



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 346 022**

(51) Int. Cl.:

C12P 19/04 (2006.01)

C12P 19/26 (2006.01)

C08B 37/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **98966468 .5**

(96) Fecha de presentación : **23.12.1998**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1051506**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **15.11.2000**

(54) Título: **Procedimiento para la extracción y el aislamiento de polisacáridos capsulares bacterianos para su uso como vacunas o ligandos a proteínas como vacunas de conjugados.**

(30) Prioridad: **23.12.1997 US 68608 P**

(73) Titular/es: **Baxter Healthcare S.A.
Hertistrasse 2
8306 Wallisellen, CH**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.10.2010

(72) Inventor/es: **Michon, Francis y
Blake, Milan**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.10.2010

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

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

Procedimiento para la extracción y el aislamiento de polisacáridos capsulares bacterianos para su uso como vacunas o ligandos a proteínas como vacunas de conjugados.

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere a procedimientos para extraer y aislar polisacáridos capsulares (PC) de bacterias tanto Gram negativas y Gram positivas. Los polisacáridos extraídos son útiles para producir vacunas que comprenden los polisacáridos solos o conjugados con proteínas.

10

Antecedentes de la invención

Las infecciones bacterianas provocadas por bacterias Gram positivas, tales como *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Listeria*, *Erysipelothrix* y *Clostridium*, y por bacterias Gram negativas, tales como *Haemophilus*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, *Neisseria*, y ciertos tipos de *Escherichia coli*, causan una alta morbilidad en todo el mundo. Esto, asociado con la resistencia emergente mostrada por las bacterias a los antibióticos, indica la necesidad de desarrollar vacunas bacterianas. *Streptococcus*, por ejemplo, es un género amplio y variado de bacterias Gram positivas que han sido ordenadas en varios grupos en base a la antigenicidad y la estructura del polisacárido de su pared celular (26, 27). Dos de estos grupos han sido asociados a graves infecciones humanas. Los estreptococos del grupo A provocan una variedad de trastornos infecciosos que incluyen "inflamación de garganta", fiebre reumática, impérito causado por estreptococos y sepsis.

Los estreptococos del grupo B no fueron conocidos como patógenos humanos en los libros de texto de Medicina estándar hasta principios de 1970. Desde entonces, los estudios han demostrado que los estreptococos del grupo B son importantes patógenos perinatales en Estados Unidos, así como en países en vías de desarrollo (37). Las infecciones sistémicas por estreptococos del grupo B durante los dos primeros meses de vida afectan a aproximadamente tres de cada 1.000 nacimientos (12), dando como resultado 11.000 casos al año en Estados Unidos. Estas infecciones provocan síntomas de neumonía congénita, sepsis y meningitis. Un número considerable de estos bebés muere o tiene secuelas neurológicas permanentes. Además, las infecciones por estreptococos del grupo B pueden estar implicadas en la elevada morbilidad relacionada con la gestación que se produce en casi 50.000 mujeres cada año. Otras personas susceptibles a las infecciones por estreptococos del grupo B son aquellas que tienen una respuesta inmune alterada, bien congénitamente, quimioterapéuticamente o por otras razones.

Los estreptococos del grupo B se pueden clasificar además en varios tipos diferentes en base al polisacárido capsular bacteriano. Los tipos Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII y VIII son responsables de la mayoría de la patogenicidad debida a la infección por el grupo B, siendo los estreptococos del grupo B de tipo Ia, Ib, II, III y V representantes de más del 90% de todos los casos publicados. Se ha caracterizado la estructura de cada uno de estos diversos tipos de polisacáridos (19-22, 44). De manera similar a los descubrimientos encontrados con otros muchos patógenos bacterianos humanos, los polisacáridos capsulares de los estreptococos del grupo B, cuando se usan en vacunas, pueden proporcionar una protección eficaz frente a infecciones con estas bacterias. Véase 4, 6, 24, 29, 30, 42, 43, 45.

Las bacterias Gram negativas también son una causa relevante de enfermedad. Hasta el desarrollo y el uso recientes de vacunas de polisacárido-proteína dirigidas contra las bacterias *Haemophilus influenzae* de tipo b (Hib), las infecciones por bacterias Hib eran responsables de muchos casos de retraso mental en bebés. Las infecciones por *N. meningitidis* y *E. coli K1* son responsables de la meningitis neonatal. Se han asociado cepas de bacterias Gram negativas, de *E. coli*, con enfermedades graves, incluyendo la muerte por ingestión de carne contaminada con cepas de *E. coli*.

La producción a gran escala de vacunas de polisacáridos capsulares y vacunas de conjugados de polisacáridos capsulares requiere suministros adecuados de polisacáridos capsulares purificados. Los procedimientos de la técnica anterior (40, 42) para aislar polisacáridos capsulares de células bacterianas se basan en el tratamiento de las células con la enzima mutanolisina. La mutanolisina escinde la pared celular bacteriana, lo que libera los componentes celulares. Este procedimiento implica tratar los lisados celulares con otras enzimas para eliminar las proteínas y los ácidos nucleicos, y purificar mediante precipitación diferencial y cromatografía. Tras la cromatografía, se somete la preparación a una hidrólisis alcalina antes del análisis de los azúcares. Son deseables procedimientos más eficientes, de un mayor rendimiento y más sencillos para obtener polisacáridos capsulares purificados.

El documento EP 0 238 739 A1 revela la purificación de polisacáridos capsulares de *Klebsiella* mediante la coprecipitación desde un sobrenadante de cultivo libre de células con un detergente, la precipitación en etanol, la extracción con disolventes orgánicos y la ultracentrifugación. Entonces se tratan los polisacáridos capsulares purificados en hidróxido de sodio diluido para eliminar la toxicidad de los lipopolisacáridos tóxicos co-purificados.

El documento US 4.413.057 describe la preparación de polisacáridos específicos de un tipo antigenético de estreptococo del grupo B mediante un procedimiento que comprende la precipitación y luego la cromatografía sobre gel. El eluido del mismo se trata con cloruro de calcio para precipitar el polisacárido que, a su vez, es disuelto en una cantidad mínima de solución tamponadora básica a un pH de aproximadamente 8 a 9. La solución resultante se eluye a través de una columna empaquetada de celulosa, y se mezclan y concentran las fracciones activas para someterlas a una diálisis.

El documento GB 1 107 693 A revela un procedimiento para preparar un secado a partir de cuerpos microbianos o licores de fermentación que comprende las etapas de descomponer las paredes celulares de al menos una parte de los microorganismos cultivados en un medio débilmente alcalino, hidrolizar la proteína microbiana a un pH aproximadamente neutro por medio de una enzima proteasa y aislar la fracción descompuesta que tenga propiedades de secado o de aromatización.

En el documento US 4.644.059, el polisacárido capsular purificado se somete a una activación mediante bromuro de cianógeno en condiciones alcalinas.

10 El documento WO 94/06467 se refiere a vacunas de conjugados de polisacáridos de tipo II y tipo V de estreptococos del grupo B y proteínas. La realización de la purificación del polisacárido se describe usando el procedimiento descrito en Wessels *et al.*, "Immunogenicity in Animals of a Polysaccharide-Protein Conjugate Vaccine Against Type III Group B Streptococcus", *J. Clin. Invest.*, 86: 1428-1433 (1990), que implica la precipitación usando etanol y un tratamiento enzimático con RNasa, DNasa y Pronasa. El polisacárido del grupo B contaminante fue despolimerizado
15 en ese procedimiento mediante el tratamiento de la solución con NaOH 1N. Posteriormente, se volvió a N-acetilar el material mediante el tratamiento con anhídrido acético.

Resumen de la invención

20 Esta invención proporciona un procedimiento para purificar polisacáridos capsulares (PC) de los componentes celulares de bacterias tanto, Gram negativas como Gram positivas, según la reivindicación 1. Según esta invención, los PC se pueden extraer bien de sobrenadantes bacterianos o de células bacterianas mediante la hidrólisis del enlace lábil a bases que conecta los PC con otros componentes celulares. Una ventaja del procedimiento de extracción proporcionado por esta invención es que los PC extraídos permanecen intactos en buena parte.

25 Una realización de esta invención proporciona un procedimiento para obtener polisacáridos capsulares purificados mediante la desacetilación de un porcentaje de los grupos N-acetilo de los PC durante la extracción básica para facilitar la separación de los PC de otros componentes celulares. Se puede volver a introducir un porcentaje de los grupos acetilo para proporcionar PC purificados que tengan la misma estructura de las unidades de repetición con respecto a los grupos N-acetilo que un polisacárido nativo o, alternativamente, se puede usar la acilación con grupos alquilo modificados para obtener PC modificados.

30 En una realización preferida, los PC se extraen de estreptococos del grupo B (EGB). En una realización más preferida, los PC se extraen de EGB de los tipos Ia, Ib, II, III, V y VIII.

35 Los PC se pueden extraer de *S. pneumoniae*. Los PC se pueden extraer de *S. pneumoniae* de los tipos III, IV y XIV.

40 Los PC se pueden extraer de bacterias *Neisseria* o *Escherichia*. Los PC se pueden extraer de *Neisseria meningitidis* de tipos B, C, Y o W135, o de *Escherichia coli K1*.

45 La purificación de polisacáridos capsulares bien de sobrenadantes bacterianos o de células bacterianas según esta invención tiene las siguientes ventajas frente a otros procedimientos: (a) simplicidad (un número mínimo de etapas); (b) eficiencia (rendimiento y pureza elevados); (c) seguridad (p. ej., reducción o eliminación del uso de disolventes orgánicos inflamables) y (d) aplicabilidad general para todas las bacterias Gram negativas y Gram positivas.

50 El procedimiento según la invención comprende el tratamiento de un extracto concentrado y/o células bacterianas aisladas con una solución básica. Además de extraer los PC, la extracción básica también provoca la desacetilación de los grupos N-acetilo. Se puede variar el grado de la desacetilación ajustando las condiciones de reacción. Entonces se separan los PC extraídos de los componentes celulares para obtener los PC preferiblemente mediante separación chromatográfica. Se puede volver a introducir algún o la mayoría de los grupos acetilo para obtener los PC o los PC modificados. La purificación final de los PC se puede conseguir mediante una chromatografía de permeación en gel. En otra realización más, la invención proporciona nuevos PC opcionalmente modificados como resultado de las condiciones de extracción básica que son adecuados para su uso como vacunas o vacunas de conjugados.

55 Un objetivo de esta invención consiste en proporcionar un procedimiento para producir PC sustancialmente puros que sean capaces de generar la producción de anticuerpos que sean bactericidas en mamíferos y proteger a los animales frente a la infección.

60 Un objetivo de esta invención consiste en usar estos PC en vacunas, bien solos o conjugados con un polipéptido, para proteger a seres humanos o a animales frente a la infección, comúnmente, por esa cepa de bacterias de las que los PC fueron aislados. En ciertos casos, el polisacárido usado con esta invención puede provocar la producción de anticuerpos que reaccionen de forma cruzada con otras bacterias patogénicas produciendo así la protección frente a la infección por estas otras bacterias. Un objetivo de esta invención consiste en proporcionar un procedimiento para aislar polisacáridos capsulares de componentes celulares tanto Gram negativos como Gram positivos contenidos bien en sobrenadantes de bacterias Gram negativas o Gram positivas, o en células bacterianas Gram negativas o Gram positivas. Estos polisacáridos capsulares se pueden usar entonces como vacunas o unidos a polipéptidos para formar moléculas conjugadas que sean útiles como vacunas.

Breve descripción de las figuras

Fig. 1: Espectro de RMN (500 MHz) del polisacárido capsular obtenido de estreptococos del grupo B de tipo Ia registrados en D₂O a 50°C.

5 Fig. 2: Espectro de RMN (500 MHz) del polisacárido capsular obtenido de estreptococos del grupo B de tipo Ib registrados en D₂O a 50°C.

10 Fig. 3: Espectro de RMN (500 MHz) del polisacárido capsular obtenido de estreptococos del grupo B de tipo II registrados en D₂O a 50°C.

Fig. 4: Espectro de RMN (500 MHz) del polisacárido capsular obtenido de estreptococos del grupo B de tipo III registrados en D₂O a 50°C.

15 Fig. 5: Espectro de RMN (500 MHz) del polisacárido capsular obtenido de estreptococos del grupo B de tipo V registrados en D₂O a 50°C.

Fig. 6: Inhibición de antisuero de conejo contra PEGB1a sobre placas revestidas con PEGB1a-ASH.

20 Fig. 7: Inhibición de antisuero de conejo contra PEGB1b sobre placas revestidas con PEGB1b-ASH.

Fig. 8: Inhibición de antisuero de conejo contra PEGBII sobre placas revestidas con PEGBII-ASH.

Fig. 9: Inhibición de antisuero de conejo contra PEGBIII sobre placas revestidas con PEGBIII-ASH.

25 Fig. 10: Inhibición de antisuero de conejo contra PEGBV-TT sobre placas revestidas con PEGBV-ASH.

Fig. 11: Ensamblaje estructural de EGB que representa un peptidoglucano junto con un antígeno subcapsular del grupo (poliramnosa) y un polisacárido capsular (Michon *et al.*, *Biochemistry* 1988, 27: 5341-5351). X e Y representan residuos de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico, respectivamente. Las flechas abiertas indican los sitios de escisión predichos mediante: lisozima (A), mutanolisina (B), lisostafina (C) o base mediante la hidrólisis de los enlaces de tipo fosfodiéster que unen el polisacárido capsular y la poliramnosa con el peptidoglucano.

30 Fig. 12: Ensamblaje estructural de EGB que representa un peptidoglucano junto con un antígeno subcapsular del grupo (poliramnosa) y un polisacárido capsular (Michon *et al.*, *Biochemistry* 1988, 27: 5341-5351). X e Y representan residuos de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico, respectivamente. Las flechas abiertas indican los sitios de escisión predichos mediante: lisozima (A), mutanolisina (B), lisostafina (C) o una base mediante la hidrólisis de los enlaces de tipo fosfodiéster que unen el polisacárido capsular con el peptidoglucano o mediante la hidrólisis de los enlaces de tipo fosfodiéster que unen la poliramnosa con el peptidoglucano.

