



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 327 895**

51 Int. Cl.:
A61K 39/095 (2006.01)
A61K 39/40 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
C07K 16/12 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00968062 .0**
96 Fecha de presentación : **02.10.2000**
97 Número de publicación de la solicitud: **1220686**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.07.2002**

54 Título: **Vacuna contra infección por *Neisseria*.**

30 Prioridad: **30.09.1999 US 156940 P**
12.04.2000 US 196305 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.11.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.11.2009

73 Titular/es: **ISIS INNOVATION LIMITED**
Ewert House, Ewert Place
Summertown, Oxford OX2 7SG, GB

72 Inventor/es: **Plested, Joyce S.;**
Jennings, Michael P.;
Gidney, Margaret Ann J.;
Cox, Andrew D.;
Richards, James C. y
Moxon, E. Richard

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 327 895 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Vacuna contra infección por *Neisseria*.

- 5 La presente invención se refiere a vacunas contra infección por *Neisseria*, especialmente a la infección por *Neisseria meningitidis* y *Neisseria gonorrhoeae* patogénicas.

Antecedentes de la invención

- 10 La septicemia y la meningitis producidas por *Neisseria meningitidis* siguen siendo un problema de salud global, especialmente en niños pequeños. *Neisseria meningitidis* normalmente es una especie comensal de la nasofaringe, el único reservorio principal natural de este microorganismo. Los factores de virulencia que potencian la capacidad de *Neisseria meningitidis* para producir una enfermedad invasiva incluyen los polisacáridos capsulares, las pilosidades (fimbrias) o los lipopolisacáridos y las proteínas de la membrana externa (DeVoe, I. W. 1982. Microbiol Rev 46: 162-190, Jennings, H. J. 1989. Contrib Microbiol Immunol 10: 151-165, Tonjum, T., y M. Koomey. 1997. Gene 192: 155-163, Nassif, X., et al. 1997. Gene 192: 149-153, Poolman, J. T. 1996. Adv Exp Med Biol 397: 73-33, Verheul, A. F., et al. 1993. Microbiol Rev 57: 34-49, Preston, A., et al. 1996. Crit Rev Microbiol 22: 139-180).

- 20 Están disponibles vacunas autorizadas existentes contra los serogrupos capsulares A, C, W y X (Frasch, C. E. 1989. Clin Microbiol Rev 2 Supl: S134-138, Herbert, M. A., et al. 1995. Commun Dis Reg CDR Rev 5: R130-135, Rosenstein, N., et al. 1998. J.A.M.A. 279: 435-439), pero generalmente carecen de inmunogenicidad satisfactoria en niños muy pequeños y no inducen inmunidad protectora de larga duración (Peltola, H., et al. 1977. N Engl J Med 297: 686-691, Peltola, H., et al. 1985. Pediatrics 76: 91-96, Reingold, A. L., C. V. Broome, et al. 1985. Lancet II: 114-118, Lepow, M. L., et al. 1986. J Infect Dis 154: 1033-1036, Cadoz, M. 1998. Vaccine 16: 1391-1395). No obstante, su utilidad ha sido significativa en permitir la protección para poblaciones seleccionadas tales como militares, viajeros y los que están en riesgo excepcional de brotes o epidemias (CDC. 1990. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 39, n.º 42: 763). Muy recientemente, se han introducido vacunas de conjugado meningocócico del grupo C como inmunización de rutina en el Reino Unido.

- 30 La principal prioridad de la salud pública acerca de las infecciones meningocócicas invasivas es identificar vacunas del grupo B que sean altamente eficaces en lactantes y que den protección a largo plazo. Las cepas del grupo B han representado una parte sustancial, a menudo una mayoría de las infecciones invasivas por *Neisseria meningitidis* en muchos países en Europa y Norteamérica (CDR. Abril de 1997. Communicable Disease Weekly Report. 7, n.º 14). La prevención de la enfermedad invasiva de grupo B representa un reto particularmente difícil en el desarrollo de vacunas ya que el polisacárido capsular es muy escasamente inmunogénico e incluso los conjugados han demostrado ser de inmunogenicidad decepcionante (Jennings, H. J. y H. C. Lugowski. 1981. J. Immunology 127: 1011-1018). Además, hay preocupación acerca de la seguridad de las vacunas cuyo fundamento es introducir anticuerpos frente al polisacárido de grupo B, un homopolímero de ácido neuramínico unido mediante enlace α -2-8. El poli(ácido siálico) (PSA) idéntico es una modificación postraduccional de una glicoproteína presente en células humanas, especialmente en las neuronas, denominándose esta última molécula de adhesión de células neuronales (N-CAM) (Finne, J., et al. 1983. Lancet 2: 355-357). Se han usado pruebas tanto teóricas como experimentales para argumentar que la inducción de anticuerpos podría dar como resultado una lesión patológica, autoinmunitaria para los tejidos del huésped.

- 45 Se están explorando activamente enfoques alternativos para desarrollar candidatos de vacuna contra *Neisseria meningitidis* del grupo B. Éstos incluyen: porinas de la membrana externa (Poolman, J. T., et al. 1995. Meningococcal disease, págs. 21-34K. Cartwright (ed.). John Wiley and sons, Wetzler, L. M. 1994. Ann N Y Acad Sci 730: 367-370, Rosenqvist, E., et al. 1995. Infect Immun 63:4642-4652, Zollinger, W. D., et al. 1997. Infect Immun 65: 1053-1060), proteínas de unión a transferrina (Al'Aldeen, A. A. y K. A. Cartwright. 1996. J Infect 33: 153-157) y lipopolisacáridos (Verheul, A. F., et al. 1993. Infect Immun 61: 187-196, Jennings, H. J., et al. 1984. Infect Immun 43: 407-412, Jennings, H. J., et al. 1987. Antonie Van Leeuwenhoek 53: 519-522, Gu, X. X. y C. M. Tsai. 1993. Infect Immun 61: 1873-1880, Moxon, E. R., et al. 1998. Adv Exp Med Biol 435: 237-243).

- 55 La estructura del LPS de *Neisseria meningitidis* se ha estudiado en detalle considerable por Jennings H. y colaboradores con contribuciones adicionales de otros (Griffiss, J. M., et al. 1987. Infect Immun 55: 1792-1800, Stephens, D. S., et al. 1994. Infect Immun 62: 2947-2952, Apicella, M. A., et al. 1994. Methods Enzymol 235: 242-252, Poolman, J. T. 1990. Polysaccharides and membrane vaccines, págs. 57-86. En Bacterial vaccines, A. Mizrahi (ed.), et al. 1997. FEMS Microbiol Lett 146: 247-253). Se han publicado las estructuras de las glicofomas principales para varios inmunotipos (L1-L9) L1, L6 (Di Fabio, J. L., et al. 1990. Can J Chem 68: 1029-1034, Wakarchuk, W. W., et al. 1998. Eur J Biochem 254: 626-633); L3 (Pavliak, V., et al. 1993. J Biol Chem 268: 14146-14152); L5 (Michon, F., et al. 1990. J. Biol Chem 265: 7243-7247); L2 (Gamian, A., et al. 1992. J Biol Chem 267: 922-925); L4, L7 (Kogan, G., et al. 1997. Carbohydr Res 298: 191-199); L8 (Wakarchuk, W. W., et al., 1996, J. Biol. Chem. 271, 19166 - 19173), L9 (Jennings, H. J., et al. 1983. Carbohydr. Res. 121: 233-241). También se hace referencia a la siguiente discusión de la figura 1 adjunta.

- 65 Se sabe que, además de esta variación entre cepas, las cepas individuales de *Neisseria meningitidis* muestran una amplia variación de fase de las estructuras del LPS del núcleo externo (revisado en van Putten, J. P. y B. D. Robertson. 1995. Mol Microbiol 16: 847-853 y Andersen, S. R., et al. 1997. Microb Pathog 23: 139-155). El mecanismo molecular

de esta variación dentro de una cepa implica loci hipermutables dentro de los marcos de lectura que codifican varias glicosil transferasas (Gotschlich, E. C. 1994. J Expt Med 180: 2181-2190, Jennings, M. P., *et al.* 1995. Mol Microbiol 18: 729-740). Se han notificado mecanismos similares de variación fenotípica para otros componentes de superficie de fase variable de *Neisseria* patogénica, incluyendo Opc (Sakari, J., *et al.* 1994. Mol. Microbiol 13: 207-217), Opa (Stem, A., *et al.* 1986. Cell 47: 61-71) y proteínas PilC (Jonsson, A. B., *et al.* 1991. EMBO J 10: 477-488). El cambio molecular reversible de alta frecuencia está mediado por trectos homopoliméricos de citosinas o guaninas a través de mecanismos de tipo deslizamiento que dan como resultado desplazamientos de marco (Gotschlich, E. C. 1994. J Expt Med 180: 2181-2190, Jennings, M. P., *et al.* 1995. Mol Microbiol 18: 729-740, Stem, A., y T. F. Meyer. 1987. Mol. Microbiol 1: 5-12).

Pese a la amplia variación antigénica de LPS, se ha considerado que el núcleo interno de LPS está altamente conservado relativamente y, por tanto, se ha sugerido el uso del núcleo interno de la estructura del LPS para su uso en el diseño de vacunas. Sin embargo, son numerosos los problemas con la generación de vacunas candidatas de esta forma.

En primer lugar, aunque se sabía que ciertos componentes del núcleo interno podían ser inmunogénicos (Jennings, H. J. Lugowski, C. y Ashton, F. E. 1984. Infect. Immun. 43: 407-412 y Verheul, A. F., *et al.*, 1991. Infect. Immun. 59: 3566-3573), se desconocía el grado de conservación de estos epítomos a través de la diversidad de aislados de enfermedad meningocócica y no se han mostrado pruebas de actividad bactericida de anticuerpos frente a estos epítomos. El documento US-A-5.705.161 da a conocer que los oligosacáridos de los inmunitipos meningocócicos difieren, por ejemplo, con respecto a la composición de monosacáridos, a la cantidad y a la ubicación de grupos de fosfoetanolamina y al grado de acetilación de la unidad de GlcNAc del núcleo interno o de otras unidades, lo que indica que pueden encontrarse muchas estructuras posibles en la estructura del núcleo. El documento US-A-5.705.161 también sugiere que una parte del núcleo de un LPS meningocócico puede ser adecuada para su uso en una vacuna, aunque no se dan a conocer epítomos inmunogénicos específicos ni datos de apoyo.

En segundo lugar, dada la presencia de la estructura del LPS del núcleo externo y de otras estructuras distintas al LPS expuestas en la superficie, incluyendo la cápsula, no se sabe si la estructura del núcleo interno es accesible al sistema inmunitario para permitir que se genere una respuesta inmunitaria bactericida. Además, sería necesario que cualquier vacuna contuviera estructuras inmunogénicas que provocaran una respuesta inmunitaria frente a la variedad completa de cepas patogénicas de *Neisseria meningitidis*. Sin embargo, no se conoce el grado de variación mostrado por la estructura del núcleo interno de las cepas virulentas y no se ha emprendido una investigación rigurosa del problema.

Además, en la publicación New Generation Vaccines [1997, Ed. M. M. Levine, publ. Marcel Dekker Inc, Nueva York, Capítulo 34, página 481], se establece que, con respecto al desarrollo de vacunas, "incluir LPS que está constituido sólo por la región del núcleo interno común del oligosacárido puede no dar como resultado la inducción de anticuerpos bactericidas...".

Además, otras especies del género *Neisseria* plantean problemas de salud globales. Por ejemplo, *Neisseria gonorrhoeae* está implicada en enfermedades transmitidas sexualmente tales como uretritis, salpingitis, cervicitis, proctitis y faringitis, y es una causa principal de la enfermedad inflamatoria pélvica en mujeres.

En consecuencia, todavía existe una necesidad en la técnica de una vacuna eficaz contra la infección por *Neisseria*, tal como la infección por *Neisseria meningitidis* y *Neisseria gonorrhoeae*.

La presente invención se ha propuesto tratar esta necesidad.

Exposición de la invención

La invención se refiere a una vacuna para el tratamiento de una enfermedad producida por infección por *Neisseria* comprendiendo la vacuna un componente inmunogénico de cepas de *Neisseria*. La vacuna presenta un epítomo conservado y accesible que a su vez potencia una respuesta funcional y protectora. Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona una vacuna para el tratamiento de una enfermedad producida por *Neisseria* patogénica, comprendiendo la vacuna un componente inmunogénico basado en el núcleo interno de un lipopolisacárido, LPS, de *Neisseria* y que puede provocar anticuerpos funcionales contra al menos el 50% de las cepas dentro de las especies de la *Neisseria* patogénica, en la que el componente inmunogénico es un epítomo en el núcleo interno de LPS caracterizado por la presencia de un resto de fosfoetanolamina unido a la posición 3 en HepII del núcleo interno.

Ahora se ha descubierto que el núcleo interno de LPS de *Neisseria* puede usarse para generar una respuesta inmunitaria protectora frente a infecciones por *Neisseria*, por ejemplo, frente a las infecciones por *Neisseria meningitidis*. Por simplicidad, la presente invención se ejemplifica en el presente documento principalmente mediante la discusión de vacunas y tratamientos contra infecciones por *Neisseria meningitidis*, pero la invención se extiende a enfermedades producidas por otras especies patogénicas de *Neisseria*.

Usando una variedad de anticuerpos monoclonales novedosos, se han identificado epítomos que pertenecen al núcleo interno de *Neisseria meningitidis* que se ha encontrado que son accesibles al sistema inmunitario, y que pueden estimular la producción de anticuerpos funcionales, protectores. Además, el análisis de las cepas de *Neisseria me-*

ningitidis usando las nuevas herramientas de anticuerpos indica que ciertos epítomos son comunes a una variedad de aislados de enfermedad por *Neisseria meningitidis*, y en ocasiones se producen en una mayoría de tales cepas. En consecuencia, una vacuna que comprende sólo una variedad limitada de epítomos del núcleo interno de *Neisseria meningitidis* puede proporcionar inmunoprolaxis eficaz contra la variedad completa de cepas que producen la infección por *Neisseria meningitidis*. Consideraciones similares se aplican a otras especies patogénicas.

En un aspecto relacionado, la invención proporciona una vacuna eficaz contra cepas de las bacterias del género *Neisseria*, especialmente cepas de la especie *Neisseria meningitidis*. Particularmente en este último caso, la vacuna comprende uno o más inmunógenos que pueden generar anticuerpos que reconocen epítomos en cepas encapsuladas. El uno o más inmunógenos representan uno o más epítomos del núcleo interno accesibles. Por tanto, los inmunógenos pueden dar lugar a anticuerpos que reconocen una mayoría de cepas.

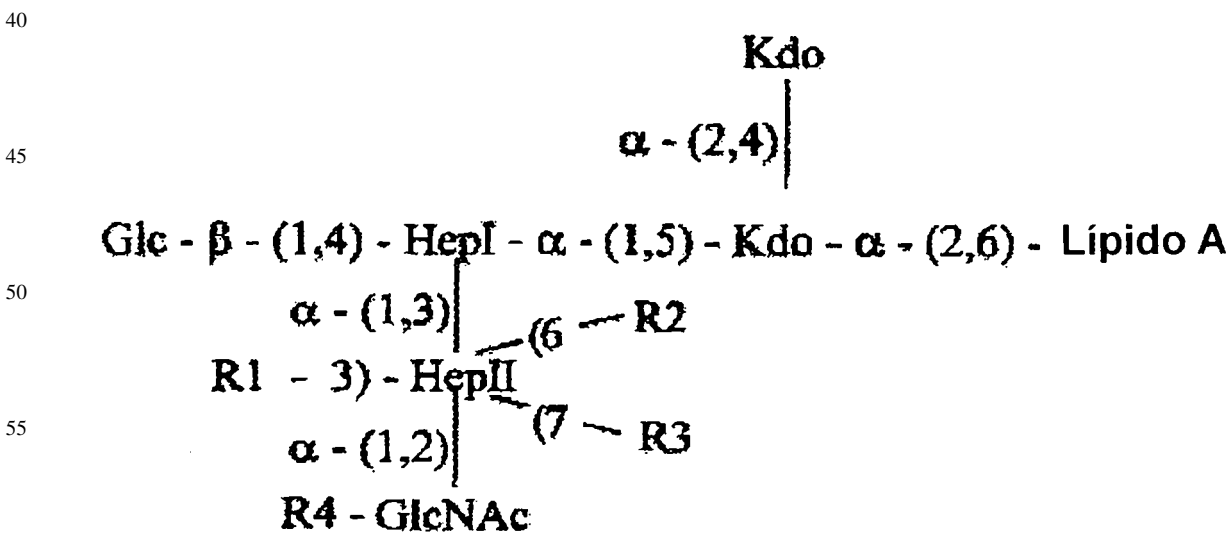
Se usa la palabra "principal" para referirse a una mayoría. Por tanto, un componente inmunogénico principal provoca anticuerpos frente a una mayoría de cepas.

Arumugham *et al* (documento EP 0941 738 A1) da a conocer el uso de proteínas portadoras conjugadas con lipopolisacáridos (LPS) conservados de bacterias Gram negativas, tales como *Haemophilus* y *Neisseria*, en provocar una respuesta de anticuerpo. Se da a conocer el uso de la parte conservada del núcleo interno, pero no se usa el resto de PEtn unido en la posición 3 de HepII del núcleo interno.

En este enfoque, se generaron anticuerpos mediante la inmunización de ratones usando mutantes galE de *Neisseria meningitidis*. Los anticuerpos producidos eran específicos para el núcleo interno de LPS porque los mutantes galE carecen de estructuras del núcleo externo. Se investigó la reactividad de estos anticuerpos contra un panel de cepas de *Neisseria meningitidis* representativas de la diversidad encontrada en las poblaciones naturales de aislados de enfermedad. Un anticuerpo monoclonal reaccionó con el 70% de todas las cepas de *Neisseria meningitidis* sometidas a prueba, lo que sugiere una fuerte conservación del epítomo del núcleo interno reconocido por este anticuerpo, denominado anticuerpo B5. Se ha caracterizado el epítomo contra el que reacciona B5 y puede usarse para constituir la base de una vacuna para evitar infecciones por *Neisseria*.

Se ha depositado un hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal B5, denominado hibridoma NmL3B5, según el Tratado de Budapest el 26 de septiembre de 2000 con la Autoridad Depositaria Internacional de Canadá en Winnipeg, Canadá, y se le ha dado el número de acceso IDAC 260900-1.

De esta forma, se ha obtenido una prueba en principio de que uno o más de los epítomos del núcleo interno de LPS están conservados y son accesibles a los anticuerpos, que una respuesta inmunitaria específica a estos epítomos puede proporcionar protección y que los oligosacáridos del núcleo interno de LPS pueden ser vacunas candidatas. El LPS del núcleo interno está constituido normalmente por un oligosacárido del núcleo interno unido al lípido A, con la fórmula general tal como se muestra:



en la que R1 es un sustituyente en la posición 3 de HepII y es hidrógeno o Glc- α -(1, o fosfoetanolamina; R2 es un sustituyente en la posición 6 de HepII y es hidrógeno o fosfoetanolamina; R3 es un sustituyente en la posición 7 de HepII y es hidrógeno o fosfoetanolamina, y R4 es acetilo o hidrógeno en la posición 3, la posición 4 o la posición 6 del residuo de GlcNAc, o cualquier combinación de los mismos; y en la que Glc es D-glucopiranososa; Kdo es ácido 3-desoxi-D-mano-2-otulosónico; Hep es L-glicero-D-mano-heptosa y GlcNAc es 2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiranososa.

Descripción general de la invención

El principal componente inmunogénico para las cepas de *Neisseria meningitidis* es preferiblemente un único componente inmunogénico encontrado en al menos el 50% de las cepas de *Neisseria meningitidis*, es decir, en la mayoría de las cepas de *Neisseria meningitidis* que se producen de manera natural. El principal componente inmunogénico constituye un inmunógeno de vacuna candidata. El componente inmunogénico de la vacuna de la presente invención es de *Neisseria meningitidis* o de otras especies de *Neisseria* y puede provocar una respuesta inmunitaria, o bien solo o bien en combinación con otro agente tal como un vehículo. La estructura del LPS del núcleo interno de *Neisseria meningitidis* se define generalmente como la mostrada en la figura 1 y tal como se explica en la leyenda de la figura. El componente inmunogénico es adecuadamente uno que provoca una respuesta inmunitaria en presencia y en ausencia de LPS del núcleo externo.

El principal componente inmunogénico está conservado en al menos el 50% de las cepas de *Neisseria* dentro de las especies, preferiblemente al menos en el 60%, y más preferiblemente al menos en el 70%. La reactividad con el 100% de las cepas es un objetivo idealizado, y por tanto el componente inmunogénico normalmente reconoce como máximo el 95% o el 85% de las cepas. La conservación se evalúa adecuadamente de manera funcional, en lo que se refiere a la reactividad cruzada del anticuerpo. Se prefiere que el componente inmunogénico esté presente en al menos el 5% de las cepas del serogrupo B, preferiblemente en al menos el 60%, más preferiblemente en al menos el 70%, incluso más preferiblemente en al menos el 76%. Adecuadamente, la evaluación de la reactividad cruzada del componente inmunogénico se realiza usando una colección representativa de cepas, tales como las explicadas en Maiden [Maiden M-C. J., *et al.* 1998, P.N.A.S. 95, 3140-3415].

El principal componente inmunogénico se encuentra en el inmunotipo L3 de *Neisseria meningitidis*, y preferiblemente no está en L2. Más específicamente, se prefiere que el inmunógeno se encuentre en los inmunotipos L1, L3, L7, L8 y L9, pero no en L2, L4, L5, L6. En otras palabras, se prefiere que el inmunógeno, particularmente el principal componente inmunogénico, genere anticuerpos que sean reactivos con al menos el inmunotipo L3 inmunogénico y habitualmente los inmunotipos L1, L3, L7, L8 y L9, pero no con L2, y habitualmente no con los inmunotipos L2, L4, L5 y L6. Hay diferencias conformacionales forzadas en el núcleo interno de los inmunotipos L2 y L3 por diferentes disposiciones en HepII, concretamente el resto de PEtn en la posición 6 en L2 o en la posición 3 en L3, y el residuo de Glc en la posición 3 en L2. Actualmente, no se concibe la posibilidad de un único epítipo para ambos inmunotipos L2 y L3. En otras palabras, sin descartar la posibilidad de un único epítipo, se espera que se requieran diferentes inmunógenos para provocar anticuerpos para L2 y L3.

Preferiblemente, el principal componente inmunogénico es un epítipo conservado en el núcleo interno de LPS reconocido por un anticuerpo denominado B5 en el presente documento. Por tanto, el epítipo preferido de la invención es cualquier epítipo reconocido por el anticuerpo B5.

El componente inmunogénico es un epítipo conservado en el núcleo interno de LPS definido por la presencia de un resto de fosfoetanolamina (PEtn) unido a la posición 3 de HepII, la heptosa de cadena β , del núcleo interno, o es un equivalente funcional del mismo. A este respecto, cuando el contexto lo permita, HepI y HepII se refieren a los residuos de heptosa del oligosacárido del núcleo interno que respectivamente son proximales y distales al resto de lípido A del LPS de *Neisseria*, sin estar relacionado necesariamente con la fórmula general facilitada anteriormente.

Preferiblemente, este epítipo comprende un residuo de glucosa en HepI, el residuo de heptosa de cadena α . Aunque esta glucosa no es necesaria para la unión a B5, se requiere para el reconocimiento óptimo.

El principal componente inmunogénico preferiblemente también comprende un epítipo en el núcleo interno de LPS que comprende una N-acetilglucosamina en HepII. Se requiere la presencia de N-acetilglucosamina para el reconocimiento óptimo por B5.

