaden azúcares hexosa a los restos heptosa en el LPS de otros organismos. Las secuencias de investigación incluyen los genes rtaK e IgtF de *Neisseria*, los genes implicados en la adición de restos hexosa a heptosa (Kahler, C. M., Carlson, R. W., Rahman, M. M., Martín, L. E. y Stephens, D. S., (1996). *J. Bacteriol.* 178, 6677-6684). Se identificó un homólogo IgtF en la cepa RM 118 y análisis del LPS de la cepa mutada en este gen era indicativo del papel de LgtF en la extensión de cadena a partir de Hep I. El IEP-EM mostró 10 iones moleculares correspondientes a una mezcla de glicofomas que tienen extensiones de cadena a partir de Hep III de un resto del núcleo interno de triheptosilo, que carece de PCho → 6)-β-D-Glcp en Hep I (Fig. 3).

15 Los genes IgtF e IpsA son claves para las extensiones de hexosa a partir de la unidad del núcleo interno que contiene heptosa de LPS de RM 118, que codifican las enzimas glicosil transferasa responsables de la adición de la primera glucosa a Hep I y Hep III, respectivamente. Los procedimientos de extensión de cadena a partir de tanto Hep I como Hep III parece ser independiente en gran medida en el LPS de la cepa RM 118. La cepa mutante RM 118 lpsA produce LPS que incluye el resto β-D-Glcp de Hep I. La cepa RM 118 IgtF produce un LPS heterogéneo que 20 contiene extensiones de oligosacárido a partir de Hep III que incluyen cadenas lactosa y globotetrosa. En la cepa RM 153, lpsA aparentemente juega un papel ligeramente diferente siendo responsable de la adición de galactosa como la única extensión a partir de la tercera heptosa (Hood, D-W., Deadman, M. E., Allen, T., Masoud, H., Martín, A., Brisson, C. R., Fleischmann, R., Venter, J. C., Richards, J. C., y Moxon, E. R. (1996) *Mol. Microbiol.* 22, 951-965). Sorprendentemente, se determinó que en ciertas cepas no tipificables, lpsA puede añadir o bien glucosa o galactosa en 25 la posición O-3 en lugar de la posición O-2.

La heterogeneidad de la estructura de LPS de *H. influenzae* puede ser debida en parte a la variación intrínseca en la biosíntesis de tal estructura compleja mediante la que no se sintetizará ninguna molécula hasta la finalización. Sin embargo, la mayoría de la variación observada parece ser debida a los genes biosintéticos de LPs específicos capaces 30 de la expresión variable (variación de fase). El análisis estructural de LPS derivado de las cepas de RM 118 de tipo salvaje y mutante han permitido a los inventores por primera vez confirmar los genes implicados en la síntesis de un epítipo variable de fase importante de LPS de *H. influenzae*, el digalactósido. En la cepa RM 118, Lic2A añade el β-D-Galp proximal y LgtC el α-D-Galp terminal al digalactósido (α-D-galp-(1 → 4)-β-D-Galp) como parte de la extensión de oligosacárido a partir de Hep III mientras que el mismo epítipo se expresa como la extensión terminal 35 a partir de la segunda heptosa en la cepa RM 118 de tipo b (Masoud, H., Moxon, E. R., Martín, A., Krajcarski, D., y Richards, J. C. (1996) *Biochem.* 36, 2091-2103). Tanto lic2A como lgtC son genes de fase variable, haciendo la expresión del epítipo altamente variable dentro y entre organismos. El epítipo digalactósido se expresa en el LPS de muchas de las cepas de NTHi descritas en la presente invención así como en las bacterias relacionadas, incluyendo *Neisseria* (Virji, M., Weiser, J. N., Lindberg, A. A., y Moxon, E. R., (1990) *Microb. Pathogen.* 9, 441-450). El epítipo es potencialmente inmunodominante y es de interés en la patogénesis ya que su presencia ofrece el potencial para el mimetismo de estructuras de huéspedes y pueden influenciar la supervivencia de *Haemophilus influenzae* con sistemas experimentales (Weiser, J. N., y Pan, N. (1998) *Mol. Microbiol.* 30, 767-775; Hood, D. W., Deadman, M. E., Jennings, M. P., Bisceric, M., Fleischmann, R. D., Venter, J. C., y Moxon, E. R. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 11121- 40 11125).

45 La sialilación de oligosacáridos es una modificación que se cree que mejora el mimetismo de estructuras de tejidos humanos, ya que, los oligosacáridos dializados se encuentran comúnmente en tejido de mamíferos. Como se describe en los ejemplos, el solicitante ha identificado LPS dializado en las cepas 375, 486 y la cepa RD de NTHi, induciendo un papel para lic3A en la síntesis de LPS (D. W. Hood y col., *Mol. Microbiol.* 39: 341-350, 2001). Una inspección de 50 25 cepas de NTHi representativas de la diversidad de las extensiones de cadenas de oligosacáridos de LPS dializados de especies identificadas en todas menos en una. La mutación de lic3A en algunas cepas de NTHi, tal como NTHi 486, se ha demostrado que tiene una influencia principal en la resistencia al efecto de muerte del suero humano normal. Una comparación de las estructuras de LPS de NTHi 486 y su lic3A y su mutante lic3A reveló la presencia de glicofomas dializadas (sialilo-lactosa) solamente en la cepa precursora, que apunta a la importancia de Lic3A para la resistencia 55 en suero en esta cepa. La adición del resto de ácido siálico cargado a LPS en *Haemophilus influenzae* parece modular el mimetismo antigénico de los epítipos de LPS.

Además del orden y estereoquímica de los restos azúcar que constituyen la parte oligosacárido de las moléculas de LPS, localización, tipo y frecuencia de sustituyentes tales como P, PEtn y PCho pueden tener un efecto profundo en al 60 estructura y la función biológica. El locus licl se ha mostrado que es esencial para la adición en fase variable de PCho a la molécula de LPs de *H. influenzae* (Weiser, J. N., Shchepetov, M., y Chong, S. T. H. (1997) *Infect. Immun.* 65, 943-950; Lysenko, E., Richards, J. C., Cox, A. D., Stewart, A., Martín, A., Kapoor, M., y Weiser, J. N. (2000) *Mol. Microbiol.* 35, 234-245). Se ha demostrado que PCho contribuye a la resistencia de *H. influenzae* para la inmunidad humoral innata (Weiser, J. N., y Pan, N. (1998) *Mol. Microbiol.* 30, 767-775; Lysenko, E., Richards, J. C., Cox, A. D., Stewart, A., Martín, A., Kapoor, M., y Weiser, J. N. (2000) *Mol. Microbiol.* 35, 234-245). Se ha identificado el gen que codifica una Kdo quinasa, kdkA, responsable de la fosforilación de Kdo (White, K. A., Lin, S., Cotter, R. J., y Raetz, C. H. R. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 31391-31400). Este gen se ha investigado previamente por el solicitante como orfZ y cuando muta se mostró que altera la supervivencia bacteriana en un modelo de rata infantil de 65

infección (Hood, D. W., Deadman, M. E., Allen, T., Masoud, H., Martín, A., Brisson, J. R., Fleischmann, R., Venter, J. C., Richards, J. C., y Moxon, E. R. (1996) Mol. Microbiol. 22, 952-965). Los únicos sustituyentes restantes en el oligosacárido del núcleo, cuyo control genético permanece desconocido, por lo tanto, son los residuos de PEtn que están unidos a la posición 6 del resto Hep II estequiométricamente y algunas veces al grupo fosfato en Kdo.

5

En resumen, se ha aclarado el plan detallado para la síntesis completa de las extensiones de cadena del oligosacárido principal de *Haemophilus influenzae*.

El solicitante ha investigado en exceso 25 cepas representativas de la diversidad conocida de *Haemophilus influenzae*. El solicitante ha confirmado que el resto del núcleo interno de triheptosilo de LPS (Hep I-Hep III marcadas) se conserva en todas las cepas ensayadas. Esta determinación permite la síntesis de oligosacáridos adecuados del resto del núcleo interno de LPS para uso en la preparación de vacunas que producen protección de amplio espectro contra principal de *Haemophilus influenzae*, incluyendo NTHi. También permite la selección y modificación de cepas de principal de *Haemophilus influenzae* que sintetizan los oligosacáridos adecuados del resto del núcleo interno de LPS para uso en la preparación de vacunas.

15

La tabla 1 resume los genes implicados en la biosíntesis de los principales oligosacáridos que contienen globotetraosa de LPS en *H. influenzae* Rd que se han identificado. El solicitante ha identificado los genes que son responsables para la extensión de cadena a partir de Hep I (IgtF) y Hep III (IpsA). Además, algunas cepas de *Haemophilus influenzae* (por ejemplo, Eagan y RM 7004) elaboran LPS que pueden mostrar extensión de cadena a partir de Hep II. El solicitante ha mostrado que un gen en el locus lic2 (orf3) inicia la extensión de cadena a partir de Hep II. La expresión diferencial de estos genes puede conducir a un número de epítopes de oligosacáridos variables que emanan del resto del núcleo interno de triheptosilo conservado. Mediante mutaciones definidas en estos genes, el solicitante puede controlar no solamente el grado de complejidad que una cepa particular de *Haemophilus influenzae* expresa, sino también los epítopes disponibles sobre la región central del LPS. De este modo, LPS de cepas de *H. influenzae* con mutaciones definidas en su maquinaria biosintética proporcionó candidatos adecuados para desarrollar una vacuna de amplio espectro a base de LPS. El solicitante ha determinado que esta estrategia es útil para el diseño de vacunas debido a que proporciona reactividad cruzada contra una diversidad de cepas patogénicas de *Haemophilus influenzae*, incluyendo cepas no tipificables que han mostrado hasta ahora tal variabilidad de LPS ya que desalientan en el desarrollo de vacunas.

30

La variación en los patrones de sustitución en Hep II y Hep III en el núcleo interno de triheptosilo conduce a epítopes de oligosacáridos del núcleo interno alternativos. Los siguientes son ejemplos de sustituciones y modificaciones de la región central interna de LPS de *Haemophilus influenzae* que ilustran la invención. Estas no se pretenden que sean limitantes y los expertos en la técnica apreciarán que otras sustituciones y modificaciones son posibles manteniendo las enseñanzas de la invención.

35

Basándose en el análisis genómico y genotípico de LPS de una colección de cepas de NTHi, el solicitante ha identificado, al mismo tiempo, cepas de *Haemophilus influenzae* que expresan LPS con una estructura del núcleo interno alternativa en la que se produce la extensión de cadena a partir de O-3 de Hep III en lugar de O-2. Los genes IpsA homólogos median la adición específica de β -D-Gal o β -D-Glc a la posición O-2 u O-3 de Hep III dependiendo de la cepa. Además, algunas cepas de *Haemophilus influenzae* expresan LPS, en el que Hep III no está sustituida por cadenas de oligosacáridos. Estos hallazgos se detallan en los ejemplos.

40

Los resultados de los ejemplos confirman la presencia de un elemento del núcleo interno conservado en NTHi. Estos resultados también proporcionan al mismo tiempo evidencia para un nuevo motivo estructural, a saber un sitio de sustitución alternativo en Hep III. La Hep III se ha encontrado anteriormente que está sustituida por restos hexosa en la posición O-2, y esto se ha encontrado que es el caso en NTHi, por ejemplo en las cepas 285 y 1158. En otras cepas de NTHi, por ejemplo 175 y 486, este patrón de sustitución no se observa. En su lugar, se produce sustitución en al posición O-3 de Hep III. Sorprendentemente, se ha mostrado que el gen IpsA puede añadir un β -D-Glcp en algunas cepas (la cepa RD, Fig. 1) o un β -D-Galp en otras (tipo b, por ejemplo la cepa Eagan) en un enlace 1,2 para iniciar la extensión de cadena a partir de Hep III. El solicitante ha encontrado que un homólogo de IpsA es responsable de la adición de un resto β -D-Glcp o un resto β -D-galp en un enlace 1,3 a Hep III.

45

50

Otra modificación útil de la región del núcleo interno se refiere al epítopo PCho. Esta es una característica común en las estructuras de superficie de patógenos que residen en el tracto respiratorio humano incluyendo *H. influenzae*. En la cepa de *H. influenzae* Rd, PCho está unido a O-6 de un resto terminal β -D-Glcp en Hep I (estructura 1; $R_1 = \text{PCho} \rightarrow 6\text{-}\beta\text{-D-Glcp}$; Fig. 1). En otras cepas de *H. influenzae*, por ejemplo la cepa Eagan de tipo b, PCho se une a O-6 de un resto β -D-Galp terminal en Hep III. (Estructura 1; $R_3 = \text{PCho} \rightarrow 6\text{-}\beta\text{-D-Galp}$) (E. K. H. Schweda y col., Eur. J. Biochem., 267 (2000) 3902-3913). Ambos patrones de sustituciones se han encontrado en las cepas de NTHi. Además, PCho se ha encontrado en el resto α -D-Glcp terminal. (Estructura 1, $R_2 = \text{PCho} \rightarrow 6\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}$). La expresión y variación de fase del epítopo PCho en el LPS de *H. influenzae* requieren los cuatro genes del locus lic1 (J. N. Weiser y col., Infect. Immun., 65 (1997) 943-950). Estos genes se han encontrado en cada cepa de NTHi investigada. El solicitante ha determinado que el polimorfismo en el gen licD afecta al sitio en el que se añade el PCho.

55

60

65

La naturaleza del patrón de sustitución al resto del núcleo interno de triheptosilo es relevante a la forma en la que los epítopes del núcleo interno se presentan al sistema inmune y son reconocidos por los anticuerpos monoclonales. Por ejemplo, el solicitante ha encontrado que un anticuerpo monoclonal IgG2a de tipo murino (L6A9) reconoce un

ES 2 284 681 T3

epítipo de oligosacárido del núcleo interno de LPS en cepas que contienen un resto β -D-Galp en O-2 de hep III; pero no cuando el resto β -D-Galp está ausente o unido a la posición O-3. La verificación estructural de la forma de alto peso molecular se muestra en la figura B.

5 Como se ha establecido anteriormente se han identificado los genes biosintéticos claves implicados en la expresión de LPS de *H. influenzae*. Esto proporcionó al solicitante la capacidad de construir de cepas mutantes de *H. influenzae* que comprenden el resto del núcleo interno conservado, pero no extensiones de oligosacáridos que imitan las estructuras de tejidos humanos. Los ejemplos establecen los resultados de este procedimiento.

10 El solicitante ha encontrado que los oligosacáridos que contienen el resto del núcleo interno conservado de triheptosilo de LPS de *H. influenzae* son inmunogénicos cuando se formulan como, por ejemplo, conjugados de proteína, usando procedimientos conocidos por los expertos en la técnica (patente de Gu, anteriormente). Por ejemplo, el solicitante ha mostrado que el de ratones con un conjugado de oligosacárido-proteína constituido por LPS O-desacilado del conjugado de la cepa Rdlic1lpsA de Hi con albúmina sérica bovina (BSA) produce suero inmune que es de reactividad cruzada con una mayoría de muestras de LPS de un conjunto genéticamente diversos de las cepas de NTHi (Tabla 7) la O-desacilación del LPS se logra mediante el uso de hidracina anhidra. esto tiene el efecto de solubilizar el oligosacárido de LPS durante la reacción de conjugación posterior con proteína y conduce a la destoxificación significativa de componente del Lípido A (patente de Gu, anteriormente). El LPS O-desacilado se conjuga mediante el grupo carboxilo del resto Kdo de acuerdo con los procedimientos conocidos por los expertos en la técnica (patente de Gu, anteriormente). Los ratones se proporcionaron con una reinmunización intraperitoneal final con LPS O-desacilado de la cepa 1003lic1lpsA de Hi (véanse los ejemplos) El suero inmune de ratón de este experimento reaccionó con LPs de cepas de NTHi que tienen múltiples extensiones de cadena del núcleo interno.

25 LPS de Rdirc1-lpsA elabora el LPS que es representativo del resto del núcleo interno de triheptosilo conservado, y contiene glicofomas minoritarias que tienen extensiones de cadena de oligosacárido que contienen lacto-N-neotetraosa (LNnT). Esto es evidente a partir de la reactividad con Mab LLA5 (Tabla 8). El conjugado LPS O-desacilado-BSA de Rdlic1lpsA también mostró reactividad con Mab LLA5 así como Mab del núcleo interno, LLA4. La cepa 1003 de NTHi no elabora LPS que tiene cadenas de oligosacáridos que contienen LNnT. El solicitante determinó esto mediante análisis estructural, genético e inmunoquímico. LPS de esta cepa no reacciona con LLA5, no contiene el locus genético rfb (Derek Hood, anteriormente). El doble mutante, 1003lic1lpsA expresa LPS que tiene el resto del núcleo interno conservado sin extensiones de cadena. Es reconocido por Mab LLA4.

30 Lo anterior muestra que el resto del núcleo interno conservado del LPs de *H. influenzae* (que se presenta en Rdlic1lpsA por ejemplo) puede inducir una respuesta inmune que es de reactividad cruzada con LPS de cepas representativas de la diversidad de la bacteria. La lactosa, LNnT y su análogo dializado son estructuras de oligosacáridos que se encuentran en tejidos humanos. Para desarrollar una vacuna basada en LPS, es por lo tanto preferible asegurar que estas extensiones de oligosacáridos no estén presentes en la formulación de vacunas. Los experimentos anteriores proporcionan evidencia que estas extensiones de oligosacáridos son comunes para todas las cepas de *H. influenzae*, y el solicitante ha enseñado la metodología para identificarlas y para construir las cepas sin ellas.

35 Por los mismos medios, otras cepas mutantes de Hi se pueden construir con sustituciones a o modificaciones del resto del núcleo interno de triheptosilo conservado de LPS que da como resultado epítipes que inducen una respuesta inmune de amplio espectro a Hi, incluyendo NTHi, y/o que inducen una respuesta inmune mejorada debido al mimetismo de, o anulación del mimetismo de tejidos animales.

40 Los procedimientos de vacunación para tratar o prevenir la infección en un mamífero comprende el uso de una formulación de vacuna de la invención a administrar mediante cualquier vía convencional, particularmente a una superficie mucosal (por ejemplo, ocular, intranasal, oral, gástrica, pulmonar, intestinal, rectal, vaginal, o trato urinario) o mediante la vía parenteral (por ejemplo, subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa, o intraperitoneal). Las vías preferidas dependen de la elección de la formulación de vacuna. El tratamiento se puede efectuar en una sola dosis o repetida a intervalos. La dosificación apropiada depende de diversos parámetros entendidos por los expertos en la técnica tal como la propia formulación de vacunas, la vía de administración o la condición del mamífero a vacunar (por ejemplo, peso, edad y similares).

55 Se usan técnicas de laboratorio convencionales para preparar y purificar lipopolisacáridos en la preparación de los lipopolisacáridos terapéuticos de la invención. Para uso como una vacuna, un lipopolisacárido de la invención se formula de acuerdo con los diversos procedimientos indicados más adelante.

60 Ya que el componente del lípido A de LPS puede hacerlo tóxico, preferiblemente el inmunógeno de LPS se destoxifica. Aunque el uso de hidracina para la destoxificación de LPS de NTHi se describe en esta memoria descriptiva, el uso de cualquier reactivo o enzima capaz de eliminar los ácidos grasos unidos por éster del Lípido A está dentro del alcance de la presente invención. El LPS seco de la cepa seleccionada de NTHi se suspende en hidracina líquida anhidra a una temperatura de entre 1°C y 100°C; preferiblemente durante un período de aproximadamente 2-3 horas. después de la eliminación de ácidos grasos unidos a éster. dLPS es conjuga a la hidracida del ácido adípico de engarce (ADH) antes de la conjugación a las proteínas vehículo inmunogénicas TT o NTHiHMPs. Aunque ADH es el engarce preferido, se contempla el uso de cualquier engarce capaz de establecer y conjugar de manera eficaz dLPS a una proteína inmunogénica. El uso de engarces se conoce bien en el campo de vacunas conjugadas (véase Dick y col., Conjugate vaccines, J. M. Cruse y R. E. Lewis, Jr., eds., karger, Nueva York, p. 48-114).

dLPS se puede unir de manera covalente directamente al vehículo. Esto se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante el uso del reactivo glutaraldehído de reticulación. Sin embargo, en una realización preferida, dLPS y el vehículo se separan mediante un engarce. La presencia de un engarce promueve la inmunogenicidad óptima del conjugado y acoplamiento más eficaz del dLPS con el vehículo. Los engarces separan los dos componentes antigénicos mediante cadenas cuya longitud y flexibilidad se pueden ajustar según se desee. Entre los sitios bifuncionales, las cadenas pueden contener una diversidad de características estructurales, incluyendo heteroátomos y sitios de escisión. Los engarces también permiten incrementos correspondientes en las características de traslación y rotación de los antígenos, incrementando el acceso de los sitios de unión a los anticuerpos solubles. Además de ADH, los engarces adecuados incluyen, por ejemplo, engarces heterodifuncionales tales como ácido epsilon aminohexanoico, clorohexanol dimetil acetal, D-glucuronolactona y p-nitrofenil amina. Los reactivos de acoplamiento contemplados para uso en la presente invención incluyen hidroxisuccinimidias y carbodiimidias. Muchos otros engarces y reactivos de acoplamiento conocidos por los expertos en la técnica son también adecuados para uso en la invención. Tales compuestos se describen en detalle por Dick y col., anteriormente.

La presencia de un vehículo incrementa la inmunogenicidad del polisacárido. Además, los anticuerpos inducidos contra el vehículo son médicamente beneficiosos. Los vehículos inmunogénicos poliméricos pueden ser material natural o sintético que contienen un grupo amino primario y/o secundario, un grupo azido o un grupo carboxi. el vehículo puede ser soluble en agua o insoluble.

Se puede usar cualquiera de una diversidad de proteínas vehículo inmunogénicas en la vacuna de conjugado de la presente invención. Tales clases de proteínas incluyen pelos, proteínas de la membrana externa y toxinas excretadas de bacterias patógenas, formas no tóxicas o formas "toxoides" de tales toxinas excretadas, proteínas no tóxicas antigénicamente similares a las toxinas bacterianas (materiales de reacción cruzada o CRMs) y otras proteínas. Los ejemplos no limitantes de los toxoides bacterianos contemplados para uso en la presente invención incluyen toxina/toxide de tétanos, toxina A de *P. aeruginosa* destoxicada, toxina/toxide de cólera, toxina/toxide de tosferina y exotoxinas/toxide de *Clostridium perfringens*. Se prefieren las formas toxoides de estas toxinas bacterianas. También se contempla el uso de las proteínas virales (es decir, antígenos de superficie/núcleo de la hepatitis B; proteína de rotavirus VP 7 y proteínas de virus sincitial respiratorio F y G)

Los CRM incluyen CRM.sub.197, equivalente antigénicamente a la toxina de difteria (Pappenheimer y col., *Immunochem*, 9: 891-906, 1972) y CRM3201, una variante genéticamente manipulada de la toxina de tosferina (Black y col., *Science*, 240: 656-659, 1988). El uso de las proteínas vehículo inmunogénicas de fuentes no mamífero incluyen la hemocianina de la lapa de ojo de cerradura, hemocianina de cangrejo de herradura y edestina de plantas también está dentro del alcance de la invención.

