VA-MENGOC-BC®. Selección de Publicaciones

PREPARACIÓN DE OLIGOSACÁRIDOS DE Neisseria meningitidis *SEROGRUPO C POR HIDRÓLISIS ÁCIDA*

✉ Juan C Martínez, Vivian Rodríguez, Yaima Merchán, Rolando Ochoa, Eric A Estrada, Mayte Nerey, Rosa Blanco, Tania Licea

DACTA, Instituto Finlay. Ave. 27 No. 19805, AP 16017, CP 11600, La Lisa, Ciudad de La Habana, Cuba. Fax: (53-7) 33 6754; E-mail: inmunoquimica@finlay.edu.cu

ABSTRACT

The current antimeningococcal vaccine, composed of the purified capsular polysaccharide of group C (PS-C) does not induce a good antibody response in children under two years of age. This drawback has usually been overcome by coupling immunogenic proteins to PS or oligosaccharides to convert these antigens to a T-dependent form. In this study the purified PS-C was depolymerized by acid hydrolysis to obtain oligosaccharides C (OS-C), and it was evaluated the integrity of their antigenic properties by inhibition ELISA. Twenty OS-C were obtained by this experimental procedure. The molecular size of the meningococcal OS-C was determined by gel filtration. Significant differences between the molecular size of the OS-C were obtained with different pH and temperature values. An inhibition ELISA was developed in order to evaluate the antigenic properties of the OS-C obtained. The antigenic properties were dependent on the molecular size. Oligosaccharides with the same antigenic properties as *Neisseria meningitidis* PS-C were obtained by acid hydrolysis at 60 °C, pH 4 for 20 min.

Keywords: acid hydrolysis, capsular polysaccharide, conjugate vaccines, ELISA, meningococcus C

Biotecnología Aplicada 1999;16:25-28

RESUMEN

La vacuna existente de polisacárido capsular purificado de *Neisseria meningitidis* serogrupo C (PS-C) posee serias limitaciones por la pobre inmunogenicidad y la corta duración de la respuesta en niños menores de dos años de edad. Numerosos estudios han demostrado la utilidad de la conjugación covalente de proteínas portadoras con polisacáridos (PS) o fragmentos antigénicos de éstos (oligosacáridos) para superar estas limitantes. El objetivo propuesto en este estudio fue obtener oligosacáridos C (OS-C) a partir de PS-C por hidrólisis ácida, y evaluar la conservación de sus propiedades antigénicas mediante un ELISA de inhibición. Se obtuvieron 20 OS-C como resultado del diseño de dos experimentos de hidrólisis ácida. Se determinó su talla molecular relativa por filtración en gel, y se encontraron diferencias significativas con las variaciones de pH y temperatura de hidrólisis utilizadas. Se desarrolló un ELISA de inhibición para la evaluación de la conservación de las propiedades antigénicas de los OS, y se halló que éstas fueron directamente proporcionales al tamaño molecular. Se obtuvieron OS-C antigénicamente similares al PS-C con 20 min de hidrólisis ácida a 60 °C y pH 4.

Palabras claves: ELISA, hidrólisis ácida, meningococo C, polisacárido capsular, vacunas conjugadas

Introducción

Las bacterias encapsuladas son causantes de serias afecciones; la cápsula es el principal mecanismo por el cual éstas se protegen de las defensas del huésped. El mayor número de casos reportados de meningitis es provocado por pneumococos, meningococos y *Haemophilus influenzae;* la meningitis bacteriana es la causante de uno de los mayores problemas de salud en el mundo actual. Los brotes meningocóccicos se encuentran entre los más temidos por la salud pública mundial, principalmente por atacar de forma aleatoria a personas sanas, provocando la muerte a uno de cada siete afectados [1].

Los tres serogrupos principales de *Neisseria meningitidis* son el A, B y C; del último se han reportado brotes en numerosos países. Este serogrupo, aunque fundamentalmente ocasiona enfermedades en forma esporádica, es la causa más frecuente de brotes epidémicos en países como Canadá y Estados Unidos [1, 2]. La mortalidad asociada con este serogrupo es mayor que la debida al serogrupo A, y similar o mayor que la asociada al serogrupo B [3].