40 Descripción detallada de la invención

45 Esta invención proporciona un procedimiento para obtener polisacáridos capsulares de bacterias Gram negativas y Gram positivas usando una hidrólisis básica del enlace lábil a bases que une el PC con los componentes celulares. El procedimiento de la invención comprende extraer PC de bacterias tanto Gram positivas y Gram negativas poniendo en contacto las bacterias o una solución que contenga fragmentos bacterianos con una base. Entonces se pueden recuperar los PC de la base mediante una variedad de procedimientos. Los ejemplos no restrictivos de bacterias Gram positivas para su uso según esta invención son *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Listeria*, *Erysipelothrrix* y *Clostridium*. Específicamente, es más preferible usar estreptococos, siendo lo más preferible usar estreptococos del grupo B de los tipos Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII y VIII. Los ejemplos no restrictivos de bacterias Gram negativas para su uso con esta invención incluyen *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* y *Escherichia coli*. Específicamente, es más preferible usar *H. influenzae* de tipo b, *N. meningitidis* de tipos B, C, Y y W135, y *E. coli* K1.

50 Se puede usar una amplia variedad de condiciones para hidrolizar el enlace lábil a bases bien en un disolvente acuoso u orgánico según la invención. Mediante las condiciones de reacción se puede controlar el grado hasta el que también se hidrolizan los enlaces N-acetilo de los hidratos de carbono. La hidrólisis de los grupos N-acetilo es ventajosa para separar los PC del resto de componentes celulares, porque cuanto mayor sea el grado hasta el que se escinden los enlaces N-acetilo, más hidrófilo se vuelve el PC en comparación con el resto de los componentes celulares. Esta diferencia de polaridad se puede aprovechar para efectuar una separación cromatográfica eficiente. La separación de dos o más componentes de una mezcla en base a las diferencias de polaridad es ampliamente conocida por los expertos en la técnica.

55 Por ejemplo, mediante el uso de una cromatografía de interacción hidrófoba, los compuestos de hidrofobicidad relativamente superior en comparación con aquellos compuestos que son más hidrófilos se mantienen más tiempo en la columna. Por el contrario, mediante el uso de una cromatografía de interacción hidrófila, se mantienen más tiempo en la columna los compuestos hidrófilos en comparación con esos compuestos que son más hidrófobos. El uso de ambos procedimientos consecutivamente permite la eliminación de impurezas que son tanto menos polares como más polares en comparación con el compuesto de interés.

ES 2 346 022 T3

Alternativamente, se pueden aprovechar los grupos amino o de ácido carboxílico libres presentes en los PC para facilitar una separación cromatográfica eficiente. La separación de dos o más componentes de una mezcla en base a las diferencias de carga es ampliamente conocida por los expertos en la técnica. Mediante el uso de una cromatografía de intercambio catiónico, los compuestos que contienen grupos cargados positivamente, tales como aminas protonadas,

- 5 permanecen más tiempo sobre la columna que esos compuestos que tienen poca o ninguna carga positiva, que pasan a través de la columna de manera relativamente rápida. Por el contrario, mediante el uso de cromatografía de intercambio aniónico, los compuestos cargados negativamente, tales como los ácidos carboxílicos, permanecen sobre la columna, mientras que esos compuestos que tienen poca o ninguna carga negativa pasan a través de la columna de manera relativamente rápida.

10 Tras分离 los PC desacetilados del resto de los componentes celulares, se pueden volver a acetilar los grupos amino libres. La variación del reactivo de acetilación y de las condiciones de reacción permite al profesional controlar el grado hasta el que se vuelven a acetilar los grupos amino. Las impurezas introducidas en la etapa de acilación son de un tamaño pequeño en comparación con los PC que se han vuelto a acilar, y por tanto, se pueden separar de los PC
15 mediante cromatografía de permeación en gel.

La cromatografía de permeación en gel permite, por ejemplo, una separación eficiente de los PC relativamente grandes. Alternativamente, se puede aprovechar la diferencia de polaridad o de carga para purificar los PC de las impurezas restantes.

20 A. Preparación de polisacáridos capsulares

El aislamiento y la purificación de polisacáridos bacterianos de componentes celulares se puede realizar, según la invención, en cuatro etapas: extracción básica, separación cromatográfica, N-acilación y purificación cromatográfica.

25 1. Materiales iniciales

Los materiales para extraer los PC se pueden obtener de sobrenadantes bacterianos concentrados de células bacterianas homogenizadas o de medio acondicionado. Las células se pueden separar mediante centrifugación o microfiltración, y el sobrenadante se puede concentrar, comúnmente, de 10-15 veces. Preferiblemente, los sobrenadantes bacterianos y el medio acondicionado se concentran de modo que los PC estén presentes a una concentración de aproximadamente 5-20 mg/ml. Además, las células sedimentadas se pueden extraer directamente.

30 2. Extracción básica

Para extraer los PC, se pueden poner en contacto el sobrenadante bacteriano concentrado o el medio acondicionado con una variedad de bases. Alternativamente, para extraer los PC, las células bacterianas aisladas también se pueden poner en contacto con una variedad de bases. Los ejemplos no restrictivos de bases que se pueden usar según esta invención son NaOH, KOH, LiOH, NaHCO₃, Na₂CO₃, K₂CO₃, KCN, Et₃N, NH₃, H₂N₂H₂, NaH, NaOMe, NaOEt o KOtBu. Las bases tales como NaOH, KOH, LiOH, NaH, NaOMe o KOtBu se usan más eficazmente en un intervalo de 0,5 N-5,0 N. Las bases tales como NaHCO₃, Na₂CO₃, K₂CO₃ y KCN se pueden usar a concentraciones tan elevadas como sus solubilidades lo permitan. Las bases orgánicas, tales como Et₃N, se pueden usar a concentraciones medias a elevadas (50-100%), siempre y cuando haya un agente, tal como el agua o el alcohol, para efectuar la hidrólisis. Las bases tales como NH₃ o H₂N₂H₂ se pueden usar casi a cualquier concentración incluyendo la del 100%. Se pueden usar disolventes tales como agua, alcoholes (preferiblemente, C₁-C₄), dimetilsulfóxido, dimetilformamida o mezclas de éstos y otros disolventes orgánicos. Las más preferidas son las soluciones de extracción básica que comprenden agua.

El intervalo de pH más eficaz para extraer los PC de los componentes celulares es de aproximadamente 9 a 14, siendo el pH óptimo de alrededor de 12. Aunque la extracción se puede realizar a temperaturas de aproximadamente 4°C, se espera que el aumento de la temperatura hasta preferiblemente entre aproximadamente 40 y 100°C y/o la agitación de la mezcla de reacción den como resultado mayores rendimientos. Es preferible usar aproximadamente 1-20 g de pasta celular para aproximadamente 1 litro de reactivo básico. Alternativamente, los sobrenadantes concentrados se diluyen con NaOH 10N hasta una concentración final de NaOH 2N en la mezcla de reacción.

55 3. Separación cromatográfica

Los PC extraídos presentes en el reactivo de extracción básica se pueden separar de las impurezas resultantes de los componentes celulares mediante cromatografía. Los ejemplos no restrictivos de los procedimientos de separación cromatográfica son la cromatografía de intercambio iónico (catiónico o aniónico), de interacción hidrófila, de interacción hidrófoba o de permeación en gel. El procedimiento preferido es la cromatografía de interacción hidrófoba (CIH). Más preferida es la cromatografía de interacción hidrófoba sobre fenil-sefarosa, que eliminará la mayoría de los contaminantes de alto peso molecular y activos bajo radiación UV del extracto básico. El polisacárido capsular se eluirá al inicio de la elución de pH alto (pH 10 a pH 8) y de salinidad elevada (2N a 1N), mientras que la proteína y los ácidos nucleicos más hidrófobos se mantendrán. Los ejemplos no restrictivos del procedimiento cromatográfico de interacción hidrófoba son las resinas de alquil agarosa o sefarosa, siendo una resina preferida la fenil sefarosa HP (Pharmacia Biothech; Piscataway, NJ). Se puede pre-equilibrar la columna con NaHCO₃ 0,5-5,0N y elirla con un volumen de columna a un caudal de 0,5-50 ml/min. Tras eluir con aproximadamente un volumen de columna de

NaHCO_3 , se pueden usar aproximadamente uno a diez volúmenes de columna de agua para eluir la columna. Entonces se puede analizar el polisacárido de las fracciones mediante procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Un procedimiento preferido para la detección de polisacárido que contiene ácido siálico es un análisis del orcinol a microescala descrito en los ejemplos.

5

4. N-acetilación

La separación del polisacárido capsular extraído en condiciones básicas se ayuda de la eliminación durante la extracción de los grupos *N*-acetilo del ácido siálico y los residuos de amino-azúcar de los polisacáridos capsulares estables por el contrario en condiciones básicas.

Opcionalmente, las fracciones mezcladas de la CIH que contienen los polisacáridos capsulares se pueden volver a acetilar hasta el grado deseado usando una variedad de agentes de acetilación. Los ejemplos no restrictivos de los agentes de acetilación son anhídrido acético, cloruro de acetilo, acetato de pentafluorofenilo, acetato de 4-nitrofenilo. Véase: Theodora W. Greene y Peter G. M. Wuts, "Protective Groups in Organic Syntheses", II Ed. (1991). El procedimiento preferido consiste en mezclar con anhídrido acético a concentraciones de aproximadamente 0,5M a aproximadamente 2M, siendo las concentraciones preferidas de aproximadamente 0,7M a aproximadamente 1M, para volver a acetilar los grupos amino libres del polisacárido capsular, regenerando así la estructura del polisacárido nativo.

20 5. *Purificación cromatográfica*

Entonces se puede realizar la purificación de los PC re-acetilados para producir PC para su uso en la preparación de reactivos inmunológicos tales como antígenos y vacunas. Hay diversos ejemplos de purificación cromatográfica adecuados para su uso con esta invención. Para efectuar la separación de los PC re-acetilados de los componentes de la reacción, se puede usar, por ejemplo, la cromatografía de intercambio iónico (catiónico o aniónico), de interacción hidrófoba, de interacción hidrófila o de permeación en gel. El procedimiento preferido es el uso de la cromatografía de permeación en gel sobre Superdex® (agarosa y dextrano entrecruzados) que eliminará los contaminantes residuales y proporcionará PC purificados. Se prefiere particularmente el Superdex 200 PG, que tiene un intervalo de fraccionamiento (PM) para los dextranos de 1.000-100.000. Los caudales son preferiblemente de aproximadamente 0,1 a 10 ml/min usando PBS como eluyente.

Los polisacáridos capsulares producidos mediante los procedimientos de extracción básica de esta invención son nuevos (véanse las Fig. 11 y 12) y mantienen epítotos en sus estructuras nativas (Fig. 5-10). Por consiguiente, los PC preparados según la invención producen anticuerpos que reaccionan de manera cruzada con los PC nativos y las bacterias que los expresan. La obtención de PC mediante los procedimientos según esta invención es superior a los procedimientos de la técnica anterior, debido a (a) la facilidad relativa con la que se llevan a cabo los procedimientos de esta invención; (b) los mayores rendimientos de aislamiento y (c) los mayores rendimientos de conjugación. Además, el ADN y el ARN bacteriano se degradan en la etapa de extracción básica y, por tanto, no están presentes en cantidades apreciables en el producto final generado según esta invención.

40

B. *Estructura de los PC extraídos*

Los polisacáridos capsulares extraídos mediante el procedimiento de esta invención tienen una estructura única en comparación con los PC extraídos mediante procedimientos anteriores. Los PC se obtienen mediante la hidrólisis catalizada por una base de los enlaces de tipo fosfodiéster que unen los polisacáridos capsulares con la poliramnosa y mediante la hidrólisis catalizada por una base de los enlaces de tipo fosfodiéster que unen la poliramnosa con el peptidoglucano (véase la Figura 11). Según un modelo alternativo para la estructura de la pared celular bacteriana, los mismos PC estructuralmente únicos se obtienen mediante la hidrólisis catalizada por una base de los enlaces de tipo fosfodiéster que unen los polisacáridos capsulares con el peptidoglucano y mediante la hidrólisis catalizada por una base de los enlaces de tipo fosfodiéster que unen la poliramnosa con el peptidoglucano (véase la Figura 12). Los procedimientos de la técnica anterior usan enzimas para escindir diferentes enlaces. Por ejemplo, se ha usado lisozima para hidrolizar el polímero de *N*-acetilglucosamina/ácido *N*-acetilmurámico. Se ha usado mutanolisina para hidrolizar el enlace entre el polímero de *N*-acetilglucosamina/ácido *N*-acetilmurámico y la parte peptídica, y la lisostafina se ha usado para hidrolizar la parte peptídica de la pared celular bacteriana.

55

Las distribuciones de las masas molares absolutas de los polisacáridos capsulares de esta invención son limitadas según lo indicado por los bajos valores de polidispersidad (M_w/M_n) (véase la tabla 2). Esta uniformidad es valiosa para generar productos vacunales consistentes y eficaces.

60 C. *Vacunas*

Esta invención también se dirige a la preparación de vacunas. Según esta invención, se pueden usar los PC aislados que se describen anteriormente como un antígeno para generar anticuerpos que sean reactivos frente a los PC y de ahí que sean reactivos frente al organismo del que se aislaron los PC.

65

Las vacunas pueden proporcionar una inmunidad activa o pasiva. Las vacunas para proporcionar una inmunidad activa comprenden un PC purificado de esta invención. Preferiblemente, esta vacuna comprende PC conjugados con al menos un péptido antigénico.

1. Anticuerpos

Las técnicas para la extracción y el aislamiento de PC descritas anteriormente generan la producción de abundantes cantidades de PC de esta invención. Esto facilita la generación de anticuerpos reactivos frente a los PC.

- 5 Los anticuerpos dirigidos contra los PC se pueden generar mediante cualquiera de las técnicas que son conocidas en la materia. Según un enfoque, los anticuerpos se pueden generar mediante la administración de una preparación de PC aislados, o derivados o fragmentos de los mismos, a un animal huésped. El animal huésped puede ser, sin limitarse a, rata, ratón, conejo, primate no humano o un ser humano. Preferiblemente, el huésped es un ser humano.
- 10 Las respuestas inmunológicas se pueden aumentar mediante el uso de adyuvantes que son conocidos en la técnica.

También se pueden preparar anticuerpos monoclonales dirigidos contra los PC mediante cualquiera de las técnicas que son conocidas en la materia. Según un procedimiento, se usan cultivos de líneas celulares de hibridoma (Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256: 495-497). Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra los PC pueden ser anticuerpos monoclonales humanos, anticuerpos monoclonales químicos o anticuerpos monoclonales humanizados creados mediante cualquiera de las técnicas que son conocidas en la materia. Según un enfoque, se pueden generar anticuerpos monoclonales químicos que tengan un dominio de unión antigenica no humano (p. ej., de ratón) combinado con una región constante humana (Takeda *et al.* (1985) *Nature* 314:452). Los anticuerpos humanizados se pueden generar según los procedimientos de Queen *et al.*, patente estadounidense n.º: 5.585.089.