Preferiblemente, el principal componente inmunogénico comprende tanto la N-acetilglucosamina en HepII como un residuo de glucosa en HepI.

El componente inmunogénico de la presente invención sólo está limitado por el requisito de un resto de fosfoetanolamina (PEtn) unido a la posición 3 de HepII del núcleo interno, lo que se requiere para la reactividad con B5. La estructura del núcleo interno puede modificarse, reemplazarse o eliminarse según sea necesario, hasta el grado en que no se necesitan. De manera similar, cualquier estructura del núcleo externo puede modificarse o deleccionarse, hasta el grado en que no se necesitan elementos estructurales. No se requiere que el componente inmunogénico carezca de la parte del núcleo externo, o equivalente, del LPS. El componente inmunogénico puede comprender elementos del núcleo externo que tienen un componente de galactosa, por ejemplo el residuo de galactosa terminal de la lacto-N-netoetraosa. En una realización adecuada, el componente inmunogénico se deriva de LPS y está libre de otro material celular. Alternativamente, puede estar presente material celular y puede adoptar la forma de bacterias vivas o inactivadas.

En un aspecto relacionado, la vacuna de esta invención tiene un epítipo inmunogénico reconocido por un anticuerpo frente a un mutante galE de *Neisseria meningitidis*.

En una realización adicional, la vacuna adecuadamente comprende elementos inmunogénicos adicionales del núcleo interno con un objetivo de lograr hasta el 100% de cobertura. Preferiblemente, la vacuna comprende sólo un

número limitado (4-6, o menos) de elementos inmunogénicos, más preferiblemente sólo aquellas glicofomas que son representativas de todas las posibles posiciones de la PEtn en HepII, la heptosa de cadena β , del núcleo interno, es decir, en las que la PEtn está en la posición 3 y preferiblemente es exocíclica (posición 6 o posición 7) también, con o sin una glucosa con enlace α -1-3 en HepII, o una combinación de los mismos. No se requiere la presencia de sustituyentes de PEtn para la generación de anticuerpos por un componente inmunogénico de esta invención.

Además, tal como se detalla en el presente documento, los epítomos de esta invención son inmunogénicos y accesibles, y por tanto pueden usarse para desarrollar una vacuna eficaz. Además, tal como se detalla en el presente documento, una vacuna que contiene sólo un número limitado de glicofomas (representando todas las posibles posiciones de PEtn en HepII, concretamente la posición 3, y preferiblemente las posiciones 6 ó 7, y combinaciones de las mismas) puede proporcionar protección eficazmente contra la diversa variedad de aislados meningocócicos que producen la enfermedad invasiva.

En consecuencia, la vacuna de la presente invención comprende un epítomo que está definido por la presencia de un resto de fosfoetanolamina (PEtn) unido a la posición 3 de HepII del núcleo interno, y preferiblemente comprende adicionalmente un epítomo definido por la presencia de PEtn en la posición 6 de HepII del núcleo interno, y/o un epítomo definido por PEtn en la posición 7 de HepII del núcleo interno, o en la que no hay adición de PEtn adicional. Preferiblemente, la vacuna contiene sólo componentes inmunogénicos que son estas variantes de glicofoma del núcleo interno.

El anticuerpo B5 de la presente invención también reconoce las estructuras del núcleo interno de *Neisseria gonorrhoeae* y *Neisseria lactamica*. Como tal, la invención se extiende a cualquier especie de *Neisseria*, y cualquier referencia a *Neisseria meningitidis* puede extenderse según sea apropiado a otras especies de *Neisseria*, preferiblemente a *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Neisseria lactamica*, más preferiblemente a *Neisseria meningitidis*. La invención también se extiende a componentes inmunogénicos en otras especies de *Neisseria* que están relacionadas con las identificadas en *Neisseria meningitidis*, o bien por la función, la reactividad con el anticuerpo o la estructura. La invención no se limita a las cepas patogénicas de *Neisseria*. La vacuna de esta invención puede derivarse de una cepa comensal de *Neisseria*, especialmente una cepa de *Neisseria lactamica*. La especie *Neisseria lactamica* normalmente es fuertemente inmunogénica y, por tanto, se prefiere que el componente inmunogénico del núcleo interno de LPS se derive de esta especie.

Por tanto, la vacuna puede ser homóloga o heteróloga y estar basada por tanto en un componente inmunogénico del microorganismo objetivo, homólogo, o de un microorganismo diferente, heteróloga. El microorganismo puede producirse de manera natural o no, tal como puede producirse por técnicas recombinantes. En particular, el microorganismo puede modificarse por ingeniería genética para modificar el epítomo o para modificar otros componentes.

También se ha determinado que un segundo anticuerpo monoclonal, denominado en el presente documento A4, puede reaccionar con epítomos del núcleo interno de casi todas las cepas de *Neisseria meningitidis* que no reaccionan con el anticuerpo B5. Por tanto, de las 100 cepas de *Neisseria meningitidis* sometidas a prueba, el 30% no fueron reactivas con B5 y se encontró que carecían de un resto de PEtn en la posición 3 de HepII. De estas 30 cepas, 27 fueron reactivas con A4. En consecuencia, una vacuna que comprende sólo 2 epítomos del núcleo interno, correspondientes a los epítomos definidos por la reactividad cruzada con A4 y B5, proporciona un 97% de cobertura de una colección representativa de cepas de *Neisseria meningitidis*, preferiblemente tal como se evalúa mediante el uso de la colección de cepas explicadas en Maiden *et al.* [citado anteriormente].

Se ha depositado un hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal A4, denominado hibridoma NmL4galEA4, según el Tratado de Budapest el 26 de septiembre de 2000 con la Autoridad Depositaria Internacional de Canadá en Winnipeg, Canadá, y se le ha dado el número de acceso IDAC 260900-2.

Por tanto, la presente invención también se refiere a una vacuna que comprende algunos componentes inmunogénicos, en la que al menos el 70% de las cepas de *Neisseria meningitidis* de la especie presentan al menos uno de los componentes inmunogénicos, preferiblemente el 80%, preferiblemente el 90% y lo más preferiblemente el 97%. De esta forma, la vacuna puede dar cobertura de protección contra la infección por *Neisseria* en el 70%, preferiblemente en el 80%, el 90% o incluso en el 97% o más de los casos.

Algunos componentes inmunogénicos significa adecuadamente al menos dos componentes inmunogénicos, preferiblemente sólo 2. Más generalmente, los pocos componentes comprenden de 2 a 6 componentes, tal como 2, 3, 4, 5 ó 6 componentes, más adecuadamente 2, 3 ó 4 componentes. Preferiblemente, los componentes inmunogénicos son algunas glicofomas del núcleo interno, representativas de todas las cepas naturales de *Neisseria meningitidis*. De esta forma, una vacuna que contiene un número limitado de glicofomas puede dar una cobertura que se aproxima al 100% de las cepas de *Neisseria meningitidis*.

En la figura 3 se muestra una representación de las estructuras 3D del núcleo interno de LPS que tiene un resto de PEtn en la posición 3, la posición 6 o está ausente en HepII. En consecuencia, la presente invención también se extiende a elementos inmunogénicos que tienen estructuras iguales o similares a las estructuras del núcleo interno de la posición 3, y preferiblemente de la posición 6, tal como se define por su geometría 3D y a anticuerpos que pueden interactuar con tales estructuras, tal como se evalúa *in vitro*, *in vivo* o *in silico*.

ES 2 327 895 T3

Los elementos inmunogénicos de la invención son preferiblemente los que se muestra que provocan anticuerpos que tienen actividad opsonica y bactericida y que se muestra que generan anticuerpos que confieren protección pasiva en modos *in vivo*.

5 La invención también se extiende al uso de cualquier elemento inmunogénico tal como se definió anteriormente en la preparación de un medicamento para la prevención, el tratamiento del diagnóstico de infección por *Neisseria*.

Los inmunógenos de la vacuna candidata de la presente invención pueden ser adecuados para la prevención de infecciones por *Neisseria*. Sin embargo, se prefiere una vacuna para el tratamiento de *Neisseria meningitidis*, siendo especialmente preferida una vacuna para las cepas del grupo B.

Preferiblemente, el elemento inmunogénico de la vacuna es accesible en presencia de cápsula bacteriana. En consecuencia, los anticuerpos generados por un individuo que se vacuna podrán acceder al mismo epítipo en las cepas invasoras de *Neisseria* y, por tanto, proteger al individuo de la infección. Los anticuerpos administrados directamente a un paciente para el tratamiento, también pueden, por tanto, acceder directamente a las cepas objetivo de *Neisseria*.

Preferiblemente la vacuna de la presente invención comprende epítopos que pueden estimular anticuerpos que son opsonicos. Además se prefiere que estos anticuerpos puedan unirse a cepas de *Neisseria* de tipo natural para conferir protección contra la infección y que sean bactericidas.

La presente invención también proporciona un procedimiento para tratar *Neisseria* patogénica. El procedimiento emplea uno o algunos componentes inmunogénicos que dan lugar a anticuerpos eficaces y que se basan en un epítipo del núcleo interno para estimular la respuesta inmunitaria. La respuesta inmunitaria normalmente está mediada por células B, pero se puede incluir inmunidad mediada por células T. Los anticuerpos generados por la vacuna de esta invención se unen a elementos del núcleo interno de la bacteria objetivo patogénica.

Las enfermedades producidas por *Neisseria meningitidis* incluyen principalmente meningitis, septicemia y neumonía, y en la presente invención se prefiere especialmente la prevención y el tratamiento de estas enfermedades. Las enfermedades producidas por *Neisseria gonorrhoeae* incluyen enfermedades transmitidas sexualmente tales como uretritis, cervicitis, proctitis, faringitis, salpingitis, epididimitis y bacteriemia/artritis. Adicionalmente, la invención se extiende al tratamiento y la prevención de cualquier otra enfermedad que resulta de la infección por *Neisseria*, especialmente a enfermedades en las que la infección por *Neisseria* podría debilitar el sistema inmunitario tal como otra enfermedad o patógeno podrían ser dañinos para un individuo. El tratamiento puede ser preventivo o curativo.

La vacuna de la presente invención es una formulación adecuada para su administración segura a un sujeto, permitiendo que el sujeto desarrolle una respuesta inmunitaria a la infección futura por *Neisseria*. Las vacunas de la presente invención son preferiblemente vacunas formuladas en las que puede conjugarse cualquiera de los componentes inmunogénicos de la vacuna y puede usarse cualquier agente adecuado para la conjugación. La conjugación permite la modificación de la presentación del antígeno y puede lograrse mediante técnicas convencionales. Ejemplos de agentes para la conjugación incluyen proteínas de especies homólogas o heterólogas. De esta forma, el componente inmunogénico de la presente invención forma un conjugado de sacárido-péptido. Preferiblemente, la parte de péptido comprende un epítipo de activación de células T.

Las vacunas de la presente invención pueden administrarse con un adyuvante, para mejorar la respuesta inmunitaria a los componentes inmunogénicos. Los adyuvantes adecuados incluyen sales de aluminio, aceites en combinación con macromoléculas bacterianas, liposomas, dipéptido de muramilo, ISCOMS, toxinas bacterianas tales como pertúsica, cólera y las derivadas de *E. coli* y citoquinas tales como IL-1, IL-2 e IFN γ .

La vacuna de la invención puede administrarse mediante medios adecuados, tales como mediante administración oral o administración parenteral, inyección, medios nutracéuticos u otros medios de administración, y puede proporcionarse en cualquier forma de administración adecuada tal como comprimidos, píldoras, cápsulas, gránulos, soluciones, suspensiones o emulsiones. Adecuadamente los componentes de la vacuna se preparan en forma de una solución estéril, isotónica.

La presente invención también se extiende a los anticuerpos monoclonales derivados de los conceptos y las metodologías descritos en el presente documento, incluyendo pero sin limitarse a B5, y al uso de estos anticuerpos en el tratamiento de infección por *Neisseria*. La invención también se refiere a preparaciones farmacéuticas que comprenden tales anticuerpos en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tales preparaciones pueden administrarse mediante medios adecuados, tales como los ejemplificados anteriormente para la administración de vacunas, y pueden usarse en combinación con otros agentes activos o adyuvantes.

La dosificación correcta del anticuerpo o de la vacuna variará según la formulación, el modo de aplicación particulares y el huésped particular que se está tratando. Es adecuado tener en cuenta factores tales como la edad, el peso corporal, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la tasa de excreción, el estado del huésped, las combinaciones de fármacos y las sensibilidades de reacción.

ES 2 327 895 T3

Las composiciones de vacunas y anticuerpos de la presente invención pueden usarse con otros fármacos para proporcionar tratamientos de combinación. Los otros fármacos pueden formar parte de la misma composición o pueden proporcionarse como una composición separada para la administración al mismo tiempo o en un momento diferente.

5 Además de los propios anticuerpos, la invención también se refiere a los híbridos que producen tales anticuerpos.

Los anticuerpos contra los componentes inmunogénicos de la invención pueden generarse administrando los componentes inmunogénicos a un animal, preferiblemente a un animal no humano, usando protocolos convencionales. Para la preparación de anticuerpos monoclonales, puede usarse cualquier técnica adecuada. Las técnicas para la producción de anticuerpos de cadena única (documento US 4.946.778) pueden adaptarse para producir anticuerpos de cadena única apropiados. Además, pueden usarse ratones transgénicos u otros organismos u animales para expresar anticuerpos humanizados inmunoespecíficos frente a los componentes inmunogénicos de la invención.

10 Alternativamente, pueden usarse otros procedimientos, por ejemplo tecnología de presentación en fago para seleccionar genes de anticuerpo para proteínas con actividades de unión hacia los componentes inmunogénicos de la presente invención.

Los anticuerpos de la invención pueden ser anticuerpos o bien monoclonales o bien policlonales, según sea apropiado.

20 La presente invención también se refiere a un procedimiento para la prevención de infección por *Neisseria*, comprendiendo el procedimiento administrar a un sujeto que necesita tal tratamiento una cantidad eficaz de una vacuna tal como se describió anteriormente.

25 Preferiblemente, la administración es adecuada para producir un anticuerpo de larga duración y/o una respuesta inmunitaria de células T para proteger al sujeto de la infección, particularmente de la infección por *Neisseria meningitidis*.

30 La invención también se refiere a un procedimiento para el tratamiento de infección por *Neisseria*, comprendiendo el procedimiento administrar a un sujeto que necesita tal tratamiento una cantidad eficaz de un anticuerpo frente al núcleo interno de *Neisseria meningitidis*. Preferiblemente, el anticuerpo es B5 o A4 o un anticuerpo que reconoce el mismo epítipo que B5 o A4, o un anticuerpo derivado de los conceptos y metodologías descritos en el presente documento, o es una combinación de los mismos.

35 Además, los procedimientos de la invención pueden extenderse a la identificación de epítopos en cualquier cepa bacteriana. Los epítopos así identificados pueden someterse a prueba tanto para determinar su accesibilidad, conservación a través de la población como para determinar su actividad funcional, usando procedimientos tal como se explica en los ejemplos adjuntos. Por tanto, la presente invención se refiere adicionalmente a un procedimiento para la identificación de un elemento inmunogénico, que comprende producir un anticuerpo frente a una estructura bacteriana, preferiblemente una estructura de LPS bacteriana, más preferiblemente una estructura de LPS bacteriana del núcleo interno, y someter a prueba el epítipo reconocido por el anticuerpo para determinar la accesibilidad al anticuerpo en la cepa de tipo natural, que comprende también opcionalmente someter a prueba el epítipo para determinar su conservación a través de la población bacteriana y someter a prueba para determinar la actividad funcional frente al epítipo *in vivo*.

45 Preferiblemente, las especies bacterianas son especies de *Neisseria*, preferiblemente *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae* o *Neisseria lactamica*.

50 Específicamente, la presente invención proporciona un procedimiento para generar anticuerpos frente al núcleo interno de *Neisseria meningitidis*. Por primera vez ha sido posible examinar una población de cepas de *Neisseria meningitidis* para identificar características de población completa que son independientes de inmunitipo.

En consecuencia, la presente invención también se refiere a un procedimiento para la identificación de epítopos inmunogénicos de *Neisseria meningitidis*, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

- 55
- 1 generar anticuerpos frente al núcleo interno de *Neisseria meningitidis*, mediante la inoculación de un microorganismo huésped con una cepa mutante *galE* de *Neisseria meningitidis*, y
 - 2 someter a prueba tales anticuerpos contra una cepa de *Neisseria meningitidis* de tipo natural para identificar aquellos anticuerpos que son reactivos y para los que los epítopos son por tanto accesibles.
- 60

La utilidad potencial de los epítopos así identificados puede evaluarse adicionalmente examinando anticuerpos que reaccionan con el núcleo interno de la cepa de *galE* de *Neisseria meningitidis* contra un panel de cepas que son representativas de una diversidad de cepas. Preferiblemente, el panel de cepas se selecciona usando un enfoque basado en un análisis de población. Los epítopos así identificados pueden someterse entonces a prueba en ensayos funcionales, tal como se explica en el ejemplo 3.

En particular, la invención se extiende a un procedimiento para el análisis de la unión de anticuerpos a bacterias, en el que se estudian aislados naturales cuando se hacen crecer y son adherentes a células en cultivos tisulares, tales como HUVEC. Este ensayo proporciona una monocapa de células a las que se adhieren las bacterias en un entorno biológicamente relevante. Intentos anteriores usando *Neisseria*, por ejemplo, directamente adherente a cubreobjetos revestidos de gelatina o Matrigel dieron como resultado bajos números de bacterias adherentes tras lavados repetidos y alta tinción de fondo no específica. En particular, se prefiere que se analice la unión de anticuerpos usando microscopía confocal.

Este procedimiento también identifica anticuerpos adecuados para el uso terapéutico y la invención se extiende a tales anticuerpos.

Además, se han identificado genes biosintéticos clave para cada etapa en la síntesis de LPS (Preston *et al.*, 1996, Crit. Rev. Microbiol. 22, 139 - 180) y esto permite la construcción de una serie de mutantes de los que pueden hacerse disponibles glicoformas de LPS de tamaño y complejidades variables para facilitar la identificación de los epítomos conservados (van der Ley *et al.*, 1997, FEMS Microbiol. Letter 146, 247 - 253, Jennings *et al.* 1993, Mol. Microbiol. 10 361 - 369, Jennings *et al.*, 1995, Microb Pathog 19, 391 - 407, van der Ley *et al.*, 1996, Mol Microbiol 19, 1117 - 1125).

La presente invención también se refiere al gen encontrado en *Neisseria meningitidis* que está implicado en la sustitución de PEtn en la posición 3 en HepII, y a los genes relacionados en estructura y función. Todavía no se han identificado genes en ninguna bacteria que estén implicados en la adición de PEtn a estructuras de LPS. Usando B5, específico para un epítomo de LPS del núcleo interno que contiene una PEtn, se ha identificado un supuesto gen de fosfoetanolamina transferasa de LPS (denominado *hypo3*) en *Neisseria meningitidis*. *Hypo3* se nombró arbitrariamente, ya que es el 3^{er} marco de lectura en un fragmento de ADN seleccionado mediante experimentación, de la secuencia genómica de MC58. El *hypo3* original procede por tanto de MC58. Este ORF se denomina NMB2010 en la base de datos TIGR (secuencia genómica de MC58) y aunque se designa como una proteína de función desconocida, se clasifica como una “proteína de la familia YhbX/YhjW/YijP/YjdB”. Esto indica que se han deducido homólogos en otros microorganismos, pero no se desconoce su función. El homólogo en la secuencia del serogrupo A en el Centro Sanger se denomina NMA0431, aunque este gen es más pequeño que *hypo3*. *Hypo3* está implicado en la sustitución de PEtn en la posición 3 en HepII. Además, se requiere la presencia del gen completo para la expresión del fenotipo reactivo con B5 en *Neisseria meningitidis* así como en otras especies patogénicas y comensales de *Neisseria*.

La identificación del gen permite que se creen mutantes que son isogénicos aparte de *hypo3*, y que sólo difieren en la presencia o ausencia de PEtn en la posición 3 de HepII en el núcleo interno de LPS. Tales cepas pueden usarse en estudios comparativos. Además, pueden modificarse por ingeniería genética cepas apropiadas para la producción de vacunas de modo que comprendan la estructura de PEtn preferida en la posición 3, o pueden modificarse por ingeniería genética de modo que esta PEtn no pueda estar presente.

En consecuencia, la invención se refiere al uso del gen *hypo3*, o un homólogo del mismo, en la producción de una cepa de *Neisseria* para la evaluación, el tratamiento o la prevención de infección por *Neisseria*. El homólogo puede tener un 60%, 70%, 80%, 90% o más de homología o identidad con *hypo3*, tal como se evalúa a nivel del ADN. El uso del gen incluye los procedimientos explicados anteriormente, para preparar cepas modificadas genéticamente para la vacunación, el aislamiento de epítomos apropiados y la generación de cepas para estudios comparativos. Más generalmente, se concibe la identificación y el uso de cualquier gen que desempeñe un papel en la ruta biosintética y que tenga un efecto sobre la conservación, la accesibilidad o la función del inmunógeno.

La presente invención se ilustra ahora mediante las siguientes figuras y ejemplos que no son limitantes de la presente invención, en los que:

la figura 1 ilustra la estructura de LPS de diversos inmunotipos de *Neisseria meningitidis*;

la figura 2 ilustra la reactividad cruzada de B5 con inmunotipos y mutantes seleccionados de LPS de *Neisseria meningitidis*;

la figura 3 ilustra modelos moleculares de los estados de mínima energía (MMC) calculados del oligosacárido del núcleo de mutantes *galE* de L3, L4 y L8 desfosforilado;

la figura 4 ilustra la reactividad cruzada de B5 con LPS de L3 modificado genéticamente y LPS de L8 modificado químicamente de *Neisseria meningitidis*;

la figura 5 ilustra la microscopía confocal de inmunofluorescencia de la cepa MC58 de microorganismos de *Neisseria meningitidis* adherente a HUVEC;

la figura 6 ilustra geles de tricina teñidos con plata de preparaciones de LPS de cepas del grupo B de *Neisseria meningitidis* no reactivas con B5;

la figura 7 ilustra la accesibilidad del epítomo de LPS a A4 en células completas de *Neisseria meningitidis*;

la figura 8 ilustra la conservación del epítipo de LPS a través de serogrupos de *Neisseria meningitidis*;

la figura 9 ilustra la estrategia para el ejemplo 2;

5 la figura 10 ilustra títulos de ELISA de anticuerpos frente a LPS de *galE* de L3 (IgG) en sueros emparejados tomados de manera temprana y tardía de niños con enfermedad meningocócica invasiva, y el % medio de fagocitosis de MC58 de *Neisseria meningitidis* con sueros emparejados tomados de manera temprana y tardía de niños con enfermedad meningocócica invasiva con células mononucleares de sangre periférica humana y complemento humano;

10 la figura 11a ilustra el % medio de fagocitosis de MC58 de *Neisseria meningitidis* con el AcM B5 preincubado con concentraciones crecientes de LPS de *galE* o bien (i) reactivo con B5 o bien (ii) no reactivo con B5 con células polimorfonucleares de sangre periférica humana y complemento humano;

15 la figura 11b ilustra el % medio de fagocitosis del par de cepas isogénicas de tipo natural de *Neisseria meningitidis* (*Neisseria meningitidis* BZ157) que son o bien reactivas con el AcM B5 o bien no reactivas con B5 con AcM B5 como la opsonina con células mononucleares de sangre periférica humana y complemento humano;

20 la figura 11c ilustra el % medio de fagocitosis de perlas de látex fluorescentes revestidas o bien con LPS purificado a partir del mutante *galE* de L3 (10 µg/ml) o bien no revestidas, en presencia del AcM B5 o de tampón final, con células mononucleares de sangre periférica humana y complemento humano;

25 la figura 12 ilustra el % medio de supervivencia del mutante *galE* de *Neisseria meningitidis* en presencia y ausencia del AcM B5 contra diluciones en serie de dos veces de suero reunido humano comenzando en el 40% tal como se detecta usando un ensayo bactericida en suero;

30 la figura 13 ilustra la bacteriemia en media geométrica en la sangre de grupos de ratas lactantes de 5 días de edad 24 h tras la infección con 1×10^8 ufc/ml de mutante *galE* administrado simultáneamente con: (i) ausencia de anticuerpo; (ii) AcM B5 (dosis de 10 µg); (iii) AcM B5 (dosis de 100 µg); o (iv) AcM 735, un anticuerpo anti-capsular control positivo (dosis de 2 µg);

35 la figura 14 ilustra una inmunotransferencia de tipo Western que muestra un LPS purificado a partir de MC58 y mutante *galE* de *Neisseria meningitidis* sondado con AcM B5 (líquido ascético 1:2000) detectado usando IgG anti-ratón - fosfatasa alcalina y sustrato BCIP/NBT; y

40 la figura 15 ilustra un perfil de FACS que compara el marcaje en superficie de MC58 y mutante *galE* de *Neisseria meningitidis* vivas (5×10^8 microorg./ml) con AcM B5 (sobrenadante de cultivo 1:50) detectado usando IgG anti-ratón (marcado con FITC).

