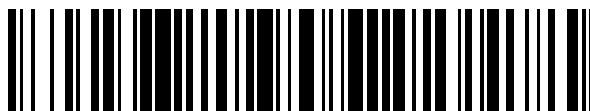


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 686 875**

51 Int. Cl.:

A61K 39/112 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
C12N 1/00 (2006.01)
C12P 19/26 (2006.01)
C08B 37/00 (2006.01)
C08L 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.05.2011 PCT/RU2011/000314**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **15.11.2012 WO12154072**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.05.2011 E 11865292 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.07.2018 EP 2705853**

54 Título: **Exopolisacárido de la bacteria Shigella sonnei, método para producirlo, vacuna y composición farmacéutica que lo contienen**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.10.2018

73 Titular/es:

**APARIN, PETR GENNADIEVICH (50.0%)
Mozhaiskoe shosse, 79-152, Odintsovo
Moskovskaya obl. 143000, RU y
LVOV, VYACHESLAV LEONIDOVICH (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ELKINA, STANISLAVA IVANOVNA;
GOLOVINA, MARINA EDUARDOVNA y
SHMIGOL, VLADIMIR IGOREVICH**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 686 875 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

Exopolisacárido de la bacteria *Shigella sonnei*, método para producirlo, vacuna y composición farmacéutica que lo contienen

5

Campo de la invención

La invención se refiere a la inmunología clínica y a la farmacología, en particular se relaciona con el antígeno polisacárido de la bacteria *Shigella sonnei*, exopolisacárido específico de O de fase I, al método para obtenerlo y a la vacuna y la composición farmacéutica que lo comprenden.

10

Antecedentes de la invención

Casi 100 años después de descubrir el bacilo *Shiga*, habitualmente conocido como *Shigella dysenteriae*, tipo 1, la shigelosis es uno de los problemas de salud pública más importantes de casi todos los países del mundo. Anualmente, varios cientos de miles de niños menores de 5 años mueren en los países en desarrollo por shigelosis provocada por microorganismos del género *Shigella*. En ocasiones, se registran brotes de shigelosis en países en desarrollo del hemisferio norte, provocados por la bacteria *S. sonnei*, el único representante del grupo D, género *Shigella*. En relación con lo anterior, la OMS recomienda como objetivo prioritario el desarrollo de una vacuna anti-*shigella* "mundial", que incluya compuestos protectores para bacterias patógenas del género *Shigella*, específicamente *S. sonnei*, fase I (Kotloff K.L., Winickoff J.P., Ivanoff B., Clemens J.D., Swerdlow D.L., Sansonetti P.J., Adak G.K., Levine M.M. *Global burden of Shigella infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. Bull. WHO*, 1999, v. 77, págs. 651-665). El desarrollo de una monovacuna contra la shigelosis *S. sonnei* puede considerarse como una etapa preliminar para la solución de este problema general y como un proyecto independiente extremadamente real para muchas regiones.

15

20

25

La especificidad de la inmunidad a la infección por *Shigella* está determinada por la estructura del principal antígeno protector de la *Shigella*, el antígeno O polisacárido. La estructura primaria del polisacárido específico de O obtenido de la molécula de lipopolisacárido (LPS) de paredes celulares de *S. sonnei*, fase I, se identificó por Kenne et al. (Kenne L., Lindberg B., Petersson K., Katzenellenbogen E., Romanowska E. *Structural studies of the O-specific side-chains of the Shigella sonnei phase I lipopolysaccharide. Carbohydrate Res.*, 1980, 78: 119-126).

30

El componente antigénico O de LPS es un polisacárido compuesto de unidades de disacáridos repetidos de O-[4-amino-2-(N-acetil)amino-2,4-didesoxi-β-D-galactopiranosil]-(1→4)-[ácido 2-(N-acetil)amino-2-desoxi-α-L-altripiraurónico] unido por enlaces (1→3) para formar una cadena de polisacáridos. Este componente polisacárido O de *S. sonnei*, fase I, se une covalentemente al dominio núcleo de tipo R2 de *E. coli*, que, a su vez, se une covalentemente al lípido A formando una molécula lineal de LPS.

35

El aislamiento del polisacárido O de la pared celular de LPS no representa dificultades técnicas significativas. Por tanto, el método de aislamiento, propuesto inicialmente por Freeman, incluye las siguientes etapas principales – obtención de un cultivo de bacterias *S. sonnei*, fase I en medio líquido; separación del líquido de cultivo de las células bacterianas, extracción de LPS de las células bacterianas con fenol acuoso (Westphal O., Jann K. *Bacterial lipopolysaccharide extraction with phenol: water and further application of the procedure. Methods Carbohydr. Chem.*, 1965, v. 5, págs. 83-91); y degradación de LPS con aislamiento adicional del polisacárido O (Morrison D.C., Leive L. *Fractions of lipopolysaccharide from Escherichia coli O111:B4 prepared by two extraction procedures. J. Biol. Chem.* 250 (1975) 2911-2919).

40

45

También se conoce otro método de obtención de antígeno específico de O altamente purificado de *Shigella* sp e incluye las siguientes etapas: obtención de cultivos bacterianos en medio líquido; tratamiento de cultivos bacterianos con bromuro de hexadeciltrimetilamonio y posterior extracción de LPS de células bacterianas; separación de extracto de LPS de células bacterianas; y degradación de LPS con separación posterior de polisacárido O de éste (documento KR 20010054032 A). Por tanto, todos los métodos conocidos para aislar antígenos específicos de O de los LPS de *Shigella* sp. se basan en la etapa de extracción, es decir, la extracción de LPS de las paredes de las células bacterianas, que provoca la pérdida inevitable de la natividad de las células bacterianas.

50

55

Ha de observarse adicionalmente, que la estructura de los antígenos específicos de O obtenidos mediante métodos conocidos a partir de LPS se determina mediante los genomas de bacterias *Shigella* sp. Prácticamente todos los antígenos O obtenidos de los LPS de *Shigella* sp. contienen elementos de estructuras de dominio núcleo. La hidrólisis suave usando ácido acético al 1 % que se usa para la retirada del lípido A de la molécula de LPS, conduce a la obtención de un derivado de polisacárido, que se representa como un polisacárido específico de O, conectado al oligosacárido "núcleo" (Fensom y Meadow, 1970; Morrison y Leive, 1975; Oertelt et al., 2001; Osborn, 1963).

60

Se propuso usar el polisacárido O del LPS de la pared celular bacteriana de *S. sonnei*, fase I, como componente solo de vacunas conjugadas contra shigelosis por *S. sonnei*, bajo su unión covalente con vehículos proteicos - proteína D de *Haemophilis influenzae*, exoproteína recombinante A de *Pseudomonas aeruginosa* (rEPA), toxina recombinante de la difteria (rDT), toxina recombinante B de *Clostridium. difficile* (rBRU) (Solicitud de Patente de los

65

EE.UU. 2005/0031646, documento WO/2010/019890).

Se realizaron investigaciones de las propiedades inmunógenas y protectoras de los conjugados que contienen polisacárido O del LPS de las paredes celulares bacterianas de O7 de *Plesiomonas shigelloides*, cuya estructura es idéntica al polisacárido O del LPS de bacterias *S. sonnei*, fase I y conjugado con proteína-exoproteína A de *P. aeruginosa* (rEPA) o toxoide diftérico CRM9 de cepa mutante de *Corynebacterium diphtheriae* (Cohen D., Ashkenazi S., Green M.S., Gdalevich M., Robin G., Slepon R., Yavzori M., Orr N., Block C., Ashkenazi I., Shemer J., Taylor D.N., Hale T.L., Sadoff J.C., Pavliakova D., Schneerson R., Robbins R. *Double-blind vaccine controlled randomized efficacy trial of an investigational Shigella sonnei conjugate vaccine in young adults. Lancet*, 1997, v. 349, págs. 155-159). Se ha descubierto que el conjugado del polisacárido O con rEPA era inmunógeno para animales de experimentación y seres humanos cuando se administraba por vía parenteral, provocando en voluntarios una producción de anticuerpos específicos de O y un nivel promedio de protección contra la infección con un coeficiente de eficacia del 74 %. Sin embargo, la duración corta del experimento controlado (2,5 - 7 meses) está provocando ciertas dudas en la calificación del potencial de protección de la vacuna. Ensayos de inmunogenia recientes en niños de la vacuna de conjugado de polisacárido O contra la infección por *S. sonnei* a base de rEPA-vehículo reveló una inmunogenia baja de la preparación para niños de edades de 1 a 4 años (el coeficiente de eficacia fue del 27,5 %), así como la disminución temprana de la respuesta inmunitaria después de la inmunización (Passwell J.H., Ashkenzi S., Banet-Levi Y., Ramon-Saraf R., Farzam N., Lerner-Geva L., Even-Nir H., Yerushalmi B., Chu C., Shiloach J., Robbins J.B., Schneerson R; *Israeli Shigella Study Group. Age-related efficacy of Shigella O-specific polysaccharide conjugates in 1-4-year-old Israeli children. Vaccine*, 2 de marzo de 2010; 28 (10), págs. 2231-2235).

Por tanto, las vacunas conjugadas de proteína-polisacárido contra la shigelosis por *S. sonnei* han demostrado una inmunogenia insuficiente en ensayos clínicos en adultos y niños. Ha de observarse que no se conocen las propiedades inmunógenas del polisacárido O libre, no conjugado, del LPS de la bacteria *S. sonnei*, fase I, como inmunógeno de vacuna. Los datos experimentales de Taylor et al. muestran una ausencia prácticamente total de actividad inmunógena en ratones contra polisacáridos no conjugados de LPS de células de bacterias *Plesiomonas shigelloides*, cuya estructura es idéntica a la de *S. sonnei*, antígeno O de fase I (Taylor D.N., Trofa A.C., Sadoff J., Chu C., Bryla D., Shiloach J., Cohen D., Ashkenazi S., Lerman Y., Egan W. *Synthesis, characterization and clinical evaluation of conjugate vaccines composed of the O-specific polysaccharides of Shigella dysenteriae type 1, Shigella flexneri type 2a, and Shigella sonnei (Plesiomonas shigelloides) bound to bacterial toxoids. Infect. Immun.*, 1993, Sep., 61(9): 3678-3687).

Nikolaeva et al., *Immunologiya*, vol. 0, n.º 2 (1992), páginas 27-30, se refiere al papel del antígeno K de superficie de *Shigella sonnei*. No se desvelan criterios químicos y/o inmunobiológicos de dicho antígeno K.

Nasher et al., *Folia Microbiol.* (1998), págs. 707-712, se refiere al polisacárido capsular de la bacteria *S. dysenteriae* de tipo 1. Este artículo no proporciona ninguna información con respecto a la composición química, la estructura y/o los criterios físicos/químicos por los cuales podría identificarse este CPS.

Kotloff et al., *Bulletin of the World Health Organization*, vol. 77 (1999), págs. 651-666, refleja la posición oficial de la OMS que señala la importancia extrema de la inmunoprofilaxis de la shigelosis mediante el desarrollo de una vacuna.