Desde 1970, se comenzaron a aplicar en grupos de riesgo y en momentos de epidemias vacunas múltiples contra los serogrupos A, C, Y y W135 producidas a partir de polisacáridos capsulares purificados (PS) [4]. El polisacárido C (PS-C) es un componente común para todas estas vacunas, que si bien ha sido útil en el control de epidemias asociadas al serogrupo C, posee serias limitaciones por la pobre inmunogenicidad y la corta duración de la respuesta encontrada en niños menores de dos años de edad, grupo de mayor riesgo de contraer la enfermedad meningocóccica debida al serogrupo C de forma esporádica, y en los que se ha observado una declinación de la respuesta inmune hasta niveles basales pasado el año de la primovacunación [5, 6]. Por esta razón, estas vacunas se emplean solamente para controlar la aparición de brotes epidémicos.

Numerosos trabajos han demostrado que la solución para mejorar la inmunogenicidad de estas vacunas en niños pequeños, es la conversión de los antígenos polisacarídicos timo-independientes en antígenos timo-dependientes. Moléculas no inmunogénicas como los PS pueden ser convertidas en antígenos inmunogénicos, a través de una unión covalente a moléculas proteicas portadoras (conjugación) [5, 7].

✉ Autor de correspondencia

1. Jackson LA, Schuchat A, Reeves MW, Wenger JD. Serogroup C meningococcal outbreaks in the United States. JAMA 1995;273:383-9.

2. Whalen CM, Hockin JC, Ryan A, Ashton F. The changing epidemiology of invasive meningococcal disease in Canada, 1985 through 1992. JAMA 1995;273:390-4.

3. Riordan FAI, Marzouk O, Thomson APJ, Sills JA, Hart CA. Mortality from group C meningococcal disease: a case for a conjugate vaccine? Eur J Pediatr 994;153:821-4.

4. Andersen J, Berthelsen L, Lind I. Measurement of antibodies against meningococcal capsular polysaccharides B and C in enzyme-linked immunosorbent assays: towards an improved surveillance of meningococcal disease. Clin Diagn Lab Immunol 1997;4:345-51.

5. Poolman JT. Development of a meningococcal vaccine. Infect Agents Dis 1995;4:13-28.

6. Robbins JB, Schneerson R. Polysaccharide-protein conjugates: a new generation of vaccines. J Infect Dis 1990; 161:821-32.

VA-MENGOC-BC®. Selección de Publicaciones

Se ha reportado que cadenas cortas de oligosacáridos (OS) de los serogrupos A y C acopladas a portadores protéicos, han sido inmunogénicas en conejos y ratones. Además, se ha demostrado la aparición de una respuesta timo-dependiente por la inmunización con los mismos. El empleo de OS en lugar de PS, permite incorporar una mayor diversidad de éstos a un preparado vacunal, lo que posibilita la obtención de vacunas múltiples eficaces necesarias para niños pequeños [8].

La inmunogenicidad de los conjugados no puede evaluarse antes de su obtención; no obstante, la evaluación de la conservación de las propiedades antigénicas originales de sus componentes si es factible de realizar durante las diferentes etapas de obtención, y está muy relacionada con la inmunogenicidad; de aquí, la importancia de su evaluación durante los diferentes procesos de obtención de preparados vacunales conjugados.

El objetivo propuesto en este trabajo fue obtener OS capsulares de *N. meningitidis* serogrupo C (OS-C), a partir de moléculas de PS-C purificadas por hidrólisis ácida, y evaluar la conservación de sus propiedades antigénicas a través de un ELISA de inhibición.

Materiales y Métodos

Preparación de OS-C mediante hidrólisis ácida del PS-C

Se realizó la hidrólisis ácida del PS-C obtenido para la producción de la vacuna antimeningocóccica VA-MENGOC-BC® y que cumple todos los requisitos de calidad establecidos, empleando para esto variantes [9] del procedimiento descrito por Nomoto y colaboradores. Con el objetivo de determinar cómo influyen las variaciones en el pH, la temperatura y el tiempo de hidrólisis recomendados para la obtención de OS-C, primeramente se diseñó un experimento de efectos fijos con estos tres parámetros como factores.

