

Procedimiento de conjugación del polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 6B a toxoide tetánico

✉ Jean P Soubal¹, Luis Peña¹, Darielys Santana¹, Yury Valdés¹, Dagmar García², Jessy Pedroso³, Félix Cardoso³, Humberto González⁴, Violeta Fernández^{5†}, Vicente Vérez⁶

¹ Departamentos de Glicoconjugación, ² Inmunología y ³ Análisis
Centro de Química Biomolecular, CQB

Ave. 21 y Calle 200, Reparto Atabey, Apdo. 16042, Municipio Playa, CP 11600, La Habana, Cuba

⁴ Departamento de Desarrollo y Escalado, Instituto Finlay

Calle 27, No. 19805, La Lisa, AP 16017, CP 11600, La Habana, Cuba

⁵ Dirección de Investigaciones y ⁶ Dirección General, Centro de Química Biomolecular, CQB

✉ jean.pierre@cqb.cu

RESUMEN

Anualmente *Streptococcus pneumoniae* provoca 826 mil muertes de niños menores de cinco años. El estudio del serotipo 6B, uno de los de mayor incidencia, es uno de los objetivos del proyecto de investigación-desarrollo para obtener una vacuna conjugada en Cuba. La estrategia de conjugación del polisacárido capsular del serotipo 6B (PS6B) fue fragmentarlo mediante hidrólisis ácida, activarlo mediante oxidación con peryodato y conjugarlo a toxoide tetánico (TT) mediante aminación-reductiva. Existe poca información sobre cómo estas modificaciones afectan las características físico-químicas y antigénicas del polisacárido, en particular para PS6B, a pesar de ser el menos inmunogénico de los polisacáridos de *S. pneumoniae*. En tal sentido, se estableció un procedimiento para obtener conjugados inmunogénicos de PS6B a TT. Se crearon condiciones de reacción para obtener el polisacárido en tres rangos de tallas y niveles de oxidación. Se determinó que la fragmentación del polisacárido por debajo de 10 kDa y la oxidación de más del 24 % de las unidades repetitivas implican pérdida de antigenicidad. La talla del polisacárido tuvo impacto en las características físico-químicas de los conjugados en las condiciones evaluadas; no así el nivel de oxidación. A diferencia del polisacárido nativo, conjugados de PS6B de 10 a 30 kDa y 30 a 100 kDa fueron inmunogénicos en conejos, con evidencias de respuesta timo-dependiente. Los procedimientos que incluyen la obtención del PS6B de 10 a 30 kDa y 30 a 100 kDa con niveles de oxidación entre 8 y 18 % de las unidades repetitivas oxidadas, permitieron obtener conjugados a TT reproducibles e inmunogénicos.

Palabras clave: polisacárido, conjugado, *Streptococcus pneumoniae*, serotipo 6B

Biotechnología Aplicada 2013;30:199-207

ABSTRACT

Procedure for the conjugation of the *Streptococcus pneumoniae* serotype 6B capsular polysaccharide to the tetanus toxoid. *Streptococcus pneumoniae* causes annually 826 000 deaths in children under five years. The serotype 6B, one of higher incidence, is targeted by the Cuban research and development project to develop a conjugate vaccine. There is limited data on how modifications caused by conjugation affect the physicochemical and antigenic characteristics of polysaccharides, particularly for serotype 6B capsular polysaccharide (PS6B), despite being the least immunogenic among *S. pneumoniae* polysaccharides. In this work, a conjugation procedure was established for PS6B comprising: fragmentation by acid hydrolysis, activation by periodate oxidation, and conjugation to tetanus toxoid (TT) by reductive amination to increase its immunogenicity. Reaction conditions were set to obtain the polysaccharide in three molecular size ranges (1-10, 10-30, 30-100 kDa) and levels of oxidation. PS6B fragmentation below 10 kDa and oxidation above 24 % of the repetitive units implied the loss of antigenicity. Polysaccharide length but not oxidation level had an impact on the physicochemical characteristics of the conjugates in the tested conditions. Unlike the native polysaccharide, conjugated 10-30 kDa and 30-100 kDa PS6B were immunogenic in rabbits, with evidence of thymus-dependent response. The procedure described supports obtaining PS6B-TT conjugates reproducibly in the 30-100 kDa and 10-30 kDa molecular size ranges and with 8-18 % oxidized repeat units, which are immunogenic.

Keywords: polysaccharide, conjugate, *Streptococcus pneumoniae*, 6B serotype

Introducción

Anualmente, el *Streptococcus pneumoniae* (neumococo) provoca 14.5 millones de episodios de neumonías, bacteriemias y meningitis a escala mundial, con 826 mil muertes de niños menores de cinco años [1]. Desde hace tres décadas se dispone de vacunas contra esta bacteria, constituidas por los polisacáridos capsulares (PS) de la envoltura de hasta 23 de los serotipos circulantes. Estas vacunas no son inmunogénicas

en niños pequeños, la población más susceptible. Esto se debe a que el sistema inmune de los infantes menores de dos años de edad es incapaz de generar una respuesta inmune adecuada contra antígenos tipo T-independientes, como los polisacáridos bacterianos [2]. Este problema se ha resuelto mediante el desarrollo de vacunas conjugadas, capaces de inducir una respuesta T-dependiente contra el PS [3]. La

1. O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, Henkle E, Deloria-Knoll M, McCall N, et al. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet*. 2009; 374(9693):893-902.

2. González-Fernández A, Faro J, Fernández C. Immune responses to polysaccharides: Lessons from humans and mice. *Vaccine*. 2008;26:292-300.

primera de estas fue licenciada en el 2000 (Prevenar®, contra siete serotipos), y más recientemente otras dos (Synflorix® y Prevenar13®, contra 10 y 13 serotipos, respectivamente), que se comercializan a elevados precios. En Cuba se trabaja en un proyecto de investigación-desarrollo para obtener una vacuna conjugada, que en una primera etapa abarca siete serotipos: 1, 5, 6B, 14, 18C, 19F y 23F.

El serotipo 6B es uno de los dos más frecuentes en enfermedades invasivas en niños menores de cinco años, en países desarrollados y en desarrollo [4], como Cuba y su área geográfica [5]. También es uno de los que más comúnmente causa otitis media a escala mundial [6]. La formulación de las tres vacunas comerciales su polisacárido capsular, componente de la mayoría de los candidatos vacunales ensayados clínicamente. La mayoría de los estudios describen que el conjugado de este serotipo es el menos inmunogénico [7, 8]. La unidad repetitiva (UR) del polisacárido capsular del serotipo 6B (PS6B) consiste en $\rightarrow 2$ - α -D-Galp-(1-3)- α -D-Glup-(1-3)- α -L-Ramp-(1-4)-D-RibOH-(5-PO₄) $\rightarrow$ [9]. Esta estructura polimérica es lineal, con enlaces fosfodiéster que le confieren una carga negativa periódica. Su baja inmunogenicidad se debe a la simplicidad de su estructura y a su similitud con el ADN [10].

La estrategia de conjugación propuesta en nuestro proyecto comprende la fragmentación del PS mediante hidrólisis ácida; activarlo mediante oxidación con peryodato; y conjugarlo a toxoide tetánico (TT) mediante aminación-reductiva. Aunque este método de conjugación es utilizado con frecuencia, son pocos los estudios sobre cómo estas modificaciones afectan las características físico-químicas y antigénicas de los PS. Específicamente para el PS6B, no se ha estudiado antes, a pesar de la baja inmunogenicidad de este PS. Las modificaciones de los PS durante el proceso de conjugación pueden llevar a la afectación de los epitopos naturales y a la aparición de estructuras neoantigénicas que afecten la especificidad de la respuesta inmunitaria [11]. El presente estudio tuvo como objetivo establecer un procedimiento de conjugación del PS6B a toxoide tetánico. Para ello fue preciso establecer condiciones de reacción reproducibles en cada etapa y determinar la talla y el nivel de activación del PS más adecuados, para la conservación de sus epitopos y de la eficiencia de obtención de conjugados inmunogénicos.

Materiales y métodos

Se usaron los PS de los serotipos 6B (lote 806), 18C (lote 801) y 19F (lote 802), y la proteína TT (lote 6017), producidos por el Departamento de Desarrollo y Escalado, y la Planta de Producción II, respectivamente, del Instituto Carlos J Finlay, de La Habana, Cuba.

Estudio de la fragmentación del PS6B nativo

A una disolución de 50 mg de PS6B se adicionó una disolución de ácido acético (Merck) o ácido trifluoracético (TFA; Merck, Alemania) para una concentración final de 0.25 M o 0.1 M, respectivamente. La disolución se incubó a 70 °C y se tomaron alícuotas a diferentes tiempos (Tabla 1). Las alícuotas se neutralizaron y se separaron por talla molecular, en un equipo de ultrafiltración (Amicon, Millipore Corp., Bedford, MA), con agua destilada, utilizando membranas de

Tabla 1. Estudio de condiciones de hidrólisis del PS capsular

Condiciones		1-10 kDa	Rendimiento (%)	
Ácido	t (min)		10-30 kDa	30-100 kDa
AcOH 0.25 M	90	nd	0	65.1
	120	nd	3.2	82.9†
	180	0	38.3	60.8
TFA 0.1 M	30	nd	46.2	55.9
	60	2.0	86.3†	10.6
	90	37.9	59.7	0
	120	71.2†	30.1	nd

† condiciones seleccionadas.