40 Ejemplos de la invención

Ejemplo 1

Identificación de epítipos inmunogénicos en *Neisseria meningitidis*

45 Introducción

Se investigó la conservación y la accesibilidad a anticuerpos de epítipos del núcleo interno de lipopolisacárido (LPS) de *Neisseria meningitidis* debido a su potencial como candidatos de vacuna. Se obtuvo un anticuerpo monoclonal (AcM) murino IgG3, denominado AcM B5, inmunizando ratones con un mutante *galE* de H44/76 de *Neisseria meningitidis* (inmunotipo L3 de B.15.P. 1.7.16). Se ha demostrado que el AcM B5 puede unirse al LPS del núcleo de microorganismos MC85 encapsulados de tipo natural (inmunotipo L3 de B.15.P1.7.16) *in vitro* y *ex vivo*. Una estructura del núcleo interno reconocida por el AcM B5 está conservada y es accesible en 26/34 (76%) cepas del grupo B y en 78/112 (70%) cepas de los grupos A, C, W, X, Y y Z. Las cepas de *Neisseria meningitidis* que presentan este epítipo son inmunotipos en los que la fosfoetanolamina (PEtn) está unida a la posición 3 de la heptosa de cadena β (HepII) del núcleo interno. En contraposición, las cepas de *Neisseria meningitidis* que carecen de reactividad con el AcM B5 tienen una estructura de núcleo alternativa en la que la PEtn está unida a una posición exocíclica (es decir, la posición 6 ó 7) de HepII (inmunotipos L2, L4 y L6) o está ausente (inmunotipo L5). Se concluye que el AcM B5 define una o más de las glicofomas principales del núcleo interno del LPS de *Neisseria meningitidis*.

60 Estos hallazgos fomentan la posibilidad de que inmunógenos que pueden provocar anticuerpos funcionales específicos para las estructuras del núcleo interno podrían constituir la base de una vacuna contra infecciones invasivas producidas por *Neisseria meningitidis*.

65 En resumen, se notifica que un anticuerpo monoclonal, denominado B5, ha identificado un epítipo en reacción cruzada en el LPS de la mayoría de las cepas que se producen de manera natural, pero genéticamente diversas, de *Neisseria meningitidis*. Una fosfoetanolamina (PEtn) en la posición 3 de la heptosa de cadena P (HepII) (figura 1) es crítica para el epítipo de las cepas reconocidas por el anticuerpo monoclonal B5. En contraposición, todas las cepas

ES 2 327 895 T3

de *Neisseria meningitidis* que carecen de reactividad con AcM B5 son inmunotipos caracterizados por la ausencia de sustitución de PEtn o por la sustitución de PEtn en una posición exocíclica (es decir, la posición 6 ó 7) de HepII (figura 1). Por tanto, se encuentra un repertorio limitado de variantes de LPS del núcleo interno entre los aislados naturales de las cepas de *Neisseria meningitidis* y estos hallazgos fomentan la posibilidad de que pudiera desarrollarse una vacuna que contenga algunas glicofomas representativas de todas las cepas naturales de *Neisseria meningitidis*.

Materiales y Procedimientos

10 Cepas bacterianas

Las cepas MC58 y H44/76 de *Neisseria meningitidis* (ambas inmunotipo L3 de B:15:P1.7.16) se han descrito anteriormente (Virji, M., H. Kayhty, D. J. P. Ferguson, J. E. Heckels y E. R. Moxon, 1991. Mol Microbiol 5: 1831-1841, Holten, E. 1979. J Clin Microbiol 9: 186-188). Se obtuvieron derivados de MC58 y H44/76 con alteraciones definidas en el LPS inactivando los genes *galE* (Jennings, M. P., P. van der Ley, K. E. Wilks, D. J. Maskell, J. T. Poolman y E. R. Moxon. 1993. Mol Microbiol 10: 361-369), *lsi* (Jennings, M. P., M. Bisercic, K. L. Dunn, M. Virji, A. Martin, K. E. Wilks, J. C. Richards y E. R. Moxon. 1995. Microb Pathog 19: 391-407), *lgtA*, *lgtB* (Jennings, M. P., D. W. Hood, I. R. Peak, M. Virji y E. R. Moxon. 1995. Mol Microbiol 18: 729-740), *rfaC* (Stoiljkovic, I., V. Hwa, J. Larson, L. Lin, M. So y X. Nassif. 1997. FEMS Microbiol Lett 151: 41-49), *icsA* e *icsB* (van der Ley, P., M. Kramer, A. Martin, J. C. Richards y J. T. Poolman, 1997. FEMS Microbiol Lett 146: 247-253) (tabla 1). Otras cepas de tipo natural de *Neisseria meningitidis* usadas en el estudio procedieron de tres colecciones: 1) representativas de los inmunotipos L1-L12 (Poolman, J. T., C. T. P. Hopman y H. C. Zanen. 1982. FEMS Microbiol Lett 13: 339-348); 2) colección global de 34 cepas representativas del grupo B de *Neisseria meningitidis* (Seiler, A., R. Reinhardt, J. Sakari, D. A. Caugant y M. Achtman. 1996. Mol Microbiol 19: 841-856); 3) colección global de 100 cepas de 107 cepas representativas de *Neisseria meningitidis* de todos los serogrupos principales (A, B, C, W, X, Y, Z) (Maiden, M. C. J., J. A. Bygraves, E. Feil, G. Morelli, J. E. Russell, R. Urwin, Q. Zhang, J. Zhou, K. Zurth, D. A. Caugant, I. M. Feavers, M. Achtman y G. B. Spratt. 1998. PNAS 95: 3140-3145).

Se construyeron mutantes *galE* y deficientes en cápsula en seis cepas del grupo B de *Neisseria meningitidis* obtenidas de la colección tal como se describe en (Seiler, A., *et al.*, 1996. Mol Microbiol 19: 841-856) (tabla 1). Otras cepas relacionadas de *Neisseria* estudiadas incluyeron 10 cepas de *Neisseria gonorrhoeae* y cepas comensales de *lactamica* (8 cepas), *polysaccharea* (1 cepa), *mucosa* (1 cepa), *cinerea* (1 cepa), *elongata* (1 cepa), *sicca* (1 cepa) y *subflava* (1 cepa). Otros microorganismos Gram negativos incluyeron: *Haemophilus influenzae* tipo b (7 cepas), *Haemophilus somnus* (1 cepa), *Haemophilus influenzae* no tipificable (8 cepas), *Escherichia coli* (1 cepa) y *Salmonella typhimurium* (1 cepa) y sus mutantes isogénicos de LPS (*rfaC*, *rfaP*, *rfaI*) (tabla 1).

Cultivo bacteriano *in vitro*

Se hicieron crecer todas las cepas durante la noche a 37°C en base de medio BHI convencional (Oxoid) en una atmósfera de CO₂ al 5%.

Cultivo bacteriano *in vivo* usando el modelo de embrión de pollo

Para determinar la accesibilidad de los epítomos del núcleo interno de *Neisseria meningitidis* hecha crecer *in vivo*, se usó el modelo de embrión de pollo (Buddingh, G. J. y A. Polk. 1937. Science 86: 20-21, Buddingh, G. J. y A. Polk. 1939. J Exp Med 70: 485-498, Schroten, H., M. Deadman y E. R. Moxon. 1995. Pediatr. Grenzgeb. 34: 319-324). Se modificó el procedimiento usando un inóculo de 10⁴ y 10⁵ microorganismos de *Neisseria meningitidis* en un volumen final de 0,1 ml, para infectar el líquido corioalantoideo de huevos de pollo Pure Sussex de 10 días de edad (obtenidos de la Poultry Unit, Institute of Animal Health, Compton, Berks). Tras una incubación durante la noche (37°C), se extrajo el líquido alantoideo (aproximadamente 3-5 ml) de los huevos y se recuperaron las bacterias tras centrifugación a 350 x g durante 15 minutos. Se lavaron los microorganismos en solución salina tamponada con fosfato estéril (PBS) y se almacenaron en solución de Greaves (5% de BSA, 5% de glutamato de sodio, 10% de glicerol) a -70°C.

Extracción de LPS

Se obtuvieron las muestras de LPS de un crecimiento durante la noche de *Neisseria meningitidis* sembrada en placa en 5 placas con BHI de la que los microorganismos se rasparon y se suspendieron en 30 ml de fenol al 0,05% en PBS y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Alternativamente, se prepararon cultivos por lotes en fermentadores usando bacterias de un crecimiento durante la noche (6 placas) en 50 ml de caldo Difco Bacto Todd Hewitt (Difco) para inocular 2,5 l del mismo medio. Para la inserción de las cepas mutantes, el medio contenía 50 µg/ml de kanamicina. Tras la incubación a 37°C durante 6-8 h se inoculó el cultivo en 60 l de caldo Bacto Todd Hewitt en un fermentador New Brunswick Scientific 1F-75. Tras el crecimiento durante la noche (17 h a 37°C), se inactivó el cultivo mediante la adición de fenol (1%) y se enfrió hasta 15°C y se recogieron las bacterias mediante centrifugación (13.000 g durante 20 min.) (Wakarchuk, W., *et al.*, 1996. J Biol. Chem. 271: 19166-19173). En cualquier caso, se extrajo el LPS bruto del sedimento bacteriano usando el procedimiento convencional de fenol-agua en caliente (Westphal, O. y J.

ES 2 327 895 T3

K. Jann. 1965. Meth. Carbohydr. Chem. 5:83-91) y se purificó a partir de la fase acuosa mediante ultracentrifugación repetida (105.000 x g, 4°C, 2 x 5 h) (Masoud, H., E. R. Moxon, A. Martin, D. Krajcarski y J. C. Richards. 1997. biochemistry 36: 2091-2103).

5

Geles de tricina

Se hirvieron cantidades equivalentes de lisados de células completas de cepas de *Neisseria meningitidis* o LPS purificado en tampón de disociación y se separaron en geles de tricina convencionales (30 mA durante 18 h) (Lesse, A. J., A. A. Campagnari, W. E. Bittner y M. A. Apicella. 1990. J Immunol Methods 126: 109-117). Se fijaron los geles y se tiñeron con plata según las instrucciones de los fabricantes (BioRad). Para determinar la presencia de ácido siálico, se incubaron los lisados de células completas con 2,5 μ l de neuraminidasa a 37°C durante 18-20 h (4 U/ml Boehringer 1585886) y luego con 5 μ l de proteinasa K a 60°C durante 2-3 h para eliminar las proteínas (Boehringer 1373196) antes de la separación en geles de tricina (16,5%).

15

Caracterización de LPS a partir de cepas negativas para AcM B5

Se sometió a O-desacilación el LPS procedente de cepas negativas para AcM B5 de tipo natural y mutantes *galE*, *cap*- con hidrazina anhidra tal como se describió anteriormente (Masoud, H., E. R. Moxon, A. Martin, D. Krajcarski y J. C. Richards. 1997. Biochemistry 36: 2091-2103). Se analizó el LPS O-desacilado mediante espectrometría de masas por electrospray (EM-ES) en el modo de iones negativos en un espectrómetro de masas triple cuádruple VG Quattro (Fisons Instruments) o API 300 (Perkin-Elmer/Sciex). Se disolvieron las muestras en agua que se diluyó en un 50% con acetonitrilo:agua:metanol:1% de amoníaco (4:4:1:1) y se mejoró la mezcla mediante infusión directa a 4 μ l/min. Se preparó LPS desacilado y desfosforilado (L8 odA HF) según el procedimiento siguiente. Se trató el LPS (160 mg) con hidrazina anhidra (15 ml) con agitación a 37°C durante 30 minutos. Se enfrió la reacción (0°C), se añadió acetona fría (-70°C, 50 ml) gradualmente para destruir la hidrazina en exceso y se obtuvo LPS O-desacilado precipitado (L8 odA) mediante centrifugación. Se lavó L8 odA dos veces con acetona fría y se redisolvió en agua y se liofilizó. Se confirmó la estructura de L8 odA mediante EM-ES de iones negativos antes de continuar con la desfosforilación. Se desfosforiló L8 odA mediante el tratamiento con fluoruro de hidrógeno acuoso al 48% (10 ml) a 0°C durante 48 h. Se dializó el producto frente a agua y se liofilizó la muestra de LPS O-desacilado, desfosforilado (L8 odA HF) (50 mg). Se confirmó la pérdida de fosfato mediante EM-ES.

35

Modelización molecular

Se llevó a cabo la modelización molecular de los epítomos de LPS tal como se describió anteriormente por Brisson, J. R., S. Uhrinova, R. J. Woods, M. van der Zwan, H. C. Jarrell, L. C. Paoletti, D. L. Kasper y H. Jennings. 1997. Biochemistry 36: 3278-3292). Se presentó la geometría de partida para todos los azúcares para un refinamiento completo de longitudes de enlaces, valencia y ángulos de torsión mediante el uso del programa de mecánica molecular MM3(92) (QPCE). Se realizaron todos los cálculos utilizando las coordenadas minimizadas para el metilglicósido. Se generaron los grupos de fósforo a partir de coordenadas convencionales (Alchemy, software de Tripos) y conformaciones de mínima energía encontradas en estructuras cristalinas. Se realizaron los cálculos usando el procedimiento Metropolis Monte Carlo (MMC). Se trataron todos los grupos colgantes como invariables excepto los grupos de fósforo que se permitió que rotasen alrededor de los enlaces Cx-Ox y Ox-P. Se tomaron los ángulos de partida para el oligosacárido de los conformadores de mínima energía calculados para cada unidad de disacárido presente en la molécula. Se llevaron a cabo cálculos de MMC de 24 dimensiones de los hexasacáridos con o sin grupos de PEtn unidos con 5000 movimientos de macro. Se generaron los gráficos usando el software Schakal (Egbert Keller, Kristallographisches Institut der Universität, Freiburg, Alemania).

50

Anticuerpos

Anticuerpo policlonal de conejo

55

Se usó un anticuerpo policlonal de conejo específico para el polisacárido capsular de *Neisseria meningitidis* del grupo B obtenido inmunizando un conejo seis veces por vía subcutánea con lisados de MC58 a intervalos de 2 semanas. Las inmunizaciones primera y segunda contenían adyuvante completo de Freund y adyuvante incompleto de Freund, respectivamente. Se obtuvo suero del sangrado 6.

60

Para aumentar la especificidad del polisacárido capsular del grupo B, se incubó anticuerpo policlonal de conejo (1 ml) durante la noche a 4°C con MC58 deficiente en cápsula fijado con etanol (5×10^9 microorg./ml). Este anticuerpo policlonal preadsorbido no reaccionó con un mutante deficiente en cápsula de MC58 usando microscopía de inmunofluorescencia.

65

Anticuerpos monoclonales frente a LPS del núcleo interno

Se prepararon anticuerpos monoclonales murinos frente a LPS de *galE* de H44/76 mediante procedimientos convencionales. En resumen, se inmunizaron ratones Balb/c de 6-8 semanas de edad tres veces por vía intraperitoneal seguido por una inyección intravenosa con células completas de mutante *galE* inactivadas con formalina. Se prepararon hibridomas mediante la fusión de células del bazo con SP2/O-Ag 14 (Shulman, M., C. D. Wilde y G. Kohler. 1978. *Nature* 276: 269-270) tal como se describe (Carlin, N. I., M. A. Gidney, A. A. Lindberg y D. R. Bundle. 1986. *J Immunol* 137: 2361-2366). Se seleccionaron supuestos hibridomas que secretaban anticuerpos específicos para *galE* mediante ELISA empleando LPS purificado a partir de L3 y su mutante *galE* y L2. Se determinaron la clase, la subclase y la cadena ligera de la Ig mediante el uso de un kit de isotipificación (Amersham Canada Ltd, Oakville, Ontario). Se expandieron clones en ratones Balb/c tras el tratamiento con pristano para generar líquido ascítico. Se recogió el sobrenadante del cultivo gastado tras el cultivo *in vitro* de líneas celulares de hibridoma. Se llevaron a cabo pruebas adicionales de AcM frente a *galE* seleccionando contra LPS purificado de las cepas de mutante *IgtA*, *IgtB* e *IgtE* de L3 de *Neisseria meningitidis* (figura 1), y los mutantes *Ra* y *Re* de *Salmonella typhimurium*. Se seleccionó uno de los AcM, AcM B5 (IgG₃), para un estudio más detallado.

Anticuerpos monoclonales para inmunotipificación

Para determinar los inmunotipos de estudios de cepas de *Neisseria meningitidis*, especialmente L2 y L4-L6, se usaron los siguientes AcM murinos en transferencias puntuales y ELISA de células completas: MN42F12.32 (L2, 5), MN4A8B2 (L3, 7, 9), MN4C1B (L4, 6, 9), MN40G11.7 (L6), MN3A8C (L5) (Scholten, R. J., *et al.*, *J Med Microbiol* 41: 236-243).

Ensayo con células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC)

Se prepararon células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) en cultivo tal como se describió anteriormente (Virji, M., *et al.*, 1991. *Microb Pathog* 10: 231-245) y se infectaron con cepas de *Neisseria meningitidis* durante 3 h a 37°C. Se hicieron crecer cepas de *Neisseria meningitidis in vitro* o *in vivo* usando el modelo de embrión de pollo (tal como se describió anteriormente). Se determinó la accesibilidad de los epítomos del LPS del núcleo interno de *Neisseria meningitidis* en células completas a AcM B5 específico usando microscopía confocal y de inmunofluorescencia. Se infectaron cubreobjetos de vidrio revestidos de gelatina con HUVEC con *Neisseria meningitidis* de tipo natural, tal como se describió anteriormente (Virji, M., *et al.*, 1991. *Mol Microbiol* 5: 1831-1841), excepto en que las bacterias se fijaron con el 0,5% de paraformaldehído durante 20 min. en lugar de con metanol. Para los estudios de accesibilidad, se lavaron los cubreobjetos con PBS, se bloquearon en BSA al 3%-PBS y se incubaron con sobrenadante de cultivo de AcM B5 y anticuerpo policlonal anti-capsular de conejo preadsorbido. Se detectó la unión del anticuerpo a las cepas de *Neisseria meningitidis* de tipo natural mediante IgG anti-ratón - rodamina (TRITC) (Dako) e IgG anti-conejo - fluoresceína (FITC) (Sigma). Se tiñeron HUVEC usando diaminofenilamina DAPI (1 µg/ml) (Sigma). Se observaron los cubreobjetos montados para detectar la inmunofluorescencia usando filtros apropiados (Microscopio Zeiss con Fluorograbber, Adobe Photoshop o microscopio confocal (Nikon Model).

*ELISA**ELISA de LPS purificado*

Se usó un ELISA indirecto en fase sólida empleando LPS purificado para determinar las especificidades de unión de los AcM. Se revistieron placas Nunc maxisorp durante la noche con 1,0 µg/pocillo de LPS purificado derivado del tipo natural y de mutantes. Se diluyó el LPS (10 µg/ml) en tampón carbonato 0,05 M que contenía MgCl₂ 0,02 M, pH 9,8. Se bloquearon sitios de unión no específicos durante 1 h con BSA al 1%-PBS (Sigma) y se lavaron tres veces con PBS Tween 20 (0,05% v/v) (PBS-T). Se incubaron las placas durante 1 h con sobrenadante de cultivo de AcM B5 y se lavaron tres veces en PBS-T. Se detectó el anticuerpo primario usando IgG anti-ratón - fosfatasa alcalina (Sigma: Cedarlane Laboratories Ltd.) se incubó durante 1 h, se lavó tres veces en PBS-T y se detectó usando el sistema de sustrato de fosfato de p-nitrofenilo AP (Sigma: Kirkegaard & Perry Laboratories). Se detuvo la reacción tras 1 h con 50 µl de NaOH 3 M y se determinó la absorbancia a DO A_{405-410 nm} (lector de placas de EIA Dynatech).

ELISA de inhibición

Para los estudios de ELISA de inhibición, se incubó AcM B5 con muestras de LPS purificado antes de la adición a placas revestidas de LPS de *galE* de L3 y se sometió a ensayo tal como se describió anteriormente.

ELISA de células completas

Se llevó a cabo ELISA de células completas (WC) usando lisados inactivados por calor de microorganismos de *Neisseria meningitidis* tal como se describió anteriormente (Abdillahi, H. y J. T. Poolman. 1988. J Med Microbiol 26:177-180). Se revistieron placas de 96 pocillos Nunc Maxisorp con 100 μ l de suspensión bacteriana (DO de 0,1 a $A_{820\text{ nm}}$) durante la noche a 37°C, se bloquearon con BSA 1%-PBS y se siguió un protocolo idéntico que para ELISA de LPS.

10 *Transferencias puntuales*

Se aplicaron suspensiones bacterianas preparadas como antes (2 μ l) a un filtro de nitrocelulosa (45 micrómetros, Schleicher y Schueller) y se dejaron secar al aire. Se siguió el mismo procedimiento que el descrito para ELISA de WC, excepto en que el sustrato de detección fue 5-bromo-4-cloro-3-indoil-fosfato/nitro-azul de tetrazolio (BCIP/NBT) (2 mg/ml; Sigma). Se detuvo la reacción de color tras 30 min. mediante varios lavados con PBS y se secaron al aire las transferencias.

20 *Resultados*

Para investigar el potencial de las estructuras del LPS del núcleo interno de *Neisseria meningitidis* como vacunas, se ha estudiado la reactividad de un anticuerpo monoclonal (AcM) murino de isotipo IgG₃, denominado B5, producido contra el mutante *galE* de inmunotipo L3 de la cepa H44/76 de *Neisseria meningitidis*. El AcM B5 fue uno de los siete anticuerpos monoclonales frente al núcleo interno de LPS producido contra *galE* de inmunotipo L3 de *Neisseria meningitidis* mediante procedimientos inmunológicos convencionales (véase Procedimientos). Las pruebas de ELISA preliminares demostraron reacción cruzada de B5 con LPS de la cepa original de L3 y con los mutantes *galE* (*IgtE*), *IgtA* e *IgtB*, pero no produjo reacción cruzada con LPS de *Ra* o *Re* de *Salmonella typhimurium*.

