



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 320 334**

51 Int. Cl.:
A61K 47/48 (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03704133 .2**
96 Fecha de presentación : **24.02.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1476197**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.11.2004**

54 Título: **Uso de análogos de ácidos grasos para el tratamiento y/o prevención de enfermedades proliferativas de la piel.**

30 Prioridad: **22.02.2002 US 358384 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.05.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.05.2009

73 Titular/es:
NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA
1200 Montreal Road
Ottawa, Ontario K1A 0R6, CA

72 Inventor/es: **Jennings, Harold;**
Mieszala, Malgorzata;
Kogan, Grigorij;
Zou, Wei;
Richards, James, C.;
Cox, Andrew y
Moxon, Richard

74 Agente: **Sanz-Bermell Martínez, Alejandro**

ES 2 320 334 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

Uso de análogos de ácidos grasos para el tratamiento y/o prevención de enfermedades proliferativas de la piel.

5 Sector de la invención

La presente invención trata de vacunas conjugadas de proteína-lipopolisacárido, con una óptima presentación de epítopes de oligosacáridos que muestran mejores propiedades inmunogénicas tras su acoplamiento a proteínas portadoras por la región del lípido A.

10 Antecedentes de la invención

A pesar del tremendo éxito de las vacunas conjugadas de proteína-lipopolisacárido en la lucha contra las graves infecciones bacterianas provocadas por bacterias encapsuladas, no es posible aplicar dicha tecnología a algunos patógenos bacterianos importantes, debido al hecho de que ciertas bacterias patógenas no son encapsuladas. Pertenecen a dicha categoría la *Haemophilus influenza* no tipificable, principal agente causativo de las infecciones respiratorias y de otitis media en los niños. Además, algunas bacterias tienen polisacáridos capsulares que son poco inmunogénicos incluso cuando se conjugan. La cápsula de ácido polisialílico α 2-8 del grupo B *Neisseria meningitidis*, responsable de la mitad de los casos de meningitis meningocócica en el mundo occidental, es un caso en punto. Las bacterias Gram-negativas tienen una membrana exterior que consta de componentes que incluyen proteínas, lipoproteínas, fosfolípidos y glicolípidos. Los glicolípidos constan principalmente de endotoxinas de lipopolisacáridos (LPS). Los LPS son moléculas compuestas por a) una porción de Lípido A que consta de una disacárido de glucosamina sustituido con grupos de fosfatos y ácidos grasos de cadena larga en enlaces de éster y amida; b) un núcleo polisacárido unido con el Lípido A mediante un azúcar de ocho carbonos, Kdo (2-keto-3-ácido deoxioctulosónico) y suele contener heptosa, glucosa, galactosa y N-acetilglucosamina; y optativamente, c) cadenas laterales O-específicas compuestas por unidades de oligosacárido repetidoras que, en función del género y la especie de la bacteria, pueden contener manosa, galactosa, D-glucosa, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina, L-ramnosa o dideoxihexosa (abeciosa, colitosa, tivelosa, paratosa, trehalosa). En algunas ocasiones un LPS que carece de las cadenas laterales -O repetidoras se denomina lipopolisacárido de cadena corta o lipooligosacárido (LOS). En la presente aplicación los términos lipopolisacárido (o LPS) y lipooligosacárido (LOS) pueden ser utilizados de forma indistinta.

Se considera que los principales determinantes antigénicos de las bacterias Gram-negativas residen en la compleja estructura de carbohidratos de los LPS. Dichas estructuras de carbohidratos varían de forma significativa, incluso entre diferentes especies del mismo género de bacteria Gram-negativa, debido principalmente a las variaciones de uno o más de los siguientes factores: la composición de azúcares, la secuencia de oligosacáridos, el enlace entre las unidades monoméricas de los oligosacáridos, entre los mismos oligosacáridos, así como las sustituciones/modificaciones de los oligosacáridos.

El LPS es un componente bacteriano que ofrece posibilidades como inmunógeno de una vacuna por los determinantes antigénicos ("epítopes") que se hallan en sus estructuras de carbohidratos. Sin embargo, la naturaleza química de los LPS impide su uso en las formulaciones de vacunas, es decir, la inmunización activa con LPS es inaceptable debido a la toxicidad inherente de la porción de Lípido A en algunos animales. Los efectos patofisiológicos inducidos (directa o indirectamente) por el Lípido A de los LPS en el flujo sanguíneo incluyen fiebre, leucopenia, leucocitosis, la reacción Schwartzman, coagulación intravascular diseminada, aborto y a dosis mayores, conmoción y muerte.

Dada la falta de componentes de polisacáridos capsulares con los cuales sintetizar las vacunas conjugadas, se está investigando activamente el uso de los antígenos de carbohidratos alternativos como componentes de las vacunas conjugadas. Uno de dichos antígenos es el lipopolisacárido (LPS) o lipooligosacárido (LOS). Los LPS de *N. meningitidis* y *H. influenzae* no tipificable se incluyen en esta última categoría (es decir LOS) y ambos han sido implicados en la respuesta inmunitaria a las infecciones naturales provocadas por sus respectivos organismos. Desgraciadamente los LOS de ambos organismos son extremadamente tóxicos y no se pueden utilizar como vacunas, ni solos ni como conjugados. Sin embargo, la toxicidad de los LOS reside únicamente en su porción de lípido A y se han desarrollado estrategias para superar dicho problema. En las primeras vacunas conjugadas se logró este objetivo mediante la extracción preliminar de la porción de lípido A del LOS mediante una hidrólisis ácida suave. A continuación se conjugó a una proteína el LOS truncado no-tóxico conseguido de este modo o bien directamente o utilizando una molécula espaciadora, por el residuo terminal 2-keto-3-ácido deoxioctulosónico (KDO). En un estudio más reciente el LOS intacto de *H. Influenzae* no tipificable se detoxificó, utilizando hidracina anhídrica antes de la conjugación. Este reactivo O-desacila la porción de lípido A y así produce la detoxificación del LOS. La conjugación del LOS detoxificado se logró enlazando las funciones carboxílicas de un residuo interno KDO a una proteína mediante un espaciador de dihidracida de ácido adípico. Aunque se ha demostrado que los conjugados realizados con LOS hidrolizados al ácido producen anticuerpos que reaccionan con sus respectivos LOS nativos, algunos de los cuales incluso muestran propiedades protectoras en los animales, su respuesta inmunitaria puede no ser óptima. Esto se debe a que el punto de segmentación o *clivaje* en el residuo KDO queda dentro de la zona de los epítopes internos (es decir el núcleo interno) de los LOS y por consiguiente se puede perjudicar la estructura de dichos epítopes. Se ha demostrado que los epítopes internos del núcleo interno se conservan muy bien a través de las cepas de una especie específica y por tanto serán candidatos atractivos para las vacunas. Además, los oligosacáridos de núcleo interno constituyen una elección sensata por el hecho de que la similitud estructural entre los oligosacáridos de núcleo externo de los LOS y los antígenos del tejido de mamíferos pueda acarrear una mala respuesta inmunitaria del huésped o enfermedades autoinmunes.

Por lo tanto, existe una permanente necesidad de vacunas de mayor eficacia y reducidos efectos secundarios. Han sido adoptados muchos enfoques desde hace unos años. Uno de ellos, descrito anteriormente, que ha alcanzado cierta popularidad recientemente, es la desacilación parcial de las porciones de lipopolisacáridos del microorganismo infeccioso. Se utiliza la desacilación para extraer las cadenas laterales de ácidos grasos esterificados del lípido A, ya que las cadenas laterales de ácidos grasos esterificados se incluyen entre los principales causantes de la toxicidad del lípido A. En la Patente EE.UU. 6207157 y su publicación de Solicitud de Patente Divisional EEUU 2002/0001389A1 Gu *et al.* divulgan una vacuna conjugada para la *Haemophilus influenzae* no tipificable. Consta de un lipooligosacárido del cual se han extraído las cadenas laterales de ácidos grasos esterificados del lípido A para conformar un LOS detoxificado (dLOS) que a continuación se enlaza covalentemente a un portador inmunogénico. Los ácidos grasos enlazados por éster se extraen mediante hidracina antes de la conjugación a la dihidracida del ácido adípico (ADH) de enlace antes de la conjugación a una proteína portadora inmunogénica. En Vaccine 3463, 1-8 (2002) GU *et al* divulgan la elaboración de una vacuna conjugada con base de lipooligosacárido contra la *Haemophilus influenzae* no tipificable. Enlazaron el lipooligosacárido reaccionado con la dihidracida de ácido adípico (AH-dLOS) al toxoide tetánico.

Otro enfoque ha sido el de Plested *et al* en la WO01/22994, quienes divulgan una vacuna para el tratamiento de la enfermedad causada por *Neisseria meningitidis* en base a elementos del lipopolisacárido del núcleo interno. Un factor que parece crítico en su técnica es la presencia de los epítopes internos conservados encontrados en la mayoría de los aislamientos que provocan enfermedades.

Otro enfoque ha sido el de Richards *et al* en la WO02/16440, en la que divulgan una porción del núcleo interno de triheptosilo conservado de un lipopolisacárido que carece sustancialmente de la extensión de cadena de oligosacárido del núcleo externo variable y su uso en las vacunas para impedir las infecciones de *Haemophilus influenzae*.

En "Infection and Immunity", de marzo 1991, p. 843-851, Verheul *et al* divulgaron un método para el acoplamiento bien definido a proteínas del grupo fosfoetanolamina (PEA) y los polisacáridos y oligosacáridos que contienen el grupo de ácido carboxílico, sin la necesidad de extensas modificaciones de los antígenos de los carbohidratos. El grupo de ácido carboxílico de la porción terminal 2-keto-3- ácido deoxiictulosónico se utilizó para introducir una función tiol en oligosacáridos derivados de lipopolisacárido del inmunotipo meningocócico L2 y L3, 7, 9. Los oligosacáridos que contenían el grupo de tiol se acoplaron posteriormente a proteínas bromoacetilados. Se elaboraron unos conjugados de toxoides de tetano de oligosacárido que contenían el grupo del inmunotipo L2 y L3, 7, 9 y se estudiaron sus inmunogenicidades en conejos. Tanto los conjugados del inmunotipo L2 como del inmunotipo L3, 7, 9 evocaron elevados títulos de anticuerpo G (IgG) de inmunoglobulina después de la primera inyección de refuerzo. Dichos conjugados mostraron además la capacidad de inducir niveles de anticuerpo IgG de larga duración que podían ser detectados hasta 9 meses después de una inyección de refuerzo durante la semana 3. El adyuvante Quil A mejoró en menor medida la respuesta inmunitaria a todos los conjugados, en contraste con los efectos adyuvantes de Quil A en estos tipos de antígenos en los ratones que han sido descritos. Un conjugado elaborado de los oligosacáridos L3, 7, 9 desfosforilados evocó una respuesta IgG considerablemente menor que un conjugado similar que contenía PEA y los estudios de inhibición de ensayo inmunosorbente enlazados con enzimas indicaron una especificidad de epítopes diferente. Además, los antiseros elicitados con las bacterias completas contenían anticuerpos dirigidos contra los epítopes que contenían PEA, lo que destaca la importancia de la presencia de grupos PEA no modificados en los conjugados de proteínas de oligosacárido derivados de lipopolisacáridos meningocócicos. El procedimiento desarrollado ofrece una solución elegante para el acoplamiento específico de oligosacáridos que contienen PEA meningocócicos a las proteínas y por lo tanto puede ser una herramienta muy útil en el desarrollo de una vacuna contra los meningococos del grupo B. En "Infection and Immunity", de enero de 1984, pp. 407-412, Jennings *et al* divulgaron un método por el que se obtuvo oligosacáridos mediante la hidrólisis ácida suave de los lipopolisacáridos de una serie de distintas cepas de *Neisseria meningitidis*, serotipos L2, L3, L4, L5 y L10. Se conjugaron los oligosacáridos desfosforilados a un toxoide tetánico como sus derivativos 2-4 (4-isotiocianotofenil)etilamina, lo que produjo la incorporación de entre 18 y 38 oligosacáridos por molécula del toxoide tetánico. Al inyectarse en los conejos, los conjugados produjeron algunos anticuerpos oligosacárido-específicos que eran principalmente específicos de forma serológica, pero que mostraron además alguna reactividad cruzada. Dichos resultados serológicos se pueden atribuir a regiones de una disimilaridad estructural y similitud dentro de los oligosacáridos. Los anticuerpos oligosacárido-específicos eran además específicos del serotipo lipopolisacárido, indicando de este modo que los oligosacáridos son los determinantes asociados con esta especificidad para serotipos. Coherentemente con los resultados serológicos, los antiseros conjugados eran bactericidas para los organismos meningocócicos de serotipo homólogo y en algunos casos para los organismos de serotipo heterólogo.

Hemos detectado en nuestros estudios que un factor que no parece haberse apreciado plenamente es la importancia de acoplar el hidrato de carbono a la proteína portadora de forma adecuada, de tal modo que los vitales epítopes antigénicos y potencialmente inmunogénicos no fuesen modificados o comprometidos por la estrategia de conjugación empleada. Nos interesó concretamente la extracción de los grupos de fosfatos, pirofosfatos o pirofosforiletanolamina del extremo reductor de la región del lípido A de la molécula LOS, creando de este modo un grupo activo hemiacetal a través del cual el LOS se puede enlazar a los portadores de proteína. El hecho de que todos los LOS y LPS conocidos contengan sustituyentes fosforilados terminales similares en la región del lípido A de las moléculas significa que este procedimiento puede ser importante en la síntesis de las vacunas conjugadas, porque tendría amplias posibilidades de aplicación. El enfoque conceptual es, *a posteriori*, sorprendentemente sencillo. En lugar de utilizar un epítipo parcial (por ejemplo un oligosacárido nuclear liberado) y enlazarlo a un portador, o utilizar una porción desacilada (que se detoxifica) pero enlazado el portador de forma que no mantenga la integridad del epítipo de oligosacárido del núcleo interior conservado, nos cercioramos de que el lipopolisacárido desacilado (detoxificado) está enlazado a la proteína en un lugar distanciado de los epítipes internos mediante la desfosforilación parcial o completa de la porción del

ES 2 320 334 T3

Otra realización más de la invención es el uso de un reductor bacteriano detoxificado antigénico del primer aspecto de la invención en la fabricación de un medicamento para combatir una infección Gram-negativa en un mamífero. Preferentemente, el mamífero es un ser humano. La vía de administración utilizada puede ser intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intraarterial, intravenosa o intranasal; más preferentemente, la vía de administración es intramuscular. La dosis eficaz utilizada puede ser de entre 10 μg y aproximadamente 50 μg . El uso puede comprender además la inyección de entre 10 μg y aproximadamente 25 μg a aproximadamente 2 meses y a aproximadamente 13 meses de la fase de administración. Alternativamente, el uso puede comprender además la inyección de entre aproximadamente 10 μg y aproximadamente 25 μg a aproximadamente 2, 4 y 16 meses después de la fase de administración.

Aunque se describe el uso de la hidracina para la detoxificación de LPS o LOS en la presente memoria, el uso de cualquier reactivo o enzima capaz de extraer los ácidos grasos enlazados al éster del lípido A o su consecución por modificación genética o por técnicas de ingeniería genética queda dentro del alcance de la presente invención. Se suspende el LPS o LOS seco en hidracina anhidra líquida a una temperatura de entre 1°C y 100°C, preferentemente entre 25°C y 75°C; más preferentemente de aproximadamente 37°C durante un periodo de entre 1 hora y 24 horas, más preferentemente durante un periodo de aproximadamente 2-3 horas. Después de la extracción de los ácidos grasos enlazados al éster, se desfosforila el residuo de la glicosa terminal (por ejemplo, glucosamina) en la región del lípido A de dLOS (denominado también LOS-OH o LPS-OH). El alcance de la invención abarca el uso de cualquier reactivo o encima química capaz de extraer el fosfato o sustituyentes del fosfato de la glicosa terminal del LOS o LPS, o mediante las técnicas de ingeniería de modificación genética. Una realización preferente de la invención consta de emplear una enzima, más preferentemente una enzima del grupo de las enzimas de fosfatasa alcalina para efectuar la extracción del fosfato de glicosa terminal del dLOS a fin de conseguir el análogo desfosforilado, dLOS de P (denominado además LOS-OH, de P o LPS-OH, de P). Se considera además el uso de cualquier enlazador o espaciador capaz de conjugar de forma estable y eficiente el dLOS a una proteína portadora inmunogénica. El uso de los enlazadores es conocido en el sector de las vacunas conjugadas (ver Dick *et al.*, Conjugate Vaccines, J. M. Cruse y R.E. Lewis, Jr., pub. Karger, Nueva York, pp. 48-114.

dLOS de P se puede enlazar covalentemente al portador directamente. Es posible, por ejemplo, mediante la aminación reductiva tal y como se describe en esta memoria. En una realización alternativa, dLOS, de P y el portador son separados mediante un enlace. En algunos casos, la presencia de un espaciador o un enlace puede promover una inmunogenicidad mejorada del conjugado y un acoplamiento más eficiente del dLOS, de P con el portador. Los enlaces separan los dLOS antigénicos, de P y el portador y, cuando el portador es un antígeno también, los dos componentes antigénicos, mediante cadenas cuya longitud y flexibilidad se puede ajustar del modo deseado. Entre los sitios bifuncionales, las cadenas pueden contener una variedad de características estructurales, incluyendo los heteroátomos y los sitios de segmentación o *clivaje*. Los enlaces permiten además unos aumentos correspondientes en las características de traslado y rotación de los antígenos, aumentando el acceso de los sitios de enlace a los anticuerpos solubles. Los enlaces apropiados incluyen, por ejemplo, dihidracida del ácido adípico (ADH), ϵ - ácido aminohexanoico, acetal dimetílico clorohexanol, D-glucuronolactona y p-nitrofenilamina. Los reactivos de acoplamiento considerados para su uso en la presente invención incluyen las hidroxisuccinimidas y las carbodiimidas. Muchos otros enlaces y reactivos de acoplamiento conocidos por personas con una pericia normal en la técnica son adecuados para utilizar en la invención. Dick *et al.* comentan en detalle dichos compuestos, *ut supra*.

La presencia de un portador puede aumentar la inmunogenicidad del polisacárido y/o oligosacárido del LPS o LOS conjugado. Además, los anticuerpos elevados contra el portador son beneficiosos desde el punto de vista médico. Los portadores inmunogénicos poliméricos pueden ser de un material natural o sintético que contiene un grupo amino primario y/o secundario, un grupo azido o un grupo carboxilo. El portador puede ser soluble o insoluble en agua.

Se puede elegir entre una variedad de proteínas portadoras inmunogénicas para su uso en la vacuna conjugada de la presente invención. Dichas clases de proteínas incluyen pili, proteínas de la membrana exterior y las toxinas excretadas de bacterias patogénicas, formas no-tóxicas o "toxoides" de dichas toxinas excretadas, proteínas no-tóxicas similares antigénicamente a las toxinas bacteriales (material de reacción cruzada o CRM) y otras proteínas. Unos ejemplos no limitadores de toxoides bacterianos considerados para su uso en la presente invención incluyen la toxina/toxoide tetánico, la toxina/toxoide diftérico, P detoxificada, toxina aeruginosa A, la toxina/toxoide de cólera, la toxina/toxoide de pertussis y las exotoxinas/toxoide de *Clostridium perfringens*. Se prefieren las formas toxoides de dichas toxinas bacterianas. Se considera también el uso de las proteínas víricas (es decir antígenos superficiales/nucleares de hepatitis B; proteína del rotavirus VP 7) y las proteínas F y G del virus sincitial respiratorio).

Los CRM incluyen el CRM₁₉₇ antigénicamente equivalente a la toxina de la difteria (Pappenheimer *et al.* *Immunochem.*, 9: 891-906, 1972) y el CRM 3201, una variante genéticamente manipulada de la toxina pertussis (Black *et al.*, *Science*, 240:656-659, 1988). El alcance de la invención abarca además el uso de las proteínas portadoras inmunogénicas de fuentes no mamíferas incluyendo la hemocianina de la lapa californiana, la hemocianina del cangrejo herradura y la edestina vegetal.

Existen muchos métodos de acoplamiento que pueden ser considerados para los conjugados de proteína dLOS. El solicitante muestra en los ejemplos expuestos a continuación la selectiva activación del dLOS mediante la extracción completa de los grupos de fosfatos de la glucosamina del extremo reductor con una fosfatasa alcalina seguida por la aminación reductiva del dLOS mediado por cianoborohidruro sódico, de P a grupos amino epsilon de residuos de lisina

ES 2 320 334 T3

expuestos en TT o CRM. De forma alternativa, otra forma de elaborar los conjugados que contienen un enlace trata de la derivatización de cistamina del dLOS, mediante por ejemplo, la aminación reductiva seguida por la generación de un grupo-tio y la conjugación de disulfuro a TT N-Bromoacetilado. Otros métodos conocidos en la técnica para realizar la conjugación de oligosacáridos que conservan la integridad de los epítopes internos a las proteínas portadoras inmunogénicas también quedan dentro del alcance de la invención.

Para la eficaz introducción de un enlazador, la relación molar del enlazador con el dLOS en la mezcla de reacción suele ser típicamente entre 10:1 y aproximadamente 250:1. Se utiliza un exceso molar del enlazador para asegurar un acoplamiento más eficiente y para limitar el acoplamiento dLOS-dLOS. En una realización preferente, la relación molar es de entre aproximadamente 50:1 y aproximadamente 150:1; en la realización más preferente, la relación molar es aproximadamente 100:1. Se contemplan unas relaciones similares de enlazador-dLOS a TT en la mezcla de reacción. En una realización preferente, en el conjugado final dLOS-proteína portadora, la relación molar de dLOS, de P con el portador es entre aproximadamente 15 y 75, preferentemente entre aproximadamente 25 y aproximadamente 50.