El documento US 2004/033550 se refiere al componente tóxico del lipopolisacárido S, a saber, el lípido A que incluye ácidos grasos no hidroxilados superiores. Basándose en lo anterior, la realidad del desarrollo de otros enfoques para la creación de vacunas de antígeno O contra la infección por *S. sonnei* es obvia. Se puede considerar un enfoque alternativo y más prometedor para el desarrollo: la creación de una vacuna no conjugada basada en el exopolisacárido de antígeno O, producido por *S. sonnei*, bacteria de fase I en el medio de cultivo. Se sabe que muchas bacterias grampositivas y gramnegativas producen no solo componentes polisacáridos de las paredes celulares, sino también exopolisacáridos extracelulares, que son secretados por la célula al medio externo y proporcionan la función protectora. Por tanto, los exopolisacáridos producidos pueden encontrarse tanto en estado libre como en forma de una cápsula o microcápsula extracelular.

En ocasiones, los exopolisacáridos producidos por las células en el medio externo representan antígenos altamente inmunógenos específicos, capaces de inducir la síntesis de anticuerpos protectores. Por tanto, se usan varios de dichos antígenos polisacáridos en las composiciones de vacunas para la prevención de infecciones, provocadas por los grupos meningocócicos A y C, causantes de la fiebre tifoidea (Lindberg A.A. *Polyosides (encapsulated bacteria)*. *C. R. Acad.Sci. Paris*, 1999, v. 322, págs. 925-932).

La inmunogenia de la vacuna polisacáridica depende de la estructura primaria del antígeno polisacárido, de su masa molecular y de la capacidad de formar estructuras agregadas (*The vaccine book*. Editado por B.R. Bloom, P.-H. Lambert Academic Press, San Diego 2003, págs. 436). Al mismo tiempo, la estructura primaria del exopolisacárido bacteriano puede ser idéntica o diferente de la del polisacárido específico de O del LPS de la pared celular. (Goldman R.C., White D., Orskov F., Orskov I., Rick P.D., Lewis M.S., Bhattacharjee A.K., Leive L., *A surface polysaccharide of Escherichia coli O111 contains O-antigen and inhibits agglutination of cells by anti-O antiserum. J. Bacteriol.*, 1982, v. 151, págs. 1210-1221).

Sin embargo, ni la estructura primaria del exopolisacárido de la bacteria *S. sonnei*, fase I, ni sus propiedades físicoquímicas, inmunobiológicas y protectoras, ni el método de su aislamiento, ni siquiera el hecho de su existencia se describen en la bibliografía.

- 5 La bibliografía tampoco describe las composiciones farmacéuticas a base de *S. sonnei*, polisacáridos de fase I, cuyo desarrollo puede contribuir significativamente a la farmacología clínica. Solamente se conoce el uso de fragmentos de polisacáridos de LPS de *S. sonnei*, células de fase I, que incluyen de 1 a 5 unidades de disacáridos, como complemento nutritivo para la administración oral, que estimula el desarrollo del sistema inmunitario en bebés de 1 a 6 meses de edad, determinado por el aumento de la relación de linfocitos T auxiliares de tipo 1 (respuesta Th1) con respecto a la relación de linfocitos T auxiliares de tipo 2 (respuesta Th2) (Solicitud de Patente de los EE.UU. 2009/0317427 A1).

Sumario

- 15 La invención reivindicada proporciona, a través de un método de alta tecnología, exopolisacáridos de bacterias *S. sonnei*, de fase I, y desvela, basándose en los mismos, vacunas polisacarídicas y composiciones farmacéuticas.

Los resultados técnicos, proporcionados por la invención reivindicada, son: (a) obtener exopolisacáridos nativos de *S. sonnei*, bacterias de fase I de alta pureza con un alto rendimiento a escala comercial; (b) aumentar la especificidad, inmunogenia, actividad protectora y seguridad de las vacunas desarrolladas; y (c) eficacia alta y espectro de actividad de las composiciones farmacéuticas propuestas.

Por primera vez se obtiene un nuevo antígeno polisacarídico – exopolisacárido, o polisacárido capsular, secretado por *S. sonnei*, bacteria de fase I en el medio externo. A diferencia del polisacárido específico de O del LPS de la pared celular bacteriana, un fragmento artificialmente aislado de la molécula, el exopolisacárido es un compuesto natural auténtico, derivado del uso de bacterias *S. sonnei*, pero sin el uso de LPS como fuente. La estructura primaria del exopolisacárido es idéntica a la del polisacárido O del LPS de las bacterias *S. sonnei*, fase I, es decir, el exopolisacárido consiste en 1 - 100 unidades de disacáridos repetidas de O-[4-amino-2-(N-acetil)amino-2,4-didesoxi-β-D-galactopiranosil]-(1→4)-[ácido 2-(N-acetil)amino-2-desoxi-α-L-altripiranurónico] unido por enlaces (1→3) para formar una cadena de polisacáridos (Fig. 1 y Fig. 2). A diferencia del polisacárido O del LPS de células bacterianas, el exopolisacárido nativo incluye un componente lipídico atóxico, cuya composición contiene ácidos grasos no hidroxilados con 16-18 átomos de carbono en la molécula (Fig. 3, Fig. 4). El contenido de ácidos grasos que contiene es no inferior al 0,01 (p/p) por ciento. Adicionalmente, obtenido mediante cualquier método, el exopolisacárido de la bacteria *S. sonnei* incluye elementos de la estructura del dominio núcleo del LPS (Fig. 4). El exopolisacárido puede prepararse mediante cualquier método, incluyendo la ingeniería genética, usando el genoma de la bacteria *S. sonnei*. Preferentemente, el exopolisacárido se produce usando bacterias *S. sonnei* mediante un método, que comprende: (a) la producción del cultivo bacteriano en fase líquida; (b) la separación de la fase líquida de las células bacterianas; y (c) el aislamiento del polisacárido de la fase líquida. Mientras tanto, para evitar la destrucción de la pared celular y la entrada de LPS en la fase líquida, es aconsejable separarla de las células bacterianas para conservar la natividad de las células bacterianas. El aislamiento del polisacárido de la fase líquida puede realizarse mediante un método que comprende: (i) la eliminación de proteínas y ácidos nucleicos de la fase líquida; (ii) la ultrafiltración y (iii) la diálisis de la solución obtenida.

Obtenido usando el método anterior, el exopolisacárido contiene no más del 1 % (p/p) de proteína y el 2 % (p/p) de ácido nucleico. El peso molecular del exopolisacárido, medido por filtración en gel, es de 0,4 a 400 kDa. La fracción principal del exopolisacárido es un biopolímero con un peso molecular superior a 80 kDa (Fig. 5B), mientras que la fracción principal del polisacárido O tiene un peso molecular de no más de 26 kDa (Fig. 5A). El exopolisacárido es inmunógeno y provoca la protección de la mucosa frente a la shigelosis por *S. sonnei* mediante la inducción de la síntesis de anticuerpos específicos contra *S. sonnei*, bacterias de fase I en organismos de mamíferos, incluyendo seres humanos (Ejemplo 1C, Fig. 6, Ejemplos 2D, 2F).

Como se ha indicado anteriormente, la inmunogenia del antígeno polisacarídico se determina por su peso molecular y capacidad para formar estructuras agregadas, por lo que se encuentra la inmunogenia más alta para la fracción de exopolisacárido con un peso molecular de 80 a 400 kD. La inmunogenia de la fracción de alto peso molecular del exopolisacárido supera más de 7 veces la inmunogenia del polisacárido O del LPS de cepas bacterianas (Ejemplo 1C, Fig. 6), que aparentemente está determinada por la presencia en la molécula de un componente lipídico atóxico - un ácido graso no hidroxilado que contribuye a la formación de la estructura del agregado supramolecular.

Adicionalmente, el exopolisacárido es apirógeno para conejos cuando se administra por vía intravenosa a una dosis de no más de 0,050 mcg/kg en un ensayo de pirogenia de conejo (Ejemplo 1D). La formulación de la vacuna de exopolisacárido satisface los requisitos del Comité de Expertos de la OMS para el parámetro de pirogenia de las vacunas polisacarídicas (IT de la OMS – Informe Técnico de la OMS N.º 840, 1994).

El método reivindicado para producir exopolisacárido de bacterias *S. sonnei*, de fase I, comprende: (a) producir cultivos de bacterias *S. sonnei* en fase líquida; (b) separar la fase líquida de las células bacterianas; y (c) aislar el polisacárido de la fase líquida. Al mismo tiempo, la fase líquida, que mantiene la viabilidad de los cultivos celulares,

puede representarse mediante un entorno de nutrientes que tiene diversas composiciones y propiedades. La separación de la fase líquida de las células bacterianas se realiza preferentemente mientras se mantiene la natividad de las células bacterianas.

- 5 Por tanto, el método reivindicado para producir un polisacárido, que excluye el uso de LPS como fuente, no contiene la etapa de extracción de LPS de las paredes de las células bacterianas que normalmente da como resultado la inevitable pérdida de la natividad de las células bacterianas.

10 El aislamiento de polisacárido de la fase líquida puede realizarse mediante un método que comprende: (i) eliminación de proteínas y ácidos nucleicos de la fase líquida; (ii) ultrafiltración y (iii) diálisis de la solución obtenida.

15 La vacuna reivindicada para la profilaxis y/o el tratamiento de la shigelosis por *S. sonnei* contiene cantidades profiláctica y/o terapéuticamente eficaces de polisacáridos de bacterias *S. sonnei*, fase I, que consisten en 1 - 100 unidades de disacáridos repetidos de O-[4-amino-2-(N-acetil)amino-2,4-didesoxi-β-D-galactopiranosil]-(1→4)-O-[ácido 2-(N-acetil)amino-2-desoxi-α-L-altripiranurónico] unido por enlaces (1→3) para formar una cadena de polisacáridos y obtenidos usando bacterias *S. sonnei*, pero sin el uso de lipopolisacáridos como fuente.

20 Este polisacárido es un exopolisacárido, o polisacárido capsular, secretado en el medio externo por *S. sonnei*, bacteria de fase I. El exopolisacárido nativo incluye un componente lipídico atóxico, presentado por ácidos grasos no hidroxilados de 16-18 átomos de carbono en la molécula (Fig. 4). Su contenido de ácidos grasos es no inferior al 0,01 % (p/p). Adicionalmente, independientemente del método de preparación con bacterias *S. sonnei*, el exopolisacárido no incluye elementos de la estructura del dominio núcleo del LPS (Fig. 4).

25 El exopolisacárido puede prepararse mediante cualquier método, incluyendo la ingeniería genética, usando el genoma de la bacteria *S. sonnei*. Preferentemente, el exopolisacárido se produce usando bacterias *S. sonnei* mediante un método que comprende: (a) producir un cultivo bacteriano en fase líquida; (b) separar la fase líquida de las células bacterianas; y (c) aislar el polisacárido de la fase líquida. Mientras tanto, para evitar la destrucción de las paredes celulares y la entrada de LPS en la fase líquida, es aconsejable la separación de las células bacterianas en condiciones de mantener la natividad de las células bacterianas. El aislamiento del polisacárido de la fase líquida puede realizarse mediante un método, que comprende: (i) eliminar proteínas y ácidos nucleicos de la fase líquida; (ii) ultrafiltración y (iii) diálisis de la solución obtenida.