Con el fin de determinar el epítipo del núcleo interno específico reconocido por AcM B5, se examinaron diversas cepas de *Neisseria meningitidis* de estructura conocida en ELISA para determinar reactividad cruzada (figura 2). El hallazgo más significativo de este análisis fue que el LPS del inmunotipo L4 de *Neisseria meningitidis* no se reconoció por AcM B5. La única diferencia estructural entre los inmunotipos L4 y L3 (que se reconoce por el AcM B5) es la posición de unión del grupo de PEtn (figura 3). En el LPS de inmunotipo L3, la PEtn está unida en la posición 3 de HepII, mientras que en el LPS de inmunotipo L4, la PEtn está unida en la posición 6 ó 7 de HepII (figura 3). Además, el LPS del inmunotipo L2 y su mutante *galE* (en los que el grupo de PEtn está unido en la posición 6 y está presente un residuo de glucosa en la posición 3 de HepII) no se reconocen por el AcM B5. El inmunotipo L5, que no tiene PEtn en el núcleo interno, no se reconoce por B5, mientras que se reconocen el inmunotipo L8 y su mutante *galE* que tienen PEtn en la posición 3 de HepII. Estos resultados sugieren que el AcM B5 reconoce específicamente PEtn cuando está unida en la posición 3 de HepII.

Con el fin de demostrar la inclusión esencial de PEtn en el epítipo reconocido por el AcM B5, se desfosforiló el LPS O-desacilado (odA) de inmunotipo L8 (HF al 48%, 4°C, 48 h) (figura 3). Se confirmó la ausencia de PEtn tras la desfosforilación mediante análisis de EM-ES. Tal como se indica en la figura 4, la desfosforilación del LPS de L8 odA suprimió la reactividad con AcM B5. Para caracterizar adicionalmente el epítipo reconocido por el AcM B5, se seleccionaron varios mutantes genéticos definidos estructuralmente del inmunotipo L3 para determinar la reactividad cruzada (figura 4). El LPS altamente truncado de la cepa de mutante *icsB* sólo se reconoció débilmente, mientras que el LPS de la cepa mutante *icsA* no se reconoció por el AcM B5. Estos resultados sugieren que la presencia de glucosa en el residuo de heptosa proximal (HepI) no es absolutamente necesaria para la unión por B5 pero se requiere para el reconocimiento óptimo (figura 1). Además, el AcM B5 no se une al LPS en el que están ausentes tanto el residuo de glucosa en la cadena α , HepI, como el residuo de N-acetilglucosamina en la cadena β , HepII. Esto sugiere que se requiere la presencia de N-acetilglucosamina para presentar el residuo de PEtn en la conformación correcta para su unión por el AcM B5. También se examinaron las modificaciones genéticas que producen glicoformas de LPS gravemente truncados para determinar su reactividad con el AcM B5. El LPS de *lsi* de inmunotipo L3 que tiene un trisacárido de Hep-Kdo-Kdo unido al lípido A, y el PB4 de L3 que sólo contiene el disacárido Kdo y el lípido A no se reconocieron por el AcM B5 (figura 4). Los estudios de ELISA de inhibición (datos no mostrados) estuvieron de acuerdo con este resultado, confirmando por tanto la especificidad del AcM B5 para la molécula de PEtn unida en la posición 3 de HepII.

Para demostrar la capacidad del AcM B5 para reconocer este epítipo del núcleo interno en las cepas encapsuladas, se concibió un ensayo en el que se estudiaron aislados naturales de *Neisseria meningitidis* cuando se hicieron crecer y llegaron a ser adherentes a células cultivadas tisulares (HUVEC). Inicialmente, se desarrolló esta metodología usando la cepa MC58 completamente encapsulada. Las ventajas de usar el ensayo de HUVEC fueron que proporcionaron una monocapa de células endoteliales a la que podrían adherirse las bacterias y que proporcionaron un entorno biológicamente relevante. Los intentos anteriores usando *Neisseria meningitidis* directamente adherente a cubreobjetos revestidos de gelatina o Matrigel dieron como resultado números bajos de bacterias adherentes tras lavados repetidos y alta tinción de fondo no específica.

Se detectaron los anticuerpos primarios, el AcM B5 y un anticuerpo policlonal anti-capsular mediante anticuerpo anti-ratón - TRITC y anticuerpo anti-conejo - FITC, respectivamente. Esto demostró que un epítipo de LPS del núcleo interno de la cepa completamente encapsulada (MC58) era accesible al AcM B5 (figura 5a). La microscopía confocal demostró que el AcM B5 y los anticuerpos anti-capsulares se localizaban conjuntamente. Además de esta demostración *in vitro* de la accesibilidad del AcM B5 al LPS del núcleo interno, también se investigó el crecimiento de microorganismos *in vivo* usando el modelo de embrión de pollo. Se inoculó la cepa MC58 (10^4 microorg./ml) en líquido corioalantoideo de embriones de pollo de 10 días de edad y se recogió al día siguiente para proporcionar microorganismos *ex vivo*. Los resultados de la microscopía confocal fueron idénticos a los observados *in vitro*, es decir el AcM B5 y los anticuerpos anti-capsulares se localizaban conjuntamente (figura 5b). Esto demostró que los epítopos del LPS del núcleo interno también eran accesibles *in vivo* en *Neisseria meningitidis* de tipo natural completamente encapsulada.

La observación de la tinción doble del epítipo de LPS del núcleo interno en presencia de cápsula es clave para el concepto de este enfoque y por tanto, se usaron varios controles para confirmar el hallazgo de validez. Estos incluyeron: (i) tinción doble de una cepa negativa para AcM B5, por ejemplo de inmunotipo L4, con AcM B5 y anticuerpo anti-capsular. Esto dio como resultado ausencia de reactividad de AcM B5 en filtro de rodamina pero reactividad positiva con el anticuerpo anti-capsular. Esto descarta un efecto de paso de banda durante el registro de las imágenes; (ii) tinción simple de cepas encapsuladas positivas para AcM B5 o bien con AcM B5 sólo o bien con anticuerpo anti-capsular solo seguido por tinción con rodamina o FITC, respectivamente. Cuando se observó a una longitud de onda apropiada, no hubo reactividad cruzada durante la tinción inmunofluorescente ni ningún efecto de paso de banda; (iii) la tinción doble de una cepa positiva o negativa para AcM B5 sin cápsula con AcM B5 y anticuerpo anti-capsular no dio como resultado tinción capsular sino reactividad o bien positiva o bien negativa con AcM B5 cuando se observó en el filtro de rodamina. Esto excluyó la reactividad cruzada durante la tinción o el efecto de paso de banda dando como resultado una tinción del núcleo interno artefactual.

Para estudiar el grado de reactividad del AcM B5 con otras cepas de *Neisseria meningitidis*, se investigaron tres colecciones.

- i) 12 cepas representativas de los inmunotipos L1-L12 de LPS
- ii) 34 cepas del grupo B seleccionadas para representar aislados genéticamente diversos de muchos países diferentes obtenidos entre los años 1940-1988 (Seiler, A., R. Reinhardt, J. Sakari, D. A. Caugant y M. Achtman. 1996. Mol Microbiol 19: 841-856)
- iii) una colección global de 107 cepas genéticamente diversas que representan todos los serogrupos capsulares, también obtenida de diferentes países desde 1940-1994 (Maiden, M. C. J., J. A. Bygraves, E. Feil, G. Morelli, J. E. Russell, R. Urwin, Q. Zhang, J. Zhou, K. Zurth, D. A. Caugant, I. M. Feavers, M. Achtman y G. B. Spratt. 1998. PNAS 95: 3140-3145).

De los 12 inmunotipos, el AcM B5 reconoció el LPS de cepas en las que el oligosacárido del núcleo interno tiene una PEtn unida a la posición 3 de HepII (tabla 2 y figura 1). Por tanto, los inmunotipos L2, L4, L6 no reaccionaron con el AcM B5, mientras que los inmunotipos L1, L3, L7-L12 se reconocieron por el AcM B5. Esto confirmó que es necesaria la presencia de PEtn en la posición 3 de la HepII para conferir reactividad con el AcM B5 (figura 3).

Para investigar adicionalmente la reactividad del AcM B5 con otras cepas del grupo B, se estudió una colección de cepas genéticamente diversas (Seiler, A., R. Reinhardt, J. Sakari, D. A. Caugant y M. Achtman. 1996. Mol Microbiol 19: 841-856). Se detectó reactividad con el AcM B5 en 26/34 (76%) cepas del grupo B de *Neisseria meningitidis* sometidas a prueba. Esto incluyó cepas representativas de ET-5, ET-37, A4 y linaje 3. Esto representa la colección disponible más completa de linajes hiperinvasivos de cepas del grupo B de *Neisseria meningitidis*.

Se obtuvieron mutantes deficientes en cápsula y *galE* de seis de ocho de las cepas del grupo B negativas para AcM B5 (las transformaciones no fueron satisfactorias en las otras dos cepas). Éstas también fueron negativas con el AcM B5 usando transferencia puntual, ELISA de células completas o inmunofluorescencia, con la excepción de un mutante BZ157 *galE* cap- que tenía reactividad de bajo nivel tanto mediante inmunofluorescencia como mediante transferencia puntual. Las cepas con AcM B5 se caracterizaron usando una batería de AcM de inmunotipificación. Se determinó el inmunotipo de las ocho cepas negativas para AcM B5 usando combinaciones de los AcM apropiados (véase Procedimientos) y transferencias puntuales de lisados de WC (obtenidos de Peter van der Ley) (tabla 3). Además, se obtuvo la huella estructural de la región del núcleo interno de las cepas negativas para AcM B5 mediante EM-ES en LPS O-desacilado de cinco de los mutantes *galE* deficientes en cápsula respectivos (1000, NGE30, EG327, BZ157, NGH38) (tabla 4). Las cepas 1000, NGE30, EG327 no eran típicas mediante AcM y el LPS de estas cepas carecía de PEtn en HepII del núcleo interno. BZ157, que correspondía al inmunotipo L2 mediante los AcM contenía PEtn en el núcleo interno, y por analogía a L2 en la posición 6/7 de HepII (tabla 3). NGH38 era el inmunotipo L2, L5 y se observó que era análogo a L2 mediante análisis estructural. Aquellas cepas no tipificables no reaccionaron con los AcM que reconocen L3, 7, 9, L6, L2, 5, L4, 6, 9. Sin embargo, 15/17 cepas de *Neisseria meningitidis* negativas para AcM B5 (todos los serogrupos) fueron positivas para L2, 5 y toda las cepas positivas para AcM B5 fueron positivas para L3, 7, 9. No se observó ninguna reacción con ningún AcM de inmunotipificación con 8/32 cepas negativas para AcM B5 y 24/68 cepas positivas para AcM B5.

ES 2 327 895 T3

Para determinar si el grado de sialilación del LPS era un factor en la capacidad del AcM B5 para reconocer su epítipo del núcleo interno, se examinaron cepas negativas para AcM B5 mediante geles de LPS. La reactividad del AcM B5 no se veía afectada variando el estado de sialilación a través de la exposición a neuraminidasa tal como se describe en los procedimientos (figura 6). Además, se encontró que la cepa MC58, con la que el AcM B5 reaccionaba fuertemente, estaba altamente sialilada (figura 6) y esto se confirmó mediante EM-ES de LPS O-desacilado purificado (datos no mostrados). Por tanto, estos datos no apoyan una contribución de la sialilación a la falta de reactividad del AcM B5.

Con respecto a las otras especies de *Neisseria*, el AcM B5 reconocía también el LPS del núcleo interno de cinco cepas de *Neisseria gonorrhoeae* (F62, MS11, FA19, 179008, 150002) (dos eran negativas) y (al menos) dos cepas de *Neisseria lactamica* (L19, L22). Sin embargo, el AcM B5 no reaccionaba con una cepa de cada una de *Neisseria polysaccharea* (M7), *Neisseria mucosa* (F1), *Neisseria cinerea* (Griffiss, J. M., J. P. O'Brien, R. Yamensaki, G. D. Williams, P. A. Rice y H. Schneider. 1987. Infect Immun 55: 1792-1800), *Neisseria elongata* (Q29), *Neisseria sicca* (Q39) y *Neisseria subflava* (U37). Además, el AcM B5 no reaccionaba con *Escherichia coli* (DH5 alfa), *Salmonella typhimurium* (LT2) o sus mutantes isogénicos de LPS (*rfaC*, *rfaI*, *rfaP*).

Finalmente, se investigó la reactividad del AcM B5 con 100 cepas que incluían representantes de los serogrupos A, B, C, W, X, Y y Z (Maiden, M. C. J., *et al.*, 1998. PNAS 95: 3140-3145). De estas cepas, el 70% eran positivas para AcM B5. La agrupación según la relación genética era evidente. Por ejemplo, ninguna de las cepas negativas para AcM B5 estaba en el complejo ET5. Entre las cepas del grupo A, las cepas positivas y negativas para AcM B5 entraron también en distintas agrupaciones. Por ejemplo, los linajes I-III y el linaje A4 eran positivos y el linaje IV-I era negativo. Esta colección, junto con la descrita en (Seiler, A., *et al.*, 1996. Mol Microbiol 19: 841-856) representa el conjunto más completo disponible para linajes hiperinvasivos conocidos en todos los serogrupos principales de cepas de *Neisseria meningitidis*.

25

Discusión y conclusiones

Los requisitos previos para cualquier vacuna candidata del grupo B de *Neisseria meningitidis* serían que contiene un(os) epítipo(s) altamente conservados que se encuentra(n) en todas las cepas del grupo B y es/son accesibles a anticuerpos en presencia de la cápsula. Este enfoque ha combinado genética, análisis estructural e inmunobiología para definir epítopos candidatos en el LPS del núcleo interno del grupo B del grupo B de *Neisseria meningitidis*. Este estudio usa AcM B5 murino, isotipo IgG3, que se produjo frente a un mutante *galE* de inmunotipo L3 definido genéticamente con el fin de dirigirse específicamente a los epítopos de LPS del núcleo interno. El/los epítipo(s) reconocido(s) por el AcM B5 se definió/definieron mediante estudios de reactividad cruzada con glicofomas de LPS purificadas de estructura conocida. El AcM B5 reconocía todas las glicofomas de LPS en las que la PEtn está en la posición 3 de HepII (inmunotipos L1, L3, L7, L8 y L9) y no reaccionaba con inmunotipos en los que PEtn está en la posición 6 ó 7 (L2, L4 y L6) o está ausente de HepII (L5) (figura 1). El AcM B5 reaccionaba con el 70% de las cepas de *Neisseria meningitidis* sometidas a prueba a partir de los dos conjuntos más completos de cepas de *Neisseria meningitidis* disponibles en todo el mundo (Seiler, A., *et al.*, 1996. Mol Microbiol 19: 841-856, 35). De estas cepas, el 76% de las cepas del grupo B de *Neisseria meningitidis* sometidas a prueba eran positivas con AcM B5 y el 70% de una colección que incluía todos los serogrupos de *Neisseria meningitidis* sometidos a prueba era positivo con AcM B5. Por tanto, puede preverse que una vacuna que contiene un número limitado de glicofomas, representando todas las posibles posiciones de PEtn (ninguna, 3 y 6/7) en HepII en el núcleo interno, cubriría el 100% de las cepas del grupo B de *Neisseria meningitidis*.

45

Las estructuras de LPS de cepas negativas para AcM B5 se confirmaron mediante análisis estructural. Se reconocieron dos variantes estructurales. Una variante sin PEtn en el LPS del núcleo interno (por ejemplo NGE30, EG327, 1000); y la otra, con un grupo PEtn de HepII (por ejemplo BZ157, NGH38) en la posición 6 ó 7 en lugar de en la posición 3.

50

Con vistas a desarrollar epítopos de LPS del núcleo interno como candidatos de vacuna, es significativo que no había ningún efecto de la cápsula sobre la accesibilidad al AcM B5, tal como se muestra mediante la localización conjunta del anticuerpo anti-cápsula y el AcM B5 en microorganismos de tipo natural (MC58) hechos crecer *in vitro* e *in vivo* mediante microscopía confocal (figuras 5a y b). Ni la presencia ni la ausencia de ácido siálico tuvo un efecto puesto que las cepas tanto positivas como negativas para AcM B5 tenían estados de alta sialilación tal como se muestra mediante geles de tricina (figura 6) y se confirma mediante EM-ES (datos no mostrados).

55

En este estudio no hubo ninguna evidencia de la variación de fase en las cepas positivas o negativas para AcM B5, con la excepción de una cepa (BZ157) que tenía un nivel muy bajo de cepas positivas para AcM B5 en el original y el mutante *galE* (0,06%) (datos no mostrados). Actualmente se está investigando el análisis estructural de LPS extraído de estas dos variantes.

60

Modelos de llenado de espacios tridimensionales del LPS del núcleo interno de los inmunotipos L3 y L4 muestran que la posición de la PEtn, posición o bien 3 o bien 6 respectivamente (mostrada en marrón), altera la accesibilidad y la conformación de PEtn en el epítipo del núcleo interno (figura 3). El ejemplo más sorprendente de la importancia de PEtn para la reactividad del AcM B5 se observó cuando se eliminaba PEtn del inmunotipo L8 (positivo para AcM B5) mediante tratamiento con fluoruro de hidrógeno (HF) lo que suprimía totalmente la reactividad del AcM B5.

65

Estudios previos con conjugados de oligosacárido en ratones y conejos han demostrado que la PEtn es importante en la inmunogenicidad y la actividad funcional de los anticuerpos policlonales (Verheul, A. F., *et al.*, 1991. *Infect Immun* 59: 843-851). Estos estudios identificaron dos conjuntos de anticuerpos policlonales. Un conjunto que resulta de oligosacáridos de L1 y L3, 7, 9 tenía PEtn en la posición 3 de HepII, era inmunogénico, tenía actividad opsonofagocítica (OP) y quimioluminiscencia en una reacción de explosión oxidativa, pero no tenía actividad bactericida en suero. El otro conjunto de anticuerpos que resulta de conjugados de L2 (posición 6 ó 7 o sin PEtn en HepII) era escasamente inmunogénico y tenía una quimioluminiscencia y una actividad de OP enormemente reducidas (Verheul, A. F., A. K. Braat, J. M. Leenhouts, P. Hoogerhout, J. T. Poolman, H. Snippe y J. Verhoef. 1991. *Infect Immun* 59: 843-851). Estudios futuros considerarán la seguridad y la inmunogenicidad de conjugados de LPS del núcleo interno (PEtn en la posición 3 de HepII y glicofomas alternativas) y la capacidad funcional de estos anticuerpos policlonales en ensayos opsonicos y bacterianos en suero, inicialmente en ratones y conejos. Estudios preliminares que usan AcM B5 en un ensayo de opsonofagocitosis con la cepa MC58 de *Neisseria meningitidis* y células polimorfonucleares humanas de donante sugieren que AcM B5 es opsonico en presencia del complemento y que la captación de bacterias de *Neisseria meningitidis* está correlacionada con una reacción de explosión oxidativa dentro del neutrófilo. El AcM B5 no parece tener ninguna actividad bactericida en suero significativa con la cepa MC58 de *Neisseria meningitidis*, sin embargo esto no se espera en vista de su isotipo (IgG3). Actualmente se está investigando adicionalmente la funcionalidad del AcM B5.

En conclusión, el AcM B5 reconoce un epítipo conservado del núcleo interno en el que la PEtn está en la posición 3 de HepII. Este epítipo estaba presente en el 76% de las cepas del grupo B de *Neisseria meningitidis* y en el 70% de todos los serogrupos de *Neisseria meningitidis*, y era accesible en presencia de la cápsula. Se ha identificado un número limitado de glicofomas alternativas que no se reconocen por el AcM B5 en las que la PEtn está o bien ausente o bien en una posición exocíclica de HepII. Por tanto, una vacuna que contiene un número limitado de glicofomas podría proporcionar un 100% de cobertura de todas las cepas del grupo B de *Neisseria meningitidis*.

TABLA 1

Cepas bacterianas

Especie	Cepa	Inmunotipo (negrita) y genotipo (cursiva) relevantes	Fuente/ referencia
<i>Neisseria meningitidis</i>	MC58	L3	Aislado de CSF

5			Virji, M., H. Kayhyt, D. J. P. Ferguson, J. E. Heckels y E. R. Moxon. 1991. Mol Microbiol 5: 1831-1841.
10			
15			
20	H44/76	L3	Holton, E. 1979. J Clin Microbiol 9: 186-188.
25			
30	MC58	<i>galE</i>	Jennings, M. P., P. van der Ley, K. E. Wilks, D. J. Maskell, J. T. Poolman y E. R. Moxon. 1993. Mol Microbiol 10: 361-369.
35			
40			
45			
	<i>Neisseria</i> <i>meningitidis</i>		
50	MC58	<i>lsil (rfaF)</i>	Jennings, M. P., M. Bisercic, K. L. Dunn, M. Virji, A. Martin, K. E. Wilks, J. C. Richards y E. R. Moxon. 1995. Microb Pathog 19: 391-407.
55			
60			
65			

ES 2 327 895 T3

5	MC58	<i>lgtA</i>	Jennings, M. P., D. W. Hood, I. R. Peak, M. Virji y E. R. Moxon. 1995. Mol Microbiol 18:729-740.
10			
15	MC58	<i>lgtB</i>	Jennings, M. P., D. W. Hood, I. R. Peak, M. Virji y E. R. Moxon. 1995. Mol Microbiol 18:729-740.
20			
25	H44/76	<i>rfaC</i>	Stolljokovic, I., V. Hwa, J. Larson, L. Lin, M. So y X. Nassif. 1997. FEMS Microbial Lett 151:41-49.
30			
35	H44/76	<i>icsA</i>	van der Ley, P., M. Kramer, A. Martin, J. C. Richards y J. T. Poolman. 1997. FEMS Microbiol Lett 146:247-253.
40			
45			

50 *Neisseria*
meningitidis

55

60

65

ES 2 327 895 T3

5	H44/76	<i>icsB</i>	van der Ley, P., M. Kramer, A. Martin, J. C. Richards y J. T. Poolman. 1997. FEMS Microbiol Lett 146:247-253.
10			
15	126E; 35E; H44/76; 89I; M981; M992 6155; 892257; M978; 120 M; 7880; 7889; 3200	L1-L12 RESPEC- TIVAMENTE	Poolman, J. T., C. T. P. Hopman y H. C. Zanen. 1982. FEMS Microbial Lett 13:339-348.
20			
25	BZ157	L2	Seiler, A., R. Reinhart, J. Sakari, D. A. Caugant y M. Achtman. 1996. Mol Microbiol 19: 841-856.
30			
35	BZ157 1000	<i>galE</i> NT	Este estudio Seiler, A Seiler, A., R. Reinhart, J. Sakari, D. A. Caugant y M. Achtman. 1996. Mol Microbiol 19: 841-856.
40			
45	1000	<i>galE</i>	Este estudio
50			
55			
60			
65			

ES 2 327 895 T3

5	NGE30	NT		Seiler, A., R. Reinhart, J. Sakari, D. A. Caugant y M. Achtman. 1996. Mol Microbiol 19: 841-856.
10				
15	NGE30	<i>galE</i>	Este estudio	
	<hr/>			
20	<i>Neisseria meningitidis</i>			
25	EG327	NT		Seiler, A., R. Reinhart, J. Sakari, D. A. Caugant y M. Achtman. 1996. Mol Microbiol 19: 841-856.
30				
35	EG327	<i>galE</i>	Este estudio	
40	NGH38	L2, 5		Seiler, A., R. Reinhart, J. Sakari, D. A. Caugant y M. Achtman. 1996. Mol Microbiol 19: 841-856.
45				
50	NGH38	<i>galE</i>	Este estudio	
55				
60				
65				

5 EG328 NT Seiler, A., R.
Reinhart, J.
Sakari, D. A.
Caugant y M.
10 Achtman. 1996.
Mol Microbiol 19:
841-856.

15 EG328 *galE* Este estudio
20 3906; NGH15; BZ133; B
Z83; EG329; SWZ107;
BZ198; NGH4
25 Seiler, A., R.
Reinhart, J.
Sakari, D. A.
Caugant y M.
Achtman. 1996.
Mol Microbiol 19:
30 841-856.