Se tomaron 12 muestras que contenían 1 mL cada una de PS-C con una concentración de ácido siálico de 14,94 mg/mL [10]. Se les añadió a seis de ellas 90 µL de HCl 0,1 M para lograr pH 1-2, y 70 µL a las seis restantes para lograr pH 2 (según papel pH 1-12, Duotest®). Seguidamente se sometieron tres de cada grupo a 80 °C en baño termostatado por espacio de 20, 40 y 60 min, y las seis restantes a 60 °C durante tiempos similares. Transcurridos estos tiempos se colocaron en baño de agua fría y se ajustó el pH a 7 con NaOH 0,1 M (según papel pH 5,0-8,0, Duotest®). Se siguió un orden aleatorio para realizar las diferentes unidades experimentales. Luego se determinó la talla molecular de los OS por filtración en gel y se aplicó un análisis de varianza de las tallas moleculares con las variaciones de tres factores: el pH, la temperatura y el tiempo de hidrólisis analizados [11].

Posteriormente se realizó un segundo experimento de hidrólisis ácida a cuatro muestras de PS-C similares a las del primer experimento. Se les añadió a cada una por separado 70, 30, 20 y 10 µL de HCl 0,1 M para lograr pH 2, 3, 3-4 y 4, respectivamente (según papel pH 1-12, Duotest®) y se incubaron a 60 °C en baño termostatado por espacio de 20 min. Transcurrido este tiempo se colocaron en baño de agua fría y el pH se ajustó a 7 con NaOH 0,1 M (según papel pH 5,0-8,0, Duotest®). Este experimento se desarrolló por duplicado y se determinó la talla molecular de los OS por filtración en gel.

Determinación de la talla molecular de los OS-C por filtración en gel

De cada muestra de OS-C se preparó 1 mL de concentración 2,5 mg/mL y se aplicó a una columna XK26 empacada con Sepharose 6FF hasta 95 cm de altura y equilibrada con NaCl 0,2 M, con el propósito de determinar el tamaño molecular relativo de los OS, mediante la determinación de sus constantes de distribución (Kd). Se tomó como referencia la Kd del PS de partida y la de un patrón de ácido siálico (Sigma No 2751). Para ello se determinó el volumen de elución (Ve) de las muestras como la mayor lectura a 206 nm. Se utilizó NaCl 0,2 M como fase móvil de la cromatografía, y la velocidad de flujo fue de 30 mL/h. El volumen muerto de la columna (Vo) se determinó con 1 mL de una solución de dextrana azul 2000 (Sigma Cat No 5376) de concentración 1,0 mg/mL y el volumen final (Vf) con 2 mL de una solución de L-serina dinitrofenolada (Sigma Cat. No 6393) de concentración 2,0 mg/mL. Estos volúmenes se determinaron como la mayor lectura a 280 nm de las fracciones con dextrana azul 2000 y como la mayor a 360 nm de las fracciones con L-serina dinitrofenolada. El valor de la Kd se calculó por la siguiente expresión:

$$Kd = Ve\text{-}Vo/Vf\text{-}Vo$$

ELISA de inhibición para evaluar la conservación de la antigenicidad de los OS

Para determinar la conservación de la antigenicidad de moléculas de OS-C, obtenidas por hidrólisis ácida del PS-C purificado, se determinó la concentración de anticuerpos (Ac) isotipo IgG contra el PS-C en un suero humano de un individuo inmunizado con VA-MENGOC-BC®, una vez que este suero fue absorbido por los diferentes OS-C y por el PS-C de partida. Para esto, se utilizó un sistema ELISA indirecto estandarizado en nuestro laboratorio [12], que utiliza como estándar un suero humano de un individuo vacunado con VA-MENGOC-BC® con altos títulos de IgG contra el PS-C y que no presenta respuesta inmune a la poli-L-lisina utilizada como recubrimiento en el ensayo, y como control negativo, un suero humano de un individuo sin inmunizar que no mostró niveles de IgG anti PS-C significativos para esta técnica. Se calculó el porcentaje de inhibición tomando como 100% la concentración de Ac de isotipo IgG en el suero humano sin adsorber.