Existen muchos procedimientos de acoplamiento que se pueden vislumbrar para los conjugados de dLPS-proteína. dLPS se puede activar selectivamente mediante derivatización de ADH mediada por 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) del grupo del ácido 3-desoxi-D-mano-2-octulosónico (KdO) terminal de dLPS, seguido del acoplamiento mediado por EDC a TT. Como alternativa, otro procedimiento para producir los conjugados presentes implica la derivatización de cistamina de dLPS, mediante, por ejemplo, derivatización mediada por EDC, seguida de la conjugación de disulfuro a proteína derivatizada de N-succinidil-3-(2-piridilditio) propionato. Otros procedimientos bien conocidos en la técnica para efectuar la conjugación de oligosacáridos a proteínas vehículo inmunogénicas están también dentro del alcance de la invención. tales procedimientos se describe en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos números 5.153.312 y 5.204.098; documentos EP 0 497 525; y EP 0 245 045.

La relación molar de ADH a dLPS en la mezcla de reacción está típicamente entre aproximadamente 10 : 1 y aproximadamente 250 : 1. Un exceso molar de ADH se usa para asegurar el acoplamiento más eficaz y limitar el acoplamiento de dLPS-dLPS. En una realización preferida, la relación molar está entre aproximadamente 50 : 1 y aproximadamente 150 : 1; en una realización más preferida, la relación molar es aproximadamente 100 : 1. También se contemplan relaciones similares de AH-dLPS a tanto TT como HMP en la mezcla de reacción. En una realización preferida, un ADH por dLPS está presente en el conjugado AH-dLPS. En otra realización preferida, en el conjugado final dLPS-proteína vehículo, la relación molar de dLPS a vehículo está entre aproximadamente 15 y aproximadamente 75, preferiblemente entre aproximadamente 25 y aproximadamente 50.

La inmunogenicidad de los conjugados tanto en ratones como en conejos se potencia mediante el uso de monofosforil lípido A más trehalosa dimicolato (Ribi-700™; Ribi Immunochemical Research, Hamilton, Mont) como un adyuvante. Aunque este adyuvante no está aprobado para uso en seres humanos, los expertos en la técnica apreciarán que otros adyuvantes convencionales bien conocidos se pueden usar en la invención, incluyendo compuestos de aluminio (es decir, alumbre), lipopolisacárido modificado químicamente, suspensiones de *Bordetella pertussis*, N-acetilmuramil-L-alanil-D-glutamina y otros adyuvantes conocidos por los expertos en la técnica. Se prefiere particularmente el uso de compuestos de aluminio. tales adyuvantes se describen por Warren y col. (*Ann. Rev. Biochem.*, 4: 369-388, 1986).

Los conjugados de dLPS-proteína vehículo para la administración parenteral pueden estar en la forma de una preparación inyectable estéril, tal como una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Esta suspensión se puede formular de acuerdo con los procedimientos bien conocidos en la técnica que usan agentes de dispersión o humectación y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptables, tales como una solución en

1,3-butanodiol. Los diluyentes adecuados incluyen, por ejemplo, agua, solución de Ringer y solución de cloruro de sodio. además, aceites estables estériles se pueden emplear de manera convencional como un medio disolvente o de suspensión. Para este propósito, cualquier aceite estable blando se puede emplear incluyendo mono- o diglicéridos. Además, se pueden usar de manera similar ácidos grasos en la preparación de preparaciones inyectables.

5 La vacuna de conjugado de la invención puede estar en forma soluble o en forma microparticulada, o se puede incorporar en microesferas o microvesículas, incluyendo liposomas. Aunque se contemplan diversas vías de administración de vacuna que incluyen, por ejemplo, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal e intraarterial, la vía preferida es al administración intramuscular. En una realización preferida, la dosificación del conjugado administrado variará entre 10 μg y aproximadamente 50 μg . En una realización más preferida, la cantidad administrada estará entre aproximadamente 20 μg y aproximadamente 40 μg . En una realización más preferida, la cantidad administrada es aproximadamente 25 μg . Se pueden administrar dosis mayores en base al peso corporal. La dosis exacta se puede determinar mediante protocolos de dosis/respuesta de rutina conocidos por los expertos en la técnica.

15 La vacuna de la invención se puede administrar a mamíferos de sangre caliente de cualquier edad y se adaptan para inducir la inmunización activa en mamíferos jóvenes, particularmente seres humanos contra otitis media e infecciones respiratorias provocadas por NTHi. Como una vacuna de la infancia, el conjugado se administra a aproximadamente 2 a 4 meses de edad. Típicamente, dos inyecciones de recuerdo de entre aproximadamente 10 μg y aproximadamente 25 μg se administran a aproximadamente 2 y otra vez aproximadamente 13 meses después de la inyección inicial. Como alternativa, estas inyecciones de recuerdo se proporcionan a los 2, 4 y 16 meses después de la inyección inicial.

25 Los anticuerpos IgG inducidos por la administración sintética de la vacuna de conjugado se transferirán a la mucosa local e inactivarán el inóculo de NTHi en las superficies mucosales (es decir, fosas nasales): El IgA secretor también jugará un papel en la inmunidad mucosal si la vacuna de conjugado se administra a la mucosa (es decir, por vía intranasal). De este modo, la vacuna de conjugación evitará la infección local, así como sistémica de NTHi.

30 Los ejemplos describen vacunas de conjugado usando NTHiRdlic1IpsA. Las vacunas de otras cepas de NTHi están dentro del alcance de la presente invención y se preparan usando las mismas técnicas. La cepa Rdlic1IpsA de NYHi. Otras cepas clínicamente relevantes de NTHi contempladas como fuentes de dLPS para la generación de una vacuna de conjugado dLPS-vehículo incluyen las cepas 9274, 2019, 1479, 5657 y 7502 (tipo III, II, I, IV y V, respectivamente) así como las cepas de la Colección Finlandesa mencionada en esta memoria descriptiva. estas cepas, así como la cepa 2019, se describen por Campagnari y col. (Infect. Immun., 55: 882-887, 1987), y Patrick y col. (Infect. Immun., 55: 2902-2911, 1987), y Hood Mol. Microbiol 33: 679-692, 1999, y están generalmente disponibles de la comunidad de 35 investigación.

Una vacuna multivalente que comprende una mezcla de conjugados, que tiene cada una un dLPS de una cepa diferente de NTHi, está también dentro del alcance de la invención. Los expertos en la técnica apreciarán que LPS de estas otras cepas clínicamente relevantes se pueden destoxificar mediante la eliminación de ácidos grasos de ellas, por ejemplo como se describe en Gu y col. (patente de estados unidos n° 6.207.157). En una realización preferida, estos dLPS así obtenidos son al menos aproximadamente 5.000 veces menos tóxicos que el propio LPS. en una realización particularmente preferida, el dLPS son al menos aproximadamente 10.000 veces menos tóxicos que dLPS. la determinación de la toxicidad se puede realizar, por ejemplo, como se describe en Gu y col., (Patente de estados Unidos N° 6.207.157).

45 Las vacunas vivas disponibles en la técnica incluyen vectores virales tales como adenovirus, alfavirus y poxvirus así como vectores bacterianos, por ejemplo., *Shigella*, *Salmonella*, *Vibrio cholerae*, *Lactobacillus*, *Bacille bilié* de Calmette-Guérin (BCG), y *Streptococcus*.

50 En el documento WO 92/11361 se describen cepas de *Salmonella typhimurium* atenuadas, modificadas por ingeniería genética para la expresión recombinante de antígenos heterólogos o no, y su uso como vacunas orales. Las vías preferidas de administración incluyen todas las vías mucosales; más preferiblemente, estos vectores se administran por vía intranasal u oral.

55 Otras cepas bacterianas usadas como vacunas se describen para *Shigella flexneri* en High y col., EMBO (1992) 11: 1991 y Sizemore y col., Science (1995) 270: 299; para *Streptococcus gordonii* en Medaglini y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 92: 6868; y para Balille Calmette Guerin en Flynn J. L. Cell. Mol. Biol (1994) 40 (supl. I): 31, documentos 88/06626, WO 90/00594, WO 91/13157, WO 92/01796, y WO 92/21376.

60 Una formulación alternativa utiliza la vacuna en asociación con agentes que asisten en la captación celular. Los ejemplos de tales agentes son (i) compuestos químicos que modifican la permeabilidad celular, tal como bupivacaína (véase, por ejemplo, el documento WO 94/16737), (ii) liposomas para la encapsulación de los lipopolisacáridos, la vacuna, o LPS parcialmente desacilado, o (iii) lípidos catiónicos o micropartículas de sílice, oro, o tungsteno que se asocian ellos mismos con los lipopolisacáridos.

65 Los liposomas aniónicos y neutros se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Liposomes: A practical Approach, RPC New Ed, IRL press (1990), para una descripción de los procedimientos para la preparación de liposomas) y son útiles para la distribución de un amplio intervalo de productos, incluyendo vacunas a base de lipopolisacáridos.

ES 2 284 681 T3

Para uso en una composición de la invención, en una realización, una vacuna a base de lipopolisacárido o derivado de la misma se formula en o con liposomas, preferiblemente liposomas aniónicos o neutros, microesferas, ISCOMS, o partículas de tipo virus (VLP) para facilitar la distribución y/o potenciar la respuesta inmune.

5 También se conocen en la técnica lípidos catiónicos. Tales lípidos incluyen Lipofectin™ también conocido como DOTMA (cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio), DOTAP (1,2-bis-(oleiloxi)-3-(trimetilamonio)propano, DDAB (bromuro de dimetildioctadecilamonio), DOGS (dioctadecilamidoglicil espermina) y derivados de colesterol tal como DC-Col (3-β-(N-(N',N'-dimetilaminometano)-carbamoil) colesterol). Una descripción de estos lípidos catiónicos se pueden encontrar en los documentos EP 187.702, WO 90/11092, patente de estados Unidos N°
10 5.283.185, documento 91/15501, documento WO 95/26356, y patente de Estados Unidos N° 5.527.928.

La vía de administración es cualquier vía convencional usada en el campo de vacunas. Como guía general, una vacuna basada en lipopolisacáridos de la invención se administra mediante una superficie mucosal, por ejemplo, una ocular, intranasal, pulmonar, oral, intestinal, rectal, vaginal, y superficie del tracto urinario, mediante una vía parenteral
15 por ejemplo, mediante una vía intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intradérmica, intraepidérmica, o intramuscular. La elección de la vía de administración depende de un número de parámetros, tal como la formulación que se selecciona, y el adyuvante asociado al lipopolisacárido. una vacuna basada en lipopolisacáridos formulada en asociación con bupivacaína se puede administrar de manera ventajosa en los músculos. Cuando se usa un liposoma neutro o catiónico o un lípido catiónico, tal como DOTMA o DC-Col, la formulación se puede inyectar de manera ventajosa
20 mediante las vías intravenosa, intranasal (por aerosol), intramuscular, intradérmica, y subcutánea. Un lipopolisacárido en una forma desnuda se puede administrar de manera ventajosa mediante las vías intramuscular, intradérmica, o subcutánea. Si se usa un adyuvante mucosal, se prefiere la vía intranasal u oral. Si se usa una formulación de lípidos o un compuesto de aluminio, se prefiere la vía parenteral siendo la vía subcutánea o intramuscular la más preferida. la elección también depende de la naturaleza del agente de vacuna.

La eficacia terapéutica o profiláctica de una formulación de vacuna de la invención se puede evaluar como se describe más adelante. otro aspecto de la invención proporciona (i) una composición de vacuna que comprende una vacuna basada en lipopolisacáridos de la invención junto con un diluyente o vehículo; específicamente (ii) una composición farmacéutica que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz o profiláctica eficaz de una vacuna basada
30 en lipopolisacáridos de la invención; (iii) un procedimiento para inducir una respuesta inmune contra *Haemophilus influenzae* en un mamífero, mediante la administración al mamífero de una cantidad inmunológicamente eficaz de un lipopolisacárido de la invención para inducir una respuesta inmune contra *Haemophilus influenzae* en un mamífero, mediante la administración al mamífero de una cantidad inmunogénica eficaz de un lipopolisacárido de la invención para inducir una respuesta inmune protectora a *Haemophilus influenzae*; y en particular, (iv) un procedimiento para prevenir y/o tratar infección por *Haemophilus influenzae*, mediante la administración de una cantidad profiláctica o terapéutica de un lipopolisacárido de la invención a un individuo infectado. De manera adicional, la invención abarca el uso de una vacuna basada en lipopolisacáridos de la invención en la preparación de un medicamento para la
35 prevención y/o tratamiento de infección por *Haemophilus influenzae*.

40 Como se usa en esta memoria descriptiva, la composición de la invención contiene uno o varios lipopolisacáridos o derivados de la invención. La composición opcionalmente contiene al menos un antígeno, o una subunidad, fragmento, homólogo, mutante o de *Haemophilus influenzae* o derivado de los mismos.

En una realización, la vacuna a base de lipopolisacáridos, composición o tratamiento está libre de adyuvante, específicamente adyuvantes usados comúnmente o específicamente en roedores. La composición, tratamiento o vacuna basada en lipopolisacáridos se puede usar para tratar trastornos cuyos síntomas están provocados o agravados al menos en parte por infección por *Haemophilus influenzae*, e incluye trastornos tales como otitis media, infección respiratoria, meningitis y neumonía. Las composiciones de lipopolisacáridos preferidas incluyen las formuladas para la administración *in vivo* a un animal, preferiblemente un ser humano, para conferir protección o tratamiento contra la enfermedad
50 provocada por *Haemophilus influenzae*. También se prefieren composiciones formuladas en forma de micropartículas, cápsulas o liposomas.

Como alternativa, la formulación de vacuna puede además contener un adyuvante, preferiblemente un adyuvante apropiado para uso humano o veterinario y que preferiblemente excluye adyuvantes específicos de roedores. Si es así, es preferible un adyuvante sistémico que no requiere la administración simultánea con el fin de mostrar un efecto adyuvante tal como, por ejemplo, QS21, que se describe en la patente de estados Unidos n° 5.057.546. Se conocen por los expertos en la técnica numerosos adyuvantes. Los adyuvantes preferidas se seleccionan como se indica más adelante.

60 En una realización, los adyuvantes distintos de los liposomas y similares también se usan y se conocen en la técnica. Los adyuvantes pueden proteger el antígeno frente a una dispersión rápida mediante su secuestro en un depósito local, o pueden contener sustancias que estimulan que el huésped secreta factores que son quimiotácticos para macrófagos y otros componentes del sistema inmune. Una selección apropiada se puede preparar convencionalmente por los expertos en la técnica, por ejemplo, de los descritos en esta memoria descriptiva.

65 El tratamiento se logra en una dosis única o repetida según sea necesario a intervalos, como se puede determinar fácilmente por los expertos en la técnica. Por ejemplo, a una dosis de cebo siguen tres dosis de recuerdo a intervalos semanales o mensuales. Una dosis apropiada depende de diversos parámetros incluyendo el receptor (por ejemplo,

ES 2 284 681 T3

adulto o niño), el antígeno de vacuna particular, y la vía y frecuencia de administración, la presencia/ausencia o tipo de adyuvante, y el efecto deseado (por ejemplo, protección y/o tratamiento), como se puede determinar por los expertos en la técnica. En general, un antígeno de vacuna de la invención, se administra mediante una vía mucosal en una cantidad entre aproximadamente 10 μg y aproximadamente 500 mg, preferiblemente entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 200 mg. Para la vía de administración parenteral, la dosis normalmente no excede de aproximadamente 1 mg, preferiblemente aproximadamente 100 μg .

Los adyuvantes útiles en cualquiera de las composiciones de vacuna descrita anteriormente son como sigue. Los adyuvantes para la administración parenteral incluyen compuestos de aluminio, tal como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, e hidroxifosfato de aluminio. El antígeno se precipita con, o se adsorbe en, el compuesto de aluminio de acuerdo con protocolos convencionales. Otros adyuvantes, tales como RIBI (ImmunoChem, Hamilton MT), se usan en la administración parenteral.

Los adyuvantes para la administración mucosal incluyen toxinas bacterianas, por ejemplo, la toxina de cólera, (CT), la toxina lábil al calor de *E. coli* (LT) la toxina A de *Clostridium difficile* y la toxina de tosferina (PT), o las combinaciones, subunidades toxoides, o mutantes de los mismos tal como una preparación purificada de la subunidad B de toxina de cólera nativa (CTB). Los fragmentos, homólogos, derivados y fusiones a cualquiera de estas toxinas son también adecuados, con la condición de que retengan la actividad adyuvante. Preferiblemente, se usa un mutante que tiene actividad reducida. Los mutantes adecuados se describe, por ejemplo, en el Documento WO 95/17211 (mutante CT Arg-7-Lys), documento WO 96/06627 (mutante LT Arg-192-Gly), y documento WO 95/34323 (mutante PT Arg-9-Lys y Glu-129-Gly). Los mutantes LT adicionales que se usan en los procedimientos y composiciones de la invención incluyen, por ejemplo los mutantes Ser-63-Lys, Ala-69-Gly, Glu-110-Asp, y Glu-112-Asp. Otros adyuvantes, tales como un monofosforil lípido a bacteriano (MPLA) de, por ejemplo, *E. coli*, *Salmonella minnesota*, *Salmonella typhimurium*, o *Shigella flexneri*, o microesferas de polilactida glicolida (PLGA), también se pueden usar en la administración mucosal.

Los adyuvantes útiles para ambas administraciones mucosal y parenteral incluyen polifosfaceno (documento WO 95/02415), DC-col (3 β -(N-(N',N'-dimetil aminometano)-carbamoil) colesterol; patente de Estados Unidos Nº 5.283.185 y documento WO 96/14831) y Q3-21 (documento WO 88/09336).

Cualquier composición farmacéutica de la invención que contiene un lipopolisacárido, o un anticuerpo de la invención, se fabrica de una manera convencional. En particular, se formula con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, agua o una solución salina tal como solución salina de tampón fosfato. En general, se selecciona un diluyente o vehículo en base al modo y vía de administración, y la práctica farmacéutica convencional. Los vehículos o diluyentes farmacéuticos adecuados, así como las necesidades farmacéuticas para su uso en las formulaciones farmacéuticas, se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, un texto de referencia convencional en este campo y en el USP/NF.

También se describen procedimientos en los que la infección por *Haemophilus influenzae* se pueden tratar mediante administración oral de un polisacárido de *Haemophilus influenzae* de la invención y un adyuvante mucosal, en combinación con un antibiótico, sucralfato, o una combinación de los mismos. Los ejemplos de tales compuestos que se pueden administrar con el antígeno de vacuna son antibióticos, por ejemplo, macrólidos, tetraciclinas, y los derivados de los mismos (los ejemplos específicos de antibióticos que se pueden usar incluyen azitromicina o doxiciclina, o inmunomoduladores tales como citoquinas o esteroides). Además, se usan los compuestos que contienen más de uno de los componentes enumerados anteriormente acoplados juntos. La invención también incluye composiciones para llevar a cabo estos procedimientos, y uno o más de los compuestos enumerados anteriormente, en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Las cantidades de los compuestos enumerados anteriormente usados en los procedimientos y composiciones descritos en esta memoria descriptiva se determinan fácilmente por los expertos en la técnica. Los programas de tratamiento/inmunización también se conocen y se diseñan fácilmente por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los componentes de no-vacuna se pueden administrar los días 1-14, y el antígeno de vacuna + adyuvante se pueden administrar los días 7, 14, 21 y 28.

55 Depósitos biológicos

Ciertas cepas de *Haemophilus influenzae* que se describen y se mencionan en esta memoria descriptiva se han depositado con la Autoridad depositaria Internacional de Canadá (IDAC) localizada en la Oficina de Microbiología, Health Canada, 1015 Arlington Street, Winnipeg, Manitoba, Canadá R3E 3R2. Los depósitos se han hecho conforme a las previsiones del Tratado de Budapest. La información del depósito es:

La cepa Rd lic1 lpsA de *Haemophilus influenzae* se depositó el 25 de agosto de 2001 bajo número de acceso IDAC 250801-1.

65 La cepa 1003 lic1 lpsA de *Haemophilus influenzae* se depositó el 25 de agosto de 2001 bajo número de acceso IDAC 250801-2.

La invención descrita y reivindicada en esta memoria descriptiva no está limitada en su alcance por los materiales biológicos depositados, y el material biológico depositado se pretende solamente como una ilustración de la realización de la invención.

5 Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran las realizaciones preferidas de los aspectos de la invención, y no pretenden limitar el alcance de la invención.

10 Ejemplo 1

Cepas mutantes Hi LPS

Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

15 La cepa Rd de *H. influenzae* se obtuvo originalmente de Alexander y Leidy (Alexander, H. E., y Leidy, G. (1951) J. Exp. Med. 93, 345-359) por Herriot. Se proporcionó a H. O. Smith quien nombró la cepa KW-20 y usó en el proyecto de secuenciación del genoma (Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O., Clayton, R. A., Kirkness, E. F., Kerlavage, A. R., Butt, C. J., Tomb, J-F., Dougherty, B. A., Merrik, J. M., McKenney, K., Sutton, G., FitzHugh, W.,
20 Fields, C., Gocaine, J. D., Scout, J., Shirley, R., Liu, L-I., Glodek, A., Kelley, J. M., Weidman, J. F., Phillips, C. A., Spriggs, T., Hedblom, E., Cotton, M. D., Utterback, T. TR., Hanna, M. C., Nguyen, D. T., Saudek, D. M., Brandon, R. C., Fine, L. D., Fritchman, J. L., Fuhrmann, J. L., Geohagen, N. S. M., Gnehm, C. L., McDonald, L. A., Small, K. V., Fraser, C. M., Smith, H. O., y Venter, J. C. (1995) Science 269, 496-512). Esta misma cepa obtenida del laboratorio Smith se ha usado por el solicitante (RM 118). Los genotipos de mutantes derivados de esta cepa se enumeran en la
25 tabla 1. Las cepas de *Haemophilus influenzae* se desarrollaron a 37°C en caldo de infusión de cerebro y corazón (BHI) suplementado con hemina (10 µg/ml) y NAD (2 µg/ml). Para la selección después de la transformación, se añadió kanamicina (10 µg/ml) al medio de crecimiento.