30 Obtenido usando el método anterior, el exopolisacárido contiene no más del 1 % (p/p) de proteína y el 2 % (p/p) de ácido nucleico. El peso molecular del exopolisacárido, que se mide por filtración en gel, es de 0,4 a 400 kDa. La fracción principal del exopolisacárido es un biopolímero con un peso molecular superior a 80 kDa (Fig. 5B).

35 El exopolisacárido es inmunógeno y provoca protección de la mucosa frente a la shigelosis por *S. sonnei* mediante la inducción de la síntesis de anticuerpos específicos contra *S. sonnei*, bacterias de fase I, en organismos de mamíferos, incluyendo seres humanos (Ejemplo 1C, Fig. 6, Ejemplos 2D, 2F).

40 La inmunogenia más alta se encuentra para la fracción de exopolisacáridos con un peso molecular de 80 a 400 kDa. La inmunogenia del exopolisacárido supera más de 7 veces la inmunogenia del polisacárido O del LPS de células bacterianas (Ejemplo 1C, Fig. 6). El exopolisacárido es apirógeno para conejos cuando se administra por vía intravenosa a una dosis no superior a 0,050 mcg/kg en un ensayo de pirogenia de conejo (Ejemplo 1D).

45 La vacuna reivindicada puede comprender aditivos farmacéuticamente aceptables, que pueden incluir estabilizadores de pH, conservantes, adyuvantes, agentes isotonzantes o combinaciones de los mismos. Esta vacuna puede incluir exopolisacáridos en forma conjugada, así como no conjugada. Mientras tanto, la vacuna, compuesta de la forma conjugada del exopolisacárido, también contiene una proteína transportadora, concretamente toxoide diftérico o toxoide tetánico, o proteína A de *P. aeruginosa* u otras proteínas. La composición farmacéutica reivindicada contiene cantidades eficaces de *S. sonnei*, polisacáridos de bacterias de fase I, que consisten en 1 - 100 unidades de disacáridos repetidos de O-[4-amino-2-(N-acetil)amino-2,4-didesoxi-β-D-galactopiranosil]-(1→4)-O-[ácido 2-(N-acetil)amino-2-desoxi-α-L-altripiranurónico] unido por enlaces (1→3) para formar una cadena de polisacáridos y obtenidos usando bacterias *S. sonnei*, pero sin el uso de lipopolisacáridos como fuente.

50 Este polisacárido es un exopolisacárido, o polisacárido capsular, secretado en el medio externo por *S. sonnei*, bacteria de fase I. El exopolisacárido nativo incluye un componente lipídico atóxico, presentado por ácidos grasos no hidroxilados de 16-18 átomos de carbono en la molécula (Fig. 4). Su contenido de ácidos grasos es no inferior al 0,01 % (p/p). Adicionalmente, independientemente del método de preparación con el uso de la bacteria *S. sonnei*, el polisacárido no incluye elementos de la estructura del dominio núcleo del LPS (Fig. 4).

55 El exopolisacárido puede prepararse mediante cualquier método, incluyendo la ingeniería genética, usando el genoma de la bacteria *S. sonnei*. Preferentemente, el exopolisacárido se produce usando bacterias *S. sonnei* mediante un método que comprende: (a) producir cultivo bacteriano en fase líquida; (b) separar la fase líquida de las células bacterianas; y (c) aislar el polisacárido de la fase líquida. Mientras tanto, para evitar la destrucción de las paredes celulares y la entrada de LPS en la fase líquida, es aconsejable la separación de las células bacterianas en

condiciones de mantener la natividad de las células bacterianas. El aislamiento del polisacárido de la fase líquida puede realizarse mediante un método que comprende: (i) eliminar proteínas y ácidos nucleicos de la fase líquida; (ii) ultrafiltración y (iii) diálisis de la solución obtenida.

5 El exopolisacárido obtenido mediante el uso del método anterior puede contener no más del 1 % (p/p) de proteína y el 2 % (p/p) de ácido nucleico. El peso molecular del exopolisacárido, que se mide mediante filtración en gel, varía de 0,4 a 400 kDa. La fracción principal del exopolisacárido es un biopolímero con un peso molecular superior a 80 kDa (Fig. 5B).

10 El exopolisacárido es el modulador de la respuesta del sistema inmunitario en mamíferos, incluyendo seres humanos (Ejemplo 3B). El exopolisacárido es apirógeno para conejos cuando se administra por vía intravenosa a una dosis de no más de 0,050 mcg/kg en un ensayo de pirogenia de conejo (Ejemplo 1D).

15 La composición farmacéutica reivindicada puede comprender aditivos dirigidos farmacéuticamente aceptables, que pueden incluir conservantes, estabilizadores, disolventes o combinaciones de los mismos.

20 La composición farmacéutica reivindicada puede tener un amplio intervalo de actividad farmacológica y presenta, en particular, un efecto antivirico terapéutico eficaz en una infección causada por el subtipo del virus de la gripe A H1N1 (Ejemplo 3B, Fig. 9).

25 También se reivindica el uso de polisacárido de *S. sonnei*, bacteria de fase I, para producción de una vacuna o composición farmacéutica. El polisacárido indicado consiste en 1 - 100 unidades de disacáridos repetidos de O-[4-amino-2-(N-acetil)amino-2,4-didesoxi-β-D-galactopiranosil]-(1→4)-O-[ácido 2-(N-acetil)amino-2-desoxi-α-L-altripiranurónico] unido por enlaces (1→3) para formar una cadena de polisacáridos y obtenidos usando la bacteria *S. sonnei*, pero sin el uso de lipopolisacáridos como fuente.

30 Este polisacárido es un exopolisacárido, o polisacárido capsular, secretado en el medio externo por *S. sonnei*, bacteria de fase I. El exopolisacárido nativo incluye un componente lipídico atóxico, presentado por ácidos grasos no hidroxilados de 16-18 átomos de carbono en la molécula (Fig. 4). Su contenido de ácidos grasos es no inferior al 0,01 % (p/p). Adicionalmente, independientemente del método de preparación con bacterias *S. sonnei*, el exopolisacárido no incluye elementos de la estructura del dominio núcleo de LPS (Fig. 4).

35 El exopolisacárido puede prepararse mediante cualquier método, incluyendo la ingeniería genética, usando el genoma de la bacteria *S. sonnei*. Preferentemente, el exopolisacárido se produce usando bacterias *S. sonnei* mediante un método, que comprende: (a) producir cultivo bacteriano en fase líquida; (b) separar la fase líquida de las células bacterianas; y (c) aislar el polisacárido de la fase líquida. Mientras tanto, para evitar la destrucción de las paredes celulares y la entrada de LPS en la fase líquida, es aconsejable la separación de las células bacterianas en condiciones de mantener la natividad de las células bacterianas. El aislamiento del polisacárido de la fase líquida puede realizarse mediante un método que comprende: (i) eliminar proteínas y ácidos nucleicos de la fase líquida; (ii) ultrafiltración y (iii) diálisis de la solución obtenida.

40 El exopolisacárido obtenido mediante el uso del método anterior puede contener no más del 1 % (p/p) de proteína y el 2 % (p/p) de ácido nucleico. El peso molecular del exopolisacárido, que se mide por filtración en gel, es de 0,4 a 400 kDa. La fracción principal del exopolisacárido es un biopolímero con un peso molecular superior a 80 kDa (Fig. 5B).

45 El exopolisacárido es inmunógeno y provoca la protección de la mucosa frente a la shigelosis por *S. sonnei* induciendo la síntesis de anticuerpos específicos contra bacterias *S. sonnei* de fase I en organismos de mamíferos, incluyendo seres humanos (Ejemplo 1C, Fig. 6, Ejemplos 2D, 2F). Adicionalmente, el exopolisacárido es también un modulador de la respuesta del sistema inmunitario en mamíferos, incluyendo los seres humanos (Ejemplo 3B). El exopolisacárido es apirógeno para conejos cuando se administra por vía intravenosa a una dosis de no más de 0,050 mcg/kg en un ensayo de pirogenia de conejo (Ejemplo 1D). El exopolisacárido es apirógeno para conejos a una dosis de no más de 0,050 mg/kg en un ensayo de pirogenia en conejos cuando se administra por vía intravenosa (Ejemplo 1D). La composición farmacéutica está destinada a la administración parenteral, oral, rectal, intravaginal, transdérmica, sublingual y en aerosol a mamíferos, incluyendo seres humanos.

Breve descripción de los dibujos

La invención se ilustra mediante las siguientes figuras.

- 60 La Fig. 1 muestra la fórmula estructural de la unidad monomérica del exopolisacárido de bacterias *S. sonnei*, de fase I.
 La Fig. 2 muestra el espectro de RMN C13 del exopolisacárido de bacterias *S. sonnei*, de fase I.
 La Fig. 3 muestra resultados de espectrometría de masas-CG de LPS de bacterias *S. sonnei*, de fase I.
 65 La Fig. 4 muestra resultados de espectrometría de masas-CG de *S. sonnei*, exopolisacárido de bacterias *S. sonnei*, de fase I; las flechas indican señales de ácidos grasos no hidroxilados.

La Fig. 5 muestra gráficos de la distribución del peso molecular del polisacárido específico de O, aislado de bacterias *S. sonnei*, de fase I (a) y exopolisacárido de bacterias *S. sonnei*, de fase I (b). En este caso, el eje vertical representa los valores de absorción ultravioleta a una longitud de onda de 225 nm; el eje horizontal representa el tiempo en minutos.

La Fig. 6 muestra gráficos de producción de anticuerpos (15 días) después de la inmunización primaria (a) y secundaria (b) de ratones con preparaciones fabricadas con exopolisacáridos de bacterias *S. sonnei*, de fase I (lote 33) y polisacárido O de LPS de bacterias *S. sonnei*, de fase I, con una dosis de 25 microgramos por ratón. En el eje vertical están los valores para la dilución del título sérico.

La Fig. 7 muestra gráficos de la unión de anticuerpos de suero de conejo monorreceptor a antígeno O de *S. sonnei*, de fase I, con las muestras: exopolisacárido de *S. sonnei* (lote 33 y 35); polisacárido O de LPS de células de bacterias *S. sonnei*; LPS de *Salmonella enterica* sv *typhimurium*; LPS 2a de *S. flexneri* en ensayo ELISA. En el eje horizontal se muestran los valores de la dilución del título sérico y en el eje vertical la densidad óptica del sustrato coloreado de reacción (orto-fenilendiamina) a una longitud de onda de 495/650 nm.

La Fig. 8 muestra un gráfico de producción de anticuerpos (15 días) después de la inmunización primaria (a) y secundaria (b) de ratones con una vacuna que consiste en la forma no conjugada de exopolisacárido bacteriano de *S. sonnei*, fase I, y con vacuna de toxoide tetánico (TT) conjugado con exopolisacárido de bacterias *S. sonnei*, fase I (lote 33), a una dosis de 25 microgramos de exopolisacáridos por ratón. El eje vertical muestra valores para la dilución del título sérico.

La Fig. 9 muestra gráficos de tasas de supervivencia de dos grupos de ratones, infectados con una dosis de DL 100 de la cepa de gripe virulenta A subtipo H1N1. El primer grupo (experimental) recibió inyecciones diarias de la composición farmacéutica, a una dosis de 100 microgramos de exopolisacáridos por ratón y el segundo grupo (control) inyecciones de solución salina.