Recubrimiento de la fase sólida. Se utilizaron placas COSTAR® (EIA/RIA, Cat No 3590, EE UU) y de cada reactivo se emplearon 100 µL por pocillo. Se utilizó como prerrecubrimiento poli-L-lisina (Sigma, Cat No P1399) a una concentración de 3 µg/mL en solución salina tamponada con fosfatos 0,015 M, pH 7,2-7,4 (SSTF). Se incubó 30 min a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Posteriormente, se realizaron tres lavados con SSTF, se secó sobre papel absorbente y se recubrió con PS-C purificado a una concentración de 2,5 µg/mL en

7. Mäkelä PH. Capsular polysaccharide and conjugate vaccines. Zbl Bakt 1994;281:334-9.

8. Costantino P, Viti S, Podda A, Velmonte MA, Nencioni L, Rappuoli R. Deve lopment and phase 1 clinical testing of a conjugate vaccine against meningococcus A and C. Vaccine 1992;10:691-8.

9. Jennings HJ, Roy R, Michon F. Determinant specificities of the groups B and C polysaccharides of *Neisseria meningitidis*. J Immunol 1985;134:2651-7.

10. Svennerholm L. Quantitative estimation of sialis acids. II. A colorimetric resorcinol-hydrochloric acid method. Biochem Biophys-Acta 1957;24:604-11.

11. Statgraphics Plus for Windows [computer program]. Version 1.0. Statistical Graphics Corp, USA, 1994.

12. Nerey M, Ochoa R, Martínez JC, Licea T, Ferriol X, García AM, *et al.* ELISA para la cuantificación de IgG humana anti-polisacárido C de *Neisseria meningitidis*. Biotecnología Habana'97. Avances en Biotecnología Moderna; 1997 dic 1-6; La Habana. Cuba. Elfos Scientiae; 1997. p. C30.

VA-MENGOC-BC®. Selección de Publicaciones

SSTF. Se incubó de 12 a 16 h a 4 °C en una cámara húmeda [12].

Preparación y adición de las muestras, suero estándar y suero control. Se mezclaron 100 µL del OS-C o del PS-C en diluciones dobles seriadas en SSTF, desde concentraciones de 4 720 hasta 147 µg/mL, concentraciones óptimas para el ensayo, con 200 µL de suero humano con 7 500 U/mL de IgG anti PS-C diluido 1:8 en SSTF. Se mantuvo esta serie de reacciones a 37 °C durante 18 h. Posteriormente, se diluyeron las mezclas 1:25 en leche descremada (Oxoid) al 3% (m/v), SSTF, Tween 20 0,05% (v/v) para una dilución final de 1:300. Este mismo diluente fue el utilizado para preparar las diluciones dobles seriadas, desde 1:100 hasta 1:6 400 (7 puntos) del estándar y para diluir el suero control negativo 1:100. Se realizaron tres lavados de la fase sólida con SSTF, Tween 20 0,05% (v/v) y se secó sobre papel absorbente. Luego las muestras fueron añadidas a la fase sólida y se incubó 1 h a 37 °C en una cámara húmeda.

Preparación y adición del conjugado Ac-enzima. Se realizaron tres lavados con SSTF, Tween 20 0,05% (v/v), se secó sobre papel absorbente y se añadió el conjugado anti-IgG humana-fosfatasa alcalina (Sigma Cat No A-0287) diluido 1:1 000 en el mismo diluente empleado para las muestras. Se incubó 1 h a 37 °C en una cámara húmeda.

Preparación y adición del substrato. Se realizaron tres lavados con SSTF, Tween 20 0,05% (v/v) y se añadió una solución de p-nitrofenilfosfato (PNPP) (Sigma Cat No 104-0) de concentración 1 mg/mL en tampón dietanolamina pH 9,8. Se mantuvo a temperatura ambiente en la oscuridad hasta que la densidad óptica del primer punto del estándar alcanzó entre 1,3-1,5 a 405 nm y se leyó en un lector de microELISA Anthos Labtec.

Cálculo de los resultados. Se analizó el ajuste de la curva y las concentraciones de IgG de las muestras y del control negativo por medio de un programa llamado ELISA, basado en una transformación logistic-log con cuatro parámetros [13], suministrado por el Centro para el Control de Enfermedades (CDC) de Atlanta, que compara el resultado de la muestra en la dilución estudiada con la curva de calibración empleada en el propio sistema, utilizando el suero humano estándar contra el PS-C, el cual tiene asignadas 11 000 U/mL.

Resultados y Discusión

Obtención de OS-C mediante hidrólisis ácida del PS-C

Se obtuvieron 12 muestras de OS-C producto de la hidrólisis diseñada en el primer experimento, y ésta se confirmó mediante la determinación de sus tallas moleculares (Tabla 1).