Neisseria
meningitidis

35

40

45

50

55

60

65

1; NG4/88; 2970; BZ
147; NGG40; N GH36;
5 NG3/88; NGF26;
NG6/88; NG H38;
10 NGE28; BZ169; 528;
DK353; BZ232; DK 24;
BZ159; BZ10; BZ163;
15 NGP20 B40; Z4024;
Z4081; Z24 91; Z3524;
Z3906; Z5826; BZ10;
20 BZ163; B6116/7 7;
L93/4286; NG3/88;
NG6/88; NGF2 6;
25 NGE31; DK24; 3906;
EG328; EG327; 10 00;
B534; A22; 71/94; 86
30 0060; NGG40; NGE28;
NGH41; 890326;
860800; NG4/88; E32;
35 44/76; 204 /92; BZ8;
SWZ107; NGH38;
40 DK353; BZ232; E26;
400; BZ198; 91/40;
NGH15; NGE30; 50/94;
45 88/03415; NGH36;
BZ147;
297-0
50 *Neisseria lactamica*
(L12, L13, L17, L18,
L19, L20, L22)
55 *polysaccharea*
(P4), *mucosa*
(M7), *cinerea*
60 (F1), *elongata* (18),
sicca (Q29), *subflava*

(35)

Brian Spratt &
Noel Smith

(U37)

Neisseria gonorrhoeae:

5 F62, MS11, FA19, FA10

90, 179008,

150002, 15253

10 SN-4

P9-2

15 *Haemophilus influenzae*

Tipo b

Eagan; 7004; Rd

20 5B33; 3Fe; E3Fi; E1B1

PLAK33

opsx

rfaF

orfH

lpxA

R. Goldstein

Staffan

Normavk

M. Virji

Hood, D. W., M.

E. Deadman, T.

Allen, H. Masoud,

A. Martin, J. R.

Brisson, R.

Fleischman, J. C.

Venter, J. C.

Richards y E. R.

Moxon. 1996.

Mol Microbiol

22:951-964.

Steeghs, L., R.

den Hartog, A.

den Boer, B.

Zomer, P. Roholl

y P. van der Ley.

1998. Nature

392:449-450.

50 *Haemophilus somnus*;

J. Richards

Neisseria

meningitidis

738 L1

J. Eskola

Neidardt, F. C.

55 *Haemophilus influenzae*

no tipificable

60 (NTHI): 54, 375, 477,

1003, 1008, 1042,

1996. Roy

Curtiss III, J. L.

Ingraham, E. C.

Lin, K. Brooks, B.

65

5	1147, 1231 <i>E. coli</i> DH5a		Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, S. M. y H. E. Umbarger (ed.), ASM Press.
10			
15	<i>Salmonella typhimurium</i> LT2	<i>rfaC</i> <i>rfaI</i> <i>rfaP</i>	Schnaitman, C. A. y F. D. Klena. 1993. 57:655- 682.

TABLA 2

25 *Reactividad del anticuerpo monoclonal B5 con cepas de Neisseria meningitidis representativas de los inmunotipos L1-L12 determinada mediante ELISA de células completas, transferencias puntuales de lisados, inmunofluorescencia y microscopía confocal*

30	Cepa	Serogrupo: Serotipo: Serosubtipo	Inmuno- tipo	ELISA de células completas ^a (DO A _{405nm})	Transferencia puntual ^b	Inmuno- fluorescencia ^c
35	126E	C:3:P1.5,2	L1	+ 1,8	+++	+
40	35E	C:20:P1.1	L2	- <0,4	-	-
	H44/76	B.15.P1.7,16	L3	+ 1,3	+++	++
45	89I	C:nt:P1.16	L4	-<0,4	-	-
	M98I	B:4:P1.-	L5	- <0,4	+/-	-
	M992	B:5:P1.7,1	L6	- <0,4	+/-	-
50	6155	B:nt:P1.7,1	L7	+0,8	++	+
	M978	B:8:P1.7,1	L8	+1,9	+++	++
	892257	B:4:P1.4	L8	+1,9		
55	120M	A:4:P1.10	L9	+ 1,8	+++	+
	7880	A:4:P1.6	L10	+ 2,2	+++	+
	7889	A:4:P1.9	L11	+ 2,0	+++	++
60	3200	A:4:P1.9	L12	+2,1	+++	++

^aReactividad positiva (DO_{A405} > 0,4) (+), reactividad negativa (DO_{A405} < 0,4) (-).

^bFuertemente positivo (+++), positivo (++) , débilmente positivo (+/-), negativo (-).

65 ^cFuertemente positivo (++), positivo (+), negativo (-).

ES 2 327 895 T3

TABLA 3

Correlación entre la reactividad con el anticuerpo monoclonal B5, inmunotipificación y localización de fosfoetanolamina (PEtn) en HepII del núcleo interno

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

Cepa	AcM B5	Inmunotipo*	Posición de PEtn en HepII	
			O-3	O-6
MC58	+	L3,7	+	-
1000	-	NT	-	-
NGE30	-	NT	-	-
EG327	-	NT	-	-
BZ157 ‡	-	L2,5	-	+
BZ157 §	+	L3,7	+	-
NGH38	-	L2,5	-	+

Abreviaturas:
 NT= no tipificable
 *MN4A8B2 (L3, 7, 9); MN42F12.32 (L2, 5); MN4C1B (L4, 6, 9); MN40G11.7 (L6).
 ‡BZ157 Variante negativa para AcM B5
 §BZ157 Variante positiva para AcM B5

ES 2 327 895 T3

TABLA 4

Datos de EM-ES de iones negativos y composiciones propuestas de LPS O-desacilado de cepas negativas para AcM B5 de Neisseria meningitidis del mutante deficiente en cápsula galE. Se usaron unidades de masa promedio para el cálculo del peso molecular basándose en la composición propuesta tal como sigue: Glc, 162,15; Hep 192,17; GlcNAc, 203,19; Kdo, 220,18; PEtn, 123,05

Cepa	Iones observados (m/z)		Masa molecular (Da)		
	(M-2H) ²⁻	(M-H) ⁻	Observado	Calculado	Lípido A ^b
1000	1213,0	2427,6	2427,7	2427,2	1075
	1252,9	2507,8	2507,8	2507,2	1155
	1314,5	2630,9	2630,9	2630,3	1278
NGH38	1293,8	2589,5	2589,3	2589,3	952
EG327	1151,2	2304,4	2304,4	2304,1	952
NGE30	1132,1	-	-	2265,1	1075
	1396,1	2793,4	2793,7	2792,5	1075
	1436,0	2873,7	2873,9	2872,5	1155
	1498,0	2997,2	2997,1	2995,6	1278
BZ157	1274,6	2551,4	-	2550,3	1075
	1314,8	2631,1	2631,2	2630,3	1155
	1376,4	2754,4	2754,5	2753,4	1278
	1457,5	2916,6	2916,6	2915,6	1278

^a Glc, glucosa; GlcNAc, N-acetilglucosamina; PEtn, fosfoetanolamina; Hep, heptosa; Kdo, ácido 3-desoxi-D-mano-octulosónico.

^b Tal como se determina mediante análisis de EM-EM.

ES 2 327 895 T3

TABLA 4 (continuación)

Composición propuesta ^a	
Cepa	
1000	2Glc, GlcNAc, 2Hep, 2 Kdo, Lípido A 2Glc, GlcNAc, 2Hep, 2 Kdo, Lípido A 2Glc, GlcNAc, 2Hep, 2 Kdo, Lípido A
NGH38	3Glc, GlcNAc, 2Hep, PEtn, 2Kdo, Lípido A
EG327	2Glc, GlcNAc, 2Hep, 2 Kdo, Lípido A
NGE30	Glc, GlcNAc, 2Hep, 2 Kdo, Lípido A 3Glc, 2GlcNAc, 2Hep, 2 Kdo, Lípido A 3Glc, 2GlcNAc, 2Hep, 2 Kdo, Lípido A 3Glc, 2GlcNAc, 2Hep, 2 Kdo, Lípido A
BZ157	2Glc, GlcNAc, 2Hep, PEtn, 2Kdo, Lípido A 2Glc, GlcNAc, 2Hep, PEtn, 2Kdo, Lípido A 2Glc, GlcNAc, 2Hep, PEtn, 2Kdo, Lípido A 3Glc, GlcNAc, 2Hep, PEtn, 2Kdo, Lípido A

^a Glc, glucosa; GlcNAc, N-acetilglucosamina; PEtn, fosfoetanolamina; Hep, heptosa; Kdo, ácido 3-desoxi-D-mano-octulosónico.

^b Tal como se determina mediante análisis de EM-EM.

Leyendas de las figuras - Ejemplo 1

Figura 1

Representación de la estructura de oligosacáridos de LPS meningocócicos de los inmunotipos L1-L9. Los inmunotipos están indicados en el extremo izquierdo. La línea de puntos vertical marca la unión entre las estructuras del núcleo interno a la derecha y estructuras del núcleo externo a la izquierda. El epítipo reconocido por AcM B5 se indica en **negrita** (positivo para AcM B5). Los números arábigos indican el enlace entre azúcares o amino-azúcares. Alfa y beta indican el enlace en el carbono 1 en el extremo no reductor del azúcar. Los genes para incorporar cada uno de los azúcares o amino-azúcares clave en el oligosacárido de LPS en la ruta biosintética se indican con flechas que indican en qué parte de la ruta se requiere el producto génico. Las abreviaturas incluyen: Kdo, ácido 2-ceto-2-desoxioctulosónico; PEtn, fosfoetanolamina; Gal, galactosa; GLcNAc, N-acetilglucosamina; Glc, glucosa; Hep, heptosa. El inmunotipo L5 no tiene ninguna PEtn en la segunda heptosa. El gen que añade la glucosa a la segunda heptosa (*IgtG*) es variable con respecto a la fase.

ES 2 327 895 T3

Figura 2

Reactividad cruzada de AcM B5 con inmunitipos y mutantes seleccionados de LPS O-desacilado (odA) y LPS de *Neisseria meningitidis* tal como se determina mediante ELISA en fase sólida. Glicoformas de LPS de los inmunitipos L2 (35E) (barras en negro), L3 (H44/76) (barras en blanco), L4 (891) (barras sombreadas con líneas diagonales), L5 (M981), L8 (M978) (barras sombreadas con líneas horizontales), mutantes de tipo natural y respectivos (*galE*, *lgtA* o *lgtB*), en una forma nativa u O-desacilada, se aplicaron sobre placas de ELISA (véase Procedimientos) y se determinó la reactividad del AcM B5 mediante ELISA convencional (DO_{A410 nm}).

10

Figura 3

Modelos moleculares en 3-D del llenado de espacios de los estados de mínima energía calculados (MMC) del oligosacárido del núcleo de mutantes *galE* de (a) L3, (b) L4 y (c) L8-desfosforilado. El resto de Kdo indicado en gris está sustituido en la posición O-5 con la unidad del núcleo interno de disacárido de heptosa (rojo). HepI proporciona el punto a través de un residuo de glucosa (verde oscuro) para la extensión para dar epítomos de cadena α , mientras que HepII está sustituido con residuo de N-acetilglucosamina (verde más claro) en O-2. PEtn (marrón) se muestra en la posición O-3 en el inmunitipo L3 y O-6 en el inmunitipo L4. Las versiones en color de esta y las otras figuras para el ejemplo 1 pueden encontrarse en Plested *et al.*, 1999 Infect. Immunity 67, 5417 - 5426.

20

Figura 4

Reactividad cruzada de AcM B5 con LPS de L3 modificado genéticamente y LPS de L8 modificado químicamente de *Neisseria meningitidis* tal como se determina mediante ELISA en fase sólida. Se aplicaron glicoformas de LPS del inmunitipo L8 (M978) (barras sombreadas con líneas horizontales) modificado químicamente mediante O-desacilación y tratamiento con HF y de los mutantes (O-desacilados) *galE*, *icsB*, *icsA*, *lsi*, PB4 del inmunitipo L3 (H44/76) (barras en blanco) sobre placas de ELISA (véase Procedimientos) y se determinó la reactividad del AcM B5 mediante ELISA convencional (DO_{A410 nm}).

30

Figura 5.a.

Microscopía confocal de inmunofluorescencia de microorganismos de *Neisseria meningitidis*, cepa MC58 adherente a células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC). (a) Marcaje con fluoresceína con anticuerpo policlonal de conejo específico para la cápsula de *Neisseria meningitidis* del grupo B. (b) Marcaje con rodamina del AcM B5, específico para LPS de *galE* (ampliación x2400). Microscopía confocal de inmunofluorescencia de microorganismos MC58 hechos crecer *in vivo* teñidos tal como se describe en Plested *et al.*, 1999 Infect. Immunity 67, 5417-5426. (c) Anticuerpo anti-capsular (verde). (d) AcM B5 (rojo) (ampliación x2400).

40

Figura 6

Geles de tricina teñidos con plata de preparaciones de LPS (10 μ g/carril) de cepas del grupo B de *Neisseria meningitidis* que no eran reactivas con el AcM B5. Estas preparaciones de LPS o bien no se trataron (-) o se trataron con (+) neuraminidasa para mostrar la presencia de ácido siálico: a) cepas negativas para AcM B5: carriles 1, 2 = NGE30; carriles 3, 4 = BZ157; carriles 5, 6 = EG328; carriles 7, 8 = 1000; carriles 9, 10 = 3906. b) Cepas negativas para AcM B5: carriles 1, 2 = EG327; carriles 3, 4 = NGH38; carriles 5, 6 = NGH15; cepas positivas para AcM B5: carriles 7, 8 = MC58. Presencia de ácido siálico (AcNeu) indicada mediante β -glucuronidasa. Esta banda se observó en preparaciones de neuraminidasa sin tratar (-) y se eliminó en preparaciones de neuraminidasa tratadas (+).

50

Ejemplo 2

55 Identificación de epítomos del núcleo interno adicionales

Introducción

El ejemplo 1 identifica un epítomo de LPS del núcleo interno que era accesible y que se conservaba en el 70% de una colección global de 104 cepas de *Neisseria meningitidis* representativas de todos los serogrupos principales (Plested *et al.*, 1999, Infect. Immunity 67, 5417 - 5426). El epítomo reconocido por AcM B5 se identificó en todos los inmunitipos de LPS con fosfoetanolamina (PEtn) en la posición 3 de heptosa de cadena β (HepII) del LPS del núcleo interno. Se llevó a cabo trabajo adicional para identificar epítomos adicionales, con los fines explicados en la figura 4.

65

En resumen:

Se desarrolló una serie de doce anticuerpos monoclonales (AcM) murinos en el NRC, usando un procedimiento descrito previamente (Plested *et al.*, 1999 Infect. immunity 67, 5417 - 5426), excepto por el uso de células completas

de *galE* de L4 (cepa 891) de *Neisseria meningitidis* fijadas con formalina. Se examinaron extensamente los doce AcM mediante ELISA usando LPS purificado a partir de cepas de tipo natural y mutantes de *Neisseria meningitidis* y se seleccionaron tres AcM B2 (IgG2b), A4 (IgG2a) y A2 IgG2a para su investigación adicional. Se evaluó la conservación del epítipo de LPS del núcleo interno en Oxford usando lisados de células completas de tipo natural de una colección global de 104 aislados de enfermedad por *Neisseria meningitidis* (Maiden, M. C. J., J. A. Bygraves, E. Feil, G. Morelli, J. E. Russell, R. Urwin, Q. Zhang, J. Zhou, K. Zurth, D. A. Caugant, I. M. Feavers, M. Achtman y G. B. Spratt. 1998. PNAS 95: 3140-3145). Se evaluó la accesibilidad del epítipo de LPS del núcleo interno usando microscopía de inmunofluorescencia con células completas de *Neisseria meningitidis* fijadas con etanol de tipo natural y mutantes adherentes a células epiteliales en monocapa (Plested *et al.* 1999).

Cada uno de los tres AcM reaccionaba con LPS de *galE* de L4 de *Neisseria meningitidis* purificado mediante ELISA. Excepto por el AcM B2 que tenía una baja reactividad con el LPS de L4 de *Neisseria meningitidis*, ninguno de la serie de AcM frente a L4 de *Neisseria meningitidis* podía reconocer LPS purificado a partir de L4 o L2 de tipo natural mediante ELISA. Ninguno de los AcM frente a L4 de *Neisseria meningitidis* reconocía células completas de L2 o L4 de tipo natural de *Neisseria meningitidis* mediante microscopía de inmunofluorescencia.

AcM B2 reaccionaba con 15/32 cepas de *Neisseria meningitidis* negativas para AcM B5 de *Neisseria meningitidis* y 9/68 cepas de *Neisseria meningitidis* positivas para AcM B5 de *Neisseria meningitidis* mediante análisis de transferencia puntual de células completas. AcM 2 reaccionaba con LPS de *galE* de L4, de *galE* de tipo natural de L4 (reactividad muy baja) pero no *galE* de L3, de *galE* de L2 (nativo/O-desacilado (odA)), de tipo natural de L2 (nativo-odA), de tipo natural de L5, L6.

AcM A2 reconocía 28/32 cepas de *Neisseria meningitidis* negativas para AcM B5 de *Neisseria meningitidis* y 20/68 cepas de *Neisseria meningitidis* positivas para AcM B5 de *Neisseria meningitidis* mediante análisis de transferencia puntual de células completas. AcM A2 reaccionaba con LPS de *galE* de L4 (nativo/odA), de *galE* de L2 (nativo) pero no de *galE* de L3, de *galE* de L2 (odA), de tipo natural de L2 (nativo/odA), de tipo natural de L4, L5, L6.

AcM A4 reaccionaba con 29/32 cepas de *Neisseria meningitidis* negativas para AcM B5 de *Neisseria meningitidis* y 24/68 cepas de *Neisseria meningitidis* positivas para AcM B5 de *Neisseria meningitidis* mediante análisis de transferencia puntual de lisados de células completas. AcM A4 reaccionaba con LPS de *galE* de L4, de *galE* de L2 (nativo/odA), pero no de *galE* de L3, de tipo natural de L2, de tipo natural de L4, L5, L6, L8.

Basándose en estos resultados, se seleccionó AcM A4 (IgG2a) para un estudio adicional ya que demostraba especificidad tanto por LPS de *galE* de L4 como por LPS de *galE* de L2 mediante ELISA y reconocía todas menos 3 cepas de *Neisseria meningitidis* negativas para B5 de *Neisseria meningitidis* (BZ232 serogrupo B; NGH38 serogrupo B; F1576 serogrupo C). Los AcM B5 y A4 juntos podían reconocer 97/100 aislados de *Neisseria meningitidis*. La microscopía de inmunofluorescencia demostró que AcM A4 podía acceder al epítipo del núcleo interno en un mutante *galE* de L4 en presencia de la cápsula.

Se han identificado epítipos del núcleo interno de LPS con PEtn en la posición 3 de HepII (AcM B5) o no en la posición 3 (AcM A4). Sigue habiendo 3 cepas de 100 (BZ232, NGH38 y F1576) que no muestran reactividad ni con AcM A4 ni con AcM B5. Se está investigando la base estructural para esta no reactividad. Una vez que se conocen todas las glicofomas variantes del núcleo interno, de las que se han identificado al menos 3, existirán fundamentos para incluir epítipos, representativos de todas las cepas de *Neisseria meningitidis* que provocan una enfermedad invasiva, en una vacuna conjugada. Ésta se someterá a prueba en principio usando estudios en animales antes proceder a ensayos en seres humanos.

Se usaron las siguientes técnicas:

- (1) Se produjo AcM A4 murino (IgG2a) frente a *galE* (89I, inmunotipo L4) y se seleccionó basándose en la reactividad en ELISA y microscopía de inmunofluorescencia (IF) de LPS.
- (2) ELISA de LPS (Plested *et al.*, 2000 J. Immunol. Meth. 237:73-84): se lavaron placas de microtitulación (Nunc) revestidas de LPS (*galE*) purificado (10 µg/ml) durante la noche, se bloquearon, se incubaron con AcM durante 1 h, se lavaron y se detectaron con IgG anti-ratón - fosfatasa alcalina y p-NPP (DO_{A405 nm}).
- (3) Inmunotransferencia usando lisados de células completas de 104 cepas de *Neisseria meningitidis* (Plested *et al.*, 1999 IAI 67: 5417-5426). Se detectó AcM A4 usando IgG anti-ratón - fosfatasa alcalina y BCIP/NBT.
- (4) Microscopía de inmunofluorescencia: tal como anteriormente (Plested *et al.*, 1999 IAI 67:5417-5426) o *Neisseria meningitidis* eran adherentes a la línea celular epitelial bucal humana en cultivo (16HBE140) en lugar de a HUVEC; se fijaron, se bloquearon, se incubaron con AcM A4 y entonces se detectó anticuerpo de serogrupo B anti-capsular usando anticuerpos secundarios marcados con fluorescencia (TRITC o FITC).
- (5) Análisis estructural fino de muestras de LPS O-desacilado purificado mediante EM-ES de iones negativos y RMN (Plested *et al.*, 1999 IAI 67:5417-5426).

*Resultados*1) *Accesibilidad del epítipo de LPS en células completas de Neisseria meningitidis*

5 Véase la figura 7.

AcM A4 accede al epítipo de LPS del núcleo interno en el mutante *galE* de L4 de *Neisseria meningitidis* en presencia de la cápsula (ampliación x 100). *galE* de L4 de *Neisseria meningitidis* adherente a células epiteliales (16HBE140) teñido con:

10

a. AcM A4 (anticuerpo anti-ratón - TRITC rojo);

b. anticuerpo anti-capsular B (anticuerpo anti-conejo - FITC verde);

15

c. tinción triple con AcM A4 (anticuerpo anti-ratón - TRITC rojo), anticuerpo anti-capsular B (anticuerpo anti-conejo - FITC verde) y células epiteliales teñidas con DAPI (azul).

AcM B5 accede a epítopos del LPS del núcleo interno en MC58 de L3 de *Neisseria meningitidis* (ampliación x 2400). MC58 de L3 de *Neisseria meningitidis* adherente a HUVEC teñidas con d. AcM B5 (anticuerpo anti-ratón - TRITC rojo), e. anticuerpo anti-capsular B (anticuerpo anti-conejo - FITC verde) usando microscopía confocal de inmunofluorescencia.

20

2) *Conservación del epítipo de LPS a través de todos los serogrupos de Neisseria meningitidis*

25

Véase la figura 8.

El AcM A4 (sombreado en diagonal) y el AcM B5 (líneas horizontales) reconocen juntos todas las cepas de *Neisseria meningitidis* mediante inmunotransferencia con lisados de células completas, excepto 3 cepas (flechas negras) que se están analizando adicionalmente. Se construyó el dendrograma de la relación genética de las cepas de *Neisseria meningitidis* de una colección global mediante un análisis de conglomerados siguiendo tipificación de secuencias multilocus (MLST) (Maiden *et al.*, 1998 PNAS 95:3140-3145).

30

3) *Estructura de LPS definida genéticamente*

35

Véase la figura 3.