- 20 Los anticuerpos dirigidos contra los PC se pueden purificar mediante cualquiera de las técnicas que son conocidas en la materia, incluyendo, pero no limitándose a, cromatografía de inmunoabsorción o inmunoafinidad, u otros procedimientos cromatográficos (p. ej., CLAR). También se pueden purificar anticuerpos como fracciones de inmunoglobulina de suero, plasma o medio de cultivo celular.

25 Las moléculas de anticuerpo pueden ser moléculas de inmunoglobulina intactas, moléculas de inmunoglobulina sustancialmente intactas o esas partes de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, fragmentos Fab, que contienen el sitio de unión antigenica.

- 30 Los fragmentos de anticuerpos dirigidos contra los PC se pueden generar mediante cualquiera de las técnicas que son ampliamente conocidas en la materia. (Campbell (1985) "Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology", Vol. 13, Burdon, *et al.* (eds.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam).

2. Moléculas conjugadas

35 Los PC se pueden usar para provocar respuestas de anticuerpos hacia una variedad de bacterias Gram negativas y Gram positivas en un individuo, bien solos o cuando están conjugados con otra molécula inmunogénica, tal como un polipéptido o una proteína. La conjugación del PC con el polipéptido convierte la respuesta inmune hacia el PC, que comúnmente es independiente de las células T, en una que es dependiente de las células T. Por consiguiente, 40 es preferible que el tamaño del polipéptido sea el suficiente como para provocar la conversión de la respuesta de independiente de las células T a dependiente de las células T. Puede ser útil usar polipéptidos de menor tamaño a efectos de proporcionar un segundo inmunógeno.

45 Se puede emplear cualquier modo de conjugación para conjugar el componente de PC con el péptido. El procedimiento preferido es aquél descrito en la patente estadounidense n.º: 4.356.170, que describe la introducción de grupos aldehído terminales en el polisacárido mediante la escisión oxidativa de los dioles vecinales y el acoplamiento de los grupos aldehído con los grupos amino peptídicos mediante una aminación reductora.

50 Se entenderá, sin embargo, que las vacunas de conjugados de la invención no se limitan a aquéllas producidas mediante la aminación reductora. De este modo, las vacunas también se pueden producir mediante la conjugación del PC con un péptido usando cualquier procedimiento de unión conocido por los expertos en la técnica, tal como un espaciador de dihidrazida del ácido adipico, según lo descrito por Schneerson, R. *et al.* (1980) *J. Exp. Med.* 1952:361-476, y en la patente estadounidense n.º: 4.644.059 o, por ejemplo, la tecnología espaciadora binaria según lo descrito por Marburg, S. *et al.* (1986) *J. Am. Chem. Soc.* 108: 5282-5287.

55 Esta invención proporciona la capacidad de producir moléculas conjugadas en las que el péptido está ligado al PC a través de uno o más sitios sobre el PC. Por consiguiente, las moléculas conjugadas preparadas según esta invención, con respecto al componente proteico, pueden ser monómeros, dímeros, trímeros y moléculas muy entrecruzadas en las que el PC entrecruza entre sí múltiples proteínas.

60 Los anticuerpos dirigidos contra los PC se pueden usar como una preparación farmacéutica en una aplicación terapéutica o profiláctica para conferir inmunidad pasiva de un individuo huésped a otro (i. e., para aumentar una respuesta inmune de un individuo contra bacterias Gram negativas o Gram positivas, o para proporcionar una respuesta en individuos inmuno-comprometidos o con el sistema inmune reducido, incluyendo personas que padecen SIDA). La transferencia pasiva de anticuerpos es conocida en la técnica y se puede realizar mediante cualquiera de los procedimientos conocidos. Según un procedimiento, se generan anticuerpos dirigidos contra los PC o los conjugados de los mismos de esta invención en un animal huésped ("donante") inmunocompetente, se cosechan del animal huésped y se transfunden a un individuo receptor. Por ejemplo, se puede usar un donante humano para generar anticuerpos reac-

tivos contra el PC o el conjugado de PC. Entonces se pueden administrar los anticuerpos en cantidades terapéutica o profilácticamente eficaces a un receptor humano en necesidad de tratamiento, confiriendo así resistencia en el receptor contra bacterias que están unidas por anticuerpos generados por el componente de polisacárido. (Véase Grossman, M. y Cohen, S. N., en "Basic and Clinical Immunology", VII Ed., (Stites, D. P. y Terr, A. T. eds., Appleton & Lange 1991) Capítulo 58 "Immunization").

3. Composiciones farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden comprender los PC o las moléculas conjugadas que comprenden los PC y vehículos farmacológicamente aceptables, tales como solución salina, dextrosa, glicerol, etanol o similares. En otra realización, la composición farmacéutica comprende otro resto inmunogénico, tal como un péptido o composiciones que comprenden anticuerpos generados por uno de los PC de esta invención. La composición también puede comprender adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica del receptor. Tales adyuvantes pueden estar basados en aluminio, tal como alumbre o adyuvantes de alquilo de cadena larga, tales como estearil-tirosina (véase el documento estadounidense con n.º de serie 583.372, presentado el 17/9/90; la patente europea EP 0 549 617 B1; Moloney *et al.*, patente estadounidense n.º: 4.258.029). Véanse también Jennings *et al.*, patente estadounidense n.º 5.683.699 y Paoletti, *et al.* *J. Infectious Diseases* 1997; 175: 1237-9. Estas composiciones farmacéuticas son particularmente útiles como vacunas.

Para provocar una inmunidad pasiva, la composición farmacéutica puede estar compuesta por anticuerpos polyclonales o anticuerpos monoclonales, o derivados o fragmentos de los mismos, según lo descrito anteriormente. La cantidad de anticuerpo, fragmento o derivado será una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz según lo determinado mediante técnicas clínicas estándar.

Las preparaciones farmacéuticas se pueden introducir en un individuo mediante procedimientos conocidos por su eficacia en la técnica. Entre las vías de introducción, pero sin limitarse a ellas, se encuentran la vía intradérmica, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intramuscular, oral e intranasal.

Las composiciones pueden comprender vehículos, tampones o conservantes estándar conocidos por los expertos en la técnica que sean adecuados para vacunas, incluyendo, pero no limitándose a, cualquier vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado, tal como solución salina fisiológica u otros líquidos inyectables. También pueden estar presentes los aditivos habituales en las vacunas, por ejemplo, estabilizadores tales como lactosa o sorbitol, y adyuvantes para aumentar la respuesta inmunogénica, tales como fosfato de aluminio, hidróxido o sulfato y estearil-tirosina. Las vacunas producidas según esta invención también se pueden usar como componentes de vacunas multivalentes que generen una respuesta inmune frente a una pluralidad de agentes infecciosos.

Las vacunas se administran en cantidades suficientes para generar la producción de anticuerpos como parte de una respuesta inmunogénica. Las dosis se pueden ajustar en base al tamaño, al peso o a la edad del individuo que recibe la vacuna. Se puede controlar la respuesta de los anticuerpos en un individuo analizando el título o la actividad bactericida de los anticuerpos y, si fuera necesario, se puede volver a aplicar para aumentar la respuesta. Comúnmente, una sola dosis para un niño es de aproximadamente 10 µg de vacuna de conjugado por dosis o de aproximadamente 0,5 µg-20 µg/kilogramo. Los adultos reciben una dosis de aproximadamente 0,5 µg-20 µg/kilogramo de vacuna de conjugado. Para la vacuna de PC, una dosis común es de aproximadamente 25 µg de cada PC individual por dosis. Es decir, una vacuna frente a estreptococos del grupo B podría comprender 25 µg de cada uno de los PC de cada uno de los nueve serotipos.

D. Equipos de diagnóstico

Los PC, o los derivados o fragmentos de los mismos, se pueden usar para producir equipos de diagnóstico más seguros que no incorporen toxinas, tales como la toxina de la neumolisis, pero que sigan indicando la presencia de anticuerpos dirigidos contra bacterias Gram negativas o Gram positivas. La presencia de tales anticuerpos puede indicar una exposición previa al patógeno y predecir aquéllos individuos que pueden ser resistentes a la infección. El equipo de diagnóstico puede comprender al menos uno de los PC, o de los derivados o fragmentos de los mismos, y los reactivos adecuados para la detección de una reacción de los anticuerpos cuando los PC modificados, o sus derivados o fragmentos, se mezclan con una muestra que contiene anticuerpo dirigido contra bacterias Gram negativas o Gram positivas. Las reacciones de los anticuerpos se pueden identificar mediante cualquiera de los procedimientos descritos en la técnica, incluyendo, pero no limitándose a, un análisis ELISA. Tal conocimiento es importante y puede evitar una vacunación innecesaria.

Alternativamente, el equipo de diagnóstico puede comprender además un soporte sólido o una perla magnética o una matriz plástica y al menos uno de los PC, o derivados o fragmentos de los mismos.

En algunos casos, puede ser preferible que los PC, o los derivados o los fragmentos, estén marcados. Los agentes de marcaje son ampliamente conocidos en la técnica. Los agentes de marcaje incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, identificadores de radiactividad, quimioluminiscencia, bioluminiscencia, luminiscencia u otras "etiquetas" de identificación para un análisis conveniente. Se pueden recoger y purificar fluidos corporales o muestras de tejidos (p. ej., sangre, suero, saliva), y aplicarlos al equipo de diagnóstico. Los PC, sus derivados o fragmentos pueden estar purificados o no purificados, y pueden estar compuestos de una mezcla de moléculas.

Las matrices sólidas son conocidas en la técnica, y se encuentran disponibles, e incluyen, pero no se limitan a, poliestireno, polietileno, polipropileno, policarbonato o cualquier material plástico sólido en forma de tubos de ensayo, perlas, micropartículas, varillas medidoras, placas o similares. Además, las matrices incluyen, pero no se limitan a, membranas, placas de microvaloración de 96 pocillos, tubos de ensayo y tubos Eppendorf. En general, tales matrices comprenden cualquier superficie a la que se pueda unir un agente de unión a ligandos o una superficie que proporcione un sitio de acoplamiento a ligandos.

Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar la presente invención, pero no deben ser considerados, bajo ningún concepto, como restrictivos del alcance de la misma. Los expertos en la técnica reconocerán que es posible realizar numerosos cambios y sustituciones sin alejarse del espíritu ni del ámbito de la invención.

Ejemplos

A. Cepas bacterianas, medios de crecimiento y condiciones de cultivo

La cepa de estreptococos del grupo B de tipo Ib H36b (ATCC 12401) fue obtenida de la Colección Americana de Cultivos Tipo (Rockville, MD). El resto de las cepas usadas, 090 (tipo Ia), 18RS21 (tipo II), M781 (tipo III) y 1169-NT I (tipo V), fueron proporcionadas amablemente por D. L. Kasper, Harvard Medical School. Las *Neisseria meningitidis* de tipo a, C, Y y W135 fueron proporcionadas amablemente por Carl Frasch de CBER, FDA, y la *Escherichia coli* K1 fue proporcionada amablemente por Willie Vann de CBER, FDA.

Cada una de las cepas de estreptococos del grupo B fue cultivada individualmente en líquido de diáisisis (membrana con un límite de peso molecular nominal (NMWL) de 10.000), un sistema de cassetes Pellicon (Millipore Corp., Bedford, MA) de caldo Columbia al 3,5% (Difco Laboratories, Inc., Detroit, MI) complementado con glucosa al 6%. Se usaron 150 ml de cultivo de siembra desarrollado durante 8 h en un matraz de agitación Erlenmeyer a 37°C para inocular un fermentador de 20 litros Bioflo IV (New Brunswick Scientific Co., Edison, NJ) llenado con 14 litros de caldo (*supra*). Se mantuvo el cultivo de fermentación a 37°C, ajustado de manera continua hasta un pH 7,1 con la adición de NaOH 10N y aireado a 1,5 l/min. Se cosecharon las células tras 17 h mediante microfiltración a través de un cartucho de fibra hueca de porosidad de 0,2 µm MiniKros (Microgon, Inc., Laguna Hills, CA). El sobrenadante del cultivo se mantuvo en condiciones estériles a 4°C hasta que se continuó con su procesamiento. Los sedimentos celulares finales se obtuvieron por centrifugación de células separadas a 9.000 rpm en un rotor GSA de Sorvall (DuPont Clinical & Instruments Div., Wilmington, DE) durante 50 min.

B. Procedimiento general para producir polisacáridos capsulares

1. Extracción y cromatografía de interacción hidrófoba

Se suspendieron los sedimentos en cuatro volúmenes de NaOH 1N usando el peso húmedo en gramos de la pasta celular como un volumen. Se incubó la suspensión a 37°C durante una noche. Se retiraron los restos celulares mediante centrifugación durante 30 min a 12.000 rpm en un rotor GSA de Sorvall. Tras la neutralización con HCl concentrado (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ), se diafiltró el sobrenadante frente a NaHCO₃ 2N (pH 9,6) usando una membrana con un NMWL de 10.000 de Pellicon. Entonces se cargó el concentrado resultante sobre una columna 26/60 XK de Pharmacia empaquetada con fenil-sefarosa HP (Pharmacia Biotech; Piscataway, NJ), se pre-equilibró con NaHCO₃ 2N, usando el sistema de cromatografía preparativa de Pharmacia descrito más adelante. Primero se eluyó la columna a 4 ml/min con un volumen de columna de NaHCO₃ 2N seguido por dos volúmenes de columna de agua. Se analizaron las fracciones en cuanto al polisacárido (*infra*) y se mezclaron las que contenían polisacárido capsular.

También se purificaron polisacáridos capsulares de los sobrenadantes del cultivo. Tras la eliminación de las células, se concentró el caldo de 10-15 veces (Pellicon, usando membrana con un NMWL de 10.000) y se diafiltró frente a 10 volúmenes de agua. Al concentrado resultante, se añadió NaOH 10N hasta una concentración final de 1M. Se incubó esta solución a 37°C durante una noche y se neutralizó con HCl concentrado. El procesamiento continuó según lo descrito anteriormente para la extracción celular.

Para un lote de polisacárido capsular de tipo III, se extrajeron conjuntamente las células y el sobrenadante del cultivo como se explica a continuación. Se concentró y se diafiltró el sobrenadante del cultivo, separado de las células, y se trató el concentrado con una base según lo descrito anteriormente. Se suspendió el sedimento celular en cuatro volúmenes del concentrado tratado con la base, y se siguió procesando según lo descrito anteriormente para la extracción celular (*supra*).