AcOH: ácido acético.

TFA: ácido trifluoracético.

nd: no determinado.

celulosa regenerada (Millipore, EE.UU.) con valores de corte de talla molecular 100, 30, 10 y 1 kDa, consecutivamente. Cada fracción se denominó por los valores de corte de las membranas entre las que quedó comprendida. A cada una se le determinó el contenido de carbohidratos. Se reprodujo la condición en que se obtuvo mayor rendimiento con cada fracción, y los productos obtenidos se analizaron en cuanto al contenido de carbohidratos, por resonancia magnética nuclear protónica monodimensional (RMN-¹H), por cromatografía líquida de alta resolución de exclusión por tamaño (SE-HPLC) y la antigenicidad. El rendimiento (R) se determinó según la fórmula siguiente:

$$R = \frac{\text{masa final de carbohidratos}}{\text{masa inicial de carbohidratos}} \times 100$$

Estudio de la activación de los PS6B fragmentados

A una disolución de 20 mg de PS6B fragmentado (fracción 10-30 kDa o 30-100 kDa) se adicionó una disolución de peryodato de sodio (NaIO₄; Riedel-de Haen) para concentraciones de 2.5, 5 o 10 mM en PBS, pH 7.0, y se incubó durante 3 h en la oscuridad. La reacción se detuvo por adición de 5 µL de glicerol (Plusone). La mezcla de reacción se diafiltró contra 5 volúmenes de agua destilada, utilizando una membrana con el valor de corte de 10 kDa para la fracción 10-30 kDa o 30 kDa para 30-100 kDa. Los productos obtenidos se analizaron en cuanto a contenido de carbohidratos, contenido de grupos aldehídos, por RMN-¹H, SE-HPLC y antigenicidad. El nivel de activación se expresó como porcentaje de unidades repetitivas oxidadas (URO) se determinó mediante la fórmula siguiente:

$$URO = \frac{\text{moles de grupos de aldehído}}{\text{moles de UR}} \times 100$$

donde:

UR: unidades repetitivas

El rendimiento se determinó igual que en el estudio de fragmentación.

Conjugación de los PS6B activados

Se emplearon polisacáridos de las fracciones 10-30 kDa y 30-100 kDa, con porcentajes de URO de 8-12 % y 13-18 %. A 20 mg de PS se le adicionó 1 mL de disolución de TT a 10 mg/mL. Se añadieron 4 mg de cianoborohidruro de sodio (Merck, Alemania) y se incubó aproximadamente durante 18 h a temperatura ambiente. A continuación se adicionaron 2 mg de

3. Lucas AH, Rittenhouse-Olson K, Kronenberg M, Apicella MA, Wang D, Schreiber JR, et al. Carbohydrate moieties as vaccine candidates: Meeting summary. *Vaccine*. 2010;28(4):1121-31.

4. Overturf GD. American Academy of Pediatrics. Committee on Infectious Diseases. Technical report: prevention of pneumococcal infections, including the use of pneumococcal conjugate and polysaccharide vaccines and antibiotic prophylaxis. *Pediatrics*. 2000;106(2 Pt 1):367-76.

5. Organización Panamericana de la Salud. Informe Regional de SIREVA II: datos por país y por grupos de edad sobre las características de los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis* en procesos invasores, 2000-2005. Documentos Técnicos. Tecnologías Esenciales de Salud. THS/EV-2007/002.

6. Rodgers GL, Arguedas A, Cohen R, Dagan R. Global serotype distribution among *Streptococcus pneumoniae* isolates causing otitis media in children: Potential implications for pneumococcal conjugate vaccines. *Vaccine*. 2009;27:3802-10.

7. Oosterhuis-Kafeja F, Beutels P, Van Damme P. Immunogenicity, efficacy, safety and effectiveness of pneumococcal conjugate vaccines (1998-2006). *Vaccine*. 2007;25(12):2194-212.

8. Rückinger S, Dagan R, Albers L, Schönberger K, von Kries R. Immunogenicity of pneumococcal conjugate vaccines in infants after two or three primary vaccinations: a systematic review and meta-analysis. *Vaccine*. 2011;29(52):9600-6.

9. Kenne L, Lindberg B, Madden J. Structural studies of the capsular antigen from *Streptococcus pneumoniae* Type 26. *Carbohydr Res*. 1979;73:175-82.

10. Sun Y, Park MK, Diamond B, Solomon A, Nahm MH. Repertoire of human antibodies against the polysaccharide capsule of *Streptococcus pneumoniae* serotype 6B. *Infect Immun*. 1999;67:1172-9.

11. Peeters CC, Lagerman PR, de Weers O, Oomen LA, Hoogerhout P, Beurret M, et al. Preparation of polysaccharide-conjugate vaccines. *Methods Mol Med*. 2003;87:153-74.

borohidruro de sodio (Merck, Alemania) y se incubó por 2 h adicionales para eliminar los grupos aldehídos remanentes. La mezcla de reacción se diafiltró con 10 volúmenes de agua destilada utilizando una membrana con valor de corte de 100 kDa. Los productos obtenidos se analizaron atendiendo a contenido de carbohidratos, contenido de proteínas, RMN-¹H, SE-HPLC y antigenicidad.

Métodos analíticos

El contenido de carbohidratos se determinó mediante orcinol-sulfúrico [12] empleando una curva de patrón de glucosa. El contenido de grupos carbonilos se determinó mediante el método de Park-Johnson modificado [13], empleando una curva patrón de glucosa. El contenido de proteínas en los conjugados se determinó mediante el método de Lowry [14], empleando una curva patrón de albúmina sérica bovina (BSA).

La estructura de la UR se siguió por RMN-¹H. Las muestras se prepararon en D₂O. Los espectros se adquirieron a 25 °C en un equipo de 250 MHz (Bruker AC-250F). La asignación inicial de las señales se realizó a partir del trabajo de van Dam et al. [15].

Los análisis cromatográficos se efectuaron por SE-HPLC (Knauer Smartline, Alemania) en una columna TSK 5000PW (TOSOH) con detección de índice de refracción. La constante de distribución (K_D) se calculó como:

$$K_D = \frac{(T_r - T_0)}{(T_t - T_0)} \times 100$$

donde:

T_r : tiempo de retención de la muestra;

T_0 : tiempo de retención de un patrón de dextrana de 2000 kDa (Blue Dextran, Sigma);

T_t : tiempo de retención de NaN_3 .

El peso molecular relativo (PMr) se determinó mediante una curva de calibración de patrones de dextrana (American Polymer Standard Corp.). El ancho del pico a la mitad de la altura de la curva ($W_{0.5}$) se determinó mediante el programa ClarityChrom 2.4.4.80 (Knauer, Alemania).

El contenido de proteína no enlazada se estimó en el mismo sistema de SE-HPLC, en una columna Supersora 12 (Farmacia, EE.UU.) con detección ultravioleta. El área bajo la curva de los picos correspondiente se integró con el programa ClarityChrom 2.4.4.80.

Determinación de la antigenicidad

La antigenicidad de los derivados de polisacárido se determinó mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA) de inhibición. Se empleó una dilución 1/3200 de suero estándar contra SP6B (factor 6c, Statem Serum Institute, Copenhague, Dinamarca), que se incubó toda la noche a 4 °C con cada inhibidor, en concentraciones desde 0.005 µg/mL hasta 500 µg/mL. Como inhibidores se emplearon los polisacáridos fragmentados, activados o conjugados según el caso. Además se incluyeron PS de los serotipos 18C y 19F como controles negativos (polisacáridos no relacionados). Para desarrollar el ELISA, las placas de microtitulación de 96 pocillos de poliestireno (Maxisorp, Nunc, Denmark) se recubrieron con PS6B a una concentración de 10 µg/mL en disolución tampón fosfato salino (PBS), a pH 7.2, y se incubaron durante toda la noche

a 37 °C. Posteriormente se bloqueó con BSA al 1 % en PBS durante 30 min. a 37 °C. Transcurrido ese tiempo, se aplicó el suero estándar contra SP6B preincubado con los diferentes inhibidores. Luego se aplicó el anticuerpo antiinmunoglobulina G de conejo conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP; Sigma, Alemania) en una dilución 1:10 000 (en PBS, Tween20 0.3 %, EDTA 0.01 M, BSA 1 %) y se incubó nuevamente durante 90 min. a temperatura ambiente. Después de cada paso se lavó tres veces con solución de lavado (PBS, Tween20 0.05 %). Finalmente se adicionó una solución de sustrato de la HRP (ortofenilendiamina 0.5 mg/mL y H₂O₂ al 0.1 % (v/v)) en solución tampón citrato, pH 5.6, y se desarrolló la reacción durante 20 min. en la oscuridad. La reacción se detuvo con una solución de HCl 3 M. Se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 492 nm. El porcentaje de inhibición (PI) se calculó según la fórmula:

$$PI = 100 - \left(\frac{\text{absorbancia del suero con inhibidor}}{\text{absorbancia del suero sin inhibir}} \times 100 \right)$$

Inmunización en conejos

Se inmunizaron dos conjugados obtenidos a partir de PS activados con un porcentaje de URO entre 13 y 18 %, de las fracciones 10-30 kDa (Cj10-30) y 30-100 kDa (Cj30-100). Por vía subcutánea se inmunizaron tres grupos de cinco conejos blancos Nueva Zelanda (Cenpalab, La Habana, Cuba) cada grupo, con 4 µg de PS conjugado, 25 µg de PS sin conjugado o placebo, mezclados con fosfato de aluminio. Se administraron tres dosis de cada inmunógeno en los días 0 (inicio del estudio), 14 y 28. A todos los animales se les practicaron extracciones de sangre en los días 7, 21 y 35. Los sueros obtenidos se conservaron a -20 °C hasta su utilización. Este estudio se rigió por las normas y guías éticas internacionales para la investigación científica experimental con animales de laboratorio. El Comité de Ética y el Departamento de Calidad del Centro de Química Biomolecular (CQB) aprobó todos los protocolos experimentales.

