



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 826 000**

⑮ Int. Cl.:

A61K 31/715 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- ⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.05.2013 PCT/US2013/043283**
- ⑦ Fecha y número de publicación internacional: **05.12.2013 WO13181348**
- ⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2013 E 13798089 (2)**
- ⑨ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2020 EP 2854822**

⑮ Título: **Composiciones de polisacárido y métodos de uso**

⑩ Prioridad:

30.05.2012 US 201261653389 P
26.05.2013 US 201361827661 P

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.05.2021

⑯ Titular/es:

THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC.
(100.0%)
75 Francis Street
Boston, MA 02115, US

⑯ Inventor/es:

PIER, GERALD, B.;
CYWES-BENTLEY, COLETTE y
SKURNIK, DAVID

⑯ Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 826 000 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

Composiciones de polisacárido y métodos de uso

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere al uso de ciertas composiciones de antígeno de polisacárido y anticuerpo en la 5 detección, la prevención y/o el tratamiento de infecciones por patógenos particulares.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El desarrollo de inmunoterapias para diversas infecciones, tanto bacterianas, virales, fúngicas como parasíticas en la 10 naturaleza, es una alta prioridad. Muchas inmunoterapias actuales se dirigen a especies microbianas particulares por antígenos específicos de especie. Son menos comunes las inmunoterapias que se dirigen a y son eficaces contra una amplia variedad de microbios.

Staphylococcus aureus y *S. epidermidis* expresan un antígeno de polisacárido de poli-N-acetil glucosamina (PNAG) 15 en su superficie. PNAG se sintetiza *in vivo* por los productos génicos del locus del gen *ica* en estas bacterias. Similarmente, *Escherichia coli* y otras bacterias Gram-negativas contienen un locus genético homólogo denominado el locus *pga* que también codifica la síntesis de las proteínas que se pueden usar para sintetizar PNAG. Así, las 20 bacterias con un locus *ica* o *pga* intacto pueden producir PNAG. Se encontró previamente que las formas desacetiladas de este antígeno eran particularmente eficaces en la estimulación de respuestas inmunitarias específicas de antígeno caracterizadas en parte por la inducción de anticuerpos opsónicos.

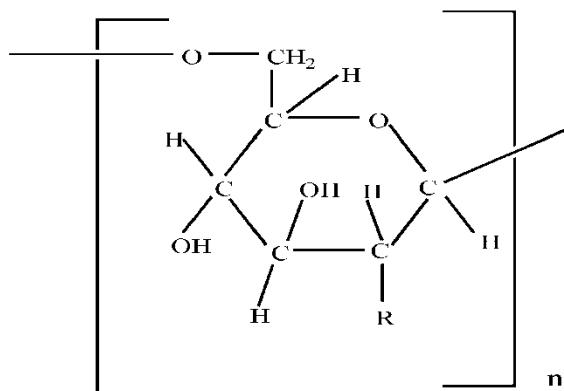
SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La invención se refiere a composiciones farmacéuticas para su uso según las reivindicaciones. La invención se basa, 20 en parte, en el hallazgo inesperado y sorprendente de que el polisacárido poli N-acetil glucosamina (PNAG) se expresa en un número y una variedad de patógenos que no se conocían previamente ni se sugirió que expresaran este polisacárido. La invención proporciona, por tanto, composiciones que comprenden este polisacárido o anticuerpos específicos para este polisacárido para su uso en prevenir y/o tratar infecciones por estos patógenos particulares, y opcionalmente tratar y/o prevenir una enfermedad o trastorno que puede resultar de dicha infección.

Sorprendentemente, los patógenos que se encontró que expresaban PNAG, según la invención, varían en varias 25 clases y tipos. Estas clases y patógenos específicos son del siguiente modo: (a) cocos Gram-positivos: cepas de vacuna y no de vacuna de *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus* del grupo A tales como *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus* del grupo B tales como *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus* del grupo C tales como *Streptococcus dysagalactiae* y *Enterococcus faecalis*; (b) bacilos Gram-positivos: *Listeria monocytogenes*, *Clostridium difficile*, 30 *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium tuberculosis* y *M. smegmatis*; (c) cocos y cocobacilos Gram-negativos: *Neisseria meningitidis*, *N. gonorrhoeae*, *Hemophilus influenzae* no tipificable, *Hemophilus ducreyi*, *Helicobacter pylori* y *Campylobacter jejuni*; (d) bacilos Gram-negativos: *Bacteroides fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. vulgatis*, *Citrobacter rodentium*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella enterica* serovariedad typhi y *Salmonella enterica* serovariedad typhimurium; 35 (e) hongos: *Candida albicans* (levadura), *Candida albicans* (hifas), *Aspergillus flavus*, *Fusarium spp.* tales como *Fusarium solani* y *Cryptococcus neoformans*; y (f) parásitos: *Plasmodium bergei* y *P. falciparum* (incluyendo esporozoítos); y *Trichomonas vaginalis* (*T. vaginalis*). La expresión de PNAG por estos patógenos es particularmente sorprendente puesto que ninguno de ellos tiene un locus genético identificable relacionado con el locus *ica* de 40 *Staphylococci* o un locus *pga* de *E. coli*, que codifica proteínas implicadas en la síntesis de PNAG y de polisacáridos relacionados en ciertas bacterias. Estos patógenos se denominan, por tanto, en el presente documento patógenos no de *ica/pga* para indicar que no tienen loci *ica* o *pga* identificables.

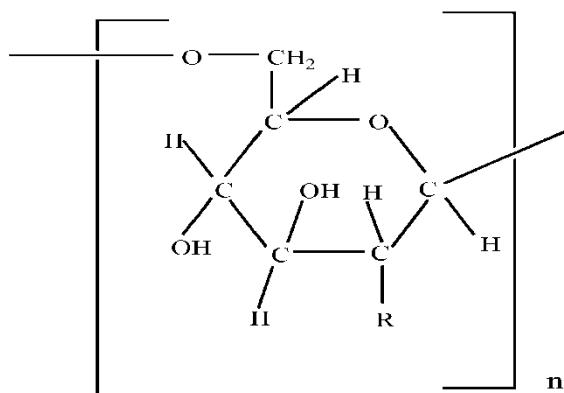
Se describen métodos de detección de cualquiera de los patógenos anteriores usando, por ejemplo, anticuerpos específicos para PNAG.

Así, en un aspecto, se describe un método que comprende administrar a un sujeto que tiene o en riesgo de desarrollar 45 una infección por un patógeno no *ica/pga*, pero PNAG-positivo una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmunitaria contra el patógeno de un polisacárido aislado que tiene la fórmula



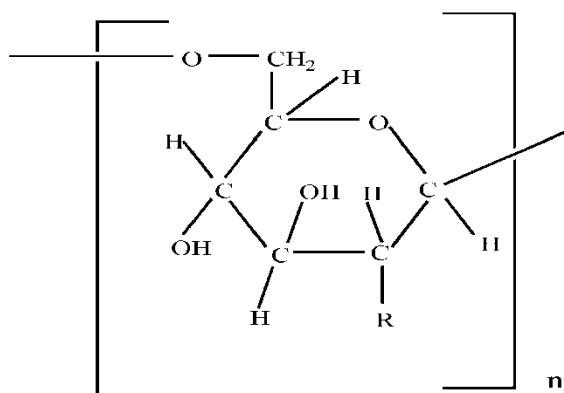
en donde n es al menos 5, R se selecciona del grupo que consiste en -NH-CO-CH₃ y -NH₂, a condición de que menos del 50 % de los grupos R sean -NH-CO-CH₃.

- 5 También se describe un método que comprende administrar a un sujeto que tiene o es en riesgo de desarrollar una infección por un patógeno no *ica/pga* PNAG-positivo una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmunitaria contra el patógeno de un polisacárido aislado conjugado con un vehículo, en donde el polisacárido tiene la fórmula



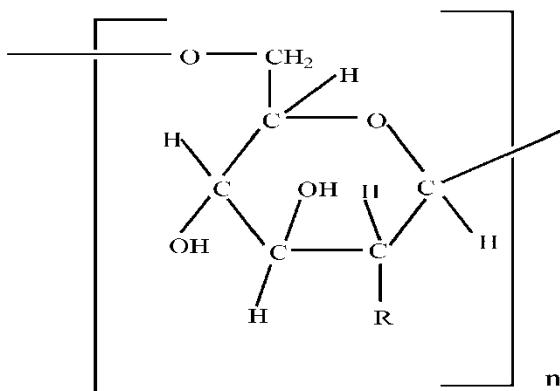
en donde n es 5 o mayor, R se selecciona del grupo que consiste en -NH-CO-CH₃ y -NH₂, a condición de que menos del 50 % de los grupos R sean -NH-CO-CH₃.

- 10 También se describe una composición farmacéutica que comprende un polisacárido aislado que tiene la fórmula



en donde n es al menos 5, R se selecciona del grupo que consiste en -NH-CO-CH₃ y -NH₂, a condición de que menos del 50 % de los grupos R sean -NH-CO-CH₃, para su uso en prevenir o tratar, en un sujeto, una infección por un patógeno no *ica/pga* PNAG-positivo.

- 15 También se describe una composición farmacéutica que comprende un polisacárido aislado conjugado con un vehículo, en donde el polisacárido tiene la fórmula



en donde n es 5 o mayor, R se selecciona del grupo que consiste en -NH-CO-CH₃ y -NH₂, a condición de que menos del 50 % de los grupos R sean -NH-CO-CH₃, para su uso en prevenir o tratar, en un sujeto, una infección por un patógeno no *ica/pga* PNAG-positivo.

- 5 En algunas realizaciones, el polisacárido aislado se conjuga con el vehículo mediante un conector. En algunas realizaciones, el vehículo es un vehículo de péptido. Cada polisacárido se puede conjugar con uno o más vehículos. El vehículo puede ser un polisacárido. En algunas realizaciones, el polisacárido del vehículo no es una N-acetil beta (β) 1-6 glucosamina.
- 10 En algunas realizaciones, igual o inferior a 45 %, igual o inferior a 40 %, igual o inferior a 35 %, igual o inferior a 30 %, igual o inferior a 25 %, igual o inferior a 20 %, igual o inferior a 15 %, igual o inferior a 10 %, igual o inferior a 5 %, o igual o inferior a 1 % de los grupos R son -NH-CO-CH₃. En alguna realización, ninguno de los grupos R es -NH-CO-CH₃.

En algunas realizaciones, n es al menos 9, al menos 10, al menos 20, al menos 50, al menos 100, al menos 200, al menos 300, al menos 400 o al menos 500.

- 15 En algunas realizaciones, el polisacárido aislado tiene un peso molecular de 100-500 kDa. En algunas realizaciones, el polisacárido aislado tiene un peso molecular de al menos 900 dáltones, al menos 2000 dáltones, al menos 2500 dáltones, al menos 5000 dáltones, al menos 7500 dáltones, al menos 10.000 dáltones, al menos 25.000 dáltones, al menos 50.000 dáltones, al menos 75.000 dáltones, al menos 100.000 dáltones, al menos 125.000 dáltones, al menos 150.000 dáltones, al menos 200.000 dáltones, al menos 250.000 Dalton, al menos 300.000 dáltones, al menos 350.000 dáltones, al menos 400.000 dáltones, al menos 450.000 dáltones o al menos 500.000 dáltones.

En algunas realizaciones, el polisacárido aislado se administra o se formula con un adyuvante o se usa junto con un adyuvante.

- 25 En algunas realizaciones, el polisacárido aislado se administra por vía sistémica o se formula para administración sistémica. En algunas realizaciones, el polisacárido aislado se administra localmente o se formula para administración local.

En algunas realizaciones, el polisacárido aislado se proporciona en una composición que comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 30 Se describe un método que comprende administrar a un sujeto que tiene o en riesgo de desarrollar una infección por un patógeno no *ica/pga* PNAG-positivo una cantidad eficaz de un anticuerpo específico de PNAG o fragmento de anticuerpo específico de PNAG.

También se describe una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo específico de PNAG o fragmento de anticuerpo específico de PNAG para su uso en prevenir o tratar, en un sujeto, una infección por un patógeno no *ica/pga* PNAG-positivo.

- 35 En algunas realizaciones, el patógeno no *ica/pga* PNAG-positivo es un coco Gram-positivo no *ica/pga* PNAG-positivo. En algunas realizaciones, el coco Gram-positivo no *ica/pga* PNAG-positivo es *S. pneumonia*, *Streptococcus* del grupo A, *Streptococcus* del grupo B, *Streptococcus* del grupo C, o *Enterococcus*.

En algunas realizaciones, el patógeno no *ica/pga* PNAG-positivo es un bacilo Gram-positivo no *ica/pga* PNAG-positivo. En algunas realizaciones, el bacilo Gram-positivo no *ica/pga* PNAG-positivo es *Listeria*, *Clostridium difficile*, *B. subtilis*, *M. tuberculosis* o *M. smegmatis*.

- 40 En algunas realizaciones, el patógeno no *ica/pga* PNAG-positivo es un coco o cocobacilo Gram-negativo no *ica/pga* PNAG-positivo. En algunas realizaciones, el coco o cocobacilo Gram-negativo no *ica/pga* PNAG-positivo es *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *H. Influenzae* no tipificable, *Helicobacter spp.* o *Campylobacter spp.*

- En algunas realizaciones, el patógeno no *ica/pga* PNAG-positivo es un bacilo Gram-negativo no *ica/pga* PNAG-positivo. En algunas realizaciones, el bacilo Gram-negativo no *ica/pga* PNAG-positivo es *Bacteroides fragilis*, *B. thetaiotamicron*, *B. vulgatus*, *Citrobacter rodentium*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella enterica* serovariedad *typhi* y *Salmonella enterica* serovariedad *typhimurium*. En algunas realizaciones, el patógeno no *ica/pga* PNAG-positivo es un hongo no *ica/pga* PNAG-positivo. En algunas realizaciones, el hongo no *ica/pga* PNAG-positivo es *Candida albicans* (levadura); *Candida albicans* (hifas), *Aspergillus*, *Fusarium* o *Cryptococcus*.
- 5 En algunas realizaciones, el patógeno no *ica/pga* PNAG-positivo es un parásito no *ica/pga* PNAG-positivo. En algunas realizaciones, el parásito no *ica/pga* PNAG-positivo es *P. bergei* o *P. falciparum*.
- En algunas realizaciones, el patógeno no *ica/pga* PNAG-positivo es *T. vaginalis*.
- 10 En algunas realizaciones, el sujeto es humano. En algunas realizaciones, el sujeto es un primate, caballo, vaca, cerdo, cabra, oveja, perro o gato.
- En algunas realizaciones, el sujeto tiene una infección por un patógeno no *ica/pga* PNAG-positivo. En algunas realizaciones, el sujeto está en riesgo de desarrollar una infección por un patógeno no *ica/pga* PNAG-positivo.
- 15 En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se administra por vía sistémica o se formula para administración sistémica. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se administra localmente o se formula para administración local.
- 20 Se describe un método que comprende precipitar con etanol una preparación de polisacárido en bruto a partir de una preparación del cuerpo de células microbianas concentradas; simultáneamente digerir el polisacárido en bruto con lisozima y lisostafina, seguido por la digestión secuencial con una nucleasa y proteinasa K para formar una preparación de polisacárido digerido; fraccionar por tamaño de la preparación de polisacárido digerido; aislar una fracción de polisacárido acetilado; y desacetilar la fracción de polisacárido acetilado para producir un polisacárido de PNAG que tiene menos del 50 % de sustituciones de acetato, en donde la preparación del cuerpo de células microbianas se obtiene de un microbio no *ica/pga* PNAG-positivo. En algunas realizaciones, la preparación de polisacárido se fracciona por tamaño usando una columna. En algunas realizaciones, el método produce el polisacárido de PNAG que tiene menos de 40 % de sustituciones de acetato.
- 25 También se describe un método que comprende preparar un polisacárido impuro de un cultivo microbiano; incubar el polisacárido impuro con un ácido o una base para producir una preparación de polisacárido semipuro; neutralizar la preparación; incubar la preparación neutralizada en ácido fluorhídrico; aislar un polisacárido acetilado de la preparación; y desacetilar el polisacárido acetilado para producir un polisacárido de PNAG que tiene menos del 50 % de sustituciones de acetato, en donde el cultivo microbiano es un cultivo microbiano no *ica/pga* PNAG-positivo. En algunas realizaciones, el método produce el polisacárido de PNAG que tiene menos del 40 % de sustituciones de acetato.
- 30 También se describe un método que comprende preparar un polisacárido impuro de un cultivo microbiano; incubar el polisacárido impuro con un ácido o una base para producir una preparación de polisacárido semipuro; neutralizar la preparación; incubar la preparación neutralizada en ácido fluorhídrico; y aislar de la preparación un polisacárido de PNAG que tiene menos del 50 % de sustituciones de acetato, en donde el cultivo microbiano es un cultivo microbiano no *ica/pga* PNAG-positivo. En algunas realizaciones, el método produce el polisacárido de PNAG que tiene menos del 40 % de sustituciones de acetato.
- 35 También se describe un método que comprende preparar un polisacárido impuro de un cultivo microbiano; incubar el polisacárido impuro con un ácido o una base para producir una preparación de polisacárido semipuro; neutralizar la preparación; incubar la preparación neutralizada en ácido fluorhídrico; y aislar de la preparación un polisacárido de PNAG que tiene menos del 50 % de sustituciones de acetato, en donde el cultivo microbiano es un cultivo microbiano no *ica/pga* PNAG-positivo. En algunas realizaciones, se aísla el polisacárido de PNAG que tiene menos del 40 % de sustituciones de acetato.
- 40 En algunas realizaciones, el método comprende además conjugar un vehículo con el polisacárido aislado. En algunas realizaciones, el vehículo es un vehículo de péptido.
- En algunas realizaciones, el polisacárido acetilado se desacetila químicamente.
- En algunas realizaciones, el polisacárido acetilado se desacetila por incubación con una disolución básica. En algunas realizaciones, el polisacárido acetilado se desacetila enzimáticamente.
- 45 Se describe un método de producción de anticuerpos que comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz para producir anticuerpos de un polisacárido de PNAG aislado de un patógeno no *ica/pga* PNAG-positivo, y un adyuvante, y aislar anticuerpos del sujeto. En algunas realizaciones, los anticuerpos son anticuerpos polyclonales.
- También se describe un método de producción de anticuerpos monoclonales que comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz para producir anticuerpos de un polisacárido de PNAG aislado de un patógeno no *ica/pga* PNAG-positivo, y un adyuvante, recoger las células del bazo del sujeto, fusionar las células del bazo del sujeto con células de mieloma, y recoger el anticuerpo producido a partir de un subclon de fusión.
- 50 En algunas realizaciones, el método comprende además aislar el anticuerpo.
- En algunas realizaciones, el polisacárido de PNAG está menos del 50 % acetilado.
- En algunas realizaciones, el sujeto es un conejo. En algunas realizaciones, el sujeto es humano.

5 También se describe un método de detección de un patógeno no *ica/pga* PNAG-positivo, que comprende poner en contacto una muestra que se sospecha que contiene un patógeno no *ica/pga* PNAG-positivo con un anticuerpo específico de PNAG o fragmento de anticuerpo, y detectar la unión del anticuerpo o fragmento de anticuerpo a la muestra, en donde la unión del anticuerpo o fragmento de anticuerpo indica que el patógeno no *ica/pga* PNAG-positivo está presente en la muestra.

En algunas realizaciones, la muestra es negativa para *Staphylococcus*.

10 En algunas realizaciones, la muestra es una muestra biológica de un sujeto. En algunas realizaciones, la muestra biológica es orina, sangre, pus, piel, esputo, líquido sinovial, linfa o leche. En algunas realizaciones, la muestra deriva de un hisopo de un dispositivo médico implantable o implantado o un trozo de equipo médico o una superficie en una instalación de cuidado del paciente.

15 En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo es un anticuerpo humanizado o un anticuerpo químérico o un fragmento del mismo. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo es el anticuerpo F598 (ATCC PTA-5931) o un fragmento del mismo. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo es el anticuerpo F628 (ATCC PTA-5932) o un fragmento del mismo. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo es el anticuerpo F630 (ATCC PTA-5933) o un fragmento del mismo. También se pueden usar antisueros policlonales producidos contra PNAG en algunos casos.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se conjuga con un agente.

20 En algunas realizaciones, el agente es un agente citotóxico tal como un antibiótico o un radioisótopo. En algunas realizaciones, el agente es una marca detectable. En algunas realizaciones, la marca detectable es una marca radiactiva, una enzima, una molécula de biotina, una molécula de avidina o un fluorocromo.

Cada una de las limitaciones de la invención puede englobar diversas realizaciones de la invención. Se anticipa, por tanto, que cada una de las limitaciones de la invención que implica un elemento cualquiera o combinaciones de elementos se puede incluir en cada aspecto de la invención.