La inmunogenicidad de los conjugados en tanto los ratones como los conejos es mejorada mediante el uso del lípido A monofosforil más dimicolato de trehalosa (Ribi-700; Ribi Immunochemical Research, Hamilton, Mont.) como adyuvante. Aunque no se ha aprobado dicho adyuvante para su uso en humanos, un experto apreciará que se puede utilizar en la invención otros adyuvantes estándares conocidos, incluyendo los compuestos de aluminio (por ejemplo, alumbre), el lipopolisacárido químicamente modificado, suspensiones muertas de pertussis Bordetella, N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-glutamina y otros adyuvantes conocidos por personas con una pericia habitual en la técnica. Se prefiere específicamente el uso de los compuestos de aluminio. Dichos adyuvantes son descritos por Warren *et al.* (Ann. Rev. Bioche., 4: 369-388, 1986).

Los conjugados de proteína portadora dLOS para la administración parenteral pueden ser en forma de una preparación inyectable estéril, como una suspensión acuosa o oleaginosa inyectable estéril. Dicha suspensión se puede formular de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica, que incluyen agentes de dispersión o humectación y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril puede ser además una solución inyectable estéril o una suspensión en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable, como una solución en 1,3 butanediol. Los diluyentes adecuados incluyen, por ejemplo, agua, la solución de Ringer y una solución de cloruro sódico isotónica. Además, se puede emplear aceites fijos estériles de forma convencional como disolvente o medio de suspensión. A dicho fin, se puede utilizar cualquier aceite fijo blando incluyendo los mono- o diglicéridos sintéticos. Se puede utilizar también los ácidos grasos como el ácido oleico en la elaboración de las preparaciones inyectables.

La vacuna conjugable según la invención puede ser en forma soluble o de micropartículas, o se puede incorporar en microesferas o microvesículas, incluyendo las liposomas. Aunque se contemplan las distintas vías de administración de vacunas incluyendo por ejemplo, la intramuscular, subcutánea, intraperitoneal e intraarterial, la forma preferida es la administración muscular. En una realización preferente, la dosificación del conjugado administrado será de entre aproximadamente 10 μg y aproximadamente 50 μg del carbohidrato conjugado. En una realización más preferente, la dosis administrada es entre aproximadamente 20 μg y aproximadamente 40 μg . En la realización más preferente de todas, la dosis administrada es aproximadamente 25 μg . Se puede administrar dosis mayores en función del peso corporal. La dosificación exacta se puede determinar mediante los protocolos habituales de dosificación/respuesta conocidos por personas de una competencia normal en la técnica.

La vacuna según la invención se puede administrar a los mamíferos de sangre caliente de cualquier edad y es adaptada para inducir la inmunización activa en los mamíferos jóvenes, específicamente los humanos. Como vacuna infantil, el conjugado se administra a entre 2 y 4 meses de edad, aproximadamente. Se administran típicamente dos inyecciones de refuerzo de entre aproximadamente 10 μg y aproximadamente 25 μg de carbohidratos conjugados a aproximadamente 2 y después aproximadamente 13 meses desde la inyección inicial. Alternativamente, se administran tres inyecciones de refuerzo a 2, 4 y 16 meses desde la inyección inicial.

Los anticuerpos IgG elicitados por la administración sistémica de la vacuna del conjugado se transferirán a la mucosa local y desactivarán los inóculos de bacteria en las superficies de mucosa (por ejemplo los conductos nasales). Los Iga de secreción también cumplirán una función en la inmunidad mucosal si la vacuna conjugada se administra a la mucosa (es decir, de forma intranasal). Por lo tanto, la vacuna conjugada impedirá la infección bacteriana local, así como la sistémica.

60 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra las estructuras de los oligosacáridos truncados (L7-OS) y de longitud completa (L7-OH, deP) antes de su conjugación.

65 La Figura 2 ilustra los títulos ELISA comparativos de los sueros de ratón individuales a partir de la inmunización con o bien L7-OS-TT o L7-OH, de P-TT (1-10), sueros preinmunes (11).

La Figura 3 ilustra la inhibición de oligosacáridos del enlace de L-LOS al suero anti-L7-OH, de P-TT.

ES 2 320 334 T3

La Figura 4 ilustra la actividad bacteriana de antisueros L7-OS-TT y L7-OH, de P-TT contra *N meningitidis* de cepa M982B.

La Figura 5a ilustra el espectro NMR del lipopolisacárido O-desacilado (LPS-OH) derivado de *N meningitidis* L3 galE sin filtración de columna de gel, mostrando unas anchas líneas no resueltas en su espectro NMR.

La Figura 5b ilustra el espectro NMR del lipopolisacárido O-desacilado (LPS-OH) derivado de *N meningitidis* L3 galE después de su filtración de columna de gel, mostrando unas líneas bien resueltas coherentes con la estructura del material LPS-OH.

La Figura 6 ilustra el espectro CE-MS del LPS desfosforilado (LPS-OH, deP) derivado de *N. meningitidis* L3 galE.

La Figura 7 muestra los espectros NMR de a) LPS -OH y b) LPS-OH deP de la Figura 6.

La Figura 8 muestra el perfil HPLC del LPS-OH, deP y CRM₁₉₇ durante el tiempo (cuadros 1 a 3) y el perfil HPLC del LPS-OH, deP, unido por Kdo mediante un enlazador M₂C₂H.

La Figura 9 muestra que el epítipo del núcleo interno fue representado de forma adecuada en el conjugado tal como lo muestra la reactividad con Mab B5.

La Figura 10 compara la respuesta inmunitaria de MLC (conjugados de la ruta de lípido A) con MLKC (conjugados de la ruta del Kdo).

La Figura 11 muestra que la respuesta inmunitaria a los epítopos del núcleo interior elicitados por MLC fue bactericida.

La Figura 12 ilustra la protección pasiva del MLC-3.

La Figura 13 muestra un examen ES-MS del LPS-OH de *Haemophilus influenzae* antes (Fig 13a) y después (Fig. 13b) del tratamiento de fosfatasa alcalina y muestra picos indicativos de la desfosforilación del LPS-OH.

La Figura 14 muestra el análisis CE-MS de los iones doblemente cargados correspondientes a la molécula LPS-OH *Haemophilus influenzae* completa y desfosforilada, confirmando que la región del lípido A de la molécula había perdido una especie de 80 amu coherente con la pérdida de una molécula de fosfato.

La Figura 15 muestra la espectroscopia ¹H-NMR de una muestra antes y después de la desfosforilación indicando una eficiente y específica desfosforilación del residuo del lípido A α-GlcN de *Haemophilus influenzae* (Fig. 15 a (fosforilado) con Fig. 15 b (desfosforilado)).

La Figura 16 muestra que el epítipo LPS del núcleo interior de *Haemophilus influenzae* ha sido adecuadamente presentado en el conjugado, tal como demuestra su reactividad con Mab LLA4.

La Figura 17 muestra una comparación de las respuestas inmunitarias de sueros derivados SRA (conjugados de la vía del lípido A) (Fig. 17b) a SK (conjugados de la vía Kdo) (Fig.17a).

La Figura 18 muestra la respuesta inmunitaria a los conjugados de *Haemophilus influenzae* utilizando dos adyuvantes diferentes (Ribi (R) y Freund's (F)). Quedó evidente que la respuesta inmunitaria a dichos conjugados tenía como objetivo los epítopos del núcleo interno en tanto las moléculas LPS enteras como las moléculas LPS -OH debido a la extensa reactividad cruzada demostrada por los sueros derivados.

Descripción detallada de la invención

Introducción a los Ejemplos 1 y 2

La invención de estos dos ejemplos se refiere a las vacunas meningocócicas conjugadas de lipooligosacáridos. La importancia de una adecuada presentación de los epítopos de oligosacárido del núcleo interno conservados para las prestaciones inmunitarias de las vacunas meningocócicas conjugadas de lipooligosacárido-proteína ha sido demostrada en los siguientes experimentos. Dos oligosacáridos distintos fueron obtenidos por degradaciones químicas del mismo lipooligosacárido L7 y ambos se enlazaron terminalmente al toxoide del tétanos. Uno era un oligosacárido truncado, en el que los epítopos internos eran incompletos y fue obtenido mediante una hidrólisis ácida suave del lipooligosacárido L7. Este oligosacárido fue conjugado mediante la aminación reductiva directa por su residuo KDO terminal recientemente expuesto. El segundo, un oligosacárido de longitud íntegra, fue obtenido mediante la O-desacilación del lipooligosacárido L7 con la posterior extracción de los sustituyentes de fosfato de su porción del lípido A utilizando la fosfatasa alcalina. Ello permitió que el oligosacárido de longitud íntegra fuese conjugado directamente al toxoide tetánico mediante la aminación reductiva por su recientemente expuesto residuo terminal 2-N-acil-2-deoxi-glucopiranososa (es decir, glucosamina terminal). La comparación de las prestaciones inmunitarias de los dos conjugados en ratones demostró que mientras ambos eran capaces de inducir niveles significativos del anticuer-

ES 2 320 334 T3

po IgG lipooligosacárido-específico L7, únicamente el conjugado realizado con el sacárido de longitud íntegra pudo inducir anticuerpos bactericidas contra los meningococos homólogos. El ejemplo 2 muestra que unos resultados similares fueron obtenidos utilizando la cepa L3 *galE* de *Neisseria meningitidis* conjugada a CRM₁₉₇, confirmando de este modo las aportaciones de los epítopes de los oligosacáridos internos (es decir, del núcleo interno) a la inducción del anticuerpo protector. El LOS de la cepa L3 *galE* de *Neisseria meningitidis* consta solamente de una unidad de oligosacárido de núcleo interno que no contiene la extensión de la cadena (es decir lacto-N-neotetraosa) observada en L7. El LOS *Neisseria meningitidis* es un patógeno humano de importancia mundial. A pesar del éxito de las vacunas actuales compuestas por los polisacáridos capsulares de grupos A, C, W-135 y Y así como el grupo perfeccionado aparecido más recientemente de vacunas conjugadas de C-polisacáridos (26), el polisacárido del grupo B se excluye de las vacunas anteriores aunque realiza una aportación importante al problema de la enfermedad en los países desarrollados (23). Este hecho se debe a la mala inmunogenicidad del polisacárido del grupo B tanto en su forma nativa (33) como la conjugada (4, 12). Por consiguiente, se está investigando las vacunas alternativas en base a los antígenos subcapsulares, incluyendo los lipooligosacáridos.

Los LOS meningocócicos han sido implicados en la respuesta inmunitaria a la infección natural (3, 8) pero su uso como vacunas está contraindicado a causa de su elevada toxicidad. Además, exhiben una diversidad antigénica considerable, que constituye otro gran reto. Existen actualmente doce inmunotipos diferentes conocidos (19, 32, 34, 35) entre los cuales los L1-L7 están asociados exclusivamente con los meningococos de grupos B y C y los tipos L10-L12 están asociados con los meningococos del grupo A. Solamente los tipos L8 y L9 se solapan entre los dos grupos. Los epítopes responsables de la inmunotipificación se ubican en las porciones de oligosacáridos del LOS (13), que se han demostrado estructuralmente diversas (5, 7, 14, 16, 21, 22) pero que además tienen algunas regiones de similitud.

25 Ejemplo 1

Elaboración, caracterización y prestaciones de una vacuna meningocócica en base a lipopolisacáridos utilizando la cepa L7 de Neisseria meningitidis conjugado al toxoide tetánico (TT) mediante la tecnología de fosfatasa alcalina

De acuerdo con la invención, para evitar la toxicidad del LOS, la porción del lípido A tóxico fue extraída mediante hidrólisis ácida suave y posteriormente los oligosacáridos inocuos fueron conjugados por distintos métodos a las proteínas portadoras por sus residuos terminales 2-keto-3-ácido deoxioctulosónico (KDO) (9, 13, 30). Aunque los conjugados L10 eran capaces de inducir anticuerpos de oligosacáridos bactericidas (9, 13) en los ratones los conjugados realizados con oligosacáridos asociados con meningococos de grupos B y C produjeron en comparación antisueros con una actividad bactericida sub-óptima. (13-30). Este hecho destacaba específicamente en el caso de los inmunotipos L3 y L7, desgraciadamente los más comunes entre los aislamientos meningocócicos de los grupos B y C (32). Los inmunotipos L3 y L7 tienen estructuras similares, siendo la L7 simplemente la forma desialilada de L3 (22).

Una posible explicación de las prestaciones inmunitarias sub-óptimas de los conjugados anteriores es que el punto de separación del LSO en el residuo KDO queda cerca, si no en el interior de, los epítopes oligosacáridos internos, por tanto perjudicando sus estructuras. La importancia de los epítopes internos para la respuesta inmunitaria se ha documentado (15, 24) y se debe a la similitud estructural entre la cadena de oligosacáridos distal no reductora de los LOS y los antígenos de tejido mamífero, lo que produce el inmunodominio de los epítopes internos (14, 15, 20, 29, 31).

Para comprobar esta hipótesis comparamos la respuesta inmunitaria de dos conjugados L7 LOS- TT: uno elaborado con un oligosacárido de longitud completa tratado con hidracina y enlazado terminalmente (L7-OH, de P) y el otro con un oligosacárido enlazado de forma similar pero truncado (L7-OS). Únicamente el anterior pudo inducir anticuerpos bactericidas en los ratones.

Materiales y métodos

Las cepas M982B (serotipo L7) y 406Y (serotipo L3) fueron cultivadas en caldo Bacto Todd-Hewitt (THB; Difco, Detroit, MI) a pH 7,3. Diez placas agar chocolate 5% (Quelab, Montreal, P.Q. (Canadá) fueron inoculadas de bacteria congelada e incubadas durante la noche a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂. A continuación las bacterias fueron resuspendidas en 50 ml de medio (THB) y transferidas a un frasco Erlenmeyer con tapón de rosca que contenía 2 l de medio (THB). El frasco fue agitado durante 7 h. a 37°C y su contenido se transfirió a un fermentador de 25 l New Brunswick Scientific MFS-128S Microferm. Las bacterias fueron criadas, muertas con 1% formaldehído y cosechadas mediante centrifugación.

Aislamiento de LOS. Unos LOS de los dos serotipos fueron aislados por un procedimiento de extracción de fenol modificado, anteriormente descrito (7). Al final fueron purificados mediante una ultracentrifugación cuádruple durante 6 h. a 100,000 g. utilizando una ultracentrífuga Beckman LE -80.

Métodos analíticos. Las soluciones fueron evaporadas a una presión reducida por debajo de 40°C en un evaporador giratorio. Se realizó la filtración en gel en columnas (1,6 x 90cm.) de Bio-Gel P2 y P4 (Extra Fino, Laboratorios Bio-

ES 2 320 334 T3

Rad), utilizando 0,02 M de un tampón de piridina-acetato (pH 5,4) como eluante y un caudal de 12 ml/h. Se empleó una columna Sephadex G-10 (1,5 x 30 cm., Pharmacia) utilizando agua como eluante y a un caudal de 24 ml/h. Las fracciones individuales fueron monitorizadas utilizando un refractómetro diferencial Waters R403.

- 5 Los conjugados fueron analizados con respecto a sus contenidos en carbohidratos y proteínas utilizando los respectivos ensayos fenol-ácido sulfúrico (6) y ácido bicinconínico. (27).

10 *Resonancia Magnética Nuclear.* Los experimentos NMR fueron realizados en un espectrómetro Bruker AMX 500, utilizando una sonda de banda ancha de 5 mm con la bobina ^1H más próxima a la muestra. Se grabaron los espectros ^1H y ^{31}P NMR a 300 y 340 K en tubos de 5 mm a concentraciones de 3-5 μg de muestra en 0,5 ml D_2O a un pH de 7,0 (^1H) y pH 7,6 (^{31}P). Se utilizó acetona como estándar interno (2,225 ppm) para el espectro ^1H . Las muestras ^{31}P NMR contenían 5 mM EDTA y 2% DOC y se referenciaron a 85% ácido ortofosfórico (0,00 ppm). Todos los experimentos fueron realizados mientras se giraban las muestras. Los experimentos 2D hetero-correlacionados (HSQC) fueron realizados del modo anteriormente descrito (2).

15 *Métodos químicos.* La O-desacilación del LOS L3 y L7 fue realizada utilizando hidracina anhidra del modo anteriormente descrito (22) para conseguir L3-OH y L7-OH O desacilados y parcialmente desfosforilados. El oligosacárido nuclear (L7-OS) fue obtenido calentando el LOS (10 mg/ml) en 1% ácido acético a 100°C durante 2 h. El lípido A insoluble fue extraído por centrifugación a 15000 rpm durante 15 minutos y el L7-OS soluble en agua fue purificado en una columna Bio-Gel P2. Un procedimiento similar se utilizó para aislar el L3-OS de su LOS con la excepción de que este último se hidrolizó en 0,1 M tampón de acetato a pH 4,2 durante 2h a 100°C.

20 *Desfosforilación enzimática de LOS-OH.* LOS-OH (10 mg) fueron disueltos en 1 ml. de 0.1 M bicarbonato amónico (pH 8.0) y tratados con 70 unidades de fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim, Laval, P.W. Canadá) a 56°C durante 18 h. En ese momento se añadieron 70 unidades adicionales de la misma enzima y la reacción se dejó reposar a 56°C durante otras seis horas. A continuación la solución se calentó a 100°C durante 5 minutos, se centrifugó a 15000 rpm durante 5 minutos y el producto parcialmente desfosforilado (LOS-OH, de P) se purificó en una columna Sephadex G-10.

30 *Acoplamiento de L7-OH de P al toxoide tetánico.* Mediante los procedimientos de aminación reductiva anteriormente descritos (12,13), L7-OH, de P se conjugó al toxoide tetánico (TT) L7-OH, de P (10 mg) se disolvió en 200 μl de 0,02 M tampón de borato a pH 9.0, junto con TT (4 mg) y cianoborohidruro sódico (50 mg). La reacción fue agitada durante 4 d. a 37°C y se controló el progreso de la conjugación mediante HPLC utilizando una columna Superosa 12 HR 10/30 (Pharmacia) con PBS como el eluante. La conjugación fue señalada por la gradual desaparición del pico TT con la aparición simultánea del pico del conjugado con un valor K_{av} relativamente inferior. Una vez desaparecido el pico TT, el conjugado fue purificado en una columna Bio-Gel A 0.5 (Bio-Rad) (1.6 x 42 cm.) obteniendo un rendimiento de 5 mg. L7-OS fue conjugado a TT utilizando procedimientos idénticos (13).

40 *Procedimientos de inmunización.* Grupos de ratones hembra 10 CF1 de entre 6 y 8 semanas de edad (Charles River, St. Constant, Canadá) recibieron una inyección subcutánea de cada uno de los conjugados que contenían 2,5 μg de carbohidratos en una solución salina. Junto con el adyuvante completo de RIBI (RIBI Immunochem Research Inc., Hamilton, MT) en un volumen total de 0,2 ml. Los ratones fueron inyectados el día 0, 21 y 35 y se recogió los antisueros el día 45, se esterilizaron mediante filtración y se almacenaron a -80°C.

45 *ELISA* Los pozos de placas microtítulo (Lynbro/Titertek, No 76-381-04) fueron recubiertos de soluciones de LOS (2 μg) en un tampón de 0,05 M de carbohidrato de sodio a pH 9.6 a 37°C durante 3 h y a continuación durante la noche a 4°C. A continuación las placas fueron lavadas y bloqueadas con 1% BSA en un tampón de 20 mM Tris-HCl-50 mM NaCl que contenía 0,05% Tween 20 (T_TBS) pH 7.5 durante 1 h. a temperatura ambiente. A continuación el contenido de los pozos fue extraído y se añadieron diluciones serie (100 μl /pozo) de antisuero murino en PBS y las placas se dejaron durante 2,5 horas a temperatura ambiente. Después de lavarlas con T-TBS, se añadió a cada uno de los pozos 100 μl de una dilución 1:3000 en PBS de un IgG cabra anti-ratón marcado con fosfatasa alcalina (H+L) (ICN, Aurora, OH). Tras la incubación durante 1 h. a temperatura ambiente las placas fueron lavadas con T-TBS (250 μl /pozo) y se añadió 100 μl /pozo de sustrato PNP (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD). Se dejó reposar las placas durante 1 h. a temperatura ambiente y las densidades ópticas fueron leídas a 410 nm utilizando un Lector de microplacas Dynatech MR 5000. Se realizaron experimentos de isotipificación, utilizando el mismo procedimiento ELISA anteriormente descrito con la excepción de la sustitución de los anticuerpos isotipo-específicos de cabra anti-ratón marcados con peroxidasa (Southern Biotechnology Associates Birmingham, AL.) y la lectura de las placas a 450 nm.

60 *Inhibición ELISA.* Los pozos de las placas microtítulo Lynbro/Titertek fueron recubiertos de LOS, lavados y bloqueados del modo que ya se ha descrito. Se mezcló simultáneamente una segunda placa microtítulo que contenía diluciones duplicadas en serie de inhibidores en PBS (volumen total 50 μl) con 50 μl de antisueros policlónicos diluidos 1:100 con PBS. La placa fue incubada durante 1,5 h. a temperatura ambiente y el contenido de los pozos se transfirió a la placa recubierta de LOS ya preparada. La placa recubierta más el anticuerpo y el inhibidor se incubó durante 2,5 h. a temperatura ambiente y se procesó y leyó del modo descrito en los experimentos de enlace ELISA anteriormente indicados.