Evaluación de la respuesta inmune inducida por los conjugados

La respuesta de anticuerpos IgG contra el polisacárido se determinó mediante ELISA indirecto, usando PS6B nativo como recubrimiento [16]. El título de anticuerpos se calculó mediante un análisis de regresión entre los valores de densidad óptica (D.O.) y el logaritmo decimal del inverso de la dilución del suero. Como título de anticuerpos se consideró el inverso de la dilución del suero a la que le corresponde un valor de absorbancia igual al doble del valor del suero preinmune en una dilución 1/100. Los títulos de más de 50 se consideraron positivos.

La respuesta de anticuerpos IgG contra la proteína portadora se determinó tal como se describió, para determinar la respuesta contra el polisacárido. A diferencia de este, las placas se recubrieron con 1 µg/mL de TT en PBS 7.2.

La avidéz de los anticuerpos IgG contra PS6B se determinó mediante un ELISA similar al utilizado para evaluar la respuesta contra el polisacárido. A diferencia de este, después del paso de incubación de los sueros, se añadió la incubación con tiocianato de

12. Brückner J. Estimation of monosaccharides by the orcinol-sulphuric acid reaction. *Biochem J.* 1955;60(2):200-5.

13. Porro M, Viti S, Antoni G, Neri P. Modifications of the Park-Johnson Ferricyanide submicromethod for the assay of reducing groups in carbohydrates. *Anal Biochem.* 1981;118:301-6.

14. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193:265-75.

15. van Dam JE, Breg J, Komen R, Kamerling JP, Vliegenthart JF. Isolation and structural studies of phosphate-containing oligosaccharides from alkaline and acid hydrolysates of *Streptococcus pneumoniae* type 6B capsular polysaccharide. *Carbohydr Res.* 1989;187(2):267-86.

amonio (NH_4SCN , Merck) 0.5 M durante 15 min., en la mitad de las réplicas. De esta manera se obtuvieron dos curvas de dilución de cada muestra: con NH_4SCN y sin NH_4SCN . El índice de avidéz (IA) se calculó según la expresión [17]:

$$\text{IA} = 100 \times \frac{\text{título cuando se empleó } \text{NH}_4\text{SCN}}{\text{título cuando no se empleó } \text{NH}_4\text{SCN}}$$

Se consideró como título la dilución del suero que dio un valor de absorbancia igual a la mitad del valor del suero diluido 1/100 cuando no se empleó NH_4SCN .

Análisis estadístico

Los resultados de las evaluaciones físico-químicas se expresaron como la media aritmética $\pm$ desviación estándar de cinco experimentos independientes (tres en el caso de los conjugados); para los rendimientos en la fragmentación y los niveles de oxidación del PS además se calculó el coeficiente de variación (CV). Los resultados de las evaluaciones inmunológicas se expresaron como la media aritmética $\pm$ desviación estándar para cinco animales. Las diferencias significativas entre los grupos se determinaron por el método no paramétrico Kruskal-Wallis y cuando se obtuvieron diferencias intragrupalas, se utilizó la prueba de Dunn *a posteriori*. Las comparaciones de medias contra valores de referencias se realizaron mediante el Test de Wilcoxon. Valores probabilísticos (p) inferiores a 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos. Todos los análisis se hicieron en el programa Graph Pad Prism 4.03.

Resultados

Estudio de fragmentación del PS6B capsular

El PS se fragmentó mediante hidrólisis ácida. El estudio se efectuó con disoluciones de dos ácidos, evaluando varios tiempos. Las condiciones en las que se obtuvieron los mayores rendimientos del PS fueron: 2 h en ácido acético 0.25 M para la fracción 30-100 kDa, 1 h en TFA 0.1 M para la fracción 10-30 kDa, y 2 h en TFA 0.1 M para la fracción 1-10 kDa (Tabla 1). Estas condiciones se reprodujeron con rendimientos mayores al 50 % (Tabla 2). En los tres procesos los CV fueron menores al 6 %.

Los espectros de RMN- ^1H registrados a partir de los PS fragmentados fueron muy similares al correspondiente del PS nativo, lo que indica que se conservó la estructura de la UR. Las señales de baja intensidad a 3.22 ppm y alrededor de 2.1 ppm en el espectro del PS nativo corresponde con el polisacárido C [18]. Este contaminante, común de los PS de neumococo, se encontró en cantidades muy bajas en el producto de partida y disminuyó aún más después de la fragmentación. No se observaron señales de monosacáridos terminales productos de la reducción de la talla, ni siquiera en el PS de la fracción 1-10 kDa (Figura 1).

La K_D aumentó congruentemente con la disminución de la talla. Los $W_{0.5}$ de los PS fragmentados fueron menores que el del PS nativo, lo que indicó una disminución en la polidispersión. Los PMr obtenidos para cada fracción fueron mayores que los valores de corte de las membranas de ultrafiltración plana empleadas (Tabla 2).

Tabla 2. Evaluación mediante SE-HPLC (TSK 5000PW) de los PS fragmentados en las condiciones seleccionadas[†]

Fracción	Rendimiento (%)	K_D	$W_{0.5}$ (min)	PMr (kDa)
30-100 kDa	84.0 $\pm$ 3.8	0.44 $\pm$ 0.02	1.47 $\pm$ 0.06*	134 $\pm$ 6
10-30 kDa	83.2 $\pm$ 3.0	0.57 $\pm$ 0.02	1.27 $\pm$ 0.11*	55 $\pm$ 8
1-10 kDa	69.2 $\pm$ 3.7	0.67 $\pm$ 0.02	1.04 $\pm$ 0.10*	20 $\pm$ 3
PsN	-	0.2	1.70	643

[†] Resultados reportados como promedio $\pm$ desviación estándar (n = 5).

* p vs. 1.70 (0.031).

K_D : constante de distribución.

$W_{0.5}$: ancho del pico a la mitad de la altura.

PMr: peso molecular relativo.

PsN: polisacárido nativo.

La antigenicidad de los fragmentos generados se evaluó mediante un ELISA de inhibición, empleando suero policlonal específico contra el PS6B. Solo los PS fragmentados de las fracciones 30-100 kDa y 10-30 kDa mostraron propiedades para inhibir el suero de forma similar al PS nativo. Las concentraciones para alcanzar el 50 % de inhibición estuvieron en el mismo orden de magnitud que para el PS natural; en cambio, para el PS de la fracción 1-10 kDa estuvo dos órdenes por encima (Figura 2A). Se continuó el trabajo solo con las fracciones 30-100 kDa y 10-30 kDa.

Estudio de la activación de los PS6B fragmentados

Los PS fragmentados se activaron por oxidación con peryodato. Se efectuó un estudio de esta reacción en las fracciones 10-30 kDa y 30-100 kDa, variando las relaciones de NaIO_4/PS (Tabla 3). Se obtuvo una relación lineal entre la cantidad de equivalentes de NaIO_4 y la cantidad de grupos aldehídos generados ($R^2 = 1.0$ en la fracción 10-30 kDa y $R^2 = 0.99$ en 30-100 kDa). Los CV de las URO obtenidas en las diferentes condiciones estuvieron entre 11 y 20 %. No hubo diferencias entre los resultados con las dos fracciones de trabajo. Se recuperó más del 85 % del PS inicial en todos los experimentos, lo cual es indicativo de que

16. Chang J, Serrano Y, Garrido R, Rodríguez LM, Pedrosa J, Cardoso F, et al. Relevance of O-acetyl and phosphoglycerol groups for the antigenicity of *Streptococcus pneumoniae* serotype 18C capsular polysaccharide. *Vaccine*. 2012; 30(49):7090-6.

17. Anttila M, Eskola J, Ahman H, Käyhty H. Avidity of IgG for *Streptococcus pneumoniae* type 6B and 23F polysaccharides in infants primed with pneumococcal conjugates and boosted with polysaccharide or conjugate vaccines. *J Infect Dis*. 1998; 177(6):1614-21.