30 Se usó la cepa DH5 α de *Escherichia coli* para propagar productos clonados de PCR y construcciones génicas y se desarrolló a 37°C en caldo Luria-Bertani (LB) suplementado con ampicilina (100 µg/ml) de kanamicina (50 µg/ml) según se requiera (Sambrook, J., Fritsch; E. F., y Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning; a laboratory manual 2^o edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

Identificación de genes relacionados con LPS a partir de la secuencia del genoma de H. influenzae

35 Los genes biosintéticos de LPS supuestos de habían identificado previamente mediante una investigación "in silico" de la secuencia del genoma de *H. influenzae* con secuencias heterólogas de los genes biosintéticos de LPS a partir de un amplio intervalo de organismos obtenidos de las bases de datos disponibles públicamente (Hood, D. W., Deadman, M. E., Allen, T., Masoud, H., Martín, A.; Brisson, J. R., Fleischmann, R., Venter, J. C., Richards, J. C., y Moxon, E. R. (1996) Mol. Microbiol. 22, 951-965). El locus RM 118IgtF (HI0653) se identificó mediante la búsqueda en la base de
40 datos de la secuencia de la cepa Rd de *H. influenzae* del Instituto para Investigación Genómica (TIGR)

www.tigr.org/tdb/CMR/ghi/htmls/SplashPage.html

45 para coincidencias con la secuencia de proteínas de Lgtf de *N. meningitidis* (Nº de acceso del GenBank US8765).

Metodología de ADN recombinante, clonación y mutación

50 Se obtuvieron endonucleasas de restricción y enzimas de modificación de ADN de Boehringer Mannheim y se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La Preparación de ADN de plásmido, el análisis de transferencia de Southern y análisis de hibridación se realizaron como describen Sambrook y col., (Sambrook, J., Erlich, E. F., y Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning; a Laboratory Manual 2^o edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) - El ADN cromosómico se preparó a
55 partir de *Haemophilus* mediante el procedimiento descrito en otra parte (High, N. J., Deadman, M. E., y Moxon, E. R., (1993) Mol. Microbiol. 9, 1275-1282).

Aparte de IgtF, se clonaron y se mutaron los genes biosintéticos de LPS de *H. influenzae* supuestos como se ha reseñado previamente (Hood, D. W., Deadman, M. E., Allen, T., Masoud, H., Martín, A.; Brisson, J. R., Fleischmann, R., Venter, J. C., Richards, J. C., y Moxon, E. R. (1996) Mol. Microbiol. 22, 951-965). Para el locus IgtF, se diseñaron
60 cebadores de oligonucleótidos,

LgtFa

65 (5'-TGTTGGTGGGCAAGACGC-3')

y IgtFb

(5'-AGCCTGAATTCGACAGCC-3')

ES 2 284 681 T3

a partir de la secuencia del genoma de la cepa Rd para amplificar un fragmento de 1461 pares de bases que incluye HI0653 mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las condiciones para PCR eran durante períodos de 1 minuto de desnaturalización (94°C), hibridación (50°C) y polimerización (72°C) durante 30 ciclos. Se ligó 1 µl de producto de PCR con 50 ng de plásmido pT7blues de (Novagen) y se transformó en la cepa DH5 de *E. coli*. Los plásmidos recombinantes se prepararon a partir de transformantes después se confirmaron mediante digestión con endonucleasas de restricción y secuenciando a partir de cebadores específicos de plásmidos (Hood, D. W., Deadman, M. E., Allen, T., Masoud, H., Martín, A., Brisson, J. R., Fleischmann, R., Venter, J. C., Richards, J. C., y Moxon, E. R. (1996) Mol. Microbiol. 22, 951-965). El gen *IgtF* se inactivó insertando un módulo de resistencia a kanamicina (liberado mediante digestión con EcoR1 de pUC4kan, Pharmacia) en un sitio de restricción MunI de 257 pares de bases en el interior del extremo 5' de HI0653 para proporcionar el plásmido pDQ1.

Construcción de cepas mutantes

Se usaron 2-3 µg de plásmido linealizado, que contiene genes biosintéticos de LPS mutados, para transformar la cepa RM 118 de *H. influenzae* mediante el procedimiento de MIV (Herriot, R., M., Meyer, E. M., y Vogt, M. J. (1970) J. Bacterial. 101, 517-524) y se seleccionaron transformantes en kanamicina. Para construir la cepa RM 118 *lic1*, RM 118 se transformó con 5 µg de ADN cromosómico fragmentado aislado del mutante RM 153 correspondiente. La cepa RM 118*lic2A* se construyó mediante transformación de RM 118 con 1 µg de un producto de PCR que incluye *lic2A* y el gen adyacente *ksgA* amplificado a partir de la cepa RM153*lic2A*.

PCR usaba los cebadores

L2A

5'-CTCCATATTACATAAT-3'

y L2D

5'-AAACACTTAGGCCATACG-3'

en condiciones como se han descrito anteriormente. Todos los transformantes se comprobaron volviendo a cultivar en placas apropiadas de BHI/antibiótico después se confirmaron como mutantes mediante amplificación por PCR y/o transferencia de Southern/hibridación de ADN cromosómico digerido por endonucleasa.

Mutante lpsAlic1. El locus *lic1* se identificó mediante transferencia de un banco de fragmentos de ADN clonados a partir de RM 7004, que expresa epítopes de LPS reconocidos mediante anticuerpos monoclonales (mAb) 4C4, 6A2, y 12D9, en la cepa RM 118 que no expresa de manera natural ninguno de estos epítopes en su LPS. Un fragmento de 4,4 Kb clonado de ADN que confiere reactividad a los mAb 6A2 y 12D9 se secuenció y se identificaron cuatro marcos abiertos de lectura (ORF). Estos 4 ORF se inactivaron juntos mediante supresión de un fragmento ClaI/EcoRV de 2,7 miles de pares de bases a partir del ADN clonado y reemplazo con un módulo de resistencia a tetraciclina del plásmido pHVT1. Esta construcción se usó para preparar una mutación *lic1* en la cepa RM 7004 después la cepa RM 118 mediante recombinación homóloga después de la transformación.

El gen *lpsA* se identificó a partir de la secuencia del genoma de la cepa Rd como un homólogo de un gen que codifica una glicosiltransferasa en *Pasteurella haemolytica*. El gen se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando los cebadores diseñados a partir de la secuencia del genoma de Rd. El producto de PCR se clonó en el plásmido pT7Blue después el gen se fragmentó mediante digestión con NsiI e inserción de un módulo de resistencia a kanamicina derivado de pUC4kan, mediante digestión con PstI. El plásmido resultante se linealizó después se usó para transformar las cepas RM 118 y NTHi 1003. Los transformantes se comprobaron mediante PCR para confirmar los mutantes.

Las cepas doble mutantes RM 118*lpsAlic1* (denominadas indistintamente Rd*lpsAlic1* o Rd*lic1lpsA*) y 1003*lpsAlic1* (denominada indistintamente 1003*lic1lpsA*) se construyeron mediante transformación de cada uno de los mutantes RM 118 y 1003 *lpsA* con ADN cromosómico derivado de la cepa mutante RM 118*lic1*. Las cepas doble mutantes se confirmaron mediante análisis de PCR de los loci relevantes y el fondo de las cepas se confirmó mediante digestión con enzimas de restricción y comparación de los patrones de los fragmentos de ADN sobre geles con las cepas de tipo salvaje relevantes.

Las cepas se comprobaron posteriormente usando un número de mAb, cada uno específico para epítopes particulares de LPS. En cada caso las cepas doble mutantes RM 118 y 1003 *lpsAlic1* había perdido reactividad a mAb TEPC-15, un anticuerpo específico para fosfocolina, cuando se compara con la de tipo salvaje. La incorporación de fosfocolina en LPS de *H. influenzae* depende del locus *lic1*. El LPS derivado de las cepas mutantes también se fraccionó en geles de poliacrilamida y se comparó con el LPS de tipo salvaje relevante. En cada caso la cepa doble mutante tenía LPS que estaba truncada cuando se compara con la de cepas de tipo salvaje.

Análisis de lipopolisacárido mediante inmunotransferencia

La reactividad de las cepas de tipo salvaje y mutantes de la cepa RM 118 de *H. influenzae* a anticuerpos monoclonales específicos de LPS se analizaron como se ha descrito por Rothey col., (Roche, R. J., High, N. J., y Moxon, E. R. (1994) FEMS Microbiol. Lett. 120, 279-284).

Análisis de lipopolisacárido mediante electroforesis

Los patrones de LPS aislado de cepas de tipo salvaje y mutantes se determinaron después del fraccionamiento por electroforesis en gel de tricina-SDS-poliacrilamida (T-SDS-PAGE) (véase, A. J., Campagnari, A. A., Bittner, W. E., y Apicella, M. A (1990) J. Immunolog. Methods 126, 109-117) como se ha descrito previamente (Hood, D. W., Deadman, M. E., Allen, T., Masoud, H., Martín, A., Brisson, J. R., Fleischmann, R., Venter, J. C., Richards, J. C., y Moxon, E. R. (1996) Mol. Microbiol. 22, 951-965).

Huella estructural de lipopolisacáridos

Células de cultivos de lote de 10¹ (10 lotes de 1 l) se recogieron después de crecer durante toda una noche, se extrajo LPS mediante el procedimiento fenol caliente-agua. (Westpahal, O. y Jann, K. (1965) Meth. carbohydr. Chem. 5, 83-91), seguido de precipitación en etanol como se ha descrito por Thibault y Richards (Thibault, P. y Richards, J. C. (2000) Se purificó el LPS mediante ultracentrifugación repetida (105 000 g, 4°C, 2 x 5 h) y se analizaron las muestras como sus derivados O-desacilados (LPS-OH). La O-desacilación se logró mediante mezclado del LPS (1-10 mg) con hidracina anhidra (0,2-1 ml) a 37°C durante 1 hora como se ha descrito previamente (Holst, O., Broer, W., Thomas-Oates, J. E., Mamat, U., y Brade, H. (1993) Eur. J. Biochem. 214, 703-710). Los azúcares se identificaron mediante cromatografía gas-líquido espectrometría de masas (CGL-EM) como sus acetatos de alditol como se ha descrito previamente (Jarosik, G. P., y Hansen, E. J., (1994) Infect. Immun. 62, 4861-4867). El análisis de enlace se llevó a cabo después de la acetilación de los oligosacáridos con anhídrido acético (0,5 ml) y 4-dimetilaminopiridina (0,5 mg) a temperatura ambiente durante 24 horas. Después el material peracetilado se trató con yoduro de metilo en dimetilsulfóxido en la presencia de metilsulfonilmetanida de litio para producir los oligosacáridos metilados que se recuperaron usando un cartucho SepPak™ C18 y se sometieron a análisis de azúcar (Blakeney, A. B. y Stone, B. A. (1985) Carbohydr. Res. 140, 319-324). las proporciones relativas de los diversos acetatos de alditol y los acetatos de alditol metilados parcialmente obtenidos en azúcar y los análisis de metilación se midieron a partir de respuestas del detector de CGL-EM y están sin corregir. CGL-EM se llevó a cabo con un cromatógrafo Delsi Di200™ equipado con un espectrómetro de masas de cuadrupolo NERMAG R10-10H™ o con un sistema Varian Iontrap™ usando una columna capilar de sílice de pirólisis DB-5 (25 m x 0,25 mm x 0,25 μm) y un gradiente de temperatura de 160°C (1 min) → 250°C a 3°C/min. La espectrometría de masas de ionización por electropulverización (IEP-EM) se realizó en un espectrómetro de masas VG Quatro™ (Micromass Manchester, Reino Unido) en el modo de ion negativo. Las muestras se disolvieron en agua y después se mezclaron en una relación 1 : 1 con acetónitrilo acuoso al 50% que contenía ácido acético al 1%. Las soluciones de la muestra se inyectaron mediante una bomba de jeringa en un disolvente de desarrollo de H₂O : CH₃CN (1 : 1) a un caudal de 5 μl/min. Los espectros de ¹H RMN de una dimensión (1D) se registraron a 500 MHz para soluciones en óxido de deuterio a 22°C, después de varias liofilizaciones con D₂O, en un espectrómetro Bruker AMX 500™. Para potenciar la resolución espectral, perdeutero-EDTA (2 mM) y perdeutero-SDS (10 mg/ml) se añadieron a las soluciones de D₂O (Risberg, A., Schweda, E. K. H., y Jansson, P. -E. (1997). Eur. J. Biochem. 243, 701-707). Los desplazamientos químicos están referenciados a la resonancia de protón de metilo (δ: 2,225 ppm) de acetona interna.

Análisis de actividad enzimática de LgtC y LgtD

La enzima codificada por lgtD se ensayó con el aceptor sintético FCHASE-P^k usando electroforesis capilar para la detección del producto. La electroforesis capilar se realizó esencialmente como se ha descrito previamente (Wakarchuk, W., Martín, A., Jennings, M. P., Moxon, E. R., y Richards, J. C., (1996) J. Biol. Chem. 271, 19166-1917). FCHASE-P^k se sintetizó a partir de FCHASE-lac usando la enzima de LgtC de *Neisseria meningitidis* como se ha descrito anteriormente (Wakarchuk, W. W., y col., Protecín Eng. 11: 295-302, 1998). Las condiciones de reacción eran aceptor 0,5 mM, 1 mM UDP-GalNAc, 50 mM HF-PES-NaOH pH 7,0, 10 mM MgCl₂. El extracto se preparó sonicando las células, y después recogiendo la fracción de membranas mediante centrifugación a 100.000 x g durante 30 minutos. Tanto RM 118 como la RM 118:lgtD mutante se analizaron. la pequeña cantidad de producto se aisló mediante TLC como se ha descrito previamente (Wakarchuk, W., Martín, A., Jennings, M. P., Moxon, E. R., y Richards, J. C., (1996) J. Biol. Chem. 271, 19166-1917). Debido a que la conversión del producto era pequeña, también se aisló algo del material de partida con él. La mezcla recuperada se dividió en 2 partes iguales y después se trató con β-hexosaminidasa como recomienda el proveedor de enzima (NEB). El producto de la reacción de LgtD se mostró que tenía especificidad β-anomérica mediante digestión con β-hexosaaminidasa.

La actividad para LgtC estaba por debajo del límite de detección en los extractos de RM118, de manera que el gen se clonó en vector de expresión y se ensayó la actividad en *E. coli*. El gen se amplificó mediante PCR (como se ha descrito anteriormente usando cebadores

65

ES 2 284 681 T3

IgtCa

5' GGG GGG CAT ATG GGA CGG ACT GTC AGT CAG ACA ATG

y IgtCb

5' GGG GGG GTC GAC TCA TTA ATT ATC TTT TAT TCT CTT TCT TAAT C

Después el gen se insertó en plusat pCWori los sitios NdeI y Sall de manera similar a lo descrito para IgtC de *N. meningitidis* (Wakarchuk, W. W., y col., Protein Eng. 11, 295-302, 1998). Los extractos brutos sonicados del clon recombinante se ensayaron con 1 mM FCHASE-Lac, 1 mM UDP-Gal, 10 mM MnCl₂, 5 mM DTT, 50 mM HEPES pH 7.5. La enzima se mostró que era inestable en *E. coli* y necesitaba ensayarse dentro de unas pocas horas en que se prepararon los extractos (datos no mostrados). El producto de la reacción enzimática se analizó mediante digestión con glicosidasa específica, espectrometría de masas y co-cromatografía con FCHASE-p^k auténtico (datos no mostrados).

15 Construcción y selección de cepas mutantes

El conjunto de mutantes preparados como se ha indicado anteriormente se usó para investigar en detalle la base genética de la biosíntesis de la parte oligosacárida de LPS de la cepa RM 118 de *H. influenzae*, la cepa índice a partir de la que se derivó la secuencia del genoma completa. La Tabla 1 enumera los genes que los inventores han investigado. Las construcciones de ADN usadas para mutar la mayoría de estos genes se ha reseñado previamente (Hood, D. W., Deadman, M. E., Allen, T., Masoud, H., Martín, A.; Brisson, J. R., Fleischmann, R., Venter, J. C., Richards, J. C., y Moxon, E. R. (1996) Mol. Microbiol. 22, 951-965). Cada construcción consistía en un vector de plásmido en el que se clonó un gen de LPS supuesto, con un gen de resistencia a kanamicina insertado dentro del extremo 5' (primer tercio) del marco predicho de lectura. No existía ningún gen candidato obvio responsable de la adición de la glucosa a la primera heptosa (HeP). La búsqueda de la base de datos de la secuencia del genoma de Rd con la secuencia de IgtF de *Neisseria* proporcionó una coincidencia (31% de identidad sobre 247 aminoácidos) al marco de lectura HI0653. IgtF se amplificó mediante PCR a partir del ADN cromosómico de las cepas RM 118 y RM 153. El producto clonado de la cepa RM 118 se inactivó mediante inserción de un módulo de kanamicina para proporcionar el plásmido pDQ1 y se usó para transformar las cepas de *H. influenzae*. *lic1* y *lic2A* son loci biosintéticos de LPS de fase variable (High, N. J., Deadman, M. E., y Moxon, E. R. (1993) Mol. Microbiol. 9, 1275-1282; Weiser, J. N., Love, J. M., y Moxon, E. R. (1989) Cell 59, 657-665). *lic1* se ha mostrado que está implicado en la adición de grupos PCho a LPS de *H. influenzae* (Weiser, J. N., Shchepetov, M., y Chong, S. T. H. (1997) Infect. Immun. 65, 943-950). Para cada locus, la cepa RM118 se transformó usando las construcciones de gen mutado (10⁻¹⁰ transformantes/ μ g de ADN de entrada). Para la mayoría de loci RM 118 era la fuente de ADN que se había clonado pero en varios casos el ADN derivado de la cepa RM 153 se usó como donante sin cambio en la eficacia de transformación. Los genes responsables para la síntesis del primer azúcar añadido al lípido A, Kdo, (*kdsA*, *kdsB*) y la Kdo transferasa (*kdtA*) se han identificado a partir de la secuencia del genoma (Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O., Clayton, R. A., Kirkness, E. F., Kerlavage, A. R., Butt, C. J., Tomb, J.-F., Dougherty, B. A., Merrick, J. M., McKenney, K., Sutton, G., Fitzhugh, W., Fields, C., Gocayne, J. D., Scott, J. Shirley, R., Liu, L.-I., Glodek, A., Kelley, J. M., Weidman, J. F., Phillips, C. A., Spriggs, T., Hedblom, E., Cotton, M. D., Utterback, T. R., Hanna, M. C., Nguyen, D. T., Saudek, D. M., Brandon, R. C., Fine, L. D., Fritzman, J. L., Fuhrmann, J. L., Geoghagen, N. S. M., Gnham, C. L., McDonald, L. A., Small, K. V., Fraser, C. M., Smith, H. C., y Venter, J. C. (1995) Science 269, 496-512). Los intentos para construir cepas mutadas en el gen *kdtA*, usando una diversidad de construcciones de plásmido no proporcionaron ningún transformante. Esto es similar a los hallazgos con las cepas de tipo b (Hood, D. W., Deadman, M. E., Allen, T., Masoud, H., Martín, A.; Brisson, J. R., Fleischmann, R., Venter, J. C., Richards, J. C., y Moxon, E. R. (1996) Mol. Microbiol. 22, 951-965) y se asume que es debido a la no viabilidad de este mutante. El LPS aislado de RM 118 y las cepas mutantes isogénicas se analizó mediante T-SDS-PAGE (datos no mostrados). Las cepas mutadas en los genes más probablemente codificaban las glicosiltransferasas para la síntesis de oligosacáridos de RM 118, y que mostraron un patrón alterado de las bandas de LPS cuando se compara con el de tipo salvaje mediante T-SDS-PAGE (Figura 1), se seleccionaron para el análisis estructural detallado de su LPS como se describe más adelante. También se investigó un mutante en el que el locus *lic1* está inactivado.