ES 2 320 334 T3

5 *Ensayo bactericida.* Los ensayos bactericidas fueron realizados en placas de poliestireno de 96-pozos de cultivo de tejido (Costar, n° 3595) esencialmente del modo anteriormente descrito (25). La cepa M982B de *N.Meningitis* se cultivó durante la noche en placas de chocolate agar (Quelab, Montreal, P.Q. Canada) a 37° en una atmósfera de 5% CO₂,m seguido por la inoculación de una segunda placa y su incubación durante 5h. Las diluciones duplicadas de antisueros policlónales murinos fueron realizados directamente en la placa utilizando “Hanks’ Balanced Salts” (HBSS) que contenían un 1% de hidrolizado de caseína, diluido a un volumen final de 50 µl/pozo. Se elaboró una suspensión de meningococos del grupo B (GBM) en HBSS, 1% de hidrolizado de caseína, produciendo un OD₄₉₀ = 0,29 y se preparó una dilución de trabajo de bacteria final por otra dilución 1: 20.000. Se añadió el complemento de conejito recientemente descongelado (20 µl) a cada uno de los pozos, seguido por 30 µl de la dilución de trabajo de bacteria (2,500 CFU/pozo). A continuación se agitó la placa a 37°C durante 1h. Posteriormente se mezcló el contenido de cada uno de los pozos antes de su puesta (10 µl) en las placas de chocolate agar. Las placas de agar fueron incubadas durante la noche a 37°C, a 5%CO₂ y se contó el número de CFU. El porcentaje de eliminación se calculó en relación con los valores medios de o bien los pozos de control HBSS o el medio sobrenadante del cultivo del modo siguiente: porcentaje de eliminación = $(CFU_{control} - CFU_{mAb}/CFU_{control}) \times 100$.

15

Resultados

20 *Caracterización de oligosacáridos.* Del modo anteriormente descrito (13, 22) la aplicación de un hidrolizado de ácido acético al 1% del L7-LOS a una columna Bio-Gel P4 produjo un oligosacárido (L7-OS) cuya estructura fue confirmada por espectroscopia ¹H NMR (22). Puesto que contenía un residuo de ácido sialico terminal, el L3-LOS fue hidrolizado en condiciones más suaves (tampón de acetato sódico a pH 4.2). La hidrólisis produjo dos oligosacáridos que fueron separados por cromatografía de columna (Bio-Gel P4). Los espectros ¹H NMR de los oligosacáridos indicaron que uno de ellos era el esperado L3-OS (22) y el otro su homónimo desialilado (L7-OS).

25

El L7-LOS también fue O-desacilado utilizando hidracina anhidra (22) antes de ser desfosforilado adicionalmente mediante fosfatasa alcalina para producir L7-OH, de P. Además de la O-desacilación, los cambios estructurales realizados por cada uno de los procedimientos anteriores fueron controlados por espectroscopia ³¹P NMR, a fin de determinar la estructura del oligosacárido (L7-OH, de P) utilizado para la conjugación. Los desplazamientos químicos de las señales ³¹P NMR de los L7-LOS nativos y modificados se relacionan en la Tabla 1 y las asignaciones fueron realizadas principalmente mediante su comparación con otros estudios ³¹P NMR de tanto LOS (22) y lípido A (1, 11, 17, 18).

30

35

(Tabla pasa a página siguiente)

40

45

50

55

60

65

TABLA 1: Datos del ^{31}P NMR obtenidos con L7 LOS y sus productos modificados

L7 LOS y tratamiento con reactivos	Valores de la desviación química a (ppm)						
	Pirofosforiletanolamina		Pirofosforomonoéster	Fosforiletanolamina	Monofosfato		
	C-4'	C-1	C-1, C-4	C-3 (Hep)	C-4'	C-1	C-3'
L7 LOS	-9,53 (1,0)	-10,36 (1,4)	-5,21 (0,3)	+0,70 (1,0)	+5,21 (0,3)	+2,77 (0,2)	^b
Hidracina	-9,59 (0,5)	-10,14 (0,4)	-	+0,73 (1,0)	+5,00 (0,4)	-	-
Alcalina-fosfatasa (1)	-	-	-	0,76 (1,0)	+5,21 (0,5) ^d	-	+3,4 (0,3) ^c
Alcalina-fosfatasa (2)	-	-	-	0,73 (1,0)	+5,20 (0,6)	-	+3,4 (0,6) ^c

a Valores relativos a la pauta externa H_3PO_4
b No detectados
c Asignación tentativa
d Pico cruzado con H-4' (experimento HSQC)

ES 2 320 334 T3

El L7-LOS nativo cuya estructura se representa en la Figura 1 demostró dos señales de difosforiletanolamina a -10,36 ppm y -9,53 ppm, que fueron asignadas a C-1 y C-4 de la porción del lípido A (17). Otra señal menor a -5,21 ppm fue asignada a un grupo pirofosfomonoéster a C1 y/o C-4 del lípido A, coherente con las asignaciones anteriores (17) en los LOS meningocócicos y con la conclusión de que dichas posiciones no están todas completamente sustituidas con grupos difosforiletanolamina (18). La señal a +0,70 ppm se asignó a un sustituyente de monofosforiletanolamina a 0-3 de uno de los residuos de heptosa (22). El tratamiento del L7-LOS con hidracina redujo por la mitad la intensidad de las señales a C-1 y C-4' y eliminó la señal de pirofosfomonoéster a -5,21 ppm (18). También produjo dos nuevas señales a +4,97 ppm y +2,53 ppm que fueron asignadas a los ésteres de monofosfato a C-4' y C-1 respectivamente. De este modo el tratamiento con hidracina es capaz de degradar parcialmente los grupos de difosforiletanolamina a ésteres de monofosfato.

Los restantes grupos de difosforiletanolamina en C-1 y C-4' fueron eliminados completamente por el primer tratamiento de fosfatasa alcalina, mientras que el sustituyente de fosfato monofosforiletanolamina en el residuo de heptosa permanecía intacto. Algo de éster de monofosfato permanecía en C-4', extremo que fue confirmado por un experimento HSQC hetero-correlado 2D, y una parte se había migrado a C-3' pero no quedaba nada en C-1. Un segundo tratamiento con fosfatasa alcalina no eliminó el éster de monofosfato residual en C-4' y C-3' pero el grupo hemiacetal del residuo de glucosamina terminal de L7-OH, de P permanecía completamente expuesto y preparado para su conjugación.

Conjugación de los oligosacáridos a TT. Los oligosacáridos L7-OS y L7-OH, de P, fueron conjugados a TT utilizando el procedimiento anteriormente descrito por Jennings y Lugowski (12) pero con modificaciones menores. Esta vez las conjugaciones fueron realizadas en 0,2 M de tampón de borato a pH 9,0, lo que mejoró el rendimiento de los conjugados. La conjugación fue controlada fácilmente por HPLC porque el pico del conjugado estaba separado por 8 min. del pico TT, y se consideró completo cuando el pico TT desapareció. Los conjugados fueron purificados por cromatografía de columna y se muestra su análisis estequiométrico en la Tabla 2. Ambos conjugados tenían relaciones oligosacárido/TT equiparables.

TABLA 2

Composición de conjugados L7-OS-TT y L7-OH, de P-TT

Conjugado	% Sacárido ^a	% TT ^b	Relación molar sacárido/TT ^c
LS-OS-TT	20,0	79,0	18,9:1
LS-OH, de P-TT	26,2	72,5	15,5:1
<p>a Estimado por el ensayo fenol-sulfúrico utilizando los sacáridos adecuados como patrones</p> <p>b El contenido en proteínas fue estimado por el ensayo de ácido bicinónico utilizando TT como patrón.</p> <p>c La relación molar de sacárido/TT fue calculado utilizando los pesos moleculares de 1590 por L7-OS, 2534 por L7-OH, de P y 150.000 por TT.</p>			

Inmunogenicidad de conjugados en ratones. Los conjugados L7-OS-TT y L7-OH, de P-TT fueron evaluados con respecto a su inmunogenicidad en ratones. A cada grupo de ratones se les administró tres inyecciones subcutáneas con vacunas que contenían 2,5 µg de carbohidratos antes de sangrarles. Los títulos ELISA de los ratones individuales se muestran en la Fig. 2 utilizando el L7-LOS como antígeno de recubrimiento y muestran que los sueros preinmunitarios contenían sólo cantidades ínfimas de anticuerpos específicos L7-LOS. Aunque ambos conjugados inducían anticuerpos de esta última especificidad, los niveles inducidos por L7-OH, de P-TT eran constantemente más elevados que los inducidos por L7-OS-TT. Además, la distribución por subclases de anticuerpos elicitados por ambos conjugados no era significativamente diferente (Tabla 3). Ambos conjugados eran capaces de producir altos niveles de anticuerpos potencialmente bactericidas IgG2a, IgG2b y IgG3.

TABLA 3

Distribución de isotipos de inmunoglobulina de antisueros L7-OS-TT y L7-OH, de P-TT

Subclase	L7-OS-TT	L7-OH, de P-TT
IgG1	18.0%	9.1%
IgG2a	18.3%	18.1%
IgG2b	15.3%	25.1%
IgG3	16.5%	9.1%
IgM	16.7%	24.7%
IgA	15.2%	13.9%

Inhibición de antisueros policlonales. Para caracterizar los antisueros policlonales murinos inducidos por el conjugado L7-OH, de P-TT, fue realizada una ELISA de inhibición competitiva utilizando L7-LOS como el antígeno de recubrimiento y seis oligosacáridos distintos obtenidos del L3-LOS y L7-LOS como inhibidores. En la Figura 3 se facilita los datos recopilados de los experimentos ELISA de inhibición competitiva utilizando los oligosacáridos L7-LOS. La inspección visual de las curvas obtenidas utilizando los oligosacáridos L7-LOS muestran la característica más importante, es decir que a diferencia del L7-OH y el L7-OH, de P, que eran equivalentes y buenos inhibidores del sistema descrito, el L7-OS era un inhibidor pésimo.

El L3 LOS tiene la misma estructura que el L7-LOS, salvo que es sialilado terminalmente (22). De acuerdo con los resultados de inhibición obtenidos utilizando los oligosacáridos del L7-LOS, los obtenidos del L3-LOS exhibieron unas propiedades de inhibición similares dentro del margen de error experimental (datos no mostrados). L3-OH y L3-OH, de P eran buenos inhibidores del enlazamiento del antisuero policlonal al L7-OS, mientras que el L3-OS, como el L7-OS, también era mal inhibidor del sistema.

Actividad bactericida de los antisueros. Las actividades bactericidas de los antisueros inducidos en los ratones por los conjugados L7-OS-TT y L7-OH, de P-TT contra el organismo inmunotipo homólogo se muestran en la Figura 4. Aunque ambos conjugados pudieron elicitar anticuerpos específicos L7-LOS que contenían isotipos potencialmente bactericidas, únicamente el antisuero inducido por L7-OH, de P-TT era bactericida de forma significativa. Al diluirse a 1:10 seguía consiguiendo una eliminación del 40%, mientras que incluso los antisueros sin diluir del conjugado L7-OS-TT mostraron una actividad bactericida muy mala.

Discusión

En los estudios anteriores de las vacunas conjugadas LOS se evitaba el problema de la toxicidad del LOS por la extracción del lípido A tóxico de la molécula mediante la hidrólisis ácida suave (9, 13, 20). A continuación se realizaron conjugados utilizando los oligosacáridos de núcleo truncado no-tóxicos como haptenos. A continuación se utilizó una serie de procedimientos químicos diferentes en la síntesis de los conjugados pero todos utilizaron el residuo KDO recientemente expuesto como punto de enlace (9, 13, 20). Los conjugados fueron evaluados en animales y de los resultados obtenidos se puede apreciar algunas conclusiones generales. Únicamente los conjugados realizados con inmunotipos asociados con cepas del grupo A (L8-L12) eran capaces de inducir anticuerpos con buena actividad bactericida (9,13). Los conjugados realizados con inmunotipos asociados con las cepas del grupo B y C; como L3, 7, indujeron anticuerpos que no tenían ninguna actividad bactericida (13, 30). Esto fue decepcionante porque L3, 7 es el inmunotipo más predominante entre los aislamientos de la enfermedad del grupo B, *N. meningitidis*. La capacidad de los inmunotipos asociados del grupo A de inducir un anticuerpo bactericida probablemente se base en su estructura. A diferencia de LOS de las cepas del grupo B y C, que tienen una cadena de lacto-N-neotetraosa inmunosupresora o su análogo sialilado unido a un Hep en sus estructuras interiores (14, 16, 22), los LOS de las cepas del grupo A tienen más estructuras inmunogénicas de la cadena distal.

Se conoce que los inmunotipos L3 y L7 están estrechamente relacionados y únicamente diferentes por la adición del ácido siálico terminal a la cadena de lacto-N-neotetraosa del L3 (22). Por lo tanto, además de la mala inmunogenicidad de los inmunotipos L3 y L7 causada por los aspectos estructurales indicados anteriormente, otro factor para considerar en su incapacidad de producir anticuerpos bactericidas es que el clivaje del LOS en el residuo interno KDO podría perjudicar estructuralmente el epítipo interior del LOS. Para averiguar esta hipótesis, conjugamos un oligosacárido L7, después de conservar epítopes interiores a TT y comparamos las propiedades inmunitarias del conjugado con las de un conjugado TT elaborado del modo anteriormente descrito con un oligosacárido nuclear L7 truncado. Para lograr nuestros objetivos elegimos conjugar el LOS L7 detoxificado tratado con hidracina a TT. Este procedimiento se ha descrito anteriormente para la síntesis de conjugados LOS no clasificables de *H. influenzae* (10) en la que utilizaron

ES 2 320 334 T3

residuos KDO internos como punto de enlace. Sin embargo, dichos residuos están cerca de los epítopes internos, si no forman parte de los mismos. Por lo tanto, coherente con nuestra estrategia original de intentar estrictamente asegurar la conservación de los epítopes internos, enlazamos el LOS O-desacilado por su residuo de glucosamina reductora terminal. Separando la unión de la región de los epítopes internos potenciales esperamos evitar cualquier posibilidad de interferencia del enlace con dicha región. A fin de conjugar L7-OH a TT mediante la aminación reductiva tuvimos que extraer todos los sustituyentes de fosfato del grupo hemiacetal en C-1 del residuo de glucosamina terminal del lípido A. Se logró esta meta mediante el tratamiento adicional del LOS-L7 detoxificado con fosfatasa alcalina. Utilizando una combinación de tratamientos con hidracida y fosfatasa alcalina y siguiendo los procedimientos por espectroscopia ³¹P NMR, pudimos verificar la extracción completa de ambos grupos de difosforiletanolamina desde C-1 y C-4' de la porción del lípido A. Aunque permanecieron dos esteres de monofosfato, uno ubicado en C-4', que probablemente se hubiera podido extraer mediante un tratamiento más apropiado de enzimas, se averiguó que el hemiacetal en C-1 estaba completamente libre.

Por lo tanto el oligosacárido anterior (L7-OH, de P) y L7-OS fueron conjugados a TT mediante la aminación reductiva directa y se demostró mediante el análisis que ambos conjugados L7OH, de P-TT y L7OS-TT tenían unas relaciones similares de sacárido/TT. Este hecho, junto con sus similitudes estructurales, permitió realizar una comparación legítima de sus prestaciones inmunitarias. Ambos conjugados eran capaces de inducir anticuerpos que se enlazaban al L7-LOS, aunque el conjugado que contenía el epítipo conservado (L7OH, de P-TT) era claramente el inmunogeno superior. La confirmación de que la conservación de los epítopes L7-LOS es un factor para obtener una respuesta inmunitaria eficaz se demostró de forma más dramática al comparar las actividades bactericidas de los anticuerpos inducidos por ambos conjugados. El conjugado que había conservado los epítopes de oligosacárido internos (L7-OH, de P) indujo anticuerpos que eran bactericidas para los organismos homólogos, mientras que los antiseros inducidos por el conjugado elaborado con el oligosacárido de núcleo truncado (L7-OS-TT) no lo eran. Este último resultado negativo también resulta coherente con los estudios anteriores que utilizaban conjugados realizados con oligosacáridos similares de los inmunotipos L3 y L7 (13, 30).

Es sorprendente la diferencia en la capacidad de inducir anticuerpos bactericidas de los dos conjugados, porque ambos conjugados podían producir anticuerpos que enlazaban a L7-LOS de isotipos que tenían al menos la posibilidad de ser bactericida. Puede ser que la falta de actividad bactericida en los anticuerpos elevados por L7-OS-TT se deba a su poca avidéz, pero disponemos de pruebas suficientes para demostrar que los epítopes bactericidas importantes se pierden cuando el L7-OS se somete a una hidrólisis al ácido suave.

Este hecho se determinó en experimentos de inhibición en los que se utilizaron los distintos oligosacáridos para inhibir el enlazamiento del L7-LOS a los anticuerpos inducidos por el conjugado L7-OH, de P-TT. Mientras que tanto el L7-OH como el L7-OH, de P eran igualmente buenos para la inhibición del enlazamiento, L7-OS era un inhibidor muy malo del mismo sistema. Este resultado implica que tanto L7-OH como L7-OH, de P contienen epítopes que no se encuentran en L7-OS y también que dichos epítopes constituyen el origen de una gran proporción de los anticuerpos bactericidas. Cuando los oligosacáridos L3 sialilados equivalentes fueron sustituidos por los del L7 en los experimentos de inhibición anteriormente descritos, produjeron unas curvas de inhibición esencialmente similares, coherente con la prueba estructural (22), de que el L7-LOS es equivalente al L3-LOS desialilado.

Ejemplo 2

Elaboración, caracterización y prestaciones de una vacuna meningocócica en base a lipopolisacáridos utilizando la cepa L3 galE de Neisseria meningitidis conjugada a CRM₁₉₇ mediante la tecnología de fosfatasa alcalina

Materiales y métodos

En este ejemplo, el mutante galE de la cepa H44/76 (inmunotipo L3) de *Neisseria meningitidis* se cultivó inicialmente durante la noche a 37°C en 10% CO₂ en placas agar 50% Todd-Hewitt 50% Columbia (THC). Se utilizaron placas iniciales para asegurar una inoculación intensiva de los cultivos iniciales (1L) y se cultivaron en caldo (THC) a 37°C durante 18 h. Los cultivos iniciales se utilizaron para inocular el fermentador de 28L con los mismos medios, y se cultivaron del mismo modo que los cultivos iniciales. Después de su desarrollo nocturno (17 h a 37°C) matamos el cultivo mediante la adición de fenol (1%) y se enfrió hasta 15°C y las bacterias fueron cosechadas mediante centrifugación (13, durante 20 min) (Wakarchuk, W. *et al.*, 1996. J. Biol. Chem. 271: 19166-19173). Los rendimientos eran generalmente de 100 g biomasa (peso húmedo). El LPS crudo se extrajo de la bola de bacteria utilizando el método estándar de fenol caliente- agua (Westphal, O., y J.K. Jann, 1965. Meth. Carbohydr. Chem. 5: 83-91) tratado con Dnasa, Rnasa y Proteinasa K y se purificó de la fase acuosa mediante su ultracentrifugado repetido (105.000 x G, 4°C, 2 x 5h) (Masoud, H., E.R. Moxon, A. Martín, D. Krajcarski, y J.C. Richards. 1997. Biochemistry 36: 2091-2103).

Preparación de LOS O-desacilado. Una muestra de LOS se secó durante la noche *in vacuo* y se añadió hidracina anhidra (98%; 1 ml/10 mg.) LOS y la suspensión se agitó a 37°C durante 30-45 min., se enfrió en hielo y se puso a enfriar en hielo seco/acetona (se añadió lentamente la acetona (5vol.)). Las soluciones fueron centrifugadas (10K, 30 min) y la bola se lavó (x2) con acetona. La bola se volvió a disolver en H₂O y se liofilizó para producir LOS-OH. Rendimiento ~ 50%.

El LPS-OH fue sometido a un control de calidad por ES-MS en el modo de iones negativos en un espectrómetro de masa triple cuádruple VG Quattro (Fisons Instruments) o API 300 (Perkin-Elmer/Sciex). Las muestras fueron disueltas en agua diluida al 50% con acetonitril: agua:metanol: 1% amoníaco (4:4:1:1) y la mezcla se realizó mediante la infusión directa a 4 μ l/min. En algunos casos se utilizó NMR (aunque normalmente era necesario añadir EDTA y SDS deuterada para obtener un espectro resuelto) de un modo similar al que se describió en el Ejemplo 1 (anterior).

Purificación de LPS O-desacilado para aumentar la eficiencia de la desfosforilación. El L3 galE LOS-PH se disolvió en H₂O (~ 10 mg/4-5 ml). El material insoluble fue eliminado por centrifugación (14 K, 5 min). El sobrenadante producido se aplicó a una columna de filtración por gel Sephadex G-50 (medio) de 2,5 cm. x 50 cm. y se eluyó con H₂O. El eluante producido se monitorizó mediante un índice refractivo y un ensayo de hidrato de carbono PhOH/H₂SO₄ (absorción a 490 nm). Las fracciones positivas al hidrato de carbono fueron liofilizadas individualmente y examinadas por espectroscopia ¹H-NMR después de disolverlas en 0,7 ml D₂O. Las fracciones que ofrecían espectros NMR bien resueltos fueron puestas en común y liofilizadas. Rendimiento ~ 50%. Tal y como lo ilustra la Figura 5b, el espectro NMR del material purificado G-50 fue coherente con la estructura del material LPS-OH. El material LPS -OH que no se purificó por columna de esta forma mostró unas líneas anchas no resueltas en su espectro NMR (Fig. 5a), indicando la posible agregación del material.