18. Abeygunawardana C, Williams TC, Summer JS, Hennessey JP. Development and validation of an NMR-based identity assay for bacterial polysaccharides. *Anal Biochem*. 2000;279:226-40.

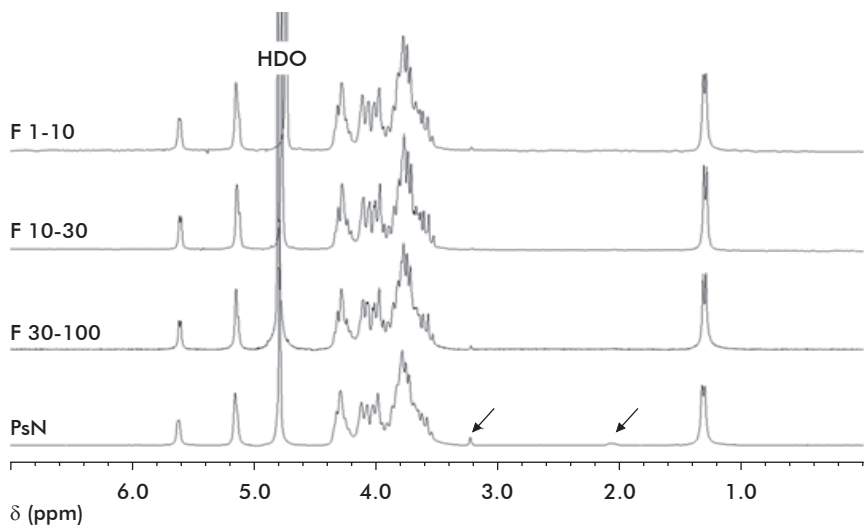
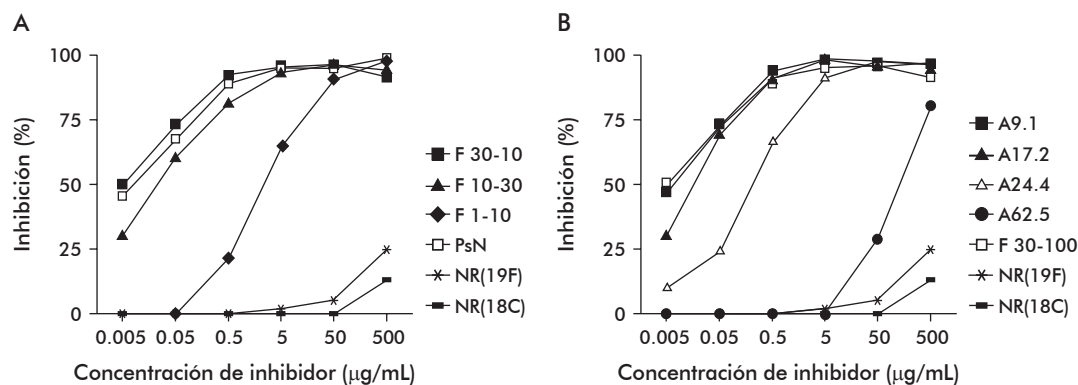


Figura 1. Evaluación de la conservación de la estructura de la unidad repetitiva de polisacáridos capsulares fragmentados de *Streptococcus pneumoniae*, serotipo 6B. Las flechas indican las señales correspondientes al polisacárido C contaminante. F1-10, F10-30 y F30-100: PS fragmentados en las fracciones de trabajo 30-100 kDa, 10-30 kDa y 1-10 kDa, respectivamente. H2O: agua semipesada. PsN: PS nativo.



las condiciones de reacción de oxidación no generan fragmentación.

En los espectros de RMN-¹H de los PS activados se observó que los corrimientos químicos y las intensidades relativas de las señales características se conservaron con respecto al registrado a partir de fragmentados sin activar (Figura 3A). No se observaron señales a campos bajos atribuibles al protón carbonílico. En cambio, aparecieron dos nuevas señales a 5.10 y 5.09 ppm a continuación de la correspondiente a los protones anoméricos de la ramnosa y la glucosa que se superponen en 5.15 ppm. Las intensidades relativas de estas fueron mayores en los PS con mayor nivel de oxidación (Figura 3B). Estas son congruentes con la señal del anomérico de la ramnosa producto del acortamiento del ribitol en las unidades repetitivas oxidadas.

Los valores de K_D fueron iguales a la de los PS sin activar de las mismas fracciones (Tabla 2 y 3). Estos resultados confirmaron que ninguna de las condiciones de oxidación empleadas parece generar fragmentación del PS.

En la evaluación de la antigenicidad, los PS con un nivel de activación hasta 17.2 % de URO mostraron un comportamiento muy similar al fragmentado de la misma talla. Para estos PS, la concentración necesaria para lograr el 50 % de inhibición del suero fue de 1 y 2 veces la del PS natural. En cambio, el PS activado con 24.4 % de URO tuvo una mayor caída de la capacidad inhibitoria en función de la concentración, y requirió una concentración 25 veces mayor que el PS natural para alcanzar el 50 % de inhibición. Un activado con 62.5 % de URO mostró una pérdida drástica de la capacidad inhibitoria (Figura 3B). Estos resultados indican que la antigenicidad se empieza a afectar en PS activados a partir de 24.4 % de URO.

Conjugación de los PS6B activados

Los PS activados de las fracciones de trabajo 10-30 kDa y 30-100 kDa con dos rangos de niveles de activación se conjugaron a TT. No se detectó proteína libre en los conjugados obtenidos. En la Figura 4A se muestran los cromatogramas típicos. Las diferencias en el nivel de activación de los PS no tuvieron

Tabla 3. Estudio de la reacción de oxidación con peryodato del PS en las fracciones 10-30 kDa y 30-100 kDa[†]

Fracción	mol NaIO ₄ / mol UR	URO (%)	Rendimiento (%)	K_D
10-30 kDa	0.18	9.9 ± 1.6	92.7 ± 4.5	0.57 ± 0.05
	0.35	15.7 ± 2.1	92.6 ± 6.1	0.56 ± 0.05
	0.71	27.6 ± 6.4	95.4 ± 3.2	0.56 ± 0.05
30-100 kDa	0.18	9.0 ± 1.0	92.5 ± 4.0	0.43 ± 0.02
	0.35	15.1 ± 2.5	95.8 ± 4.2	0.43 ± 0.02
	0.71	27.9 ± 5.4	93.7 ± 4.9	0.44 ± 0.02

[†] Resultados reportados como promedio ± desviación estándar (n = 5)

UR: unidades repetitivas.

URO: unidades repetitivas oxidadas.

K_D : constante de distribución.

influencia en las características evaluadas. En cambio, los conjugados obtenidos a partir de PS de la fracción 10-30 kDa tuvieron mayor K_D y menor relación PS/proteína que a partir de los de la fracción 30-100 kDa (Tabla 4).

Los espectros de RMN-¹H de los PS conjugados mantuvieron las señales con sus corrimientos

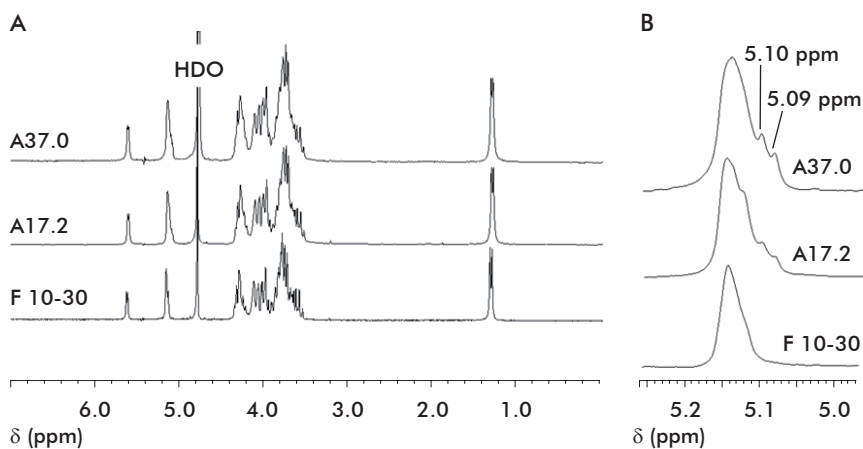


Tabla 4. Características químico-físicas de los conjugados obtenidos [†]

Fracción del PS	URO (%)	PS/Prot.	K _D
10-30 kDa	13-18	0.7 ± 0.3	0.42 ± 0.02
	8-12	0.8 ± 0.3	0.41 ± 0.04
30-100 kDa	13-18	1.7 ± 0.4	0.28 ± 0.02
	8-12	1.6 ± 0.4	0.31 ± 0.05

[†] Resultados reportados como promedio ± desviación estándar (n = 3). En ninguna de las fracciones se detectó proteína no enlazada.

URO: unidades repetitivas oxidadas.

PS/prot.: Relación carbohidrato/proteína (m/m).