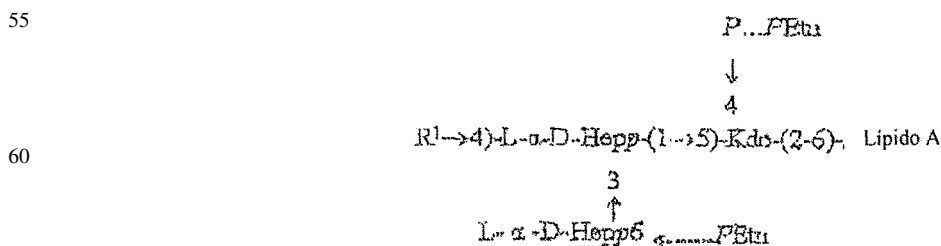
Caracterización estructural de LPS

El análisis de LPS de la cepa RM 118 mediante T-SDS-PAGE mostró un patrón heterogéneo de bandas correspondientes en movilidad electroforética a poblaciones de LPS de baja masa molecular compuesto de lípido A y componentes de oligosacáridos que difieren en el número de residuos de azúcar unidos (Figura 1). El solicitante ha mostrado previamente que la cepa RM 118 crecida en condiciones similares expresa poblaciones de LPS que contienen tres a cinco restos de glucosa unidos a un elemento del núcleo interno común (Risberg, A., Masoud, H., Martín, A., Richards, J. C., Moxon, E. R., y Schweda, E. K. H. (1999) Eur. J. Biochem. 261, 171-180). LPS de las cepas con mutaciones en *lic1*, *IgtF*, y *IgtD* mostraron patrones de bandas complejos similares, mientras que las de las cepas con las mutaciones *IgtC*, *lic2A*, *IpsA*, *orfH*, *rfaF*, y *opsX* proporcionan menos patrones complejos que comprenden bandas que tienen movilidades más rápidas consecutivamente consistente con supresiones sucesivas de azúcar. La identificación de la naturaleza y localización de las supresiones de azúcar en las muestras de LPS de las cepas mutantes se lograron mediante análisis estructural comparativo. LPS se extrajo a partir de mutantes isogénicas de la cepa RM 118 después de crecimiento en cultivo líquido. La huella estructural se realizó usando el análisis de IEP-EM y 1D ¹H RMN de las muestras de LPS O-desacilado (LPS-OH), obtenidas después del tratamiento con hidracina anhidra. Además, se llevaron a cabo análisis de glucosa y enlace sobre muestras de LPS intacto. Una comparación de los datos obtenidos

a partir de las cepas mutantes que contienen los genes de la glicosil transferasa supuestos específicamente inactivados con la del modelo estructural para el LPS de RM 118 que contiene globotetrosa (Risberg, A., Masoud, H., Martín, A., Richards, J. C., Moxon, E. R., y Schweda, E. K. H. (1999) Eur. J. Biochem. 261, 171-180) establecía las características estructurales clave de las glicofomas de LPS alterados. IEP-EM proporciona una herramienta valiosa para investigar la composición estructural de LPS de baja masa molecular (Gibson, B. W., Melaugh, W., Phillips, N. J., Apicella, M. A., Campagnari, A. A., y Griffis, J. M. (1993) J. bacterial. 175, 2702-2712; Masoud, H., Moxon, E. R., Martín, A., Krajcarski, D., y Richards, J. C. (1996) Biochem. 36, 2091-2103; Risberg, A., Masoud, H., Martín, A., Richards, J. C., Moxon, E. R., y Schweda, E. K. H. (1999) Eur. J. Biochem. 261, 171-180; Risberg, A., Schweda, E. K. H., y Jansson, P. E. (1999) Eur. J. Biochem. 243, 701-707), Phillips, N. J., MaLaughlin, R., Miller, T. J., Apicella, M. A. y Gibson, B. W. (1996) Biochem. 35, 5937-5947). Los datos de IEP-EM obtenidos en el modo de ion negativo sobre las muestras de LPS O-desacilado se presentan en la Tabla 2. Las muestras de LPS-OH de las cepas mutantes proporcionaron los datos consistentes con la presencia de oligosacáridos unidos mediante Kdo-4-fosfato a un resto Lípido A O-desacilado común que difiere en el número de sustituyentes que contienen heptosa, hexosa y fosfato (Phillips, N. J., Apicella, M. A., Griffis, J. M. y Gibson, B. W. (1992) Biochem. 31, 4515-4526; Masoud, E. R., Martín, A., Krajcarski, D., y Richards, J. C. (1996) Biochem. 36, 2091-2103; Risberg, A., Masoud, H., Martín, A., Richards, J. C., Moxon, E. R., y Schweda, E. K. H. (1999) Eur. J. Biochem. 261, 171-180; Schweda, E. K. H., Hegedeus, O. E., Borrelli, S., Lindberg, A. A., Weiser, J. W., Maskell, D. J., y Moxon, E. R. (1993) Carbohydr. Res. 246, 319-330; Schweda, E. K. H., y Jansson, P. E., Moxon, E. R., y Lindberg, A. A., (1995) Carbohydr. Res. 272, 213-224; Risberg, A., Schweda, E. K. H., y Jansson, P. E. (1997) Eur. J. Biochem. 243, 701-707; Phillips, N. J., McLaughlin, R., Miller, T. J., Apicella, M. A. y Gibson, B. W. (1996) Biochem. 35, 5937-5947). El mutante opsX. La inactivación de opsX dio lugar, a LPS profundamente bruto, que estaba desprovisto de restos heptosa o hexosa, que contenía solamente un Kdo fosforilado unido al resto de Lípido A (Tabla 2). Los inventores han mostrado previamente que la mutación en el gen opsX de la cepa RM 153 de tipo b de *H. influenzae* da como resultado el truncamiento del LPS entre Hep1 y Kdo (Hood, D. W., Deadman, M. E., Allen, T., Masoud, H., Martín, A.; Brisson, J. R., Fleischmann, R., Venter, J. C., Richards, J. C., y Moxon, E. R. (1996) Mol. Microbiol. 22, 951-965). El análisis de EM-EM de la muestra de LPS-OH mediante la activación de colisión de baja energía del ion molecular doblemente cargado (m/z 625) produjo un fragmento iónico principal en m/z 951 (Lípido-A-OH) que surge de la escisión del enlace de la Kdo-β-D-glucosalina (datos no mostrados). La masa de este fragmento iónico es consistente con la esperada para el Lípido A-OH de *H. influenzae* (Helander, I. M., Lindner, B., Brade, H., Altmann, K., Lindberg, K. K., Rietschel, E. T., Y Zahringer, U. (1988) Eur. J. Biochem. 177, 483-492). Es evidente que los mutantes opsX de RM 118 y RM 153 expresan LPS similar al de la cepa mutante Rdis (169) previamente caracterizado (Helander, I. M., Lindner, B., Brade, H., Altmann, K., Lindberg, K. K., Rietschel, E. T., Y Zahringer, U. (1988) Eur. J. Biochem. 177, 483-492); Preston, A., Maskell, D., Jonson, A., y Moxon, E. R. (1996) J. Bacterial. 178, 396-402). El fenotipo de 169 LPS surge de una mutación en el gen gmhA biosintético de heptosa (Brook, J. S., y Valdano, M. A (1996)j . Bacterial. 178, 3339-3341), que produce la cepa mutante incapaz de añadir heptosa a su LPS.

Mutante rfaF. El análisis de ¹H RMN de LPS-OH de RM 118rfaF mostró, además de la resonancia de ¹H esperada del resto de glucosalina α-unido del lípido A, una resonancia de protón anomérica (~ 5,19 ppm) en la región de campo baja de una sola unidad de heptosa. El análisis de azúcar confirmó que el residuo Hep es L-glicero-D-mano heptosa. De manera correspondiente, el espectro IEP-EM estaba dominado por un solo ion doblemente cargado abundante a m/z 721,6 consistente con la estructura, Hep₁-Kdo-Lípido A-OH (tabla 2).

Mutante orfH. Los organismos en los que el gen orfH está inactivado proporcionaron una mezcla de glicofomas de LPS, conteniendo cada una dos restos Hep, como se evidencia de los datos de IEP-EM (Tabla 2). Además de la población principal de las glicofomas que contienen un resto adicional Hep, es decir Hep₂ · PEtn₀₋₂ · (Kdo-Lípido A-OH, comparada con el LPS de RM 118rfaF, eran especies que contenían una unidad Hex-PCho. El análisis de azúcares indicó la presencia de D-glucosa y los protones metilo de PCho proporcionó una señal intensa en la ¹H RMN a 3,24 ppm. Como se esperaba, LPS de esta cepa reaccionó con TEPC-15, un anticuerpo monoclonal específico de PCho (Mab) (Weiser, J. H., Shchepetov, M., y Chong, S. T. H. (1997) Infect. Immun. 65, 943-950), en experimentos de inmunotransferencia. Los análisis de enlace revelaron la presencia de restos Hep terminal, Hep 3 sustituida y Hep 3,4 disustituida (Tabla 3). Basándose en la estructura de la cepa precursora, estos datos son consistentes con RM 118orfH que tiene la capacidad de elaborar LPS que expresa las dos estructuras 1 y 2 de glicofomas principales (PEtn muestra sustitución parcial).



Estructura 1: R¹ = H

Estructura 2: R¹ = PCho(6)-β-D-Glcp

ES 2 284 681 T3

La existencia de dos bandas para el LPS de RM 118orfH cuando se analiza por T-SDS-PAGE (Figura 1) es consistente con la conclusión.

5 *Mutante lpsA*. El análisis de IEP-EM de LPS-OH de RM 118lpsA indicó que contenía las glicofomas que tienen un resto Hep adicional cuando se compara con RM 118orfH (Tabla 2), siendo la glicofoma de Hex1 que contiene fosfocolina la especie de LPS principal (Figura 2). El análisis de enlace era consistente con la adición secuencial de la heptosa a la Hep terminal en la estructura 2 (Tabla 3). De manera correspondiente, el espectro de ¹H RMN de esta muestra de LPS O-desacilada mostró el patrón característico en la región del campo baja (5,0-6,0 ppm) para el elemento del núcleo interno de tri-heptosa de LPS (Hep II, 5,76 ppm; Hep I/Hep III, 5,16/5,15 ppm) de *H. influenzae* (Figura 3) (Risberg, A., Masoud, H., Martín, A., Richards, J. C., Moxon, E. R., y Schweda, E. K. H. (1999) Eur. J. Biochem. 261, 171-180). Estos datos son consistentes con el LPS derivado de RM 118 lpsA que tiene la estructura 3. (Figura 2, tabla 4).

15 *Mutante lic2A*. El análisis de IEP-EM de LPS O-desacilado de RM 118lic2A reveló la presencia de las glicofomas Hex2 como la especie de LPS principal (Tabla 2). El análisis de composición del LPS de RM 118lic2A indicó la presencia de D-glucosa como la única hexosa neutra, el análisis de enlace indicada que era un resto terminal (Tabla 3). Una proporción significativa de restos de heptosa unidos en 2 también se reveló mediante análisis de enlace. Merece la pena hacer notar, que los restos de heptosa 2-sustituídos no se detectaron en la muestra de LPS del mutante lpsA debido a la sustitución de ese resto por grupos PEtn (cf. Estructura 3) que no son fácilmente excindibles en las condiciones de hidrólisis empleadas en el procedimiento de análisis de enlace. De acuerdo con estos hallazgos, se puede concluir que LPS del mutante lic2A difiere del mutante lpsA porque lleva un resto glucosa en la posición 2 de Hep III como se muestra en la Estructura 4. (Tabla 4). La presencia de una señal de ¹H RMN adicional a 4,65 ppm indicaba que el D-Glcp terminal tiene la configuración β , el valor del desplazamiento campo arriba de la resonancia para Hep II (5,58 ppm) comparado con la del análogo no sustituido, (5,76 ppm) siendo indicativo del enlace 1,2 a Hep III (estructura 4) (Masoud, H., Moxon, E. R., Martín, A., Krajcarski, D., y Richards, J. C. (1996) Biochem. 36, 2091-2103; Schweda, E. K. H., Hegedeus, O. E., Borrelli, S., Lindberg, A. A., Weiser, J. W., Maskell, D. J., y Moxon, E. R. (1993) Carbohydr. Res. 246, 319-330; Schweda, E. K. H., y Jansson, P. E., Moxon, E. R., y Lindberg, A. A., (1995) Carbohydr. Res. 272, 213-224).

30 *Mutante lic3A*. De manera similar, se generó un mutante que permitía la investigación de glicofomas dializadas. Estos estudios confirmaron la carencia de ácido siálico en el mutante lic3A relevante. La preparación del mutante se describe en Hood y col., Mol. Microbiol. 39: 341-350, 2001. La glicofoma sialilada se encontró que estaba ausente en las cepas que contienen una ruptura del gen lic3A. Lic3A ha demostrado que tiene una actividad sialiltransferasa, que está modificada por la acción de otra glicosil transferasa de fase variable, lgtC, que compite por el mismo aceptor de lactosilo.

40 *Mutante lgtC*. En el mutante RM 118lgtC, el análisis de IEP-EM de la muestra de LPS O-desacilada reveló la presencia de glicofomas Hex3. El análisis de azúcar indicó que el LPS del mutante lgtC contenía D-galactosa, que mediante análisis de enlace se encontró que estaba presente como un resto terminal (Tabla 3). El análisis de enlace también reveló restos D-Glcp unidos en 4 consistentes con el hecho de que la glicofoma Hex 3 principal (Tabla 3) estuviera sustituida con un resto lactosa en Hep III (Estructura 5). El espectro de ¹H RMN del LPS-OH es idéntico al reseñado previamente por los inventores (Risberg, A., Masoud, H., Martín, A., Richards, J. C., Moxon, E. R., y Schweda, E. K. H. (1999) Eur. J. Biochem. 261, 171-180) para la lactosa que contiene la glicofoma de LPS de Hex3 que está presente en la cepa precursora. En *N. meningitidis*, el gen lgtC se ha mostrado que codifica una 1,4- α galactosil transferasa (Wakarchuck, W. W., Cunningham, A. M., Watson, D. C., y Young, N. M. 1998. Role of paired basic residues in the expression of active recombinant galactosyltransferases from the bacterial pathogen *Neisseria meningitidis*. Protein Eng. 11: 295-302). Una función similar se demostró para lgtC de RM 118 mediante el examen de la actividad transferasa de la enzima recombinante y mediante el análisis del LPS a partir del mutante RM 118lgtC.

50 *Mutante lgtD*. Una mezcla de las glicofomas de LPS Hex3 y Hex4 se elaboraron mediante RM 118 de *H. influenzae* en la que el gen lgtD está inactivado (Tabla 2). Por lo tanto, se observaron dos bandas tras análisis de T-SDS-PAGE del LPS, una correspondiente en la movilidad electroforética a la del mutante lgtC y una banda migratoria más lenta (Figura 1). LPS de esta cepa mutante contenía los restos D-Galp terminal y unido en 4 (Tabla 3). Una comparación de los espectros de 1D ¹H RMN con los de la cepa precursora y su mutante lgtC, apuntaba a la presencia de una unidad α -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Galp en la glicofoma Hex 4, siendo una señal en 5,01 ppm indicativa del resto α -D-galp terminal (estructura 6) (Tabla 4). El producto génico lgtD se investigó para evaluación de la actividad glicosil transferasa con el aceptor sintético, FCHASE-p^k. Una comparación de las cepas RM 118 precursora y el mutante lgtD en el ensayo CE mostró la carencia de la actividad transferasa de β -galpNAc en el mutante (Figura 4).

60 *Mutante lgtF*. La mutación del gen lgtF en *H. influenzae* proporcionó una cepa a partir de la que el LPS ni reaccionaba con Mab TEPC-15 (datos no mostrados) ni mostraban la señal del protón metilo de PCho característica (3,24 ppm) en su espectro ¹H RMN. El análisis de enlace indicaba que LPS carecía del residuo terminal β -D-Glcp, que contiene solamente los restos de Hep I mono-3-sustituídos (Tabla 3). Una distribución similar de glicofomas, como se encontró en el LPs de la cepa precursora, que difiere en la longitud de la cadena de oligosacáridos de Hep III se observó para LPS-OH del mutante lgtF en su IEP-EM (tabla 2). Merece la pena destacar que la extensión total de la unidad de globotetraosa de Hep III se puede producir en la ausencia o la presencia del resto β -D-Glcp en Hep I (Figura 5). El solicitante ha mostrado que la cepa precursora puede elaborar poblaciones mixtas de las glicofomas de LPS en la que la unidad de galabiosa está alargada mediante la adición de un resto terminal β -D-galpNAc que proporcio-

na las unidades de glabotraosa β -D-GalpNAc-(1 \rightarrow 3)- α -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glcp (Risberg, A., Masoud, H., Martín, A., Richards, J. C., Moxon, E. R., y Schweda, E. K. H. (1999) Eur. J. Biochem. 261, 171-180).

5 *Mutante lic1*. El análisis de IEP-EM de la forma de LPS O-desacilada del mutante *lic1* proporcionó una mezcla heterogénea similar de glicofomas (Tabla 2) como la observada en la cepa precursora (Risberg, A., Masoud, H., Martín, A., Richards, J. C., Moxon, E. R., y Schweda, E. K. H. (1999) Eur. J. Biochem. 261, 171-180), pero que carece de la presencia de sustituyentes PCho. El locus *lic* se ha mostrado que contiene genes responsables de la expresión de sustituyentes de PCho en la posición 6 de β -D-Glcp unida a la heptosa 3,4-disustituida (Hep I) en RM 118 (Risberg, A., Masoud, H., Martín, A., Richards, J. C., Moxon, E. R., y Schweda, E. K. H. (1999) Eur. J. Biochem. 261, 171-190); Weiser, J. N., Shchepetov, M., y Chong, S. T. H. (1997) Infect. Immun. 65, 943-950). El examen del espectro de ^1H RMN de LPS O-desacilado de RM 118*lic1* reveló la ausencia de la señal de protón metilo de PCho característica a 3,24 ppm. Adicionalmente el LPS de este mutante *lic*., como se esperaba (34), no reaccionó con Mab TEPC-15 (datos no mostrados).

15 Ejemplo 2

Sustituciones y modificaciones del resto del núcleo interno

20 En la cepa 2019 de NTHi, Hep I está sustituida con lactosa ($R_1 = \beta$ -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glcp; $R_2/R_3 = \text{H}$) (N. J. Phillips y col., Biochemistry, 31 (1992) 4515-4526), En la cepa 375 de NTHi, Hep III está sustituida con lactosa sialilada en una población de glicofomas secundarias ($R_1 = \beta$ -D-Glcp, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{Neu5Ac-}\beta$ -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow 2)). (D. W. Hood y col., Mol. Micro. 33 (1999) 679-692). Este ejemplo resume los resultados de las investigaciones estructurales de LPS a partir de 4 cepas de NTHi usando análisis de metilación, espectrometría de masas de ionización por electropulverización (IEP-EM) y RMN.

25 Las cepas 466, 176, 285 y 1159 de *H. influenzae* no tipificables se obtuvieron a partir del estudio de cohorte del oído interno y son aislamientos obtenidos del oído interno. Las bacterias se desarrollaron en caldo de infusión de cerebro corazón (BHI) (DiscoTM (3,7%, p/v) que contenía dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD) (2 $\mu\text{g/ml}$), hemina (10 $\mu\text{g/ml}$) y ácido neuramínico (NeuAc; 50 $\mu\text{g/ml}$) a 37°C. El LPS se obtuvo a partir de bacterias liofilizadas mediante el uso del procedimiento de fenol cloroformo/éter de petróleo, seguido de ultracentrifugación (A. Risberg y col., Eur. J. Biochem., 261, (1999) 171-180). Se realizaron estudios estructurales detallados mediante el uso de procedimientos basados en EM y técnicas de MMR de campo alto sobre muestras de oligosacáridos obtenidas de muestras de LPS o bien O-desacilación con hidracina anhidra (37°C, 1h) o escisión del enlace cetosídico de kdo con ácido acético diluido (100°C, 2 h).

35 Los análisis de composición de azúcar de LPS de las cepas 486, 176, 285 y 1158 de NTHi, todos indicaban D-glucosa (Glc) 2-amino-2-desoxi-D-glucosa (GlcN) y L-glicero-D-mano-heptosa (Hep) como los componentes principales identificados mediante CGL-EM de sus derivados de acetato de aldilol y 2-butil glicósido correspondientes. Además, se identificó D-galactosa en las cepas 486, 176 y 1158. Además, se encontró que D-glicero-D-mano-heptosa era un componente principal en la cepa 1158. Este azúcar se identificó recientemente la primera vez como un componente en el LPS de *H. influenzae* en la cepa 9274 de NTHi (M. M. Rahmany y col., Glycobiology, 9 (1999) 1371-1380). El tratamiento de LPS O-desacilado (LPS-OH) con neuraminidasa seguido de cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución e IEP-EM indicó que el ácido siálico (NeuAc) era un componente principal en la cepa 486 de NTHi. Cantidades secundarias se detectaron en las cepas 176, 285 y 1158 de NTHi.

45 IEP-EM de muestras de LPS-OH indicaron mezclas heterogéneas de glicofomas en todas las cepas. Parte del espectro de IEP-EM de LPS-OH de la cepa 486 de NTHi se muestra en la figura 2. Las composiciones propuestas para las principales glicofomas de LPS de las cepas de NTHi se muestran en la Tabla 2. Todas las glicofomas contienen el resto del núcleo interno de triheptosilo PÉtn sustituido unido mediante el engarce Kdo fosforilado al Lípido A O-desacilado supuesto (Lípido A-OH).

PCho está presente en todas las cepas como un componente principal. La presencia de dos PCho en una glicofoma Hex 2 está indicada para la cepa 1158. La glicofoma más corta (Hex 1) se observa para la cepa 285.

55 Los datos de los análisis de metilación de las muestras de LPS se proporcionan en la tabla 6. Merece la pena hacer notar que solamente pequeñas cantidades de Hep 2-sustituidas, un componente integral de las estructuras de *H. influenzae* previamente publicadas, se pudieron detectar en las cepas 176 y 486. En su lugar, se detectaron cantidades significativas de Hep 3-sustituidas apuntando a un nuevo patrón de sustitución en el elemento del núcleo interno de L- α -D-Hepp-(1 \rightarrow 2)-L- α -D-Hepp-(1 \rightarrow 3)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)-L- α -D-Hepp-(1 \rightarrow 5)- α -Kdop común de LPS de *H. influenzae*. Las estructuras completas de las glicofomas principales en las cepas 176 y 486 se determinaron mediante RMN y los resultados se resumen más adelante. El análisis de metilación de la cepa 285 reveló, entre otros, cantidades altas de L,D-Hep terminal además de Hep 3,4-disustituida lo que indicaba una sustitución de Hep II y Hep III del resto del núcleo interno de triheptosilo (es decir, R_2 y $R_3 = \text{H}$). La estructura completa de la glicofoma Hex 1 en esta cepa (Fig. 9) se determinó mediante RMN sobre LPS-OH (datos no mostrados). El análisis de metilación de la cepa 1158 (mostró, entre otros, D-Glc 6-sustituido y D,D-Hep terminal que se podría atribuir al elemento estructural D- α -D-Hepp-(1 \rightarrow 6)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)-L- α -D-Hepp que se evidenció mediante RMN (datos no mostrados). La glicofoma de LPs principal se encontró que estaba sustituida en Hep II ($R_2 = \alpha$ -D-Glcp) y Hep III ($R_3 = \text{PCho} \rightarrow 6$)- β -D-Glcp). Una estructura tentativa de la glicofoma principal en la cepa 1158 de NTHi se proporciona en la Fig. 10.

Detalles estructurales de la cepa 176 de NTHi. La hidrólisis parcial ácida de LPS con ácido acético diluido produjo un Lípido A insoluble y fracciones de oligosacáridos del núcleo que se separaron mediante GPC (Fig. 11) proporcionando Fr. 1, Fr. 2 y Fr. 3. Los datos del análisis de metilación para estas fracciones se presentan en la Tabla 6. La presencia de Gal 3- y 6- sustituidas y GlcN 4-sustituída en Fr. 1 indicaba la presencia de características estructurales
 5 novedosas para este oligosacárido. EC-IEP-EM sobre Fr. 1 reveló, entre otros, un ion doblemente cargado principal en m/z 1214,0 indicando una glicofoma de peso molecular considerablemente mayor (HMG) en esta fracción que el observado en Fr. 2 y Fr. 3. Se realizó una observación similar para la cepa 285 de NTHi (véase más adelante). El espectro de IEP-EM de Fr. 2 (datos no mostrados) indicó que las glicofomas principales tenían la composición PCho₁-Hex₂-Hep₃-PEtn · AnKdo-ol y PCho₁-Hex₃-Hep₃-PEtn · Ankdo-ol. El IEP-EM para Fr. 3 (datos no mostrados)
 10 indicaron glicofomas principales con las composiciones respectivas Hex₃-Hep₃-PEtn · Ankdo-ol y Hex₄-Hep₃-PEtn · Ankdo-ol.