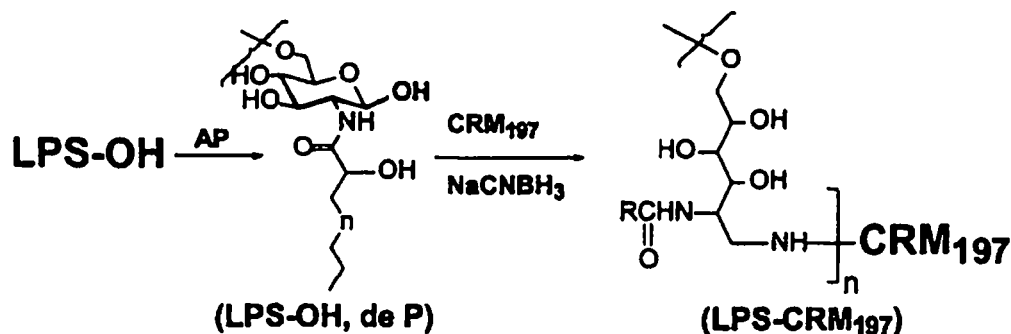
Desfosforilación de fosfatasa alcalina de LPS O-desacilado (LPS-OH). Los métodos utilizados eran básicamente los del Ejemplo 1 (anterior) con las modificaciones indicadas a continuación. El LPS purificado L3 galE O-desacilado fue tratado con fosfatasa alcalina (Sigma; P 6772, Tipo VII-L de mucosa intestinal bovina, polvo liofilizado purificado por afinidad en un tampón tris-citrato) de la siguiente manera. El polvo facilitado por el proveedor fue disuelto en 0,1 M de un tampón de NH₄ HCO₃ (pH 8,0) para facilitar una solución de 4000 U/ml. Se realizaba siempre una reacción de control disolviendo aprox. 1 mg. de p-nitrofenilfosfato en 1 ml del tampón de NH₄ HCO₃ (pH 8,0). Se añadió 20 μ l de enzima y en el caso de tener lugar la reacción, se observó inmediatamente una coloración amarilla. El LOS O-desacilado purificado fue disuelto en 0,1 M de un tampón de NH₄ HCO₃ (pH 8,0) a una concentración de 1 mg./ml y se añadió 100 U enzima/mg de LOS O-desacilado purificado. La mezcla de la reacción fue agitada en un Reacti-vial a 54°C. Después de una reacción durante ~ 16 h. se extrajo una alícuota, se calentó a 100% durante 5 min., se enfrió y se centrifugó a 14 K durante 5 min. para intentar quitar la enzima desnaturalizada. Una alícuota de la misma fue analizada por CE-MS (Fig. 6) utilizando el monitorizado de ión único para buscar iones diagnósticos del material inicial y desfosforilado. En el caso de indicar una desfosforilación exitosa por CE-MS, la mezcla de la reacción restante fue desnaturalizada y centrifugada del modo indicado y se liofilizó para reducir la cantidad de tampón volátil presente. El material liofilizado fue disuelto en H₂O y se desaló en una columna de Sephadex G-10. Se monitorizó el eluante del modo ya descrito y las fracciones positivas respecto de carbohidratos fueron combinadas y liofilizadas. El rendimiento de los productos desfosforilados de la reacción fue del 80-90%. Una pequeña cantidad del material desfosforilado fue examinada mediante espectroscopia ¹H-NMR después de disolverse en 0,7 ml D₂O. Se verificó una desfosforilación eficiente por la observación de la pérdida de señal de la resonancia ¹H anomérica fosforilada correspondiente al residuo del lípido A α -GlcN desde 5,4 ppm (contrastar Fig. 7b con Fig. 7a)

Acoplamiento de LPS-OH, de P a CRM₁₉₇ (ver Esquema 1)

Acoplamiento mediante la aminación reductiva. A una solución de CRM₁₉₇ (4.5 mg) en 0.1 N NaHCO₃ (0.15 mL) se añadió L3 galE LOS-OH, de P (2.0 mg) y NaCNBH₄ (5.0 mg). La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante dos días. El progreso de la conjugación se monitorizó por HPLC utilizando una columna Superosa 12 HR 10/30 (Pharmacia) con PBS como eluante a una velocidad de flujo de 0.4 mL/min (Fig. 8). La conjugación fue indicada por la desaparición completa del pico CRM₁₉₇ y la aparición simultánea del pico del conjugado con un valor K_{av} relativamente más bajo. La mezcla se diluyó repetidamente con PBS (10 ML x 4) y se concentró por Centriprep (Amicon, 50,000 Dalton) a 3000 r/min durante 60 min. para extraer LPS no conjugado. La solución final del conjugado (2.5 mL) fue sometida a la purificación de columna (Biogel A 0,5 PBS) y las fracciones fueron recogidas y concentradas por Centriprep. El contenido de LPS y CRM₁₉₇ fue analizado utilizando los mismos métodos descritos en el Ejemplo 1 y la relación de LPS a CRM₁₉₇ era de aproximadamente 5.2:1.

Esquema 1

Glicoconjugación mediante la aminación reductiva directa



ES 2 320 334 T3

La conjugación del L3 *galE* LOS-OH mediante el acoplamiento por un carboxilo de Kdo con un enlazador (M₂C₂H) (ver la Esquema 2) (procedimiento modificado empleado por Gu *et al* (op. cit.)).

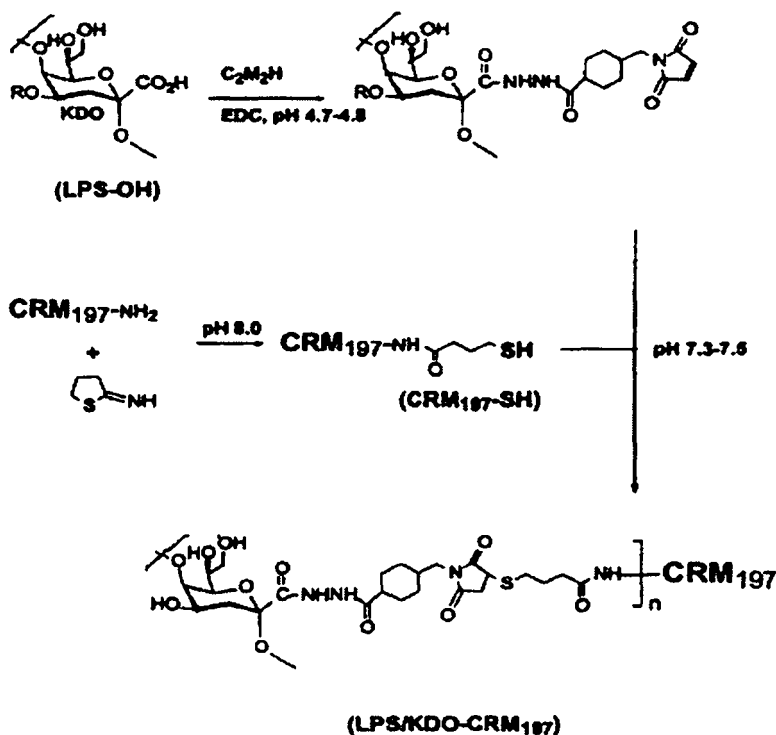
5 Activación de Kdo con M₂C₂H. A una solución de LPS-OH (2.0 mg) en agua (1 mL) se añadió M₂C₂H (3 mg en 100 μ L de DMSO). El pH de la solución se fijó a 4,7-4,8 utilizando 0,01 N NaOH ó 0,01N HCl. Se añadió EDC (3 mg en 100 μ L de agua) y el pH de la solución se mantuvo a 4,7-4,8 durante 3 h. La purificación fue realizada en una columna Sephadex G-10 (40. x 1.6 cm.) utilizando agua como eluante. Las fracciones que contenían LPS-OH activado fueron recogidas y liofilizadas a material amorfo (c.a. 2.0 mg). ¹H NMR (D₂O) mostró un característico pico de meileimida a 6,75 ppm.

10 CRM₁₉₇ tiolado. Una solución de CRM₁₉₇ (6 mg) en 0,1 N NaHCO₃ (0,2 mL) se diluyó con un tampón de trietilamina (pH 8.0) A esta solución se añadió iminotiolano -HCL (0.5 mg) y la mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 2 h. Las pequeñas moléculas fueron extraídas por Centriprep (10 mL x 3) hasta que no se detectase compuesto tío en el lavado.

15 Acoplamiento. A una solución de dicho CRM₁₉₇ tiolado (0,8 mL) se añadió LPS-OH activado (2 mg) y la solución se mantuvo a temperatura ambiente durante la noche. HPLC indicó una conjugación exitosa (ver también la Fig. 8). Se añadió ditioeritritol (0,5 mg) y posteriormente se realizó una purificación durante 15 min. en una columna Biogel A 0,5. Se recogieron dos fracciones y se concentraron por Centriprep. El contenido de LPS y CRM₁₉₇ se analizó y la relación de LPS a CRM₁₉₇ era de aproximadamente 6.5:1

Esquema 2

Glicoconjugación por KDO y un enlazador



60 *Confirmación de la presentación del epítipo.* El epítipo LPS del núcleo interno LPS se presentaba adecuadamente en el conjugado tal como lo demostró la reactividad con MAb B5 (Fig. 9). Se mostró anteriormente que MAb B5 reconoce un epítipo del núcleo interno conservado en LOS meningocócico en Piested *et al* 1999, referencia n° 24 de la lista de referencias más adelante.

65 *Protocolos de inmunización.* Se realizaron según la descripción de Piested *et al.* 1999 con las siguientes modificaciones. En resumen, unos ratones hembra Balb/C de entre 6 y 8 semanas de edad fueron inmunizados intraperitonealmente con conjugados LPS-CRM L3 *galE* OdA (MLC y MLKC). A cada ratón se le administró 2 μ g de carbohidratos en 0,2 ml de adyuvante completo Ribis (Cedarlane Laboratories Ltd. Hornby, ON) por inyección. Los ratones recibieron un complemento el día 20 y 42 de una cantidad equivalente de vacuna conjugada. Se recuperaron los sueros mediante punción terminal del corazón el día 51.

ES 2 320 334 T3

Comparación de la respuesta inmunológica a distintas estrategias de conjugación: Ventajas de la conjugación a la proteína portadora mediante el acoplamiento por la glucosamina del extremo reductor. La comparación de las respuestas inmunitarias de los sueros derivados MLC (conjugados de la ruta de lípido A) y MLKC (conjugados de ruta Kdo) ilustró (Fig. 10) que los sueros derivados MLC generalmente reconocen los epítopes del núcleo interior en todo el trasfondo LPS; mientras que los sueros derivados MLKC no reconocen los epítopes del núcleo interno en el trasfondo LPS, sino que la respuesta inmunitaria se dirige a la región del lípido A O-desacilado de la molécula, una característica indeseable.

Ensayo bactericida de sueros (SB). El método del suero bactericida (SB) se adaptó del protocolo CDC con la excepción de que los sueros policlonales derivados de los ratones siguiendo las inmunizaciones del conjugado se añadieron a las diluciones de sueros humanos puestos en común y 1000 cfu de la cepa *Neisseria meningitidis* con un tiempo de incubación de 40-45 min. a 37°C. En breve, las bacterias fueron cultivadas en BHI agar durante la noche a partir de cepas congeladas. Una suspensión de bacteria en PBS-B se midió a OD 260 (1:50 en 1% NAOH). Utilizando una placa de microtítulos de 96 pozos se añadió 50 µl de tampón a los pozos en las columnas 2-7. 50 µl de sueros descomplementados humanos combinados al 80% se añadió a los pozos de la columna 1. Unas diluciones serie duplicadas de anticuerpo se añadieron a las columnas 1-7 (desechando los últimos 50 µl de la columna 7). Se añadió a los pozos de las columnas 1-8 50 µl de suspensión bacteriana diluida para proporcionar 1000 cfu en 50 µl. La mezcla se incubó durante 40-45 minutos y se puso en placas de BHI agar para su incubación nocturna. Se contó el número de colonias en cada placa y los resultados se expresaron como % de cfu/ml en un pozo de control descomplementado.

El ensayo SB mostró que la respuesta inmunitaria a los epítopes del núcleo interior elicitados por sueros MLC -3 era bactericida. (Fig. 11).

Ensayo *in vivo* de protección pasiva (PP) Modelo de protección pasiva *in vivo*, utilizando el modelo de ratas infantiles Wister de cinco días de edad. Se procedió según lo descrito por Moe, G.R. *et al.* 1999, Infect. Immun. 67: 5664-5675, salvo que se emplearon unas dosis de bacterias *Neisseria meningitidis* superiores y se utilizó una cepa diferente de *Neisseria meningitidis*. En breve, grupos de ratas infantiles de cinco días fueron distribuidos aleatoriamente con sus madres; se pesaron y se les administró el inóculo 1×10^8 cfu/ml mutante *Neisseria meningitidis galE* mezclado 1:1 con o bien (i) Ningún anticuerpo (PBS); (ii) IgG3 irrelevante (iii) sueros pre-inmunes (iv y v) sueros policlonales MLC-3 y MLC-6 derivados de ratones después de las inmunizaciones del conjugado; (vi) MAb B5 purificados por afinidad (iv) MAb P1.2 (anticuerpo anti-porina) (2 µg). Las ratas infantiles fueron controlados por indicios de infección y se tomaron muestras mediante el sangrado de la vena de la cola a 6 horas después de la infección. Los animales fueron pesados y se tomó un sangrado terminal después de 24 h. mediante punción cardíaca después de una inyección de pentobarbitona. La sangre pura y diluida fue puesta inmediatamente en placas BHI y se incubó durante la noche. Las placas fueron contadas el día siguiente para determinar la bacteremia (cfu/ml) a 6 h. y 24 h..

El ensayo PP muestra que la respuesta inmunitaria a los epítopes del núcleo interno elicitados mediante suero MLC-3 ofreció protección pasiva contra el reto para los ratones (Fig. 12).

Ejemplo 3

Producción, caracterización y rendimiento de una vacuna contra *Haemophilus influenzae* en base a lipopolisacárido utilizando la cepa 1003 *lic1 lps A* de *Haemophilus influenzae* conjugado a TT mediante la tecnología fosfatasa alcalina

Introducción

Haemophilus influenzae constituye una causa importante de la enfermedad en todo el mundo. Se reconocen seis serotipos capsulares (“a” a “f”) y un número indeterminado de cepas acapsulares (no tipificables) de *H. influenzae*. Las cepas capsulares del tipo B se asocian con las enfermedades invasoras incluyendo meningitis y neumonía, mientras que la *H. influenzae* no tipificable (NTHi) es una causa principal de otitis media en niños y de infecciones de la vía respiratoria en adultos. La otitis media es una enfermedad infantil común que acarrea la frecuencia más elevada de visitas al pediatra de los Estados Unidos (Stool *et al.*, *Pediatr. Infect. Dis. Suppl.*, 8: 211-S14, 1989).

El desarrollo de una vacuna para las enfermedades NTHi se ha demostrado difícil por una falta de comprensión de los antígenos que confieren la inmunidad protectora. El empeño en el desarrollo de una vacuna NTHi se ha concentrado en los antígenos de la superficie celular tales como las proteínas de la membrana exterior y las cepas pili o fimbria de *H. influenzae* (es decir, contra las enfermedades provocadas por NTHi) porque sólo protegen contra las infecciones provocadas por las cepas de *H. influenzae* que llevaban la cápsula del tipo b. El lipopolisacárido (LPS) es un antígeno principal NTHi - superficie celular. Se ha detectado que el LPS de *Haemophilus influenzae* contiene solamente componentes del lípido A y de oligosacárido (OS). Puesto que el componente del lípido A de LPS es tóxico, debe ser detoxificado antes de su conjugación a un portador inmunogénico, tal como se ha descrito anteriormente. En este ejemplo se utiliza una cepa no tipificable de *H. influenzae*, cepa 1003 con mutaciones específicas en los genes *lic1* y *lpsA*. Tal como lo divulga la W002/16640, esta cepa doble mutante de *H. Influenzae* elabora LPS que comprende la región conservada del oligosacárido del núcleo interno de *H. influenzae* unida únicamente con una porción del lípido A.

ES 2 320 334 T3

Material es y métodos

5 A menos que se indique lo contrario, los métodos utilizados son los descritos en el Ejemplo 2. La cepa 1003 *lic1* *lpsA* de *H. influenzae* fue cultivada a 37°C en un caldo de infusión de cerebro y corazón (BHI) con suplemento de hemina (10 µg/ml) y NAD (2 µg/ml). Para la selección después de la transformación, se añadió kanamicina (10 µg/ml) al medio de cultivo. El LOS se aisló mediante el método de extracción fenol agua, se O-desaciló con hidracina anhidra y cromatografía de filtración en gel purificada en una columna Sephadex G-50 del modo anteriormente descrito.

10 *Desfosforilación enzimática de LOS-OH*. El tratamiento de fosfatasa alcalina se realizó esencialmente del modo anteriormente descrito. El estudio ES-MS de LPS-OH antes (Fig. 13a) y después (Fig. 13b) del tratamiento de fosfatasa alcalina mostró picos que indicaban que la desfosforilación del LPS -PH había tenido lugar. El análisis posterior CE-MS en los iones doblemente cargados correspondientes a la molécula completa y desfosforilada de LPS-PH confirmó que la región del lípido A de la molécula había perdido una especie de 80 amu coherente con la pérdida de una molécula de fosfato (Fig. 14).

20 La espectroscopia ¹H-NMR de la muestra antes y después de la desfosforilación dio muestras de una desfosforilación eficiente y específica debido a la observación de la pérdida de la señal para la resonancia ¹H anomérica fosforilada correspondiente al extremo reductor α-GlcN del LOS O-desacilado a partir de 5,4 ppm (comparar la Fig. 15a (fosforilado) con la Fig. 15b (desfosforilado)).

Acoplamiento del Haemophilus influenzae 1003lic1 LpsA LOS-OH, de-P no tipificable al toxoide tetánico (ver la Esquema 3). En este ejemplo, se utiliza un espaciador para enlazar el LPS-OH, de -P al TT de la siguiente manera.

25 La activación de TT con los grupos de bromoacetilo (TTAcBr). A una solución de 20 mg de TT (0,5 mL) en 1,6 mL de 0,1 M Na₂HPO₄ se añadió 20 mg de éster de succinilo de bromo acetilo (Sigma) en 0,4 ml de DMSO. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. cuando una prueba TNBS indicó una derivación casi completa de los grupos amínicos (prueba TNBS: las soluciones de TT, TTAcBr (ambos a 3 mg/mL, 200 µL) y el tampón fueron reaccionadas con 5% TNBS recién preparado en un tampón de 0,1 M de borato (pH 8,3 400 µL) durante 1,5 h. Únicamente el TT mostró un color amarillo (420 nm)). A continuación la mezcla se pasó por una columna Sephadex G-25 (1,6 x 40 cm.) utilizando un tampón de fosfato de 10 mM (pH 6,5) que contenía 1 mM de EDTA como eluante. El primer pico (proteína) se recogió (aproximadamente 10 mL).

35 *Derivatización LPS con un espaciador (LPS-OH, SS)*. A una solución de LPS-OH, de P (10 mg) en 0,1 M NaHCO₃ (3 mL) se añadió cistamina (75 mg, Aldrich) y Na CNBH₃ (40 mg. re-cristalizado para garantizar su pureza). La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 72 h. La mezcla se purificó en una columna Sephadex G-25 utilizando agua como eluante. El primer pico se recogió y se liofilizó (10 mg). El análisis CE-MS indicó que el rendimiento de conversión fue de aproximadamente 50-60% en base al *m/z* de 1084 (producto) y 1016 (material inicial).

40 *Activación de LPS-PH, SS a LPS-OH, SH*. El LPS-PH, SS (10 mg) derivado del espaciador fue disuelto en 2,0 mL de 0,1 M Na₂HPO₄ con 0,2 M DTT a RT durante 1,5 h. La solución fue pasada por una columna Sephadex G-25 (1,6 x 40 cm.) utilizando 10 mM de un tampón de fosfato (pH 6,5) que contenía 1 mM EDTA como eluante. El primer pico fue recogido (aproximadamente 8 mL) y la prueba Ellman dió un fuerte positivo (color amarillo), indicando la presencia de grupos de tiol.

45 *Acoplamiento*. Las soluciones de TTAcBr y LPS-OH, SH fueron mezcladas y el pH se ajustó añadiendo 0,1 M Na₂ HPO₄ hasta 7,5. La mezcla (aproximadamente 36 mL) se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 h. El perfil HPLC mostró una ligera desviación, indicando que se habían formado conjugados de un peso molecular superior.