Descripción detallada de realizaciones preferidas

Ejemplo 1

Preparación y características de exopolisacárido de bacterias *S. sonnei*, fase I

A. Preparación de exopolisacárido

El exopolisacárido se prepara usando bacterias *S. sonnei*, fase I. El cultivo de bacterias se prepara en fase líquida mediante cultivo profundo de *S. sonnei* en medio nutriente. La separación de la fase líquida de las células bacterianas se realiza mediante una centrifuga de flujo (Westphalia) con enfriamiento, de acuerdo con las pautas para la deposición suave de las células con el mantenimiento de su natividad celular. El exopolisacárido se aísla de la fase líquida mediante la eliminación de proteínas y ácidos nucleicos, seguido de ultrafiltración y diálisis de la solución obtenida. Para este fin, la fase líquida se concentra y se dializa usando una instalación para ultrafiltración (Viadisart, límite de exclusión de membrana de 50 kDa). El dializado se liofiliza, se vuelve a disolver en tampón Tris 0,05 M, pH = 7,2, que contiene CaCl₂ al 0,01 % y MgCl₂, se añade ARNasa y ADNasa en concentraciones de 100 mcg/ml y 10 mcg/ml, respectivamente, y después de 16 horas de agitación a 37 °C, la mezcla de reacción se trata con proteinasa K (20 mcg/ml) durante 2 horas a 55 °C. La solución transparente resultante se somete a ultrafiltración y diálisis usando una instalación para ultrafiltración (Viadisart, límite de exclusión de membrana de 50 kDa). Si es necesario, la solución final puede liofilizarse y puede obtenerse el exopolisacárido purificado con un rendimiento del 60-80 %. El exopolisacárido obtenido mediante el método mencionado anteriormente contiene no más del 1 % (p/p) de proteína, determinado mediante el método de Bradford (Bradford M.M. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal. Biochem.* 1976, v. 72, págs. 248-254) y no más del 2 % (p/p) de ácido nucleico, determinado mediante el método de Spirin (Spirin A.S. *Spectrophotometric determination of the total amount of nucleic acids*. *Biochemistry*, 1958, v. 23, N.º 4, pág. 656).

B. La estructura, composición y propiedades físicoquímicas del exopolisacárido

La estructura del exopolisacárido de *S. sonnei*, fase I, se estudió usando espectroscopía de RMN C¹³. La espectrometría de RMN se realiza mediante un espectrómetro Bruker, modelo DRX500, con software XWINNMR y secuencias de impulso del fabricante. La prospección de los espectros se realiza en D₂O (99:95 %) con acetona como patrón (31,5 ppm para C¹³). La espectrometría de masas de alta resolución con ionización por electronebulización y detección de iones mediante resonancia de ion-ciclotrón se realiza en un espectrómetro Bruker Daltonics, modelo Apex II, con un imán 7 Tesla.

El análisis comparativo del espectro de RMN C¹³ del exopolisacárido (Fig. 2] muestra su identidad completa frente a espectros de RMN C¹³ del polisacárido específico de O, aislado de LPS de *S. sonnei*, fase I, que indica claramente la identidad de la estructura de la unidad monomérica de ambos biopolímeros (Fig. 1).

Los estudios del componente lipídico del exopolisacárido se realizan basándose en el análisis de ácidos grasos usando cromatografía gas-líquido y CG/espectrometría de masas en un cromatógrafo Hewlett Packard modelo 5890, conectado a un espectrómetro de masas NERMAG, modelo R10-10L.

Se realiza un estudio comparativo de la composición de ácidos grasos y la estructura del exopolisacárido y LPS de *S. sonnei*, fase I. El exopolisacárido y el LPS se someten a metanólisis por tratamiento con HCl 2 M/CH₃OH a 85 °C durante 16 horas. Después de la metanólisis, entre los productos de LPS se encuentran los ácidos láurico (12:0), mirístico (14:0) y β-hidroximirístico (30H14:0) (Fig. 3), mientras que el metanolisato del exopolisacárido contiene, como productos básicos, ésteres metílicos de ácidos grasos superiores 16:0, 18:1 y 18:0.

Los resultados de la espectrometría de masas/CG permiten concluir que el exopolisacárido contiene un componente lipídico atóxico, compuesto de ácidos grasos no hidroxilados con 16-18 átomos de carbono en la molécula, característicos de los diglicéridos, en cantidades no inferiores al 0,01 % (p/p). En el exopolisacárido, a diferencia del LPS, no se descubrieron componentes del núcleo de oligosacáridos (heptosa, Kdo) ni el lípido A (ácidos grasos hidroxilados, ácidos grasos con cadenas más cortas que el ácido palmítico) (Fig. 4). Con la degradación ácida leve del exopolisacárido, no se produce la segmentación de la parte lipídica. La hidrólisis suave del LPS con ácidos acéticos al 1 % conduce a la eliminación del lípido A de la molécula de LPS. Mientras tanto, el componente de polisacárido obtenido es un polisacárido específico de O, unido al oligosacárido "central" (Fensom y Meadow, 1970; Morrison y Leive, 1975; Oertelt et al., 2001; Osborn, 1963).

Para concluir, el exopolisacárido no es LPS, que debe contener componentes de los dominios núcleo y del lípido A, ni polisacárido específico de O, que contiene el fragmento oligosacárido "núcleo". Es más bien un glucoconjugado con otra composición y estructura, pero con la misma estructura monomérica repetitiva que el antígeno O de *S. sonnei*.

El estudio de la distribución del peso molecular del exopolisacárido y del polisacárido específico de O de *S. sonnei*, aislados de LPS de *S. sonnei*, se realiza mediante HPLC en una columna TSK 3000 SW con un detector de UV de flujo continuo (longitud de onda 225 nm) en un tampón que contiene NaOAc 0,02 M, NaCl 0,2 M (pH 5,0). El análisis comparativo de los cromatogramas de polisacáridos específicos de O y exopolisacáridos muestran que la fracción principal del polisacárido O tiene un peso molecular de ~26 kDa (Fig. 5A), mientras que el exopolisacárido es un biopolímero con un peso molecular superior a 80 kDa (Fig. 5B).

C. Inmunogenia del exopolisacárido

Se inmunizan dos grupos de ratones de la cepa (CBAXC57B1/6) F1 por vía intraperitoneal con preparación farmacológica de exopolisacárido de bacterias *S. sonnei*, fase 1, lote 33 y preparación el polisacárido O de LPS de células de bacterias *S. sonnei*, fase 1, con una dosis de 25 microgramos por ratón. La preparación farmacológica de exopolisacárido induce la respuesta inmunitaria humoral después de una inyección de dosis única y el día 15 el suero de sangre periférica de animales muestra un aumento de 3,4 veces de anticuerpos IgG; la preparación de polisacárido O de LPS de célula bacteriana induce una respuesta inmunitaria primaria débil, un aumento de 1,9 veces en los niveles de anticuerpos IgG en el día 15, en comparación (Fig. 6A).

Para estudiar la respuesta inmunitaria secundaria, los mismos grupos de ratones se vuelven a inmunizar con antígenos a una dosis de 25 microgramos por ratón un mes después de la inyección primaria. El día 15, se produce una respuesta secundaria después de la inmunización repetida con la preparación farmacológica de exopolisacárido, lote 33, aumento de 25 veces de los anticuerpos IgG anti-O registrados en ratones, es decir, se observa una respuesta inmunitaria secundaria anamnésica. Después de la reinmunización con la preparación del polisacárido O de LPS de células bacterianas, se registra un aumento bajo en el número de anticuerpos IgG anti-O en ratones (Fig. 6 B). Por tanto, el exopolisacárido bacteriano es mucho más inmunógeno, lo que induce la síntesis de anticuerpos IgG específicos de O, que tiene un nivel 7 veces más alto que el inducido por el polisacárido O de LPS de células bacterianas.

D. Pirogenia del exopolisacárido

Se determina la pirogenia de la preparación farmacológica de exopolisacárido de bacterias *S. sonnei* (lote 33 y 35) y polisacárido O del LPS de células de bacterias *S. sonnei* en comparación con la pirogenia de muestras de LPS, extraídas de células de la misma cepa mediante el método Westphal (Westphal O., Jann K. *Bacterial lipopolysaccharide extraction with phenol: water and further application of the procedure. Methods Carbohydr.Chem.*, 1965, v. 5, págs. 83-91) y con la vacuna comercial de antígeno Vi. El ensayo se realiza con conejos Chinchilla que pesan 2,8-3,05 kg de acuerdo con los requisitos de las Regulaciones Técnicas de la OMS para vacunas de polisacárido Vi (Informe Técnico de la OMS N.º 840, 1994). Después de la administración de la muestra, se midió la temperatura rectal del conejo tres veces a intervalos de 1 hora. Una preparación se considera apirógena si el aumento de la temperatura total no supera 1,15 °C.

Tabla 1. Pirogenia de preparaciones de polisacáridos y LPS de bacterias *S. sonnei* y vacuna comercial de antígeno Vi

Preparación	Aumento de la temperatura, en °C	Pirogenia
Vacuna para el tífus de antígeno Vi «Vianvac», lote 152	(0,1; 0,2; 0,3) Σ: 0,6	apirógeno
Exopolisacárido de bacterias <i>S. sonnei</i> , lote 33	(0,2; 0,2; 0,1) Σ: 0,5	apirógena

Exopolisacárido de bacterias <i>S. sonnei</i> , lote 35	(0,2; 0,2; 0,3) Σ : 0,7	apirógena
Polisacárido O de LPS de células de bacterias <i>S. sonnei</i> ,	(0,2; 0,1; 0,2) Σ : 0,5	apirógeno
LPS de las células de bacterias <i>S. sonnei</i>	(1,1; 0,8; 1,0) Σ : 2,9	alta pirogenia

La administración intravenosa de preparación farmacológica de exopolisacárido bacteriano de *S. sonnei* y polisacárido O de LPS de células de bacterias *S. sonnei* a una dosis de 0,050 mcg por kg de peso corporal no provoca efecto pirógeno en conejos. La preparación de LPS, extraído de células de la misma cepa, que es una endotoxina clásica, demostró una alta pirogenia.

Ejemplo 2

Vacunas, que comprenden exopolisacárido bacteriano de *S. sonnei*, fase I

A. Uso del exopolisacárido para la producción de vacuna no conjugada (productos farmacéuticos)

La preparación de vacuna no conjugada incluye la obtención de exopolisacárido usando bacterias *S. sonnei*, fase I de acuerdo con el Ejemplo 1 (A) y el posterior llenado aséptico de viales o jeringas con una solución que contiene la sustancia activa y aditivos especiales farmacéuticamente adecuados, que pueden incluir estabilizadores del pH, conservantes, adyuvantes, agentes isotónicos o combinaciones de los mismos. La dosis de vacunación contiene: forma no conjugada de exopolisacárido, en una cantidad de 0,010 mg a 0,100 mg; fenol (conservante), sin superar 0,75 mg (Sigma, Calidad USP 108-95-2), con adición de cloruro de sodio (Sigma, Calidad USP 7647-14-5), fosfato de sodio dibásico (Sigma, Calidad USP 7782-85-6) y fosfato de sodio monobásico (Sigma, Calidad USP 13472-35-0); y agua estéril apirógena para inyección, 0,5 ml (documento FS 42-2620-97, documento EP IV 2002).