La estructura de la glicofoma Hex3 en Fr. 2 se podría detallar mediante análisis detallado de ¹H RMN. El espectro de ¹H RMN de Fr. 2 se muestra en la Fig. 12. La señal característica para los grupos metilo de PCho se observó a
 15 δ 3,24. Las resonancias anoméricas de Hep I-Hep III se identificaron a 5,03-5,13, 5,83 y 5,26, respectivamente. Los subespectros correspondientes a Glc I, Glc II y Gal se identificaron en los espectros de 2D COSY y TOCSY a δ 4,56, 4,62 y 4,64, respectivamente. Los datos de desplazamiento químico apuntan a Glc II y Gal que son residuos terminales de acuerdo con los análisis de metilación. El valor desplazado campo abajo para H-6,5' de Glc I a δ 4,3 indica que este residuo está sustituido con PCho en esta posición. Las conectividades de Inter. residuos NOE entre pares de protones
 20 Glc II H-1/Glc I H-4, Glc I H-1/Hep I H-4, 6 (Fig. 13) estableció la secuencia de una unidad de disacárido y su punto de unión a β -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)-(PCho \rightarrow 6)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)-L- α -D-Hepp-(1 \rightarrow . El Interresiduo NOE entre H-1 de Gal y H-3//H-2 de Hep III proporcionó evidencia para la unidad β -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L- α -D-Hepp-(1 \rightarrow . A partir de los datos combinados se puede concluir así que la glicofoma Hex 3 PCho sustituida tiene la estructura 2 (Fig. 14). El análisis de metilación de Fr. 2 mostró una cantidad considerable de Heo terminal y se puede concluir que la glicofoma
 25 de Hex 2 PCho sustituida observada en los espectros IEP-EM tiene la estructura 3 (Fig. 14).

El espectro de ¹H RMN de Fr. 3 se muestra en la Fig. 12. De acuerdo con los datos de IEP-EM es evidente que PCho no se expresa en el grado alto como en Fr. 2 ya que la señal para los protones de metilo de PCho es de baja intensidad. Las señales para los protones anoméricos de Hep I-III resuenan a aproximadamente los mismos desplazamientos
 30 químicos que los correspondientes en Fr. 2. A δ 5,26 se observa la resonancia anomérica de un residuo Glc terminal unido a α (Glc III). la región anomérica para las hexosas unidas a β era más heterogénea que en Fr. 2. Los sistemas de giro de los espectros 2D para los residuos Glc terminales se observaron en δ 4,50 y 4,45. Un residuo Glc 4-sustituido y 2 residuos Gal terminales se identificaron a δ 4,56, 4,61 y 4,54. Los datos de NOE confirmaron la presencia del elemento estructural Glcp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)-L- α -D-Hepp-(1 \rightarrow así como gal unido a Hep III. Además, las
 35 conectividades de NOE confirmaron que el Glc unido a α a unirse a la posición 3 de Hep II. La evidencia combinada conduce a la estructura de la glicofoma Hex 4 como se muestra en la Tabla 4 (Fig. 14). De acuerdo con el análisis de metilación que muestran Hep 2-sustituido y Hep terminal, las glicofomas Hex 4 se concluye que tienen las estructuras 5 y 6 (Fig. 14).

Detalles estructurales de la cepa 486 de NTHi. La estructura del LPS principal de la glicofoma de la cepa 486 de NTHi se estableció siguiendo el uso extensivo de IEP-EM. Los análisis de RMN y de metilación sobre LPS-OH y el material oligosacárido (OS-1) obtenido después de la hidrólisis suave ácida (Fig. 15). Como para la cepa 176, Hep
 40 III se sustituye en la posición O-3. Sin embargo en este caso, mediante un residuo glucosa. el LPs de la cepa 486 de NTHi está altamente dializado con Neu5Ac unido a la β -galactosa terminal de un resto lactosa.

En el espectro de ¹H RMN de LPS-OH, cinco señales discretas de aproximadamente área igual se observaron entre δ 5,8 y 5,0. Tres de estas señales corresponden a las señales H-1 de los tres restos heptosa (Hep I-Hep III) en la región del núcleo interno. La señal anomérica de un resto glucosa unido en α (Glc) se identificó a δ 5,28 (J 3,8 Hz), las
 50 señales anoméricas correspondientes a las hexosas unidas en β se identificaron entre δ 4,52 y 4,42. En el espectro de ¹H RMN de OS-1, resonancias anoméricas de las heptosas así como un sitio de acetilación se observaron a δ 5,83-5,75 (1H, no resuelto) y δ 5,14-5,04 (3H, no resuelto). Una señal intensa correspondiente a los protones metilo de un grupo O-acetilo se observó a δ 2,17, que está correlacionada con una señal ¹³C a δ 21,0 en el espectro HSQC. La secuencia de las glucosas dentro de la región del núcleo interno se estableció a partir de conectividades de NOE
 55 transglicosídicas que relacionan protones anoméricos y aglicónicos en los residuos adyacentes. Las señales para los protones metilo de PCho se observaron a δ 3,21 (LPS-OH) y δ 3,23 (OS-1) y sistemas de giro para protones etileno de este residuo y a partir de PEtn eran similares a las observadas anteriormente (A, Risberg y col., Eur. J. Biochem., 261 (1999) 171-180. Los estudios de correlación deH RMN de LPS-OH y OS-1, demostraron que PCho y PEtn estaban unidos a restos Glc I y Hep II, respectivamente. Las señales características de los protones metileno H-3 de ácido
 60 siálico se observaron a δ 1,79 (H-3_{ax}, J_{3ax,3eq} = 12,3 Hz) y δ 2,73 (H-3_{ax}, J_{3ax,4} = 4,3 Hz en el espectro de ¹H RMN de LPS-OH. El Interresiduo NOE entre H-3_{ax} de Neu5Ac y H-3 de un residuo Gal confirmó que el ácido siálico estaba unido en 2,3 a galactosa como se indica por los análisis de metilación, α -D-Neu5Ac-(2 \rightarrow 3)- β -D-galp-(1 \rightarrow . Varios valores de desplazamiento químico para un número de núcleos en Hep III de OS-1 diferían considerablemente de los desplazamientos químicos correspondientes en LPS-OH. Los desplazamientos campo abajo se obtuvieron para H-2 (0+0,99 ppm), H-1 (+ 0,03 ppm), H-3 (+ 0,22 ppm) y C-2 (+ 1,2 ppm) de Hep III en OS-1, mientras que C-1 (- 3,3 ppm) y C-3 (- 2,5 ppm) se desplazaron campo arriba. De este modo, se indicó que Hep III estaba acetilado en la
 65 posición O-2. El sitio de acetilación se apoyaba también por el experimento de NBC, donde se observó una correlación entre el carbono carbonilo (δ 174,0) y H-2 de Hep III. Además, un pico cruzado se observó entre el carbono carbonilo y los protones metilo del grupo O-acetilo, estableciendo por lo tanto la identidad del sustituyente.

ES 2 284 681 T3

IEP-EM y los análisis de metilación de LPS del mutante *lpsA* de la cepa 486 de NTHi indicaron una ausencia de extensión de cadena desde Hep III. Los análisis de metilación del material O-desacetilado mostró Glc terminal, Hep terminal, Hep 3,4-disustituido, Hep 2,3-disustituido y GlcN 6-sustituido en las proporciones relativas 34 : 39 : 20 : 3 : 4. En el espectro IEP-EM de LPS-OH, se pueden observar dos iones triplemente cargados principales en m/z 812,9/653,9, correspondientes a Pcho · Hex₂ · Hep₃ · PEtn₁₋₂ · P₁ · Kdo₁ · Lípido A-OH.

Las glicofomas de alto peso molecular en las cepas 176 y 285 de NTHi. Después de la hidrólisis ácida suave sobre LPS de la cepa 285 de NTHi, la filtración en gel mostró una fracción secundaria que contenía una glicofoma de mayor peso molecular junto con una fracción principal que contenía la glucoforma mostrada en la Fig. 9. El análisis de azúcar de esta fracción de alto peso molecular (HMW) indicaba D-Glc, D-gal, D-GlcNAc y L,D-Hep y análisis de mutilación proporcionó Gal terminal, gal 3-sustituido, gal 6-sustituido, GlcNAc 4-sustituido; Hep terminal y Hep 2,4-disustituido. EC-IEP-EM mostró, entre otros, un ion doblemente cargado principal a m/z 1052. EM/EM en este ion proporcionó un patrón de fragmentación similar como m/z 1214 observado para HMW de la cepa 176 de NTHi (véase anteriormente). En particular un ion hijo se observó a m/a 692 correspondiente a una composición Pcho-Hex-HexNAc.

Ejemplo 3

Preparación de Anticuerpos monoclonales (MAb) contra doble mutante Rd lic1lpsA de Haemophilus influenzae

Ratones hembra BALB/c, 6-8 semanas de edad, se inmunizaron por vía intraperitoneal con células enteras de *lic1lpsA* de Rd matadas con formalina. Cada ratón recibió 10⁸ células en 0,5 ml de PBS por inyección. Los ratones se reinmunizaron el día 14, 35 y se extrajo una muestra de sangre el día 45. A los dos ratones que muestran la titulación más alta de anticuerpo al homólogo LPS se proporcionaron dos inyecciones finales el día 56, una inyección i.p. como se ha proporcionado anteriormente y una inyección intravenosa en 0,1 ml de PBS. la fusión se realizó tres días después de la última inyección. Células de bazo estimuladas de los dos ratones inmunizados se fusionaron con células de mieloma SP2/O-Ag14 en una relación de 10 : 1 en 33% de PEG1-450. Los híbridos supuestos que sobreviven la selección de hipoxantina/aminopteridin/timina (HAT), se seleccionaron mediante ELISA contra LPS de Rd *lic1lpsA* homólogo y LPS de Rd heterólogo. Los hibridomas que producen anticuerpos de interés se clonaron dos veces usando dilución limitante para asegurar la estabilidad y clonabilidad. la subclase Ig se determinó sobre el sobrenadante gastado usando el kit EIA mouse MaAb isotyping (Amersham Canadá, Oakville, ON). Los clones se expandieron como fluido ascítico mediante inyección intraperitoneal de 10⁶ células de hibridoma en ratones BALB/c 10-14 días después del tratamiento i.p. con 0,5 ml de 2,6,10,14-tetrametilpentadecano (pristano). Se golpeó ligeramente el fluido ascítico 7-14 días después de la inyección.

ELISA indirecto. Sobrenadante de cultivo y fluido ascítico se ensayaron contra LPS purificado en placas de 96 pocillos Nunc maxisorp EIA. Los pocillos se revistieron a 37°C durante 3 horas con 1,0 µl de LPS en 100 µl de tampón carbonato 0,05 M (pH 9,8) que contiene MgCl₂ 0,02 M y después se bloqueó con 200 µl de BSA al 1%-PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar con PBS-T (0,05% de Tween 20), las muestras del cultivo sobrenadante de ascitos, se diluyeron en serie en BSA al 1%-PBS se añadieron e incubaron 1-3 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron después y se añadió IgG anti-ratón de cabra marcada con fosfatasa alcalina (Cedarlane Laboratorios, Hornby, ON), diluida 1 : 3000 en BSA al 1%-PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se desarrollaron con Sistema Sustrato Fosfato p-NPP (Kirkegaard & Perry laboratorios, gaithersberg, MD). Después de 30-60 minutos, las placas se exploraron a 410 nm en un lector de placas Dynatech EIA.

Resultados. La inmunización de los ratones BALB/c con células enteras matadas con formalina de Rd *lic1lpsA*, fusión, y selección de ELISA inicial contra el LPS homólogo y Rd LPS heterólogo dio como resultado el establecimiento de 12 hibridomas. Después del ensayo de los 12 MAb contra un panel de PLS del mutante Rd, dos MAb, LLA5, IgG_{2a}, se eligieron para ensayo posterior. LLA5 se encontró que reacciona de manera cruzada con 14 de 25 LPS de la cadena no tipificable mientras que LLA4 reconocía el LPS homólogo. El análisis estructural reveló que LLA4 detectaba las glicofomas de alto peso molecular mientras que LLA4 estaba unido al epítipo del núcleo i8nterno presente en la cadena homóloga.

Ejemplo 4

Preparación del conjugado Hi Rdlcl1lpsA LPS-OH-BSA

LPS de la cepa *RdlclpsA* se aisló y se purificó mediante el protocolo de extracción de fenol agua y O-desacilado mediante tratamiento con hidracina anhidra de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente. El análisis de azúcar indicó que la parte de oligosacárido del LPS-OH contenía L-glicero-D-mano-heptasa y glucosa como las únicas aldosas detectables. IEP-EM del LPS-OH reveló un ion doblemente cargado en m/z 1056,5 correspondiente a una masa molecular de 2114,9 que es consistente con la composición esperada de Glc(HepIII-PEtn-Kdo-P-Lípido A-OH) (1). ¹H RMN mostró claramente señales anoméricas bien definidas de los residuos heptosa a 5,16 (Hep), 5,15 (Hep III) y 5-76 ppm (Hep II) para el resto triheptosilo conservado similar al de LPS-OH observado para el mutante individual *RdlpsA* (Ejemplo 1). No era detectable ninguna señal debida a resonancias de metilo de Pcho(Risberg y col., Eur. J. Biochem. 261: 171-180, 1999) en el ¹H RMN.

Ejemplo 5

Inmunización con conjugado carbohidrato (CHO)-BSA seguido de CHO no conjugado

5 El LPS-OH del previo ejemplo se puede conjugar a BSA de acuerdo con el procedimiento descrito en Gu y col., Infect. Immun. 64: 4047-4053, 1996. Como alternativa, se puede conjugar a BSA mediante el grupo carboxilo de Kdo con M_2C_2H (4(4-N-maleimidometil)ciclohexano 1-carboxil hidracida. $\frac{1}{2}$ dioxano) de acuerdo con el procedimiento desarrollado por Wei Zou del Consejo de Investigación Nacional de Canadá como se describe en la figura C. En resumen, LPS-OH se conjugó a BSA mediante la activación selectiva del grupo carboxilo de Kdo con EDC y el uso
10 de la estrategia de engarce mostrado en el esquema anterior.

Ratones hembra BALB/c, de 6-8 semanas de edad, se inmunizaron por vía intraperitoneal con conjugado Rd liposA odA LPS-BSA. Cada ratón recibió 2 μ g de carbohidrato en 0,2 ml de adyuvante completo Ribis (Cerdalane Laboratories Ltd, Hornby, ON) por inyección. Los ratones se reinmunizaron el día 21 y 42, con una cantidad equivalente de vacuna de conjugado. el día 137 recibió una inyección i.p. final que contenía 10 μ g de LPS de 1.003 lic1lpsA odA en Ribis y se recogió suero el día 147.
15

Ejemplo 6

20 *Preparación de anticuerpos monoclonales LLA4 y LLA5 contra cepas de Haemophilus influenzae*

Cepas con mutaciones definidas en la maquinaria biosintética de LPS se puede usar para producir anticuerpos monoclonal (Mabs) a estructuras de oligosacáridos de LPs definidas. Se indujeron Mabs murinos contra cepas mutantes de *H. influenzae* que contienen el resto del núcleo interno conservado. Por ejemplo, ratones BALB/c se inmunizaron con células enteras matadas con formalina de Rdlic1lpsA. La selección inicial ELISA contra el LPS homólogo y LPS de Rd heterólogo dio como resultado el establecimiento de 12 hibridomas. Después del ensayo de los 12 MAb contra un panel de LPS del mutante Rd, dos MAb, LLA5, IgG_{2a} y LLA4, IgG2b, se eligieron para el ensayo posterior.
25

30 LLA4 se encontró que reconoce un epítipo del núcleo interno presente en la cepa homóloga. En el ensayo ELISA, LLa5 mostró reactividad cruzada con LPS purificado de una cepa mayoritaria de una colección de cultivo genéticamente diversa (14 de 25 cepas no tipificable) (Tabla 1). El epítipo reconocido por Mab LLA5 estaba presente en el mutante individual Rdlic1lpsA y el doble mutante Rdlic1lpsH más truncado que carece del residuo Hep III (Tabla 2). El epítipo LLA5 no está presente en LPS del mutante individual, RdltgF. Como se ha mencionado anteriormente el gen lgtF se requiere para adición del residuo β -D-Glc en la posición 4 de Hep I.
35

Sorprendentemente, una comparación del LPS de las 25 cepas mediante técnicas de análisis estructurales conocidas en la técnica indicaban que Mab LLA5 detectaba un epítipo de oligosacárido que contiene lacto-N-neotetraosa (LNnT) que proviene de la extensión de cadena de la unidad Hep I del resto del núcleo interno. Las cepas que no se reconocían, por Mab LLA5 se caracterizaban por la ausencia de las extensiones de cadena que contienen LNnT. Las cepas de *H. influenzae* que expresan la extensión de cadena que contiene LNnT solamente se expresan en un grado menor en condiciones de crecimiento de laboratorio convencionales. No se identificó previamente en la cepa Rd debido a los niveles de baja expresión (Risberg y col., Eur. J. Biochem., 261: 717-180. 1999). Ahora se ha aislado y caracterizado liberando el oligosacárido del núcleo del LPS de la cepa Rd (RM 118) mediante hidrólisis ácida suave y separación sobre cromatografía de permeación en gel en Biogel P-4. (Fig. 11), procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. La fracción de oligosacáridos del núcleo que contiene LNnT eluye como una "fracción HMW" marcada con el componente de alto peso molecular. existe un componente secundario comparado con el pico más grande (centrado a 400) que comprendía las glicofomas principales identificadas para la cepa Rd (Risberg y col., 1999 anteriormente). El oligosacárido del núcleo HMW de la cepa rd se caracterizó por tener extensiones de cadena que contienen LNnT de Heo I mediante técnicas de espectrometría de masas en tándem. (EM/EM) (Thibault y Richards, en Methods in Molecular Biology, vol. 145, 145, Bacterial toxins: Methods and Protocols (Holst, O. ed) p. 327-344, Humana Press, 1999 y las referencias en ese documento). El patrón de fragmentación en el IEP-EM/EM era indicativo de la presencia de la cadena de oligosacáridos LNnT que tiene la secuencia Gal-GlcNAc-gal-Glc y se tapó mediante la unidad de azúcar terminal, Petn-GalNAc (Fig. 8).
40
45
50
55

Cuando la cepa Rd se hace crecer en medio que contiene ácido siálico, se expresa la glicofoma de LPS que contiene los oligosacáridos sialilizados. El solicitante ha encontrado silalilactosa que tiene la estructura α -Neu5Ac (2 \rightarrow 3)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glc unido como una extensión de oligosacárido de Hep III. Además esta extensión de oligosacárido se ha identificado en varias cepas de NTHi. El gen de fase variable lic3A codifica la sialiltransferasa que añade CMP-Neu5Ac al aceptor de lactosa. Los análogos dializados de las extensiones de cadena LNnT son detectables en el LPS en la cadena de Rd cuando el organismo se hace crecer en las condiciones descritas. Las extensiones de cadena de oligosacáridos de LNnT sialilizado del LPS del núcleo interno que tienen la estructura α -Neu5Ac (2 \rightarrow 3)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glc son fácilmente detectables en el doble mutante RdltgClic3A por EP-EM de LPS O-desacilado. Los inventores han confirmado que la estructura de LPS en el núcleo interno conservado tiene extensiones de cadena que contienen LNnT sialilizado usando técnicas EM/EM, técnicas de resonancia magnética nuclear de campo alto, y análisis de mutilación, todos los cuales son procedimientos de análisis estructurales conocidos por los expertos en la técnica. Los inventores han encontrado que *H. influenzae* utiliza un
60
65

ES 2 284 681 T3

mecanismo de bloqueo para añadir las extensiones de cadena del oligosacárido que contiene LNnT que implica los genes del locus *rfb*. Existe una correlación absoluta entre la presencia del gen *rfb* y la formación de LNnT en todas las cepas de *Hi* investigadas.

5 El LPS de las cepas de NTHi que son reactivas con Mab LLA5 también muestran una fracción de alto peso molecular (HMW) en los cromatogramas de permeación en gel después de la hidrólisis ácida suave. Por ejemplo, LPs de la cepa 285 de NTHi muestra la fracción secundaria de HMW para la que la presencia de extensiones de cadena que contienen LNnT, también bloqueadas por una unidad Petn-GalNAc, se caracterizan a partir de fragmentación de EM/EM (Fig. 8). la confirmación adicional para esta extensión de cadena de oligosacáridos que contienen LNnT
10 se obtuvo a partir de un experimento de EM/EM/EM. No se encuentra ninguna fracción detectable de HMW en los hidrolizados de cepas que son LLA5 - no reactivas, por ejemplo la cepa 1247 de NTHi (tabla 7).

15

TABLA 1

Genes relacionados con LPS investigados en la cepa RM 118 en este estudio

20 Los números HI son las designaciones de ORF proporcionadas por TIGR para la base de datos de la secuencia del genoma de *H. influenzae*. Los genes proporcionados en letra negra son los seleccionados para el análisis comparativo detallado de las glicofomas de LPS expresadas.

Gen	Nº. de HI	Referencia
kdtA	0652	6
lgtC	0259	6
lgtD	1578	6
lpsA	0765	6
orfZ	0260.1	6
opsX	0261	6
orfH	0523	6
rfaF	1105	6
lic2A	0550	9
lic1	1537 - 1540	7
lgtF	0653	Este estudio
cld	0866	6
galU	0812	6
kfiC	0868	6
lsgI	0867	6
orfM	0260	6
orfE	0869	6
orfO	0870	6

60

65

ES 2 284 681 T3

orfY	0871	6
pgmB	0740	6
pgmC	1337	6
rfe	1716	6
rfbP	0872	6
rfbB	0873	6

6. Hood, D. W., Deadman, M. E., Allen, T., Masoud, H., Martín, A.; Brisson, J. R., Fleischmann, R., Venter, J. C, Richards, J. C., y Moxon, E. R. (1996) Mol. Microbiol. 22, 951-965.