25 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

30 FIG. 1. Efecto del MAb F598 contra PNAG administrado por vía intraperitoneal (IP) y por vía tópica empezando 4 horas después de la infección. Esta figura muestra datos del experimento de 48 horas del inóculo más bajo. Detalles experimentales: El inóculo fue 1×10^5 /ojo; 200 µg de MAb inyectados IP 4 y 24 horas después de la infección; 20 µg de MAb aplicados por vía tópica 24 y 32 horas después de la infección. Los puntos de datos representan el valor para el ratón individual; las barras representan la puntuación media para el grupo. Valor de *p*: prueba de la U de Mann Whitney.

35 FIG. 2. Efecto del MAb F598 contra PNAG administrado IP y por vía tópica empezando 4 horas después de la infección. Esta figura muestra datos del experimento de 48 horas del inóculo más bajo. Detalles experimentales: El inóculo fue 2×10^5 /ojo; 500 µg de MAb inyectados IP 4 horas después de la infección; 50 µg de MAb aplicados por vía tópica 24 y 32 horas después de la infección. Los puntos de datos representan el valor para el ratón individual; las barras representan la puntuación media para el grupo.

Valor de *p*: prueba de la U de Mann Whitney.

40 FIG. 3. Efecto del MAb F598 contra PNAG administrado por vía tópica empezando 4 horas después de la infección. Esta figura muestra datos del experimento de 32 horas del inóculo medio. Detalles experimentales: El inóculo fue $5,1 \times 10^6$ /ojo; MAb aplicados por vía tópica 4, 8, 24 horas después de la infección. Los puntos de datos representan el valor para el ratón individual; las barras representan la puntuación media para el grupo.

Valor de *p*: prueba de la U de Mann Whitney.

45 FIG. 4. Efecto del MAb F598 contra PNAG administrado por vía tópica empezando 4 horas después de la infección. Esta figura muestra los datos del experimento de 32 horas del inóculo alto. Detalles experimentales: Inóculo: 5×10^7 /ojo; MAb aplicados por vía tópica 4, 8, 24 horas después de la infección. El experimento terminó a las 32 horas. Los puntos de datos representan el valor para el ratón individual; las barras representan la puntuación media para el grupo. Valor de *p*: prueba de la U de Mann Whitney.

FIG. 5. Supervivencia de ratones CBA/N expuestos a D39 de *S. pneumoniae* (N=12/grupo).

50 FIG. 6. La eficacia protectora del anticuerpo producido contra la vacuna conjugada 9GlcNH2-TT contra la causa de infección letal de la piel de *S. pyogenes* (*Streptococcus* del grupo A).

FIG. 7. Eficacia protectora del anticuerpo producido en conejos contra la vacuna conjugada de 9GlcNH2-TT contra meningitis (bacterias en el cerebro) de crías de ratón de 2-3 días de edad expuestos a la cepa B16B6 de

N. meningitidis del grupo B. Los puntos de datos representan \log_{10} UFC/cerebro para un ratón individual; las barras representan la mediana de la puntuación para el grupo. Valor de p : prueba de la U de Mann Whitney.

5 FIG. 8. Reducciones en las puntuaciones de colitis en ratones administrados con MAb IgG1 humano contra PNAG en comparación con o PBS (experimento 1) o un MAb IgG1 humano contra el VIH (MAb F105, experimento 2). Los puntos de datos representan la puntuación para el ratón individual; las barras representan la mediana de la puntuación para el grupo. Valor de p : prueba de la U de Mann Whitney.

FIG. 9. Comparación de las puntuaciones individuales para los cuatro parámetros usados para encontrar la puntuación histológica total en ratones TRUC tratados con o MAb F598 contra PNAG o MAb IgG1 humano de control contra el VIH (F105).

10 FIG. 10. Eficacia protectora de anticuerpo producido en conejos contra la vacuna conjugada 9GlcNH₂-TT contra *L. monocytogenes*.

FIG. 11. Destrucción opsónica de 4 cepas de *S. pneumoniae* mediada por anticuerpo de conejo producido contra dPNAG-TT. Destrucción en comparación con la obtenida en el control con suero de conejo normal.

15 FIG. 12. Destrucción opsónica de 4 cepas de *S. pneumoniae* mediada por el MAb IgG1 humano F598 contra PNAG20. Destrucción en comparación con el MAb F429 de control específico para alginato de *P. aeruginosa*.

FIG. 13. Destrucción opsónica de 3 cepas de *E. faecalis* mediada por anticuerpo de conejo producido contra 9GlcNH₂-TT. Destrucción en comparación con la obtenida en el control con suero de conejo normal.

FIG. 14. Destrucción opsónica de *Streptococcus* del grupo A por el MAb F598 contra PNAG. Destrucción en comparación con el MAb F429 de control específico para alginato de *P. aeruginosa*.

20 FIG. 15. Destrucción opsónica de *Candida albicans* por el MAb F598 contra PNAG. Destrucción en comparación con el MAb F429 de control específico para alginato de *P. aeruginosa*.

FIG. 16. Destrucción bactericida de las cepas del serogrupo B de *N. meningitidis*.

FIG. 17. Destrucción bactericida de *N. gonorrhoeae*.

FIG. 18. Inhibición de la destrucción bactericida de *N. meningitidis*.

25 FIG. 19. Inhibición de la destrucción bactericida de *N. gonorrhoeae*.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La invención se refiere, en parte, al hallazgo inesperado de la expresión de PNAG en varios patógenos bacterianos y no bacterianos. El hallazgo fue inesperado por al menos dos motivos. Primero, ninguno de los patógenos que se encontró que expresaba PNAG, según la invención, tenía un locus *ica* o *pga*. Los loci *ica* y *pga* codifican cada uno cuatro proteínas implicadas en la síntesis de polisacáridos, que incluyen la síntesis de PNAG. Se creía, antes de la invención, que un patógeno debía tener un locus *ica* o *pga* para sintetizar PNAG. El locus *ica* está presente en *S. aureus* y *S. epidermidis*, que se sabía que expresaban PNAG antes de la invención, mientras que el locus *pga* se ha identificado en algunos organismos Gram-negativos. No es evidente cómo los patógenos PNAG-positivos recién descubiertos sintetizan en realidad PNAG en ausencia aparente de estos loci. Los hallazgos de la invención sugieren que la PNAG se puede sintetizar incluso en ausencia de dichos loci y las proteínas que codifican. Segundo, existe una gran variedad en los patógenos encontrados que expresan PNAG, que incluyen patógenos bacterianos y no bacterianos. Antes de la invención, no se contempló que los patógenos que no expresaron un locus *ica*/*pga* pudieran producir PNAG. Tampoco se contempló que los patógenos no bacterianos pudieran expresar PNAG.

40 El hallazgo de que estos diversos patógenos bacterianos y no bacterianos expresan PNAG proporciona nuevos enfoques para prevenir, tratar y/o diagnosticar infecciones provocadas por dichos patógenos. Así, se describe, entre otros, el aislamiento y/o la derivación de PNAG y dPNAG de los patógenos PNAG-positivo recién descritos, y su uso en estimular las respuestas inmunitarias (incluyendo respuestas inmunitarias requeridas para producir anticuerpos específicos para PNAG), detectar PNAG y patógenos que expresan PNAG, y prevenir y tratar infecciones de patógenos que expresan PNAG. Dichos patógenos que expresan PNAG incluyen, pero no se limitan a, los patógenos no *ica*/*pga* que expresan PNAG descritos en el presente documento.

Patógenos no *ica*/*pga* PNAG-positivo

50 El patógeno recién descubierto que expresa PNAG se denomina en el presente documento patógenos no *ica*/*pga* PNAG-positivo para indicar que no contienen un locus genético basado en ADN con ninguna similitud significativa por los loci *ica*/*pga* de cuatro genes de patógenos que expresan PNAG conocidos tales como *S. aureus*, *S. epidermidis* o *E. coli*. Los loci *ica* o *pga* codifican cuatro proteínas (2 glucosiltransferasas, una N-desacetilasa y una proteína para la exportación del polisacárido sintetizado). Algunos patógenos no *ica*/*pga* PNAG no comprenden genes que codifican estas cuatro proteínas en un único locus.

La secuencia de nucleótidos de un locus *ica* a modo de ejemplo (es decir, uno de *S. aureus*) se ha depositado en GenBank con el número de acceso AF086783. Un patógeno que se considera un patógeno "no *ica*", según la invención, no posee un locus *ica* perceptible. Como un ejemplo, dicho patógeno puede no poseer una secuencia de nucleótidos que ocurre en el mismo alargamiento contiguo de ADN cromosómico y que tiene al menos 25 % de homología con la secuencia de nucleótidos de 4 genes enteras del locus *ica* depositado en AF086783. Los patógenos PNAG-positivo no *ica* excluyen *Staphylococci*.

5 Se ha depositado la secuencia de nucleótidos de un locus *pga* a modo de ejemplo (es decir, uno de *E. coli* K12 substr. MG1655) en GenBank con los números de acceso para cada uno de los 4 genes dentro del locus como AAC74106.1, AAC74107.1, AAC74108.1 y AAC74109.1. Un patógeno que se considera un patógeno "no *pga*", según la invención, no posee un locus *pga* perceptible. Como un ejemplo, dicho patógeno puede no poseer una secuencia de nucleótidos que ocurre en el mismo alargamiento contiguo de ADN cromosómico y que tiene al menos 25 % de homología con las cuatro de las secuencias de nucleótidos depositadas en AAC74106.1, AAC74107.1, AAC74108.1 y AAC74109.1. Los patógenos no *pga* PNAG-positivo excluyen *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bordetella pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica*, *Burkholderia cenocepacia*, *B. dolosa*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Acinetobacter baumannii* y algunas cepas del género *Shigella*.

10 Los patógenos no *ica/pga* PNAG-positivo incluyen bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, hongos y parásitos. Más específicamente, las bacterias no *ica/pga* PNAG-positivo incluyen cocos Gram-positivos, bacilos Gram-positivos, cocos o cocobacilos Gram-negativos y bacilos Gram-negativos. Los cocos Gram-positivos no *ica/pga* PNAG-positivo incluyen *S. pneumoniae*, *Streptococcus* del grupo A (*Streptococcus pyogenes*), *Streptococcus* del grupo B (*Streptococcus agalactiae*), *Streptococcus* del grupo C (*Streptococcus dysgalactiae*) y *Enterococcus* (*E. faecalis* y *E. faecium*). Los bacilos no *ica/pga* PNAG-positivo Gram-positivos incluyen *Listeria monocytogenes*, *Clostridium difficile*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium tuberculosis* y *M. smegmatis*. Los cocos o cocobacilos no *ica/pga* PNAG-positivo Gram-negativos incluyen *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *H. influenzae* no tipificable, *Hemophilus ducreyi*, *Helicobacter pylori* y *Campylobacter jejuni*. El bacilo Gram-negativo no *ica/pga* PNAG-positivo incluye *25 Bacteroides fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. vulgatus*, *Citrobacter rodentium*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella enterica* serovariedad *typhi* y *Salmonella enterica* serovariedad *typhimurium*.

20 Los hongos no *ica/pga* PNAG-positivo incluye *Candida albicans* (levadura), *Candida albicans* (hifas), especies de *Aspergillus*, *Fusarium* y *Cryptococcus*. Los parásitos no *ica/pga* PNAG-positivo incluyen *Plasmodium bergei* y *P. falciparum*.

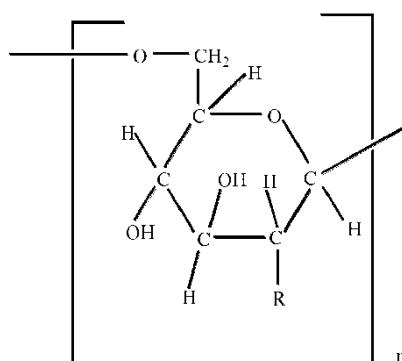
30 30 El patógeno no *ica/pga* PNAG-positivo puede ser *T. vaginalis*.

35 Se describe el uso del polisacárido de PNAG como un antígeno para inducir respuestas inmunitarias que son específicas para el polisacárido de PNAG en sujetos. Dicha inmunidad se denomina en el presente documento inmunidad activa. Los sujetos pueden ser los que tienen o están en riesgo de desarrollar infecciones provocadas por uno cualquiera de los patógenos no *ica/pga* PNAG-positivo anteriores. Las infecciones se pueden prevenir o tratar mediante el uso del polisacárido de PNAG.

40 También se describe el uso de anticuerpos específicos de PNAG (o fragmentos de anticuerpos) para inducir respuestas inmunitarias que son específicas para el polisacárido de PNAG en sujetos. Dicha inmunidad se denomina en el presente documento inmunidad pasiva. Los sujetos pueden ser los que tienen o están en riesgo de desarrollar infecciones provocadas por uno cualquiera de los patógenos no *ica/pga* PNAG-positivo anteriores. Las infecciones se pueden prevenir o tratar mediante el uso de los anticuerpos específicos de PNAG (o fragmentos de anticuerpos).

Polisacárido de PNAG y dPNAG

El polisacárido de PNAG es poli N-acetyl beta (β) 1-6 glucosamina (es decir, comprende unidades de monómero de glucosamina unidas juntas por enlaces beta (β) 1-6). El grupo acetilo, cuando está presente, se une en N al monómero de glucosamina (a diferencia de estar unido en O). PNAG tiene la estructura de la siguiente fórmula



donde n es un número entero y R se selecciona del grupo que consiste en -NH-CO-CH₃ y -NH₂. "n" puede variar, sin limitación, de 2-500.

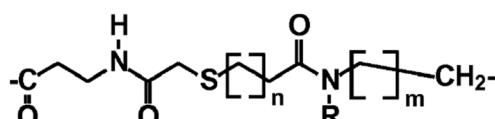
PNAG se puede sintetizar *in vitro* o se puede aislar de una fuente que existe de forma natural, tal como, por ejemplo, los patógenos PNAG-positivo recién descritos. En su forma nativa, PNAG existe como una mezcla de formas que varían en acetilación (es decir, donde R es -NH-CO-CH₃) desde 1-100 %, siendo las formas más altamente acetiladas (es decir, las que tienen más de 50 % de acetilación) las formas más predominantes.

Se descubrió previamente que las formas poco acetiladas eran altamente inmunogénicas y eran más capaces de provocar anticuerpos protectores opsónicos en comparación con las formas más altamente acetiladas en los ensayos de estimulación inmunitaria *in vivo*. Los anticuerpos provocados tras la administración de dPNAG reconocen dPNAG y, en algunos casos, las formas altamente acetiladas de PNAG también. Estos hallazgos hicieron que la forma poco acetilada de PNAG fuera un candidato a vacuna adecuado para estimular respuestas inmunitarias protectoras *in vivo*. Como resultado, se describe el uso de las formas poco acetiladas de PNAG para estimular la inmunidad activa en sujetos. Dichas formas poco acetiladas de PNAG se denominan en el presente documento PNAG desacetilado (o dPNAG). dPNAG tiene la misma estructura que la mostrada anteriormente con la excepción de que menos del 50 % de los grupos R son -NH-CO-CH₃ (es decir, menos del 50 % de los grupos amino están sustituidos con acetato). dPNAG puede estar completa o parcialmente desacetilada, a condición de que el intervalo de acetilación sea desde 0 hasta menos de 50 %. dPNAG completamente desacetilado (es decir, donde R=NH₂ solo) se puede denominar en el presente documento un homopolímero. La dPNAG parcialmente desacetilada (es decir, en donde R puede ser -NH₂ o -NH-CO-CH₃, a condición de que menos del 50 % de R sea -NH-CO-CH₃) se puede denominar en el presente documento un heteropolímero. Por ejemplo, menos del 49 %, menos del 45 %, menos del 40 %, menos del 35 %, menos del 30 %, menos del 25 %, menos del 20 %, menos del 15 %, menos del 10 %, menos del 5 %, o menos del 1 % de grupos R pueden ser -NH-CO-CH₃. En algunos casos, el nivel de acetilación es 40 % o menos, 35 % o menos, 20 % o menos, o 15 % o menos.

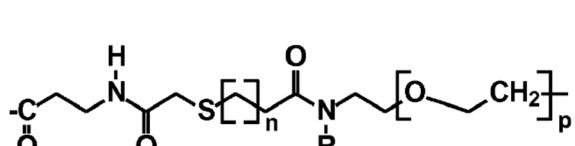
Se describe el uso de formas altamente acetiladas y poco acetiladas de PNAG en diversas aplicaciones. Como ejemplo no limitante, se pueden usar PNAG altamente acetiladas para preparar anticuerpos que se van a usar como diagnóstico o para otro fin no terapéutico.

También se describe el uso de formas que existen de forma natural de PNAG, tanto si están altamente como poco acetiladas, así como formas sintéticas de PNAG (es decir, las preparadas completamente de nuevo). Como se apreciará, dichas formas sintéticas se pueden sintetizar con un número y secuencia conocida de glucosamina y unidades de N-acetil glucosamina que están unidas en β-1-6 entre sí. Las formas sintéticas pueden ser tan pequeñas como 4 monómeros en algunos casos.

La solicitud de patente de EE. UU. publicada N° US-2011-0150880 describe oligosacáridos sintéticos, sus síntesis y su conjugación con vehículos. Los oligosacáridos sintéticos se pueden usar conjugados con un vehículo, en algunas realizaciones. Un ejemplo es un conjugado de oligosacárido-vehículo que comprende un oligosacárido conjugado con un vehículo mediante un conector que es



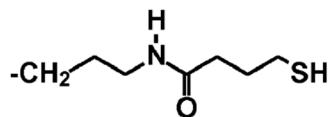
Fórmula I



Fórmula II

en donde n es mayor que 1, m es un número seleccionado desde 1 hasta 10, p es un número seleccionado desde 1 hasta 20, y R es H o un grupo alquilo, y en donde el conector está unido en O al oligosacárido y unido en N al vehículo. "n" puede ser 2-10, 2-5, o 2, 3, o 4, en algunas realizaciones.

Otro ejemplo es un oligosacárido que lleva un conector unido en O, en donde el conector comprende



Fórmula III,

en donde el oligosacárido es una poliglucosamina. La poliglucosamina puede ser una glucosamina unida en β -1-6 que tiene 2-20 monómeros de longitud, 5-11 monómeros de longitud, por ejemplo.

El tamaño de PNAG y dPNAG puede variar y puede venir dictado por la aplicación particular. Normalmente, puede variar el peso molecular de PNAG y de dPNAG desde aproximadamente 900 dáltones (Da) hasta 750 kilodáltones (kDa). En algunos aspectos, PNAG o dPNAG tiene un peso molecular de menos 2 kDa. En algunas realizaciones, el peso molecular de PNAG o dPNAG puede ser al menos aproximadamente 2200 dáltones, o al menos aproximadamente 2500 dáltones, o al menos aproximadamente 3000 dáltones. En algunas realizaciones, PNAG o dPNAG pueden ser al menos 9, al menos 10 unidades de monómero de longitud, o al menos 12 unidades de monómero de longitud, o al menos 15 unidades de monómero de longitud. En otros aspectos, PNAG o dPNAG tiene un peso molecular de al menos 100 kDa, opcionalmente en el intervalo de 100-500 kDa.

Como se trata en mayor detalle en el presente documento, PNAG y dPNAG, que incluyen versiones de peso molecular más bajo de PNAG y dPNAG, se pueden conjugar con un vehículo tal como una proteína transportadora. Cuando se conjugan con un vehículo, PNAG y dPNAG pueden ser tan pequeños como 2-3 unidades de monómero, pero preferentemente tienen al menos 4-6 unidades de monómero de longitud. Los polisacáridos entre 800 Da y 1.000 kDa serán típicos. Las formas de PNAG o dPNAG de este tamaño se pueden sintetizar de nuevo como se describe en el presente documento. Cuando se usa sin un compuesto de vehículo, el PNAG o dPNAG puede ser aproximadamente 100 kDa o mayor.

Preparación de PNAG

Se describe el uso de formas que existen de forma natural y sintéticas de dPNAG y PNAG, que incluyen dPNAG y PNAG aislada o derivada de los patógenos no *ica/pga* que expresan PNAG descritos en el presente documento. Como se usa en el presente documento, la PNAG o la dPNAG que existe de forma natural es una que existe en, y opcionalmente se puede aislar o derivar de, fuentes que existen de forma natural.

Se pueden proporcionar y/o usar antígenos de PNAG y dPNAG en forma aislada. Un polisacárido aislado, tal como dPNAG aislado, es uno que ha sido retirado y así separado de al menos en parte del entorno en el que existe normalmente o en el que se ha sintetizado. En algunos casos, un polisacárido aislado se separa suficientemente de otros compuestos a caracterizar estructuralmente o funcionalmente. Por ejemplo, un polisacárido aislado puede ser "secuenciado" para determinar su composición química.

Se puede aislar dPNAG de PNAG nativa o se puede obtener de PNAG más altamente acetilada que existe de forma natural usando los métodos de desacetilación descritos en el presente documento. También se puede aislar dPNAG que se sintetiza *in vitro* a partir de su mezcla de reacción de síntesis, separándolo así de los sustratos de reacción, enzimas, cofactores, catalizadores, o falsos productos de reacción.