Los detalles de la estructura de LPS fina demuestran efectos conformacionales de PEtn sobre el epítipo presentado. Modelos moleculares en 3-D del llenado de espacios de (Metropolis Monte Carlo) los estados de mínima energía calculados del LPS del núcleo de mutantes *galE* a. L3; b. L4; c. L8 (desfosforilado). Kdo en gris, heptosa (Hep) en rojo, glucosa (Glc) y glucosamina (GlcNAc) en verde claro y más oscuro, (PEtn) en marrón.

40

45 *Conclusiones*

Se han identificado glicofomas del núcleo interno con PEtn en la posición 3 de HepII, una posición exocíclica de Hep II o ausente. Este estudio ha indicado que la utilización de AcM A4 junto con AcM B5 permite que se reconozca el 97% de las cepas meningocócicas. Estos estudios indican por tanto que el LPS del núcleo interno puede tener potencial como vacuna de serogrupo B de *Neisseria meningitidis*.

50

Ejemplo 3

55 *Estudios sobre la actividad funcional del anticuerpo monoclonal, AcM B5, y anticuerpos frente al lipopolisacárido del núcleo interno (galE) en suero humano usando un ensayo de opsonofagocitosis, un ensayo bactericida en suero y un modelo de protección pasiva in vivo*

Introducción

60

Se ha generado un anticuerpo monoclonal, AcM B5. Este anticuerpo puede acceder a las estructuras del LPS del núcleo interno en *Neisseria meningitidis* en presencia de la cápsula y está conservado en el 70% de una colección representativa de *Neisseria meningitidis* de todas las cepas y el 76% de las cepas del serogrupo B (Plested, J. S. *et al.* (1999) Infect. & Immun. 67 (10): 5417-5426).

65

Hasta ahora no se sabía si los anticuerpos en una infección humana natural pueden ser específicos para el epítipo para el AcM B5 y tienen actividad funcional.

ES 2 327 895 T3

Se ha demostrado que el AcM B5 tiene actividad opsonica y bactericida contra el mutante *galE* y capacidad para proteger de manera pasiva a las ratas lactantes frente a la exposición al mutante *galE* de *Neisseria meningitidis* usando un modelo *in vivo*.

5

Procedimientos

- 10 (1) *Ensayo de opsonofagocitosis (OP)* (Plested *et al.*, 2000b): En resumen, se opsonizaron el mutante *galE* o MC58 de *Neisseria meningitidis* fijado con etanol marcado con fluorescencia o perlas revestidas de LPS de *galE* purificado (10 $\mu\text{g/ml}$) con el AcM B5 y se diluyó la fuente del complemento humano en tampón final durante 10 min./37°C/500 rpm en una placa de microtitulación. Entonces se diluyeron células polimorfonucleares de sangre periférica humana (PMN) preparadas a partir de sangre heparinizada de un donante en tampón final y se añadieron a cada pocillo (1 x 10⁷ células/ml) y se incubaron durante otros 10 min./37°C/500 rpm. Se detuvo la mezcla de reacción sobre hielo mediante la adición de 150 μl de PBS-EDTA y se añadió a un tubo de FACS que contenía 50 μl de azul trípango. Se mezcló la mezcla y se analizaron y 10.000 linfocitos en un FACScan y con software Cellquest. Se analizaron las PMN mediante FSC frente a los canales apropiados para determinar el % de captación de bacterias fluorescentes por los granulocitos y monocitos (% de actividad de OP).
- 20 (2) El procedimiento de *ensayo bactericida en suero (SB)* se adaptó del protocolo de CDC excepto en que se añadió AcM B5 a diluciones de sueros reunidos humanos y 1000 ufc de la cepa de *Neisseria meningitidis* y el tiempo de incubación fue de 40-45 min. a 37°C. En resumen, se hicieron crecer bacterias en agar BHI durante la noche a partir de disoluciones madre congeladas. Se midió una suspensión de bacterias en PBS-B a DO₂₆₀ (1:50 en SDS al 1%, NaOH al 0,1%). Usando una placa de microtitulación de 96 pocillos, se añadieron 50 μl de tampón a los pocillos en las columnas 2-7. Se añadieron 50 μl de sueros reunidos humanos sin complemento al 80% a los pocillos de la columna 8. Se añadieron 100 μl de los sueros reunidos al 80% a los pocillos en la columna 1. Se añadieron diluciones en serie de dos veces del anticuerpo a las columnas 1-7 (desechando los últimos 50 μl de la columna 7). Se añadieron 50 μl de la suspensión bacteriana diluida para dar 1000 ufc en 50 μl a los pocillos de las columnas 1-8. Se incubó la mezcla durante 40-45 minutos y se sembró en placa en agar BHI para su incubación durante la noche. Se contó el número de colonias en cada placa y se expresaron los resultados como un % de ufc/ml en el pocillo control sin complemento.
- 35 (3) *Modelo de protección pasiva in vivo* usando el modelo de ratas lactantes Wistar de 5 días de edad. Este modelo era tal como se describe por Moe, G. R., *et al.*, 1999. Infect. Immun. 67: 5664-5675, excepto en que se usaron dosis más altas de bacterias de *Neisseria meningitidis* y se usó una cepa diferente de *Neisseria meningitidis*. En resumen, se aleatorizaron grupos de ratas lactantes de 5 días de edad con las madres, se pesaron y se les administró un inóculo de mutante de *galE* de *Neisseria meningitidis* 1 x 10⁸ ufc/ml mezclado 1:1 o bien con (i) ausencia de anticuerpo (PBS) (ii) AcM B5 purificado por afinidad (10 μg) (iii) AcM B5 purificado por afinidad (100 μg) (iv) AcM 735 (anticuerpo del grupo B anti-capsular) (2 μg). Se controlaron las ratas lactantes para detectar signos de infección y se tomaron muestras mediante sangrado de la vena de la cola a las 6 horas tras la infección. Se pesaron los animales y se tomó un sangrado terminal tras 24 h mediante punción cardiaca siguiendo una inyección de pentobarbital. Se sembraron en placa sangre pura y diluida inmediatamente sobre placas de BHI y se incubaron durante la noche. Se hizo un recuento de las placas al día siguiente para determinar la bacteriemia (ufc/ml) a las- 6 h y 24 h.
- 40 (4) *ELISA de LPS* (Plested *et al.*, 2000a). Se lavaron placas de microtitulación (Nunc) revestidas de LPS (*galE*) purificado (10 $\mu\text{g/ml}$) durante la noche, se bloquearon y se incubaron con AcM o sueros humanos durante 1 h, se lavaron y detectaron con IgG anti-ratón o anti-ser humano - fosfatasa alcalina y p-NPP (DO_{A405 nm}).
- 50 (5) *AcM B5 purificado por afinidad*. Se purificó el sobrenadante del cultivo usado del AcM B5 en una columna de proteína A-Sepharose y se eluyó con glicina pH 4,0, se neutralizó con Tris-HCl pH 9,0. Se sometieron a prueba las fracciones para detectar la reactividad en ELISA de LPS, se reunieron y se concentraron usando un filtro de Amicon. Se determinó la pureza mediante gel de SDS-PAGE y se determinó la concentración de proteína mediante DO y ensayo de proteínas.
- 55 (6) *Marcaje en superficie mediante FACS de bacterias de Neisseria meningitidis*
El procedimiento se adaptó de Moe *et al.*, (Moe, G. R., *et al.*, 1999. Infect Immun. 67: 5664-5675) excepto en que no se incluyó azida sódica en la etapa de tampón de bloqueo (Plested *et al.*, 2000b). Para preparar bacterias de *Neisseria meningitidis* marcadas (cepa MC58, *galE*), se hicieron crecer los microorganismos durante la noche mediante condiciones convencionales a 37°C sobre placas de agar BHI y se suspendieron con cuidado en PBS. Se ajustó la DO_{A260 nm} para dar la concentración requerida, por ejemplo 5 x 10⁹ microorg./ml. Se añadieron 100 μl de células bacterianas a cada tubo de FACS (5 x 10⁸ microorg.) y se añadió un volumen igual de sueros diluidos (1/100 AcM B5 en BSA al 1%/PBS). Se incubaron los tubos durante 2 horas a 4°C y se centrifugaron las células durante 5 minutos a 13.000 g. Se desechó el sobrenadante y se lavaron las células con 200 μl de BSA al 1%/PBS. Se añadieron 100 μl de anticuerpo de cabra anti-ratón F(ab)₂ conjugado con FITC (Sigma F2772), se diluyeron 1:100 en BSA al 1%/PBS y se incubaron
- 60
- 65

ES 2 327 895 T3

los tubos durante 1 hora a 4°C. Se centrifugaron las células a 13.000 g durante 5 minutos y se lavaron mediante la adición de 200 µl de BSA al 1%/PBS. Se desechó el sobrenadante y se suspendieron las células en formaldehído al 1% v/v. Se transfirieron las muestras a tubos de FACScan y se analizaron en el FACS.

5

Resultados

1) Relevancia clínica del epítipo para el AcM B5

10 Se presentan datos sobre los tres sueros emparejados tomados de lactantes temprano (agudos) y más tarde (convalecientes) durante la enfermedad meningocócica invasiva (IMD) confirmada mediante cultivo que resultaba de la infección con aislados de *Neisseria meningitidis* de los inmunitipos L1, L3 (reactivos con el AcM B5) (pacientes 1 y 2) y el inmunitipo L2 (no reactivo con el AcM B5) (paciente 3) (figura 10). Los aislados de *Neisseria meningitidis* para los pacientes 1, 2, 3 eran L1 (B nt p1.14), L3 (B 15 p1.7) y L2 (C2a p1.5) respectivamente. Los sueros emparejados del paciente 2 infectado con una cepa de *Neisseria meningitidis* que era reactiva con el AcM B5 mostraron un aumento en anticuerpos frente a LPS del núcleo interno específicos mediante ELISA entre la infección temprana y la tardía ($p = 0,03$, prueba de la t para datos emparejados de dos colas no significativa, IC del 95%, 0,09-90,8) (figura 10a). Los sueros del paciente 1 no mostraron ninguna diferencia significativa en el título de anticuerpos tomado de manera temprana y tardía durante IMD, pero el título de la muestra temprana estaba ya a un nivel alto (figura 10a). La falta de aumento puede reflejar un anticuerpo de afinidad más alta en la muestra del paciente convaleciente que no se detectaría en este ELISA. Sin embargo, en los sueros tanto del paciente 1 como del paciente 2 hubo un aumento casi significativo en la actividad funcional en los sueros de pacientes convalecientes en un ensayo de opsonofagocitosis con la cepa MC58 de tipo natural de L3 y células polimorfonucleares periféricas humanas ($p = 0,06$, prueba de la t para datos emparejados de dos colas, IC del 95%, 0,90-5,96) (figura 10b) (Plested *et al.*, 2000b). No hubo un aumento significativo en el título de anticuerpos específicos entre los sueros de pacientes agudos y convalecientes tomados del paciente 3 infectado con una cepa del inmunitipo L2 (no reactiva con el AcM B5) tal como se mide mediante ELISA (figura 10a). No hubo actividad funcional significativa en el ensayo de OP contra una cepa de tipo natural de L3 con sueros tomados del paciente 3 de manera temprana o tardía durante la IMD (figura 10b). Esto demuestra la relevancia clínica del epítipo para el AcM B5 *in vivo* y que los anticuerpos frente a LPS del núcleo interno específicos son funcionales *in vivo*. Figura 10. A. Títulos de anticuerpos mediante ELISA frente a LPS de *galE* de L3 (IgG) en sueros emparejados tomados de manera temprana y tardía de niños con enfermedad meningocócica invasiva.

35 B. % medio de fagocitosis de MC58 de *Neisseria meningitidis* con sueros emparejados tomados de manera temprana y tardía de niños con enfermedad meningocócica invasiva con células mononucleares de sangre periférica humana y complemento humano.

40 2) Pruebas que apoyan que el AcM B5 murino tiene actividad funcional en ensayos biológicamente relevantes y un modelo *in vivo*

(i) Ensayo de opsonofagocitosis

45 El ensayo de OP proporciona pruebas de que el AcM B5 tiene actividad opsónica contra el mutante *galE* y de tipo natural de *Neisseria meningitidis* y de que la actividad de OP es específica para el epítipo para el AcM B5.

50 Se demostró la especificidad de la reactividad del AcM B5 usando el MC58 de *Neisseria meningitidis* de tipo natural mediante estudios de inhibición. Se incubó previamente el AcM B5 con diferentes concentraciones de LPS purificado. Hubo una inhibición de respuesta a la dosis en la actividad de OP con MC58 de *Neisseria meningitidis* con concentraciones crecientes de LPS de *galE* añadido a AcM B5 (véase la figura 11 a).

55 Figura 11a. % medio de fagocitosis de MC58 de *Neisseria meningitidis* con el AcM B5 preincubado con concentraciones crecientes de LPS de *galE* o bien (i) reactivo con B5 o bien (ii) no reactivo con B5 con células polimorfonucleares de sangre periférica humana y complemento humano.

60 El AcM B5 tiene actividad de OP específica para cepas reactivas con el AcM B5 usando un par isogénico de cepas de tipo natural de *Neisseria meningitidis* (*Neisseria meningitidis* BZ157, serogrupo B) que son reactivas con el AcM B5 o no reactivas con el AcM B5. El AcM B5 tiene actividad opsónica con la cepa reactiva con el AcM B5 pero no con la cepa no reactiva con el AcM B5 (véase la figura 11b).

65 Figura 11b. % medio de fagocitosis del par de cepas isogénicas de tipo natural de *Neisseria meningitidis* (*Neisseria meningitidis* BZ157) que son o bien reactivas con el AcM B5 o bien no reactivas con B5 con AcM B5 como la opsonina con células mononucleares de sangre periférica humana y complemento humano.

El ensayo de OP demostró que la captación de las perlas revestidas de LPS de *galE* de L3 purificado opsonizado con el AcM B5 era significativamente mayor que la captación con perlas no revestidas. Esto demuestra la especificidad del AcM B5 por LPS de *galE* revestido sobre perlas (véase la figura 11c).

ES 2 327 895 T3

Figura 11c. % medio de fagocitosis de perlas de látex fluorescentes revestidas o bien de LPS purificado a partir del mutante *galE* de L3 (10 µg/ml) o bien no revestidas, en presencia del AcM B5 o de tampón final, con células mononucleares de sangre periférica humana y complemento humano.

5

(ii) Ensayo bactericida en suero

El ensayo SB proporciona pruebas de que el AcM B5 tiene actividad bactericida contra el mutante *galE* de *Neisseria meningitidis* en el ensayo SB en presencia de una fuente de complemento humano (véase Procedimiento).

10

Se comparó la sensibilidad del suero del mutante *galE* o bien sin anticuerpo o bien en presencia del AcM B5 (figura 12). Hubo un aumento de respuesta a la dosis en la actividad bactericida del mutante *galE* mostrado mediante el % de supervivencia en disminución, con un % de suero en disminución en presencia del AcM B5 en comparación con ausencia de anticuerpo. Figura 12. % medio de supervivencia del mutante *galE* de *Neisseria meningitidis* en presencia y ausencia del AcM B5 contra diluciones en serie de dos veces de suero reunido humano comenzando en el 40% tal como se detecta usando un ensayo bactericida en suero (véase Procedimientos).

15

(iii) Modelo de protección pasiva usando la rata lactante

20

Usando el modelo de ratas lactantes de 5 días de edad se ha demostrado que dos dosis del AcM B5 pueden reducir la bacteriemia frente a la exposición a 1×10^8 ufc/ml de mutante *galE* de MC58 de *Neisseria meningitidis* por vía i.p. en comparación con controles sin anticuerpos. Estos datos demuestran la capacidad del AcM B5 para proteger de manera pasiva frente a la exposición al mutante *galE* de MC58 de *Neisseria meningitidis* y están correlacionados con la actividad funcional del AcM B5 en los ensayos de OP y SB contra la misma cepa de *Neisseria meningitidis*.

25

Figura 13. Bacteriemia en media geométrica en la sangre de grupos de ratas lactantes de 5 días de edad 24 h tras la infección con 1×10^8 ufc/ml de mutante *galE* administrado simultáneamente con cualquiera de: (i) ausencia de anticuerpo (ii) AcM B5 (dosis de 10 µg); (iii) AcM B5 (dosis de 100 µg); (iv) AcM 735, un anticuerpo anti-capsular control positivo (dosis de 2 µg).

30

Estudios de unión a AcM B5

35

Se muestran pruebas adicionales de que AcM B5 reconoce tanto LPS de mutante *galE* como de tipo natural en los siguientes estudios de unión:

a) Análisis de inmunotransferencia de tipo Western

40

Se separó LPS purificado a partir de MC58 y mutante *galE* de *Neisseria meningitidis* de tipo natural en gel de tricina convencional y se sometió a inmunotransferencia en nitrocelulosa mediante procedimientos convencionales. Se sondó la inmunotransferencia con líquidos ascíticos de cultivo de AcM B5 (1:2000) durante la noche y se detectó usando IgG anti-ratón y sustrato BCIP/NBT. La inmunotransferencia demuestra la unión del AcM B5 a una banda de LPS de tipo natural de mayor peso molecular y una banda de LPS de *galE* de menor peso molecular en LPS de tipo natural. Esto demuestra que el AcM B5 puede acceder y unirse al LPS de tipo natural así como al LPS de *galE* truncado.

45

Figura 14. Inmunotransferencia de tipo Western que muestra LPS purificado a partir de MC58 y mutante *galE* de *Neisseria meningitidis* sondado con AcM B5 (fluido ascítico 1:2000) detectado usando IgG anti-ratón - fosfatasa alcalina y sustrato BCIP/NBT.

50

b) Datos de marcaje en superficie mediante FACS

55

Se comparó cuantitativamente la unión del AcM B5 a la cepa MC58 de tipo natural y al mutante *galE* (1×10^8 ufc/ml) usando marcaje en superficie con anticuerpo anti-ratón - FITC y se analizó mediante FACS.

La unión relativa del AcM B5 a MC58 de *Neisseria meningitidis* fue del 82,5% y al mutante *galE* de *Neisseria meningitidis* fue del 96,9%, lo que demuestra que, tal como se esperaba, la mayor unión era al mutante *galE* pero había todavía una unión significativa a la cepa MC58 de tipo natural.

60

Figura 15. Perfil de FACS que compara el marcaje en superficie de MC58 y mutante *galE* de *Neisseria meningitidis* vivas (5×10^8 microorg./ml) con AcM B5 (sobrenadante del cultivo 1:50) detectado usando IgG anti-ratón (marcado con FITC).

65

REIVINDICACIONES

1. Una vacuna para el tratamiento de una enfermedad producida por *Neisseria* patogénica, comprendiendo la vacuna un componente inmunogénico basado en el núcleo interno de un lipopolisacárido, LPS, de *Neisseria* y que puede provocar anticuerpos funcionales contra al menos el 50% de las cepas dentro de las especies de la *Neisseria* patogénica, en la que el componente inmunogénico es un epítipo en el núcleo interno de LPS, **caracterizada** por la presencia de un resto de fosfoetanolamina unido a la posición 3 en HepII del núcleo interno.

2. Una vacuna según la reivindicación 1, en la que dicho componente inmunogénico puede provocar anticuerpos funcionales contra al menos el 60% de las cepas dentro de las especies de la *Neisseria* patogénica.

3. Una vacuna según la reivindicación 2, en la que dicho componente inmunogénico puede provocar anticuerpos funcionales contra al menos el 70% de las cepas dentro de las especies de la *Neisseria* patogénica.

4. Una vacuna según cualquier reivindicación anterior, en la que el componente inmunogénico está libre de lipopolisacárido del núcleo externo.

5. Una vacuna según cualquier reivindicación anterior, en la que la especie de la *Neisseria* patogénica es *Neisseria meningitidis*.

6. Una vacuna según la reivindicación 5, en la que los anticuerpos se provocan por el componente inmunogénico en al menos el 50% de las cepas del grupo B de *Neisseria meningitidis*.

7. Una vacuna según la reivindicación 5, en la que los anticuerpos se provocan por el componente inmunogénico en al menos el 60% de las cepas del grupo B de *Neisseria meningitidis*.

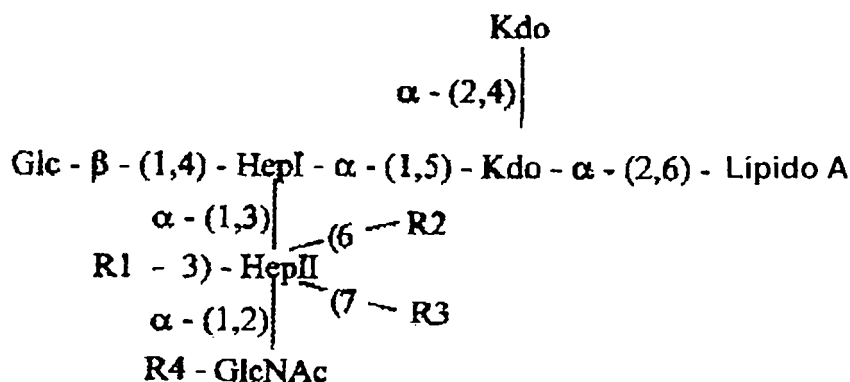
8. Una vacuna según la reivindicación 5, en la que los anticuerpos se provocan por el componente inmunogénico en al menos el 70% de las cepas del grupo B de *Neisseria meningitidis*.

9. Una vacuna según cualquier reivindicación anterior, en la que el componente inmunogénico comprende o está constituido por un epítipo que es una parte o la totalidad de la estructura del núcleo interno de un LPS de *Neisseria*, se deriva de este núcleo interno o es una versión sintética del núcleo interno.

10. Una vacuna según cualquier reivindicación anterior, en la que el componente inmunogénico es un epítipo en el núcleo interno de LPS que comprende un residuo de glucosa en HepI.

11. Una vacuna según cualquier reivindicación anterior, en la que el componente inmunogénico es un epítipo en el núcleo interno de LPS que comprende una N-acetilglucosamina en HepII del LPS del núcleo interno.

12. Una vacuna según cualquier reivindicación anterior, en la que el LPS del núcleo interno está constituido por un oligosacárido del núcleo interno unido al lípido A, con la fórmula general tal como se muestra:



en la que R1 es un sustituyente en la posición 3 de HepII y es hidrógeno o Glc- α -(1, o fosfoetanolamina; R2 es un sustituyente en la posición 6 de HepII y es hidrógeno o fosfoetanolamina; R3 es un sustituyente en la posición 7 de HepII y es hidrógeno o fosfoetanolamina, y R4 es acetilo o hidrógeno en la posición 3, la posición 4 o la posición 6 del residuo de GlcNAc, o cualquier combinación de los mismos; y en la que Glc es D-glucopiranososa; Kdo es ácido 3-desoxi-D-mano-2-octulosónico; Hep es L-glicero-D-mano-heptosa y GlcNAc es 2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiranososa.

ES 2 327 895 T3

13. Una vacuna según cualquier reivindicación anterior, en la que el componente inmunogénico es reactivo con el anticuerpo B5 producido por el hibridoma depositado con el número de acceso IDAC 260900-1.

5 14. Una vacuna que comprende al menos dos componentes inmunogénicos basados en el núcleo interno de un lipopolisacárido, LPS, de *Neisseria* y que puede provocar anticuerpos funcionales contra al menos el 50% de las cepas dentro de las especies de la *Neisseria* patogénica, incluyendo la vacuna un componente inmunogénico tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

10 15. Una vacuna según la reivindicación 14, en la que dichos componentes inmunogénicos provocan anticuerpos funcionales en al menos el 85% de las cepas dentro de las especies de la *Neisseria* patogénica.

16. Una vacuna según la reivindicación 15, en la que dichos componentes inmunogénicos provocan anticuerpos funcionales en al menos el 95% de las cepas dentro de las especies de la *Neisseria* patogénica.