7. Weiser, J. N., Maskell, D. J., Butler, P. D., Lindberg, A. A., y Moxon, E. R. (1990) J. Bacteriol. 172, 3304-3309.

9. High, N. J., Deadman, M. E., y Moxon, E. R. (1993) Mol. Microbiol. 9, 1275-1282.

TABLA 2

Datos de IEP-EM de ion negativo y composiciones propuestas de LPS O-desacilado de la cepa Rd de *H. influenzae* y mutantes. Se usaron unidades de masa media para el cálculo del peso molecular basándose en la composición propuesta como sigue: Lípido A-OH, 953,00; Hex, 162,15; HexNAc, 203,19; Hep, 192,17; Kdo-P, 300,16; PEm), 123,05. PCho, 165,05

Cepa	Iones observados		Masa molecular		Intensidad relativa ^b	Composición propuesta
	(M - 2H) ²⁻	(M - 3H) ³⁻	Observada	Calculada		
OpsX ^a	616,0	-	1234,0	1235,1	80,0	Kdo - P, Lípido A - OH - (-H ₂ O) ^c ,
	625,0	-	1252,0	1253,1	20,0	Kdo - P, Lípido A - OH
rfaF	721,6	-	1445,1	1445,3	100,0	Hep, Kdo - P, Lípido - A - OH
orfH	817,5		1637,5	1637,5	10,6	2Hep, Kdo - P, Lípido A - OH

ES 2 284 681 T3

5		879,2	-	1760,4	1760,5	42,4	2Hep, PEtn, Kdo - P, Lipido A - OH
10		940,5	-	1883,4	1883,6	15,2	2Hep, PEtn, Kdo - P, Lipido A - OH
15		1042,3	-	2087,5	2087,7	21,2	PCho, Hex, 2Hep, PEtn, Kdo - P, Lipido A - OH
20		1104,8	-	2211,6	2210,8	10,6	PCho, Hex, 2Hep, 2PEtn, Kdo - P, Lipido A - OH
25		1104,8	-	2211,6	2210,8	10,6	PCho, Hex, 2Hep, 2PEtn, Kdo - P, Lipido A - OH
30	lpsA	1056,3	-	2114,7	2114,9	10,3	Hex, 3Hep, PEtn, Kdo - P, Lipido A - OH
35		1139,0	759,0	2280,1	2279,9	69,0	PCho, Hex, 3Hep, PEtn, Kdo - P, Lipido A - OH
40		1200,4	800,0	2403,0	2403,0	20,7	PCho, Hex, 3Hep, 2PEtn, Kdo - P, Lipido A - OH
45		1200,4	800,0	2403,0	2403,0	20,7	PCho, Hex, 3Hep, 2PEtn, Kdo - P, Lipido A - OH
50	lic2A	1137,5	758,3	2277,5	2277,1	18,0	2Hex, 3Hep, PEtn, Kdo - P, Lipido A - OH
55		1220,0	813,3	2442,5	2443,1	51,0	PCho, 2Hex, 3Hep, PEtn, Kdo - P, Lipido A - OH
60		1281,9	854,3	2565,8	2566,1	31,0	PCho, 2Hex, 3Hep, 2PEtn, Kdo - P, Lipido
65							

ES 2 284 681 T3

5						A - OH PCho, 3Hex, 3Hep, PEtn, Kdo - P, Lípido A - OH	
10	lgtC	130,1	867,1	2604,3	2604,3	80,0	
15		1362,7	908,2	2727,4	2727,3	20,0	PCho, 3Hex, 3Hep, 2PEtn, Kdo - P, Lípido A - OH
20	lgtD	1300,6	867,1	2603,9	2604,3	62,0	PCho, 3Hex, 3Hep, PEtn, Kdo - P, Lípido A - OH
25		1362,0	-	2726,0	2727,3	5,0	PCho, 3Hex, 3Hep, 2PEtn, Kdo - P, Lípido A - OH
30		1381,6	921,2	2765,5	2766,3	28,0	PCho, 4Hex, 33acp, PEtn, Kdo - P, Lípido A - OH
35		1443,3	962,1	2888,9	2889,4	5,0	PCho, 4Hex, 3Hep, 2PEtn, Kdo - P, Lípido A - OH
40	lgtF	1137,4	757,8	2276,6	2277,1	18,0	2Hex, 3Hep, PEtn, Kdo - P, Lípido A - OH
45		1218,6	812,2	2439,4	2439,2	18,0	3Hex, 3Hep, PEtn, Kdo - P, Lípido A - OH
50		1280,0	853,2	2562,3	2562,3	10,0	3Hex, 3Hep, 2PEtn, Kdo - P, Lípido A -
55							
60							
65							

ES 2 284 681 T3

	1462,5	974,6	2927,0	2927,5	15,1	HexNAc, 4Hex, 3Hep, 2PEtn, Kdo - P, Lípido A - OH
--	--------	-------	--------	--------	------	---

^a Datos adquiridos por EC-IEP-EM sobre un instrumento de cristal Modelo 310CE con interfase a un espectrómetro de masas triple cuadrupolar (Perkin-Elmer/Sciex) equipado con una columna capilar de sílice condensada sencilla y usando acetato de morfolina 30 mM (pH 9,0) que contiene metanol al 5% como tampón de separación como se ha descrito (30).

^b Medido a partir de los iones moleculares respectivos en el espectro reconstruido.

^c El ion principal observado correspondía al ion molecular-18 (pérdida de agua).

TABLA 3

Datos de análisis de enlace para el LPS derivado de RM 118 de *H. influenzae* mutada en los genes de biosíntesis de LPS

Azúcar metilado ^a	Tgm ^b	Respuesta de detector relativa para la cepa mutante						Asignación de enlace
		orfH	lpsA	lic2A	lgtC	lgtD	lgtF	
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	1,00	-tr ^c	6,7	22,5	tr	tr		D-Glcp- (1→
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	1,05	-tr			34,3	22,9	10,3	D-Galp- (1→
2,3,6-Me ₃ -Glc	1,18	-tr		6,3	33,0	24,4	18,8	→ 4)-D-Glcp- (1→
2,3,6-Me ₁ -Gal	1,17					12,4	16,6	→ 4)-D-Galp- (1→
2,4,6-Me ₃ -Gald	1,20	5,0	12,4	5,4	tr	4,0	10,3	→ 3)-D-Galp- (1→
2,3,4,6,7-Me ₅ -Hep	1,30	27,4	35,4					L,D-Hepp- (1→

ES 2 284 681 T3

3,4,6,7- Me ₄ -Hep	1,44			53,3	15,8	16,0	16,3	→ 2)-L,D- Hepp- 1→
2,4,6,7- Me ₄ -Hep	1,47	37,0					19,7	→ 3)-L,D- Hepp- 1→
2,6,7- Me _j -Hep	1,52	23,7	45,4	12,5	10,6	17,1		→ 3,4)- L,D- Hepp- 1→
2,3,4,6- Me ₄ - GalN	1,58						8,0	D- GalpNAc-1 (1→
<p>^a 2,3,4,6- Me₄-Glc representa 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol-1-d₁, etc</p> <p>^b Tiempos de retención (T_{gm}) se reseñan con relación a 2,3,4,6-Me₄-Glc y los valores no están corregidos para las diferencias en factores de respuesta del detector</p> <p>^c Cantidad pequeña detectada.</p> <p>^d Todas las muestras mostraron niveles detectables de 2,4,6-Me₃-Gal</p>								

TABLA 4

Estructuras de las glicofomas de LPS principales de incremento de la longitud de cadena de oligosacárido desde Hep III en cepas mutantes de RM 118 de *H. influenzae*

Estructura	Glicofoma	Cepa (s) mutante (s)	Patrón de sustitución (R ³)
3	Hex1	lpsA	H
4	Hex2	lic2A	βD-Glcp
5	Hex3	lgtC, lgtD	β-D-Galp-(1 → 4)- β-D-Glcp
6	Hex4	lgtD	α-D-Galp-(1 → 4)- β-D-Gal-(1 → 4)- β-D-Glc

ES 2 284 681 T3

TABLA 5

Similaridades estructurales compartidas por glucolípidos de *Haemophilus* y de seres humanos

Glicolípido	Estructura de oligosacárido
Celobiosa	β -D-Glcp-(1 → 4)- β -D-Glcp(1 →
Lactosa	β -D-Galp-(1 → 4)- β -D-Glcp(1 →
Globósido	α -NeuAc(2 → 3)- β -D-Galp(1 → 3)- β -D-Glcp(1 →
Globotetraosa	α -D-Galp(1 → 4)- β -D-Galp(1 → 4)- β -D-Glcp(1 →
Paraglobósido	β -D-GalNAcp(1 → 3)- α -D-Galp(1 → 4)- β -D-Galp(1 → 4)- β -D-Glcp(1 →
	α -NeuAc(2 → 3)- β -D-Galp(1 → 4)- β -D-GlcpNAcp(1 → 3)- β -D-Galp(1 →

TABLA 6

Datos de IEP-EM de ion negativo y composiciones propuestas para las glicofomas principales en LPS O-desacilado de las cepas 176, 486, 285 y 1158 de NTHi. Un asterisco (*), indica las predominancias

Cepa	Iones observados (m/z)		Peso molecular (Da)		Cr propuesto
	(M - 4H) ⁴⁻	(M - 3H) ³⁻	Observado	Calculado ^a	
176	608,8	811,9	2439,2	2439,2	Hex ₃ ·Hep ₃ ·PEtn ₁ ·P ₁ ·Kdo ₁
	609,5	813,0	2442,0	2442,2	PChO·Hex ₂ ·Hep ₃ ·PF-tn ₁
	639,6	853,0	2562,4	2562,1	Fl- Hex ₃ HepHep ₃ ·PETn ₂
	640,4	853,8	2565,6	2565,3	P ₁ ·Kdo ₁
	650,0	867,0	2604,0	2604,3	PChO·Hex ₂ ·Hep ₃ ·PEm ₁ ·P ₁
	680,9 *	908,3	2727,6	2727,3	PChO·Hex ₃ ·Hep ₃ ·PEn ₁ ·P ₁ PChO·Hex ₃ ·Hep ₃ ·Pen ₂ ·P ₁
486	690,4	920,8	2765,5	2766,4	PChO·Hex ₄ ·Hep ₃ ·PEtn ₁ ·P ₁
	721,2 *	961,8	2888,6	2889,5	PChO·Hex ₄ ·Hep ₃ ·PEm ₂ ·P ₁
	763,2	1017,9	3056,8	3057,7	Neu5Ac·PChO·Hex ₄ ·Hep ₃ ,
	793,9	1059,1	3180,0	3180,7	Neu5Ac·PChO·Hex ₄ ·Hep ₃ ,
285	568,9	758,7	2279,5	2280,0	PChO·Hex ₁ ·Hep ₃ ·PEtn ₁ ·P ₁
	599,6 *	799,8	2402,3	2403,1	PChO·Hex ₁ ·Hep ₃ ·PEtn ₁ ·P ₁
1158	657,7	877,4*	2634,8	2634,4	PChO·Hex ₂ ·Hep ₄ ·PEtn ₁ ·P ₁
	688,6	918,3	2758,4	2757,4	PChO·Hex ₂ ·Hep ₄ ·PEtn ₂ ·P ₁
	699,0	932,5	2800,0	2799,5	PChO ₂ ·Hex ₁ ·Hep ₃ ·PEtn ₁ ·P ₁

^a Se usaron unidades de masa media en el cálculo de los pesos moleculares.

ES 2 284 681 T3

TABLA 7

Datos de análisis de enlace para LPS de las cepas 176, 486, 285 y 1158 de NTHi y oligosacáridos derivados de LPS de la cepa 176 de NTHi

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Azúcar metilado ^a	Respuesta del detector relativa						
	Cepas de NTHi				176 derivada de NTHi		
	176	486	285	1158	LPS-P ^b	Fr.1 ^c	Fr.2
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	22	16		7	13	15	26
2,3,4,6-Me ₄ -Gal			2	8	10	16	22
17 16							
2,3, 6-Me ₃ -Glc 6		27		15	14	7	2
2,3, 6-Me ₃ -Gal			2	6		2	
2,4, 6-Me ₃ -Gal	5	7	1	5	1	13	3
2,3, 4-Me ₃ -Glc			1	11	1	1	
2,3, 4-Me ₃ -Gal						6	
2,3, 4,6,7-Me ₅ -Hep				11		1	
2,3, 4,6,7-Me ₅ -Hep			52		1		5
3, 4,6,7-Me ₄ -Hep	1		4	13	12		
2, 4,6,7-Me ₅ -Hep	22	12			12	12	19
2, 6,7-Me ₃ -Hep	22	14	34	16	26	16	23
4,6,7-Me ₃ -Hep	2	5				1	
2,3, 6-Me ₄ -GlcN						6	
2,3, 4-Me ₄ -GlcN	2	2	4				
^a 2,3,4,6- Me ₄ -Glc representa 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol-1-d ₁ , etc ^b LPS - P representa LPS - OH desfosforilado ^c Fr.1 representa muestra de alto peso molecular (HMG) de 176 de NTHi obtenida después de la hidrólisis ácida suave							

ES 2 284 681 T3

TABLA 8

Suero del día 17 de LPS de Rd lic1lpsA odA-BSA más 1003 lic1lpsA odA y LLA5 MAb contra LPS de cepas mutantes y no tipificable de *Haemophilus*

Cepas	EIA DO ₄₁₀		
	suero nº. 1	suero nº. 2	LLA5
1003 lic1lpsA odA	1,329	1,575	-
Rd lic1lpsA odA	0,746	0,742	1,414
1268	1,143	0,240	1,371
1247	0,571	0,250	-
1209	0,870	0,162	0,988
1233	0,436	0,135	1,451
1181	0,702	0,244	1,452
1232	0,568	0,270	1,661
981	0,474	0,182	-
486	0,512	0,287	-
1292	0,433	0,184	1,675
1008	0,830	0,172	-
1158	0,763	0,154	-
1124	0,524	0,127	-
1003	2,014	0,914	
667	0,606	0,252	1,239
285	0,658	1,350	1,334
176	0,360	0,237	1,444
162	0,462	0,251	1,388
1180	0,974	0,254	1,464
1559	0,874	0,128	-
723	> 2,500	1,253	-
1231	> 2,500	1,008	1,404
1200	1,206	0,186	1,420
1207	0,667	0,137	1,040
432	0,530	0,159	-
375 de tipo salvaje	1,860	0,946	-

ES 2 284 681 T3

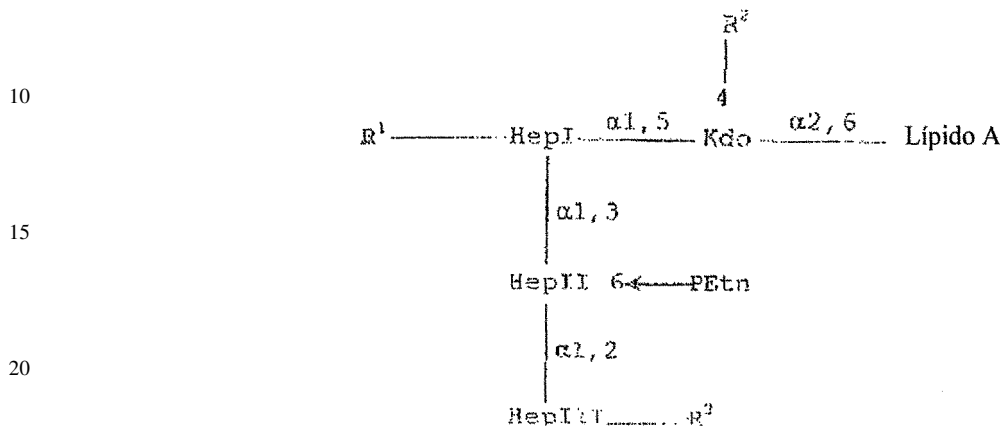
TABLA 9

LPS MUTANTE	LLA5 MAb
	EIA DO ₄₁₀
Rd lic1IpsA odA	0,889
Rd IpsA	1,630
Rd licIorfH	1,216
Rd IgtF	-

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

REIVINDICACIONES

1. Un resto de lipopolisacárido aislado que consta de un resto del núcleo interno de triheptosilo que tiene la estructura II:



en la que R¹ es hidrógeno, β-D-Glcp (1 → 4); o PCho → 6)-β-D-Glcp (1 → 4); R² es fosfato (P) o pirofosfoetanolamina (P-PEtn); R³ es hidrógeno, β-D-Glcp o β-D-Galp,

y cuando R¹ es hidrógeno o β-D-Glcp (1 → 4), entonces R³ también puede ser β-D-Galp (1 → 4)-β-D-Glcp, α-D-Galp (1 → 4) β-D-Galp (1 → 4)-β-D-Glcp β-D-GalpNac-(1 → 3)-α-D-Galp (1 → 4) β-D-Galp (1 → 4)-β-D-Glcp, o α-NeuAc (2 → 3)-β-D-Galp (1 → 4)-β-D-Glcp (1 → 3), en la que R³ está unido a o bien la posición O-3 u O-2 de Hep III; y

Kdo es ácido 3-desoxi-D-mano-2-octulosónico; y

Lípido A está destoxificado.

2. Una composición farmacéutica que comprende el resto de lipopolisacárido de la reivindicación 1 junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

3. La composición farmacéutica de la reivindicación 2 en la que el vehículo farmacéuticamente aceptable es inmunogénico.

4. Un anticuerpo que específicamente se une al resto de lipopolisacárido de la reivindicación 1.

5. Un procedimiento para la producción y recogida de un anticuerpo de reactividad cruzada contra *Haemophilus influenzae* que comprende:

- (a) generar anticuerpos contra el resto de lipopolisacárido de la reivindicación 1;
- (b) ensayar tales anticuerpos contra una pluralidad de cepas de *Haemophilus influenzae*;
- (c) y seleccionar los anticuerpos que tienen reactividad cruzada.

6. El procedimiento de la reivindicación 5 en el que el *Haemophilus influenzae* es *Haemophilus influenzae* no tipificable.

7. Uso de la composición de la reivindicación 2 ó 3 para la preparación de un medicamento en el tratamiento de una enfermedad provocada por infección con *Haemophilus influenzae*.

8. El uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el *Haemophilus influenzae* es *Haemophilus influenzae* no tipificable.

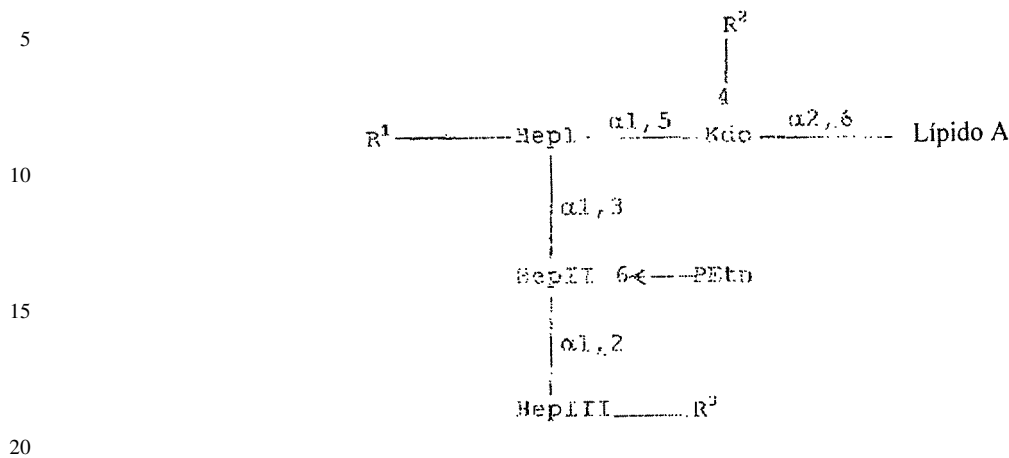
9. El uso de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en el que la enfermedad se selecciona entre el grupo constituido por otitis media, meningitis, neumonía, e infección del tracto respiratorio.

10. El N° de acceso ISAC 250801-1 de la cepa de Rd lic1lpsA de *Haemophilus influenzae*.

11. El N° de acceso ISAC 250801-2 de la cepa de 1003 lic1lpsA de *Haemophilus influenzae*.

ES 2 284 681 T3

12. Un procedimiento para preparar un resto de lipopolisacárido que consta de un resto del núcleo interno de triheptosilo conservado que tiene la estructura II:



en la que

R^1 es hidrógeno, β -D-Glcp (1 \rightarrow 4), o PCho \rightarrow 6)- β -D-Glcp (1 \rightarrow 4);

25 R^2 es fosfato (P) o pirofosfoetanolamina (P-PEtn);

R^3 es hidrógeno, β -D-Glcp, β -D-Galp, β -D-Galp (1 \rightarrow 4)- β -D-Glcp, α -D-Galp (1 \rightarrow 4)- β -D-Galp (1 \rightarrow 4)- β -D-Glcp, y cuando R^1 es hidrógeno o β -D-Glcp (1 \rightarrow 4), entonces R^3 también puede ser β -D-GalpNac-(1 \rightarrow 3)- α -D-Galp (1 \rightarrow 4)- β -D-Galp (1 \rightarrow 4)- β -D-Glcp, o α -NeuAc (2 \rightarrow 3)- β -D-Galp (1 \rightarrow 4)- β -D-Glcp (1 \rightarrow 3), en la que R^3 está unido a o bien la posición O-3 u O-2 de Hep III; y

30

Kdo es ácido 3-desoxi-D-mano-2-oculosónico; comprendiendo dicho procedimiento:

- 35
- transformar una cepa bacteriana de *Haemophilus influenzae* receptora con uno o más genes inactivados seleccionados entre el grupo constituido por lpsA, lic1, lic2, lic2A, lic2orf3, lic2B, lic3A, lgtC, lgtD, y lgtF;
 - cultivar la cepa bacteriana de *Haemophilus influenzae* transformada en condiciones adecuadas para expresar el resto de lipopolisacárido;

40

 - aislar el resto de lipopolisacárido; y
 - destoxificar la parte del Lípido A del resto de lipopolisacárido.

45 13. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12 en el que el *Haemophilus influenzae* es *Haemophilus influenzae* no tipificable.

50 14. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5 en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que se une al resto del núcleo interno triheptosilo conservado como se define en la reivindicación 1.

55 15. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12 ó 13, que comprende además la identificación del resto lipopolisacárido poniendo en contacto el resto de lipopolisacárido con un anticuerpo monoclonal específico para un epítipo expresado después de la inactivación de uno o más genes seleccionados entre el grupo constituido por lpsA, lic1, lic2, lic2A, lic2orf3, lic2B, lic3A, lgtC, lgtD, lgtF, rfaF y orfH.

16. El procedimiento de la reivindicación 15 que comprende al anticuerpo monoclonal producido de acuerdo con la reivindicación 14.

60 17. Un glicoconjugado que comprende:

el resto de lipopolisacárido de acuerdo con la reivindicación 1 y un vehículo inmunogénico reticulado al resto de lipopolisacárido.

65 18. El glicoconjugado de acuerdo con la reivindicación 17 en el que el resto de lipopolisacárido y el vehículo inmunogénico están reticulados con una molécula de engarce.