Se pueden preparar PNAG y dPNAG a partir de cualquier cepa microbiana (incluyendo bacteriana) que lleve el locus *ica*. Estas cepas que llevan *ica* incluyen las que expresan naturalmente el locus *ica*, tales como, pero no se limitan a, *S. epidermidis* y *S. aureus*. Las cepas específicas incluyen *S. epidermidis* RP62A (ATCC número 35984), *S. epidermidis* RP12 (ATCC número 35983), *S. epidermidis* M187, *S. aureus* RN4220 (pCN27) y *S. aureus* MN8 mucoide. Las cepas que llevan *ica* también incluyen las que han sido transformadas con los genes en el locus *ica* (por ejemplo, *S. carnosus* TM300 (pCN27)).

Se pueden preparar PNAG nativa mediante una variedad de métodos que incluyen extraer una preparación de PNAG nativa en bruto de un cultivo microbiano, que incluye células y sobrenadantes de cultivo sin células, dando como resultado el aislamiento de un material enriquecido en PNAG nativa de alto peso molecular de la preparación de PNAG en bruto, y obtenido inicialmente por precipitación de una PNAG impura que contiene el material enriquecido en PNAG de alto peso molecular con un disolvente tal como metanol, etanol, acetona o cualquier otro disolvente orgánico conocido para un experto en la técnica por ser capaz de causar la precipitación de polisacáridos a partir de disoluciones acuosas. Las etapas de extracción de la preparación de PNAG nativa en bruto y el aislamiento y la precipitación de la preparación de PNAG nativa impura se pueden realizar usando métodos conocidos en la técnica y descritos en la solicitud de EE. UU. publicada N° US-2005-0118198-A1.

Entonces se puede purificar y desacetilar este material de PNAG impuro para producir dPNAG. La desacetilación se puede llevar a cabo química o enzimáticamente. La desacetilación química puede implicar, en algunos casos, incubar la preparación de PNAG impura con una base o ácido para producir una preparación de PNAG semipura, neutralizar la preparación y tratar adicionalmente la preparación neutralizada para producir dPNAG.

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

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

También se puede sintetizar dPNAG de nuevo. Los métodos para la síntesis de dPNAG de nuevo se describen en la solicitud de patente de EE. UU. publicada N° US-2005-0118198-A1 y US-2011-0150880-A1.

- 20 Algunos métodos pueden obtener dPNAG de materiales de partida tales como, pero no se limitan a, poliglucosa (es decir, dextrano), poliglucosaminas tales como quitina o quitosano, ácido poliglucosaminourónico, y el ácido poliglucosaminourónico también se puede usar para producir el antígeno de dPNAG de la invención.

25 Las purezas de PNAG y de dPNAG pueden ser de pureza variable. Como se usa en el presente documento, una preparación pura de PNAG o de dPNAG es una preparación de PNAG o de dPNAG que está más del 92 % libre de contaminantes. Estos contaminantes incluyen galactosa, fosfato, ácido teicoico y similares. En algunas realizaciones, las composiciones de PNAG y de dPNAG están al menos 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % libres de contaminantes o están 100 % libres de contaminantes. En algunas realizaciones, una composición de dPNAG está libre de PNAG altamente acetilada.

- 30 El grado de pureza de una composición de PNAG o de dPNAG se puede evaluar mediante cualquier medio conocido en la técnica. Por ejemplo, la pureza se puede evaluar por ensayos de análisis químico, así como cromatografía de gases y resonancia magnética nuclear para verificar los aspectos estructurales del material.

Vehículos

35 PNAG y dPNAG, si se sintetizan de nuevo o se obtienen de una fuente que existe de forma natural, se pueden usar en una forma conjugada o no conjugada. En una forma conjugada, se pueden conjugar PNAG o dPNAG con un vehículo (o un compuesto de vehículo, como los términos se usan indistintamente en el presente documento), ya sea directamente o mediante un conector. La conjugación puede ocurrir en cualquier posición en el polisacárido, que incluye en uno o ambos de sus extremos.

40 Un "vehículo", como se usa en el presente documento, es un compuesto que se puede conjugar con un polisacárido ya sea directamente o mediante el uso de un conector. El vehículo puede ser inmunológicamente activo (es decir, inmunogénico) o puede ser inerte. Cuando se usa *in vivo*, se debe entender que el vehículo es seguro para administración a un sujeto.

45 Los vehículos incluyen, pero no se limitan a, proteínas, o péptidos, polisacáridos, ácidos nucleicos, u otros polímeros, lípidos y moléculas pequeñas. Las proteínas transportadoras incluyen por ejemplo, proteínas plasmáticas tales como albúmina de suero, inmunoglobulinas, apolipoproteínas y transferrina; polipéptidos bacterianos tales como TRPLE, β -galactosidasa, polipéptidos tales como proteína gD del herpes, alérgenos, toxoides diftéricos y tetánicos, flagelina de salmonella, pilina de hemophilus, proteínas de la membrana de 15 kDa, 28-30 kDa y 40 kDa de hemophilus, *Escherichia coli*, enterotoxina ltb lábil al calor, toxina del cólera y proteínas virales que incluyen VP del rotavirus y proteínas f y g del virus respiratorio sincitial.

50 55 Las proteínas transportadoras que pueden ser particularmente útiles para inmunización incluyen hemocianina de lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja. Se puede usar como vehículo cualquier otro compuesto que sea inmunogénico en el sujeto que se inmuniza.

Se conocen en la técnica muchos métodos para conjugar un polisacárido con una proteína. En general, el polisacárido se debe activar o hacer que sea de otro modo susceptible para la conjugación (es decir, al menos un resto debe ser capaz de unirse covalentemente a una proteína u otra molécula). Se conocen muchos de dichos métodos. Se puede hacer referencia a las solicitudes de patente de EE. UU. publicadas N° US-2005-0118198-A1 y US-2011-0150880-A1 y las patentes de EE. UU. N° 4356170, 4663160, 4619828, 4808700, 4711779.

El vehículo se puede conjugar con PNAG o dPNAG mediante un conector o espaciador. Se puede acoplar un polisacárido a un conector o un espaciador mediante cualquier medio conocido en la técnica que incluye, por ejemplo, usando un extremo reductor libre del polisacárido para producir un enlace covalente con un espaciador o conector. Se puede producir un enlace covalente convirtiendo un extremo reductor libre de PNAG o dPNAG en un 1-aminoglucosído libre, que se puede unir covalentemente posteriormente a un espaciador por acilación. (Lundquist et al., J. Carbohydrate Chem., 10:377 (1991)). Alternativamente, PNAG o dPNAG se pueden unir covalentemente al espaciador usando un éster activo de N-hidroxisuccinimida como grupo activado en el espaciador (Kochetkov, Carbohydrate Research, 146:C1 (1986)). El extremo reductor libre de PNAG o dPNAG también se puede convertir en una lactona usando yodo e hidróxido potásico (Isbell et al., Methods of Carbohydrate Chemistry, Academic Press, New York (1962)). La lactona se puede unir covalentemente al espaciador por medio de un grupo amino primario en el espaciador o conector. El extremo reductor libre de PNAG o dPNAG también se puede unir covalentemente al conector o espaciador usando aminación reductora.

Anticuerpos

La invención engloba anticuerpos que se unen a PNAG y/o dPNAG. Los anticuerpos pueden ser o anticuerpos monoclonales o anticuerpos policlonales. Los anticuerpos que se unen a dPNAG también se pueden unir a formas de formas altamente acetiladas de PNAG. Los anticuerpos se pueden preparar usando dPNAG o PNAG u oligosacáridos sintéticos compuestos de >3 unidades de monosacárido de glucosamina o N-acetil glucosamina, opcionalmente conjugada con un vehículo y/o usada junto con un adyuvante. Los anticuerpos se pueden producir usando PNAG o dPNAG derivados de los patógenos no *ica/pga* PNAG-positivo o patógenos que llevan *ica* o que llevan *pga*.

Los anticuerpos policlonales se producen, en general, en animales por múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales de un antígeno y un adyuvante. Se pueden generar anticuerpos policlonales contra PNAG o dPNAG u oligosacáridos sintéticos conjugados inyectando PNAG o dPNAG en forma conjugada o no conjugada o los oligosacáridos sintéticos en una forma conjugada, solos o en combinación con un adyuvante. Los métodos de preparación de dichos policlonales se describen en la solicitud de patente de EE. UU. publicada Nº US-2005-0118198-A1.

Brevemente, se combinan dPNAG o dPNAG, en forma conjugada o no conjugada, u oligosacáridos conjugados, con un adyuvante tal como adyuvante incompleto de Freund (por ejemplo, 100 µg de conjugado para conejos o ratones en 1-3 volúmenes de Freund) y se inyectan por vía intradérmica en múltiples sitios. Aproximadamente un mes después, los animales se refuerzan con 1/5 - 1/10 de la cantidad original de antígeno, o conjugado de antígeno, en adyuvante por inyección subcutánea en múltiples sitios. Los animales se sangran una a dos semanas después, y se ensaya el suero para la presencia de anticuerpo. Los animales se pueden reforzar repetidamente hasta que se estabilice el título de anticuerpos. El animal se puede reforzar con PNAG o dPNAG o conjugados de oligosacárido sintético solo, conjugado de PNAG o dPNAG o conjugados de oligosacárido sintético, o PNAG o dPNAG conjugado con un compuesto de vehículo diferente, o conjugados de oligosacárido sintético, con o sin un adyuvante. En algunas realizaciones, los refuerzos pueden comprender PNAG en vez de dPNAG, o pueden contener una mezcla de dPNAG y PNAG.

Además de suministrar una fuente de anticuerpos policlonales, los animales inmunizados se pueden usar para generar anticuerpos monoclonales específicos de PNAG y específicos de dPNAG. Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo monoclonal" se refiere a una población homogénea (es decir, clonal individual) de inmunoglobulinas que se unen al mismo epítope de un antígeno. Los anticuerpos monoclonales tienen la misma reordenación de genes Ig y así demuestran especificidad de unión idéntica. En el caso en el que se use dPNAG o conjugados de oligosacárido sintético para generar los anticuerpos, el epítope puede estar presente en PNAG altamente acetilada, así como dPNAG, y así los anticuerpos producidos contra dPNAG también se pueden unir a PNAG.

Se conocen en la técnica métodos de preparación de anticuerpos monoclonales. Se pueden preparar anticuerpos monoclonales mediante una variedad de métodos. En dicho método, se inmortalizan células del bazo aisladas del animal inmunizado por fusión con células de mieloma o por transformación con el virus de Epstein Barr, y se criban e identifican clones que expresan el anticuerpo deseado. Otros métodos implican el aislamiento de las secuencias de genes Ig reordenadas y la clonación en líneas celulares inmortalizadas. Dichos métodos se describen en mayor detalle en las solicitudes de patente de EE. UU. publicadas Nº US-2005-0118198-A1 y US-2011-0150880-A1.

Los anticuerpos específicos para PNAG pueden ser, sin limitación, anticuerpos murinos, humanos o quiméricos tales como, pero no se limitan a, anticuerpos humanizados.

Se pueden preparar anticuerpos monoclonales humanos por cualquiera de los métodos conocidos en la técnica, que incluyen los desvelados en la patente de EE. UU. Nº 5567610, la patente de EE. UU. Nº 5565354, la patente de EE. UU. Nº 5571893, Kozber, J. Immunol. 133: 3001 (1984), Brodeur, et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, p. 51-63 (Marcel Dekker, Inc, New York, 1987) y Boerner et al., J. Immunol., 147: 86-95 (1991). Se pueden obtener anticuerpos humanos por recuperación de linfocitos productores de anticuerpos de la sangre u otros tejidos de los seres humanos que producen el anticuerpo contra un antígeno de interés (por ejemplo, dPNAG o PNAG). Estos linfocitos se pueden tratar para producir células que crecen por sí mismas en el laboratorio

en condiciones de cultivo apropiadas. Los cultivos celulares se pueden cribar para la producción de anticuerpo contra el antígeno de interés y luego se criban. Se pueden usar cultivos clonales para producir anticuerpos monoclonales humanos contra dPNAG o PNAG, o se pueden clonar los elementos genéticos que codifican las porciones variables de la cadena pesada y ligera del anticuerpo e insertar en vectores de ácido nucleico para la producción de anticuerpo de diferentes tipos. Además de los métodos convencionales para preparar anticuerpos monoclonales humanos, dichos anticuerpos también se pueden preparar inmunizando animales transgénicos que son capaces de producir anticuerpos humanos (por ejemplo, Jakobovits et al., PNAS USA, 90: 2551 (1993), Jakobovits et al., Nature, 362: 255-258 (1993), Brugermann et al., Year in Immunol., 7:33 (1993) y la patente de EE. UU. Nº 5569825 concedida a Lonberg).

Como se usa en el presente documento, un "anticuerpo monoclonal humanizado" es un anticuerpo monoclonal o fragmento funcionalmente activo del mismo que tiene al menos regiones constantes humanas y una región de unión al antígeno, tal como una, dos o tres CDR, de una especie no humana. Los anticuerpos humanizados tienen utilidad clínica particular en que reconocen específicamente antígenos de interés, pero no provocarán una respuesta inmunitaria en los seres humanos contra el anticuerpo en sí. Como un ejemplo, se pueden injertar CDR murinas en la región estructural de un anticuerpo humano para preparar el anticuerpo humanizado. Véase, por ejemplo, L.

Riechmann et al., Nature 332, 323 (1988); M. S. Neuberger et al., Nature 314, 268 (1985) y el documento de patente EPA 0 239 400. Alternativamente, se pueden construir anticuerpos monoclonales humanizados reemplazando las regiones no CDR de un anticuerpo no humano con regiones similares de anticuerpos humanos mientras que retengan la especificidad epítópica del anticuerpo original. Por ejemplo, se pueden unir covalentemente CDR no humanas y opcionalmente algunas de las regiones estructurales con regiones FR y/o Fc/pFc' humanas para producir un anticuerpo funcional. Existen entidades comerciales en los Estados Unidos que sintetizan anticuerpos humanizados a partir de regiones de anticuerpos murinos específicos, tales como Protein Design Labs (Mountain View California), Abgenix y Medarex. También se puede hacer referencia a la solicitud de patente EP Nº 0239400.

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

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

Usos

Los polisacáridos, oligosacáridos sintéticos y anticuerpos de la invención son útiles en una variedad de aplicaciones diferentes que incluyen aplicaciones *in vitro*, *in situ* e *in vivo*. Los polisacáridos y oligosacáridos sintéticos se pueden usar para inmunizar sujetos *in vivo* para prevenir o tratar infección por patógenos no *ica/pga* PNAG-positivo. Los polisacáridos y oligosacáridos sintéticos también se pueden usar para desarrollar anticuerpos específicos para PNAG o dPNAG que, a su vez, se pueden usar para inmunizar sujetos *in vivo* para prevenir o tratar infección por patógenos no *ica/pga* PNAG-positivo.

5 Se puede usar PNAG y/o dPNAG derivada de patógenos no *ica/pga* PNAG-positivo para cribar componentes de unión tales como anticuerpos. Los anticuerpos también se pueden usar para detectar patógenos que expresan PNAG, que incluyen detectar (es decir, diagnosticar) la infección en un sujeto. Se describen métodos de generación de anticuerpos que se unen a PNAG y dPNAG.

10 Se puede usar PNAG y/o dPNAG derivada de patógenos no *ica/pga* PNAG-positivo para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto que tiene o en riesgo de desarrollar una infección por cualquier patógeno que expresa PNAG, que incluye los que llevan un locus *ica* y los que no. Se debe entender que "PNAG y/o dPNAG derivada de patógenos no *ica/pga* PNAG-positivo" significa los polisacáridos producidos a partir de patógenos no *ica/pga* PNAG-positivo usando los métodos descritos en el presente documento. La inducción de la respuesta inmunitaria puede prevenir o puede tratar parcialmente o completamente la infección. El tratamiento parcial de la infección puede incluir la reducción en la intensidad o la frecuencia de los síntomas y/o la reducción parcial en la carga de patógenos en el sujeto. Puede ser útil el tratamiento parcial donde un sujeto se administra o se administrará con uno o varios de otros agentes terapéuticos. Se lleva a cabo la inducción de la respuesta inmunitaria administrando al sujeto una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmunitaria tal como una respuesta de anticuerpos contra PNAG o dPNAG (o patógenos que expresan PNAG) de cualquiera de PNAG o dPNAG o composiciones de las mismas.

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

20 Se 25 El sujeto puede ser uno que tiene o uno en riesgo de desarrollar una infección por un patógeno que expresa PNAG si dicho patógeno lleva un locus *ica* o no. Un sujeto en riesgo de desarrollar una infección por un patógeno que expresa PNAG puede estar en riesgo de exponerse a dicho patógeno. Como se describe en el presente documento, varios patógenos no *ica/pga* PNAG-positivo son resistentes a una o más clases de antibióticos. Es, por tanto, probable que pueda ocurrir la exposición a dichos patógenos puesto que no habrán sido erradicados en un sujeto previo mediante el uso de antibióticos. Las poblaciones en riesgo de desarrollar infección incluyen, por ejemplo, sujetos neonatales, sujetos inmunodeprimidos (tales como los que reciben quimioterapia), sujetos que usan inmunosupresores (incluyendo receptores de trasplantes), sujetos en diálisis, sujetos que se someten a una cirugía de alto riesgo y sujetos con dispositivos médicos permanentes tales como líneas intravenosas (por ejemplo, líneas centrales) o prótesis (por ejemplo, prótesis de sustitución de cadera o de rodilla).

30 35 Se 40 45 Se pueden administrar PNAG o dPNAG de y oligosacáridos sintéticos conjugados con vehículos de proteína al sujeto en una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmunitaria. Dicha cantidad eficaz puede ser una cantidad suficiente para ayudar al sujeto en la producción de su propia protección inmunitaria, por ejemplo, induciendo la producción de anticuerpos específicos para PNAG y/o dPNAG, induciendo la producción de células de memoria y posiblemente una reacción de linfocitos citotóxicos, etc. La respuesta inmunitaria puede prevenir a su vez que ocurra la infección por un patógeno que expresa PNAG en un sujeto que se expone a dicho patógeno. Un experto habitual puede evaluar si una cantidad de PNAG o dPNAG o vacunas conjugadas de oligosacárido sintético son suficientes para inducir inmunidad activa por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede evaluar la capacidad de un PNAG o dPNAG o vacunas conjugadas de oligosacárido sintético para producir anticuerpo específico de PNAG en un mamífero cribando los anticuerpos producidos en un ratón u otro sujeto usando el antígeno de PNAG. Las cantidades de PNAG o dPNAG para inducir respuestas inmunitarias pueden variar desde aproximadamente 1 hasta 100 µg, aunque no están así limitadas.

50 55 El anticuerpo o fragmento de anticuerpo específico para PNAG y/o dPNAG es útil para inducir la inmunización pasiva en un sujeto, por ejemplo, previniendo el desarrollo de infección sistémica en los sujetos en riesgo de exposición a patógenos que expresan PNAG, que incluyen patógenos no *ica/pga* PNAG-positivo. El método para inducir inmunidad pasiva a la infección implica administrar a un sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo específico para PNAG y/o dPNAG o los oligosacáridos sintéticos para inducir una respuesta inmunitaria a PNAG o patógenos que expresan PNAG, que incluye patógenos no *ica/pga* PNAG-positivo.

El anticuerpo o fragmento de anticuerpo se puede administrar a cualquier sujeto en riesgo de desarrollar una infección por patógenos no *ica/pga* PNAG-positivo, y en algunas realizaciones puede ser particularmente apto para sujetos incapaces de inducir inmunidad activa a PNAG y/o dPNAG. PNAG o dPNAG o vacunas conjugadas de oligosacáridos sintéticos podrían no ser completamente eficaces en la prevención o la eliminación de una infección en ciertos sujetos

y, por tanto, dichos sujetos se pueden beneficiar del tratamiento con anticuerpo específico para PNAG y/o dPNAG. Un sujeto que es incapaz de inducir una respuesta inmunitaria incluye un sujeto inmunodeprimido (por ejemplo, un sujeto que recibe quimioterapia, un sujeto que tiene sida, etc.) o un sujeto que todavía no ha desarrollado el sistema inmunitario (por ejemplo, recién nacido prematuro).

- 5 El anticuerpo o fragmento de anticuerpo se administra al sujeto en una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmunitaria a PNAG o patógenos que expresan PNAG tales como patógenos no *ica/pga* PNAG-positivo. Como se usa en el presente documento, una cantidad eficaz o anticuerpo o fragmento de anticuerpo para inducir una respuesta inmunitaria es una cantidad de anticuerpo o fragmento de anticuerpo que es suficiente para (i) prevenir que ocurra la infección en un sujeto que se expone al patógeno; (ii) inhibir el desarrollo de la infección, es decir, detener o ralentizar su desarrollo; y/o (iii) aliviar la infección, es decir, erradicación del microbio en sujetos infectados. Los microbios incluyen bacterias, virus, hongos, parásitos y similares.

Usando procedimientos conocidos por los expertos habituales, se puede determinar si una cantidad de anticuerpo o fragmento de anticuerpo es una cantidad eficaz en un ensayo de opsonización *in vitro* que es predictivo del grado de opsonización de un anticuerpo. Un anticuerpo que opsoniza un microbio tal como una bacteria es uno que cuando se añade a una muestra de microbios provoca la fagocitosis de los microbios. Un ensayo de opsonización puede ser un ensayo colorimétrico, un ensayo quimioluminiscente, un ensayo de captación fluorescente o de radiomarcas, un ensayo citotóxico mediado por células u otro ensayo que mide el potencial opsónico de un material.