K_D: constante de distribución.

químicos e intensidades relativas características. Se observaron nuevas señales de baja intensidad entre 1.0 y 0.8 ppm, correspondientes a los aminoácidos alifáticos de la proteína (Figura 4B). Por otra parte, la capacidad para inhibir el suero de referencia varió poco. La concentración necesaria para alcanzar el 50 % de inhibición se mantuvo en el mismo orden de magnitud con respecto al PS activado antes de conjuguar (Figura 4C). Estos resultados indicaron que la conjugación no afectó significativamente la estructura y la exposición de los PS.

Evaluación la respuesta inmune generada por los conjugados

En un esquema de tres inmunizaciones a intervalos de dos semanas, se utilizaron dos conjugados obtenidos

a partir de PS activados de las fracciones 10-30 kDa (Cj10-30) y 30-100 kDa (Cj30-100).

El PS sin conjuguar, administrado como control, no indujo títulos positivos de anticuerpos anti-PS6B durante el tiempo de evaluación. Después de tres dosis, la respuesta permaneció al nivel de la del placebo (Figura 5). En cambio, ambos conjugados generaron anticuerpos IgG contra el PS con logaritmos de títulos superiores a 2 después de la segunda dosis. En el día 21, para Cj30-100 se obtuvo un título de IgG superior al inducido por Cj10-30 ($p < 0.001$). Esta diferencia no fue significativa después de la tercera inmunización, al producirse un incremento de la respuesta inducida por el Cj10-30 ($p < 0.001$); pero no por Cj30-100 (Figura 5A).

Para evaluar la calidad de la respuesta, se determinó el IA de los anticuerpos contra el PS en los días 21 y 35. Después de la segunda dosis, los sueros del grupo inmunizado con Cj10-30 rebasaron el 50 % de IA, a diferencia de los sueros inducidos por el Cj30-100 que fueron menores ($p < 0.001$). Después de la tercera dosis los IA aumentaron ($p < 0.001$) a alrededor del 90 % en ambos grupos, y llegaron a un nivel similar al suero de referencia (Figura 5B).

Con respecto a la respuesta contra la proteína portadora, después de tres dosis no se observaron diferencias entre los grupos inmunizados con los dos conjugados ($p > 0.05$) (Figura 5C); a pesar de que la dosis de TT en el Cj10-30 fue 70 % mayor.

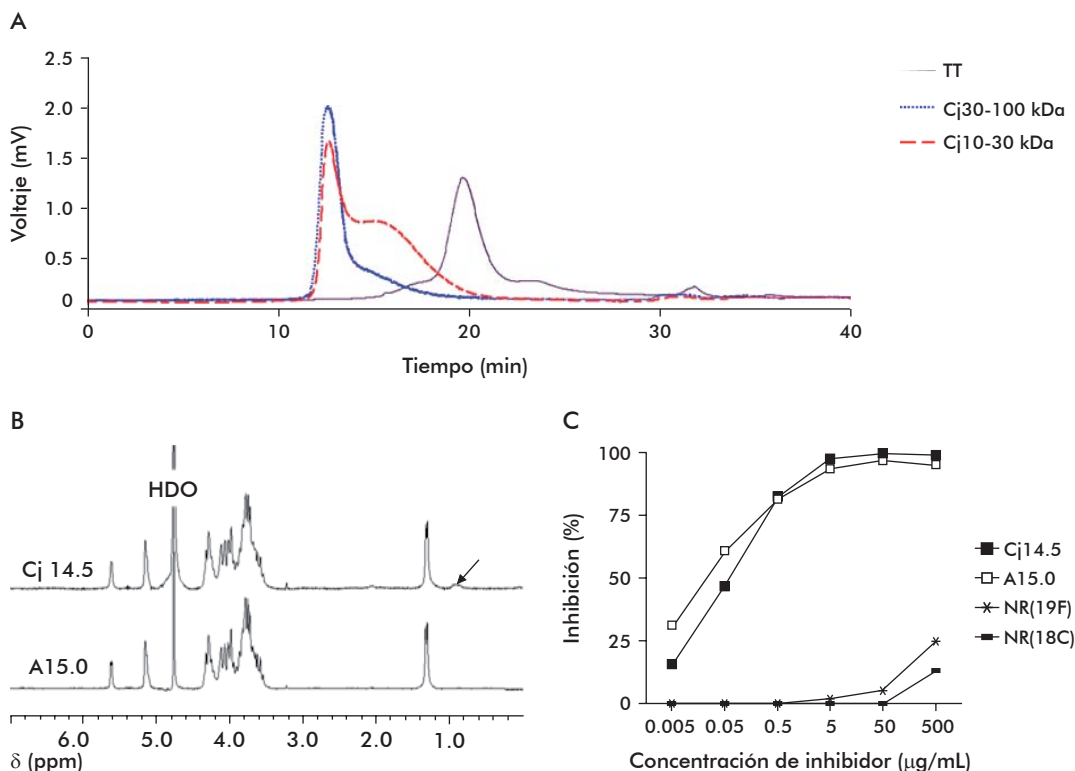


Figura 4. Caracterización físico-química e inmunoquímica de conjugados de polisacáridos capsulares (PS) de *Streptococcus pneumoniae*, serotipo 6B. A) Superposición de cromatogramas de conjugados y la proteína portadora toxoide tetánico (TT). B) Superposición de los espectros de RMN-¹H. Las señales correspondientes a los aminoácidos alifáticos de la proteína portadora, se señalan con una flecha. C) Gráfico de inhibición en función de la concentración de inhibidor. Cj30-100 kDa y Cj10-30 kDa: conjugados obtenidos a partir de PS de las fracciones 30-100 kDa y 10-30 kDa, respectivamente. Cj14.5: conjugado obtenido a partir de un PS con 14.5 % de unidades repetitivas oxidadas (URO). A15.0: PS activado con 15.0 % de URO. NR (19F) y NR (18C) son PS de serotipos no relacionados.

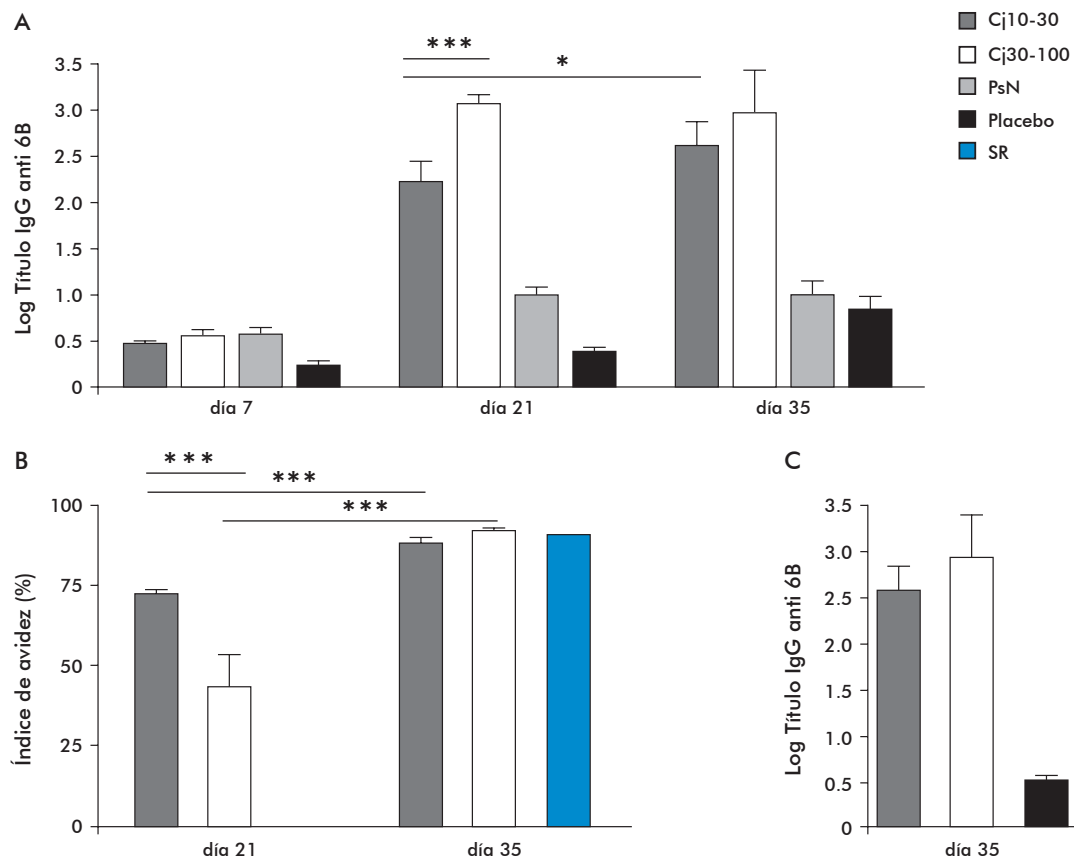


Figura 5. Evaluación inmunológica de conjugados de polisacáridos capsulares (PS) de *Streptococcus pneumoniae*, serotipo 6B. Grupos de 5 conejos inmunizados con 4 μ g de PS conjugado a TT, 10 μ g de PS sin conjugar o placebo en los días 0, 14 y 28. Las barras representan el promedio con la desviación estándar. A) Títulos de anticuerpos IgG anti-PS6B. B) Avidez de los anticuerpos IgG anti-PS6B. C) Títulos de anticuerpos IgG anti-TT después de la tercera dosis. Cj10-30 y Cj30-100 se conjugaron a partir de PS de las fracciones 10-30 kDa y 30-100 kDa, respectivamente; PsN PS nativo; SR: suero de referencia. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