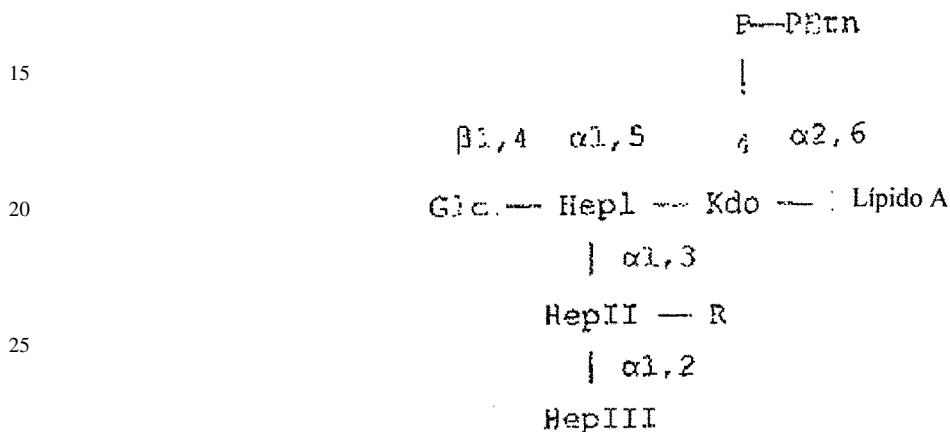
ES 2 284 681 T3

19. El glicoconjugado de acuerdo con la reivindicación 18 en el que la molécula de engarce se selecciona entre el grupo constituido por dihidrazida del ácido adípico, ácido epsilon aminohexanoico, clorohexanol dimetil acetal, D-glucuronolactona y p-nitrofenil amina.

5 20. El glicoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19 en el que el vehículo es TT o NTHi HMP.

21. Una composición de vacuna que comprende uno o más glicoconjugados de una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 20 y un adyuvante.

10 22. La composición de vacuna de la reivindicación 21, en la que la vacuna se formula en forma de un liposoma.



en la que R es hidrógeno o fosfoetanolamina, Glc es D-glucopiranososa, Kdo es ácido 3-desoxi-D-mano-2-octulosónico y P-PEtn es pirofosfoetanolamina.

35

40

45

50

55

60

65

Figura B
 IEP - EM / EM en m/z 1236 (2 +) que proporciona evidencia para la estructura de la forma HMW en RM 118

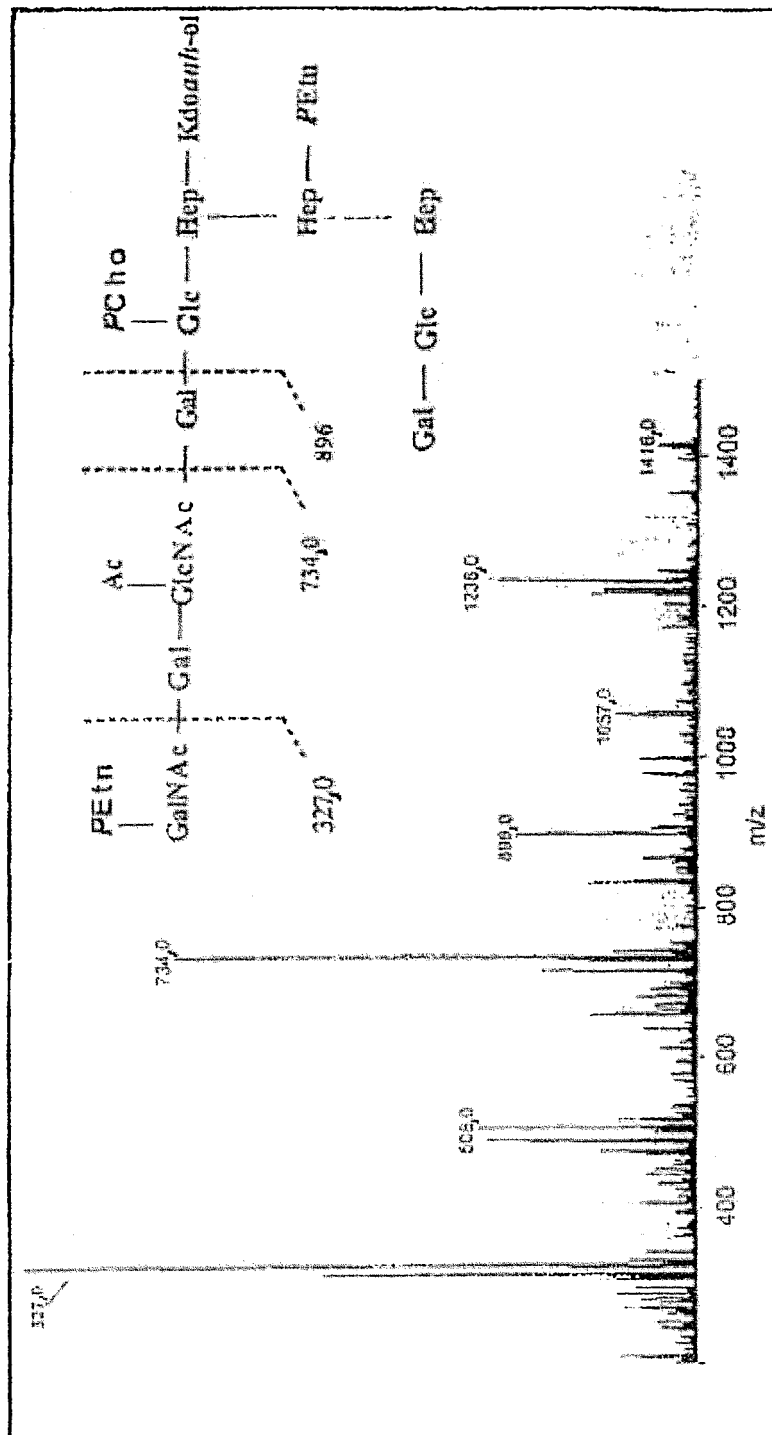
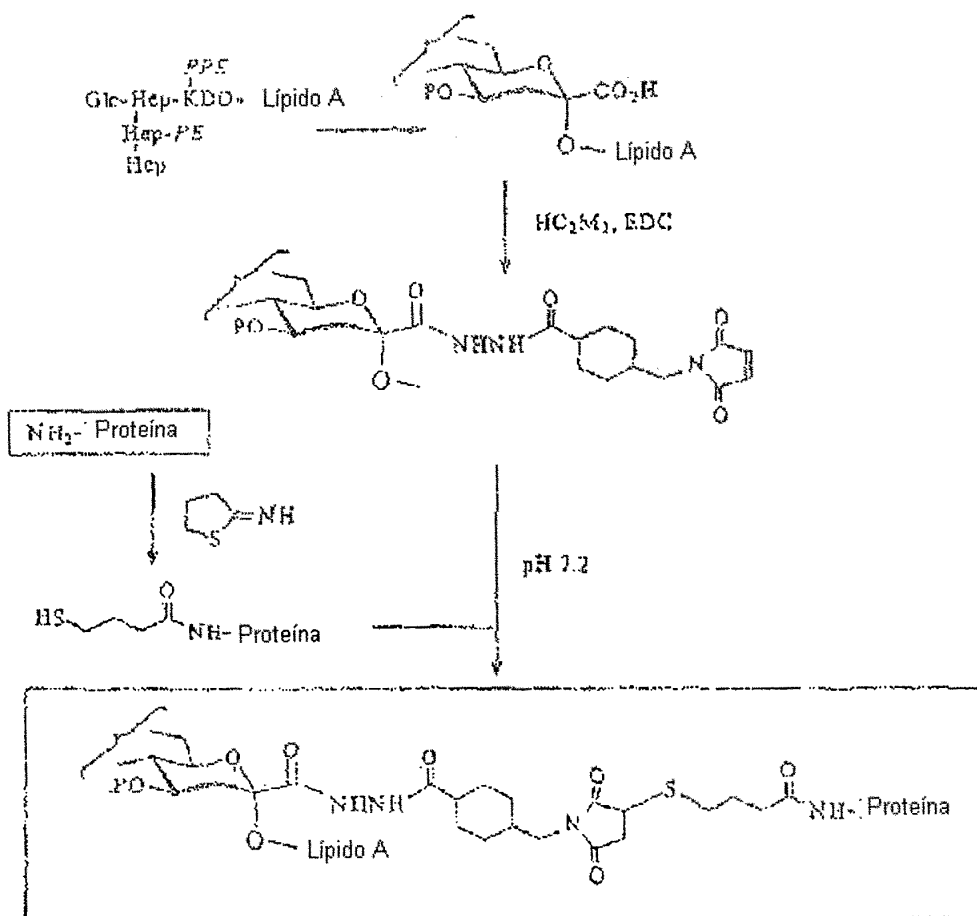


Figura C

Esquema XX: Etapas requeridas para la conjugación de LPS - OH de la cepa Rdlic1psA de *H. influenzae* a una proteína vehículo (BSA en el presente ejemplo).



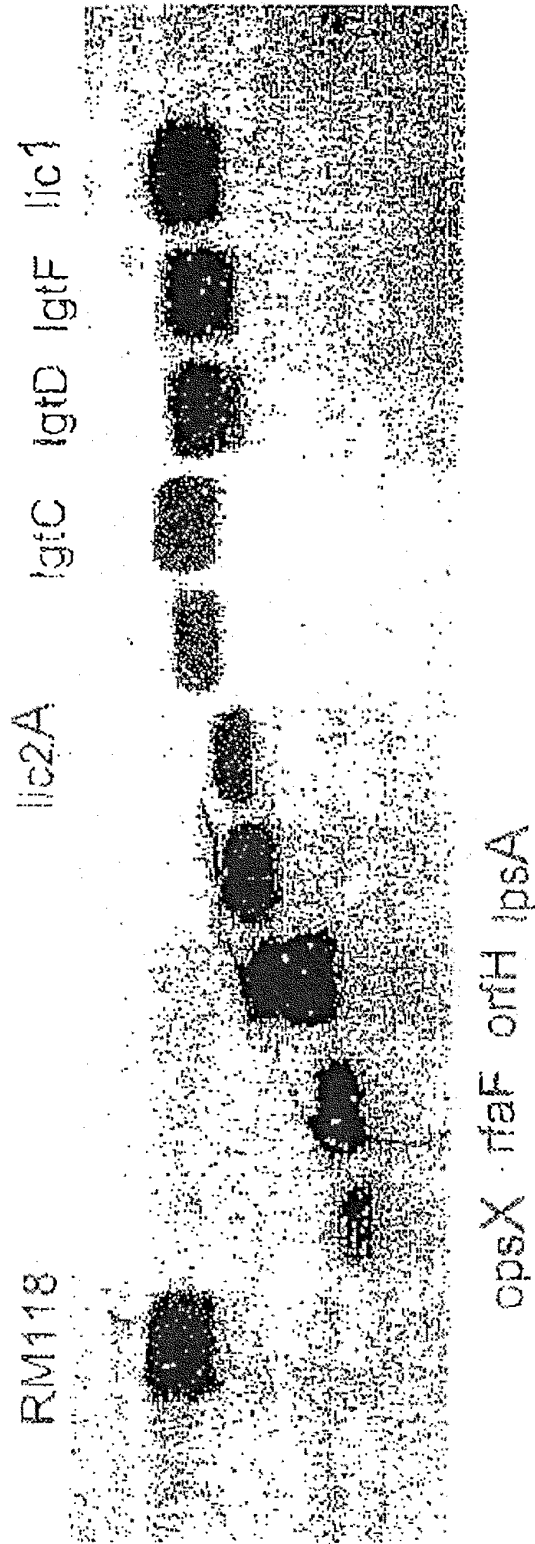


Fig. 1

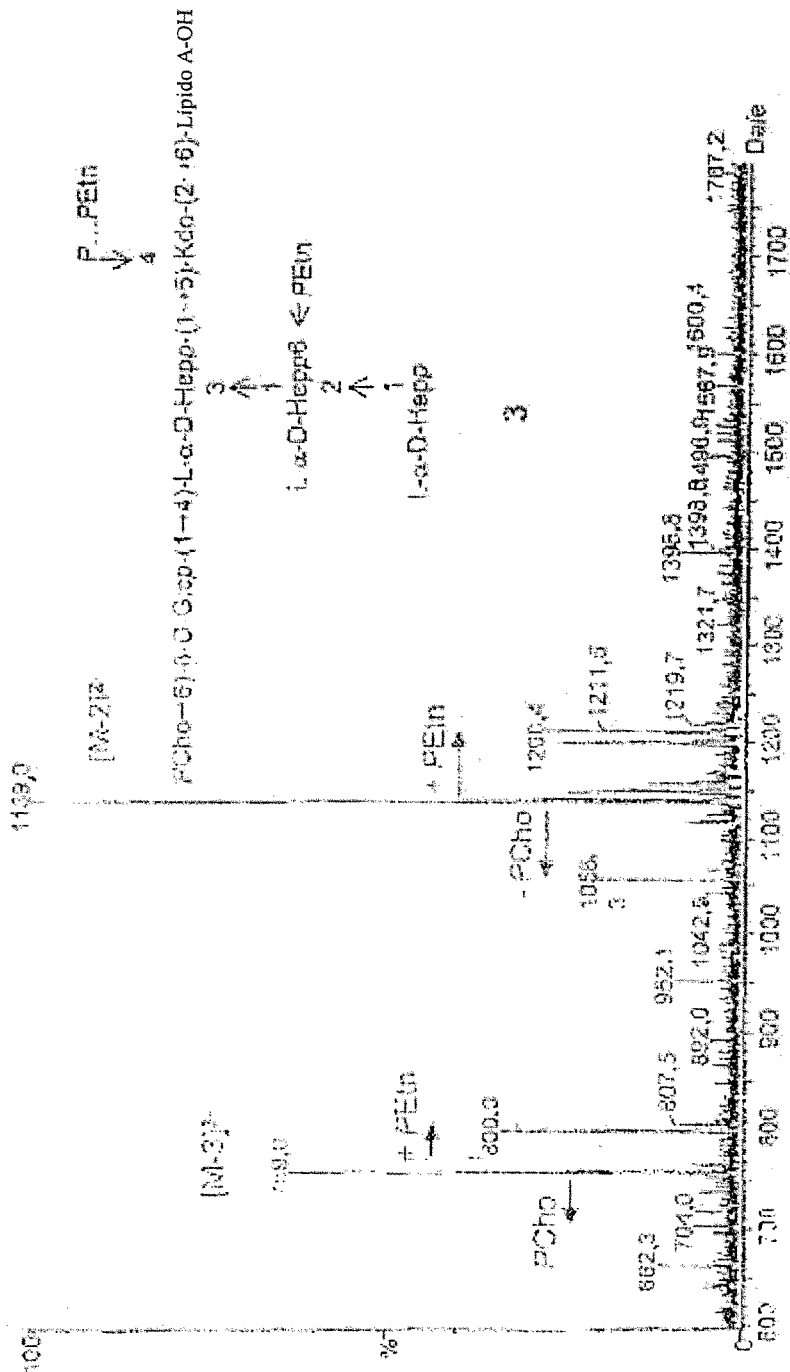


Fig. 2

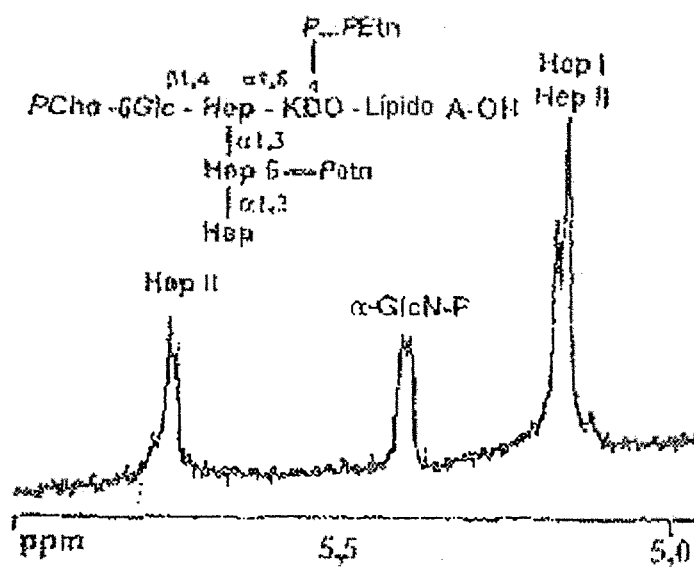


Fig. 3

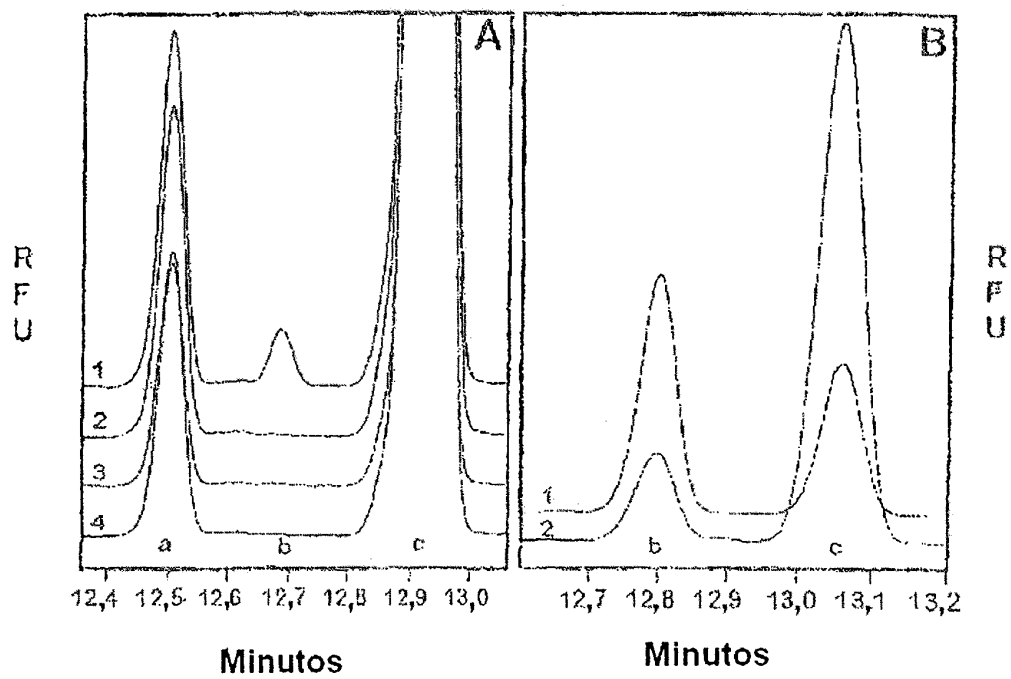
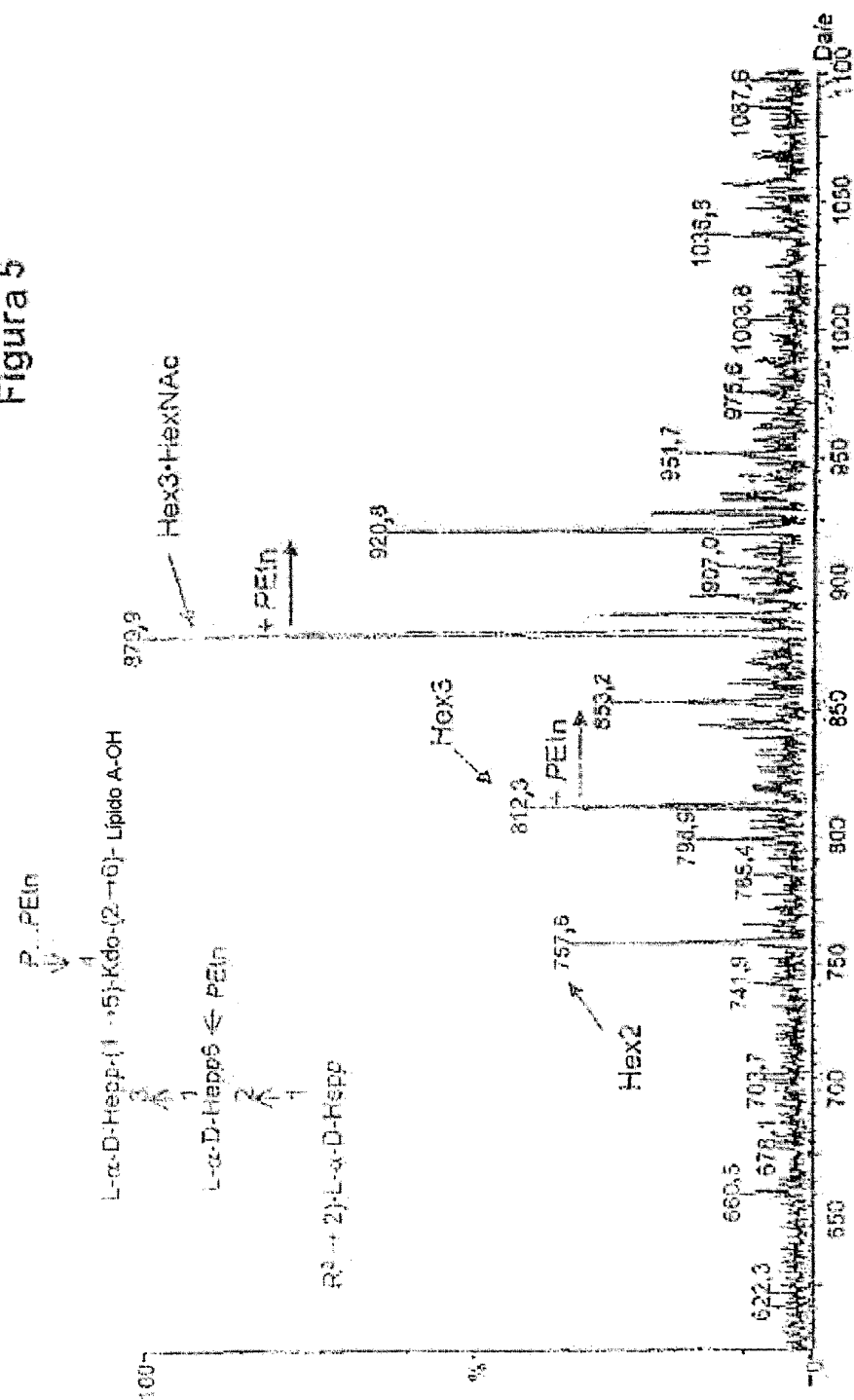


Figura 4

Figura 5



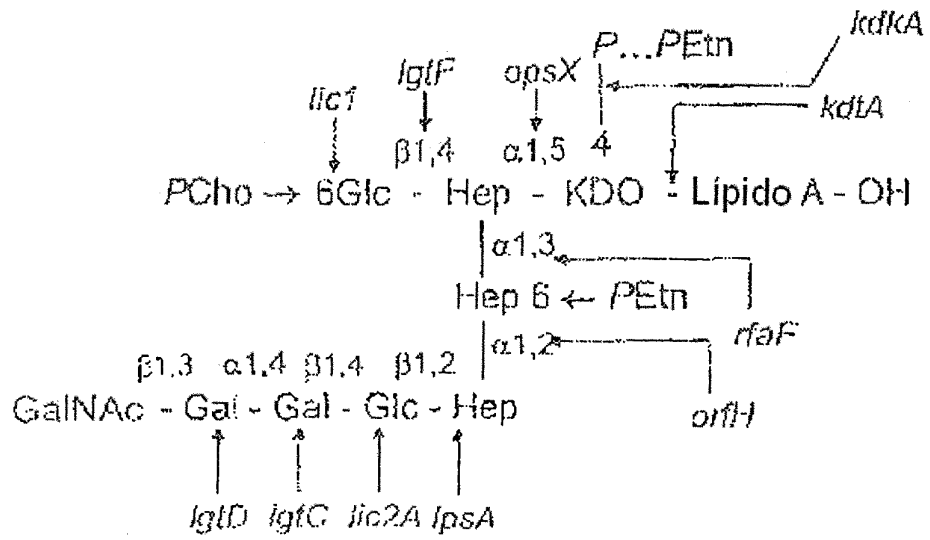


Figura 6

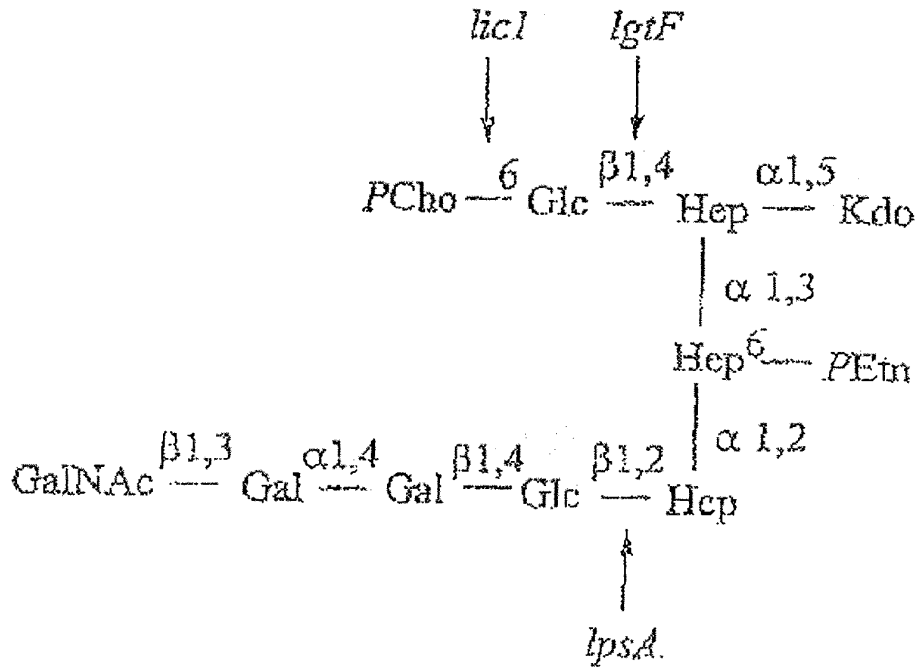


Fig. 7 Genes implicados en la extensión de cadena desde el núcleo interno de LPS de la cepa Rd⁻ de *H. influenzae*. Genes orf3 y lic2b en el locus lic2 controlan la extensión de cadena desde Hep II en las cepas de tipo b: estos genes no están en la cepa Rd⁻. Lic1 controla la incorporación de PCho.