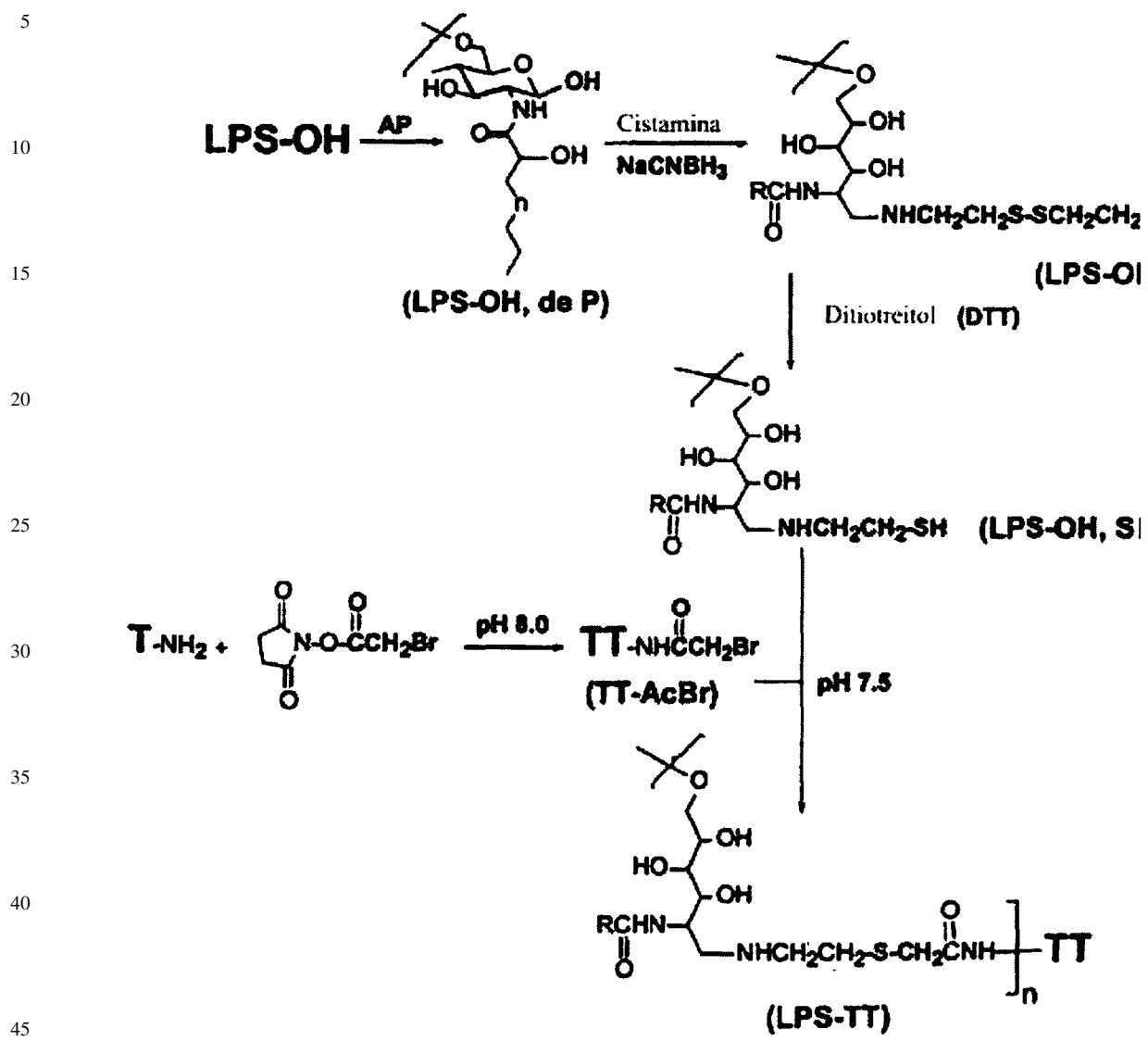
50 *Extracción de LPS no conjugado*. La solución de reacción indicada se concentró hasta aproximadamente 5 mL mediante su centrifugado con un Centriprep (Amicon, 50.000 Dalton) a 3.000 r/min durante 60 minutos. La solución fue diluida por la adición de PBS (10 mL, CMF, Sigma) y fue concentrada. El proceso se repitió seis veces cuando el hidrato de carbono no fue detectado en los últimos dos lavados. Cada lavado fue comprobado por ensayo BCA y el ensayo fenol-sulfúrico. Los conjugados en PBS (36 mL) fueron obtenidos con TT a 1,5 mg/mL y LPS a 0,2 mg/mL. La relación de LPS a TT fue de aproximadamente 10:1.

60

65

Esquema 3

Glicoconjugación por el lípido A y un enlazador



Acoplamiento por Kdo y un enlazador. 1003 *liclpsA* LPS-PH de *Haemophilus influenzae* también fue acoplado a TT mediante el grupo Kdo y un espaciador, utilizando la metodología descrita en el Ejemplo 2.

Confirmación de la presentación de epítopes. El epítipo LPS del núcleo interno fue presentado de forma adecuada en el conjugado tal y como fue mostrado por su reactividad con MAb LLA4 (Fig. 16). Ya se ha demostrado que MAb LLA4 reconoce un epítipo de núcleo interno conservado en LPS de *Haemophilus influenzae* (Ejemplo 6 en WO02/16640).

Protocolos de inmunización. Siguieron esencialmente los indicados en el Ejemplo 5 de la WO02/16640. Unos ratones hembra Balb/C de entre 6 y 8 semanas de edad fueron inmunizados intraperitonealmente con conjugados 1003 *lic1*, *lpsA*, Oda LPS-TT (SRA y SK). Cada ratón recibió 10 μ g de carbohidratos en 0,2 mL de adyuvante completo Ribí o Freund's por inyección. Se administró un refuerzo a los ratones el día 21 y 42 con una cantidad equivalente de vacuna conjugada. Los sueros fueron recuperados por punción de corazón terminal el día 51.

Comparación de la respuesta inmunitaria a las distintas estrategias de conjugación: Ventajas de la conjugación por la glucosamina de extremo reductor. La comparación de las respuesta inmunitarias de sueros derivados SRA (conjugados de la vía del lípido A con Ribí como adyuvante) (Fig. 17b) a SK (conjugados de vía Kdo) (Fig. 17a) mostró que los sueros derivados SRA suelen reconocer los epítopes del núcleo interno en todo el trasfondo LOS, mientras que los sueros derivados SK se dirigen de forma significativa a la región del lípido A O-desacilado, lo que no constituye un aspecto deseable. Esta conducta fue corroborada por la observación de que todos los sueros SK reconocieron LOS-OH de la cepa meningocócica heteróloga L3 *galE* pero no reconocieron LOS intactos de esta cepa L3 *galE*, confirmando que una proporción significativa de la respuesta inmunitaria inducida por la inmunización con

ES 2 320 334 T3

los conjugados 1003 *lic1*, *lpsA* *Oda* LPS-TT unidos por la porción Kdo fue dirigida a la región del lípido A O-desacilado de la molécula.

Los estudios que utilizan la tecnología fosfatasa alcalina para producir conjugados con la unión a la glucosamina del extremo reductor en la región del lípido A de la porción del hidrato de carbono dio los siguientes resultados. Utilizando dos adyuvantes diferentes (Ribi y Friends) quedó evidente que la respuesta inmunitaria a dichos conjugados se dirigía a los epítopes del núcleo interno en tanto las moléculas LPS enteras como las LPS-OH. En la Figura 18, R se corresponde con el adyuvante Ribi y F con el adyuvante Friends y *oda* se refiere a las moléculas LPS-OH O-desacilados.

Reactividad cruzada de los sueros derivados.

Las cepas no tipificables fueron obtenidas del Prof. Eskola como parte de un Estudio finlandés de Cohortes de Otitis Media y principalmente son aislamientos obtenidos del oído medio de niños. Estas cepas se describen adicionalmente en Hood *et al.*, Mol. Microbiol, 33:679-792, 1999. 102 cepas de otitis media NTHi fueron enviadas a Richard Goldstein en Boston para ser incluidas en un estudio de la diversidad de más de 600 cepas capsulares de *H. influenzae* y NTHi obtenidas en todo el mundo y durante un periodo de 35 años, mediante el análisis de ribotipos. Cuando se elaboró un dendrograma a partir de los resultados del ribotipo, los aislamientos de otitis media NTH se detectaron en casi todas las ramas obtenidas. Las 25 cepas representativas fueron seleccionados de ramas que abarcaban el dendrograma y por lo tanto representan la diversidad conocida asociada con la especie *H. influenzae*. Se incluyeron en las 25 cepas algunas seleccionadas del mismo cluster para permitir una evaluación de la diversidad de los aislamientos estrechamente relacionados.

Los sueros derivados de las inmunizaciones con tanto Ribi como Friends como adyuvantes dieron una respuesta de amplia reactividad-cruzada contra los LPS de las 25 cepas no tipificables de *Haemophilus influenzae* que representaban la diversidad genética presente en esta especie (Tabla 4).

TABLA 4

Sueros 1003 <i>lic1</i> / <i>lpsA</i> .TT D56 contra 25 NT LPS								
{LPS}	F10 1:30	F14 1:50	F15 1:200	F16 1:100	R19 1:200	R20 1:100	R22 1:200	R24 1:30
1003 <i>lic1/lps</i>	0.459	1.443	1.634	1.438	1.291	1.561	1.688	0.840
*1268	0.848	0.132	-	-	-	-	-	1.098
1247	0.551	0.312	-	-	0.549	-	-	0.624
*1209	0.443	0.212	-	-	0.473	-	-	0.556
*1233	0.319	0.227	-	-	0.242	-	-	0.271
*1181	0.522	0.283	-	-	0.489	-	-	0.755
*1232	0.537	0.285	-	-	0.133	-	-	0.634
981	0.843	0.491	-	-	-	-	-	0.341
486	0.723	0.189	-	-	-	-	0.121	1.015
*1292	0.555	0.358	-	-	0.468	-	-	0.541
1008	0.591	0.278	-	-	0.591	-	-	0.814
1158	0.624	0.267	-	-	0.163	-	-	0.640
1124	0.860	0.636	-	-	-	-	-	0.611
1003	0.489	0.207	-	-	0.665	-	-	0.771
*667	0.454	0.219	-	-	0.276	-	-	0.336
*285	0.725	0.285	-	-	1.009	-	-	0.713
*176	0.604	0.337	-	-	0.465	-	0.139	0.720
*162	0.495	0.251	-	-	0.656	-	-	0.729
*1160	0.549	0.193	-	-	0.652	-	-	0.784
1159	0.579	0.199	-	-	0.109	-	-	0.539

ES 2 320 334 T3

TABLA 4 (continuación)

Sueros 1003hc <i>l</i> hpsA TTD56 contra 25 NT LPS								
cepas (LPS)	F10 1:30	F14 1:50	F15 1:200	F16. 1:100	R19 1:200	R20 1:100	R22 1:200	R24 1:30
723+ NANA	0.473	0.325	-	-	0.261	-	-	0.586
*1231+ NANA	0.335	0.397	0.126	-	0.123	-	-	0.471
*1200	0.637	0.153	-	-	-	-	-	0.751
*1207	0.370	0.156	-	-	0.571	-	-	0.593
432	0.330	0.196	-	-	0.276	-	-	0.500
375 + NANA	0.306	0.194	-	-	0.330	-	-	0.407
Rd opsX	0.165	0.297	-	-	-	-	-	-
Rd opsX odA	0.810	0.566	-	-	-	-	-	0.822
En el que F se refiere a los sueros elaborados utilizando el adyuvante de Freund y R se refiere a los sueros elaborados utilizando Ribí Bolb > 0,200 + > 0,100-								

Referencias

1. **Batley, M., N.H. Packer and J.W. Redmond.** 1985. Analytical studies of lipopolysaccharide and its derivatives from *Salmonella minnesota* R595. *Biochim. Biophys. Acta* 821:179-194.
2. **Baumann, H., A.O. Tzianabos, J.-R. Brisson, D.L. Kasper, and H.J. Jennings.** 1992. Structural elucidation of two capsular polysaccharides from one strain of *Bacteroides fragilis* using high-resolution NMR spectroscopy. *Biochemistry* 31:4081-4089.
3. **Brandtzaeg, P.P., P. Kierulf, P. Ganstád, A. Skulberg, J.M. Bruun, S. Halvorsen, and E. Sorensen.** 1989. Plasma endotoxin as a predictor of multiple organ failure and death in systemic meningococcal disease. *J. Infect. Dis.* 160: 58-65.
4. **Devi, S.J., J.B. Robbins, and R Schneerson** 1991. Antibodies to poly [(2-8)- α -N-acetylneuraminic acid] and poly [(2-9)- α -N-acetylneuraminic acid] are elicited by immunization of mice with *Escherichia coli* K92 conjugates: potential vaccines for groups B and C meningococci and *E. coli* K1 *Natl Acad. Sci. U.S.A.* 88:7175-7179.
5. **DiFabio, J.L., F. Michon, J.-R. Brisson, and H.J. Jennings.** 1990. Structure of the L1 and L6 oligosaccharide epitopes of *Neisseria meningitidis*. *Can. J. Chem.* 68:1029-1034.
6. **Dubois, M., H. Gillis, JK. Hamilton, A.A. Rebers, and R. Smith.** 1956. Colorimetric methods for the determination of sugars and related substances. *Anal. Biochem.* 28:250-256.
7. **Gamian, A., M. Beurret, F. Michon, J. R. Brisson, and H.J. Jennings.** 1992. Structure of the L2 lipopolysaccharide core oligosaccharides of *Neisseria meningitidis*. *J. Biol. Chem.* 267:922-925.
8. **Goldschneider, I., E.C. Gotachlich and M.S. Artenstein.** 1969. Human immunity to the meningococcus II. Development of natural immunity. *J. Exp. Med.* 129:1327-1348.
9. **Gu, X.X., and C.-M. Tsai.** 1993. Preparation characterization and Immunogenicity of meningococcal lipopolysaccharide-derived oligosaccharide-protein conjugates. *Infect. Immun.* 61:1873-1880.
10. **Gu, X.X., C.-M. Tsai, T. Veyama, S.J. Barenkamp, J.B. Robbins and D.J. Lim.** 1996. Synthesis, characterization, and immunological properties of detoxified lipooligosaccharide from nontypeable *Haemophilus influenzae* conjugated to protein. *Infect. Immun.* 64:4047-4053.
11. **Hoist, O., S. Moller-Loennies, B. Lindner, and H. Brade.** 1993. Chemical structure of the lipid A of *Escherichia coli* J-5. *Eur. J. Biochem.* 214:695-701.

12. **Jennings, H.J. and C. Lugowski.** 1981. Immunochemistry of groups A, B, and C meningococcal polysaccharide tetanus toxoid conjugates. *J. Immunol.* 127:1011-1018.
13. **Jennings, H.J., C. Lugowski and F.E. Ashton.** 1984. Conjugation of meningococcal 10opolysaccharide II-type oigosaccharides to tetanus toxoid as a route to a potential vaccine against group B *Neisseria meningitidis*. *Infect. Immun.* 43:407-412.
14. **Jennings, H.J., K.G. Johnson, and L. Kenne.** 1983. The structure of an R-type oigosacchride core obtained from some lipopolysacchride of *Neisseria meningitidis*. *Carbohydr. Res.* 121:233-241.
15. **Jennings, HJ, M. Beurret, A. Gamian, and F. Michon.** 1987. Structure and immunochemistry of meningococcal hpopolysaccharides. *Antonie van Leeuwenhoek* 53:519-522.
16. **Kogan, G., D. Uhrin, J.-R. Brisson and H.J. Jennings.** 1997. Structural basis of the *Neisseria meningitidis* immunotypes including the L4 and L7 immunotypes. *Carbohydr. Res.* 298:191-199.
17. **Kulshin, V.A., U. Zähringer, B. Lindner, C.E., Frasch, C.-M. Tsai, B.A. Dmitriev, and E.T. Rietschel.** 1992. Structural characterization of the lipid A component of pathogenic *Neisseria meningitidis*. *J. Bacteriol* 174 1793-1800.
18. **L'Vov, V.L., I.K. Verner, L.Y. Musina, A.V. Rodinov, A.V. Ignatenko and A.S. Shashkcv.** 1992. Structure of the sugar-phosphate moiety of lipid A from the lipopoyasaccharlde of *Neisseria meningitidis* group B, strain BC5S No, 125. Hydrolytic stability of phosphate and pyrophosphate substltuents. *Arch, Microbiol.* 157:131-134.
19. **Mandrell, R.E., and W.D. Zollinger.** 1977. Upopoyasaccharide serotyping of *Neisseria meningitidis* by hemagglutination inhibition. *Infect. Immun.* 16:471-475.
20. **Mandrell, R.E., J.M. Griffiss and B.A. Macher.** 1988. Lipopolysaccharides (LOS) of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis* have components that are immunochemically similar to precursors of human blood group antigens. *J. Exp. Med.* 168:107-126.
21. **Michon, F., M. Beurret, A. Gamian, J.-R. Brisson and H.J. Jennings.** 1990.. Structure of L5 lipopolysaccharide core ongosaccharides of *Neisseria meningitidis*. *J. Biol. Chem.* 265:7243-7247.
22. **Pavliak, V., J.-R. Brisson, D. Uhrin, and H.J. Jennings.** 1993. Structure of the siaiylated L3 lipopolysaccharide of *Neisseria meningitidis*. *J. Biol. Chem.* 268:14146-14152.
23. **Pelola, H., P.H. Mäkëls, and H. Kahty.** 1977. Clinical efficacy of meningococcus group A polysaccharide vaccine in children three months to five years of age. *N. Engl. J. Med.* 297:686.691.
24. **Piested, J.S., Makepeace, K., Jennings, M.P., Gidney, M.A.J., Lacelle, S., Brisson, J.-R., Cox, A.D., Martin, A., Bird, A.G., Tang, C.M., MacKinnon, F.M., Richards, J.C.; and Maxon, E R.** 1999. Conservation and accessibility of an inner core lipopoyasaccharide epitope of *Neisseria meningitidis*. *Infect. Immun.* 67, 5417-5426.
25. **Pon, R.A., L. Lussier, O.-L. Yang, and H.J. Jennings.** 1997. N-propionylated group B meningococcal polysaccharide mimics a unique bactericidal capsular epitope in group B *Neisseria meningitidis*. *J. Exp. Med.* 185:1929-1938.
26. **Richmond, P.R., R. Borrow, E., Miller, S. Clark, F. Sadler, A. Fox, N. Begg, R. Morrisv and K. Cartwright.** 1999. Meningococcal serogroup C conjugate vaccine is immunogenic in infancy and primes for memory. *J. Infect. Dis.* 179:1569-1572.
27. **Smith, P.K, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Malls, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. F#ujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, and D.C. Kienk.** 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150:76-85.
28. **Snippe, H. and J. Verhoef.** 1991. Preparation characterization, and immunogenicity of meningococcal L2 and L3,9,7 phosphoethanolamine group containing oligosaccharide protein conjugates. *Infect. Immun.* 59:843-851.
29. **Tsal, C.M., and C.V. Civin.** 1991. Eight lipopolysaccharldes of *Neisseria meningitidis* react with a monoclonal antibody which binds lacto-N-neotetraose. *Infect. Immun.* 59:1652-1656.
30. **Verheui, A.F.M., A.K Braaat, J.M. Leenhouts, P. Hoogerhout, J.T. Poolman, H. Snippe, and J. Verhoef.** 1991. Preparation characterization, and immunogenicity of meningococcal L2 and L3,9,7 phosphoethanolamine group containing oligosaccharide protein conjugates. *Infect. Immun.* 59:843-851.
31. **Verheul, A.F.M., G.J.P.H. Boons, A. Van der Marel, J.H. Van Boom, H.J. Jennings, H. Snippe, J. Verhoef, P. Hoogerhout, and J.T. Poolman.** 1991. Minimal ollgosaccha ride structures requiredforinduction of immune respon-

ES 2 320 334 T3

ses against meningococcal immunotype L1, L2, and L3, 9 phosphoethanolamine group-containing oligosaccharide-protein conjugates. *Infect. Immun.* 59:843-851.

5 32. **Verheal**, A.F.M., H. **Snippe**, H., and J.T. **Poolman** 1993. Meningococcal lipopolysaccharide:virulence factor and potential vaccine candidate. *Microbiol. Revs.* 67:34-49.

10 33. **Wyle**, F.A., M.S. **Artenstein**, B.L. **Brandt**, D.L. **Tramont**, D.L. **Kasper**, P. **Alteri**, S.L. **Berman** and J.P. **Lowenthal**. 1972. Immunological response of man to group B meningococcal polysaccharide antigens. *J. Infect. Dis.* 126: 514-522.

15 34. **Zollinger**, W.D., and R.E. **Mandrell**. 1977. Outer membrane protein and lipopolysaccharide serotyping of *Neisseria meningitidis* by inhibition of solid-phase radioimmunoassay. *Infect. Immun.* 28:451-458.

20 35. **Zollinger**, W.D., and R.E. **Mandrell**. 1980. Type-specific antigens of group A *Neisseria meningitidis*: lipopolysaccharide and heat-modifiable outer membrane proteins. *Infect. Immun.* 28:451-458.

25

30

35

40

45

50

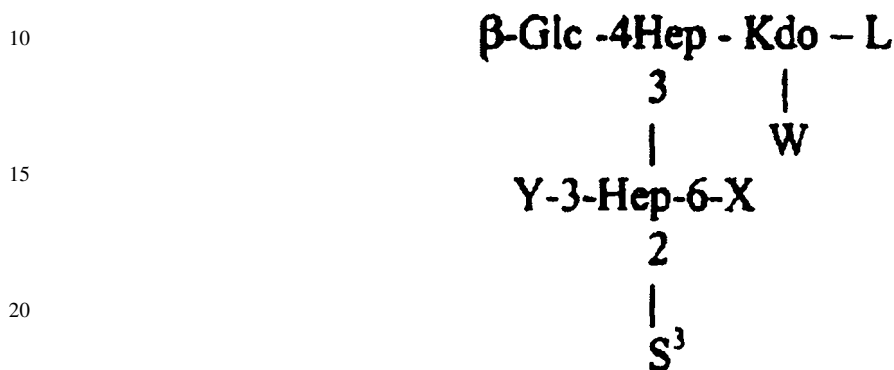
55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Lipooligosacárido bacterial Gram-negativo reductor detoxificado y antigénico con una región del lípido A detoxificado y susceptible de ser enlazado a un portador inmunologicamente aceptable por la región del lípido A detoxificado, constando dicho lipooligosacárido bacterial detoxificado y antigénico de una porción según la siguiente fórmula:



25 en la que

L es la región del lípido A detoxificado

Kdo es una porción de 2-keto-3-ácido deoxioctulosónico

30 W es una porción de 2-keto-3-deoxioctulosónico, un grupo de fosfato o un grupo de pirofosfoetanolamina

Glc es glucosa

35 Hep es L-glicero- α -D-mano-heptosa

Y es fosfoetanolamina o hidrógeno

40 X es fosfoetanolamina cuando Y es hidrógeno y X es hidrógeno cuando Y es fosfoetanolamina; y S³ es N-acetil- α -glucosamina o L-glicero- α -D-mano-heptosa.