Discusión

Los métodos de obtención de conjugados PS-proteína son muy diversos [19]; pero no todos se pueden emplear en el desarrollo de vacunas. Se seleccionó la oxidación con peryodato controlada del PS seguida por la aminación-reductiva de los grupos aldehídos generados, empleando los grupos aminos de la proteína. Este es un método sencillo, escalable y aplicable a los PS de los serotipos incluidos en el proyecto de vacuna cubano. Es el método empleado en las vacunas Prevenar® y Prevenar13® [20]. A diferencia de los procedimientos de las vacunas comerciales contra neumococos, se fragmentó el PS y se seleccionó el rango de talla deseado. De esta manera se puede lograr un proceso más eficiente y consistente, así como favorecer la calidad de la respuesta inmune generada por el conjugado [21]. A su vez, la diferencia en la distribución de PMr con el conjugado permitió eliminar al menos una parte del PS sin reaccionar, según indicó el cambio de la relación PS/proteína de los conjugados finales con respecto a la mezcla de reacción. Un porcentaje elevado de PS sin reaccionar en este serotipo podría afectar la inmunogenicidad del conjugado, de manera más pronunciada para PS de PMr mayores [22]. De entre los métodos de fragmentación de PS, se empleó la hidrólisis ácida, por las posibilidades para

su aplicación en la mayoría de los PS del candidato vacunal y por la factibilidad para ser escalada.

Para buscar las condiciones de reacción de cada etapa, se siguió una metodología de trabajo que tuvo en cuenta varios factores, en ocasiones contrapuestos. Entre estos, fueron importantes la conservación de los epitopos naturales del PS y potenciar el carácter de antígeno timo-dependiente una vez conjugado; llegar a tiempos de reacción que no ocuparan más de 3 h del día de trabajo, pero que permitieran una buena reproducibilidad y potencial robustez, con rendimientos de PS superiores al 50 %.

En el estudio de fragmentación se usaron dos ácidos, con diferentes fortalezas. El ácido acético permitió obtener el PS en la fracción 30-100 kDa y el TFA en las fracciones 10-30 kDa y 1-10 kDa. Los rendimientos fueron mayores que lo esperado y se consideró que la reproducibilidad fue adecuada. Para el trabajo con lotes de PS nativo con otras distribuciones PMr pueden ser necesario ajustes de estas condiciones.

Los fragmentos mantuvieron la estructura química de la UR en las tres fracciones, lo cual es de esperar si se considera que el PS6B no tiene cadenas laterales sensibles a ser hidrolizadas. Sin embargo, la antigenicidad permaneció invariable en los PS de las fracciones mayores, pero se afectó en los de la fracción

19. Kamerling J. Pneumococcal Polysaccharides: A Chemical View. In: *Streptococcus pneumoniae. Molecular biology & mechanisms of disease*. New York: Mary Ann Liebert, Inc.; 1999. p.81-112.

20. Hausdorff WP, Siber JR, Paradiso PR, inventors; Wyeth Lederley, Inc., assignee. Multivalent pneumococcal polysaccharide-protein conjugate composition. US patent US 0130137. 2009 may 21.

21. Bröker M, Dull PM, Rappuoli R, Costantino P. Chemistry of a new investigational quadrivalent meningococcal conjugate vaccine that is immunogenic at all ages. *Vaccine*. 2009;27:5574-80.

22. Rodríguez ME, van den Dobbelsteen GP, Oomen LA, de Weers O, van Buren L, Beurret M, et al. Immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae* type 6B and 14 polysaccharide-tetanus toxoid conjugates and the effect of uncoupled polysaccharide on the antigen-specific immune response. *Vaccine*. 1998;16(20):1941-9.

1-10 kDa. Esto evidenció la conservación de epitopos conformacionales importantes en el reconocimiento del PS nativo, que no están en el rango de talla inferior. Aunque no se encontraron publicaciones acerca de este fenómeno para el PS6B, se ha estudiado en otros PS, como el de *Streptococcus* B tipo III [23, 24], *Neisseria meningitidis* serogrupos Y y W₁₃₅ [25] y el *S. pneumoniae* serotipo 14 [26, 27]. Para este último PS también se observa que los epitopos conformacionales son importantes para que los conjugados generen anticuerpos funcionales [28].

En el estudio de la activación del PS6B, se establecieron condiciones reproducibles de oxidación del PS. Se encontró una relación lineal entre la cantidad equivalente de NaIO₄ y la cantidad de grupos aldehídos generados. Ello permitió generar un nivel de activación, en un rango estrecho, previamente seleccionado.

La reacción de oxidación con peryodato ocurre entre hidroxilos adyacentes, con ruptura del enlace entre los carbonos involucrados, que pasan a aldehídos. La UR del PS6B presenta tres de estos sitios: entre C1-C2 y C2-C3 del ribitol y C3-C4 de la galactosa. Según el orden de reactividad ofrecido por Kim *et al.* [29], la oxidación en este PS debe ocurrir por completo en el ribitol, por ser una cadena lineal. Apoyando esta afirmación, se conoce que para condiciones de oxidación con 0.87 mol de NaIO₄/mol de UR la oxidación del PS de *N. meningitidis* serogrupo W₁₃₅ ocurre en la cadena lineal del ácido siálico entre C7-C8 y C8-C9 y no por C2-C3 y C3-C4 de la galactosa [30].

En este trabajo, el análisis mediante RMN-¹H reveló señales congruentes con el protón anomérico de la ramnosa al blindarse, debido al acortamiento del residuo de ribitol adyacente. En cambio, no se encontró la señal del anomérico desblindado de la galactosa, si esta se oxidara. Ello implica que no se produjo apertura de ningún anillo de monosacárido, lo cual debe minimizar la perturbación de la conformación del PS. No obstante, se observó pérdida de antigenicidad a partir del 24 % de URO a pesar de que no se detectó fragmentación del PS. Esto indica que se necesitaron más de ¾ de los residuos ribitol intactos para un reconocimiento antigénico adecuado. A partir de estos resultados se descartó el empleo de las condiciones de oxidación con 0.71 moles de NaIO₄/mol de UR.

Los conjugados obtenidos a partir de PS con 8-12 % y 13-18 % de URO, activados con 0.18 y 0.35 moles de NaIO₄/mol de UR respectivamente, no tuvieron diferencias entre sí, en ninguno de los parámetros físico-químicos evaluados. Sin otra diferencia que el nivel de activación, no es de esperar diferencias en la inmunogenicidad de los conjugados a partir de PS de la misma talla. Se ha observado mayor inmunogenicidad en conjugados de PS de estreptococos del grupo B tipo III con mayores porcentajes de URO, producto de un mayor entrecruzamiento en el conjugado [31], pero el rango evaluado entre 18 y 89 % de URO fue mayor que el empleado por nuestro grupo. Además,

este resultado no fue reproducido posteriormente, al observarse un ligero descenso en la inmunogenicidad, debido a un mayor porcentaje de URO [32].

En cambio, la talla de los PS sí influyó en las características físico-químicas de los conjugados, al obtenerse PMr y relaciones PS/proteína mayores a partir de PS de la fracción 30-100 kDa. La caracterización de los conjugados obtenidos a partir de PS de una misma talla reveló una buena reproducibilidad.

La respuesta inmune inducida por los conjugados fue cuantitativa y cualitativamente superior a la obtenida con la inmunización del PS sin conjuguar. El aumento de los títulos y la avidez de los anticuerpos IgG después de cada dosis de conjugado indican una respuesta timo-dependiente, con maduración de la afinidad [33]. Una alta avidez se correlaciona con la capacidad protectora de los anticuerpos [34].

El Cj30-100 resultó más inmunogénico que el Cj10-30, aunque esta diferencia no fue significativa después de la tercera dosis. Este resultado coincide con lo obtenido por Daum *et al.* [35] en infantes inmunizados con vacunas conjugadas de polisacáridos o de oligosacáridos. Estas diferencias en las respuestas inmunes pueden estar influenciadas por el largo del PS, pero también por el tamaño del conjugado [36], la relación PS/proteína [37] o una combinación de estos factores. De hecho, distintos estudios con respecto a la influencia del largo de los PS en la inmunogenicidad de sus conjugados dan resultados diferentes [32, 38]. A su vez, la respuesta que generó el conjugado Cj10-30 parece haber tenido un mayor carácter timo-dependiente, en tanto el aumento de la avidez fue más rápido. El polisacárido en su estructura nativa es un antígeno timo-independiente tipo 2, y puede retener parte de sus características después de conjugado a una proteína [39]; mientras que los oligosacáridos de menor PMr conjugados pueden provocar un mejor reconocimiento del antígeno, de manera T-dependiente, maximizando el efecto de la proteína portadora [11]. No obstante, estas diferencias, después de tres dosis de ambos conjugados generaron títulos y avidez de anticuerpos IgG similares.