15 17. Una vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en la que un componente inmunogénico es reactivo con el anticuerpo A4 producido por el hibridoma depositado con el número de acceso IDAC 260900-2.

20 18. Una vacuna según cualquier reivindicación anterior, en la que el elemento inmunogénico de la vacuna es un epítipo accesible en la bacteria en presencia de cápsula bacteriana.

19. Una vacuna según cualquier reivindicación anterior, que comprende uno o más componentes inmunogénicos que pueden estimular anticuerpos que son opsónicos.

25 20. Una vacuna según cualquier reivindicación anterior para el tratamiento de *Neisseria meningitidis*.

21. Una vacuna según la reivindicación 20 para el tratamiento del grupo B de *Neisseria meningitidis*.

30 22. Una vacuna según cualquier reivindicación anterior para la prevención de meningitis, septicemia o neumonía u otra manifestación de enfermedad sistémica o local producida por *Neisseria meningitidis*.

35 23. Una vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 para el tratamiento de uretritis, salpingitis, cervicitis, proctitis, faringitis, enfermedad inflamatoria pélvica u otra manifestación de enfermedad sistémica o local producida por *Neisseria gonorrhoeae*.

40 24. Una vacuna según cualquier reivindicación anterior que es una vacuna conjugada.

25. Una vacuna según cualquier reivindicación anterior, que se deriva de una *Neisseria* comensal.

45 26. Una vacuna según la reivindicación 25, en la que la *Neisseria* comensal es *Neisseria lactamica*.

27. Un anticuerpo reactivo con un componente inmunogénico tal como se define en cualquier reivindicación anterior.

50 28. Un anticuerpo según la reivindicación 27, estando el anticuerpo humanizado o adaptado de otra forma para mejorar la idoneidad para su administración a un ser humano.

29. Un anticuerpo según la reivindicación 27, que puede obtenerse a partir del hibridoma depositado con el número de acceso IDAC 260900-1 que produce el anticuerpo B5.

55 30. Un hibridoma depositado con el número de acceso IDAC 260900-1 que produce el anticuerpo B5.

31. Una preparación farmacéutica que comprende un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 27 a 29 en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

60 32. El uso de una vacuna según cualquiera de la reivindicación 1 a 26 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de infección por *Neisseria*.

33. El uso de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 27 a 29 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de infección por *Neisseria*.

65 34. Un procedimiento para la identificación de epítipos inmunogénicos de cepas de una especie de *Neisseria*, comprendiendo el procedimiento las etapas de generar anticuerpos frente al núcleo interno de LPS de una bacteria de *Neisseria*, mediante la inoculación de un organismo huésped con una cepa de mutante *galE* de *Neisseria meningitidis*, y someter a prueba tales anticuerpos contra una cepa de *Neisseria meningitidis* de tipo natural para identificar aquellos anticuerpos que son reactivos y para los que los epítipos son por tanto accesibles, en el que epítipo en el núcleo interno de LPS está **caracterizado** por la presencia de un resto de fosfoetanolamina unido a la posición 3 en HepII del núcleo interno.