2. Re-N-acetilación

Debido a que la exposición del polisacárido a las condiciones de extracción descritas anteriormente libera los grupos N-acetilo de los polisacáridos, se volvieron a N-acetilar los polisacáridos mediante la adición en gotas de anhídrido acético (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI) a las fracciones mezcladas a una concentración final de 0,8M. Se agitó esta mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 1 h y se mantuvo a un pH 9 con la adición de NaOH 10N. Entonces se aumentó el pH de la reacción hasta 13, y se continuó con la reacción durante 30 min más. Se diafiltró la solución que contenía polisacárido capsular re-N-acetilado frente a agua usando un sistema de cassetes Minitan (membrana NMWL 10.000, Millipore) y se liofilizó el concentrado. Se volvió a disolver el concentrado liofilizado en PBS

ES 2 346 022 T3

(pH 7,4) y se purificó mediante cromatografía de permeación en gel sobre Superdex 200 PG (*infra*). Las fracciones que contenían polisacárido se mezclaron, se diafiltraron frente a agua (*supra*) y se liofilizó el concentrado para producir PC purificado.

5 3. Cromatografía de permeación en gel

La cromatografía analítica de permeación en gel (GPC) se realizó sobre un sistema de FPLC de Pharmacia dotado de un detector ultravioleta UV-1 de Pharmacia (con un filtro de 280 nm), un refractómetro diferencial R401 de Waters Corp. (Milford, MA) y una columna 10/30 6 HR de Superosa de Pharmacia (agarosa en perlas muy entrecruzada). Se eluyó la columna a 0,5 ml/min con PBS, pH 7,4. Se usó dextrano (aprox. 2×10^6 de peso molecular; Sigma Chem Co., St. Louis, MO) para determinar el volumen hueco (V_o) y se usó azida de sodio para determinar el volumen total del lecho (V_t). Los volúmenes de elución relativos se expresan como $K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$, en la que V_e es el volumen de elución del perfil de RI. La GPC preparativa se realizó sobre un sistema de Pharmacia que comprendía los detectores anteriormente mencionados, una bomba P-50, un colector de fracciones FRAC-100, un controlador GP-250 Plus y una columna 26/100 XK empaquetada con Superdex 200 PG (Pharmacia). La columna se eluyó con PBS a 1 ml/min.

C. Análisis de los polisacáridos

1. Determinación de la masa molar

Las distribuciones de las masas molares absolutas de los polisacáridos se determinaron mediante GPC analítica con la detección mediante fotometría de difusión de luz láser multiangular en línea y refractometría diferencial (GPC-MALLS/RI). Este procedimiento se realizó en un sistema de cromatografía en fase líquida que constaba de una bomba de CLAR PU-980 de Jasco (Easton, MD), una válvula de inyección modelo 7125 de Rheodyne (Cotati, CA) y una columna 10/30 6 HR de Superosa equilibrada con PBS y con un caudal de 0,5 ml/min. La fase móvil se preparó en agua de pureza ultra alta (Stephens Scientific, Riverdale, NJ) y se filtró a través de un filtro en línea de diámetro de 25 mm (Millipore) dotado de una membrana de 0,22 mm de tipo GV de Millipore. Se disolvieron las muestras de polisacáridos (1-2 mg) a una concentración de 10 mg/ml en la fase móvil y se centrifugaron las soluciones resultantes durante 2 a 3 min a 14.000 rpm en un microcentrifugador para eliminar la materia en partículas antes de la inyección. Los efluentes de la columna se analizaron directamente con un fotómetro de difusión de luz láser de triple ángulo fijo miniDAWN en línea (Wyatt Technology Corp., Santa Bárbara, CA) acoplado a un refractómetro diferencial modelo 1047A de Hewlett-Packard. La salida de la señal analógica del refractómetro se conectó al miniDAWN a través de un canal de entrada auxiliar. Se recogieron los datos de difusión de la luz y se procesaron con los programas informáticos ASTRette y EASI de Wyatt. Se calculó la superficie máxima con los programas informáticos de Wyatt como la suma total de las superficies de 200-300 divisiones trapezoides o "rodajas" en el intervalo completo de un máximo. A partir de la superficie así obtenida, se calcularon las masas molares medias en peso y las masas molares medias en número (M_p y M_n , respectivamente) de un polisacárido obtenido mediante la elución de un máximo dado. El incremento del índice de refracción específico (dn/dc) para todos los polisacáridos fue determinado en 0,140 ml/g usando el refractómetro HP 1047A en línea. Este valor era comparable a los valores obtenidos previamente para otros polisacáridos (7, 8, 38).

2. Espectroscopia de RMN

Se registraron espectros de ^1H -RMN unidimensionales de las muestras de polisacáridos (4-5 mg/ml) en D_2O (Aldrich) a 500 MHz en un espectrómetro AMX 500 de Bruker Instruments (Billerica, MA). Los datos espectrales se obtuvieron a 50°C y los desplazamientos químicos se relacionaron con 2,2,3,3-tetradeterio-3-(trimetilsilil)propionato externo (Aldrich) en D_2O .

3. Análisis químicos

Se determinó el contenido de polisacáridos en los efluentes de la columna preparativa y en los polisacáridos purificados mediante una modificación del análisis con orcinol a microescala de Reuter y Schauer (35) para el ácido siálico. En síntesis, se añadieron 100 μl de muestra o de control que contenían 1-1,5 μg de patrón de NeuAc o hasta 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de polisacárido capsular purificado a 100 μl de reactivo de orcinol (35) en un tubo de microcentrifugación de 1,5 ml. Se mezclaron las muestras bien y se calentaron en un baño de agua hirviendo durante 15 min. Una vez enfriadas las muestras en agua con hielo durante 5 min, se añadieron 500 μl de alcohol isoamílico (Fluka Chemical Co., Ronkonkoma, NY) a cada muestra. Se mezcló bien la muestra y se centrifugó en un microcentrifugador a 3.000 rpm durante 2-3 min. Se repitió este procedimiento para garantizar la extracción completa del cromóforo en el alcohol. Se transfirió una porción de 200 μl de la fase alcohólica de cada muestra a una placa de microvaloración de poliestireno de unión baja y fondo plano de 96 pocillos (Coming Costar Corp., Cambridge, MA), y se leyó a 560 nm en un lector de microplacas Emax de Molecular Devices (Menlo Park, CA). A partir del contenido de ácido siálico, se obtuvo la pureza de las preparaciones de los polisacáridos finales, usando los siguientes pesos fórmula: 314,3 g/mol para el residuo de NeuAc terminal; 1.004 g/mol para la unidad de repetición de los PC de tipo Ia, Ib o III; 1.328 g/mol para la unidad de repetición de los PC de tipo II o V.

Se determinó el contenido proteico de las muestras que contenían 1-2 mg de polisacárido capsular por ml en PBS mediante el procedimiento de Bradford (9) usando reactivo Coomassie Plus de Pierce (Rockford, IL) e IgG de caballo como patrón. Se determinó el contenido de ácido nucleico mediante una fotometría UV directa a 260 nm. Las

ES 2 346 022 T3

mediciones fotométricas para estos análisis se realizaron con un espectrofotómetro de modelo UV160U de Shimadzu (Shimadzu Scientific Inst., Columbia, MD).

D. Rendimientos

En la Tabla 1, se muestran los rendimientos del polisacárido capsular obtenido a partir de los diversos serotipos de estreptococos del grupo B. Para todos los serotipos, el polisacárido purificado de los sedimentos celulares superó al de los sobrenadantes del cultivo, variando de un rendimiento 4 veces mayor para el tipo II a un rendimiento 60 veces mayor para el tipo Ib. A modo de comparación, en la Tabla 1, se proporcionan los rendimientos a partir del sobrenadante, así como a partir de las células, como los miligramos de polisacárido por litro de cultivo (mg/l). De este modo, si se consideran fermentaciones de 14 litros, los rendimientos totales a partir de las células variaron de 1,1 g para el tipo Ia a 0,6 g para el tipo II, mientras que los rendimientos totales a partir de los sobrenadantes variaron de 150 mg para el tipo II a 14 mg para el tipo Ib. Cuando se procesaron conjuntamente las células y el sobrenadante de una fermentación de tipo III, el rendimiento, 63 mg/l o 0,9 g totales, fue similar al obtenido únicamente a partir de los sedimentos celulares. La variación entre las cepas de estreptococos del grupo B estudiadas en las proporciones de las producciones aisladas de los polisacáridos capsulares a partir de las células con respecto a las de las obtenidas a partir de los sobrenadantes sugiere las diferentes tendencias entre los serotipos para liberar polisacáridos capsulares en las presentes condiciones de crecimiento. Las cantidades de los polisacáridos capsulares asociados a las células purificados mediante este procedimiento se aproximan a las cantidades encontradas a partir de las fermentaciones por lotes de las cepas de estreptococos del grupo B de los tipos Ia, III, IV, V y VI, deducibles a partir de los niveles de ácido siálico unido a las células (usado como marcador de polisacáridos capsulares) según lo publicado por von Hunoistein *et al.* (39). Cabría esperar que condiciones de extracción más rigurosas (p. ej., una base más fuerte, una temperatura mayor o la agitación de la mezcla de extracción) mejoren los rendimientos de los polisacáridos capsulares unidos a las células.

25

TABLA 1

Rendimientos de polisacárido capsular de estreptococo del grupo B		
Serotipo	Rendimiento a partir de sobrenadante (mg/l) ^A	Producción a partir de los sedimentos celulares (mg/l) ^A
Ia	4	79
Ib	1	64
II	11	42
III ^B	4	65
V	5	65

^A Los rendimientos se expresan en mg de polisacárido capsular purificado final por litro de cultivo de crecimiento.

^B Cuando se procesaron conjuntamente el caldo y las células, los estreptococos del grupo B de tipo III produjeron 63 mg/l.

Resultados

A. Análisis de los polisacáridos purificados

Para cada uno de los serotipos de estreptococos del grupo B estudiado, la espectrometría de ¹H-RMN unidimensional de las preparaciones de polisacáridos de ambos orígenes confirmó su identidad con los datos espectrales publicados previamente para los respectivos polisacáridos de cada tipo (41,44). Además, los espectros de RMN para todas estas preparaciones indicaron niveles muy bajos de contaminación. En las Figuras 1-5, se muestran los espectros de RMN representativos de los cinco polisacáridos de estreptococos del grupo B. Los niveles de ácidos nucleicos, detectados mediante fotometría UV directa a 260 nm, no superaron el 1% en masa, mientras que la proteína, analizada mediante el procedimiento de Bradford (9), no fue detectable en ninguna de las preparaciones de polisacáridos por encima del límite inferior de detección de este análisis (1 µg/ml). Las purezas de todos los polisacáridos, calculadas a partir de su contenido de ácido siálico, estimado mediante un análisis con orcinol a microescala modificado (35), fueron del aproximadamente 100%. Por consiguiente, para todas las preparaciones de polisacáridos obtenidas mediante el procedimiento descrito anteriormente, los datos espectrales y fotométricos coinciden con polisacáridos capsulares muy purificados con una contaminación mínima por proteínas o ácidos nucleicos.

B. Tamaño molecular de los polisacáridos

En la Tabla 2, se proporcionan los volúmenes relativos de elución (como K_{AV}) de los polisacáridos purificados sobre Superosa 6, tomados de los máximos de sus perfiles de GPC detectados por RI.

En análisis separados, se determinaron las distribuciones de las masas molares absolutas de los polisacáridos mediante GPC-MALLS/RI. Este procedimiento permite la estimación directa de la masa molar de macromoléculas, independientemente de parámetros cromatográficos tales como el caudal o el volumen de retención, y sin la necesidad de patrones secundarios cuyas propiedades hidrodinámicas puedan variar enormemente del analito de interés. La utilidad de la GPC-MALLS/RI como procedimiento de caracterización está bien establecida para los polisacáridos de interés farmacéutico (7, 8, 10, 17, 25). Las distribuciones de las masas molares se presentan habitualmente como la masa molar media en peso (M_p) y la polidispersidad (M_p/M_n), que es indicadora de la amplitud de la distribución. Como la polidispersidad se aproxima a la unidad, la distribución de las masas molares se aproxima a la homogeneidad.

En la Tabla 2, se proporcionan los datos de las masas molares para los polisacáridos de estreptococos del grupo B purificados. Para cada uno de los serotipos, las distribuciones de las masas molares para las preparaciones de polisacáridos de ambos orígenes fueron similares. Las masas molares medias en peso de estas preparaciones variaron de 92 kg/ml para los polisacáridos capsulares asociados a células del tipo V a 318 kg/ml para los polisacáridos capsulares de tipo Ia purificados del sobrenadante de cultivos. Las distribuciones de todas las preparaciones fueron limitadas, según lo indicado por sus bajos valores de polidispersidad ($M_p/M_n \leq 1,6$). Estos valores fueron comparables con los obtenidos mediante análisis similares de polisacáridos capsulares de varios serotipos de *S. pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* de tipo b (7, 17).

25

TABLA 2

Caracterización bioquímica y biofísica de los polisacáridos capsulares de estreptococos del grupo B purificados					
Serotipo	K_{av}	M_p (kg/ml) ^A	Polidispersidad M_p/M_n	Contenido de ácido nucleico (%)	Contenido de proteína (%)
Ia (S) ^B	0,005	318	1,35	0,23	0,21
Ia (C) ^C	0,010	311	1,31	0,15	< 0,01
Ib (S)	0,191	170	1,20	0,95	< 0,01
Ib (C)	0,150	218	1,61	0,33	< 0,01
II (S)	0,152	246	1,46	0,13	< 0,01
II (C)	0,115	289	1,46	0,12	< 0,01
III (S)	0,343	ND	ND	0,58	< 0,01
III (C)	0,268	108	1,24	0,10	< 0,01
III (S + C)	0,272	104	1,22		
V (S)	0,257	92	1,28	0,26	0,27
V (C)	0,156	179	1,15	0,17	0,09
V (C)	0,241	99	1,20		

^A Los datos de masas molares se determinaron mediante GPC-MALLS/RI

^B (S) indica que el polisacárido fue purificado de subrenadantes

^C (C) indica que el polisacárido fue purificado de sedimentos celulares

65

Consideradas junto con los datos espectrales de RMN, las distribuciones de masas molares indican que, para cada serotipo, las diferencias entre los polisacáridos purificados de sobrenadantes o de sedimentos celulares (así como de ambas fuentes combinadas, para el tipo III) no son relevantes. Como los espectros de RMN para las preparaciones de cada serotipo indican que son químicamente idénticas, también se prevé que el comportamiento inmunoquímico de estas preparaciones sea idéntico. Por lo tanto, la decisión de combinar el sobrenadante de los cultivos con las células para la extracción sólo se basa en la contribución que se espera que el sobrenadante haga a la producción (Tabla 1). Por tanto, puede ser preferible usar un extracto combinado de tipo II.