En resumen, los procedimientos descritos, que incluyeron la fragmentación del PS6B en intervalos de talla molecular de 10-30 kDa y 30-100 kDa, y la activación a niveles entre 8 y 18 % de las unidades repetitivas oxidadas, permitieron obtener de forma reproducible conjugados a TT que demostraron ser inmunogénicos. La metodología de trabajo seguida para encontrar y establecer las condiciones de cada reacción es extensible al establecimiento de procedimientos de conjugación de polisacáridos de otros serotipos de neumococo y otras bacterias.

Agradecimientos

Agradecemos a la Dr. Cs. Lila Castellanos Serra por la asistencia y consejos en la preparación del manuscrito.

23. Wessels MR, Muñoz A, Kasper DL. A model of high-affinity antibody binding to type III group B *Streptococcus* capsular polysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987;84(24):9170-4.

24. Zou W, Mackenzie R, Thérien L, Hirama T, Yang Q, Gidney MA, *et al.* Conformational

epitope of the type III group B *Streptococcus* capsular polysaccharide. *J Immunol*. 1999;163(2):820-5.

25. Moore SL, Uitz C, Ling CC, Bundle DR, Fusco PC, Michon F. Epitope specificities of the group Y and W-135 polysaccharides of

Neisseria meningitidis. *Clin Vaccine Immunol*. 2007;14(10):1311-7.

26. Wessels MR, Kasper DL. Antibody Recognition of the type 14 pneumococcal capsule: evidence of conformational epitope in a neutral polysaccharide. *J Exp Med*. 1989;169(6):2121-31.

27. Mawas F, Niggemann J, Jones C, Corbel MJ, Kamerling JP, Vliegenthart JF. Immunogenicity in a mouse model of a conjugate vaccine made with a synthetic single repeating unit of type 14 pneumococcal polysaccharide coupled to CRM197. *Infect Immun*. 2002; 70(9):5107-14.
28. Laferrière CA, Sood RK, de Muys JM, Michon F, Jennings HJ. *Streptococcus pneumoniae* type 14 polysaccharide-conjugate vaccines: length stabilization of opsonophagocytic conformational polysaccharide epitopes. *Infect Immun*. 1998;66(6):2441-6.
29. Kim JS, Laskowich ER, Michon F, Kaiser RE, Arumugham RG. Monitoring activation sites on polysaccharides by GC-MS. *Anal Biochem*. 2006;358(1):136-42.
30. Gudlavalleti SK, Lee CH, Norris SE, Paul-Satyaseela S, Vann WF, Frasch CE. Comparison of *Neisseria meningitidis* serogroup W135 polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccines made by periodate activation of O-acetylated, non-O-acetylated and chemically de-O-acetylated polysaccharide. *Vaccine*. 2007;25(46):7972-80.
31. Wessels MR, Paoletti LC, Guttormsen HK, Michon F, D'Ambra AJ, Kasper DL. Structural properties of group b streptococcal type III polysaccharide conjugate vaccines that influence immunogenicity and efficacy. *Infect Immun*. 1998;66(5):86-2192.
32. Michon F, Uitz C, Sarar A, D'Ambra AJ, Laude-Sharp M, Moore S, Fusco PC. Group B Streptococcal Type II and III Conjugate Vaccines. Physicochemical Properties that Influence Immunogenicity. *Clin Vaccine Immunol*. 2006;13(18):936-43.
33. Wuorimaa T, Dagan R, Väkeväinen M, Bailleux F, Haikala R, Yaich M, et al. Avidity and subclasses of IgG after immunization of infants with an 11-valent pneumococcal conjugate vaccine with or without aluminum adjuvant. *J Infect Dis*. 2001;184(9):1211-5.
34. Usinger WR, Lucas AH. Avidity as a determinant of the protective efficacy of human antibodies to pneumococcal capsular polysaccharides. *Infect Immun*. 1999;67:2366-70.
35. Daum RS, Hogerman D, Rennels MB, Bewley K, Malinoski F, Rothstein E, et al. Infant immunization with pneumococcal CRM197 vaccines: effect of saccharide size on immunogenicity and interactions with simultaneously administered vaccines. *J Infect Dis*. 1997; 176(2):445-55.
36. An SJ, Yeon YK, Kothari S, Kothari N, Kim JA, Lee E, et al. Physico-chemical properties of *Salmonella typhi* Vi polysaccharide-diphtheria toxoid conjugate vaccines affect immunogenicity. *Vaccine*. 2011;29(44):7618-23.
37. Dick WE Jr, Beurret M. Glycoconjugates of bacterial carbohydrate antigens. A survey and considerations of design and preparation factors. *Contrib Microbiol Immunol*. 1989; 10:48-114.
38. Laferrière CA, Sood RK, de Muys JM, Michon F, Jennings HJ. The synthesis of *Streptococcus pneumoniae* polysaccharide-tetanus toxoid conjugates and the effect of chain length on immunogenicity. *Vaccine*. 1997; 5(2):179-86.
39. Mäkelä O, Péterfy F, Outschoorn IG, Richter AW, Seppälä I. Immunogenic properties of alpha (1→6) dextran, its protein conjugates, and conjugates of its breakdown products in mice. *Scand J Immunol*. 1984;19(6):541-50.

Recibido en enero de 2013.

Aprobado en abril de 2013.

Procedure for the conjugation of the *Streptococcus pneumoniae* serotype 6B capsular polysaccharide to the tetanus toxoid

✉ Jean P Soubal¹, Luis Peña¹, Darielys Santana¹, Yury Valdés¹, Dagmar García², Jessy Pedroso³, Félix Cardoso³, Humberto González⁴, Violeta Fernández^{5†}, Vicente Vérez⁶

¹ Departamentos de Glicoconjugación, ² Inmunología y ³ Análisis
Centro de Química Biomolecular, CQB

Ave. 21 y Calle 200, Reparto Atabey, Apdo. 16042, Municipio Playa, CP 11600, La Habana, Cuba

⁴ Departamento de Desarrollo y Escalado, Instituto Finlay
Calle 27, No. 19805, La Lisa, AP 16017, CP 11600, La Habana, Cuba

⁵ Dirección de Investigaciones y ⁶ Dirección General, Centro de Química Biomolecular, CQB

✉ jean.pierre@cqb.cu

ABSTRACT

Streptococcus pneumoniae causes annually 826 000 deaths in children under five years. The serotype 6B, one of higher incidence, is targeted by the Cuban research and development project to develop a conjugate vaccine. There is limited data on how modifications caused by conjugation affect the physicochemical and antigenic characteristics of polysaccharides, particularly for serotype 6B capsular polysaccharide (PS6B), despite being the least immunogenic among *S. pneumoniae* polysaccharides. In this work, a conjugation procedure was established for PS6B comprising: fragmentation by acid hydrolysis, activation by periodate oxidation, and conjugation to tetanus toxoid (TT) by reductive amination to increase its immunogenicity. Reaction conditions were set to obtain the polysaccharide in three molecular size ranges (1-10, 10-30, 30-100 kDa) and levels of oxidation. PS6B fragmentation below 10 kDa and oxidation above 24 % of the repetitive units implied the loss of antigenicity. Polysaccharide length but not oxidation level had an impact on the physicochemical characteristics of the conjugates in the tested conditions. Unlike the native polysaccharide, conjugated 10-30 kDa and 30-100 kDa PS6B were immunogenic in rabbits, with evidence of thymus-dependent response. The procedure described supports obtaining PS6B-TT conjugates reproducibly in the 30-100 kDa and 10-30 kDa molecular size ranges and with 8-18 % oxidized repeat units, which are immunogenic.

Keywords: polysaccharide, conjugate, *Streptococcus pneumoniae*, 6B serotype

Biotechnología Aplicada 2013;30:208-215

RESUMEN

Procedimiento de conjugación del polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 6B a toxoide tetánico. Anualmente *Streptococcus pneumoniae* provoca 826 mil muertes de niños menores de cinco años. El estudio del serotipo 6B, uno de los de mayor incidencia, es uno de los objetivos del proyecto de investigación-desarrollo para obtener una vacuna conjugada en Cuba. La estrategia de conjugación del polisacárido capsular del serotipo 6B (PS6B) fue fragmentarlo mediante hidrólisis ácida, activarlo mediante oxidación con periodato y conjugarlo a toxoide tetánico (TT) mediante aminación-reductiva. Existe poca información sobre cómo estas modificaciones afectan las características físico-químicas y antigénicas del polisacárido, en particular para PS6B, a pesar de ser el menos inmunogénico de los polisacáridos de *S. pneumoniae*. En tal sentido, se estableció un procedimiento para obtener conjugados inmunogénicos de PS6B a TT. Se crearon condiciones de reacción para obtener el polisacárido en tres rangos de tallas y niveles de oxidación. Se determinó que la fragmentación del polisacárido por debajo de 10 kDa y la oxidación de más del 24 % de las unidades repetitivas implican pérdida de antigenicidad. La talla del polisacárido tuvo impacto en las características físico-químicas de los conjugados en las condiciones evaluadas; no así el nivel de oxidación. A diferencia del polisacárido nativo, conjugados de PS6B de 10 a 30 kDa y 30 a 100 kDa fueron inmunogénicos en conejos, con evidencias de respuesta timo-dependiente. Los procedimientos que incluyen la obtención del PS6B de 10 a 30 kDa y 30 a 100 kDa con niveles de oxidación entre 8 y 18 % de las unidades repetitivas oxidadas, permitieron obtener conjugados a TT reproducibles e inmunogénicos.