B. Actividad serológica de la vacuna no conjugada

La actividad serológica y la especificidad inmune de la vacuna, que incluye del exopolisacárido en forma no conjugada, en concentración de 100 mcg/ml (lotes 33 y 35), se determinaron en la inhibición de la reacción de hemaglutinación pasiva (IHA) en comparación con otras muestras de antígenos O en concentración de 100 mcg/ml - polisacárido O de LPS de células de bacterias *S. sonnei*, así como LPS de *S. sonnei*, *S. flexneri 2a* y *Salmonella enterica sv typhimurium*, obtenidos mediante el método Westphal (Westphal O., Jann K. *Bacterial lipopolysaccharide extraction with phenol: water and further application of the procedure. Methods Carbohydr.Chem.*, 1965, v. 5, págs. 83-91). Se usa el kit de diagnóstico comercial contiene eritrocitos adsorbidos con antígeno de *S. sonnei* (Microgen, Rusia) y antisuero de conejo monorreceptor frente a antígeno O de *S. sonnei*.

La concentración de IHA por vacuna, que incluye exopolisacáridos (lotes 33 y 35), polisacárido O de LPS, así como la preparación de LPS bacteriano de *S. sonnei*, no superó 1,56 mcg/ml (Tabla 2). Los LPS bacterianos heterólogos de *S. flexneri 2a* y *Salmonella enterica sv typhimurium* tuvieron una baja actividad serológica en la reacción de IHA con el suero monorreceptor de *S. sonnei* (concentración de inhibición \geq 25 mcg/ml) (Tabla 2).

Tabla 2. Inhibición de IHA por vacuna no conjugada, incluye exopolisacárido de bacterias *S. sonnei* y preparaciones de polisacárido O del LPS de células de bacterias *S. sonnei* y LPS de bacterias *S. sonnei*, *S. flexneri 2a*, *Salmonella enterica sv typhimurium*

Preparación	Concentración de IHA, mcg/ml
Vacuna, incluye exopolisacárido de bacterias <i>S. sonnei</i> en forma no conjugada (lote 33-1)	1,56
Vacuna, incluye exopolisacárido de bacterias <i>S. sonnei</i> en forma no conjugada (lote 35-1)	0,78
Polisacárido O de LPS de células de bacterias <i>S. sonnei</i>	1,56
LPS de bacterias <i>S. sonnei</i>	0,78
LPS de bacterias <i>S. flexneri 2a</i>	25,00
LPS de bacterias <i>Salmonella enterica sv typhimurium</i>	\geq 25,0

Se detecta en el ensayo ELISA la interacción de los lotes de vacunas in vitro, incluye exopolisacárido no conjugado de bacterias *S. sonnei* a concentraciones de 100 mcg/ml (lotes 33-1 y 35-1) y otros antígenos O en concentraciones de 100 mcg/ml - polisacárido O de LPS de células de bacterias *S. sonnei*, preparación de LPS de bacterias *S. flexneri 2a* y *Salmonella enterica sv typhimurium*, con anticuerpos de suero monorreceptor de conejo frente a antígeno O de *S. sonnei*. Con absorción en fase sólida, la vacuna, incluye exopolisacárido bacteriano de *S. sonnei* y muestra de polisacárido O del LPS de células de bacterias *S. sonnei*, interaccionó eficazmente con antisuero de antígeno O de *S. sonnei* (Fig. 7).

C. Pirogenia de la vacuna no conjugada

La pirogenia de la vacuna, que contiene 100 mcg/ml de exopolisacárido de bacterias *S. sonnei* en forma no conjugada (lotes 33 y 35) se determina en comparación con la pirogenia de la vacuna comercial de antígeno Vi, polisacárido O del LPS de células de bacterias *S. sonnei* y de LPS aislados de sobrenadante de cultivo celular y células de la misma cepa usando el método de Westphal descrito en el Ejemplo 1C. Los resultados del ensayo se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Pirogenia de la vacuna, que contiene exopolisacáridos de bacterias *S. sonnei* en forma no conjugada, vacuna comercial de antígeno Vi, preparaciones de polisacárido O de LPS de células de bacterias *S. sonnei* y LPS de bacterias *S. sonnei*

Preparación	Aumento de la temperatura, °C	Pirogenia
Vacuna para el tifus de antígeno Vi «Vianvac», lote 152	(0,3; 0,2; 0,0) Σ: 0,5	apirógena
Vacuna, incluye exopolisacárido de bacterias <i>S. sonnei</i> , (lote 33-1)	(0,2; 0,2; 0,2) Σ: 0,6	apirógena
Vacuna, que contiene exopolisacárido de bacterias <i>S. sonnei</i> , (lote 35-1)	(0,2; 0,1; 0,3) Σ: 0,6	apirógena
Polisacárido O de LPS de células de bacterias <i>S. sonnei</i>	(0,1; 0,1; 0,3) Σ: 0,5	apirógena
LPS del sobrenadante de cultivo de bacterias <i>S. sonnei</i>	(1,2; 1,2; 1,1) Σ: 3,5	altamente pirógena
LPS de células de bacterias <i>S. sonnei</i>	(1,1; 0,9; 1,1) Σ: 3,1	altamente pirógena

La administración intravenosa de vacuna incluye exopolisacárido de bacterias de *S. sonnei*, a una dosis de 0,050 mcg por kg de peso corporal no provoca efecto pirógeno en conejos. La preparación que contiene LPS de células de bacterias *S. sonnei* de la misma cepa muestra una alta pirogenia y, por tanto, representa una endotoxina clásica.

D. Propiedades protectoras de la vacuna no conjugada

Para estudiar la formación de inmunidad protectora de la mucosa en cobayas, se inmunizan animales de laboratorio con un peso de 200-250 g con inyección subcutánea de vacuna, que incluye 100 mcg/ml de forma no conjugada de exopolisacárido bacteriano de *S. sonnei* (lotes 33 y 35) y una preparación del polisacárido O de LPS de células de bacterias *S. sonnei*, en dosis de 25 y 50 mcg por animal, dos veces en la región posterior con un intervalo de 10 días. Los animales de control reciben solución salina en lugar de la preparación. Diez días después de la última inmunización, se induce queratoconjuntivitis por *S. sonnei* (ensayo de Sereny) en los animales de experimentación y de control mediante la introducción en las conjuntivas oculares de suspensión de células de la cepa virulenta de *S. sonnei* en una dosis cercana a la DI_{100} (10^9 células) y en una dosis cercana a $2DI_{100}$ (2×10^9 células), en 30 mcl de solución salina estéril. Todos los animales del grupo de control, infectados con una dosis de 2×10^9 células y el 90 % de los animales del grupo de control, infectados con una dosis de 10^9 células, desarrollaron queratoconjuntivitis por *S. sonnei* (Tabla 4). La inmunización con vacuna, que incluye exopolisacárido (lotes 33 y 35), en una dosis de 25 mcg proporciona una tasa de protección del ojo del 70-90 % de los animales de experimentación infectados con una dosis de 10^9 células; cuando se infecta con una dosis de 2×10^9 células, la tasa de protección ocular varía del 50 % al 70 %, respectivamente. Una dosis más alta de 50 mcg de inmunización con la misma vacuna proporciona una tasa de protección ocular del 55 % al 85 % en animales de experimentación infectados con una dosis de 10^9 células; cuando se infecta con una dosis de 2×10^9 células, el nivel de protección ocular varía del 50 % al 70 %, respectivamente. Por tanto, con inmunización subcutánea de los animales con vacuna a base de la forma no conjugada de exopolisacárido bacteriano de *S. sonnei* (lotes 33 y 35), se registra inmunidad anti-*Shigella* local marcada, mientras que la inmunización con preparación de polisacárido O de LPS de células bacterianas de *S. sonnei* no muestran efecto anti-*Shigella* de la preparación.

Tabla 4. Inmunidad protectora de la mucosa frente a la infección por *S. sonnei* en cobayas como resultado de la inmunización sistémica con la vacuna, a base de la forma no conjugada de exopolisacárido de bacterias *S. sonnei*

Preparación	Dosis de preparación, mcg por animal	Dosis de infección (N.º de células en 30 mcl de solución salina)	N.º de animales infectados	N.º de ojos de animales infectados	N.º de ojos con queratoconjuntivitis	N.º de ojos protegidos de la queratoconjuntivitis	Tasa de protección de los ojos, %
Vacuna, que contiene exopolisacárido de bacterias <i>S. sonnei</i> , (lote 33)	25	109	10	20	2	18	90
	25	2x109	10	20	6	14	70
	50	109	10	20	9	11	55
	50	2x109	10	20	10	10	50
Vacuna, que contiene exopolisacárido de bacterias <i>S. sonnei</i> , (lote 35)	25	109	10	20	6	14	70
	25	2x109	10	20	10	10	50
	50	109	10	20	3	17	85
	50	2x109	10	20	6	14	70
Polisacárido O de LPS de células de bacterias <i>S. sonnei</i>	25	109	10	20	12	4	20
	25	2x109	10	20	14	6	0
	50	109	10	20	16	4	10
	50	2x109	10	20	17	3	15
Control	-	109	10	20	18	2	10
	-	2x109	10	20	20	0	0

E. Seguridad de la vacuna no conjugada

La vacuna, que incluye la forma no conjugada de exopolisacárido bacteriano de *S. sonnei* (lote 33), en una dosis de 50 mcg de antígeno, contenida en 0,5 ml de solución tampón de fenol-fosfato y la preparación para la comparación - la vacuna contra el tífus de antígeno Vi "Vianvac", en una dosis de 25 mcg, se inyectan individualmente por vía subcutánea en dos grupos de 20 voluntarios adultos en el tercio superior del hombro. Las reacciones de temperatura a la inyección del fármaco, los efectos secundarios generales y las reacciones locales de los voluntarios se estudian durante los tres primeros días después de la inmunización. La vacuna, que comprende exopolisacárido bacteriano de *S. sonnei* (lote 33), administrado en dosis de 50 mcg, muestra un alto perfil de seguridad para voluntarios adultos. Las reacciones de temperatura en el intervalo de 37,1-37,5 °C se encuentran en solo el 5 % de los voluntarios, no hay reacciones de temperaturas más altas ni efectos secundarios generales; la reacción local (dolor en el sitio de inyección) se detecta en un solo voluntario (Tabla 5).