Como resultado del análisis de varianza realizado, se encontraron diferencias significativas entre los valores de Kd a diferentes pH (P = 0,0005) y a diferentes temperaturas (P = 0,0041). No se encontraron diferencias significativas entre los valores de Kd en los diferentes tiempos analizados (P > 0,05). Se observó un aumento apreciable de la Kd con respecto a la del PS-C de partida (0,190), y un acercamiento de ésta al

Tabla 1. Tamaños moleculares relativos (Kd) determinados en Sepharose 6FF de los OS-C obtenidos del primer experimento de hidrólisis.

pH	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Kd
1-2	80	20	0,729
		40	0,780
		60	0,766
	60	20	0,710
		40	0,724
		60	0,731
2	80	20	0,654
		40	0,695
		60	0,748
	60	20	0,626
		40	0,632
		60	0,645

que presenta el ácido siálico (monómero) utilizado como referencia (0,833), en la medida que fueron más drásticas las condiciones de pH y temperatura, lo cual presupone un producto de la hidrólisis antigénicamente diferente al PS-C de partida. Algunos autores reportan resultados similares donde el mayor tamaño molecular corresponde al hexámero [9] y donde predominan monómeros, dímeros y trímeros.

Como resultado de este diseño, se realizó un segundo experimento fijando la menor temperatura y el menor tiempo analizados anteriormente, y aumentando el pH en busca de una hidrólisis menos severa que permitiera obtener OS-C de mayores tallas. De este segundo experimento, se obtuvieron ocho muestras (dos de cada pH) de OS-C a las cuales se les determinó la Kd y se comprobó la disminución de la misma en la medida en que fue aumentando el pH (Tabla 2).

El valor de Kd resultante se acercó al valor del PS-C de partida (0,190) a medida que aumentó el pH, lo cual evidencia la obtención de fragmentos de PS-C de mayor tamaño molecular que los del primer experimento. Es de esperar que estos fragmentos de mayor talla sean antigénicamente más parecidos al PS-C de partida que los obtenidos en el primer experimento, debido a que fueron sometidos a condiciones de hidrólisis menos drásticas.

Evaluación de la conservación de la antigenicidad de los OS-C

Se evaluó la antigenicidad de los OS-C mediante un ELISA de inhibición, ajustándose todos los ensayos por el programa ELISA (CDC, EE UU), y en los mismos se obtuvo un CV interensayo estimado de 11,7 a 14,8%. Trabajos similares reportan valores de CV de hasta 19% [4]. El ensayo mostró, además, blancos bajos y resultados reproducibles.

En la Figura 1, se observa que los OS del primer experimento mostraron ser antigénicamente diferentes al PS-C, ya que sus porcentajes de inhibición fueron mucho más bajos que los del PS. Las propiedades

Tabla 2. Tamaños moleculares relativos (Kd) determinados en Sepharose 6FF de los OS-C obtenidos del segundo experimento de hidrólisis.

Temperatura	Tiempo	pH	Kd media
60 °C	20 min	2	0,625
		3	0,538
		3-4	0,529
		4	0,400

13. Plikaytis BD, Turner SH, Gheesling LL, Carlone GM. Comparisons of standard curve-fitting methods to quantitate *Neisseria meningitidis* group A polysaccharide antibody levels by enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol 1991;29:1439-46.

14. Lett E, Gangloff S, Zimmermann M, Wachsmann D, Klein J-P. Immunogenicity of polysaccharides conjugated to peptides containing T- and B-cell epitopes. Infect Immun 1994;62:785-92.

15. Berzofky JA, Berkower IJ. Immunogenicity and antigens structure. In: Paul WE. Fundamental immunology. 3rd ed. New York: Raven Press; 1993. p. 235-82.

16. Margni RA. Inmunología e inmunoquímica. 4ta ed. Buenos Aires: Edición Médica Panamericana S.A. Marcelo T. de Alvear; 1989. p. 213-37.