Composiciones farmacéuticas y formulaciones

20 En general, cuando se administran *in vivo*, los polisacáridos, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de la invención se aplican en composiciones farmacéuticamente aceptables. Dichas composiciones pueden comprender vehículos farmacéuticamente aceptables, sales, agentes de tamponamiento, conservantes, adyuvantes y opcionalmente otros componentes profilácticos o terapéuticos. Un vehículo farmacéuticamente aceptable significa una o más cargas sólidas o líquidas, diluyentes o sustancias de encapsulación compatibles que son adecuadas para administración a un humano u otro animal. En el contexto de un vehículo farmacéuticamente aceptable, el término "vehículo" indica un componente orgánico o inorgánico, natural o sintético, con el que el polisacárido, anticuerpo o fragmento de anticuerpo se combina para facilitar el uso que incluye la administración. Los componentes de las composiciones farmacéuticas también deben ser capaces de ser combinados con el polisacárido, anticuerpo o fragmento de anticuerpo, y entre sí, de un modo de forma que no exista interacción que alteraría sustancialmente la eficiencia farmacéutica deseada.

30 Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, las preparadas a partir de los siguientes ácidos: clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, p-toluenosulfónico, tartárico, cítrico, metanosulfónico, fórmico, malónico, succínico, naftaleno-2-sulfónico y bencenosulfónico. Por tanto, se pueden preparar sales farmacéuticamente aceptables como sales de metal alcalino o alcalinotérreo, tales como sales de sodio, potasio o calcio del grupo ácido carboxílico.

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

40 Las composiciones adecuadas para administración parenteral normalmente comprenden una preparación acuosa estéril del polisacárido, anticuerpo o fragmento de anticuerpo, que puede ser isotónica con la sangre del sujeto receptor. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear están agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro sódico. Además, se emplean convencionalmente aceites no volátiles estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este fin se puede emplear cualquier aceite no volátil suave que incluye mono o di-glicéridos sintéticos. Además, ácidos grasos tales como ácido oleico encuentran uso en la preparación de inyectables. Las formulaciones de vehículo adecuadas para administraciones subcutáneas, intramusculares, intraperitoneales, intravenosa, etc., se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA.

50 Los polisacáridos, oligosacáridos, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos se administran en cantidades eficaces. Pueden ser eficaces las dosis de polisacárido u oligosacárido que varían desde 1-100 µg, dependiendo del modo de administración. Pueden ser eficaces las dosis de anticuerpo o fragmento de anticuerpo que varían desde 0,1-100 mg/kg y 0,1-20 mg/kg, dependiendo del modo de administración. La cantidad absoluta dependerá de una variedad de factores que incluyen si la administración se realiza en un sujeto de alto riesgo aún no infectado con los microbios o en un sujeto que ya tiene una infección, el tratamiento simultáneo, el número de dosis y los parámetros del paciente individual que incluyen edad, estado físico, tamaño y peso. Estos son factores bien conocidos para los expertos habituales en la técnica y se pueden tratar con no más de experimentación rutinaria. Se prefiere, en general, usar una dosis máxima, es decir, la dosis segura más alta según el criterio médico sensato.

55 Se contemplan dosis múltiples de los polisacáridos, anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpos. En general, los esquemas de inmunización implican la administración de una alta dosis de un antígeno seguido por dosis más bajas posteriores de antígeno después de un periodo de espera de varias semanas. También se pueden administrar dosis

adicionales. El programa de administración para la inmunización pasiva sería bastante diferente con administración más frecuente, si fuera necesario. Se puede usar cualquier pauta que dé como resultado una respuesta inmunitaria potenciada a la infección microbiana y/o posterior protección de la infección. Un experto habitual en la técnica puede determinar intervalos de tiempo deseados para la administración de dosis múltiples de un antígeno particular

5 empleando no más que experimentación rutinaria. Se pueden administrar dosis de vacuna durante un periodo de 1 a 6 meses, opcionalmente con dosis igualmente separadas en el tiempo. Para anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, los intervalos de administración varían, en general, desde 14-180 días.

Están disponibles una variedad de vías de administración. El modo particular seleccionado dependerá de, por ejemplo, la afección particular que está tratándose y la dosis requerida para la eficacia terapéutica. Los métodos descritos, en 10 términos generales, se pueden poner en práctica usando cualquier modo de administración que sea medicamente aceptable, que significa cualquier modo que produzca niveles eficaces de una respuesta inmunitaria sin causar efectos adversos clínicamente inaceptables. Los modos de administración preferidos son las vías parenterales. El término "parenteral" incluye inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal e intraesternal, o técnicas de infusión. Otras vías incluyen, pero no se limitan a, oral, nasal, dérmica, sublingual y local.

15 Otros sistemas de administración pueden incluir sistemas de administración de liberación con el tiempo, liberación retardada o de liberación sostenida. Dichos sistemas pueden evitar administraciones repetidas de los polisacáridos de la invención, aumentando la conveniencia al sujeto y al médico. Están disponibles muchos tipos de sistemas de administración de liberación y son conocidos por los expertos habituales en la técnica. Incluyen sistemas basados en polímero tales como ácido poliláctico y poliglicólico, polianhídridos y policaprolactona; sistemas no de polímero que 20 son lípidos que incluyen esteroles tales como colesterol, ésteres de colesterol y ácidos grasos o grasas neutras tales como mono-, di- y triglicéridos; sistemas de liberación de hidrogeles; sistemas silásticos; sistemas basados en péptidos; recubrimientos de cera, comprimidos por compresión usando aglutinantes y excipientes convencionales, implantes parcialmente fundidos y similares. Los ejemplos específicos incluyen, pero no se limitan a: (a) sistemas de erosión en 25 los que el polisacárido está contenido en una forma dentro de una matriz, encontrada en las patentes de EE. UU. Nº 4.452.775 (Kent); 4.667.014 (Nestor et al.); y 4.748.034 y 5.239.660 (Leonard) y (b) sistemas de difusión en los que un componente activo permea a una tasa controlada a través de un polímero, encontrados en las patentes de EE. UU. Nº 3.832.253 (Higuchi et al.) y 3.854.480 (Zaffaroni). Además, se puede usar un sistema de administración de hardware basado en bomba, algunos de los cuales están adaptados para implantación.

Agentes secundarios

30 Se pueden administrar anticuerpos específicos para dPNAG y/o PNAG junto con otros agentes. La naturaleza del (de los) otro(s) agente(s) puede depender de si se está administrando el anticuerpo específico de dPNAG o de PNAG.

Por ejemplo, cuando se administran para inducir inmunidad activa y/o para producir anticuerpo, dPNAG se puede usar 35 junto con un adyuvante. Como se usa en el presente documento, el término adyuvante se refiere a una sustancia que se administra junto con (incluyendo al mismo tiempo, en la misma formulación, etc.) un antígeno (tal como dPNAG) para potenciar una respuesta inmunitaria específica de antígeno. Los adyuvantes incluyen, pero no se limitan a, compuestos de aluminio, por ejemplo, geles, hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio, y adyuvante completo o incompleto de Freund (por ejemplo, en la que el antígeno de dPNAG se incorpora en la fase acuosa de una emulsión de agua en aceite de parafina estabilizada). El aceite de parafina se puede sustituir con diferentes tipos de aceites, 40 por ejemplo, escualeno o aceite de cacahuete. Otros materiales con propiedades adyuvantes incluyen BCG (*Mycobacterium tuberculosis* atenuado), fosfato de calcio, levamisol, isoprinosina, polianiones (por ejemplo, poli A: U), lentinano, toxina pertussis, lípido A, saponinas, QS-21 y péptidos, por ejemplo, muramil dipéptido. También se pueden usar como adyuvantes sales de las tierras raras, por ejemplo, lantano y cerio. La cantidad de adyuvantes depende del sujeto y el antígeno de dPNAG particular usado (por ejemplo, el nivel de sustitución de acetato) y se puede determinar fácilmente por un experto en la técnica sin excesiva experimentación.

45 El agente puede ser un antimicrobiano tal como un antibacteriano, un antiviral, un antiparásito, un antifúngico y similares.

El agente puede ser un fármaco antibacteriano (por ejemplo, un antibiótico), otro antígeno bacteriano, u otro anticuerpo 50 antibacteriano, o mezclas o combinaciones de los mismos. El uso de antibióticos en el tratamiento de infección bacteriana es rutinario. También es rutinario el uso de antígenos para inducir la inmunización activa y los anticuerpos para inducir la inmunización pasiva. En esta realización, un vehículo de administración común (por ejemplo, comprimido, implante, disolución inyectable, etc.) podría contener tanto el agente activo de la invención como un antibiótico y/u otro antígeno y/u otro anticuerpo. Alternativamente, el antibiótico y/u otro antígeno y/u otro anticuerpo se puede administrar por separado. El antibiótico se puede conjugar con dPNAG o con un anticuerpo anti-dPNAG.

55 Se conocen bien los fármacos antibióticos antibacterianos e incluyen, sin limitación, penicilina G, penicilina V, ampicilina, amoxicilina, bacampicilina, ciclacicilina, epicilina, hetacilina, pivampicilina, meticilina, nafcilina, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina, flucloxacilina, carbenicilina, ticarcilina, avlocilina, mezlocilina, piperacilina, amdinocilina, cefalexina, cefradina, cefadoxilo, cefaclor, cefazolina, cefuroxima axetilo, cefamandol, cefonicid, cefoxitina, cefotaxima, ceftizoxima, cefmenoxina, ceftriaxona, moxalactam, cefotetan, cefoperazona, ceftazidima, imipenem, clavulanato, timentina, subbactama, neomicina, eritromicina, metronidazol, cloranfenicol, clindamicina, lincomicina, vancomicina,

trimetoprim-sulfametoxazol, aminoglucósidos, quinolonas, tetraciclinas y rifampina (véase Goodman and Gilman's, Pharmacological Basics of Therapeutics, 8^a Ed., 1993, McGraw Hill Inc.)

Se conocen en la técnica los antígenos de polisacárido (distintos de PNAG y dPNAG) y los anticuerpos específicos de polisacárido (distintos de anticuerpos específicos de PNAG). Los ejemplos incluyen antígeno Vi de la cápsula de

- 5 *Salmonella typhi* (Szu, S.C., X. Li, A.L. Stone and J.B. Robbins, Relation between structure and immunologic properties of the Vi capsular polysaccharide, *Infection and Immunity*. 59:4555-4561 (1991)); cápsula K5 de *E. coli* (Vann, W., M.A. Schmidt, B. Jann and K. Jann, The structure of the capsular polysaccharide (K5 antigen) of urinary tract infective *Escherichia coli*, 010: K5:H4. A polymer similar to desulfo-heparin, *European Journal of Biochemistry*. 116: 359-364, (1981)); cápsula de tipo 5 de *Staphylococcus aureus* (Fournier, J.-M., K. Hannon, M. Moreau, W.W. Karakawa and W.F. Vann, Isolation of type 5 capsular polysaccharide from *Staphylococcus aureus*, *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol. (Paris)*. 138: 561-567, (1987)); expolisacárido II de *Rhizobium meliloti* (Glazebrook, J. and G.C. Walker, a novel expolysaccharide can function in place of the calcofluor-binding expolysaccharide in nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*, *Cell*. 65:661-672 (1989)); tipo III de *Streptococcus* del grupo B (Wessels, M.R., V. Pozsgay, D.L. Kasper and H. J. Jennings, Structure and immunochemistry of an oligosaccharide repeating unit of the capsular polysaccharide of
- 10 type III Group B *Streptococcus*, *Journal of Biological Chemistry*. 262:8262-8267 (1987)); cadena lateral específica de O de Fisher 7 de *Pseudomonas aeruginosa* (Knirel, Y.A., N.A. Paramonov, E.V. Vinogradov, A.S. Shashkow, B.A. N.K. Kochetkov, E.S. Stanislavsky and E.V. Kholodkova, Somatic antigens of *Pseudomonas aeruginosa* The structure of O-specific polysaccharide chains of lipopolysaccharides of *P. aeruginosa* O3 (Lanyi), 025 (Wokatsch) and Fisher immunotypes 3 and 7, *European Journal of Biochemistry*. 167:549, (1987)); cadena lateral específica de O de *Shigella sonnei* (Kenne, L., B. Lindberg and K. Petersson, Structural studies of the O-specific side-chains of the *Shigella sonnei* phase I lipopolysaccharide, *Carbohydrate Research*. 78:119-126, (1980)); cápsula de tipo I de *S. pneumoniae* (Lindberg, B., Lindqvist, B., Lonngren, J., Powell, D.A., Structural studies of the capsular polysaccharide from *S. pneumoniae* type 1, *Carbohydrate Research*. 78:111-117 (1980)); y antígeno del grupo de *S. pneumoniae* (Jennings, H.J., C. Lugowski and N. M. Young, Structure of the complex polysaccharide C-substance from *S. pneumoniae* type 1, *Biochemistry*. 19:4712-4719 (1980)). Los expertos en la técnica conocen otros antígenos no de polipéptido y anticuerpos específicos no de polisacárido y se pueden usar juntos con las composiciones de la invención.

Detección y ensayos de diagnóstico

Los antígenos de oligosacárido de dPNAG y sintéticos y los anticuerpos para ellos también son útiles en ensayos de diagnóstico para determinar un estado inmunológico de un sujeto o muestra o se pueden usar como reactivos en inmunoensayos. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden usar para detectar la presencia en una muestra de un microbio tal como una bacteria que tiene PNAG sobre la superficie. Si el microbio está presente en la muestra, entonces los anticuerpos se pueden usar para tratar el sujeto infectado. Los anticuerpos también se pueden usar para cribar microbios para la presencia de antígeno de PNAG y para aislar antígeno de dPNAG o PNAG y microbios que contienen antígeno de dPNAG o PNAG de mezclas complejas.

35 Los ensayos anteriormente descritos y cualquier otro ensayo conocido en la técnica se pueden llevar a cabo por marcado de dPNAG o anticuerpos y/o inmovilizando dPNAG o los anticuerpos en una matriz insoluble. Los métodos analíticos y de diagnóstico para usar dPNAG y/o sus anticuerpos usan al menos uno de los siguientes reactivos: análogo de analito marcado, análogo de analito inmovilizado, componente de unión marcado, componente de unión inmovilizado y conjugados estéricos. La marca usada puede ser cualquier funcionalidad detectable que no interfiera 40 con la unión de analito y su componente de unión. Se conocen numerosas marcas para dicho uso en inmunoensayos. Por ejemplo, los compuestos que se pueden detectar directamente, tales como fluorocromo, marcas quimioluminiscentes y radiactivas, así como compuestos que se pueden detectar mediante reacción o derivatización, tales como enzimas. Los ejemplos de estos tipos de marcas incluyen los radioisótopos ³²P, ¹⁴C, ¹²⁵I, ³H y ¹³¹I, fluoróforos tales como quelatos de las tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, 45 umbelifera, luciferas tales como luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (patente de EE. UU. N° 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalavindionas, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina, β-galactosidasa, glucomilasa, lisozima, oxidasa de sacárido tales como glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Oxidasa heterocíclicas tales como uricasa y xantina oxidasa, acopladas a una enzima que 50 usa peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de colorante tal como HRP, lactoperoxidasa o microperoxidasa, biotina avidina, etiquetas de espín, marcas de bacteriófago y radicales libres estables.

Las marcas se pueden conjugar con dPNAG o anticuerpo anti-dPNAG por métodos conocidos para los expertos habituales en la técnica. Por ejemplo, las patentes de EE. UU. N° 3.940.475 y 3.645.090 demuestran la conjugación de fluoróforos y enzimas con anticuerpos. Otros ensayos que se usan supuestamente comúnmente con antígeno y anticuerpo y que se pueden usar incluyen ensayos de competición y de sándwich.

- 55 Los siguientes ejemplos están incluidos para fines de ilustración y no pretenden limitar el alcance de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Expresión del polisacárido de la superficie bacteriana poli-N-acetyl glucosamina (PNAG) mediante una variedad de especies microbianas.

- 5 *Unión directa de anticuerpos:* Se cultivan organismos en diversos medios para promover la producción de PNAG a temperaturas que varían desde 20 °C hasta 37 °C durante 24-72 horas en o condiciones de oxígeno atmosférico (21 % de O₂), 5 % de CO₂ o en condiciones anaerobias. Se suspenden directamente células de placas en PBS (solución salina tamponada con fosfato), mientras que aquellas en caldo se lavan y se resuspenden en PBS.
- 10 Se disponen las muestras sobre portaobjetos, seguido por fijación con metanol durante 1 min. Se incuban adicionalmente las muestras con o MAb F429 (control negativo, IgG1 humana específica para antígeno de alginato de *Pseudomonas aeruginosa*) directamente conjugado con Alexafluor 488 (AF488) (dilución 1:313 de 1,63 mg/mL de disolución madre, concentración final 5,2 ug/mL) o MAb F598 (IgG1 humana específica para PNAG) directamente conjugado con AF488 (dilución 1:833 de 4,35 mg/mL de disolución madre, concentración final 5,2 ug/mL) en PBS que contiene 0,5 % de BSA durante la noche a 4 °C y Syto 83 4 uM. Las muestras se lavan con PBS y se montan con cubreobjetos de 1,5 para análisis confocal.
- 15 15 *Especificidad de MAb F598 que se une a PNAG:* Se cultivan organismos en diversos medios para promover la producción de PNAG a temperaturas que varían desde 20 °C hasta 37 °C durante 24-72 h en o condiciones de oxígeno atmosférico (21 % de O₂), 5 % de CO₂ o en condiciones anaerobias. Se suspenden directamente las células bacterianas de placas en TBS (solución salina tamponada con Tris, pH 6,5), mientras que aquellas en caldo se lavan y se resuspenden en TBS.
- 20 20 En general, las muestras se tratan con quitinasa, dispersina B o peryodato y luego se exponen a MAb F598. Las muestras en TBS pH 6,5 se incuban con (a) 50 µg/mL de quitinasa (control negativo), (b) dispersina B (digiere PNAG) durante 24 horas a 37 °C, o (c) con peryodato 0,4 M durante 2 horas a 37 °C. PNAG se escinde por peryodato, se digiere por dispersina B y no se afecta por quitinasa. Entonces se hicieron reaccionar las células con anticuerpo monoclonal (MAb) IgG humano contra PNAG o MAb IgG1 contra antígeno irrelevante-alginato de *Pseudomonas aeruginosa* (MAb F429 (control negativo, IgG1 humana específica para antígeno de alginato de *Pseudomonas aeruginosa*). No se debe unir el anticuerpo al antígeno irrelevante en una PNAG.
- 25 30 Específicamente, se lavan las muestras y se secan al aire alícuotas de 10 µL sobre portaobjetos de vidrio, seguido por fijación por metanol durante 1 min. Se conjugó directamente el MAb F429 (control negativo) con AF488 (dilución 1:313 de 1,63 mg/mL de disolución madre, concentración final 5,2 µg/mL) y se conjugó directamente MAb F598 (anti-PNAG, lote 2) con AF488 (dilución 1:833 de 4,35 mg/mL de disolución madre, concentración final 5,2 ug/mL) en PBS que contenía 0,5 % de BSA durante la noche a 4 °C junto con Syto 83 4 µM (tiñe DNA Red). Las muestras se lavaron con PBS y se montaron sobre portaobjetos de vidrio con cubreobjetos de 1,5 para análisis confocal.