Analistas inmunoquímicos

A. ELISA de inhibición competitiva

Se revistieron pasivamente placas de microvaloración (Nunc Polysorp) bien con PEGB_{Ia}-ASH, PEGB_{Ib}-ASH, PEGB_{II}-ASH, PEGB_{III}-ASH o PEGB_V-ASH (100 ng de polisacárido en 100 µl a cada pocillo) diluido en PBS (fósforo 10
15 de sodio 50nM, NaCl 150mM, pH = 7,4) durante 1 h a 37°C. Una vez lavadas las placas con PBS + Tween 20 al 0,05% (PBS-Tween, pH = 7,4), se bloquearon con 150 µl/pocillo de PBS + albúmina de suero bovino al 0,1%. Tras el post-revestimiento, se volvieron a lavar las placas y se almacenaron a 4°C hasta su uso.

Se valoraron por separado antisueros de conejo contra estreptococos del grupo B de células enteras dirigidos contra 20 PEGB_{Ia}, PEGB_{Ib}, PEGB_{II} y PEGB_{III} (Dennis Kasper) en placas revestidas con PEGB_{Ia}-ASH, PEGB_{Ib}-ASH, PEGB_{II}-ASH y PEGB_{III}-ASH, respectivamente. De manera similar, se valoró antisuero de conejo contra PEGB_V-TT en una 25 placa revestida con PEGB_V-ASH. Se eligió la dilución correspondiente a aproximadamente un 50% de la señal máxima como la apropiada para los estudios de inhibición.

Se diluyeron los antisueros en PBS-Tween. Se diluyeron los inhibidores cinco veces en serie en tampón que contenía 30 los antisueros diluidos. A continuación, se añadieron 100 µl de estas muestras a los pocillos de las placas de microvaloración revestidas por duplicado y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h. Tras lavarlas, se añadieron a cada pocillo 100 µl de conjugado de cabra frente a inmunoglobulina de conejo-rábano picante (Kirkegaard & Perry) diluido en PBS-Tween según las instrucciones del fabricante. Se incubaron las placas a temperatura ambiente y luego se volvieron a lavar. Se añadieron los 100 µl de sustrato TMB microwell (n.º de cat. 50-76-04, Kirkegaard & Perry) a cada pocillo. Se detuvo la reacción tras 5 min mediante la adición de 100 µl de solución de detención de un componente (n.º de cat. 50-85-04, Kirkegaard & Perry) y se leyó la absorbancia a 450 nm. La inhibición se determinó como el porcentaje de señal máxima conseguida con el antisuero diluido en ausencia de cualquier inhibidor.

B. Resultados

En las Figuras 5-10, se representan las curvas de inhibición de la unión para cada antisuero de EGB específico de tipo Ia, Ib, II, III, V con sus antígenos de P capsulares homólogos, respectivamente. Según lo demostrado por 40 estas curvas, cada antígeno de P bien extraído del sobrenadante de cultivo o del caldo, resultó tener propiedades de inhibición similares que indican su equivalencia antigenética. Por lo tanto, el procedimiento empleado para generar estos polisacáridos capsulares no afecta a su antigenicidad.

Referencias

1. Anderson, P., G. Peter, R. B. Johnson, L. H. Wetterlow y D. H. Smith. 1972. "Immunization of humans with polyribophosphate, the capsular antigen of *Haemophilus influenzae* type b". *J. Clin. Invest.* 51: 39-44.
2. Avery, O. T. y W. F. Goebel. 1931. "Chemo-immunological studies on conjugated carbohydrate-proteins V. The immunological specificity of an antigen prepared by combining the capsular polysaccharide of type 3 pneumococcus with foreign protein". *J. Exp. Med.* 54: 437-447.
3. Baker, C. J. y D. L. Kasper. 1985. "Group B streptococcal vaccines". *Rev. Inf. Dis.* 7: 458-467.
4. Baker, C. J., M. A. Rench, M. S. Edwards, R. J. Carpenter, B. M. Hays y D. L. Kasper. 1988. "Immunization 55 of pregnant women with a polysaccharide vaccine of group B *Streptococcus*". *N. Engl. J. Med.* 319: 1180-1185.
5. Baker, C. J., M. A. Rench y D. L. Kasper. 1990. "Response to Type III polysaccharide in women whose infants have had invasive Group B streptococcal infection". *New Engl. J. Med.* 322: 1857-1860.
6. Baltimore, R. S., D. L. Kasper y J. Vecchitto. 1979. "Mouse protection test for group B *Streptococcus* type III". *J. Infect. Dis.* 140: 81-86.
7. Bednar, B. y J. P. Hennessey. 1993. "Molecular size analysis of capsular polysaccharide preparations from *Streptococcus pneumoniae*". *Carbohydr. Res.* 243: 115-130.
8. Beri, R. G., J. Walker, E. T. Reese y J. E. Rollings. 1993. "Characterization of chitosans via coupled size-exclusion chromatography and multiple-angle laser light-scattering technique". *Carbohydr. Res.* 238: 11-26.

ES 2 346 022 T3

9. **Bradford, M. M.**, 1976. "A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Analyt. Biochem.* 72: 248-254.
- 5 10. **D'Ambra, A. J., J. E. Baugher, P. E. Concannon, R. A. Pon y F. Michon.** 1997. "Direct and indirect methods for molar-mass analysis of fragments of the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b". *Anal. Biochem.* (En prensa).
- 10 11. **Dick, W. E., Jr. y M. Beurret.** 1989. "Glycoconjugates of bacterial carbohydrate antigens". p. 48-114. En: J. M. Cruse y R. E. Lewis, Jr., "Contributions to microbiology and immunology". S. Karger, Basel.
- 15 12. **Dillon, H. C., Jr., S. Khare y B. M. Gray.** 1987. "Group B streptococcal carriage and disease: A 6-year prospective study". *J. Pediat.* 110: 31-36.
- 15 13. **Goebel, W. F. y O. T. Avery.** 1931. "Chemo-immunological studies on conjugated carbohydrate-proteins IV. The synthesis of the p-aminobenzyl ether of the soluble specific substance of type 3 pneumococcus and its coupling with protein". *J. Exp. Med.* 54: 431-436.
- 20 14. **Gold, R., M. L. Lepow, I. Goldschneider, T. L. Draper y E. C. Gotschlich.** 1975. "Clinical evaluation of group A and group C meningococcal polysaccharide vaccines in infants". *J. Clin. Invest.* 56: 1536-1547.
- 20 15. **Gold, R., M. L. Lepow, I. Goldschneider y E. C. Gotschlich.** 1977. "Immune response of human infants to polysaccharide vaccines of Groups A and C *Neisseria meningitidis*". *J. Infect. Dis.* 136S: S31-S35.
- 25 16. **Gold, R. M., M. L. Lepow, I. Goldschneider, T. F. Draper y E. C. Gotschlich.** 1978. "Antibody responses of human infants to three doses of group A *Neisseria meningitidis* vaccine administered at two, four and six months of age". *J. Infect. Dis.* 138: 731-735.
- 30 17. **Hennessey, J. P., B. Bednar y V. Manam.** 1993. "Molecular size analysis of *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide". *J. Liq. Chromat.* 16: 1715-1729.
- 30 18. **Howard, J. G., G. H. Christie, B. M. Courtenay, E. Leuchars y A. J. S. Davies.** 1971. "Studies on immunological paralysis. VI. Thymic-independence of tolerance and immunity to type III pneumococcal polysaccharide". *Cell. Immunol.* 2: 614-626.
- 35 19. **Jennings, H. J., E. Katzenellenbogen, C. Lugowski y D. L. Kasper.** 1983. "Structure of the native polysaccharide antigens of type la and type Ib Group B *Streptococcus*". *Biochemistry* 22: 1258-1263.
- 40 20. **Jennings, H. J., K.-G. Rosell y D. L. Kasper.** 1980. "Structural determination and serology of the native polysaccharide antigen of type III group B *Streptococcus*". *Can. J. Biochem.* 58: 112-120.
- 40 21. **Jennings, H. J., K.-G. Rosell y D. L. Kasper.** 1980. "Structure and serology of the native polysaccharide antigen of type la group B *Streptococcus*". *Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU.* 77: 2931-2935.
- 45 22. **Jennings, H. J., K.-G. Rosell, E. Katzenellenbogen y D. L. Kasper.** 1983. "Structural determination of the capsular polysaccharide antigen of type II Group B *Streptococcus*". *J. Biol. Chem.* 258: 1793-1798.
- 45 23. **Jennings, H. J. y R. K. Sood.** 1994. "Synthetic glycoconjugates as human vaccines". p. 325-371. En: Y. C. Lee y R. T. Lee, "Neoglycoconjugates: Preparation and applications". Academic Press, Nueva York.
- 50 24. **Kasper, D. L., C. J. Baker, R. S. Baltimore, J. H. Crabb, G. Schiffman y H. J. Jennings.** 1979. "Immunodeterminant specificity of human immunity to type III group B *Streptococcus*". *J. Exp. Med.* 149: 327-339.
- 55 25. **Knobloch, J. E. y P. N. Shaklee.** 1997. "Absolute molecular weight of low-molecular-weight heparins by size-exclusion chromatography with multiangle laser light scattering detection". *Anal. Biochem.* 245: 231-241.
- 55 26. **Lancefield, R. C.** 1933. "A serological differentiation of human and other groups of haemolytic streptococci". *J. Exp. Med.* 57: 571-595.
- 60 27. **Lancefield, R. C.** 1938. "A micro-precipitin technique for classifying hemolytic streptococci and improved methods for producing antigen". *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 38: 473-478.
- 60 28. **Lancefield, R. C., M. McCarty y W. N. Everly.** 1975. "Multiple mouse-protective antibodies directed against group B streptococci: Special reference to antibodies effective against protein antigens". *J. Exp. Med.* 142: 165-179.
- 65 29. **Madoff, L. C., L. C. Paoletti, J. Y. Tai y D. L. Kasper.** 1994. "Maternal immunization of mice with Group B streptococcal type III polysaccharide-beta C protein conjugate elicits protective antibody to multiple serotypes". *J. Clin. Invest.* 94: 286-292.

30. **Marques**, M. B., D. L. **Kasper**, A. **Shroff**, F. **Michon**, H. J. **Jennings** y M. R. **Wessels**. 1994. "Functional activity of antibodies to the group B polysaccharide of group B streptococci elicited by a polysaccharide-protein conjugate vaccine". *Infect. Immun.* 62: 1593-1599.
- 5 31. **Mäkelä**, P. R. H., H. **Peltola**, H. **Kayhty**, et al. 1977. "Polysaccharide vaccines of group A *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae* type b: A field trial in Finland". *J. Infect. Dis.* 136: S43-50.
- 10 32. **Michon**, F., J. R. **Brisson**, A. **Dell**, D. L. **Kasper** y H. J. **Jennings**. 1988. "Multiantennary group-specific polysaccharide of group B *Streptococcus*". *Biochem.* 27: 5341-5351.
33. **Peltola**, A., H. **Käyhty**, A. **Sivonen** y P. R. H. **Mäkelä**. 1977. "*Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide vaccine in children: A double blind field study of 100,000 vaccines 3 months to 5 years of age in Finland". *Pediatrics* 60: 730-737.
- 15 34. **Peltola**, H., P. R. H. **Mäkelä**, H. **Jousimies**, et al. 1977. "Clinical efficacy of meningococcal group A vaccine in children three months to five years of age". *N. Engl. J. Med.* 297: 686-691.
- 20 35. **Reuter**, G. y R. **Schauer**. 1994. "Determination of sialic acids". p. 168-199. En: W. J. **Lennarz** y G. W. **Hart**, "Methods in Enzymology" Vol. 230 Techniques in Glycobiology. Academic Press, Nueva York.
36. **Robbins**, J. B. y R. **Schneerson**. 1990. "Polysaccharide-protein conjugates: A new generation of vaccines". *J. Infect. Dis.* 161: 821-832.
- 25 37. **Smith**, A. L. y J. **Haas**. 1991. "Neonatal Bacterial Meningitis". p. 313-333. En: W. M. Scheld, R. J. Whitley y D. T. Durack, "Infections of the Central Nervous System". Raven Press, Ltd., Nueva York.
38. **Tsunashima**, T., K. **Moro**, B. **Chu** y T.-Y. **Liu**. 1978. "Characterization of group C meningococcal polysaccharide by light-scattering spectroscopy. III. Determination of molecular weight, radius of gyration, and translational diffusional coefficient". *Biopolymers* 17: 251-265.
- 30 39. Von **Hunolstein**, C., L. **Nicolini**, S. **D'Ascenzi**, C. **Volpe**, G. **Alfarone** y G. **Orefici**. 1993. "Sialic acid and biomass production by *Streptococcus agalactiae* under different growth conditions". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38: 458-462.
- 40 35 40. **Wessels**, M. R., W. J. **Benedi**, H. J. **Jennings**, F. **Michon**, J. L. **DiFabio** y D. L. **Kasper**. 1989. "Isolation and characterization of type IV group B *Streptococcus* capsular polysaccharide". *Infect. Immun.* 57: 1089-1094.
41. **Wessels**, M. R., J. L. **DiFabio**, V. J. **Benedi**, et al. 1991. "Structural determination and immunochemical characterization of the type V group B *Streptococcus* capsular polysaccharide". *J. Biol. Chem.* 266: 6714-6719.
- 45 42. **Wessels**, M. R., L. C. **Paoletti**, D. L. **Kasper**, et al. 1990. "Immunogenicity in animals of a polysaccharide-protein conjugate vaccine against type III group B *Streptococcus*". *J. Clin. Invest.* 86: 1428-1433.
43. **Wessels**, M. R., L. C. **Paoletti**, A. K. **Rodewald**, et al. 1993. "Stimulation of protective antibodies against type la and Ib group B streptococci by a type la polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine". *Infect. Immun.* 61: 4760-4766.
- 50 44. **Wessels**, M. R., V. **Pozsgay**, D. L. **Kasper** y H. J. **Jennings**. 1987. "Structure and immunochemistry of an oligosaccharide repeating unit of the capsule polysaccharide of Type III Group B Streptococcus : A revised structure for the Type III Group B streptococcal polysaccharide antigen". *J. Biol. Chem.* 262: 8262-8267.
- 45 45. **Wyle**, S. A., M. S. **Artenstein**, B. L. **Brandt**, et al. 1972. "Immunologic response of man to group B meningococcal polysaccharide vaccines". *J. Infect. Dis.* 126: 514-522.