2. Lipooligosacárido según la Reivindicación 1, en que S³ es un N-acetil- α -glucosamina.

45 3. Lipooligosacárido según la Reivindicación 1 en que W es una porción de ácido 2-keto-3-deoxioctulosónica y S³ es N-acetil- α -glucosamina.

4. Lipooligosacárido según la Reivindicación 1 en que W es un grupo de fosfato.

5. Lipooligosacárido según la Reivindicación 1 en que X es una porción lateral de fosfoetanolamina.

50 6. Lipooligosacárido según la Reivindicación 1 en que Y es una porción lateral de fosfoetanolamina.

7. Vacuna conjugada para combatir una bacteria Gram-negativa que comprende un lipooligosacárido bacterial reductor detoxificado y antigénico de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 6, enlazado a un portador inmunológicamente aceptable por la región del lípido A detoxificado.

8. Vacuna conjugada de acuerdo con la Reivindicación 7 en que dicho lipooligosacárido bacterial reductor detoxificado y antigénico es un lipooligosacárido bacterial reductor detoxificado y antigénico de *Neisseria meningitidis*.

60 9. Vacuna conjugada de acuerdo con la Reivindicación 7 en que dicho lipooligosacárido bacterial reductor detoxificado es un lipooligosacárido bacterial reductor detoxificado y antigénico de *Haemophilus influenzae*.

10. Vacuna conjugada según cualquiera de las Reivindicaciones 7 a 9, en que dicho portador inmunogénico es una proteína.

65 11. Vacuna conjugada según la Reivindicación 10, en que dicho portador inmunogénico es una proteína seleccionada del grupo compuesto por la toxina/el toxoide tetánico, un material de reacción cruzada (CRM), proteína de elevado peso molecular NTHi, toxina/toxoide diftérico, la toxina A de *P. aeruginosa* detoxificada, toxina/toxoide de

ES 2 320 334 T3

cólera, toxina/toxoides de pertussis, exotoxinas/toxoides de *Clostridium perfringens*, antígeno superficial de hepatitis B, antígeno nuclear de hepatitis B, proteína de rotavirus VP7, proteínas F y G del virus de sincitial respiratorio.

5 12. Vacuna conjugada según la Reivindicación 11, en que dicha proteína portadora inmunogénica es el toxoide tetánico.

13. Vacuna conjugada según la Reivindicación 11, en que dicha proteína portadora inmunogénica es CRM₁₉₇.

10 14. Vacuna conjugada para combatir una bacteria Gram-negativa que comprende un lipooligosacárido bacterial reductor detoxificado y antigénico de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 6 enlazado mediante un enlazador a un portador inmunológicamente aceptable por la región del lípido A detoxificado.

15 15. Vacuna conjugada según la Reivindicación 14, en que dicho enlazador se selecciona del grupo compuesto por M₂C₂H cistamina, di-hidracida de ácido adípico, ácido ε-aminohexanoico, clorohexanol acetal dimetilico, D-glucuronolactona y p-nitrofeniletilamina.

16. Vacuna conjugada de la Reivindicación 15, en que dicho enlazador es M₂C₂H.

20 17. Vacuna conjugada según la Reivindicación 15, en que dicho enlazador es cistamina.

18. Composición farmacéutica compuesta por la vacuna conjugada de cualquiera de las Reivindicaciones 7 a 17 en asociación con un adyuvante.

25 19. Composición farmacéutica según la Reivindicación 18, en que dicho adyuvante se selecciona del grupo compuesto por el adyuvante de Freund, alumbre y Ribi.

20. Composición farmacéutica según la Reivindicación 18 o 19, compuesta además por un diluyente farmacéuticamente aceptable.

30 21. Uso de un lipooligosacárido bacterial reductor detoxificado y antigénico de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 6 en la fabricación de un medicamento para combatir una infección Gram-negativa en un mamífero.

35

40

45

50

55

60

65

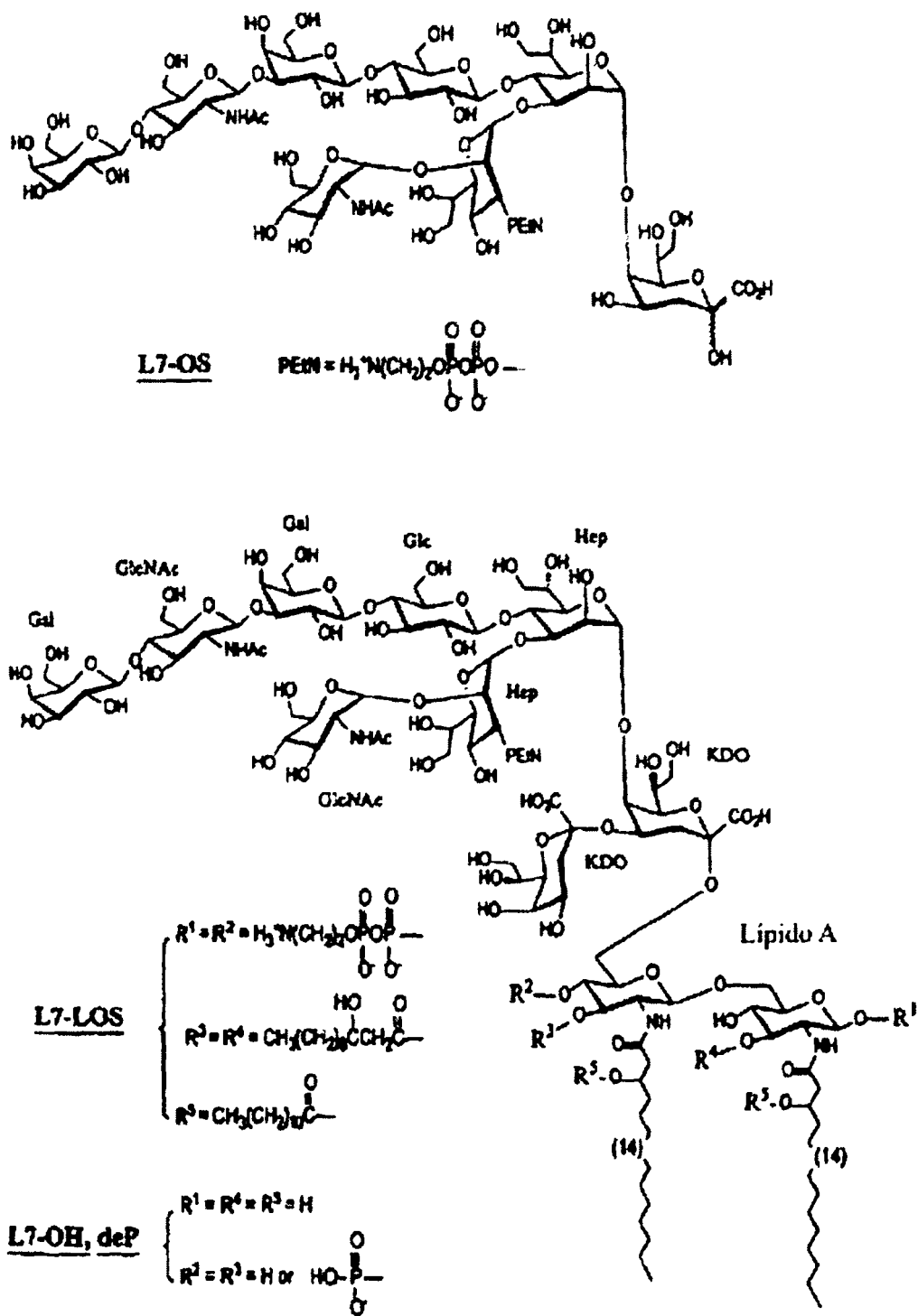


Fig. 1

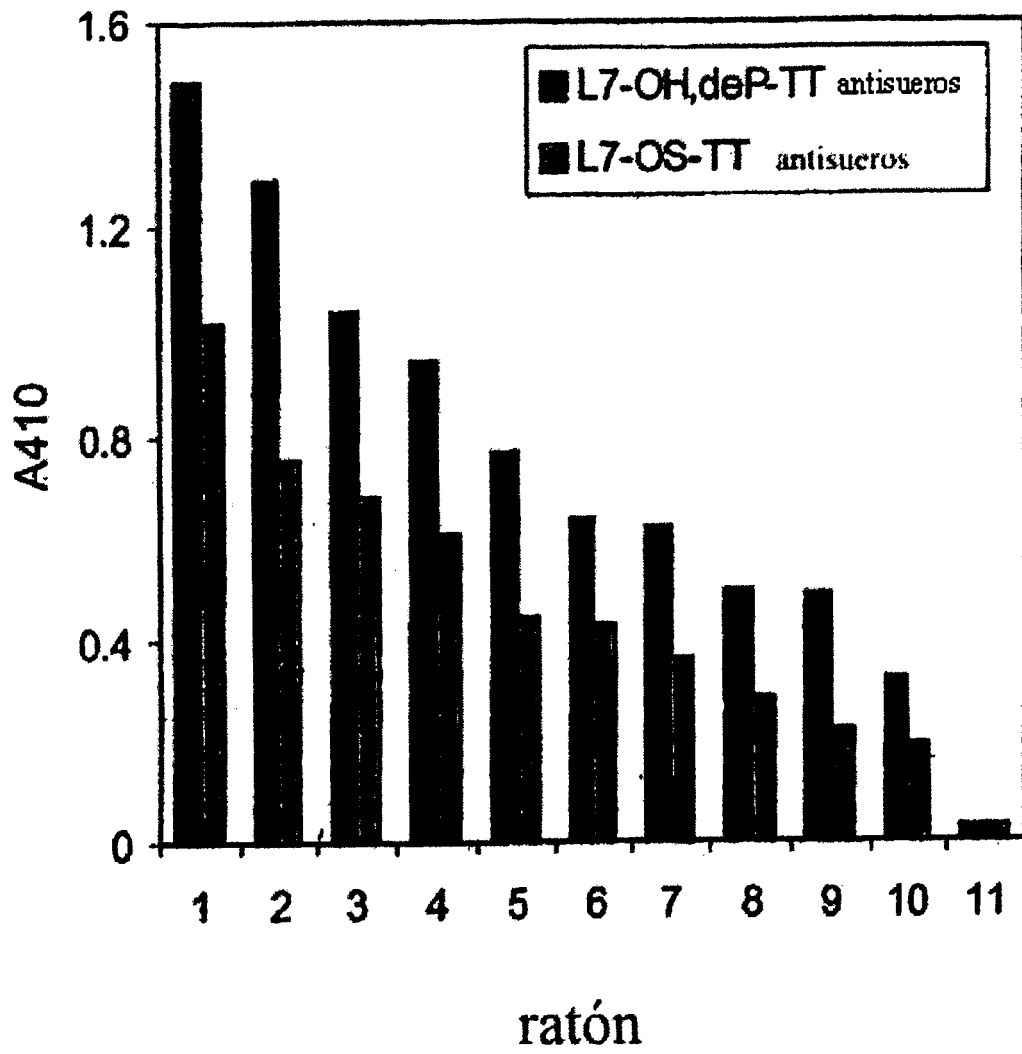


Fig. 2

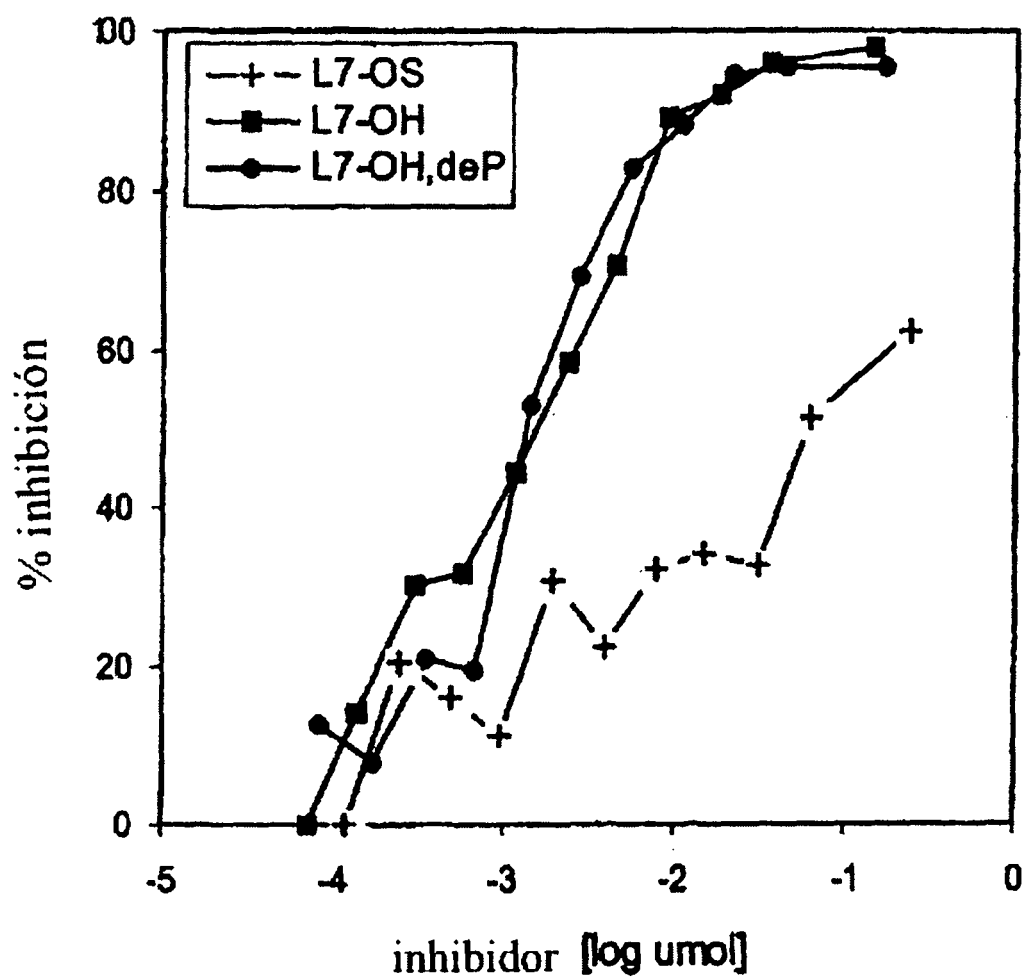


Fig. 3

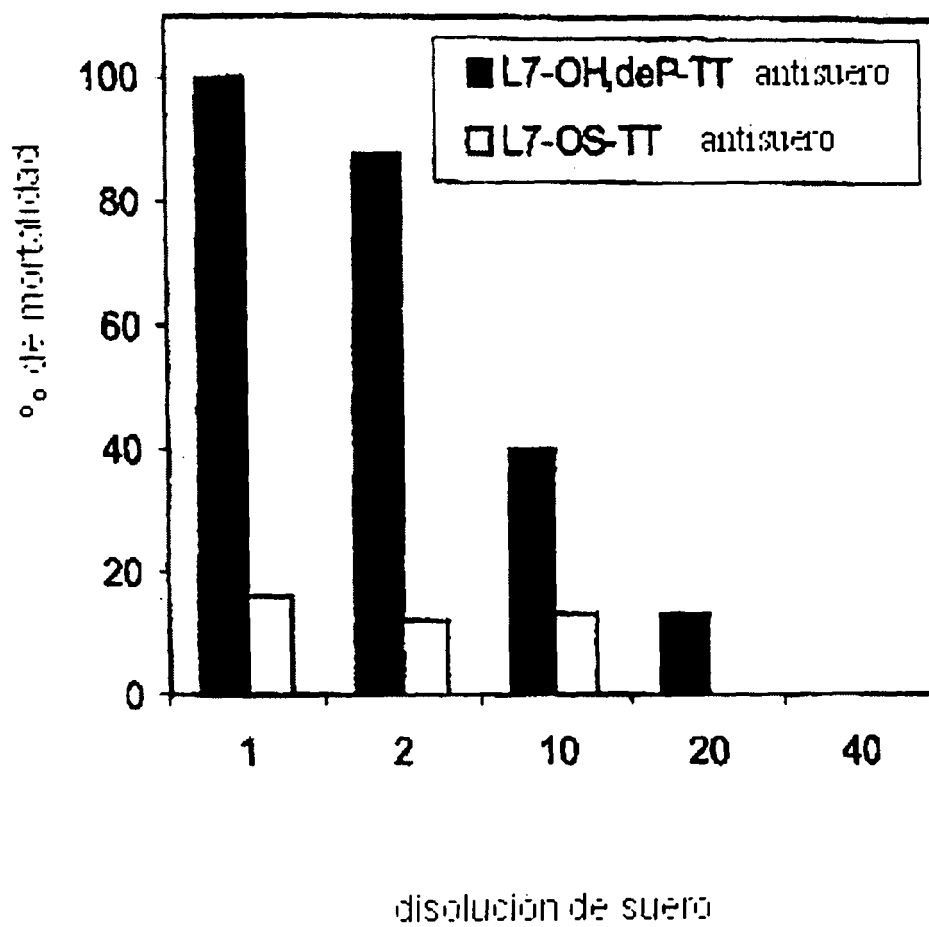
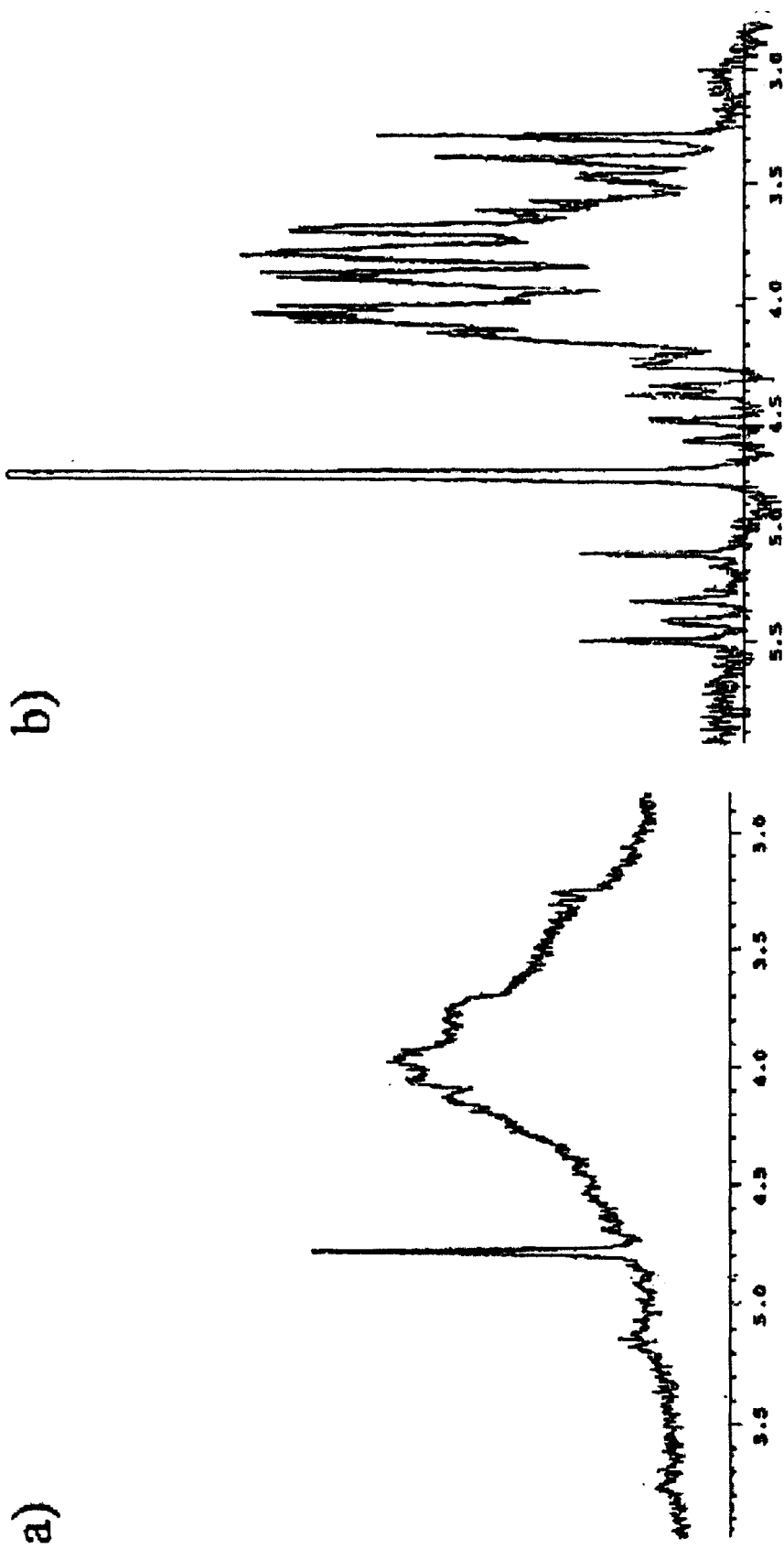