Tabla 1

Microbio	MAb F598	MAb F598 + quitinasa	MAb F598 + dispersina	MAb F598 + peryodato	Control negativo
<i>S. aureus</i> (control positivo)	Positivo (verde)	Positivo (verde)	Negativo (oscuro)	Negativo (oscuro)	Negativo (oscuro)
<i>Streptococcus pneumonia</i> (cepa D39)	Positivo (verde)	Positivo (verde)	Negativo (oscuro)	Negativo (oscuro)	Negativo (oscuro)
<i>Streptococcus pneumonia</i> (cepa ATCC8)	Positivo (verde)	Positivo (verde)	Negativo (oscuro)	Negativo (oscuro)	Negativo (oscuro)
<i>Streptococcus pyogenes</i> (cepa 950771)	Positivo (verde)	Positivo (verde)	Negativo (oscuro)	Negativo (oscuro)	Negativo (oscuro)
<i>Streptococcus agalactiae</i> (cepa M781)	Positivo (verde)	Positivo (verde)	Negativo (oscuro)	Negativo (oscuro)	Negativo (oscuro)
<i>Enterococcus faecalis</i> (cepa V583)	Positivo (verde)	Positivo (verde)	Negativo (oscuro)	ND	Negativo (oscuro)
<i>Listeria monocytogenes</i>	Positivo (verde)	Positivo (verde)	Negativo (oscuro)	Negativo (oscuro)	Negativo (oscuro)
<i>Clostridium difficile</i>	Positivo (verde)	Positivo (verde)	Negativo (oscuro)	Negativo (oscuro)	Negativo (oscuro)

Microbio	MAb F598	MAb F598 + quitinasa	MAb F598 + dispersina	MAb F598 + peryodato	Control negativo
<i>Bacteroides fragilis</i> (cepa 9343)	Positivo (verde)	Positivo (verde)	Negativo (oscuro)	ND	Negativo (oscuro)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (cepa H37RV)	Positivo (verde)	Positivo (verde)	Negativo (oscuro)	Negativo (oscuro)	Negativo (oscuro)
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	Positivo (verde)	Positivo (verde)	Negativo (oscuro)	Negativo (oscuro)	Negativo (oscuro)
<i>Neisseria meningitidis</i> (cepa B16B6)	Positivo (verde)	Positivo (verde)	Negativo (oscuro)	Negativo (oscuro)	Negativo (oscuro)
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (cepa 179008)	Positivo (verde)	Positivo (verde)	Negativo (oscuro)	Negativo (oscuro)	Negativo (oscuro)
<i>Hemophilus influenzae</i> (no tipificable) (cepa 140)	Positivo (verde)	Positivo (verde)	Negativo (oscuro)	Negativo (oscuro)	Negativo (oscuro)
<i>Hemophilus ducreyi</i>	Positivo (verde)	Positivo (verde)	Negativo (oscuro)	Negativo (oscuro)	Negativo (oscuro)
<i>Helicobacter pylori</i> (cepa 88-3857)	Positivo (verde)	Positivo (verde)	Negativo (oscuro)	Negativo (oscuro)	Negativo (oscuro)
<i>Campylobacter jejuni</i>	Positivo (verde)	Positivo (verde)	Negativo (oscuro)	Negativo (oscuro)	Negativo (oscuro)
<i>Citrobacter rodentium</i>	Positivo (verde)	Positivo (verde)	Negativo (oscuro)	ND	Negativo (oscuro)
<i>Candida albicans</i> (levadura)	Positivo (verde)	Positivo (verde)	Negativo (oscuro)	Negativo (oscuro)	Negativo (oscuro)
<i>Candida albicans</i> (hifas)	Positivo (verde)	Positivo (verde)	Negativo (oscuro)	Negativo (oscuro)	Negativo (oscuro)
<i>Aspergillus flavis</i>	Positivo (verde)	ND	ND	ND	Negativo (oscuro)
<i>Fusarium</i>	Positivo (verde)	Positivo (verde)	Negativo (oscuro)	Negativo (oscuro)	Negativo (oscuro)
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Positivo (verde)	ND	ND	ND	Negativo (oscuro)
<i>Plasmodium berghei</i> (cepa ANKA) – en sangre de ratón infectado	Positivo (verde)	Positivo (verde)	Negativo (oscuro)	Negativo (oscuro)	Negativo (oscuro)
<i>Plasmodium falciparum</i> (cepa Senegal 2) - en sangre infectada	Positivo (verde)	Positivo (verde)	Negativo (oscuro)	Negativo (oscuro)	Negativo (oscuro)
<i>Salmonella enterica</i> serovariedad <i>typhi</i> (cepa TY2)	Positivo (verde)	Positivo (verde)	Negativo (oscuro)	Negativo (oscuro)	Negativo (oscuro)
<i>Salmonella enterica</i> serovariedad <i>typhimurium</i> (cepa LT2)	Positivo (verde)	Positivo (verde)	Negativo (oscuro)	Negativo (oscuro)	Negativo (oscuro)
ND = no se hizo.					

Además, se detectó PNAG sensible a dispersina B resistente a quitinasa sobre bacterias infectantes en muestras de efusiones del oído medio (MEF) de niños con otitis media por *S. pneumoniae* y dos muestras de MEF de niños con otitis media por *H. influenzae* no tipificable. También se tiñeron las mismas bacterias infectantes con o anticuerpo específico de *S. pneumoniae* o de *H. influenzae*. También se detectó PNAG en tejido de pulmón de un paciente

5 infectado con *M. tuberculosis*. En líquido nasofaríngeo de chinchillas experimentalmente infectadas con el serogrupo 19A de *S. pneumoniae*, se observó fácilmente la colocalización del antígeno de PNAG sensible a dispersina B resistente a quitinasa con la cápsula del serogrupo 19A. En el tubo gastrointestinal de un ratón experimentalmente infectado con *C. rodentium*, se detectó PNAG alrededor de los microbios asociados a las células epiteliales. En tejidos oculares de ratones con queratitis por *C. albicans*, se detectó PNAG en la porción de ADN-positivo de las células fúngicas.

10 Además, las cepas bacterianas que reaccionan con MAb F598, pero no con MAb F429 en análisis microscópico confocal incluyen *Vibrio cholerae* 2R1 y *Vibrio cholerae* 0395.

15 Las cepas bacterianas que reaccionan con anticuerpo policlonal de conejo contra PNAG, pero no con suero de conejo normal incluyen *Bacteroides thetaiotamicron* y *Bacteroides vulgatis*.

Ejemplo 2: *C. rodentium* en el tubo GI.

20 Se hicieron reaccionar muestras o con MAb F429 (control negativo, IgG1 humana específica contra antígeno de alginato de *P. aeruginosa*) directamente conjugado con AF488 (dilución 1:313 de 1,63 mg/mL de disolución madre, concentración final 5,2 ug/mL) o MAb F598 (IgG1 humana específica para PNAG) directamente conjugado con AF488 (dilución 1:833 de 4,35 mg/mL de disolución madre, concentración final 5,2 ug/mL) en PBS que contenía 0,5 % de BSA durante la noche a 4 °C y Syto 83 4 µM (para la tinción de núcleos). Se lavan las muestras con PBS y se montan con cubreobjetos de 1,5 para análisis confocal.

25 Los resultados mostraron la presencia de PNAG en colonias de *C. rodentium* en el tubo GI de un ratón infectado usando el anticuerpo F598. El MAb F429 no tiñó las colonias, confirmando la especificidad de tinción por el MAb F598 (datos no mostrados).

Ejemplo 3: *S. pneumoniae* en líquido de lavado del oído y nasal.

30 Este ejemplo demuestra la coexpresión en *S. pneumoniae* del tipo 19A de la cápsula con antígeno de PNAG en el líquido de lavado del oído y nasal de una chinchilla con otitis media.

35 Se incubaron muestras con 50 µg/mL de dispersina B o quitinasa en TBS durante la noche y luego se marcaron o con 1:50 de F598 (1 mg/mL) o F429 (1 mg/mL) y anti-polisacárido capsular 19A de *S. pneumoniae* de conejo (1:100) en BSA/PBS durante la noche a 4 °C, seguido por IgG anti-humana de cabra conjugada con AF 488 y AF 568 anti- conejo de cabra a 1:200 durante 1 hora a temperatura ambiente.

40 Los resultados mostraron la presencia de PNAG que rodeaba las células bacterianas de *S. pneumoniae* en lavados nasofaríngeos de una chinchilla con otitis media. Las muestras tratadas con quitinasa y dispersina B y luego expuestas a MAb F429 de control fueron negativas. Las muestras tratadas con dispersina B y luego expuestas a MAb F598 fueron negativas, mientras que las muestras tratadas con quitinasa y luego expuestas a MAb F598 fueron positivas, demostrando la presencia de PNAG en el lavado nasofaríngeo de una chinchilla con otitis media. Los patrones de tinción se solaparon con tinción anti-SPn 19A de conejo (datos no mostrados).

45 Similarmente, se detectó PNAG en líquido del oído (lavado) y las fosas nasales de una chinchilla infectada con *S. pneumoniae* 19A y que tenía otitis media, como se ha determinado por tinción con el MAb F598 específico de PNAG, pero no con el MAb F429 de control después del tratamiento con quitinasa. Los patrones de tinción se solaparon con tinción anti-SPn 19A de conejo (datos no mostrados).

Ejemplo 4: *S. pneumoniae* o *H. influenzae* no tipificable en líquido del oído humano de niño con otitis media.

50 Se incubaron muestras de líquido del oído con 100 µg/mL de DNase I durante la noche a 37 °C y luego se trataron con 50 µg/mL de quitinasa o dispersina B en TBS durante 24 horas a 37 °C. Se lavaron las muestras y se secaron al aire alícuotas de 10 µL sobre portaobjetos de vidrio, se fijaron por calor y se marcaron con 50 µg/mL de F598 (AP01) o F429 (1 mg/mL) y fosfatidilcolina anti-*S. pneumoniae* de ratón (1:100) o anti-*H. influenzae* de cobaya (células completas destruidas por calor; 1:100) en PBS que contenía 0,5 % de BSA (PBS/BSA) durante la noche a 4 °C. Se lavaron con PBS las muestras y se incubaron con 1:250 de IgG anti-humana conjugada con AF488 y o 1:200 de IgG de cabra anti-ratón o IgG de cabra anti-cobaya conjugada con AF568 en PBS/BSA durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron los portaobjetos y se montaron.

55 Los resultados demuestran la presencia de PNAG en el líquido del oído del sujeto humano que tenía una infección del oído por *S. pneumoniae* (otitis media). Las muestras expuestas a quitinasa seguido por MAb F429 o dispersina B seguido por MAb F598 fueron negativas, mientras que las muestras expuestas a quitinasa seguido por MAb F598 fueron positivas. Los patrones de tinción se solaparon con los observados con el anticuerpo de ratón contra la tinción con fosfatidilcolina de *S. pneumoniae* (datos no mostrados).

Ejemplo 5: *P. berghei* y *P. falciparum* en sangre.

Microscopía confocal de mancha de sangre nueva sin teñir preparada a partir de ratones infectados con la malaria (BALB/CJ infectados con *P. berghei* NK-65, día 18 después de la infección). La mancha se repartió con un Pap-pen en 3 pocillos para tratamientos con quitinasa, dispersina B y peryodato. Se fijó por calor el portaobjetos y se trató con

- 5 50 µg/mL de quitinasa o dispersina B en TBS durante 24 horas a 37 °C o con peryodato 0,4 M durante 2 horas a 37 °C. Se lavó el portaobjetos con PBS y se incubó con MAb F598 (1,3 mg/mL de disolución madre; se usó dilución 1:250, igual a 2,4 µL en 600 µL; concentración final 5,2 µg/mL o 3,12 µg en 600 µL; se añadieron 200 µL por pocillo) directamente conjugado con AF488 (color verde). También se añadió 4 µM de Syto 83 (color rojo de colorante de ADN) en PBS que contenía 0,5 % de BSA (BSA/PBS); ambos se incubaron durante 4 horas a temperatura ambiente.
- 10 10 Se lavó el portaobjetos con PBS y se cubrió con un cubreobjetos de 1,5 µm para visualización por microscopía confocal.

Los resultados mostraron la presencia de PNAG en la sangre de un ratón que murió de malaria cerebral. Las muestras tratadas con dispersina B o peryodato seguido por tinción con MAb F598 fueron negativas, mientras que las muestras tratadas con quitinasa seguido por tinción con MAb F598 fueron positivas (datos mostrados ahora).

- 15 15 Usando un enfoque similar, se analizó la expresión de PNAG en sangre de un humano infectado con *P. falciparum*. Las muestras teñidas con el MAb F429 de control y las muestras tratadas con dispersina B o peryodato seguido por tinción con MAb F598 fueron negativas (datos no mostrados). Las muestras tratadas con quitinasa o las muestras que no se trataron, y luego se tiñeron con F598, fueron positivas (datos no mostrados). Los patrones de tinción de F598 se solaparon con la identificación de ADN dentro de los glóbulos rojos, que indica la presencia del parásito de la malaria ya que los glóbulos rojos humanos no contienen un núcleo o ADN (datos no mostrados).
- 20 20

Ejemplo 6: *B. dolosa* en pulmón.

Usando un enfoque similar al descrito en los ejemplos previos, se seccionó tejido de pulmón de un paciente con fibrosis quística que murió de neumonía y septicemia por *B. dolosa* y se analizó para la expresión de PNAG. Se usó TO-PRO-3 para teñir núcleos de células de pulmón. Se visualizaron células de *B. dolosa* usando suero de ratón anti-*B. dolosa*

- 25 25 seguido por IgG de burro anti-ratón AF568. Se visualizó PNAG usando antisuero de conejo contra la glucoforma de PNAG 9GlcNH2-TT, seguido por la IgG de cabra anti-conejo AF488. El control negativo fue suero de conejo normal con tinción nuclear de TO-PRO-3. La expresión de PNAG se solapó con la tinción de células de *B. dolosa* (datos no mostrados).

Ejemplo 7: *C. albicans* en ojos.

- 30 30 Se desparafinaron secciones de histología incorporadas en parafina de ojos de ratón infectados con *C. albicans* usando EzDewax según instrucciones del fabricante. Los portaobjetos se rehidrataron en agua durante 2 horas a temperatura ambiente, seguido por el bloqueo en 0,5 % de BSA/PBS durante 2 horas a temperatura ambiente. Se incubaron adicionalmente las muestras con o MAb F429 (control negativo) directamente conjugado con AF488 (dilución 1:313 de 1,63 mg/mL de disolución madre, concentración final 5,2 µg/mL) o MAb F598 contra PNAG directamente conjugado con AF488 (dilución 1:833 de 4,35 mg/mL de disolución madre, concentración final 5,2 µg/mL) en PBS que contenía 0,5 % de BSA durante la noche a 4 °C y Syto 83 4 µM. Se lavaron las muestras con PBS y se montaron con cubreobjetos de 1,5 para el análisis confocal.
- 35 35

Los resultados mostraron la tinción confocal de núcleos con MAb F598, pero no MAb F429, demostrando la expresión de PNAG por *C. albicans* *in vivo* (datos no mostrados).

40 Ejemplo 8: Eficacia del MAb F598 contra PNAG microbiana en un modelo murino de queratitis por *C. albicans*.

Se indujo queratitis por raspado (3X 1 mm) de las córneas de ratones C57B1/6 macho anestesiados, seguido por inoculación con $\sim 10^1$ - 10^7 UFC/ojo de *Candida albicans* SC5314 en un volumen de 5 µL. Se administró MAb específico de PNAG (F598) o MAb IgG1 humano de control (F429) o por inyección IP y/o administración tópica 4 h después de la infección y anticuerpo adicional aplicado por vía tópica 24 y 32 horas después de la infección. Se comprobaron los ratones 24 y 32 horas después de la infección, y si los controles mostraron un daño irrecuperable de la córnea en este momento, se sacrificaron los animales y se determinó UFC/ojo. Si los controles a las 36 horas no tuvieron más de 3+ de daño al ojo dañado, se dejó que la infección progresara hasta las 48 horas, tiempo después del cual los ratones se sacrificaron y se determinaron UFC/ojo y la puntuación de patología de la córnea de 0 a 4 por el observador sin conocimiento del tratamiento del ratón. La puntuación de la patología de la córnea fue del siguiente modo:

- 50 50 Puntuación 4: Perforación de la córnea

Puntuación 3: Densa opacidad que cubre el segmento anterior

Puntuación 2: Densa opacidad que cubre la pupila

Puntuación 1: Leve opacidad que cubre parcialmente la pupila

Puntuación 0: Idéntico al ojo contralateral no infectado.

Ratones infectados por *C. albicans* tratados terapéuticamente por inyección IP y/o administración tópica de MAb F598 tuvieron niveles bacterianos notablemente reducidos en el ojo y redujeron la patología de la córnea en comparación con los ratones tratados con el MAb F429 de control. Estos datos se presentan en las FIG. 1-4.

5 El anticuerpo contra PNAG demostró la eficacia terapéutica en un modelo de queratitis por *C. albicans*, que indica la expresión *in vivo* de PNAG y el potencial para prevenir o tratar infecciones fúngicas por vacunas e inmunoterapéuticos para PNAG.

Ejemplo 9: Eficacia protectora del anticuerpo policlonal contra la vacuna conjugada de 9GlcNH₂-TT contra la neumonía letal provocada por *S. pneumoniae*.

10 Se cultivó la cepa D39 de *S. pneumoniae* durante la noche en caldo de tripticasa de soja (TSB) a 37 °C en 5 % de CO₂. Se diluyó el cultivo en caldo de Todd-Hewitt + 1 % de glucosa hasta una DO a 650 nm=0,1 y se cultivó a 37 °C hasta que DO=0,45 (aproximadamente 2,5 horas). Se inyectaron retroorbitalmente (RO) ratones CBA/N con anestesia con isoflurano con 37,5 µL de suero de cabra normal inactivado por calor o antisuero de cabra producido contra la vacuna conjugada anti-9GlcNH₂-TT diluida hasta 50 µL en PBS. Se inyectaron los ratones. Veinticuatro horas después, se diluyó la preparación bacteriana hasta DO a 650 nm = 0,45 (es decir, para este experimento, se diluyeron 15 83 µL en 917 µL en PBS dando 3 x 107 UFC/mL. Los ratones se anestesiaron con ketamina/xilazina (250 µL por ratón), y se instilaron por vía intranasal 2 x 10 µL de dosis de bacterias. Los ratones se monitorizaron para su supervivencia durante 7 días. Los resultados se muestran en la FIG. 5.

20 Además, se encontró que el MAb F598 administrado 4 h antes de la infección intranasal con la cepa DSM 11865 de serotipo 9V en ratones FVB era tan potente como el antibiótico cefotaxima (administrado 1 y 4 h después de la infección) en reducir las cargas bacterianas en los pulmones del ratón.

Ejemplo 10: Eficacia protectora del anticuerpo policlonal contra la vacuna conjugada de 9GlcNH₂-TT contra la infección letal de la piel provocada por *S. pyogenes* (*Streptococcus* del grupo A).

25 Los ratones fueron ratones CD1(ICR) hembra de 6 semanas. El grupo 1 (8 ratones) correspondió a ratones inyectados con sueros de conejos normales (NRS). El grupo 2 (8 ratones) correspondió a ratones inyectados con 9GlcNH₂-TT. Las bacterias fueron la cepa 950771 de *Streptococcus* del grupo A (GAS) usada a 10⁷ UFC/mL en fase logarítmica. Los anticuerpos fueron anti-9GlcNH₂-TT de conejo policlonal usado a 200 µL/ratón/dosis y NRS usado a 200 µL/ratón/dosis.

30 En el día 0, se extendió una disolución madre de células bacterianas de GAS sobre una placa de agar sangre (BAP) y se incubó a 37 °C durante la noche y se usó para inocular un tubo de extracto de levadura de caldo de Todd-Hewitt con 1 % de glucosa (THY+G) para el cultivo a 37 °C. Los ratones se inyectaron IP 24 horas antes de la infección. En el día 1, los ratones se inmunizaron una segunda vez IP 4 horas antes de la infección. Para preparar el inóculo para infección, se usaron 10 mL de THY+G y una suspensión bacteriana en una DO_{600nm}=0,05 preparada y dispuesta a 37 °C hasta que se logró una DO_{600nm} = 0,15. Ésta se diluyó y se sembró para las determinaciones de las UFC en BAP del siguiente modo: se sembraron 10 µL de las diluciones de 10⁻⁵ y 10⁻⁶ en BAP (2 placas para cada dilución). 35 Para preparar el inóculo infeccioso, se transfirieron 10 mL del cultivo de THY+G a un tubo cónico de 15 mL y el tubo se centrifugó a 2000 rpm durante 20 minutos para sedimentar las células bacterianas. Se desecharó el sobrenadante y el sedimento se suspendió en 1 mL de caldo THY+G que se transfirió a un tubo de microcentrifuga y se centrifugó a 8000 rpm durante 2 minutos. Se desecharó el sobrenadante y el sedimento de células bacterianas se suspendió en 500 µL de agua inyectable, luego se transfirió a una jeringa de 1 mL de 27 de calibre, y se mantuvo sobre hielo. Se preparó 40 una dilución 1:4 de 50 mg/mL de Nembutal con agua inyectable [conc. final 10 µg/mL] y se inyectó IP (0,3 mL de disolución de anestésico por ratón). Se rasuraron los flancos derechos y se limpiaron con algodón con etanol, luego se inyectaron con 0,1 mL de la suspensión bacteriana por vía subcutánea por ratón (es decir, 5x10⁵ UFC/ratón). Para confirmar el inóculo actual, se diluyó la suspensión bacteriana y se sembró para enumeración. La suspensión bacteriana inyectada tuvo una concentración de 1,7x10⁶ UFC/mL, que significa que se habían inyectado 1,7x10⁵ UFC en cada ratón. Se observaron los ratones y se sacrificaron los ratones moribundos. Los resultados se muestran en la FIG. 6.

Ejemplo 11: Eficacia protectora de anticuerpo producido en conejos contra la vacuna conjugada 9GlcNH₂-TT contra meningitis (bacterias en el cerebro) de crías de ratón de 2-3 días expuestas a *N. meningitidis* del grupo B.