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de purificación de un polisacárido capsular de componentes celulares de bacterias Gram negativas y Gram positivas, en el que la purificación comprende:
- proporcionar para la extracción células bacterianas aisladas, sobrenadantes bacterianos concentrados de células bacterianas homogenizadas o medio acondicionado, o sedimentos celulares;
 - extraer el polisacárido capsular de los componentes celulares, componentes celulares que incluyen proteína y ácido nucleico, mediante la puesta en contacto de las células bacterianas aisladas, los sobrenadantes bacterianos concentrados de células bacterianas homogenizadas o medio acondicionado, o los sedimentos celulares, con un reactivo básico en un intervalo de pH de 9 a 14, mediante lo que se degrada el ADN o el ARN bacteriano; y
 - separar el polisacárido capsular extraído de las impurezas que resultan de los componentes celulares que comprenden proteínas y ácidos nucleicos, y recuperar los polisacáridos capsulares purificados.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que un porcentaje de los grupos *N*-acetilo presentes en el polisacárido capsular se hidroliza durante la extracción y luego se vuelve a acilar, de modo que el polisacárido capsular re-*N*-acilado recuperado tras la purificación genera la producción de anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con el polisacárido capsular nativo.
3. El procedimiento según la reivindicación 1 que comprende además las etapas:
- (a) separar opcionalmente el polisacárido capsular de las impurezas mediante cromatografía;
 - (b) hacer reaccionar el polisacárido capsular de la etapa (a) con un agente de acilación;
 - (c) purificar el polisacárido capsular de la etapa (b) mediante cromatografía.
4. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el pH es 12.
5. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el polisacárido capsular procede de cualquier bacteria del género *Streptococcus*.
6. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que polisacárido capsular procede de estreptococos del grupo B.
7. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que los polisacáridos capsulares proceden de estreptococos del grupo B de tipo Ia, Ib, II, III, V, VI y VIII.
8. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el reactivo básico comprende una base orgánica.
9. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el reactivo básico comprende una base inorgánica.
10. El procedimiento según la reivindicación 3, en el que el reactivo básico comprende NaOH, KOH o LiOH.
11. El procedimiento según la reivindicación 3, en el que la separación mediante la etapa de cromatografía es una cromatografía de interacción hidrófoba.
12. El procedimiento según la reivindicación 3, en el que el agente de acilación es anhídrido acético, cloruro de acetilo, acetato de pentafluorofenilo o acetato de 4-nitrofenilo.
13. El procedimiento según la reivindicación 3, en el que la purificación del polisacárido capsular mediante la etapa de cromatografía es una cromatografía de permeación en gel.
14. El procedimiento según la reivindicación 3, en el que el reactivo básico comprende una base inorgánica, la separación mediante la etapa de cromatografía es una cromatografía hidrófoba, el reactivo de acilación es anhídrido acético, cloruro de acetilo, acetato de pentafluorofenilo o acetato de 4-nitrofenilo, y la purificación del polisacárido capsular mediante la etapa de cromatografía es una cromatografía de permeación en gel.
15. El procedimiento según la reivindicación 3, en el que el reactivo básico comprende NaOH, la separación mediante la etapa de cromatografía implica Phenyl Sepharose®, el agente de acilación es anhídrido acético y la purificación del polisacárido capsular mediante la etapa de cromatografía implica Superdex®.

ES 2 346 022 T3

16. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el polisacárido capsular procede de cualquier bacteria del género *Neisseria*.
17. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el polisacárido capsular procede de *N. meningitidis* de tipo C.
18. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el que la etapa de separación es una separación cromatográfica.
19. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, que comprende además conjugar el polisacárido así purificado con un polipéptido o una proteína, mediante lo cual se produce una vacuna de conjugado de polisacárido.
20. El procedimiento según la reivindicación 19, en el que la conjugación se realiza introduciendo grupos aldehído terminales en el polisacárido capsular mediante escisión oxidativa de los dioles vecinales del polisacárido capsular, y luego conjugando los grupos aldehídos terminales con los grupos amino del polipéptido mediante una aminación reductora.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 346 022 T3

PC de EGB Ia

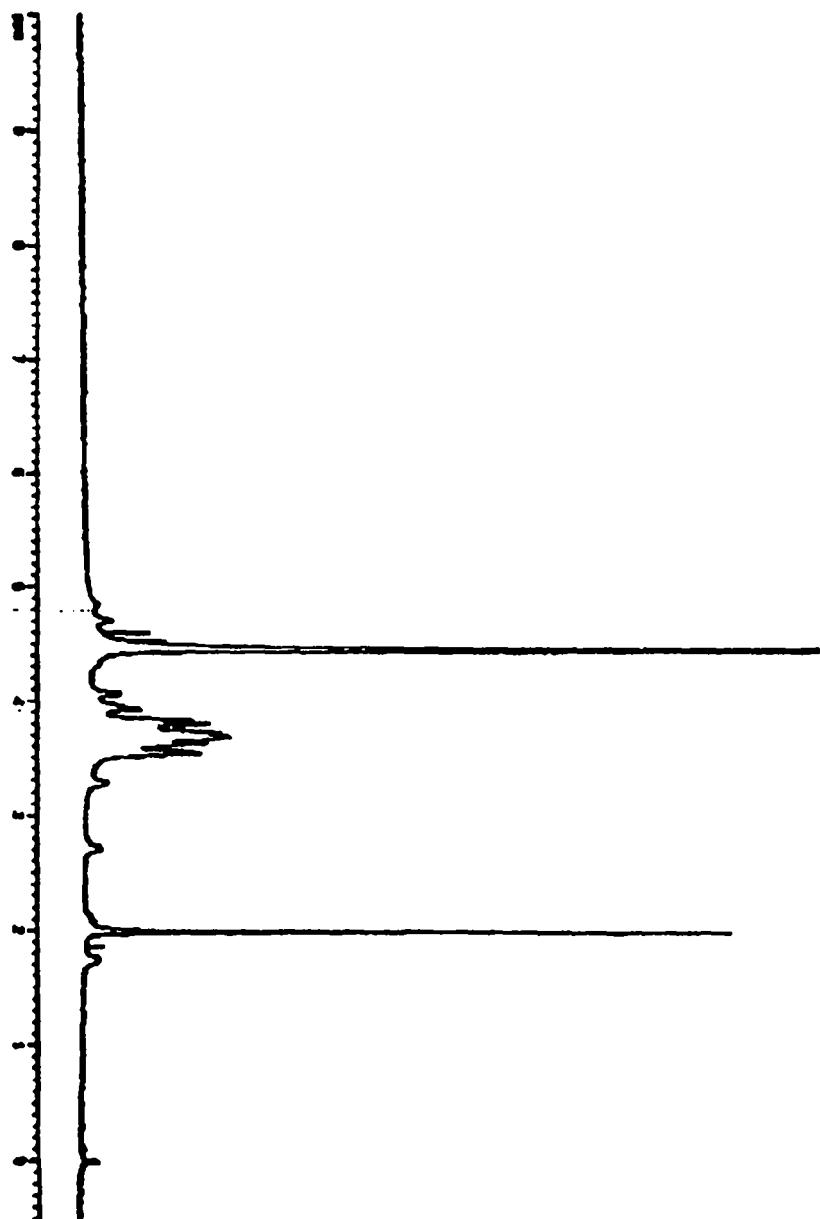


FIGURA 1

ES 2 346 022 T3

PC de EGB Ib

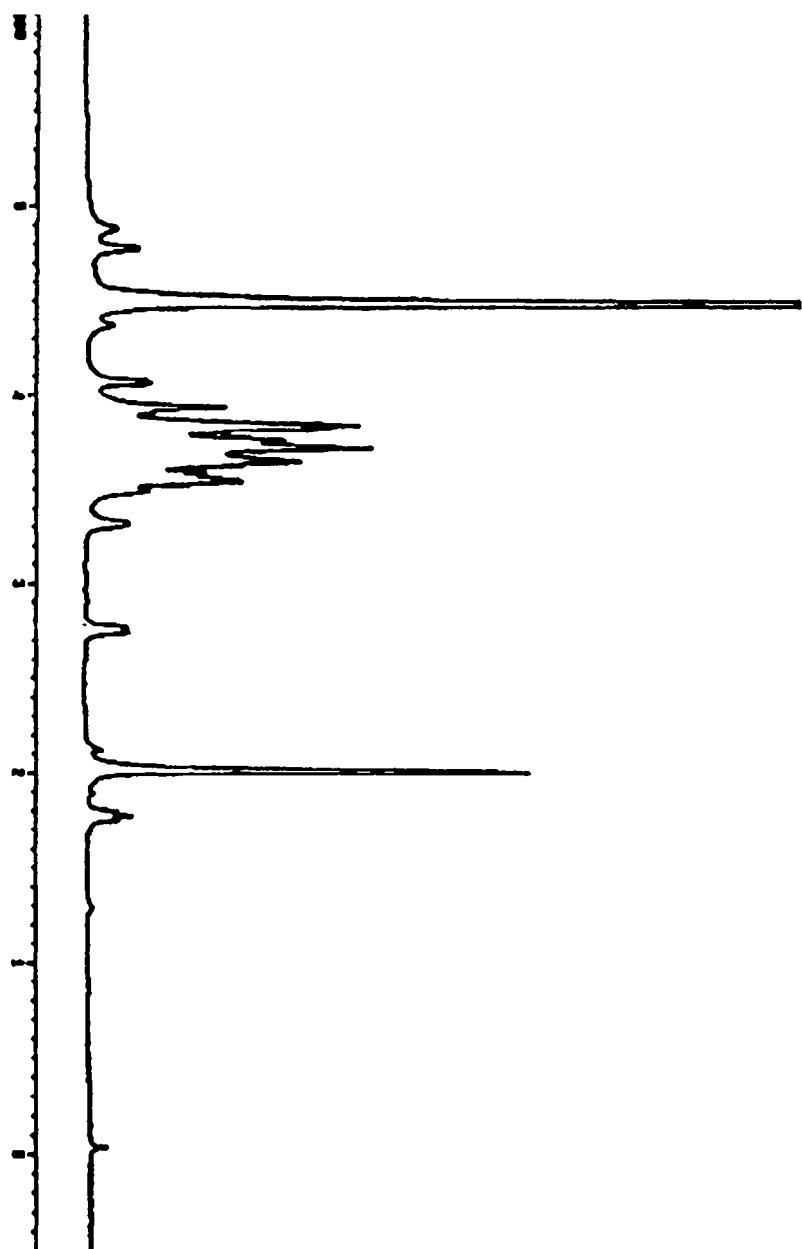
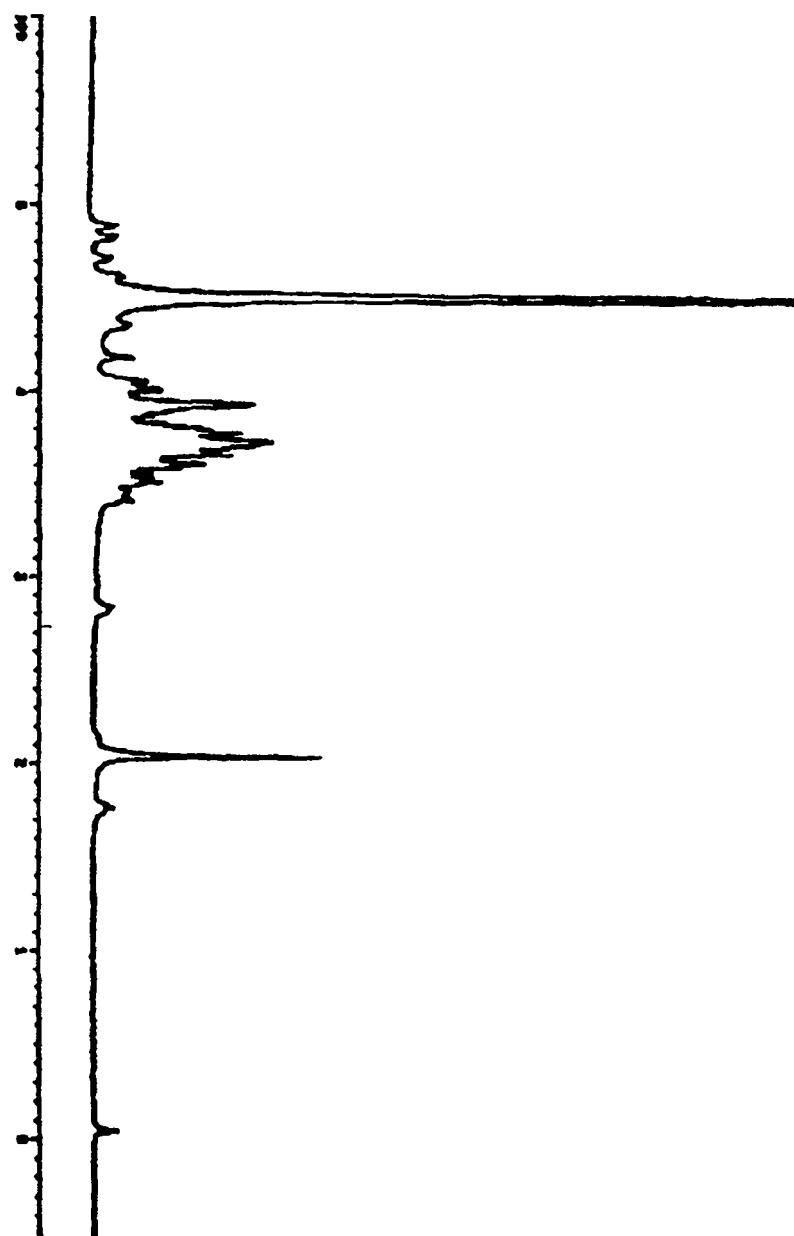