Fig. 4

Fig.5



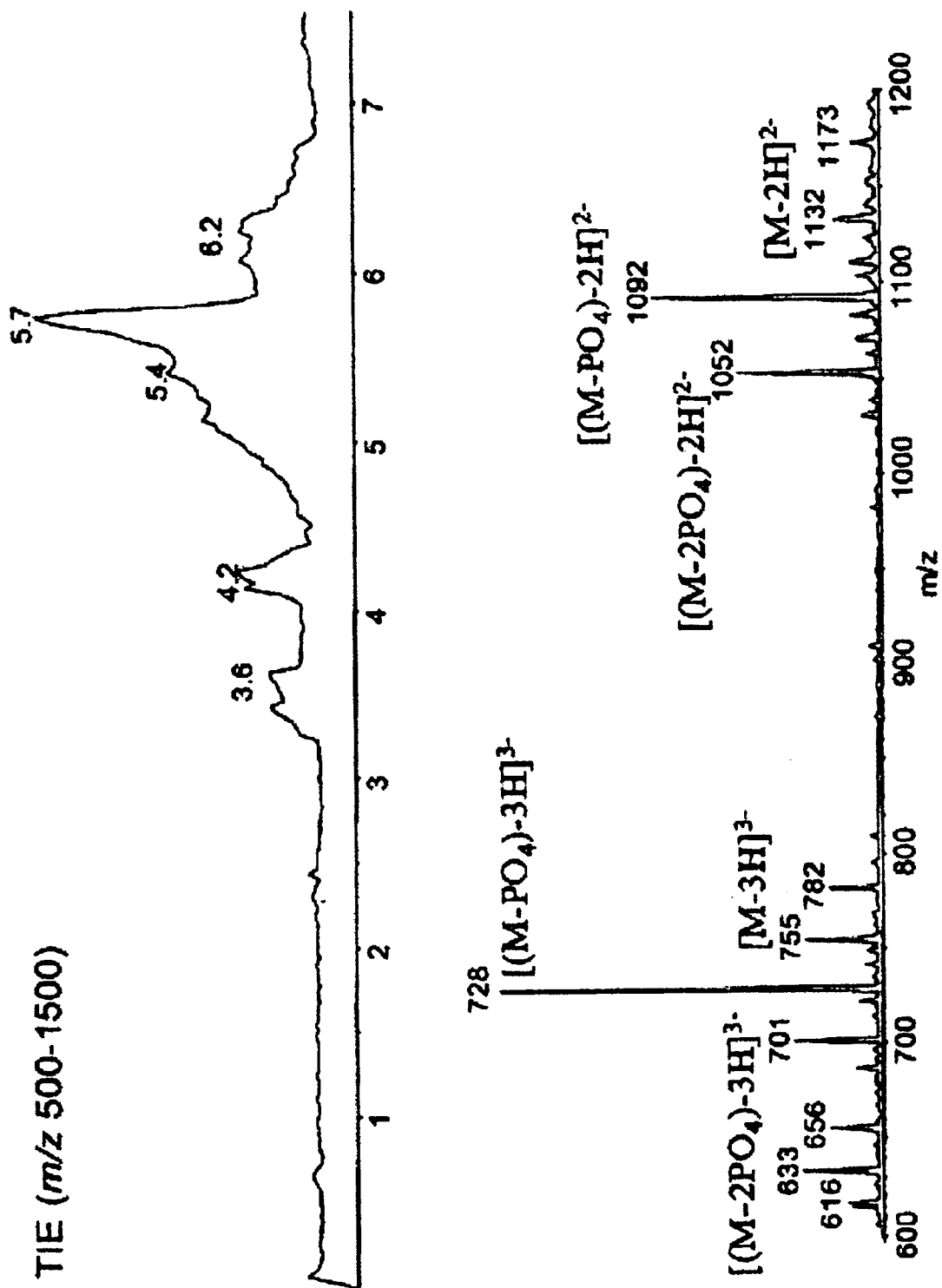
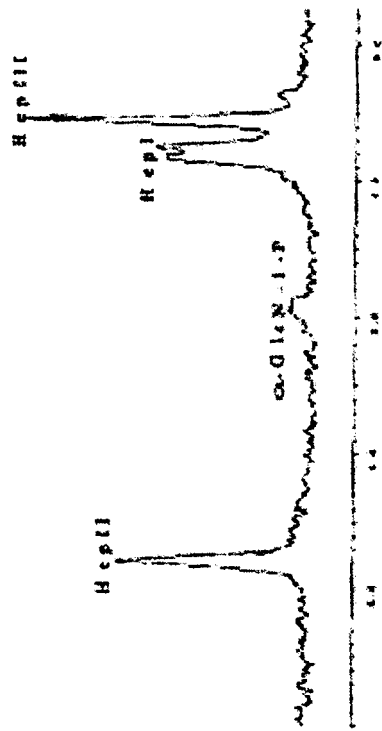
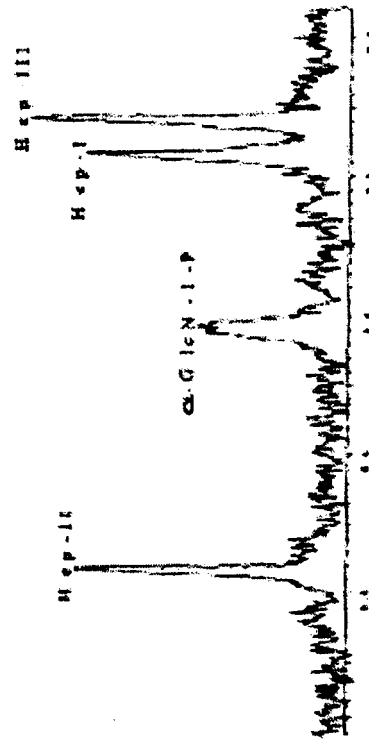


Fig.7

b)



a)



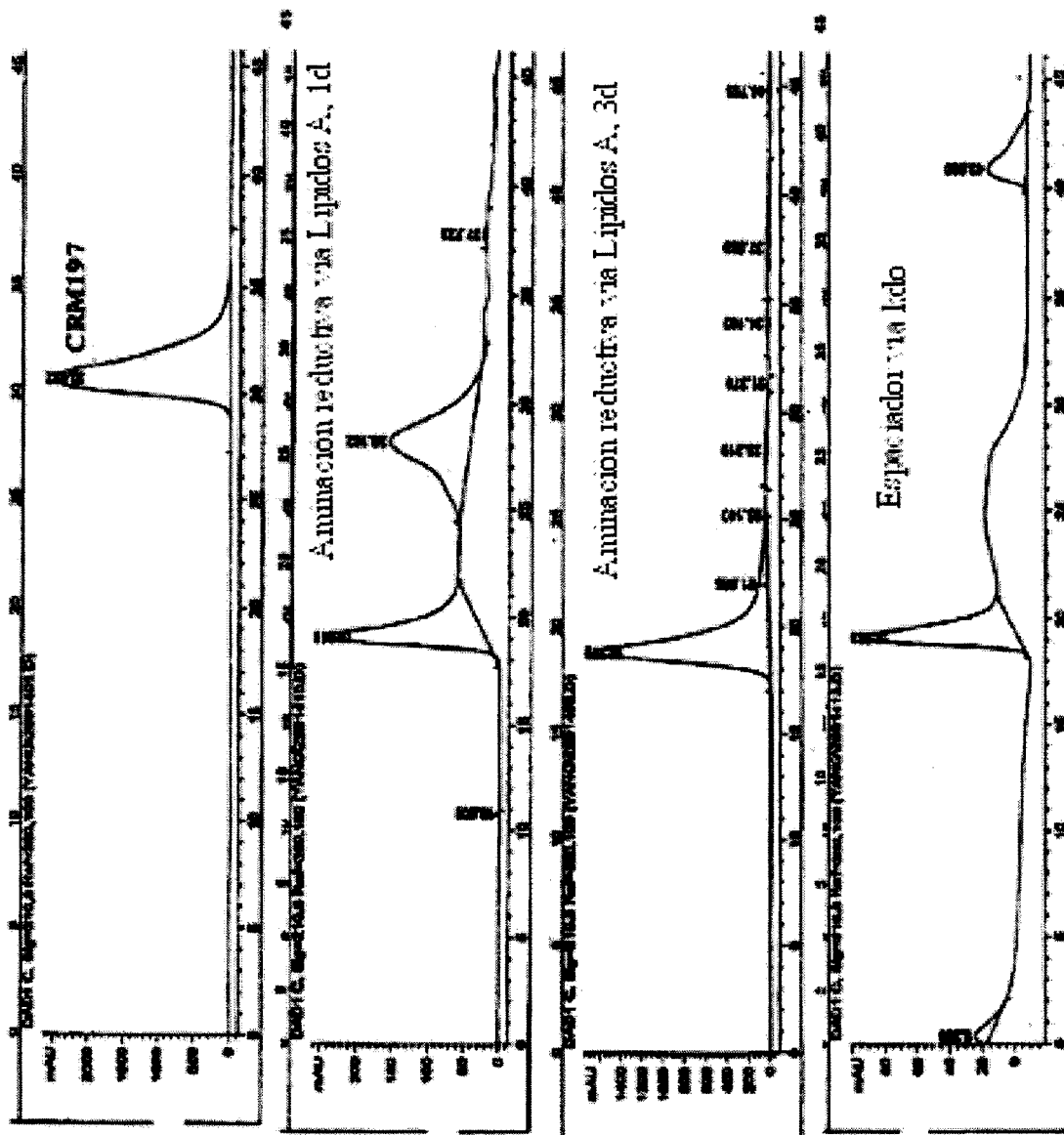


Fig. 8

B5

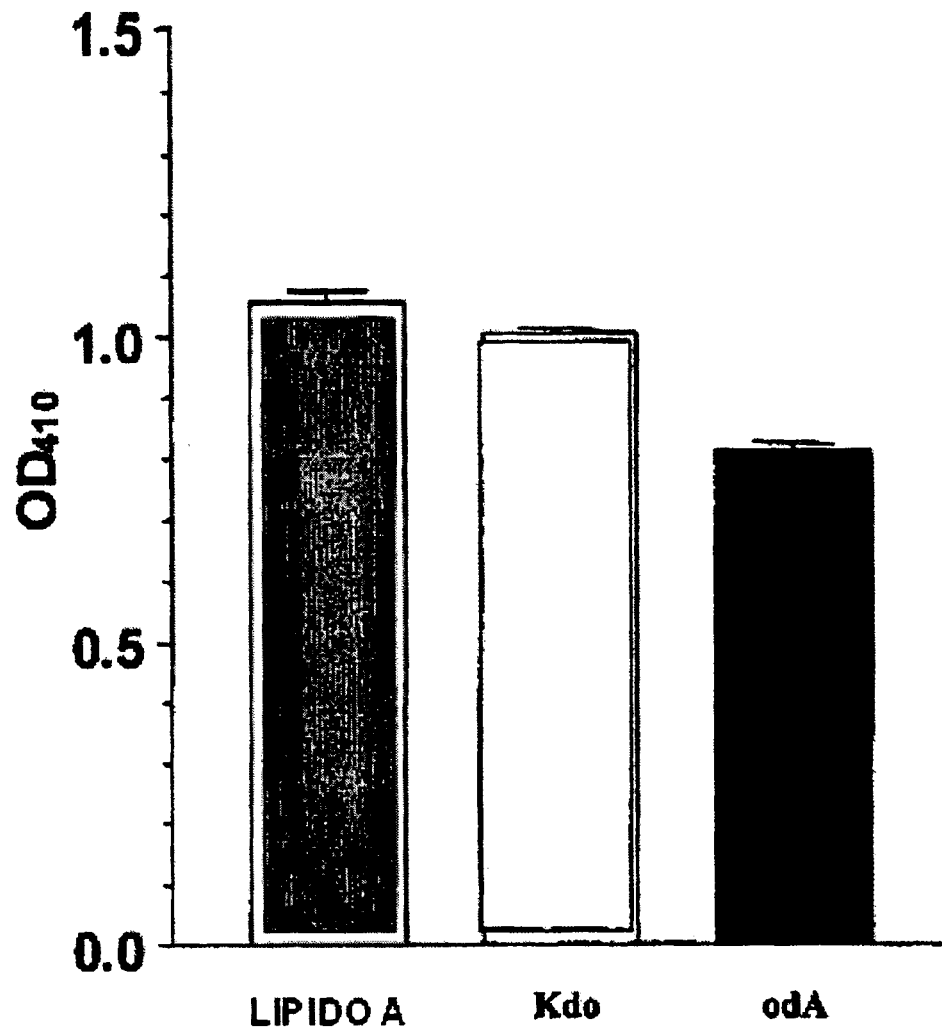


Fig. 9

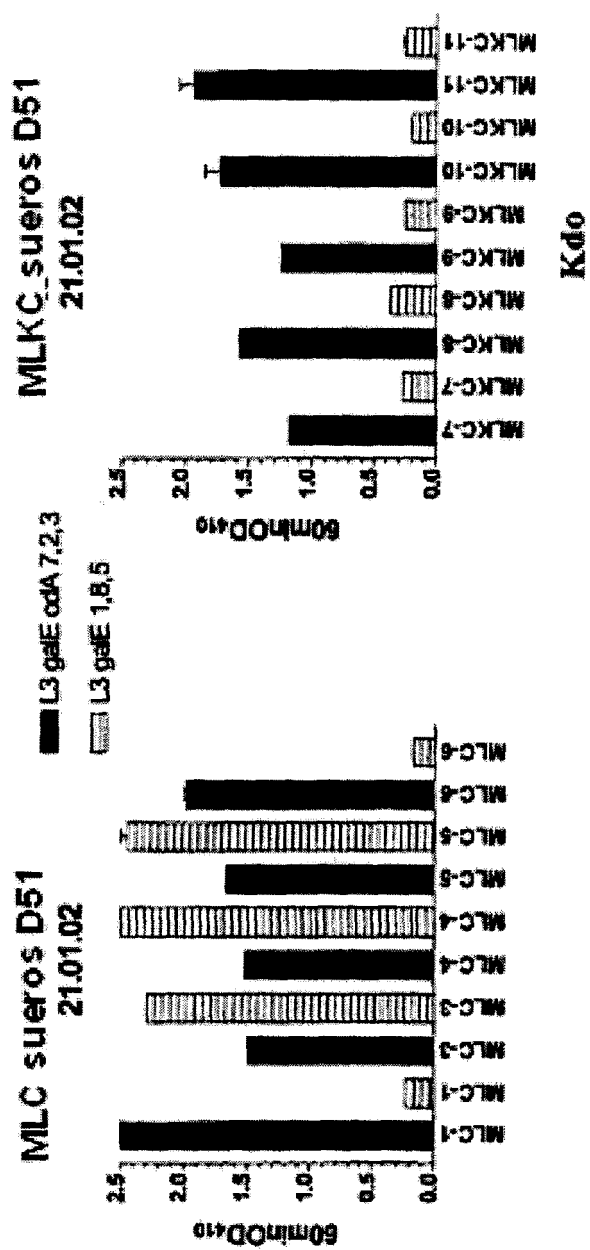


Fig. 10

LIPIDO A

Sueros animales	SBA (50% ^{super vi} % sera)	SBA diln Sueros for 50% ^{super vi} vencia
Pre-immune	- (100)	<1:50
MLC-1	- (60)	<1:50
MLC-3	++ (16)	1:800
MLC-4	- (100)	1:75
MLC-5	+ (25)	1:300
MLC-6	+ (30)	1:100
MAb B5	+ (25)	1:1000

Fig. 11

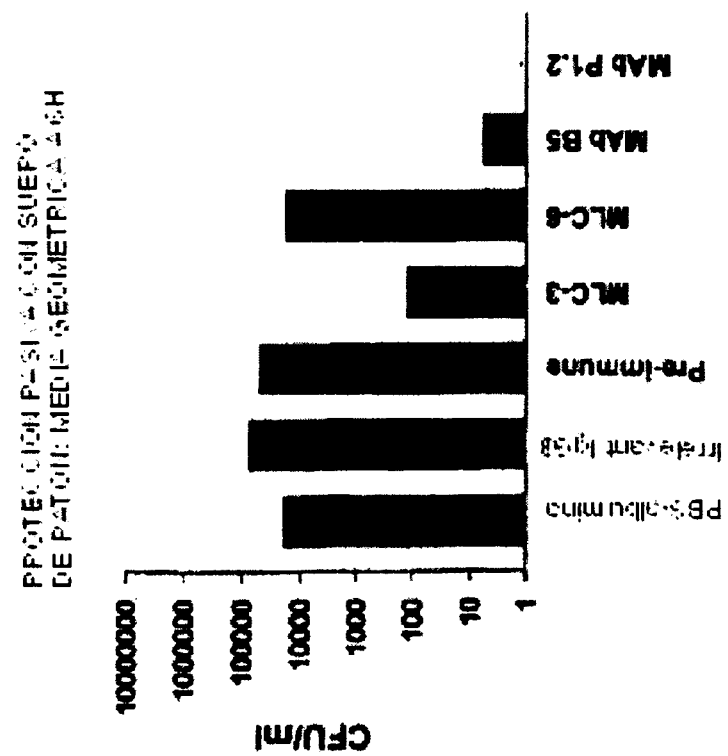
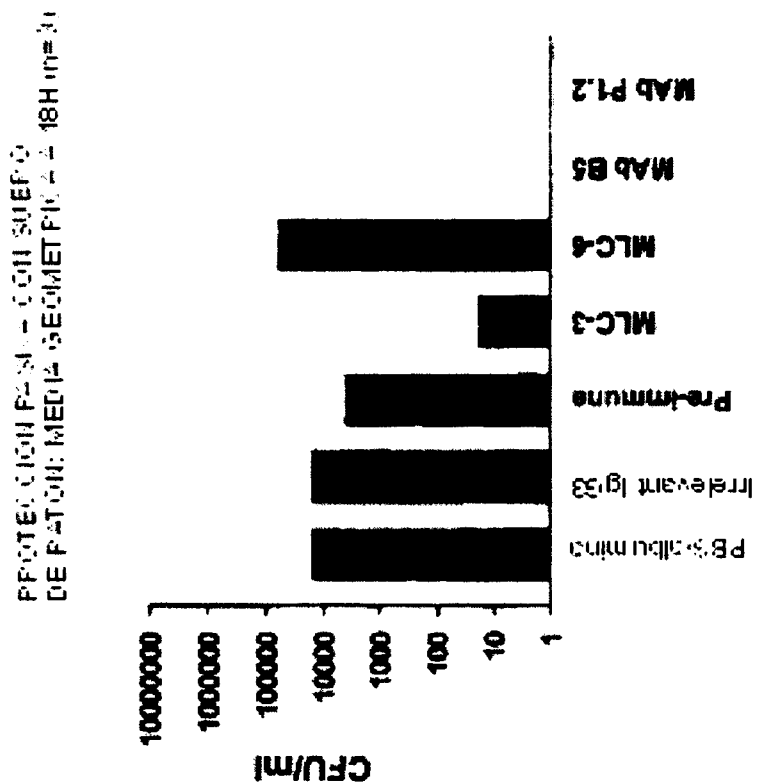