50 Los ratones fueron CD-1 ratones neonatales en el día 2 al día 3 de vida. Se cultivó *N. meningitidis* en una placa de agar sangre durante la noche y se rasparon las células bacterianas en PBS y se ajustó la DO a 600 nm dando diversas dosis de exposición como se indicó. Los ratones se inyectaron una vez 24 horas antes de la infección con o NRS (50 µL de IP (NRS de Accurate)) o suero de conejo producido contra la vacuna conjugada 9GlcNH₂-TT (50 µL IP (conejo 4,2, sangrado 4-3/4-4)). Se expusieron los ratones 24 horas después IP con 50 µL de la cepa B16B6 de *N. meningitidis* del serogrupo B a las siguientes diluciones: 5x10⁵, 5x10⁶ o 5x10⁸. Los ratones se sacrificaron 24 horas después, y se retiraron los cerebros, se homogeneizaron y se sembraron en placas de agar chocolate para enumeración bacteriana. Los resultados se muestran en la FIG. 7.

Ejemplo 12: Eficacia protectora de un MAb IgG1 completamente humano F598 cuando se administra a ratones susceptibles a colitis infecciosa.

Los ratones TRUC carecen de sistemas inmunitarios adquiridos e innatos (Garrett et al. *Cell* 2007 131(1):33-45; Garrett et al. *Cell Host Microbe*, 2010 8(3):292-300). Estos ratones desarrollan espontáneamente colitis infecciosa a las 8 semanas de edad. Se injectaron IP los ratones TRUC recién nacidos, empezando en la primera semana de vida, con 50 µg de o MAb F598 o PBS, o MAb F598, o un MAb IgG1 humano de control, 3 veces a la semana hasta el sacrificio a las 8 semanas. Se extirparon los tubos digestivos de los ratones y se trataron para la evaluación de colitis como se describe (Garrett et al. *Cell* 2007 131(1):33-45; Garrett et al. *Cell Host Microbe*, 2010 8(3):292-300). Se compararon las puntuaciones de patología de colitis general entre los grupos de ratones administrados o con MAb F598 o MAb IgG1 de control. Los resultados se muestran en las FIG. 8 y 9.

En otros experimentos, la administración semanal del MAb F598 empezando en el día 7 de vida redujo significativamente el daño histopatológico total determinado a las 8 semanas (en un modo cegado por un patólogo).

Cuando recién nacidos WT fueron adoptados de forma cruzada por hembras TRUC, desarrollaron colitis espontánea a las 8 semanas, aunque es menos intensa que en la descendencia de TRUC. Para evaluar el potencial terapéutico del MAb F598 contra colitis en un ámbito de función no perturbada del sistema inmunitario, el tratamiento de ratones WT adoptados por hembras TRUC se inició a las 4 semanas con inyecciones cada dos semanas del MAb F598 o MAb IgG1 humano de control F105 y se determinó el nivel de patología colónica a las 8 semanas. MAb F598 redujo significativamente la puntuación de patología total en los ratones receptores en comparación con los controles, con reducciones significativas en la infiltración de monocitos e hiperplasia reactiva, pero no lesión, debido a que la mayoría de los controles tuvieron puntuaciones de lesión de cero (datos no mostrados).

Ejemplo 13: Eficacia protectora de anticuerpo producido en conejos contra la vacuna conjugada de 9GlcNH2-TT contra la cepa 10403S de *L. monocytogenes*.

Se inmunizaron IP ratones CD1 lactantes de dos a tres días 24 horas antes de la exposición a 50 µL de o NRS (n=15) o antisuero de conejo producido contra la vacuna conjugada de 9GlcNH2-TT (n=15). Los ratones se expusieron IP a *L. monocytogenes* (% X 10⁸ UFC en 50 µL). Se monitorizó la supervivencia durante 24 horas. Se analizó la supervivencia global por la χ^2 con corrección de Yates, P,001. Los resultados se muestran en la FIG. 10.

Una vacuna eficaz para la malaria probablemente requerirá múltiples antígenos de parásito, pero como etapa inicial en la determinación de si PNAG podría ser un componente de antígeno de vacuna candidato para una vacuna multivalente, ratones C57BL/6 infectados con ANKA de *P. berghei* PNAG-positivo se trataron con 200 µL de anticuerpo polyclonal contra PNAG o suero normal de control inyectado IP cada 3 días empezando el día antes de la infección y durante 20 días después de la infección. El anticuerpo contra PNAG prolongó significativamente la supervivencia de los ratones tratados y previno el desarrollo de malaria cerebral. Cinco de los ocho ratones tratados con suero normal murieron en el día 9 con bajos niveles de parasitemia, y los tres restantes murieron en el día 30 con altos niveles de parasitemia. Para los ratones tratados con anticuerpo contra PNAG durante 3 semanas, solo uno murió de malaria cerebral en el día 7, cuatro desarrollaron niveles crecientes de parasitemia y murieron en el día 33, que era 13 días después de la última inyección del anticuerpo, uno no tuvo parasitemia detectable hasta el día 22 y murió en el día 40 (20 d después de la última inyección de anticuerpo), y dos ratones tuvieron de poca a ninguna parasitemia detectable y sobrevivieron al periodo experimental de 45 d. El tratamiento con anticuerpos se detuvo en el día 20 según la estipulación inicial del protocolo. Es probable que se pudiera observar la prolongada supervivencia aumentando la duración del tratamiento con anticuerpo.

Ejemplo 14: El anticuerpo contra PNAG media en o la destrucción opsónica o bactericida de diversos patógenos que expresan PNAG.

El protocolo de destrucción opsónica por *S. pneumoniae* y *E. faecalis* es similar al publicado para *S. aureus* por Skurnik et al. (*J Clin Invest.* 2010, 120(9):3220-33), excepto que las células HL60 se usaron como fuente de células fagocíticas en lugar de PMN humanas frescas. Se diferenciaron células HL60 con 0,8 % de DMF durante 6 días y se ajustaron hasta 1,3x10⁶/mL. Las bacterias se cultivaron durante la noche a 37 °C (sin agitación). Se dispuso *S. pneumoniae* en 5 % de CO₂ en THY +1 % de glucosa (THY+G). Se cultivó *E. faecalis* en condiciones atmosféricas. Se sembraron cepas bacterianas en TSB + agar sangre al final del ensayo. Se adsorbió el complemento con bacterias MN8 de *S. aureus* diana cultivadas durante la noche en CSB, agitando. C': Sueros del complemento de Invitrogen Cat N° 31203/S Lote N° 510908698270 absorbidos con células MN8 de *S. aureus*. Se produjo anticuerpo de conejo contra uno de dos antígenos:

- 50 1. PNAG desacetilada (dPNAG) conjugada con toxoide tetánico (dPNAG-TT): Maira-Litran et al. *Infect Immun.* 2005, 73(10):6752-62. Fe de erratas en: *Infect Immun.* 2005, 73(11):7789; y
2. Oligosacárido 9GlcNH2 sintético conjugado con TT: Gening et al. *Infect Immun.* 2010, 78(2):764-72.

También se probó MAb humano contra PNAG, MAb F598, (Kelly-Quintos et al. *Infect Immun.* 2006, 74(5):2742-50).

Los resultados se muestran en las FIG. 11-13.

55 El protocolo de destrucción opsónica de *Streptococcus* del grupo A es del siguiente modo: Se usaron las cepas 771, 188 de *Streptococcus* del grupo A (GAS). Lote de MAb usado: F598 AP1-01 a [19 mg/mL], recién descongelado x1.

Control para MAb F598: MAb F429 contra alginato de *P. aeruginosa* [1,0 mg/mL]. Se cultivó la cepa MN8 de *S. aureus* de disolución madre congelada inoculada en 10 mL de THB+G en cónico de 50 mL a 37 °C con agitación con tapa suelta. Se cultivaron GAS 771 y 188 en THY+G de la placa ON y se inocularon a DO₆₅₀=0,05 a 37 °C de cultivo estático. Se cultivó MN8 Dica de *S. aureus* a partir de disolución madre congelada inoculada en THB+G en 10 mL de

5 CSB en cónico de 50 mL a 37 °C con agitación con la tapa suelta. Se sembraron las cepas de GAS en TSA con sangre al final del ensayo. Se adsorbió el complemento con *MN8Δica* de *S. aureus* diana o bacterias GAS 771 cultivadas durante la noche en THB+G con agitación o THY+G estático, respectivamente. Tampón: HBSS + 0,1 % de gelatina. C': Sueros del complemento de Invitrogen Cat Nº 31203/S Lote Nº 510908698270 absorbidos con células de MN8 Dica de *S. aureus* o GAS 771 o 188.

10 Los resultados se muestran en la FIG. 14.

El protocolo de destrucción opsónica de *C. albicans* es del siguiente modo: Se cultivó *C. albicans* en caldo de YPD (extracto de levadura/peptona/dextrosa) hasta DO 1,0, luego se centrifugó, se resuspendió en MEM+1 % de BSA, se ajustó la DO hasta 0,4 a 650 nm, luego se diluyó la suspensión 1:10. Se purificó MAb F429 de sobrenadante de hibridoma por Proteína A y se dializó a pH 6,5 en PBS, se conservó a -20 °C. Tampón: MEM + 1 % de BSA. C': Sueros del complemento de conejo, Sigma Lote 106K6029, catálogo Nº S7764. El complemento se absorbió con células de *C. albicans*. Se obtuvieron células fagocíticas del donante del collar TRIMA.

15 Los resultados se muestran en la FIG. 15.

El protocolo de destrucción bactericida por *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae* es del siguiente modo: Se usaron suero de conejo normal (NRS de disolución madre a -20 °C, Accurate Chemical, lote 2008) y anticuerpo de conejo producido contra la vacuna conjugada 9GlcNH₂-TT, conservada a -20 °C, sueros de los conejos 4.3 y 4.4. Los sueros se equilibraron a 4 °C y se mantuvieron a 4 °C hasta el ensayo. Se cultivaron las bacterias *N. meningitidis* o *N. gonorrhoeae* durante 24-48 horas en agar chocolate en 5 % de CO₂. Las bacterias se suspendieron en PBS que contenía 0,5 % de glucosa, CaCl₂ 9 mM y MgCl₂·6H₂O 4,9 mM y 1 % (p/vol) de albúmina de suero bovino (Lifeblood Medical, Freehold, NJ) = PBS++, pH 7,4. Se diluyeron suspensiones bacterianas a partir de la suspensión de DO₆₅₀ nm preparada a partir de la suspensión de agar chocolate hasta ~ 1,5-2 X 10⁴ UFC/mL en PBS++. El ensayo implicó mezclar juntos 80 µL de diluciones del suero y 20 µL de células de *Neisseria*, luego incubar las mezclas a 37 °C durante 1 hora. Los tubos se dispusieron a 37 °C con agitación suave (orbital cuando fuera posible). Se prepararon 10 µL de ambas de las diluciones 1:2 y 10⁻¹ en caldo de Muller-Hinton, luego se dispusieron sobre agar chocolate. Los cultivos se incubaron a 37 °C en 5 % de CO₂ durante la noche. Las colonias se contaron al día siguiente. Los resultados se muestran en las FIG. 16 y 17.

30 Se llevó a cabo la destrucción bactericida de cepas de *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae* en presencia de suero de conejo contra 9GlcNH₂-TT con y sin inhibición específica de antígeno del siguiente modo:

Tampón: Tampón-PBS que contienen 0,5 % de glucosa, CaCl₂ 9 mM y MgCl₂·6H₂O 4,9 mM y 1 % (p/vol) de albúmina de suero bovino (Lifeblood Medical, Freehold, NJ) = PBS++, pH 7,4.

35 Cepas bacterianas usadas y preparación: Resuspender las bacterias en PBS que contiene 0,5 % de glucosa, CaCl₂ 9 mM y MgCl₂·6H₂O 4,9 mM y 1 % (p/vol) de albúmina de suero bovino (Lifeblood Medical, Freehold, NJ) = PBS++, pH 7,4. Diluir la suspensión bacteriana a partir de la suspensión a DO₆₅₀nm de suspensión de agar chocolate de DO hasta ~ 1,5-2 X 10⁴ UFC/mL en PBS++.

40 Inhibición de antígenos: Disolver hasta 200 ug/mL de concentración final en el antígeno PNAG PBS++ usado: lote 27. Se usó antígeno de alginato de la cepa 2192, Pk 3 (serie 1)

Antisueros usados: Suero de conejo normal (NRS de disolución madre a -20 °C de, Accurate Chemical). Se produjo anticuerpo de conejo contra la vacuna conjugada de 9GlcNH₂-TT, conservada a -20 °C, se usaron sueros de los conejos 4.3 y 4.4.

45 Ensayo: Mezclar juntos 40 µL de la fuente de suero (dilución basada en la dilución más alta en el ensayo bactericida directo necesario para lograr >80-90 % de destrucción, a menos que la máxima destrucción a 1:2 de la dilución de suero sea más baja, en cuyo caso usar sueros a 1:2 de dilución final), 40 µL de antígeno y 20 µL de células de *Neisseria* (tubos sin antígeno añadir 80 µL de antisuero apropiadamente diluido). Disponer los tubos a 37 °C con agitación suave (orbital si es posible). Placa sobre agar chocolate e incubar a 37 °C en 5 % de CO₂ durante la noche, contar las colonias al día siguiente.

50 Los resultados se muestran en las FIG. 18 y 19.

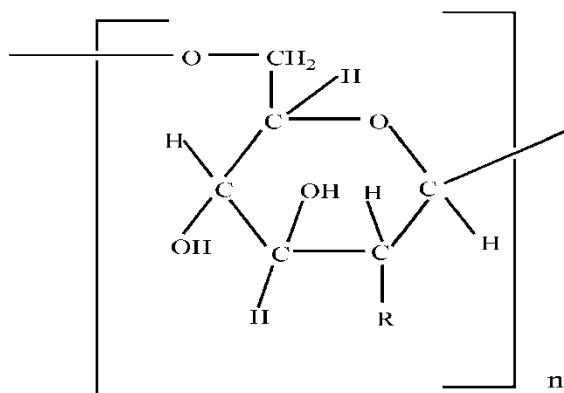
EQUIVALENTES

La anterior memoria descriptiva descrita se considera que es suficiente para permitir que un experto en la técnica practique la invención. La presente invención no se debe limitar en el alcance por los ejemplos proporcionados, puesto que los ejemplos están previstos como una única ilustración de un aspecto de la invención y otras realizaciones funcionalmente equivalentes están dentro del alcance de la invención. Diversas modificaciones de la invención,

además de las mostradas y descritas en el presente documento, serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior y entran dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Las ventajas y los objetos de la invención no están necesariamente englobados por cada realización de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un polisacárido aislado conjugado con un vehículo, teniendo el polisacárido aislado la fórmula



5 en donde n es al menos 5, R se selecciona del grupo que consiste en -NH-CO-CH₃ y -NH₂, a condición de que menos del 50 % de los grupos R sean -NH-CO-CH₃, para su uso en la inducción de una respuesta inmunitaria contra un patógeno en un sujeto que tiene o en riesgo de desarrollar una infección por el patógeno, en donde el patógeno se selecciona de:

- (a) *S. pneumonia*, *Streptococcus* del grupo A, *Streptococcus* del grupo B y *Enterococcus*,
- 10 (b) *Listeria*, *Clostridium difficile*, *B. subtilis*, *M. tuberculosis* o *M. smegmatis*,
- (c) *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *H. influenzae* no tipificable, *Helicobacter* o *Campylobacter*,
- (d) *Bacteroides fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. vulgaris*, *Citrobacter rodentium*, *Vibrio cholera*, *Salmonella enterica* serovariiedad *typhi* o *Salmonella enterica* serovariiedad *typhimurium*,
- (e) *Candida albicans* (levadura), *Candida albicans* (hifas), *Aspergillus*, *Fusarium* o *Cryptococcus*,
- 15 (f) *P. bergei* o *P. falciparum*, y
- (g) *Trichomonas vaginalis*.

2. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en donde el polisacárido aislado se conjuga con el vehículo mediante un conector.

3. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde

- 20 (a) menos del 30 %, menos del 20 %, menos del 10 %, o menos del 5 % de los grupos R son -NH-CO-CH₃, y/o
- (b) ninguno de los grupos R es -NH-CO-CH₃, y/o
- (c) n es al menos 15, al menos 20, al menos 50, al menos 100, al menos 200, al menos 300, al menos 400 o al menos 500, y/o
- (d) el polisacárido aislado tiene un peso molecular de 100-500 kDa.

25 4. La composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el polisacárido aislado conjugado con el vehículo se usa con un adyuvante, y opcionalmente se formula para

- (a) administración sistémica, o
- (b) administración local.

30 5. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo específico de PNAG o fragmento de unión al antígeno del mismo para su uso en inducir una respuesta inmunitaria contra un patógeno en un sujeto que tiene o en riesgo de desarrollar una infección por el patógeno, en donde el patógeno se selecciona de

- (a) *S. pneumonia*, *Streptococcus* del grupo A, *Streptococcus* del grupo B y *Enterococcus*,
- (b) *Listeria*, *Clostridium difficile*, *B. subtilis*, *M. tuberculosis* y *M. smegmatis*,
- (c) *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *H. influenzae* no tipificable, *Helicobacter* y *Campylobacter*,

- (d) *Bacteroides fragilis*, *B. thetaiotamicron*, *B. vulgatis*, *Citrobacter rodentium*, *Vibrio cholera*, *Salmonella enterica* serovariedad *typhi* y *Salmonella enterica* serovariedad *typhimurium*,
- (e) *Candida albicans* (levadura), *Candida albicans* (hifas), *Aspergillus*, *Fusarium* y *Cryptococcus*,
- (f) *P. bergeri* y *P. falciparum*, y
- 5 (g) *Trichomonas vaginalis*.
6. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 5, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se formula para
- (a) administración sistémica, o
- (b) administración local,
- 10 opcionalmente en donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo es
- (a) anticuerpo ATCC PTA-5931 (F598) o fragmento de unión al antígeno del mismo,
- (b) anticuerpo ATCC PTA-5932 (F628) o fragmento de unión al antígeno del mismo, o
- (c) anticuerpo ATCC PTA-5933 (F630) o fragmento de unión al antígeno del mismo,
- más opcional en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se conjuga con un agente, 15 opcionalmente en donde el agente es un agente citotóxico.
7. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 5, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se formula para
- (a) administración sistémica, o
- (b) administración local,
- 20 en donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo es el anticuerpo ATCC PTA-5931 (F598) o un fragmento de unión al antígeno del mismo.
8. La composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el sujeto es
- (a) humano, o
- 25 (b) un primate, caballo, vaca, cerdo, cabra, oveja, perro o gato.
9. La composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el sujeto
- (a) tiene una infección por un patógeno de la reivindicación 1, o
- (b) está en riesgo de desarrollar una infección por un patógeno de la reivindicación 1.
- 30 10. La composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes para su uso en prevenir o tratar infección por un patógeno citado en la reivindicación 1.
11. La composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el patógeno se selecciona de *Listeria*, *Clostridium difficile*, *B. subtilis*, *M. tuberculosis* o *M. smegmatis*.
- 35 12. La composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el patógeno es *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *H. Influenzae* no tipificable, *Helicobacter* o *Campylobacter*.
13. La composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el patógeno es *Bacteroides fragilis*, *B. thetaiotamicron*, *B. vulgatis*, *Citrobacter rodentium*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella enterica* serovariedad *typhi* o *Salmonella enterica* serovariedad *typhimurium*.
- 40 14. La composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el patógeno es *Candida albicans* (levadura), *Candida albicans* (hifas), *Aspergillus*, *Fusarium* o *Cryptococcus*.
15. La composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el patógeno es *S. pneumonia*.

16. La composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el patógeno es *Streptococcus* del grupo A.
17. La composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el patógeno es *Streptococcus* del grupo B.
- 5 18. La composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el patógeno es *M. tuberculosis*.
19. La composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el patógeno es *N. meningitidis*.
- 10 20. La composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el patógeno es *N. gonorrhoeae*.
21. La composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el patógeno es *Salmonella enterica* serovariedad typhi.
22. La composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el patógeno es *Candida albicans* (levadura).
- 15 23. La composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el patógeno es *Candida albicans* (hifas).
24. La composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el patógeno es *Aspergillus*.
- 20 25. La composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el patógeno es *Fusarium*.
26. La composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el patógeno es *Cryptococcus*.
27. La composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el patógeno es *P. falciparum*.
- 25 28. La composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y 8-27, en donde n es 5.
29. La composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y 8-28, en donde el vehículo es un vehículo de péptido.
- 30 30. La composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y 8-29, en donde el vehículo es toxoide tetánico.
31. La composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y 8-30, en donde ninguno de los grupos R es -NH-CO-CH₃.