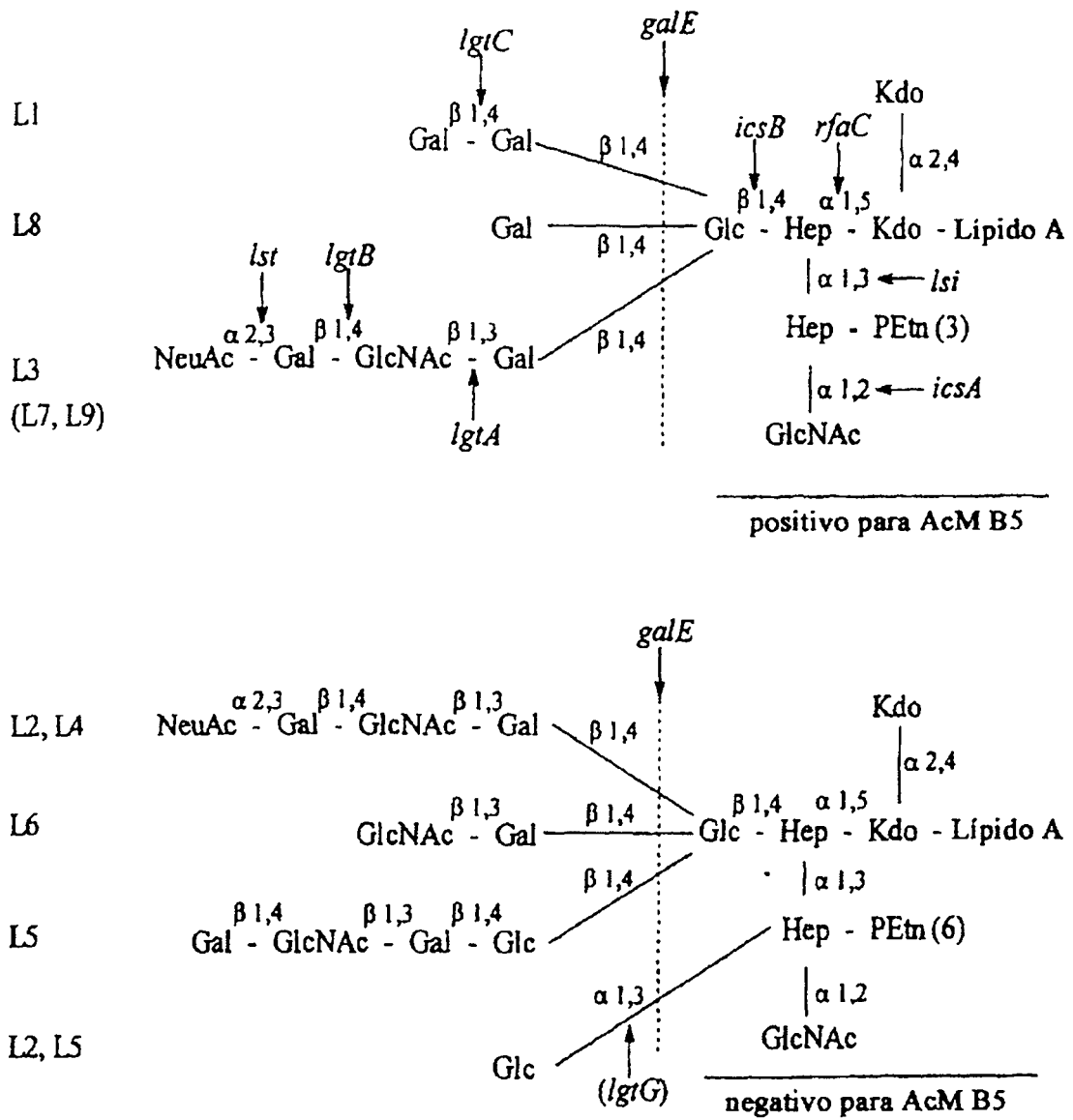


Fig. 1

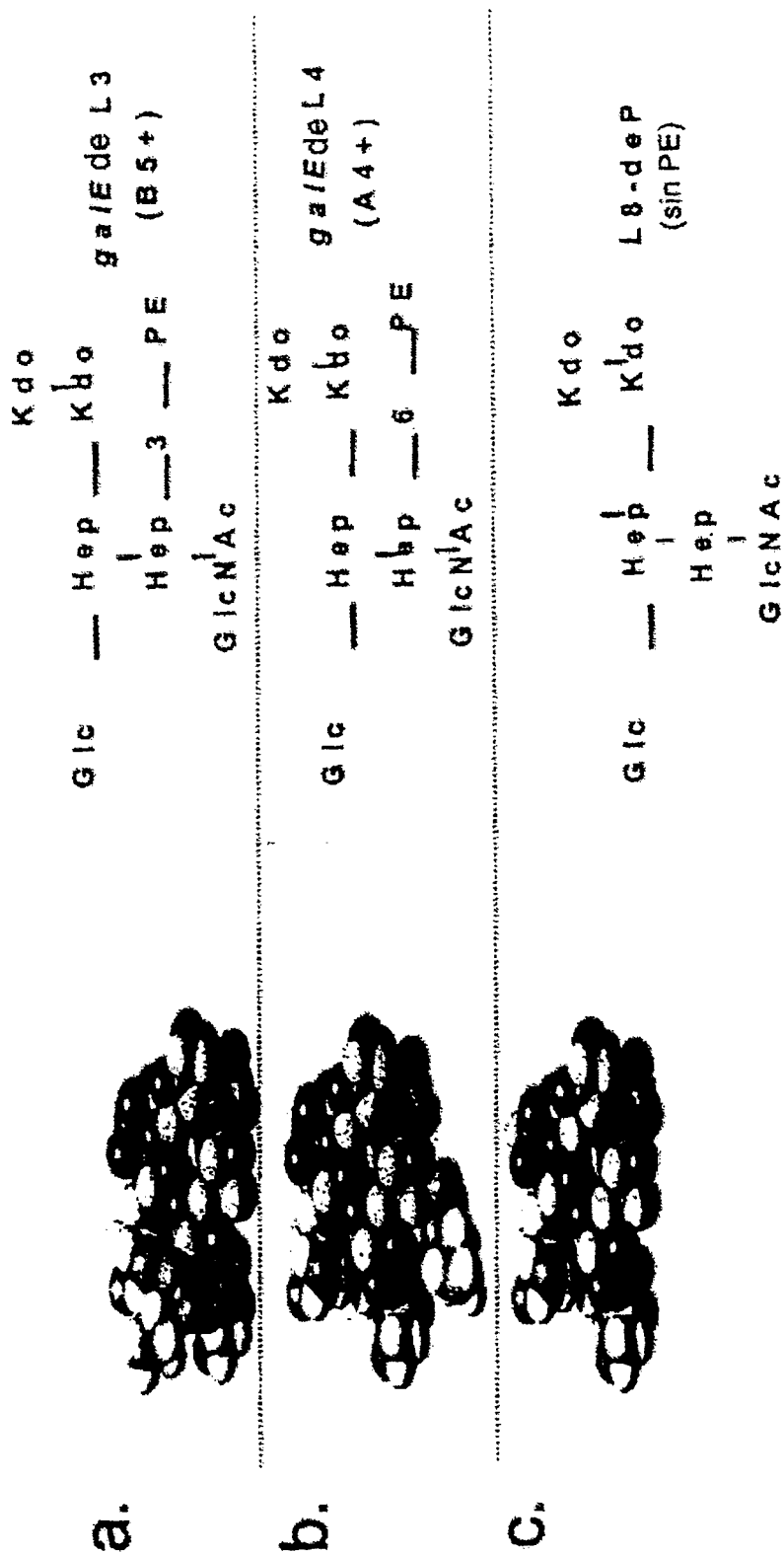


Fig. 3

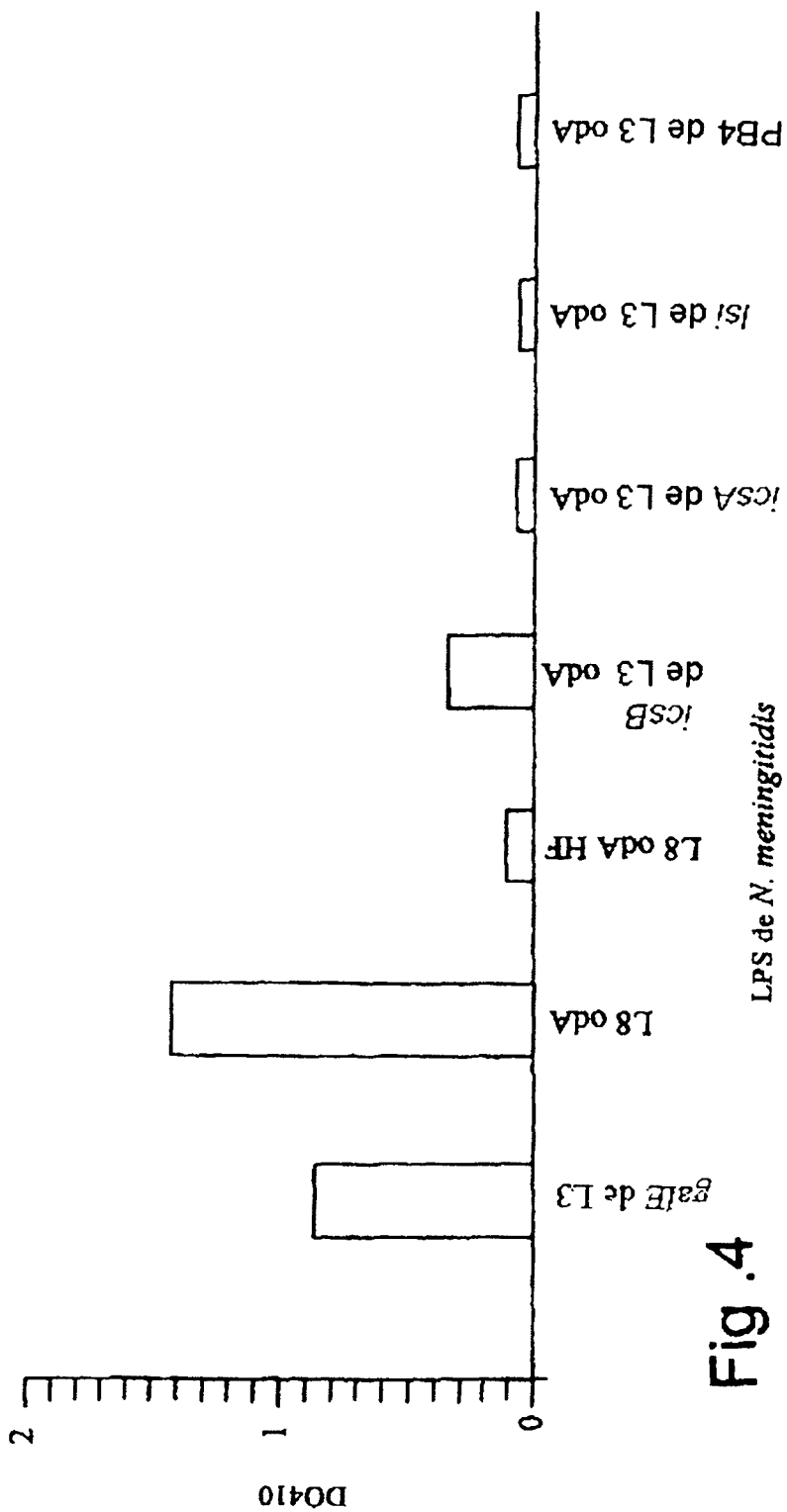


Fig. 4

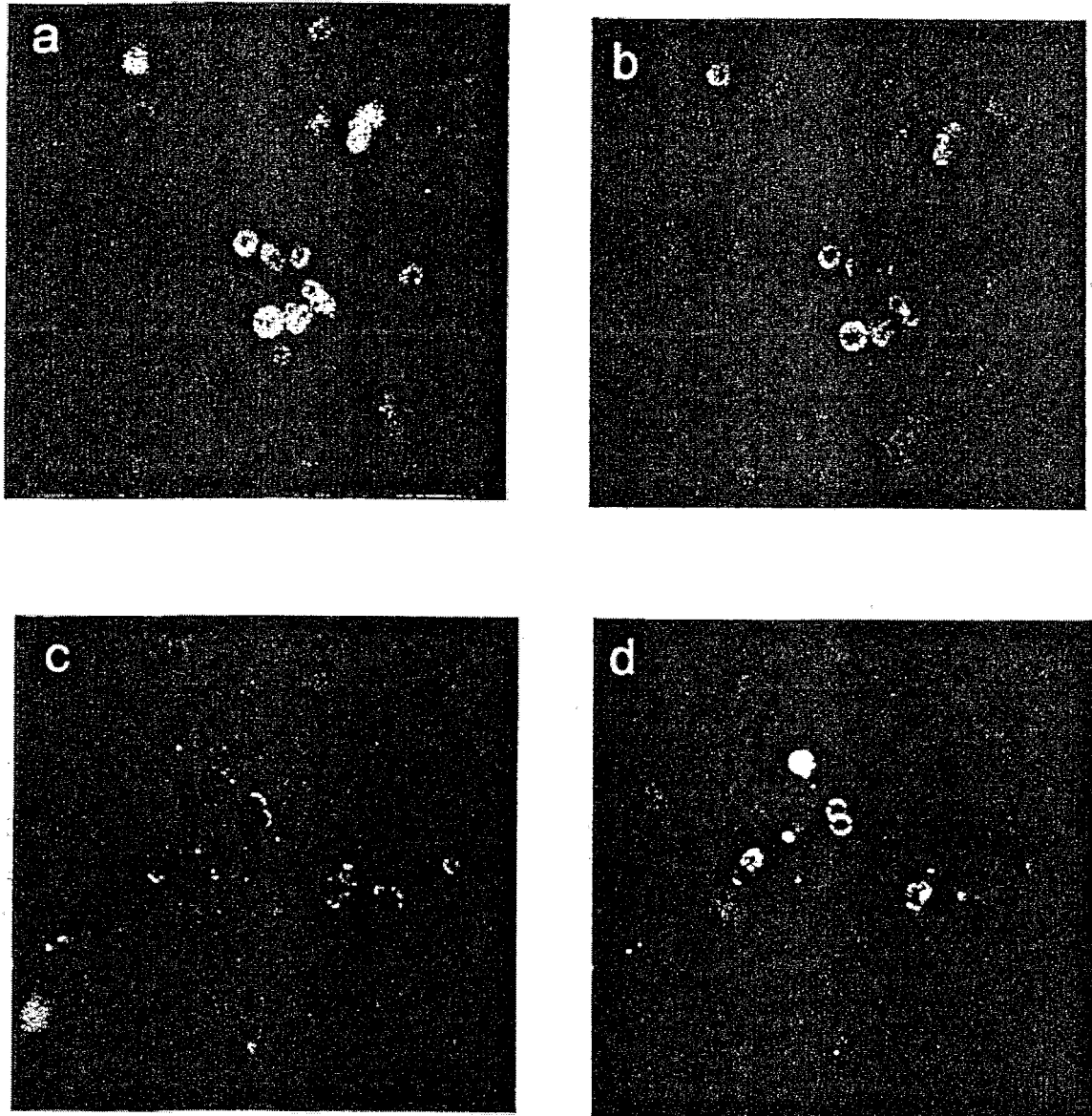


Fig. 5

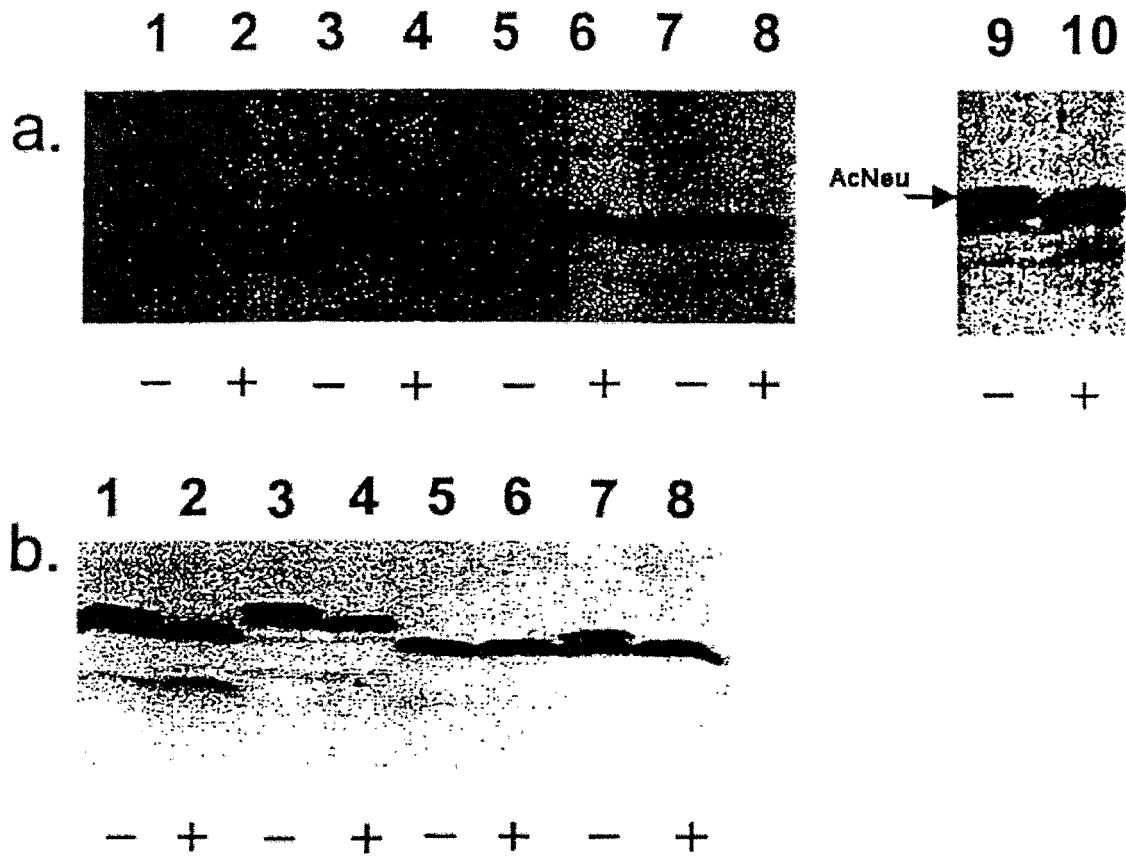


Fig. 6

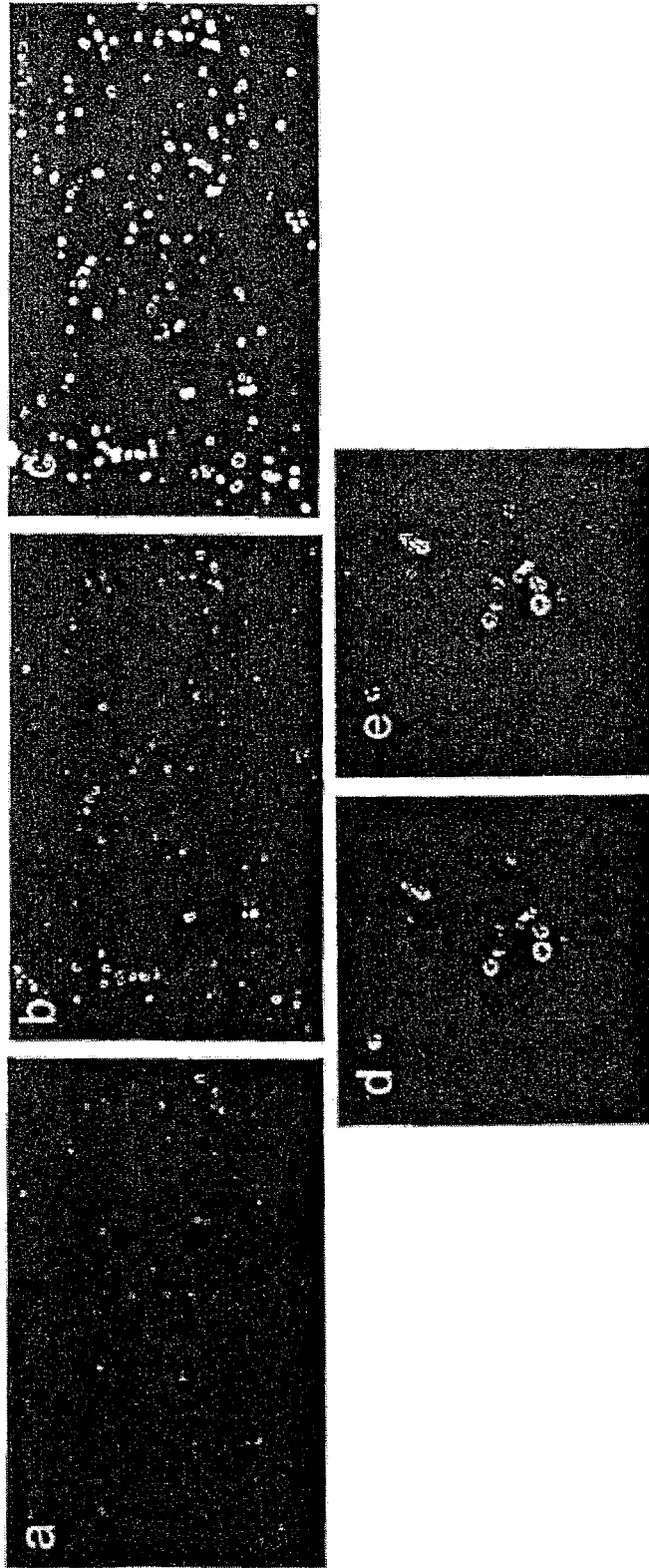


Fig. 7

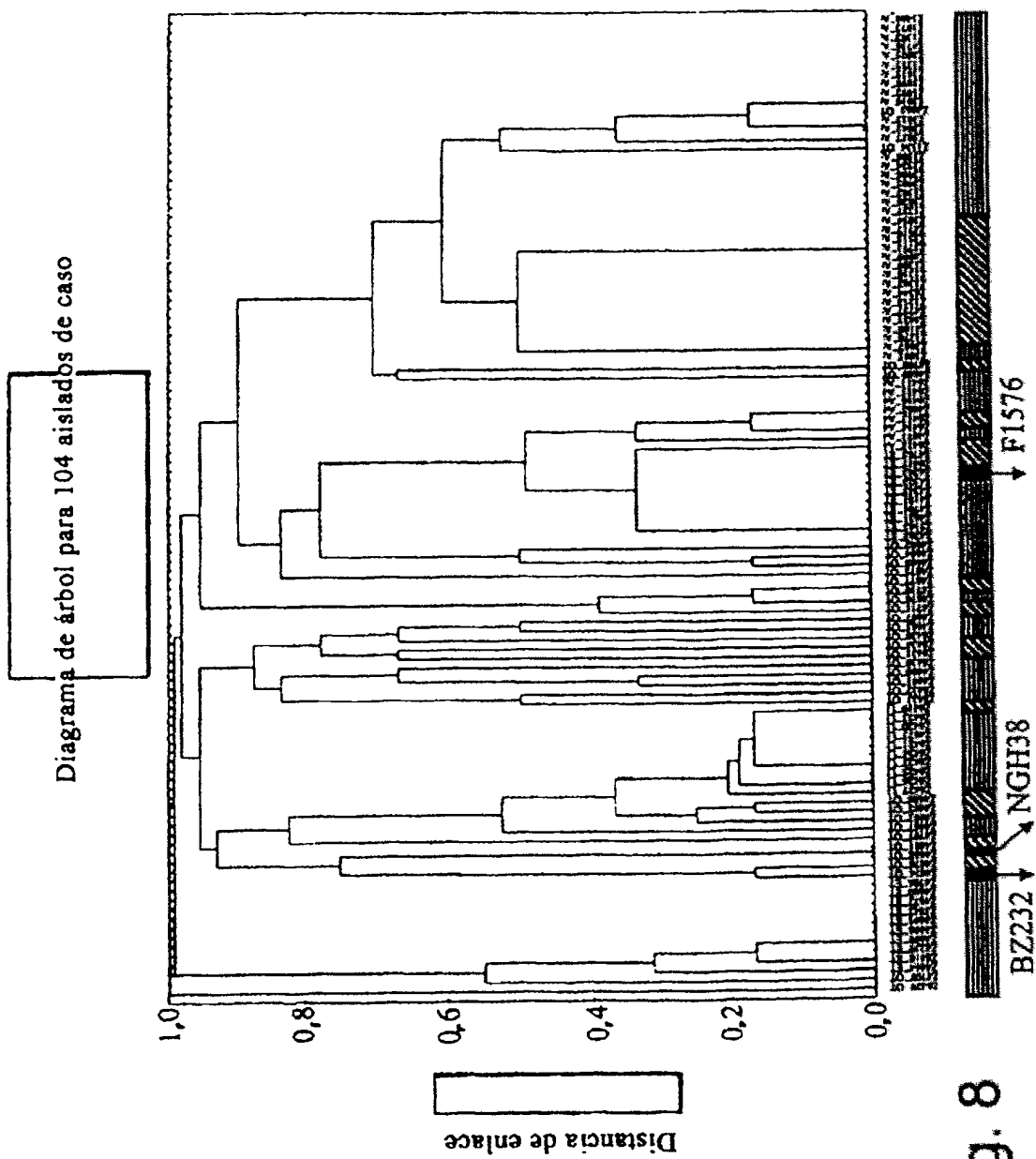


Fig. 8

DIAGRAMA DE LA ESTRATEGIA
(Procedimientos usados entre paréntesis)

↓
Identificar epítomos
accesibles al anticuerpo
de cepas de Nm del Gp B
encapsuladas de tipo natural
(2,3,4)

↓
Investigar la conservación
de epítomos del núcleo interno
accesibles al anticuerpo
en una población natural de Nm
(3)

↓
Investigar la estructura
de LPS derivado de Nm
de reactividad con AcM conocida
(5)

↓
Definir detalles de
epítomos accesibles al
anticuerpo conservados
(2,5)

↓
Seleccionar el número mínimo
de glicoformas que tienen
una variedad de epítomos
representativos de todas
las cepas de Nm
(3,4,5)

↓
Investigar el potencial
de una glicoforma
para provocar anticuerpos
funcionales
(por ejemplo,
ensayos bacterianos,
opsonofagocíticos y
de protección animal)

Fig. 9

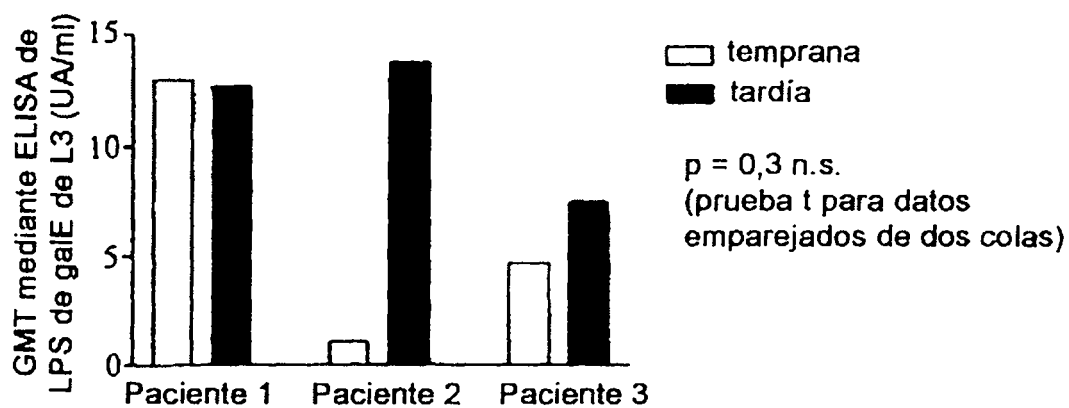


Fig. 10a

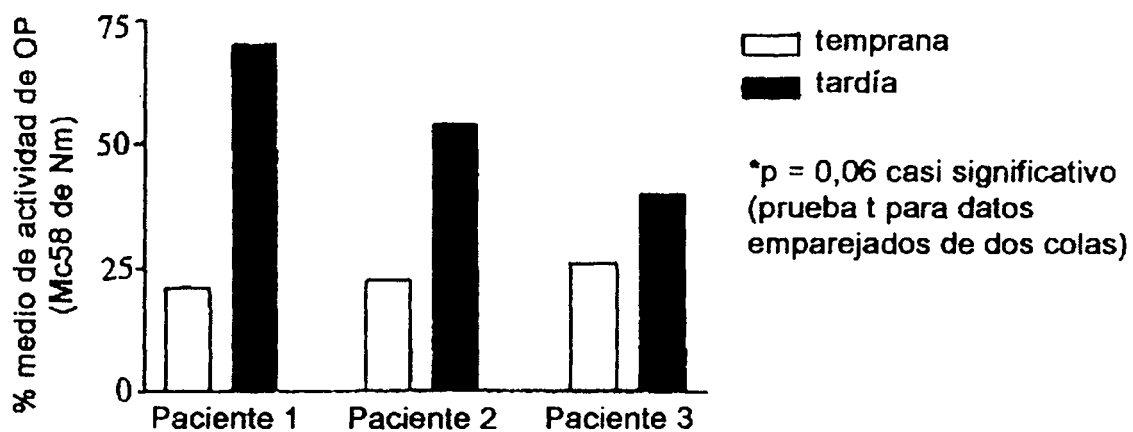
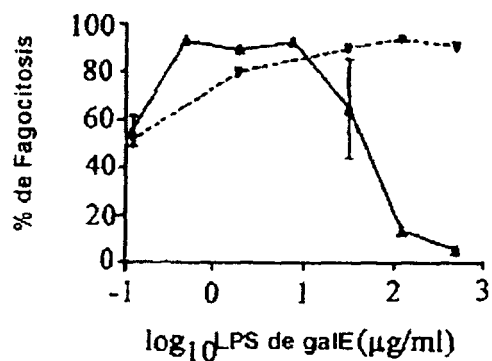


Fig. 10b



LPS de galE B5+
LPS de galE B5-

Fig. 11a

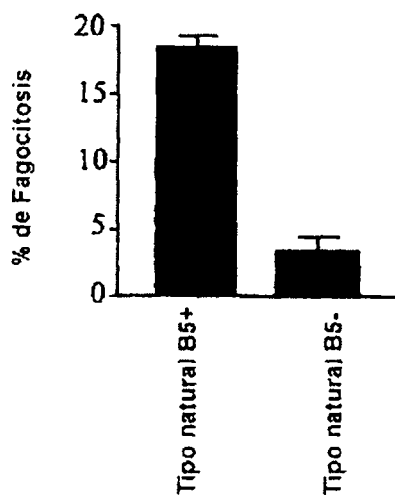


Fig. 11b

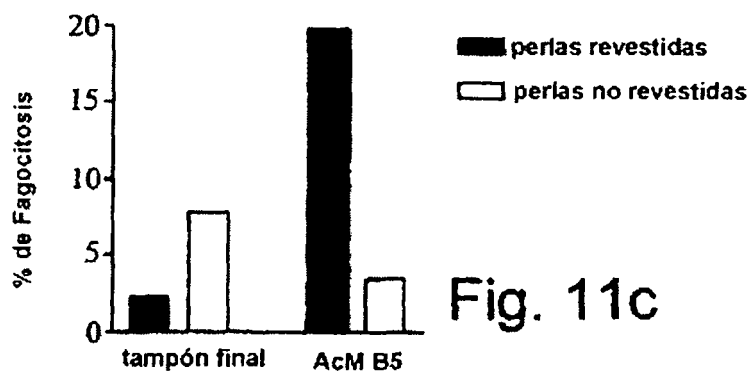


Fig. 11c

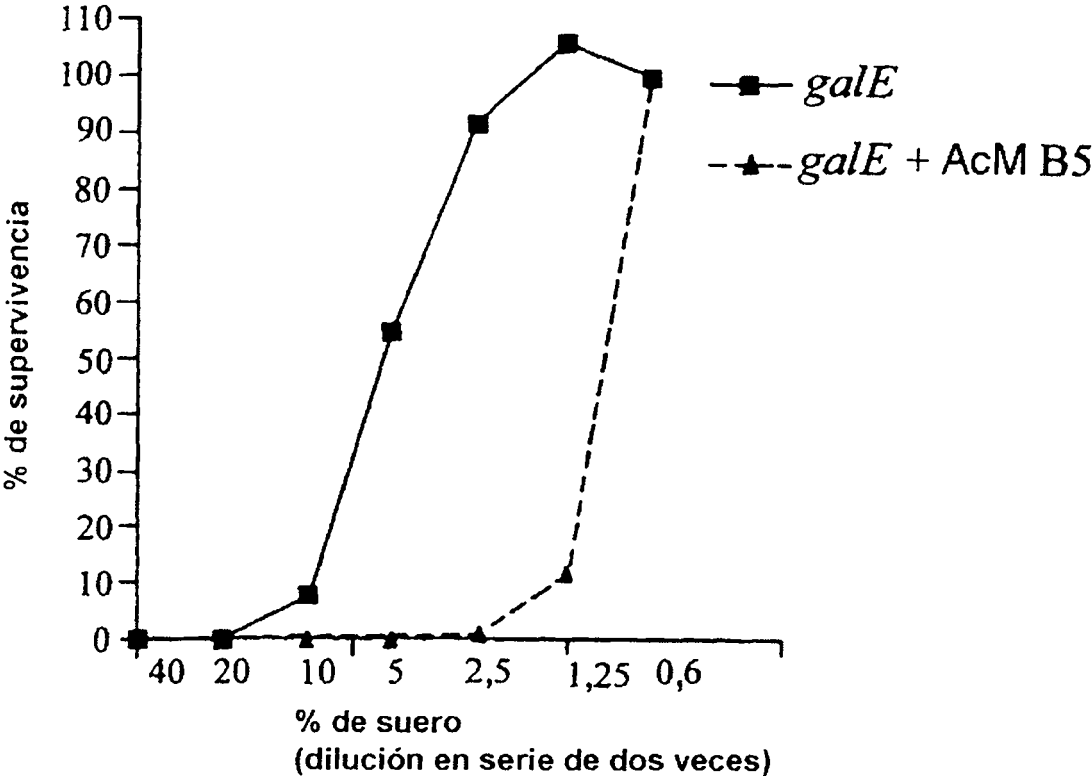


Fig. 12

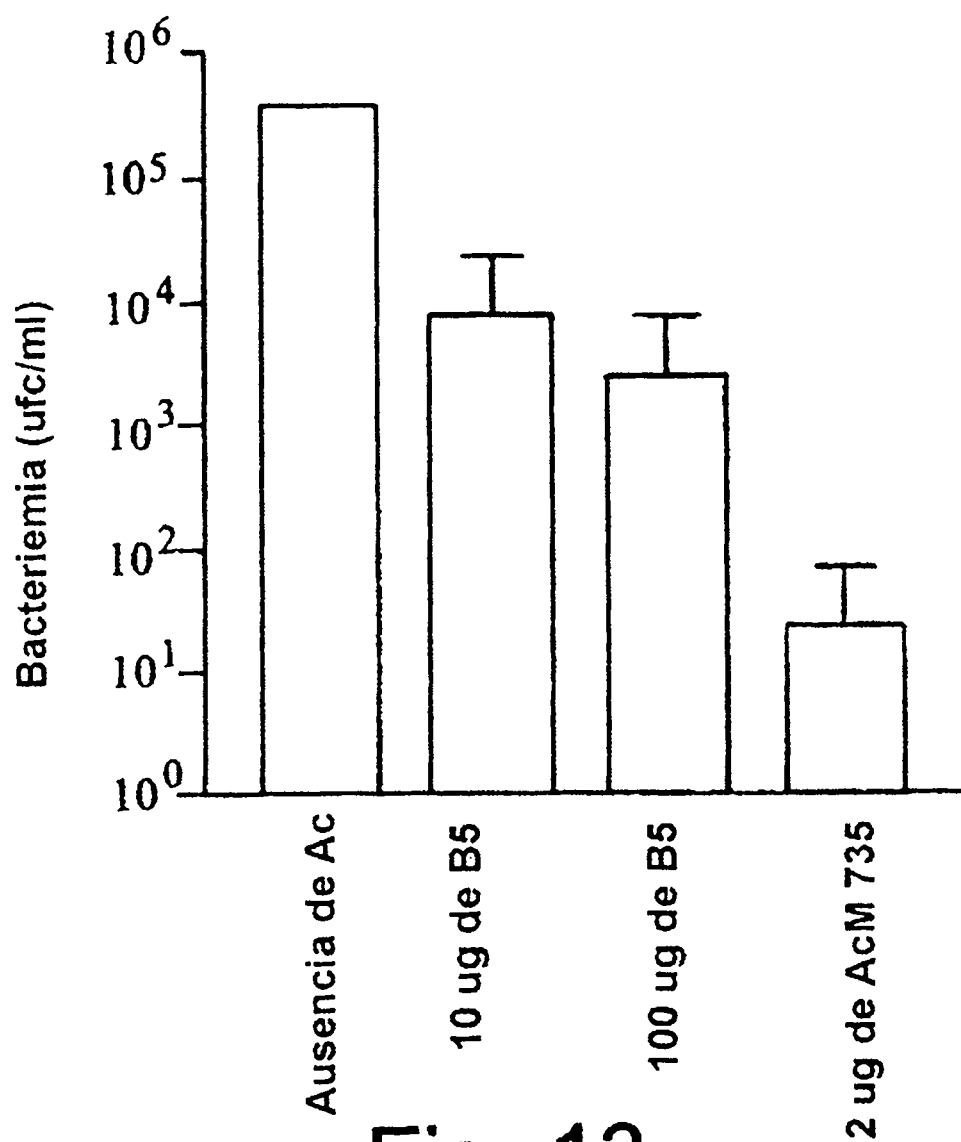


Fig. 13

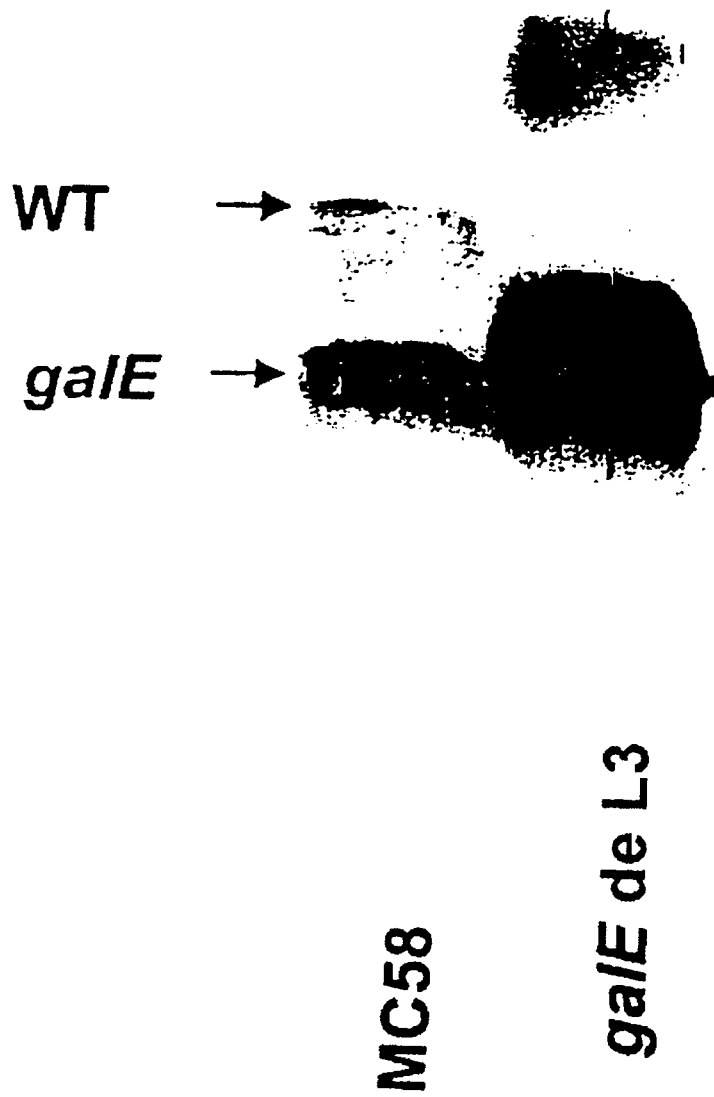


Fig. 14

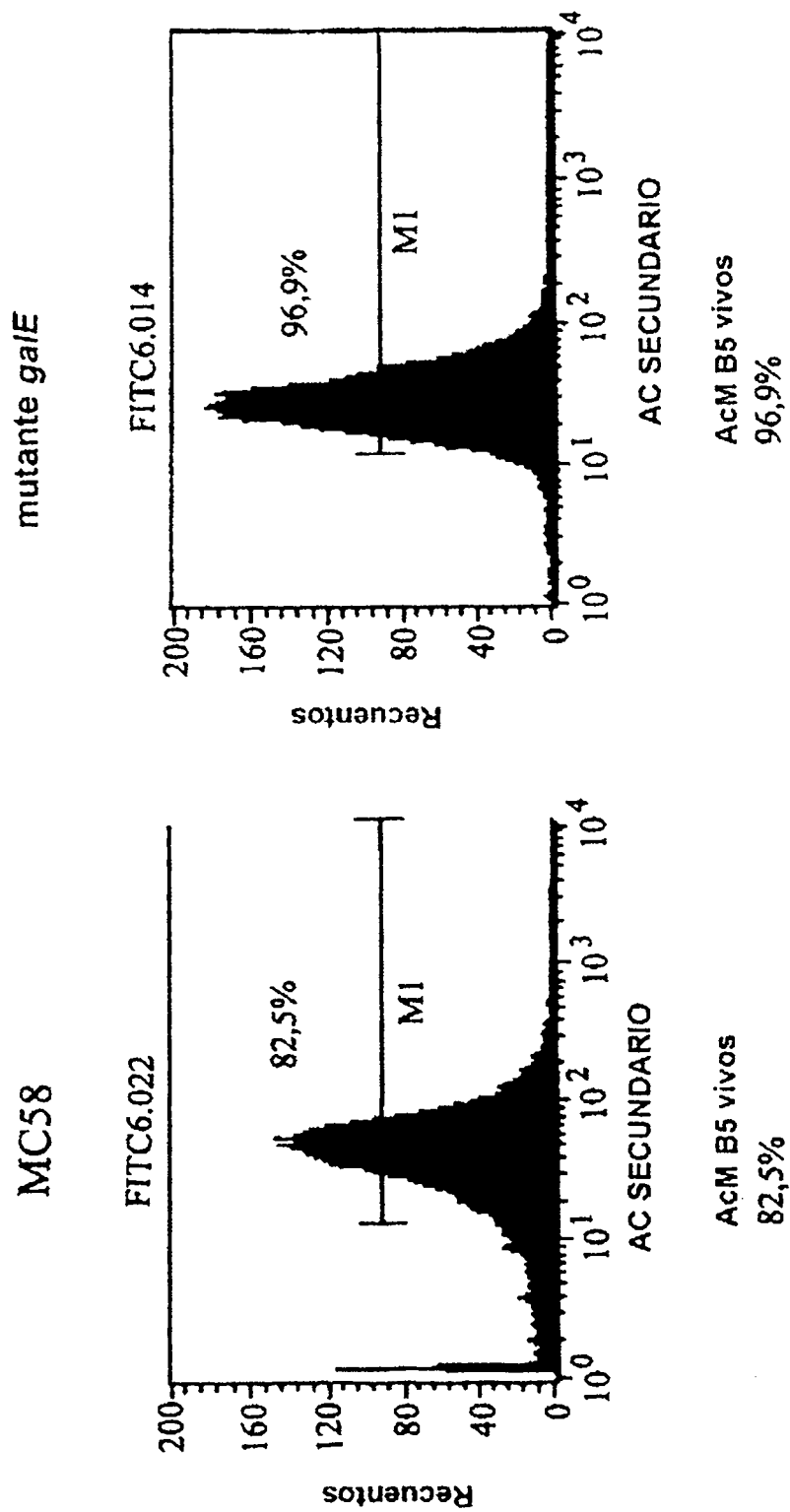


Fig. 15