Fig. 12

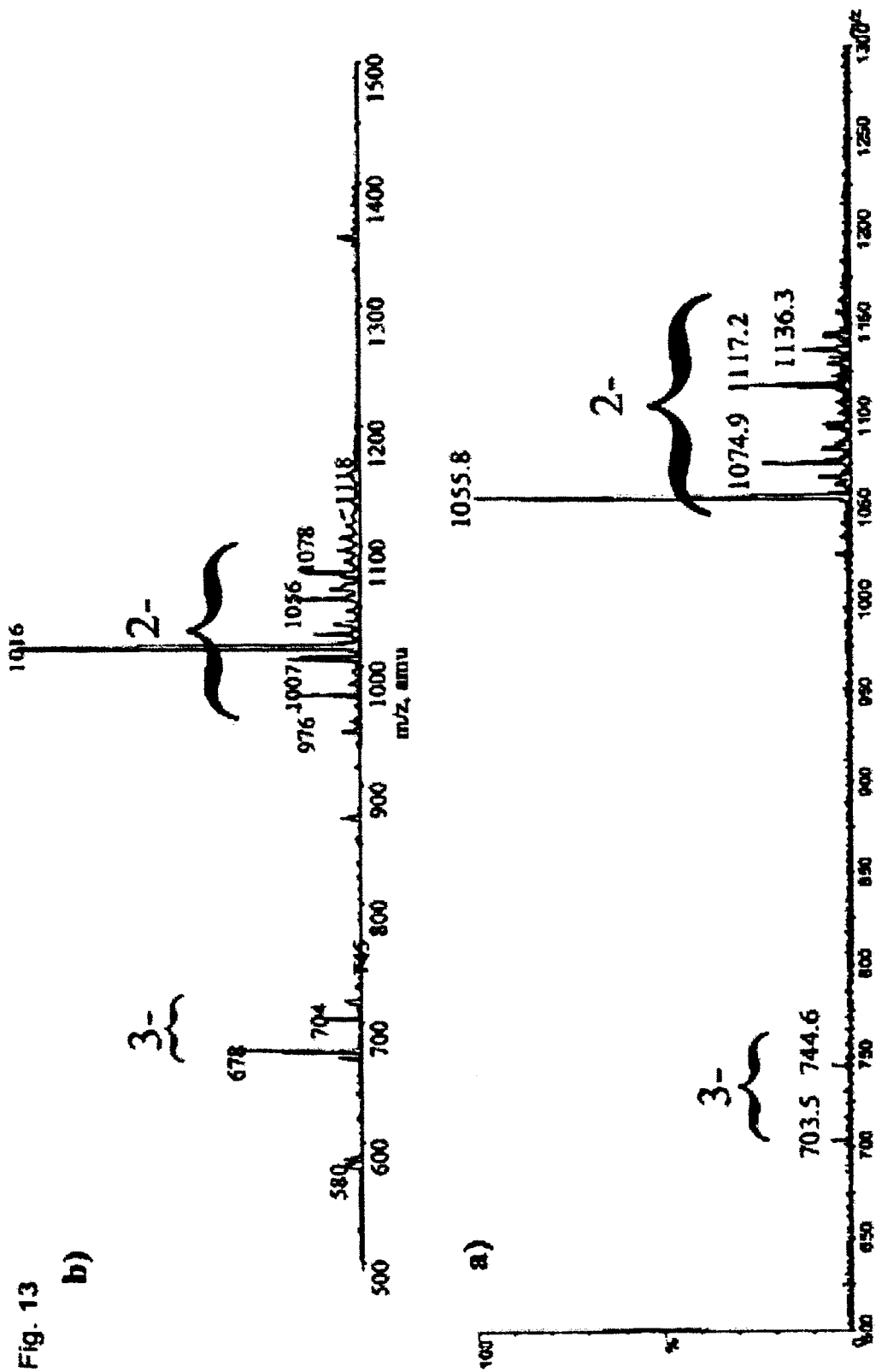


Fig. 13

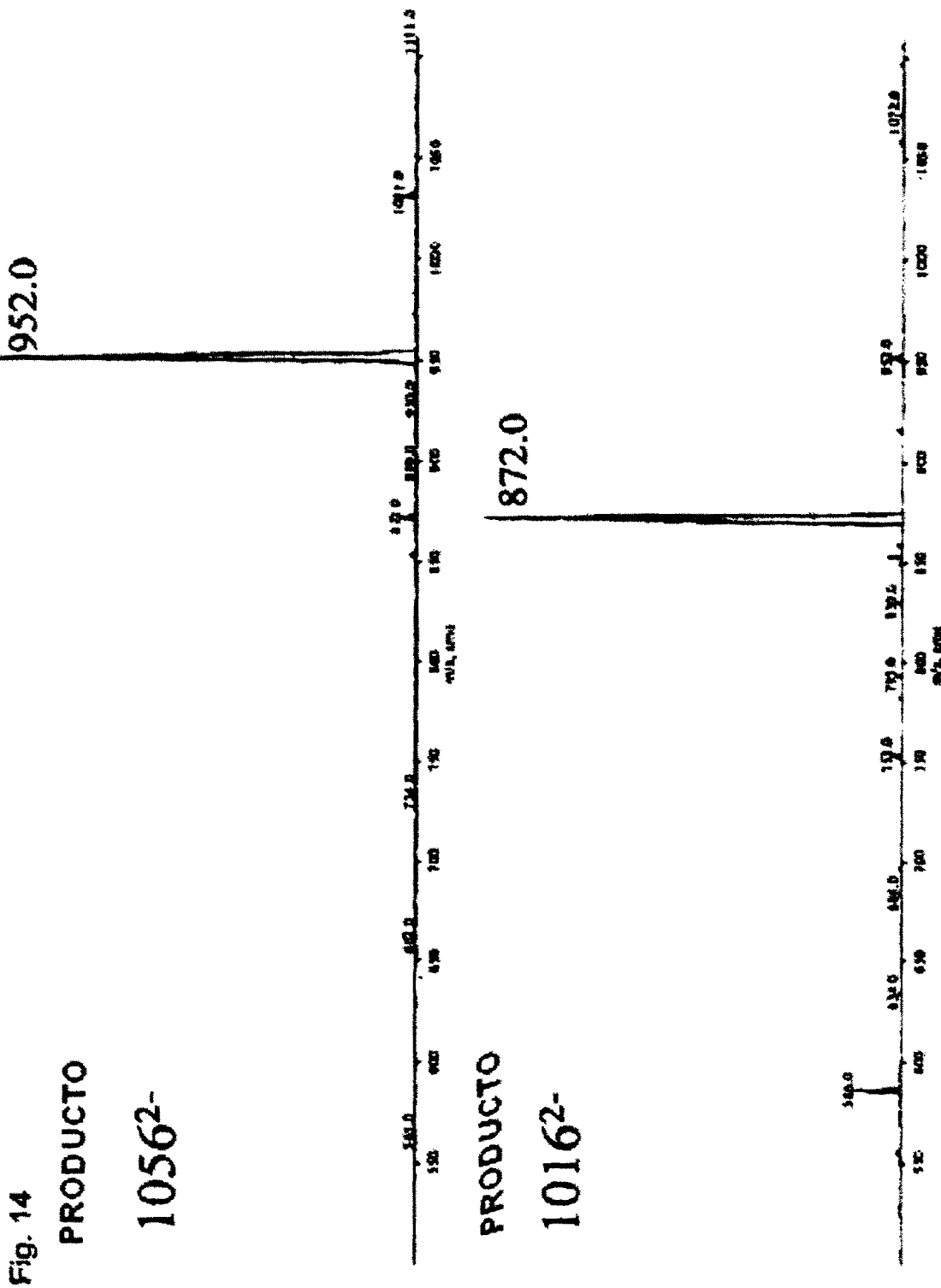
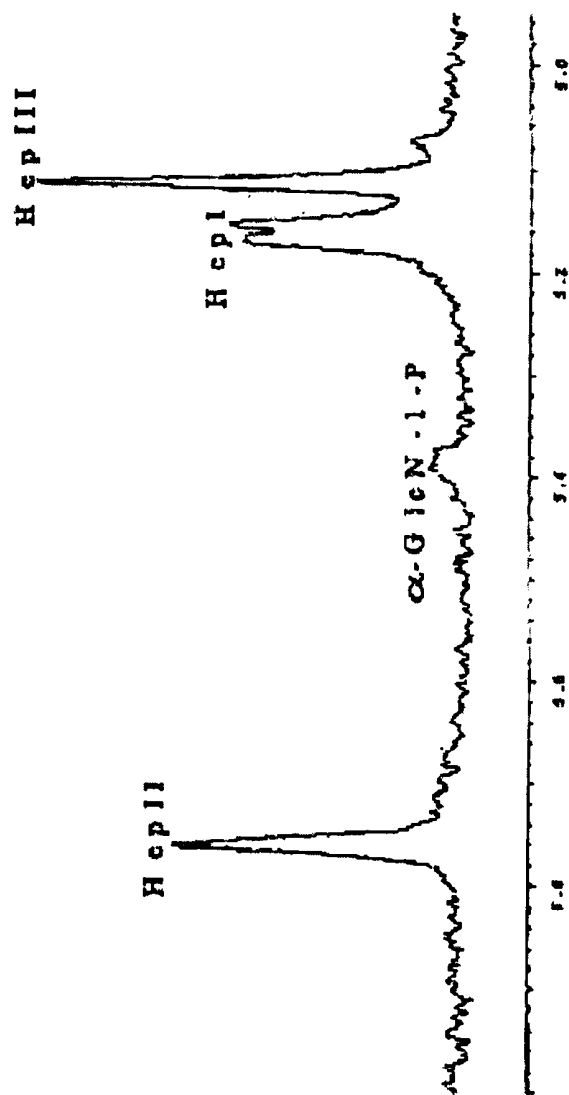
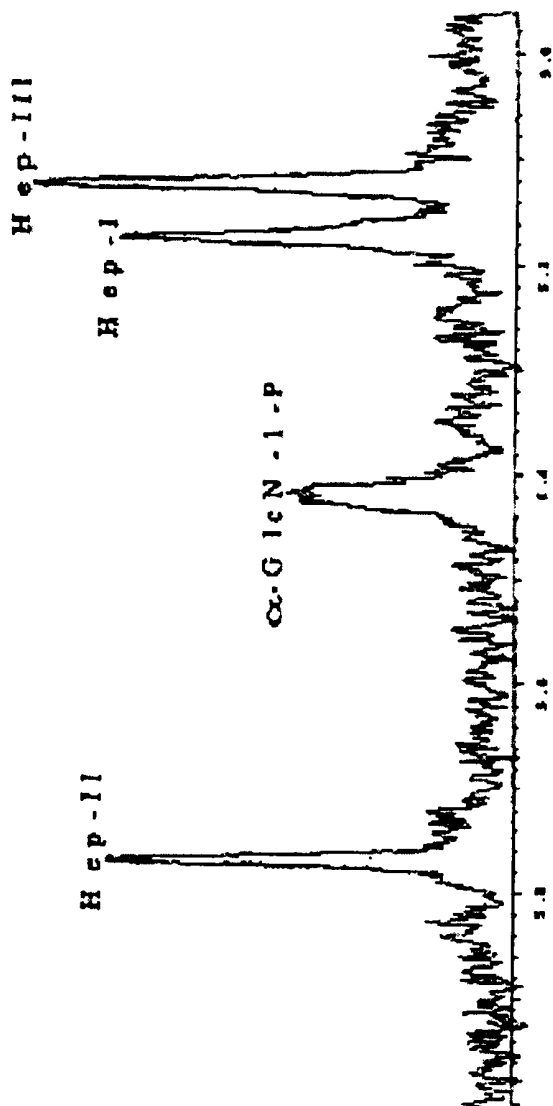


Fig.15

b)



a)



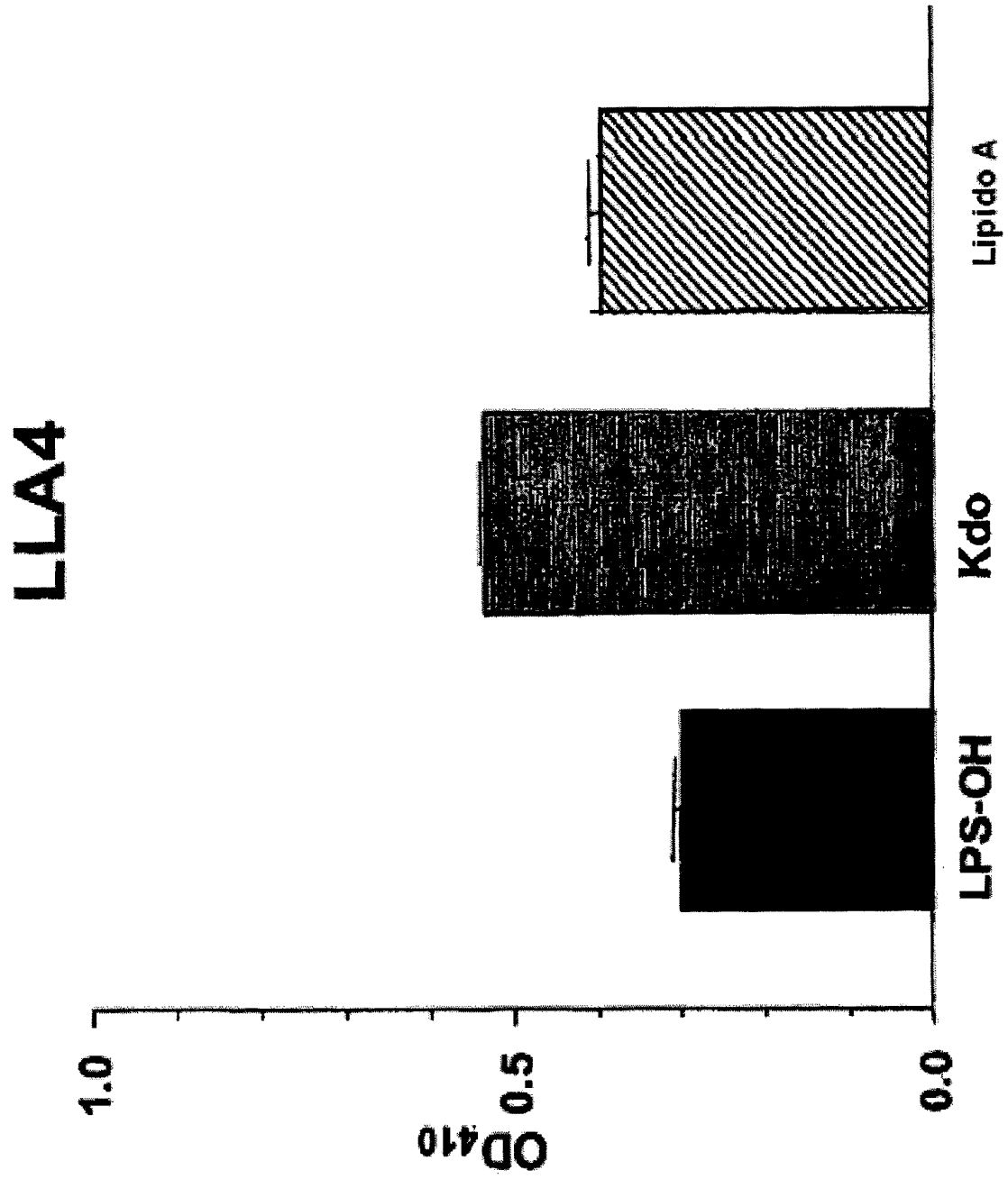


Fig. 16

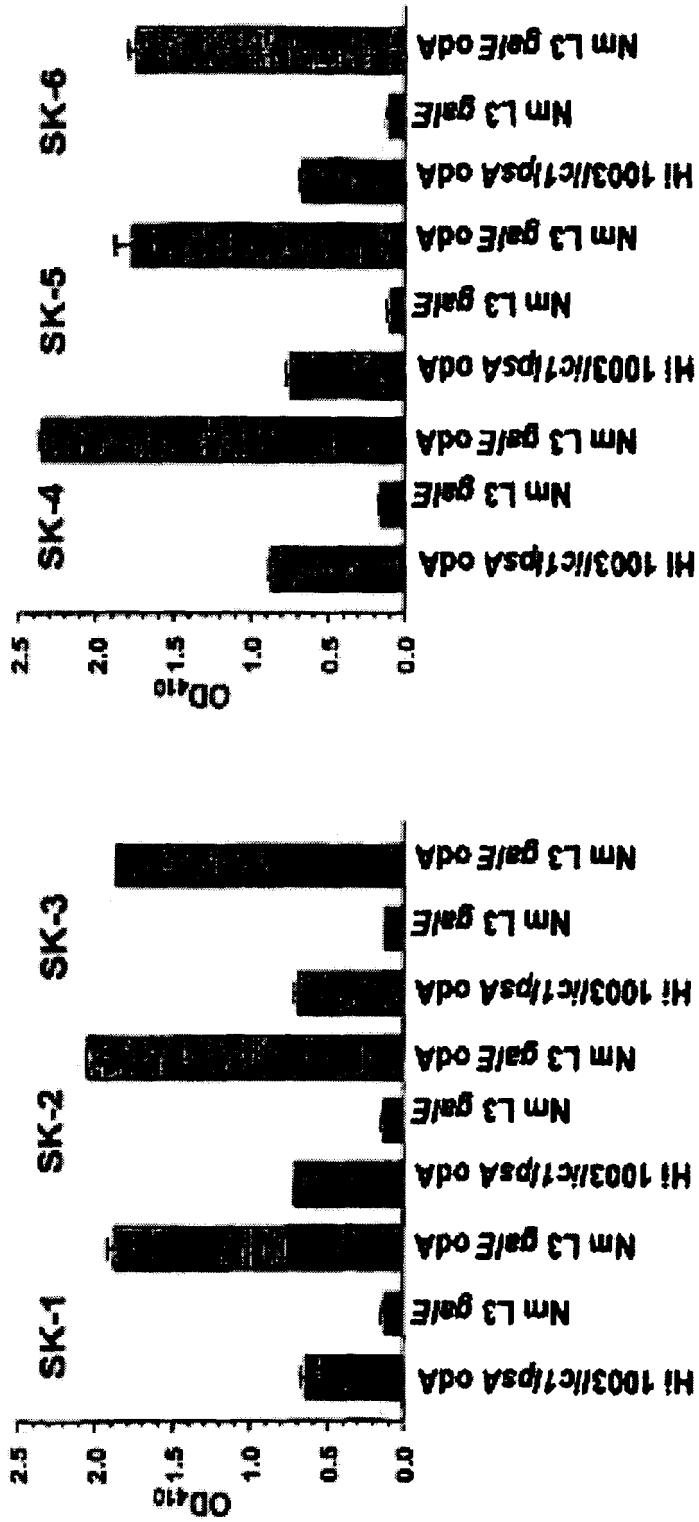


Fig. 17a

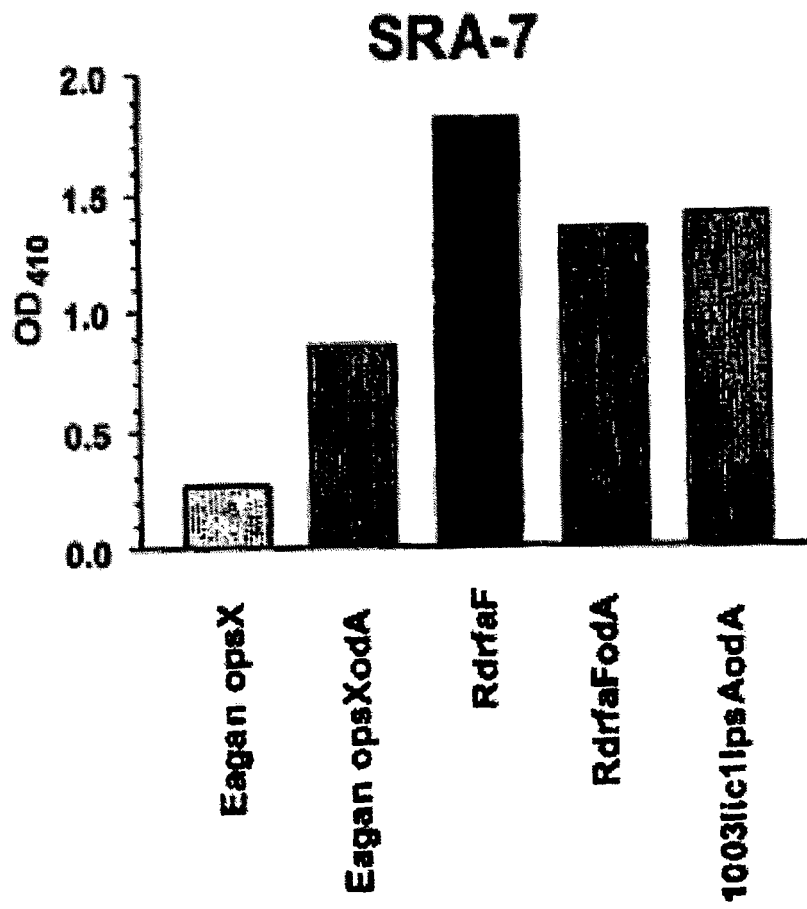


Fig. 17b

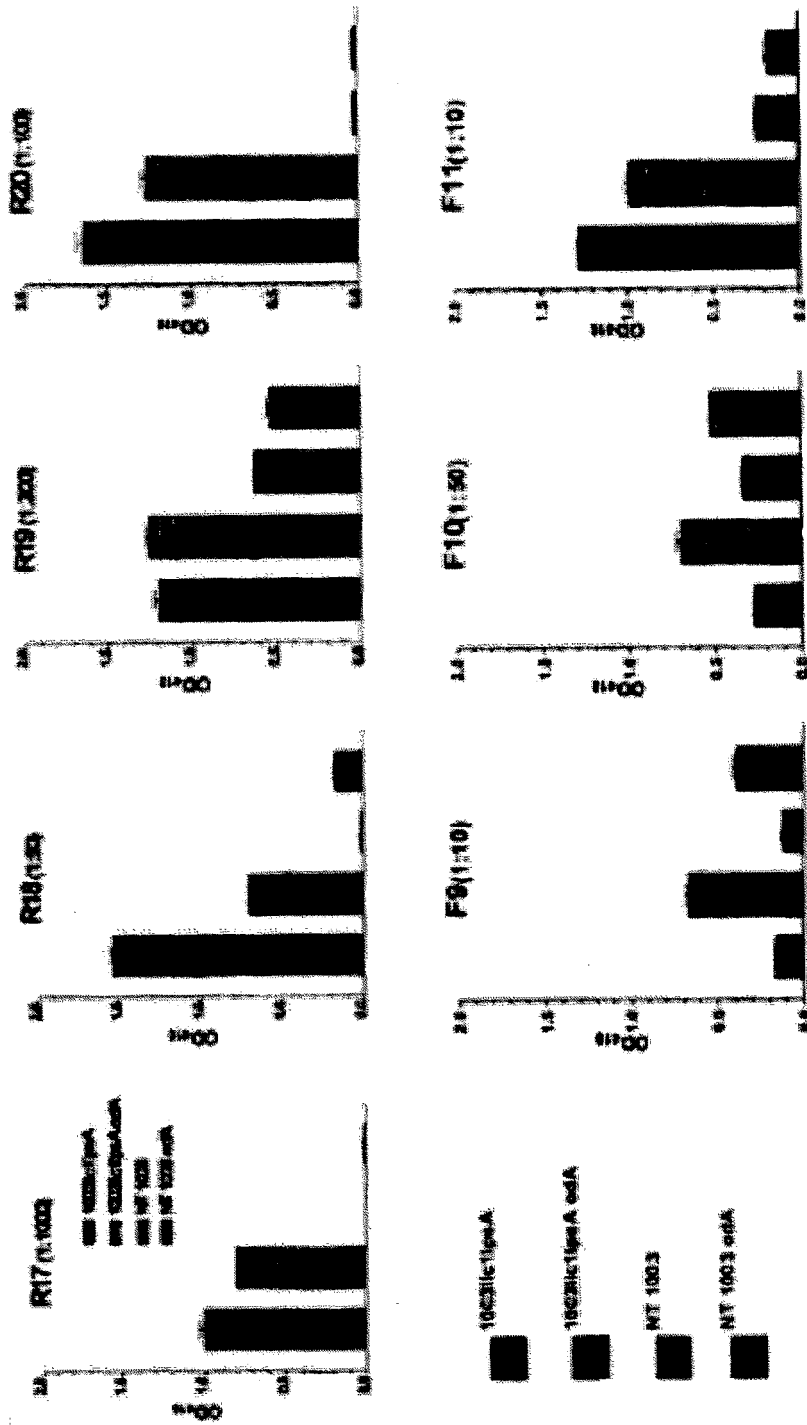


Fig. 1B