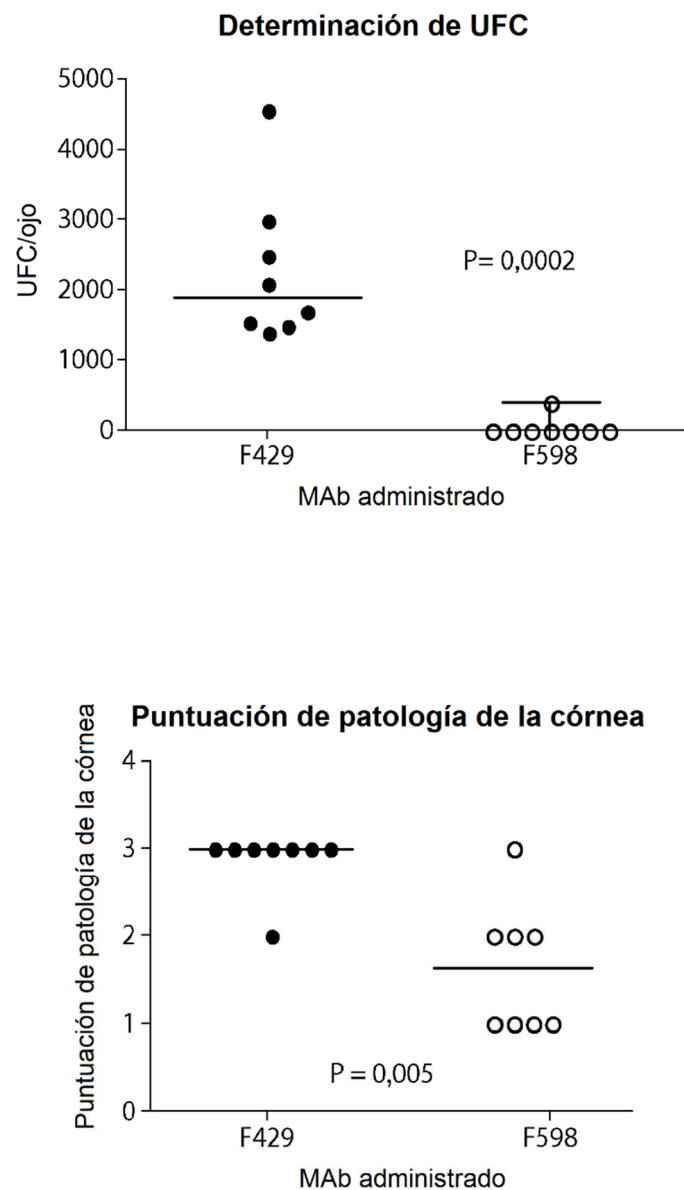


Fig. 1

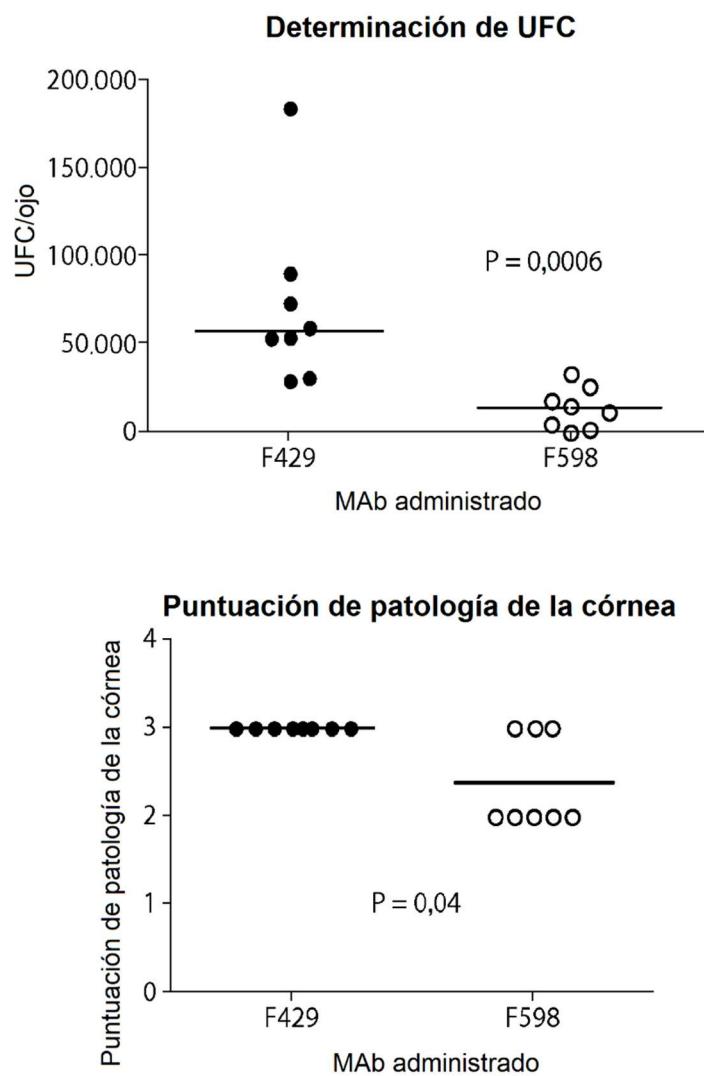


Fig. 2

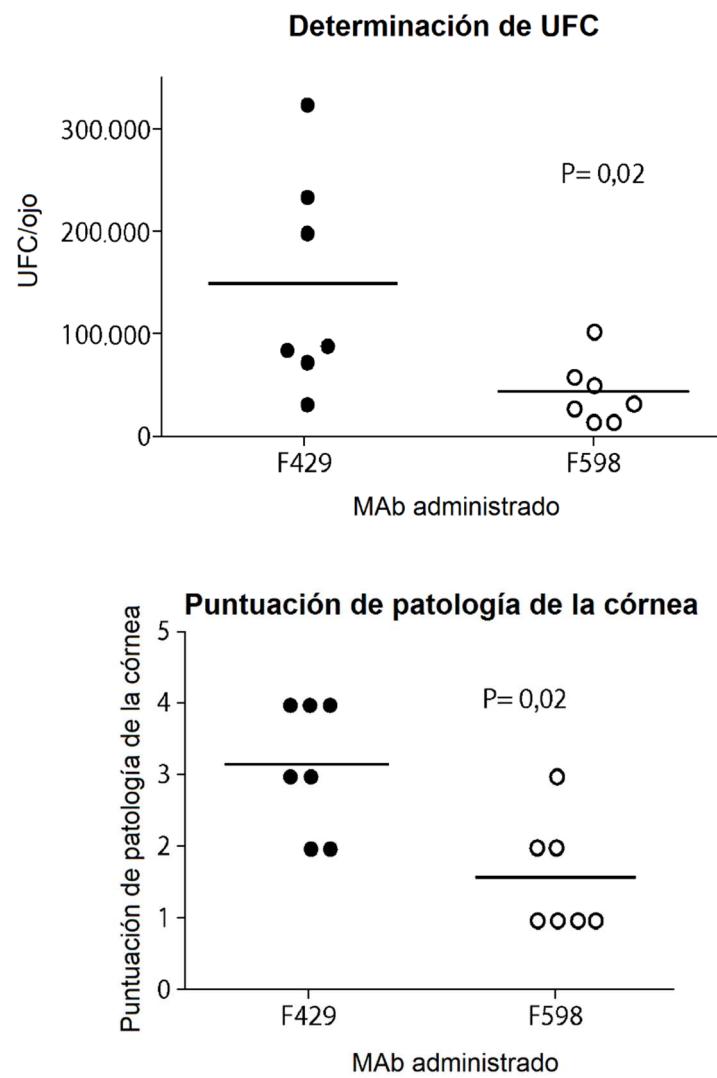


Fig. 3

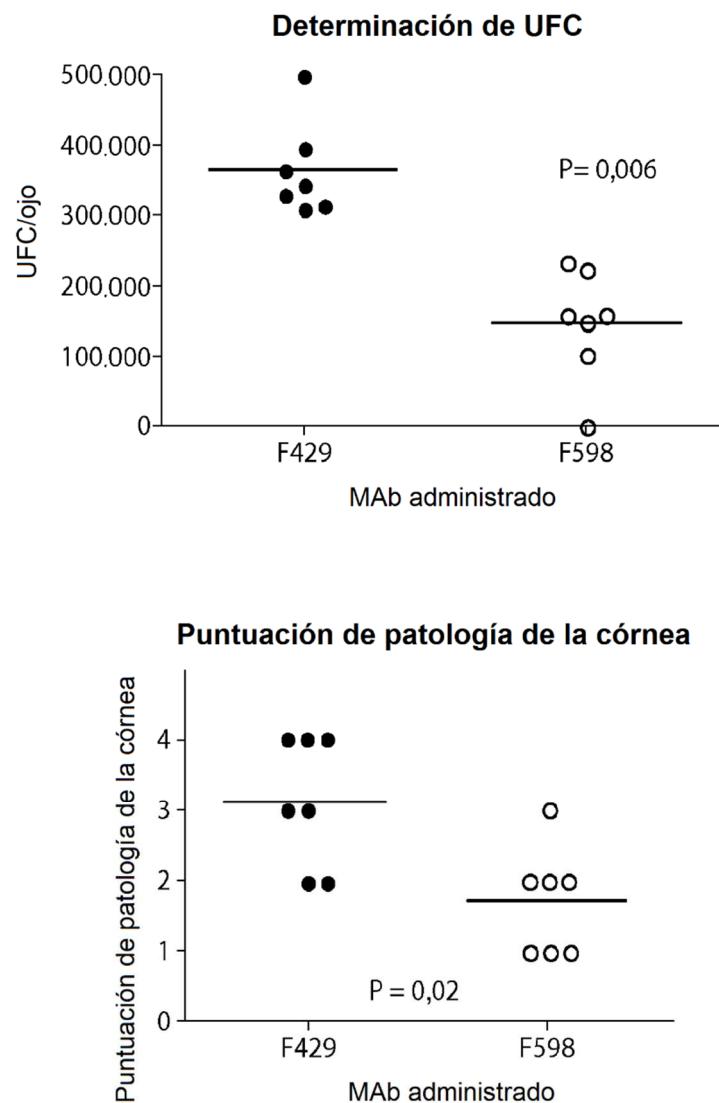


Fig. 4

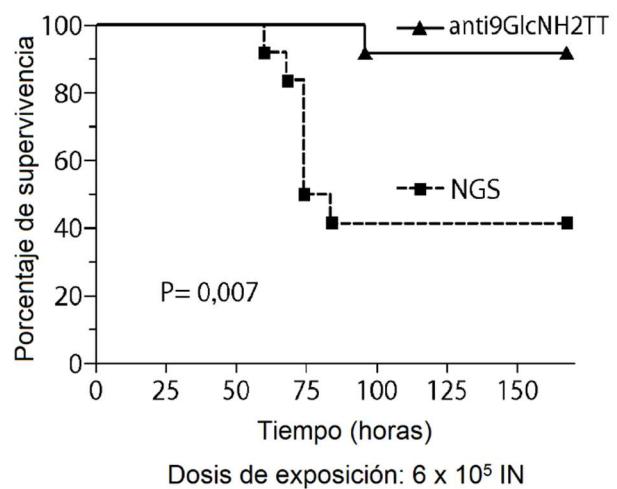


Fig. 5

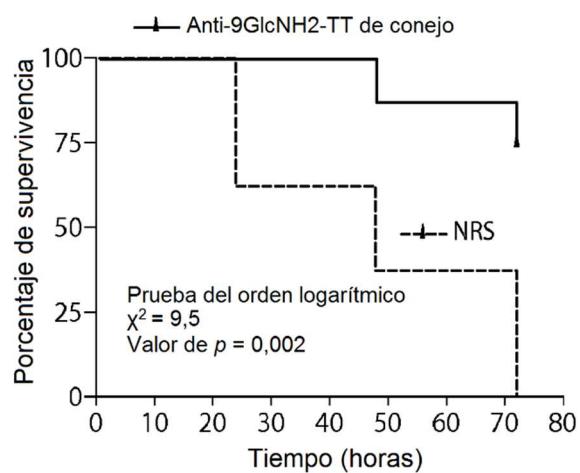


Fig. 6

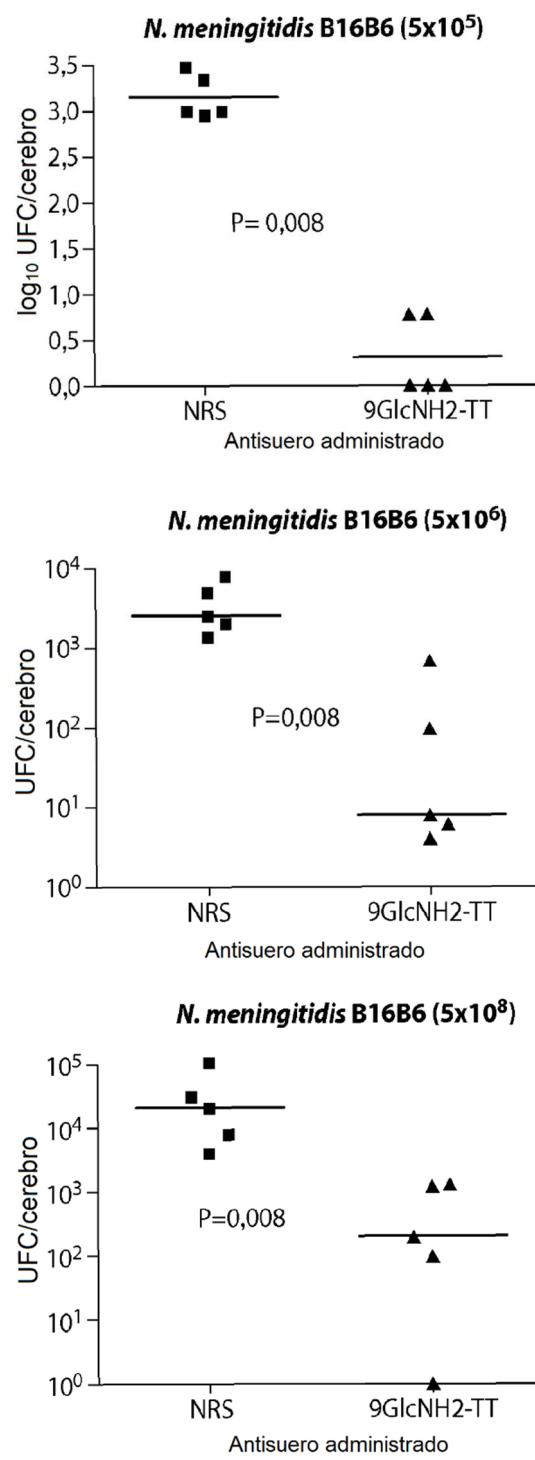


Fig. 7

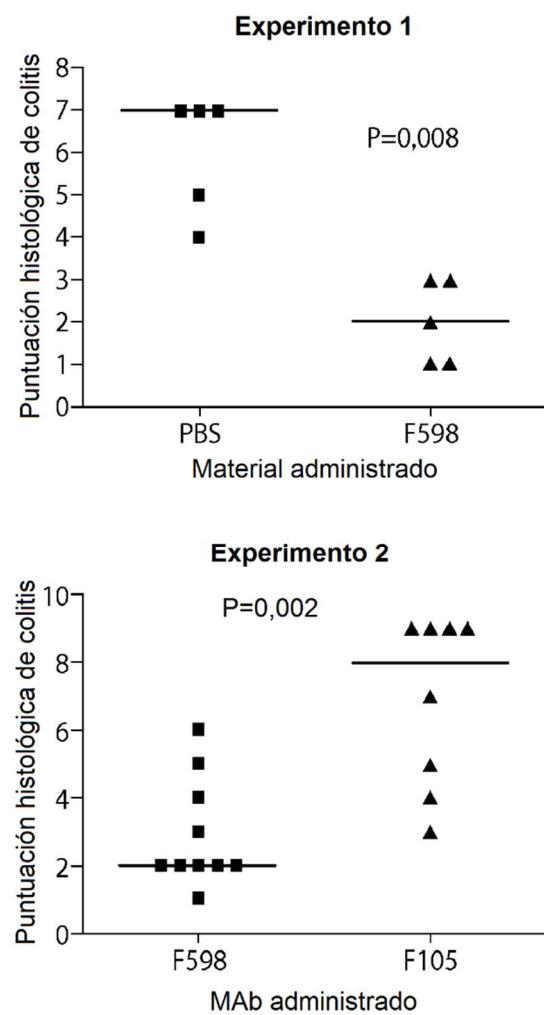


Fig. 8

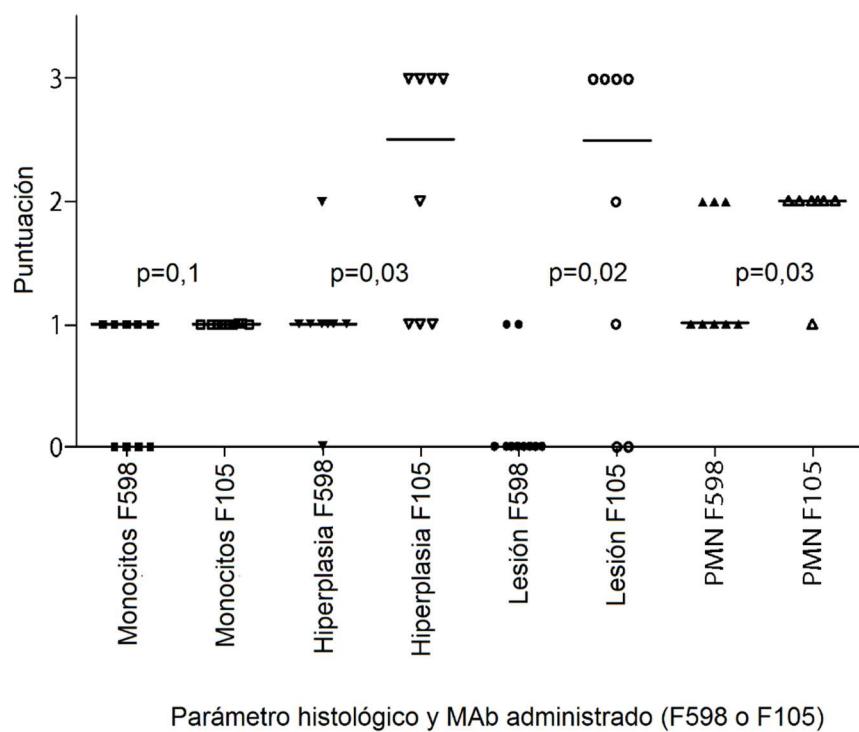


Fig. 9