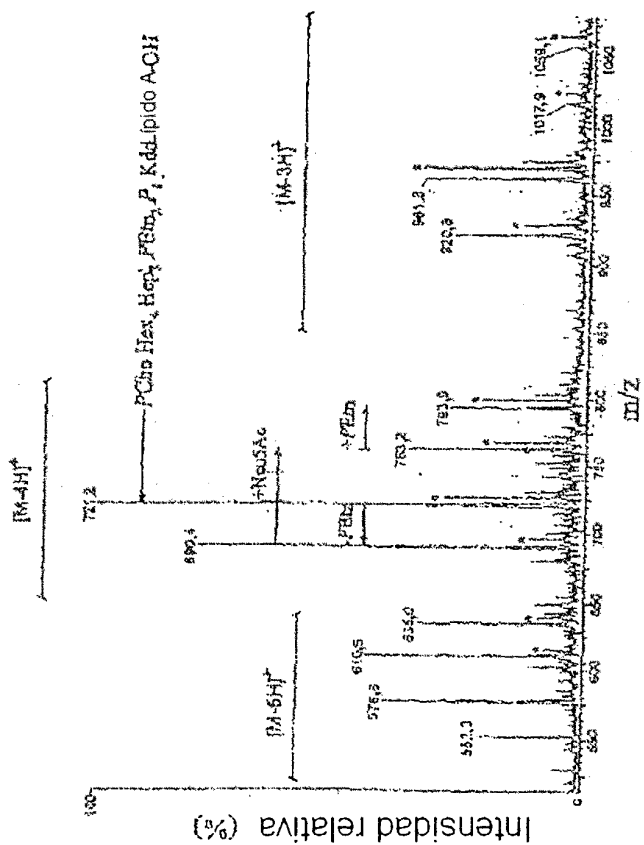


Fig. 8 Parte del espectro de IEP - EM de ion negativo de LPS O-desacilado de la cepa 486 de NTHi. Se indican las composiciones propuestas de las glicoforamas principales. Se indican los aductos de sodio mediante un asterisco (*).

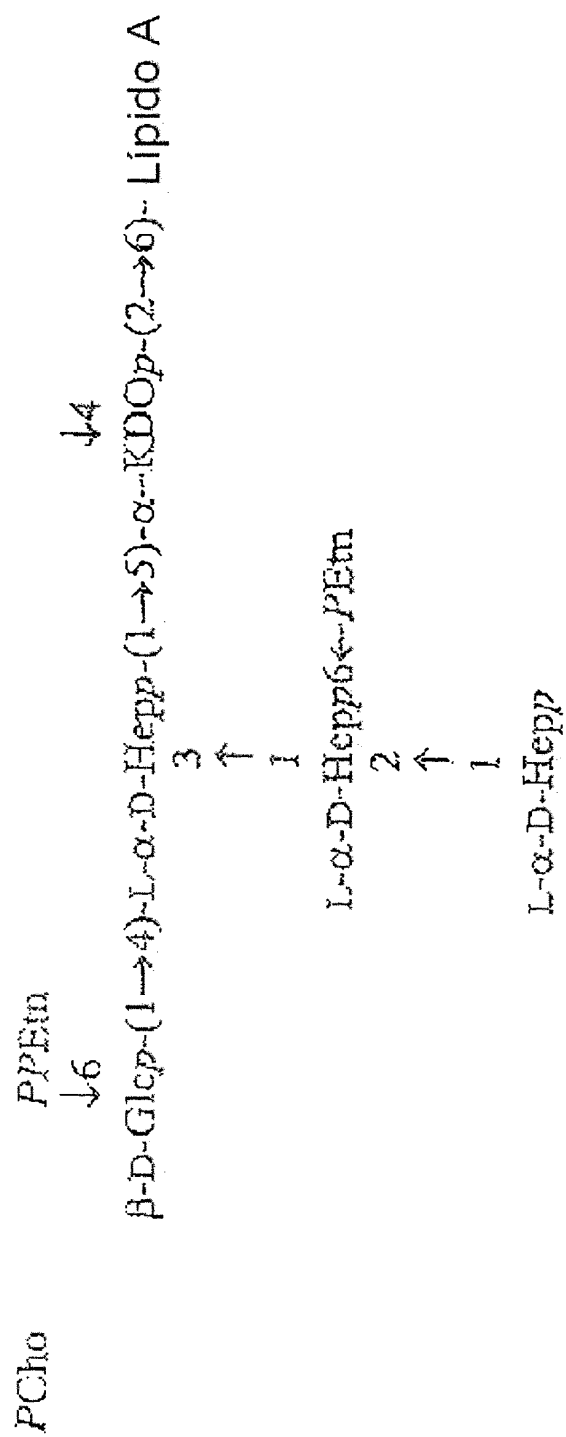


Fig. 9 Estructura de la glicoforma principal de LPS de Hex I observada en la cepa 285 de NTHi.

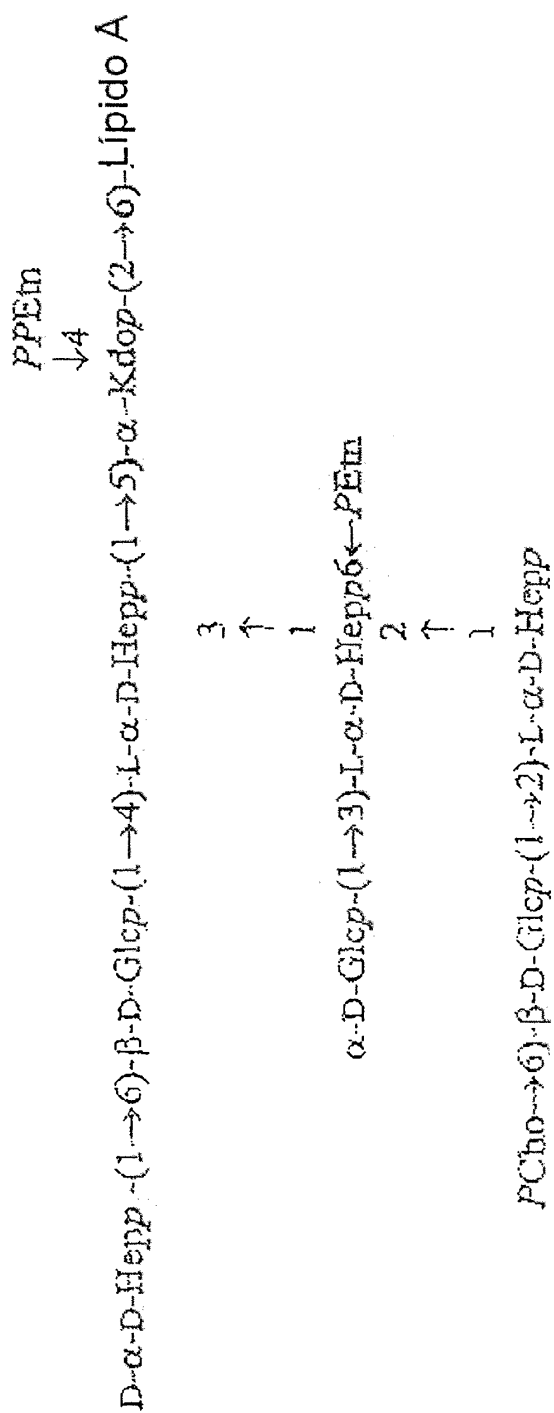


Fig. 10 Estructura tentativa de la glicoforma principal de LPS en la cepa 1158 de NTHi.

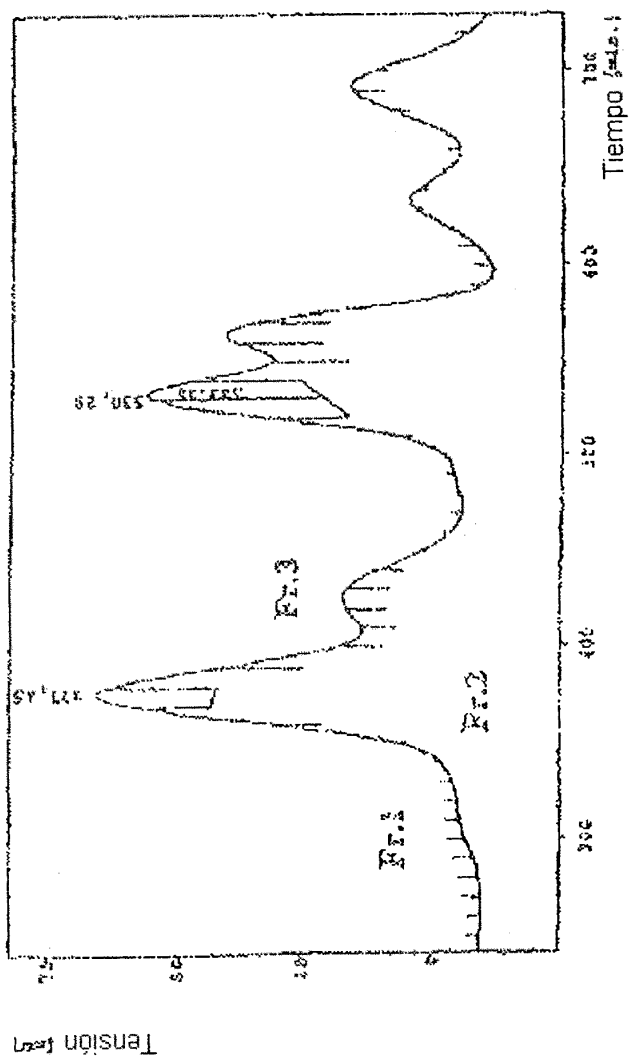


Fig. 11 El cromatograma Biogel P - 4 de LPS (100 mg) de la cepa 176 de NTHI después de hidrólisis ácida suave. Se indican Fr. 1 (10 mg), Fr. 2 (10 mg) y Fr. 3 (6,4 mg).

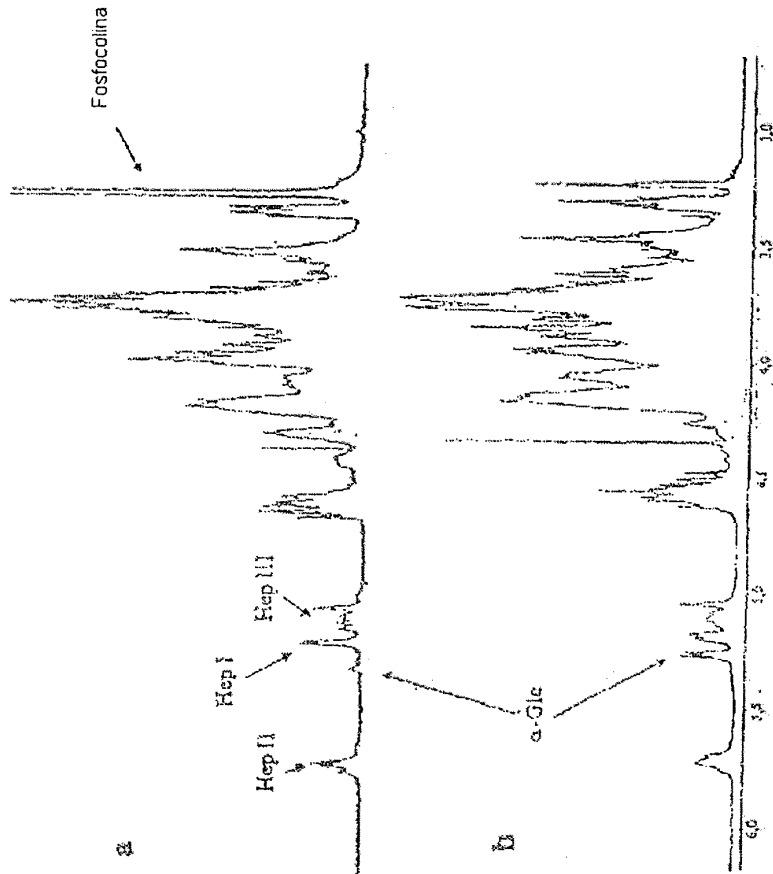


Fig. 12 Espectros de ¹H RMN a 270 MHz de Fr. 2 derivado de la cepa 176 de NTHi (a) y Fr. 3 (b)

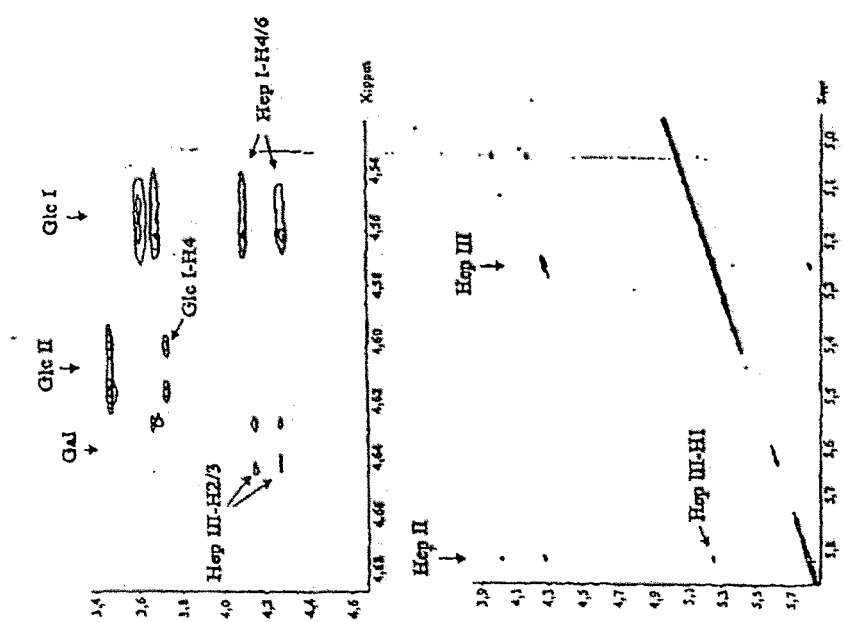


Figura 13. Partes del espectro NOESY de 2D a SOOHz de Fr.2 de la cepa 176 de NTHi.

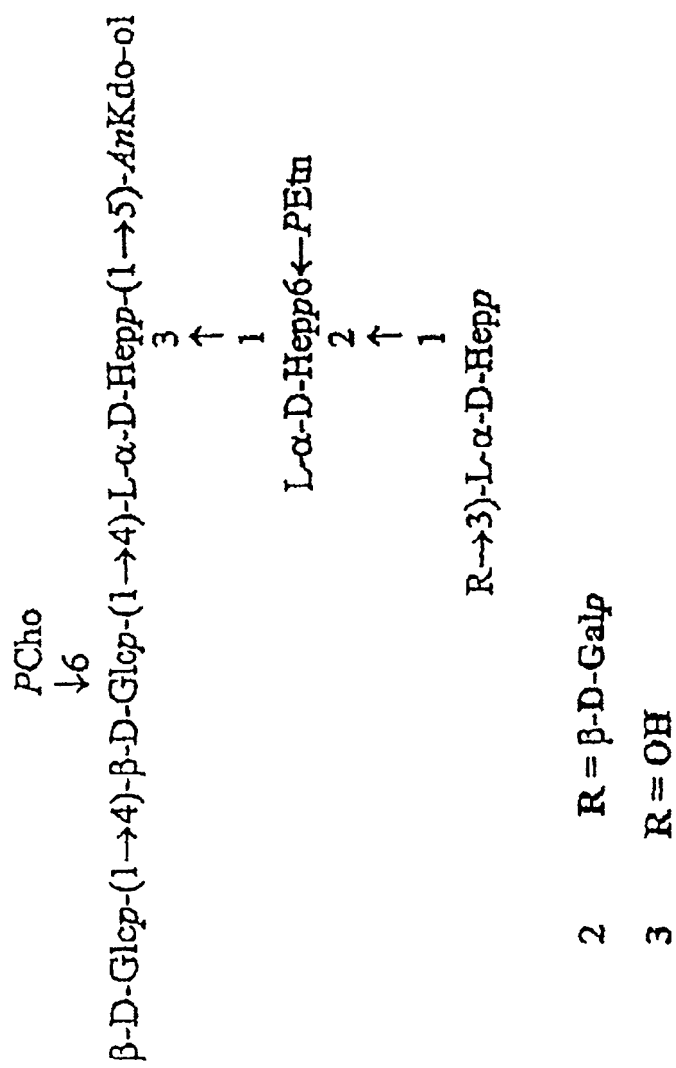


Fig. 14 Estructuras de oligosacáridos derivados del LPS de la cepa 176 de NTHi.

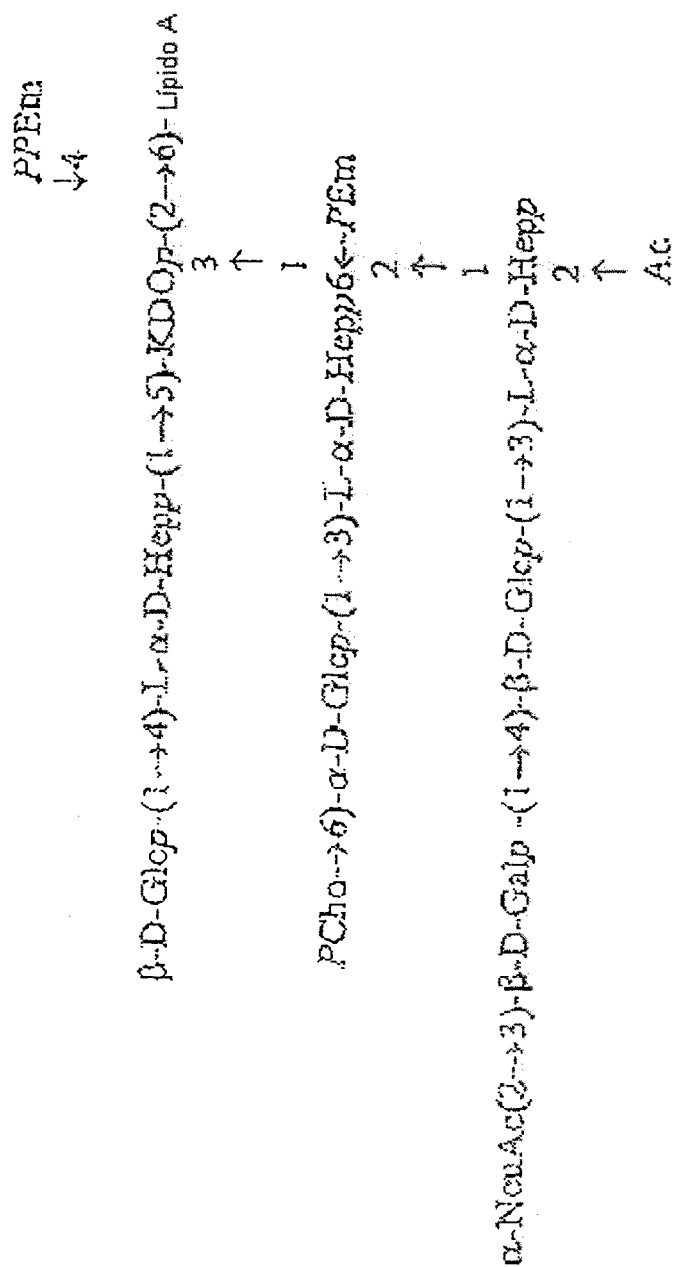


Fig. 15 Estructura de la principal glicofoma de LPS que contiene NeuAc de la cepa 486 de NTHi.