Tabla 5. Seguridad de la vacuna, que incluye la forma no conjugada de exopolisacárido bacteriano de *S. sonnei* con inmunización de los voluntarios adultos

Reacciones en la administración de la vacuna	Vacuna, que contiene exopolisacáridos de bacterias <i>S. sonnei</i> (lote 33), dosis de 50 mcg	Vacuna de antígeno Vi «Vianvac» (lote 193), dosis de 25 mcg
Reacciones de temperatura (37,1 - 37,5 °C)	5 % de los voluntarios	5 % de los voluntarios
Reacciones de temperatura (37,6 - 38,5 °C)	ausente	Ausente
Reacciones de temperatura (38,5 °C y más)	ausente	Ausente
Efectos secundarios	ausente	Ausente
Reacciones locales (dolor)	Un caso	Un caso

F. Inmunogenia de la vacuna no conjugada

La inmunogenia de la vacuna, que incluye el exopolisacárido bacteriano de *S. sonnei* no conjugado (lote 33), para voluntarios adultos se determina en estudios serológicos usando los siguientes ensayos: análisis de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA) y la reacción de hemaglutinación pasiva (PHA). Las vacunas, que comprendían exopolisacáridos bacteriano de *S. sonnei* (lote 33), en una dosis de 50 mcg de antígeno, contenidos en 0,5 ml de solución tampón de fenol-fosfato y la preparación para la comparación - vacuna contra el tífus de antígeno Vi "Vianvac", en dosis de 25 mcg, se inyectan individualmente por vía subcutánea en dos grupos de 20 voluntarios adultos en el tercio superior del hombro. Los sueros sanguíneos para los ensayos se toman de cada sujeto antes de la vacunación y 30 y 60 días después de la vacunación. Para realizar el análisis ELISA, se usan microplacas recubiertas con exopolisacárido bacteriano de *S. sonnei*, anticuerpos de conejo contra IgG, IgM, IgA humanas conjugados con peroxidasa de rábano picante (Sigma, EE. UU.). La densidad óptica se mide en un lector Bio-Rad iMark ELISA con lecturas de longitud de onda dual (490/630 nm). El ensayo de PHA se realiza de acuerdo con las instrucciones del fabricante, usando diagnóstico comercial en eritrocitos de *S. sonnei* (Microgen, Rusia).

La inmunogenia se evalúa de acuerdo con los siguientes criterios: seroconversión 4 veces en comparación con el suero de fondo, nivel de respuesta antigénica antes y después de la vacunación; también, se mide la media geométrica del título de anticuerpos (MG), los aumentos de títulos en el grupo vacunado en comparación con los niveles de suero de fondo.

El aumento en los títulos de anticuerpos anti-O se observa en todos los voluntarios a los que se administra una vacuna con exopolisacárido bacteriano de *S. sonnei* (lote 33). Se registran altas elevaciones en el título de anticuerpos aglutinantes antes y después de la vacunación; con un aumento de 40,7x y 42,5x veces en los días 30 y 60 después de la vacunación, respectivamente. Se registran altos niveles de seroconversión de anticuerpos contra el antígeno O de *S. sonnei*, que comprende ≥ 90 % entre los sujetos vacunados. En sujetos inmunizados con la vacuna "Vianvac", no se observan aumentos en los anticuerpos específicos contra exopolisacáridos y no se observan seroconversiones cuádruples (Tabla 6).

Se revelan altos aumentos de los títulos de anticuerpos, especialmente la clase IgA, con el estudio de aumento y seroconversión de clases IgA, IgG e IgM de anticuerpos contra el antígeno O de *S. sonnei* en el ensayo ELISA, en comparación con el nivel de fondo, entre sujetos inmunizados con vacuna, que comprende exopolisacárido bacteriano de *S. sonnei* (lote 33). Por tanto, el aumento de títulos de anticuerpos IgA en el día 30 y 60 después de la inmunización fue de 25,7 veces y 30,2 veces, respectivamente; anticuerpos IgG – 6,1 veces y 5,8 veces, respectivamente. La tasa de seroconversión de las clases IgG e IgG de anticuerpos específicos de O es alta y consiste en el 95 % y el 95 % para IgA; el 75 % y el 70 % para IgG, en los días 30 y 60 después de la vacunación, respectivamente. Por tanto, la vacuna reivindicada, que comprende exopolisacárido bacteriano de *S. sonnei* no conjugado, con una única inmunización subcutánea de voluntarios adultos, induce una respuesta inmunitaria adaptativa sistémica humana con anticuerpo dominante de clase IgA.

Tabla 6. Inducción de la respuesta inmunitaria sistémica en voluntarios adultos con una inmunización subcutánea mediante vacuna, que comprende exopolisacárido no conjugado de *S. sonnei*

Vacuna y la dosis de inmunización	N.º de voluntarios	Aumento de título de anticuerpos en comparación con el título de antígeno antes de la vacunación	% de voluntarios con seroconversión de 4 veces 30 días después de la vacunación	Aumento del título de anticuerpos en comparación con el título del antígeno antes de la vacunación	% de voluntarios con seroconversión de 4 veces y más 60 días después de la vacunación
Anticuerpos aglutinantes-ensayo PHA					
Vacuna, incluye exopolisacárido de bacterias <i>S. sonnei</i> , (lote 33), 50 mcg	20	40,7	90 %	42,5	95 %
Vacuna de antígeno Vi «Vianvac» (lote 193), 25 mcg	20	1,14	Ninguno	1,16	Ninguno
Ensayo ELISA - IgA					
Vacuna, incluye exopolisacárido de bacterias <i>S. sonnei</i> , (lote 33), 50 mcg	20	25,7	95 %	30,2	95 %
Vacuna de antígeno Vi «Vianvac» (lote 193), 25 mcg	20	0,82	Ninguna	0,99	Ninguna
Ensayo ELISA - IgG					
Vacuna, incluye exopolisacárido de bacterias <i>S. sonnei</i> , (lote 33), 50 mcg	20	6,1	75 %	5,8	70 %
Vacuna de antígeno Vi «Vianvac» (lote 193), 25 mcg	20	1,06	Ninguno	1,09	Ninguno
Ensayo ELISA - IgM					
Vacuna, incluye exopolisacárido de bacterias <i>S. sonnei</i> , (lote 33), 50 mcg	20	2,51	50 %	2,73	50 %
Vacuna de antígeno Vi «Vianvac» (lote 193), 25 mcg	20	1,10	Ninguno	1,14	Ninguno

G. Uso del exopolisacárido para la producción de vacuna conjugada (productos farmacéuticos)

5

El exopolisacárido se obtiene usando bacterias *S. sonnei*, fase de acuerdo con el Ejemplo 1 (A). La obtención del conjugado de exopolisacárido con proteína puede realizarse mediante cualquiera de los métodos conocidos. En el marco de este estudio, el método utilizado ((Taylor D.N., Trofa A.C., Sadoff J., Chu C., Brula D., Shiloach J., Cohen D., Ashkenazi S., Lerman Y., Egan W., Schneerson R., Robbins J.B. *Synthesis, characterization, and clinical evaluation of conjugate vaccines composed of the O-specific polysaccharides of Shigella dysenteriae type 1, Shigella flexneri type 2a, and Shigella sonnei (Plesiomonas shigelloides) bound to bacterial toxoids. Infect. and Immunity.* 1993, págs. 3678-3687), puede describirse como que se basa en la modificación del exopolisacárido mediante dihidrazida adipica (ADH) en presencia de 1-etil-3-(3dimetilaminopropil) carbodiimida (CDI) seguida de la reacción del exopolisacárido amidado resultante con un grupo hidrazida con vehículo proteico - toxoide tetánico (TT).

10

15

La modificación del exopolisacárido con ADH en presencia de CDI se realiza en agua durante 2-16 horas, manteniendo el pH entre 4,8-5,2 mediante la adición de HCl concentrado con un pH-estado. El exopolisacárido modificado se separa en una columna mediante Sephadex G-50 en agua. El control de los niveles de amidación se realiza usando espectroscopía de RMN C¹³. La conjugación del exopolisacárido modificado con toxoide tetánico se realiza en solución de cloruro de sodio 0,2 M en presencia de CDI durante 4-18 horas, mientras que el pH se mantiene a 5,6 usando el pH-estado. El conjugado se purifica en columna con Sepharose CL-6B a partir de cantidades insignificantes de biopolímeros no conjugados e impurezas con bajo peso molecular, usando 0,2 M de

20

solución de cloruro de sodio como eluyente. Se combinan las fracciones que contienen el conjugado de EPS con proteína y se eluyen cerca del volumen vacío de la columna y se añade fenol a una concentración del 0,05-0,15 % para el llenado posterior de viales estériles con la adición de aditivos especiales farmacéuticamente adecuados, que incluyen estabilizadores de pH o conservantes, adyuvantes, agentes isotonzantes o combinaciones de los mismos.

5 La vacuna conjugada contiene un 40 % de masa de proteína, determinada mediante el método de Bradford (Bradford M.M. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal.Biochem.* 1976, v. 72, págs. 248-254). Una dosis de vacuna conjugada
10 contiene: conjugado de exopolisacárido de 0,010 a 0,200 mg; fenol (conservante), sin superar 0,75 mg (Sigma, Calidad USP 108-95-2), con la adición de cloruro de sodio (Sigma, Calidad USP 7647-14-5), fosfato de sodio dibásico (Sigma, Calidad USP 778285-6) y fosfato de sodio monobásico (Sigma, 13472-35-0); y 0,5 ml de agua estéril apirógena para inyección (documento FS 42-2620-97, documento EP IV 2002).

15 *H. Inmunogenia de la vacuna conjugada*

15 Se inmunizan por vía intraperitoneal dos grupos de ratones (CBAXC57B1/6) F1 con una vacuna, que comprende exopolisacárido bacteriano no conjugado de *S. sonnei*, lote 33 y una vacuna que comprende exopolisacárido bacteriano conjugado de *S. sonnei*, lote 33, con una proteína transportadora TT, a una dosis de 25 mcg de
20 polisacárido por ratón. La vacuna no conjugada después de una inmunización de una única dosis induce una respuesta inmunitaria humoral y se detecta un aumento en el número de anticuerpos IgG el día 15 en el suero de sangre periférica de animales. La vacuna conjugada también induce una respuesta inmunitaria humoral después de una inyección de una única dosis y se detectó un aumento de 3,7 veces en los anticuerpos IgG el día 15 en el suero de sangre periférica de animales (Figura 8A).

25 Para estudiar la respuesta inmunitaria secundaria, los mismos grupos de ratones se vacunan nuevamente con una dosis de 25 mcg de polisacárido por ratón un mes después de la inyección primaria. El día 15 de la respuesta secundaria después de la segunda inmunización con vacuna conjugada, se registra un aumento de 27 veces de anticuerpos IgG anti-O y después de la segunda inmunización con vacuna no conjugada un aumento de 23,6 veces
30 de anticuerpos IgG anti-O. En este experimento, los niveles de anticuerpos específicos de O superan significativamente los niveles de anticuerpos de respuesta inmunitaria primaria en ratones inmunizados (Fig. 8B).

Ejemplo 3

35 Composición farmacéutica que comprende exopolisacárido bacteriano de *S. sonnei*, fase I.

A. Uso del exopolisacárido para la producción de composiciones farmacéuticas (productos farmacéuticos).

40 La preparación de una composición farmacéutica comprende la obtención del exopolisacárido usando bacterias de fase 1 *S. sonnei* de acuerdo con el Ejemplo 1 (A) y el posterior llenado en viales o jeringas estériles de solución que contiene el principio activo y aditivos especiales farmacéuticamente adecuados, que pueden incluir conservantes, estabilizadores, disolventes o una combinación de los mismos.

45 Una dosis terapéutica de una composición farmacéutica comprende: exopolisacárido, de 0,010 a 5,000 mg, con la adición de cloruro de sodio (Sigma, Calidad USP 10895-2), fosfato de sodio dibásico (Sigma, Calidad USP 7782-85-6) y fosfato de sodio monobásico (Sigma, Calidad USP 13472-35-0) y 0,5 ml de agua estéril apirógena para inyección (documento FS 42-2620-97, documento EP IV 2002).