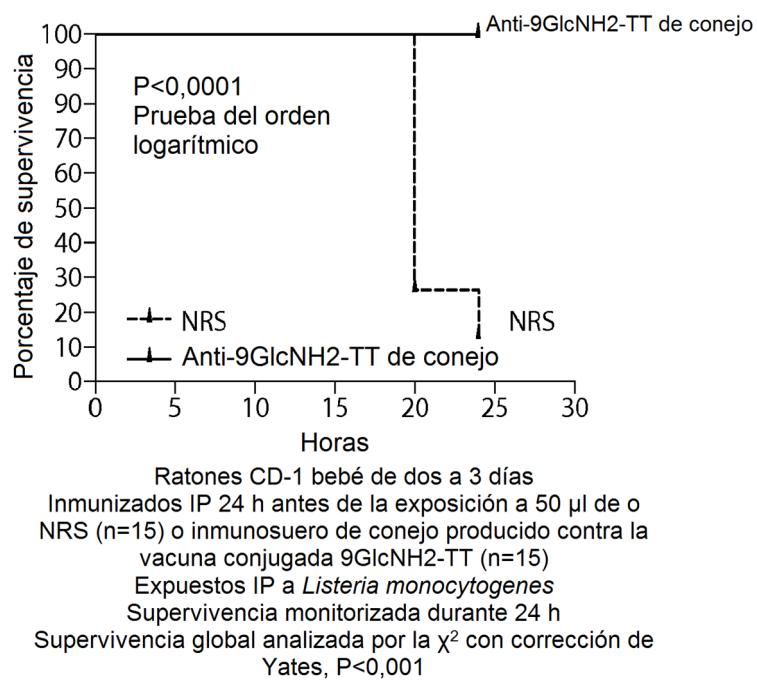


Fig. 10

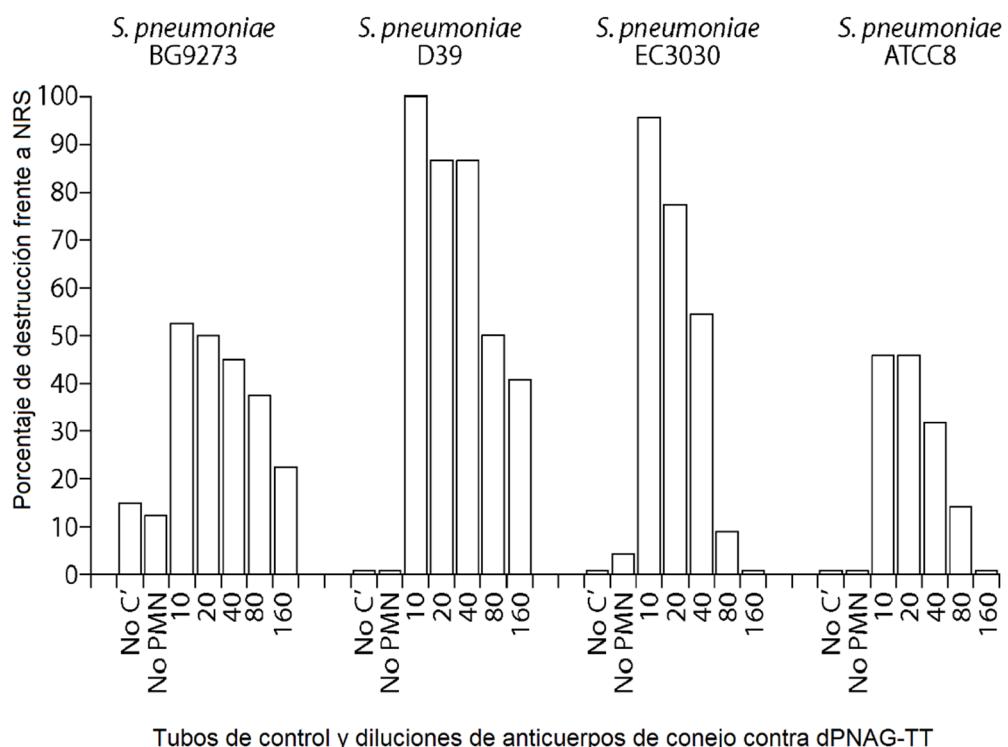


Fig. 11

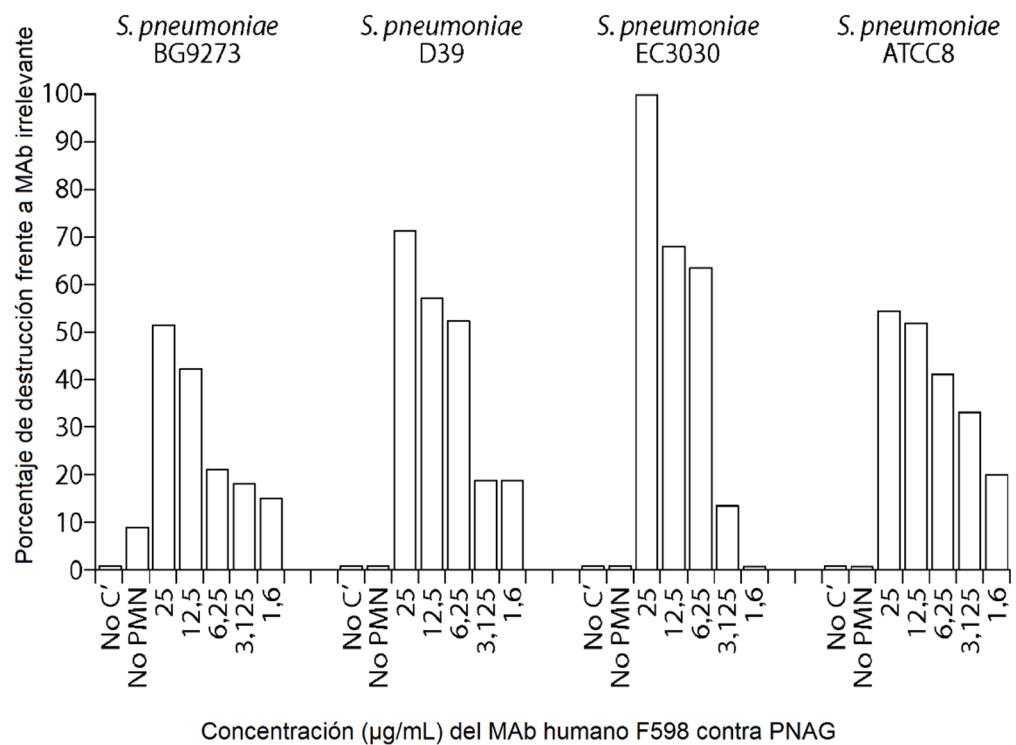


Fig. 12

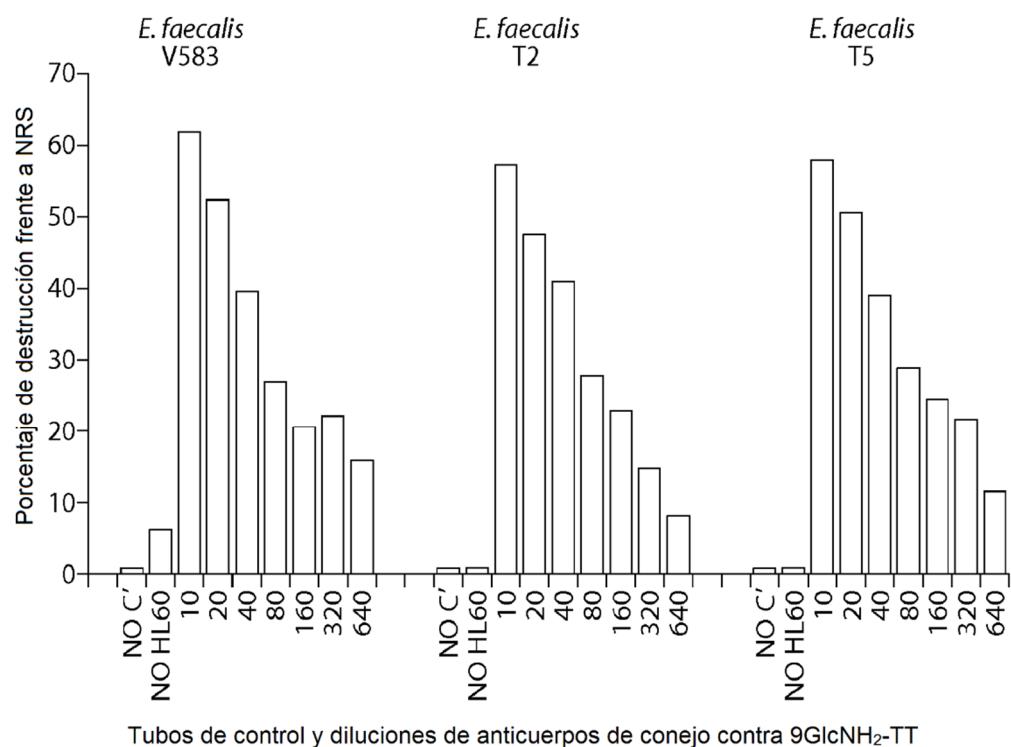


Fig. 13

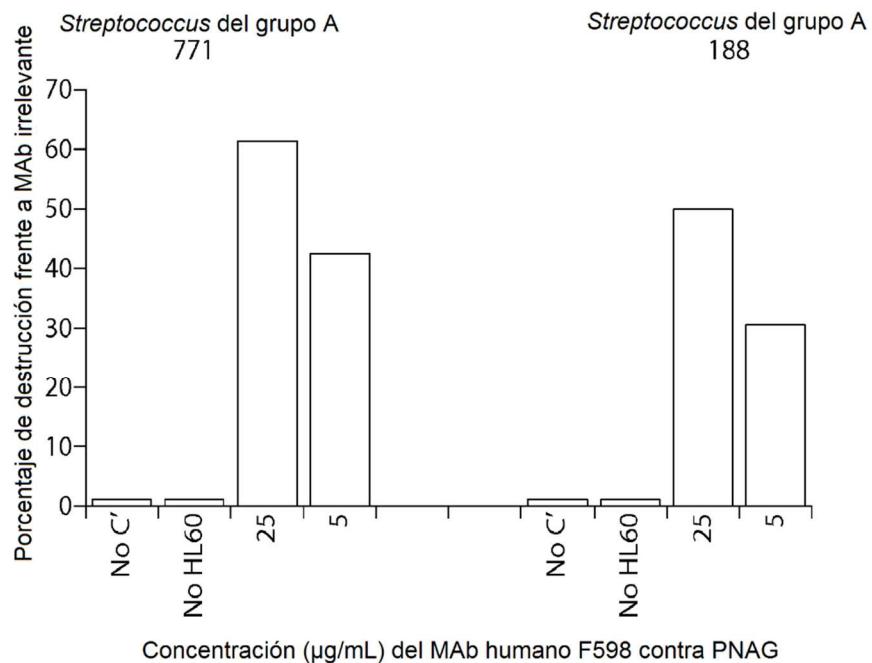


Fig. 14

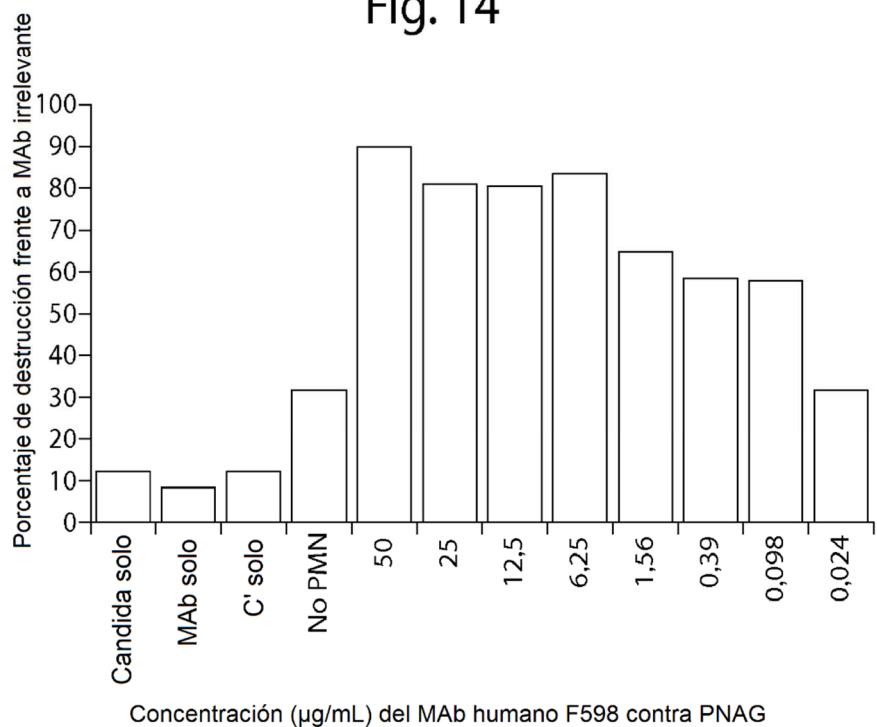


Fig. 15

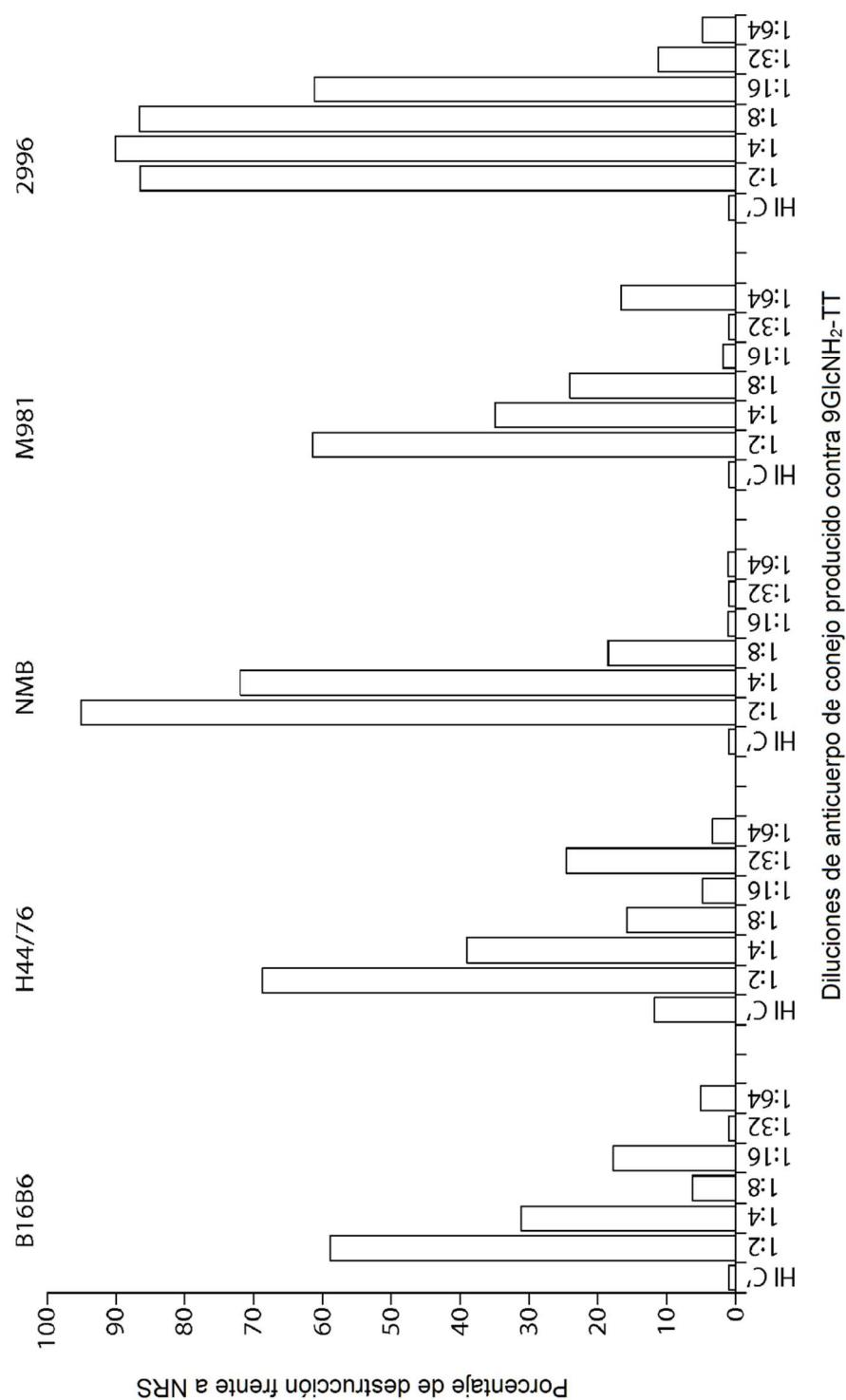


Fig. 16

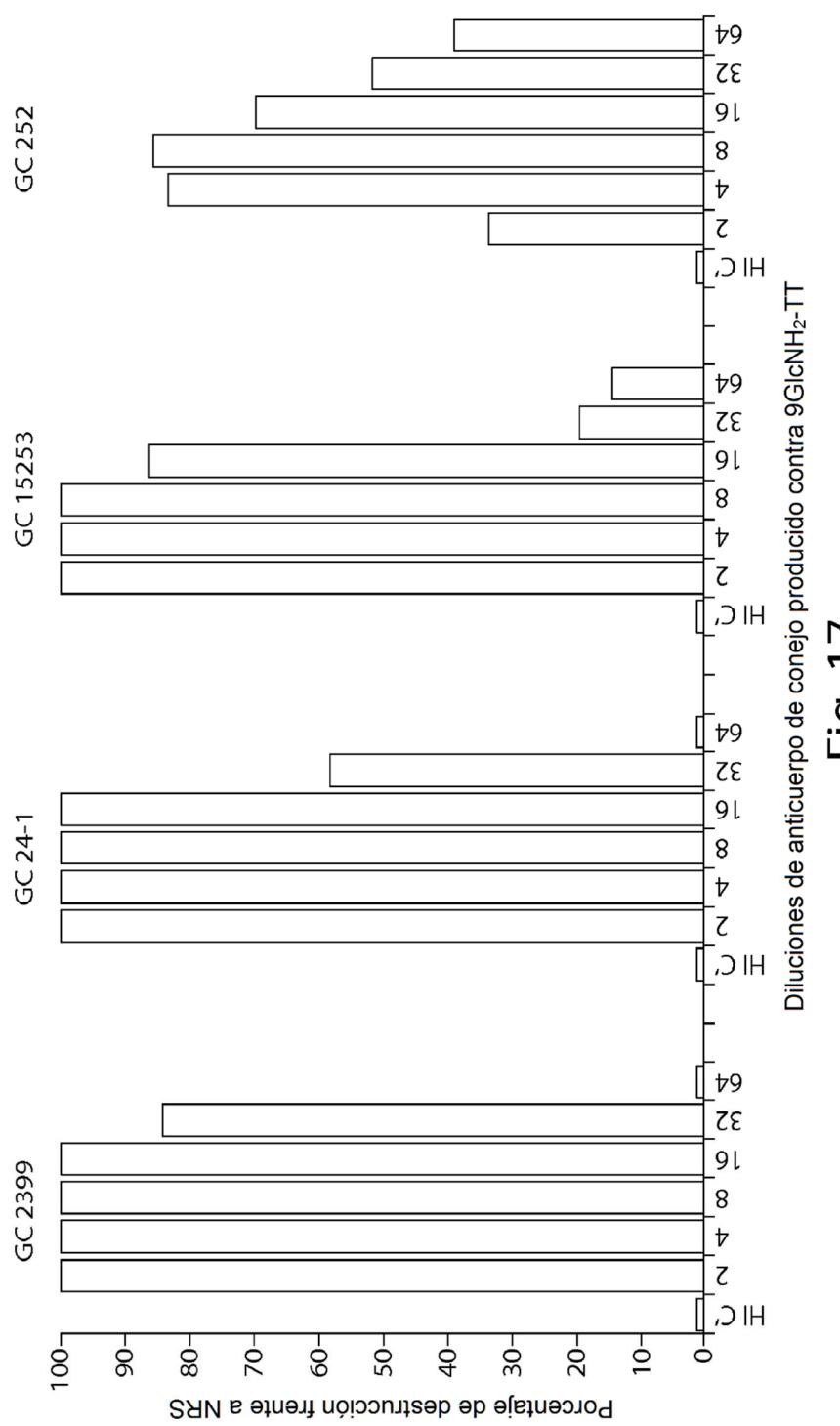


Fig. 17

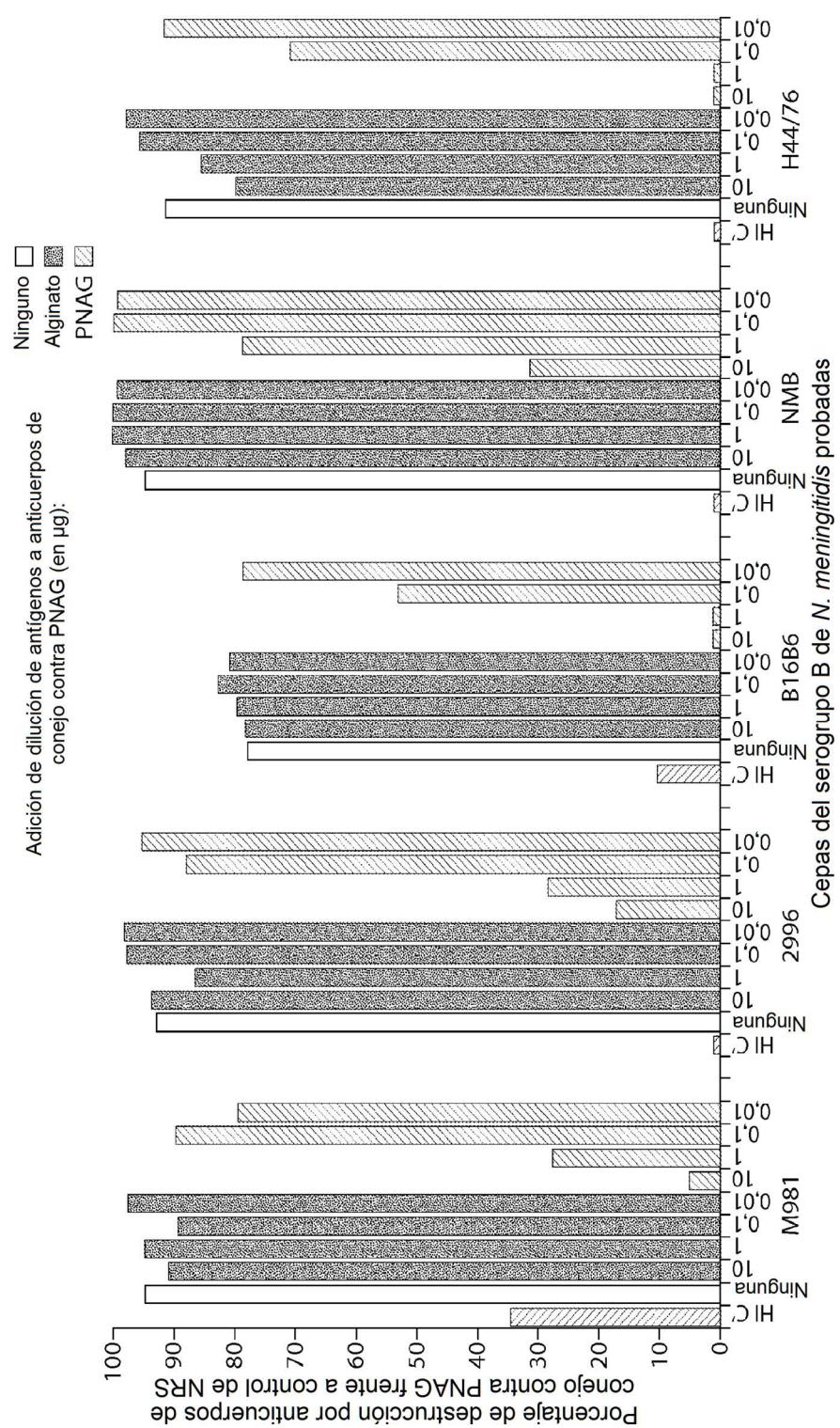


Fig. 18