VA-MENGOC-BC®. Selección de Publicaciones

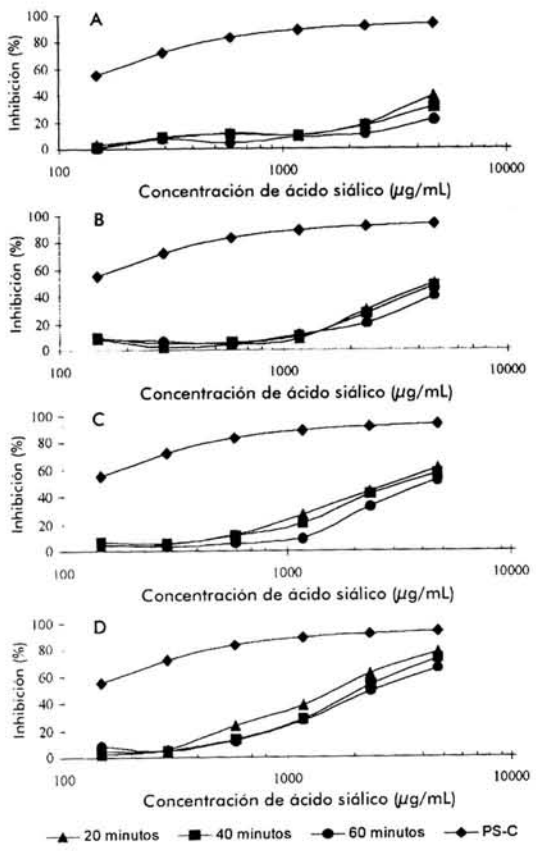

Figura 1. Inhibición de la IgG anti PS-C por los OS-C obtenidos del primer experimento bajo las condiciones A: pH 1-2, 80 °C; B: pH 1-2, 60 °C; C: pH 2, 80 °C; D: pH 2, 60 °C, y diferentes tiempos de hidrólisis.

antigénicas fueron directamente proporcionales al tamaño molecular de los OS-C. Los obtenidos a pH 1-2 y 80 °C en los diferentes tiempos, mostraron los menores porcentajes de inhibición comparados con los obtenidos bajo otras condiciones.

En la Figura 2, se observa la inhibición de los OS-C obtenidos del segundo experimento bajo condiciones de pH más suaves que provocan la obtención de moléculas antigénicamente más parecidos al PS-C que las del primer experimento.

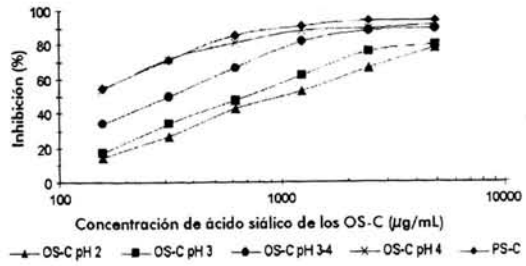

Figura 2. Inhibición de la IgG humana anti PS-C por OS-C obtenidos del segundo experimento de hidrólisis ácida (60 °C, 20 min y diferentes pH).

Las propiedades antigénicas de las moléculas obtenidas a pH 4, fueron muy similares a las del PS-C y la hidrólisis bajo estas condiciones se evidenció por el aumento de la Kd con respecto a la del PS-C de partida.

Algunos autores señalan que las propiedades inhibitorias de los OS-C dependen de la presencia de al menos dos residuos de ácido siálico unidos (dímero); el monómero no presenta propiedades inhibitorias; las mismas se incrementan en el trímero y rápidamente se hacen máximas cuando se emplean el pentámero y el hexámero como inhibidores. Estas dimensiones se corresponden con las mínimas requeridas para las uniones antígeno-Ac [9].

Numerosos autores analizan los determinantes antigénicos de los PS por la técnica de inhibición de la precipitación por haptenos, donde se inhibe la precipitación del PS original con sus Ac por los OS [14-16]. Esta técnica, al igual que el ELISA de inhibición, permite medir la capacidad inhibitoria de haptenos relacionados para comparaciones entre sí y con el antígeno inmunizante; sin embargo, resulta más compleja en su ejecución que el ELISA. Además, consume mayores cantidades de antisuero y antígenos por ensayo, y se limita sólo al análisis antigénico de moléculas de bajo peso molecular que no precipitan con la unión a los Ac.

Podemos concluir que la hidrólisis ácida desarrollada permite obtener OS capsulares antigénicamente similares al PS-C de partida, luego de controlar fundamentalmente la temperatura y el pH de la reacción.

Recibido en noviembre de 1997. Aprobado en junio de 1998.