B. El efecto antivírico de las composiciones farmacéuticas

50 Se infectan dos grupos de ratones (CBAXC57B1/6) F1, de 10 animales cada uno, con la dosis DL100 de la cepa virulenta de gripe A del subtipo H1N1, después de lo cual el grupo experimental se trata con administración intraperitoneal diaria de composición farmacéutica para animales a una dosis de 100 mcg de exopolisacárido por animal; el grupo de control de animales se inyecta de manera similar con solución salina. La tasa de supervivencia animal se determina en las dos semanas después de la infección. En el grupo control, la tasa de supervivencia es
55 del 0 %, en el grupo experimental del 20 % (Fig. 9). El tiempo medio de supervivencia del grupo experimental de ratones es estadísticamente significativo ($p < 0,001$) más alto que para los ratones del grupo control. Por tanto, los datos experimentales demuestran que la composición farmacéutica reivindicada tiene un efecto modulador sobre la respuesta inmunitaria.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Antígeno polisacárido de *Shigella sonnei*, fase I, que consiste en 1-100 unidades de disacáridos repetidos de O-[4-amino-2-(N-acetil)amino-2,4-didesoxi-β-D-galactopiranosil]-(1→4)-O-[ácido 2-(N-acetil)amino-2-desoxi-α-L-altripiranurónico] unidos dentro de la cadena de polisacáridica por enlaces (1→3), y ácidos grasos no hidroxilados.
- 10 2. El polisacárido de acuerdo con la reivindicación 1, en forma de un exopolisacárido, secretado por bacterias de fase I *S. sonnei*, en medio externo.
- 15 3. El polisacárido de acuerdo con la reivindicación 2, producido usando bacterias de *S. sonnei* mediante un método que incluye: (a) producción de un cultivo bacteriano en fase líquida; (b) separación de la fase líquida de las células bacterianas; (c) aislamiento del polisacárido de la fase líquida.
- 20 4. Polisacárido de acuerdo con la reivindicación 3, producido usando bacterias *S. sonnei* mediante un método en el que, durante la separación de la fase líquida de las células bacterianas, se mantiene la natividad de las células bacterianas.
- 25 5. Polisacárido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los ácidos grasos no hidroxilados están en forma de un componente lipídico atóxico.
- 30 6. El polisacárido de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 5, en el que los ácidos grasos no hidroxilados comprenden 16-18 átomos de carbono por molécula.
- 35 7. El polisacárido de acuerdo con las reivindicaciones 3 o 4 que contiene no más del 1 (p/p) por ciento de proteína y el 2 (p/p) por ciento de ácidos nucleicos.
- 40 8. El polisacárido de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 5 o 6, en el que los ácidos grasos no hidroxilados están en una cantidad de no menos del 0,01 (p/p) por ciento.
- 45 9. El polisacárido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que tiene un peso molecular, medido mediante el método de filtración en gel, de 0,4 a 400 kDa.
- 50 10. Un método para la producción del polisacárido de acuerdo con la reivindicación 1, que incluye: (a) la producción de cultivos de bacterias *S. sonnei* en fase líquida; (b) la separación de la fase líquida de las células bacterianas; (c) el aislamiento del polisacárido de la fase líquida.
11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que, durante la separación de la fase líquida de las células bacterianas, se mantiene la natividad de las células bacterianas.
12. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el aislamiento del polisacárido de la fase líquida incluye: (i) la eliminación de proteínas y ácidos nucleicos de la fase líquida; (ii) la ultrafiltración y (iii) la diálisis de la solución obtenida.
13. Una composición que contiene el polisacárido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, para su uso en el tratamiento de la gripe o para su uso como una vacuna terapéutica o preventiva para una infección bacteriana o vírica.
14. Una vacuna o una composición farmacéutica que comprende el polisacárido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