FIGURA 2

ES 2 346 022 T3



PC de EGB //

FIGURA 3

ES 2 346 022 T3

PC de EGB III

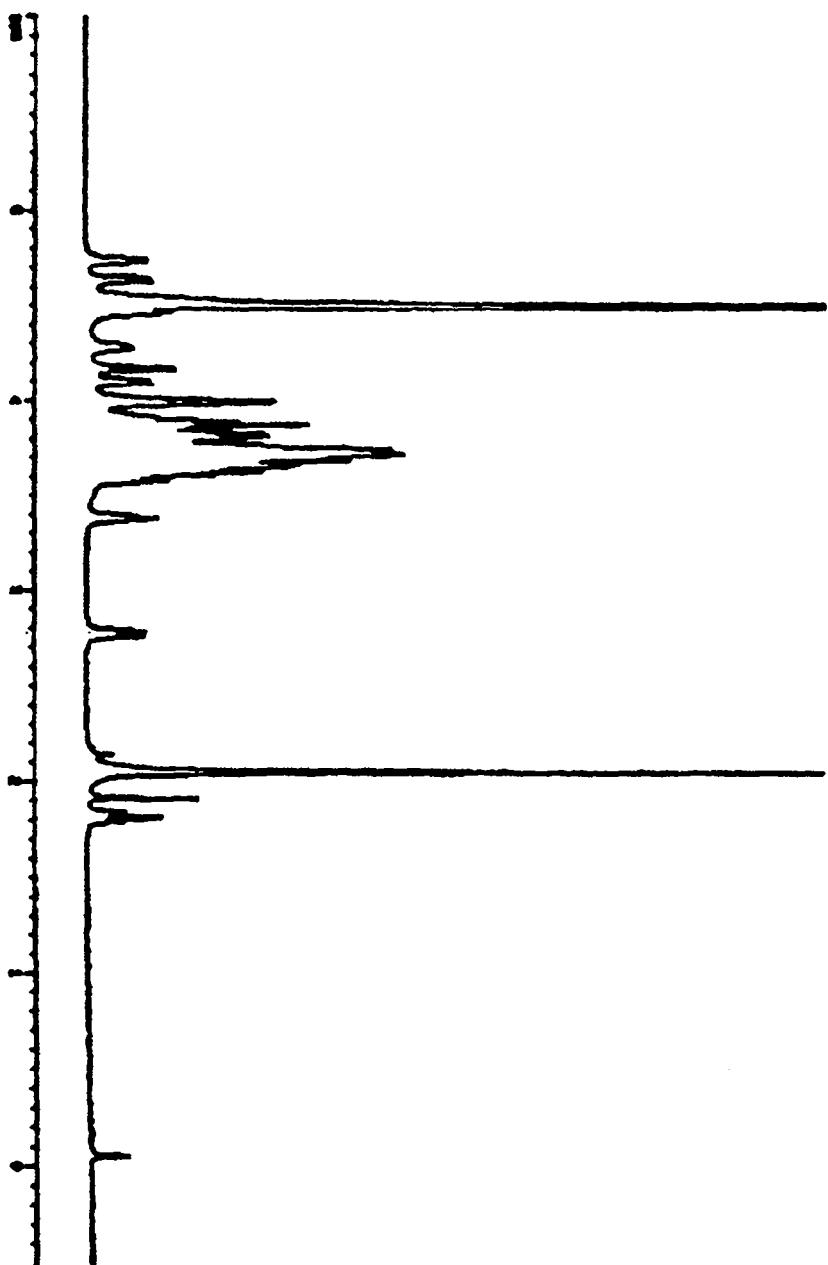
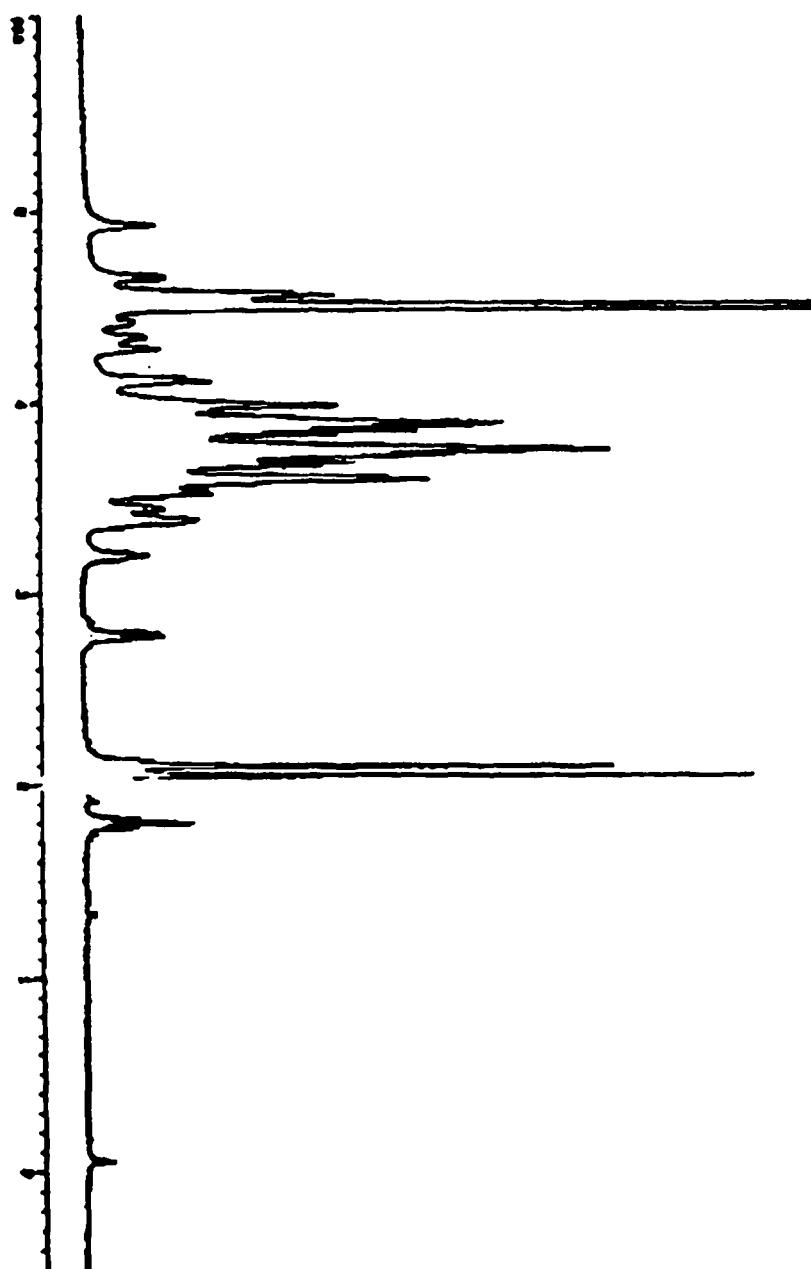


FIGURA 4



PC de EGB V

FIGURA 5

Inhibición de antisuero de conejo contra PEGBI_a sobre placa revestida de PEGBI_a-ASH

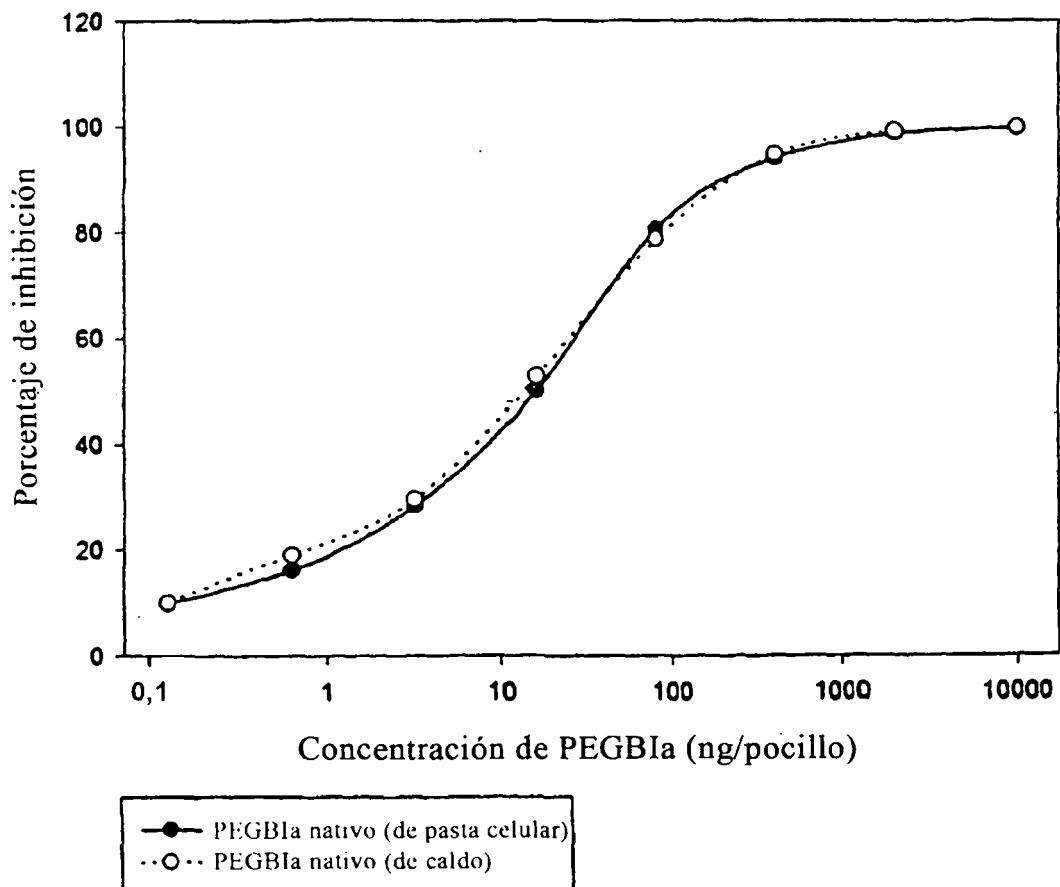
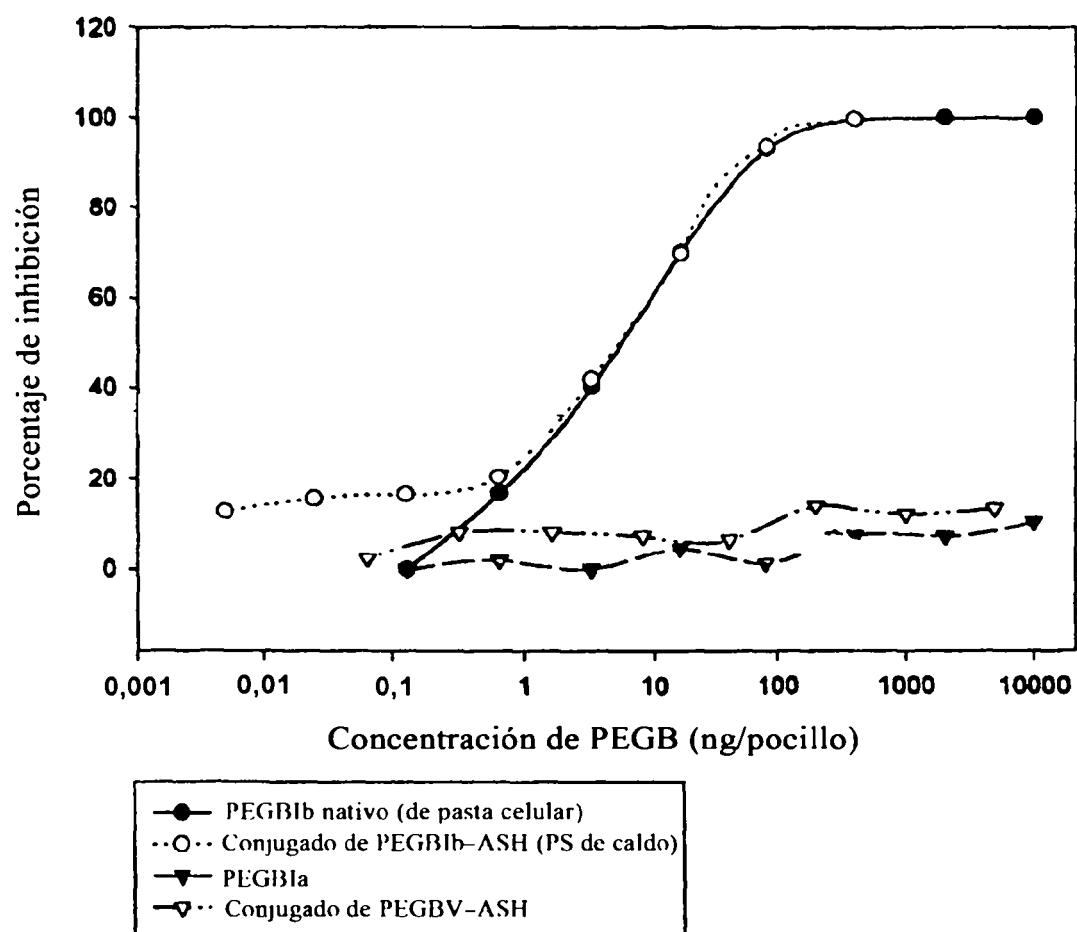


FIGURA 6

Inhibición de antisuero de conejo contra PEGB1b sobre placa revestida de PEGB1b-ASH

**FIGURA 7**

Inhibición de antisuero de conejo contra PEGBII sobre placa revestida de PEGBII-ASH

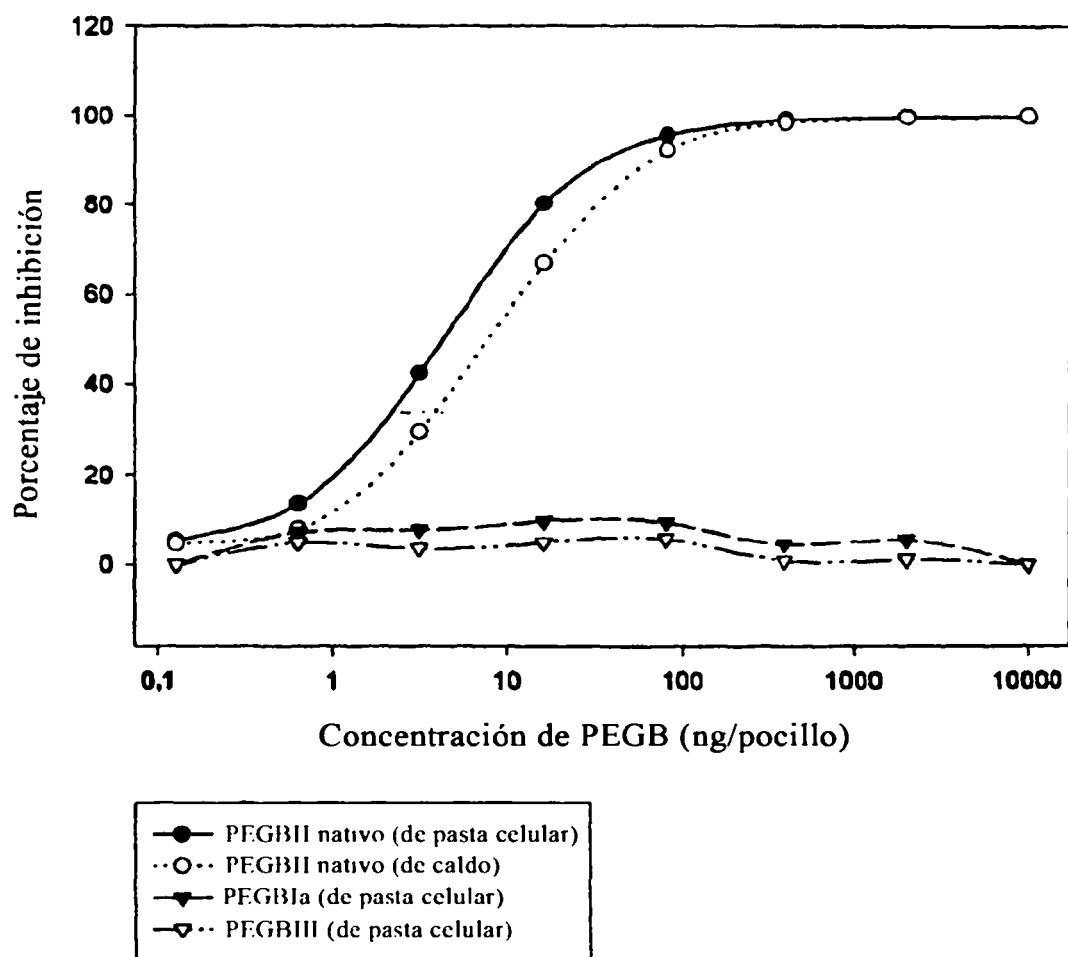


FIGURA 8

Inhibición de antisuero de conejo contra PEGBIII sobre placa revestida de PEGBIII-ASH