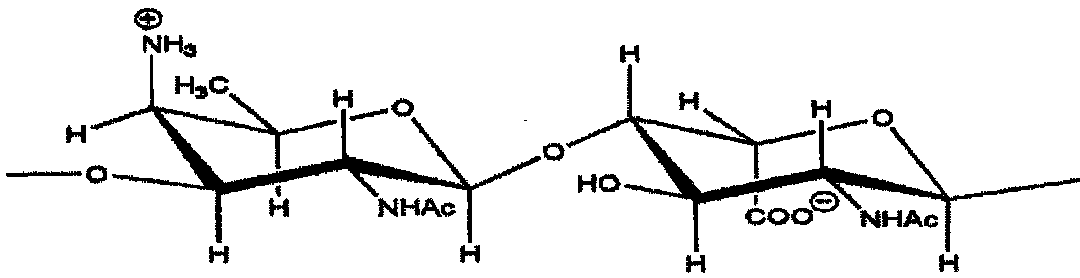


Fig. 1

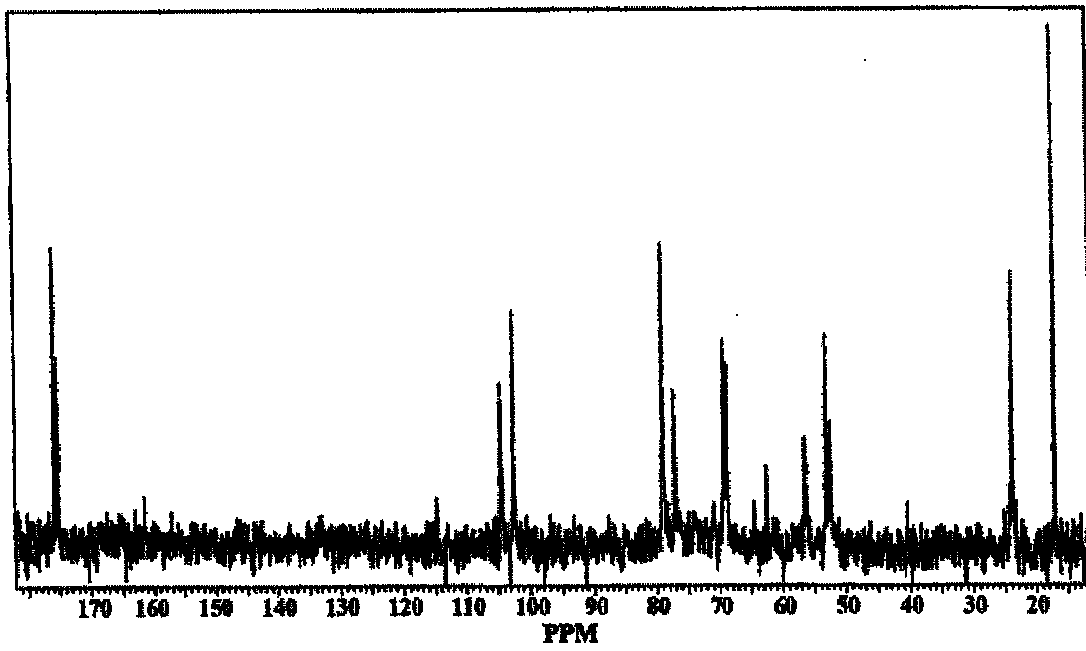


Fig. 2

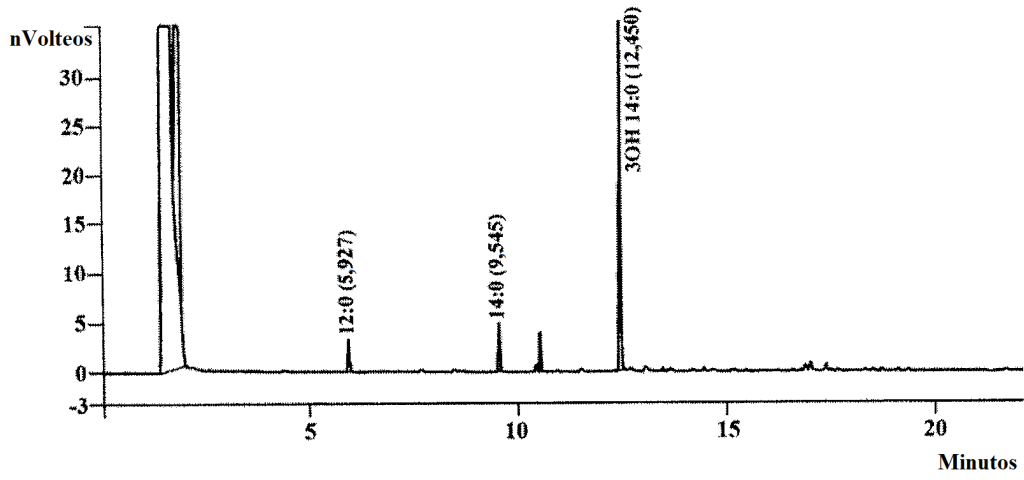


Fig. 3

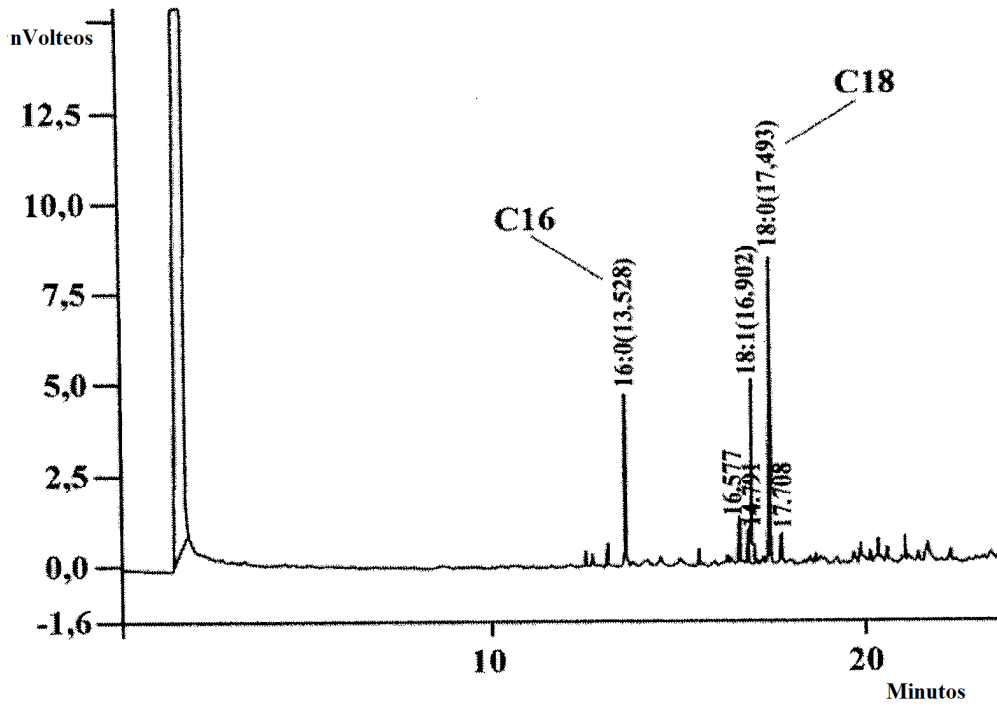


Fig. 4

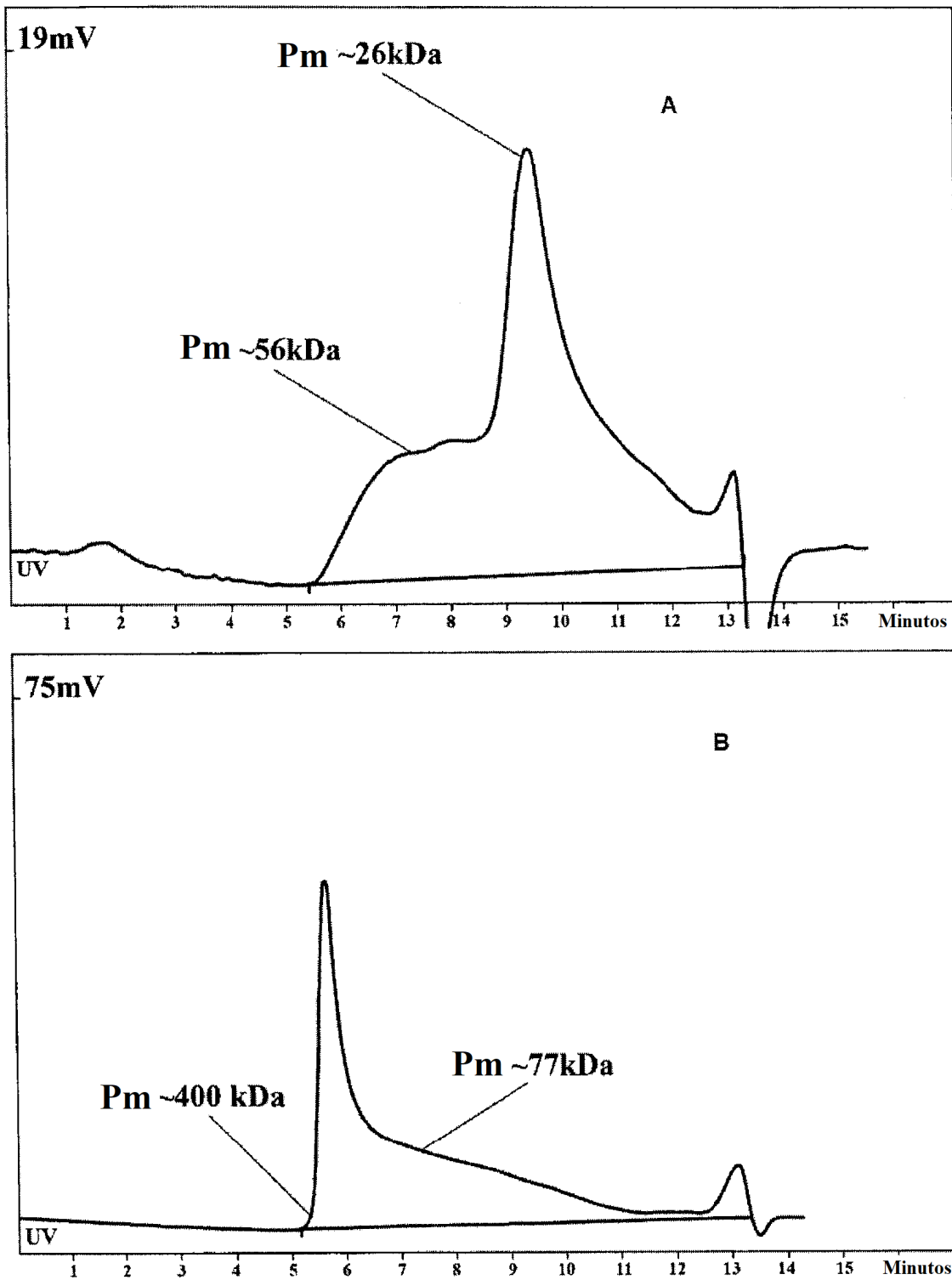


Fig. 5

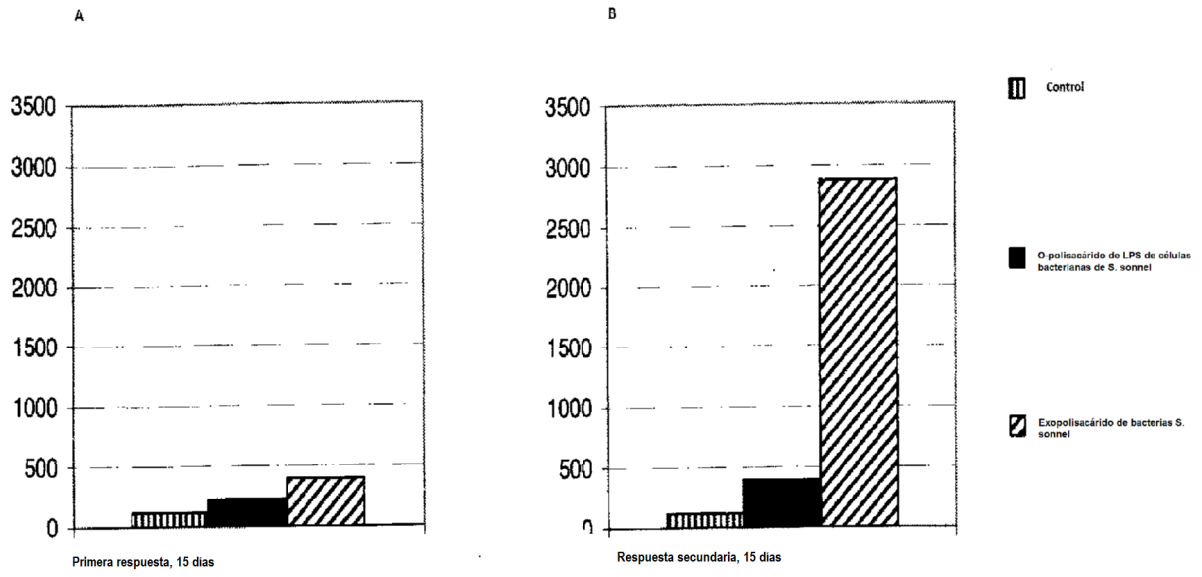


Fig. 6

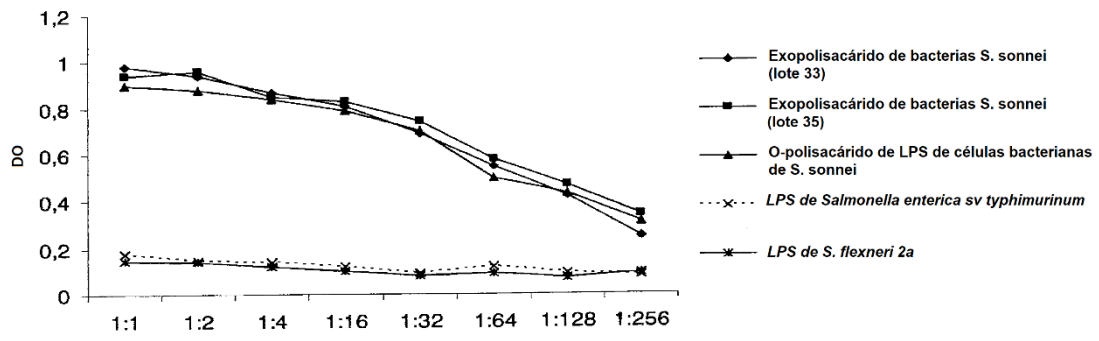


Fig. 7

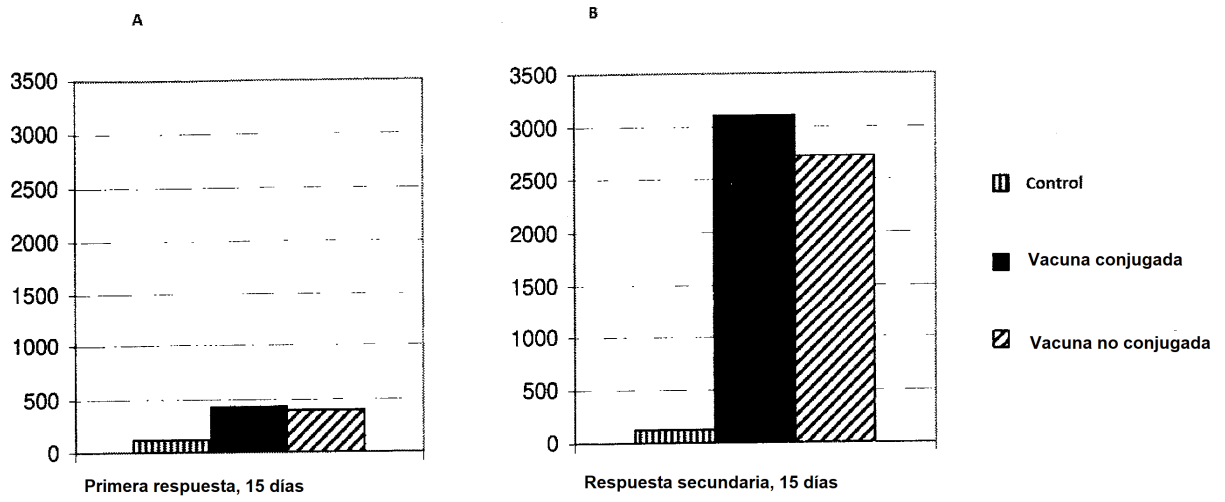


Fig. 8

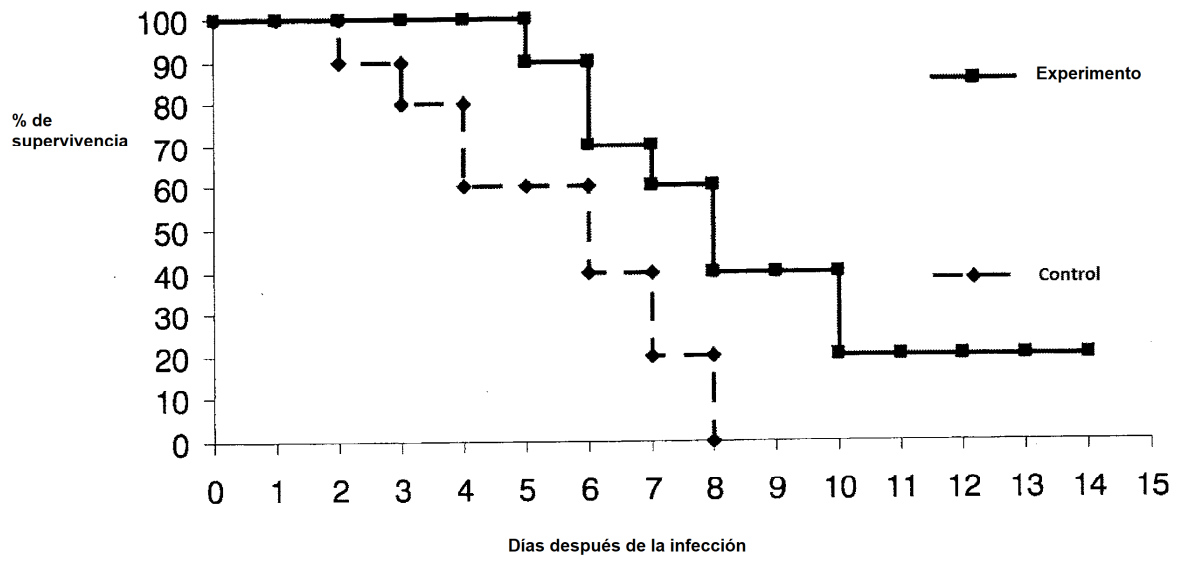


Fig. 9