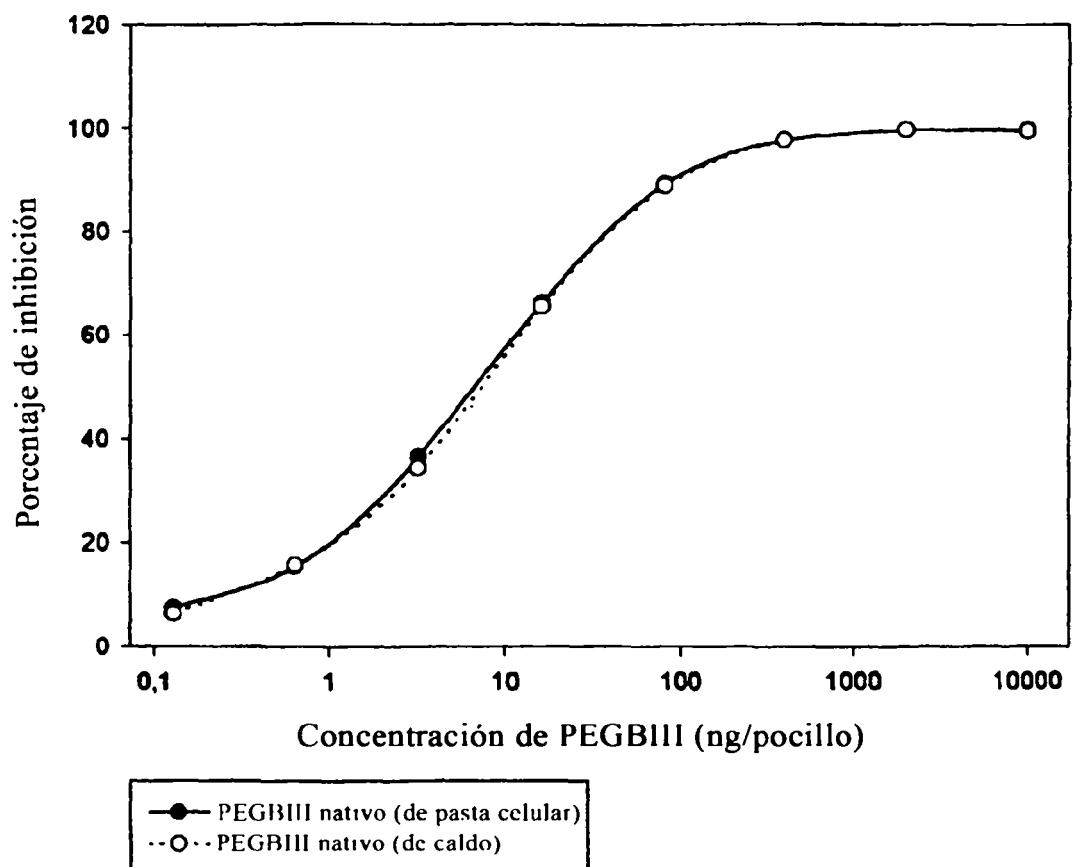


FIGURA 9

Inhibición de antisuero de conejo contra PEGBV-TT sobre placa revestida de PEGBV-ASH

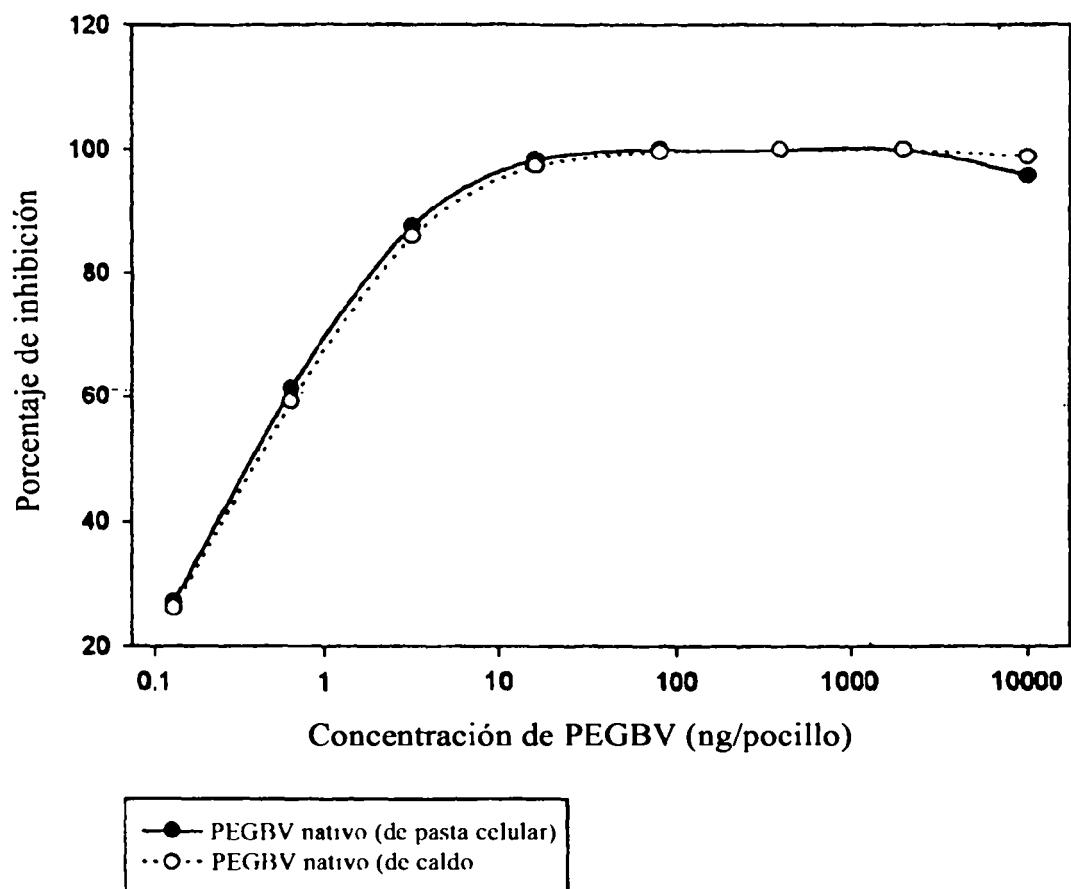


FIGURA 10

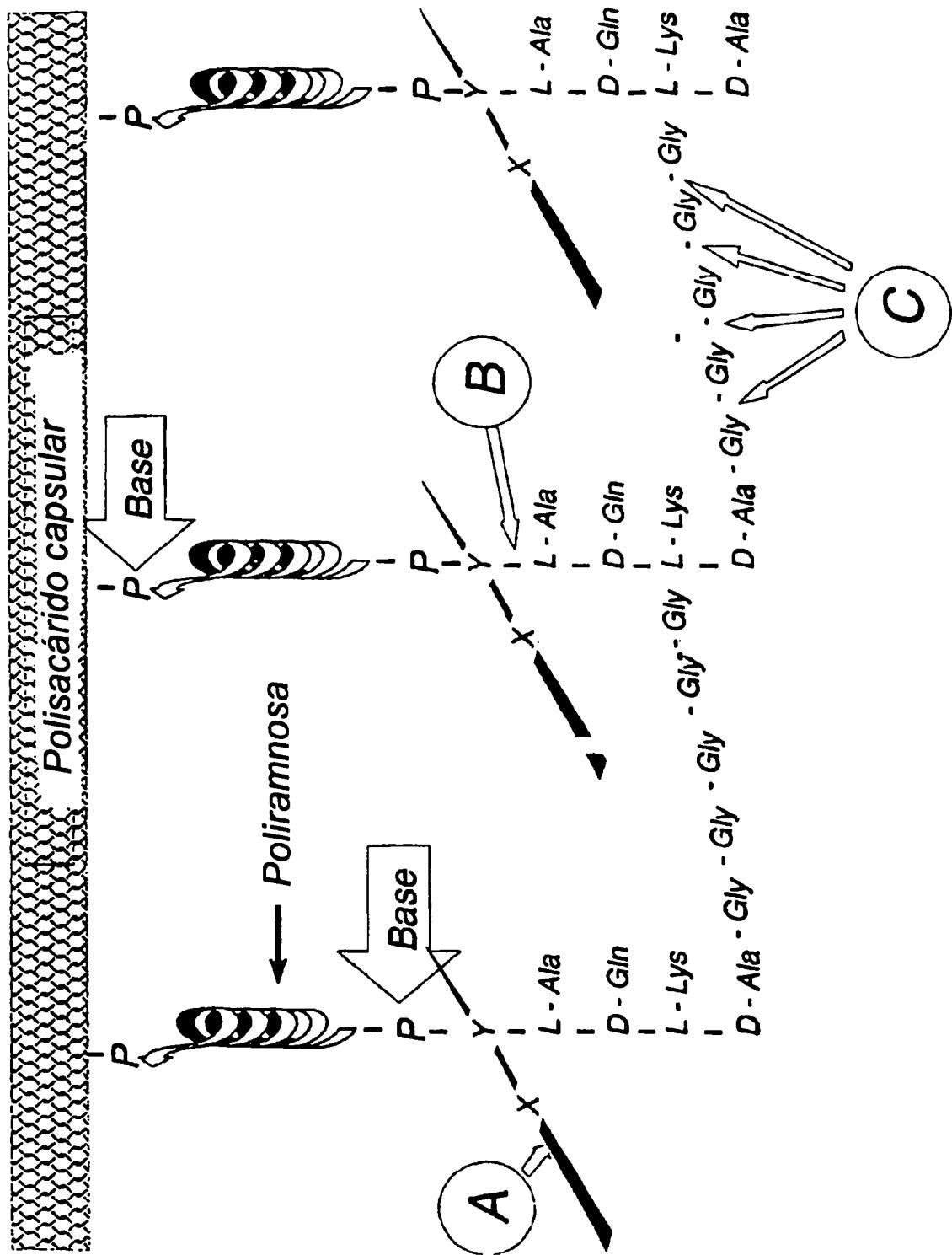


FIGURA 11

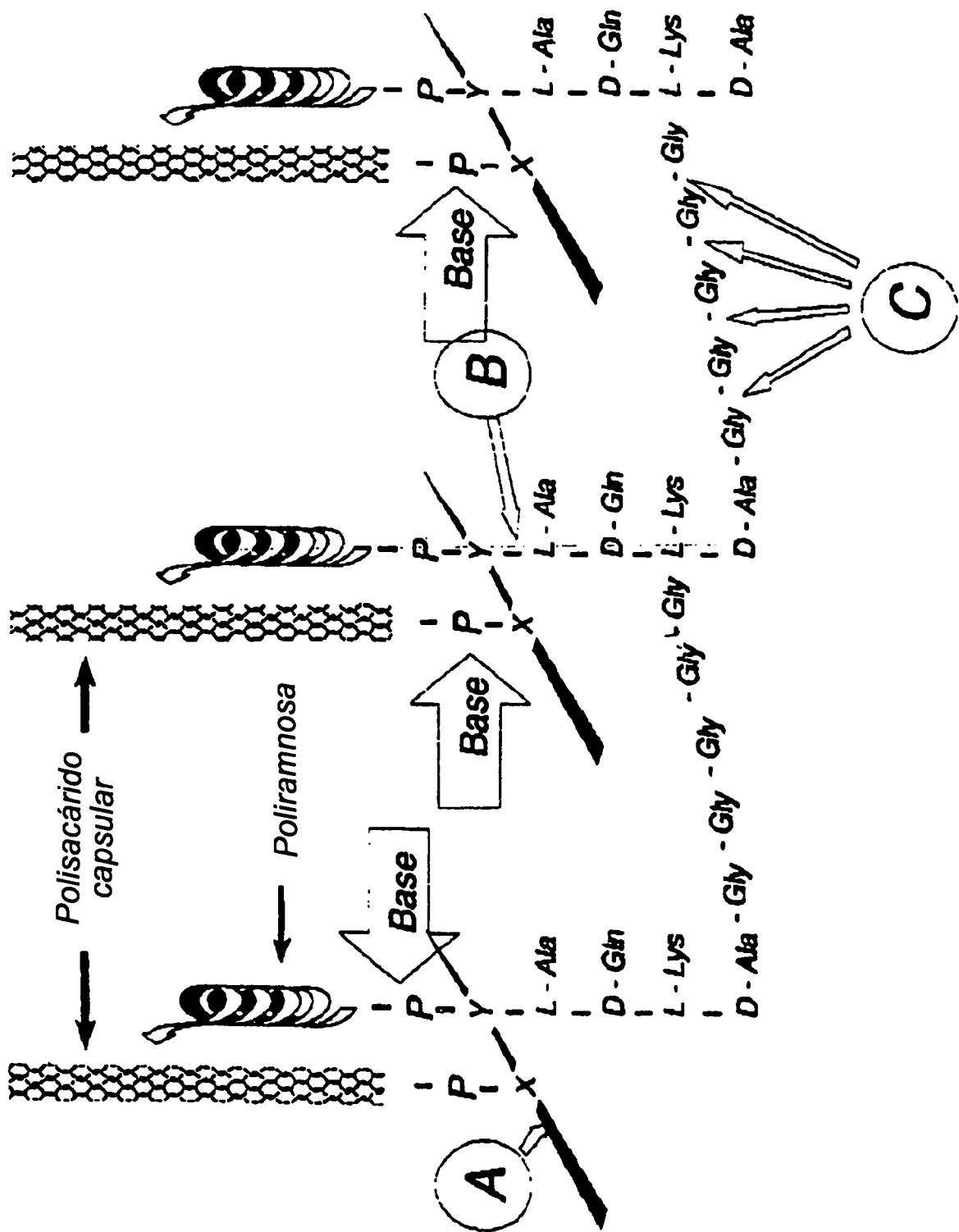


FIGURA 12