Palabras claves: polisacárido, conjugado, *Streptococcus pneumoniae*, serotipo 6B

Introduction

Yearly, *Streptococcus pneumoniae* (pneumococcus) causes 14.5 millions of pneumonia, bacteremia and meningitis episodes worldwide, with 826 000 deaths among infants younger than five years [1]. Vaccines against this bacterium have been available for the last 30 years, mostly based on the envelope capsular polysaccharides (PS), and from up to 23 different circulating serotypes. However, those vaccines are not immunogenic in children younger than 2 years, the most susceptible population. This happens because their immune

system is unable to generate the adequate immune response against T-independent antigens, as the bacterial polysaccharides [2]. This problem has been addressed by developing conjugate vaccines, capable of inducing the required T-dependent immune responses against PS [3]. The first of these vaccines was licensed in 2000 (Prevenar®, against seven serotypes), and more recently other two (Synflorix® and Prevenar 13®, against 10 and 13 serotypes, respectively), but at very high prices in the market. In Cuba, there is a project currently

1. O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, Henkle E, Deloria-Knoll M, McCall N, et al. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet*. 2009; 374(9693):893-902.

2. González-Fernández A, Faro J, Fernández C. Immune responses to polysaccharides: Lessons from humans and mice. *Vaccine*. 2008;26:292-300.

at the research-development phase to develop a pneumococcal conjugate vaccine covering seven serotypes on its first stage: 1, 5, 6B, 14, 18C, 19F and 23F.

Among them, serotype 6B is one of the most frequently causing invasive diseases in children younger than five years in countries either developed or underdeveloped [4], like in Cuba and its geographic area [5]. It is also one of the most common causes of otitis media worldwide [6]. The three commercially available vaccine formulations contain the serotype 6B PS (PS6B), a component of most of the vaccine candidates assayed in clinical trials. Most of the studies describe the conjugate of this serotype as the less immunogenic [7, 8]. Its repetitive unit (RU) comprises the sequence $\rightarrow 2\text{-}\alpha\text{-D-Galp-(1-3)-}\alpha\text{-D-Glcp-(1-3)-}\alpha\text{-L-Rhap-(1-4)-D-RibOH-(5-PO}_4\text{)}\rightarrow$ [9]. This polymeric structure is linear, with phosphodiester bonds which confers it a periodic negative charge. Its low immunogenicity results from its relatively simple structure and its similarity to DNA [10].

The conjugation strategy proposed by our project comprises the fragmentation of PS by acid hydrolysis, followed by PS activation by periodate oxidation and conjugation to the tetanus toxoid (TT) by reductive amination. Although this conjugation method is frequently used, there are few studies elucidating how such modifications affect the physicochemical and antigenic properties of PS in general. Particularly for PS6B, it has not been previously studied, in spite of its low immunogenicity. PS modifications during the conjugation process could affect the natural epitope conformation and promote the appearance of neoantigenic structures that subsequently affect the specificity of the immune response attained [11]. Therefore, the present study established a procedure to conjugate the PS6B to TT. It required to establish reproducible reaction conditions on each step and to determine the size and activation levels required for PS in order to preserve its epitopes and to efficiently generate its immunogenic conjugates.

Materials and methods

PS from serotypes 6B (batch 806), 18C (batch 801) and 19F (batch 802), and TT protein (batch 6017), were produced by the Development and Scale up department, and the Production plant II, respectively of the Finlay Institute, Havana, Cuba.

Fragmentation of native PS6B

The dissolution of 50 mg of PS6B was added with either a dissolution of acetic acid (Merck) or trifluoroacetic acid (TFA; Merck, Germany) to a final concentration of 0.25 M or 0.1 M, respectively. Each dissolution was further incubated at 70 °C and aliquots were collected at different times (Table 1). Aliquots were neutralized and molecular size fragmented by ultrafiltration (Amicon, Millipore Corp., Bedford, MA), with distilled water using regenerated cellulose membranes (Millipore, USA) with subsequent molecular cutoffs of 100, 30, 10 and 1 kDa. Each fraction was denominated according to the interval of cutoff values of the membrane retaining it and the one of the previous fragmentation step, and carbohydrate content was determined. The condition providing the highest yield for each fraction was reproduced, and the products

Table 1. Study of hydrolysis conditions of the capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* serotype 6B

Acid	Conditions † (min)	1-10 kDa	Yield (%) 10-30 kDa	30-100 kDa
AcOH 0.25 M	90	nd	0	65.1
	120	nd	3.2	82.9†
	180	0	38.3	60.8
TFA 0.1 M	30	nd	46.2	55.9
	60	2.0	86.3†	10.6
	90	37.9	59.7	0
	120	71.2†	30.1	nd

† Selected conditions.

AcOH: acetic acid; TFA: trifluoroacetic acid.

nd: not determined.

obtained were analyzed attending to carbohydrate content, by monodimensional proton nuclear magnetic resonance (NMR-¹H), size exclusion-high performance liquid chromatography (SE-HPLC) and in antigenicity studies. Yields (Y) were determined according to the following formula:

$$Y = \frac{\text{final carbohydrate mass}}{\text{initial carbohydrate mass}} \times 100$$

Activation of fragmented PS6B

A dissolution of 20 mg of fragmented PS6B (fractions 10-30 kDa or 30-100 kDa) was added with a sodium periodate dissolution (NaIO₄; Riedel-de Haen) to final concentrations of 2.5, 5 or 10 mM in PBS, pH 7.0, and were further incubated for 3 h in the darkness. The reaction was stopped by adding 5 µL of glycerol (Plu-sone). The reaction mix was diafiltered against 5 volumes of distilled water, using a membrane with cutoff values of 10 kDa for the 10-30 kDa fraction or 30 kDa for the 30-100 kDa fraction. The products obtained were analyzed for carbohydrate and aldehyde groups content, by NMR-¹H, SE-HPLC and antigenicity. The activation level was expressed as the percentage of oxidized repetitive units (ORU), calculated by the following formula:

$$\text{ORU} = \frac{\text{moles of aldehyde groups}}{\text{moles of RU}} \times 100$$

where:

RU: repetitive units

Yield was determined ad in the fragmentation study.

Conjugation of activated PS6B

Polysaccharides from 10-30 kDa and 30-100 kDa fractions were used, with ORU percentage ranges 8-12 and 13-18%. PS (20 mg) were added with 1 mL of 10 mg/mL TT dissolution. Subsequently, 4 mg of sodium borohydride (Merck, Germany) were added and incubated for approximately 18 h at room temperature. Two milligrams of sodium borohydride were further added and incubated for 2 h to eliminate the remaining aldehyde groups. The reaction mix was diafiltered against 10 volumes of distilled water with a 100 kDa cutoff membrane. The products obtained were analyzed for carbohydrate and protein content, by NMR-¹H, SE-HPLC and antigenicity.

Analytical methods

Carbohydrate content was determined by the orcinol-sulfuric acid method [12] using a glucose standard

3. Lucas AH, Rittenhouse-Olson K, Kronenberg M, Apicella MA, Wang D, Schreiber JR, et al. Carbohydrate moieties as vaccine candidates: Meeting summary. *Vaccine*. 2010;28(4):1121-31.

4. Overturf GD. American Academy of Pediatrics. Committee on Infectious Diseases. Technical report: prevention of pneumococcal infections, including the use of pneumococcal conjugate and polysaccharide vaccines and antibiotic prophylaxis. *Pediatrics*. 2000;106(2 Pt 1):367-76.

5. Organización Panamericana de la Salud. Informe Regional de SIREVA II: datos por país y por grupos de edad sobre las características de los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis* en procesos invasores, 2000-2005. Documentos Técnicos. Tecnologías Esenciales de Salud. THS/EV-2007/002.

6. Rodgers GL, Arguedas A, Cohen R, Dagan R. Global serotype distribution among *Streptococcus pneumoniae* isolates causing otitis media in children: Potential implications for pneumococcal conjugate vaccines. *Vaccine*. 2009;27:3802-10.

7. Oosterhuis-Kafeja F, Beutels P, Van Damme P. Immunogenicity, efficacy, safety and effectiveness of pneumococcal conjugate vaccines (1998-2006). *Vaccine*. 2007;25(12):2194-212.

8. Rückinger S, Dagan R, Albers L, Schönberger K, von Kries R. Immunogenicity of pneumococcal conjugate vaccines in infants after two or three primary vaccinations: a systematic review and meta-analysis. *Vaccine*. 2011;29(52):9600-6.

9. Kenne L, Lindberg B, Madden J. Structural studies of the capsular antigen from *Streptococcus pneumoniae* Type 26. *Carbohydr Res*. 1979;73:175-82.

10. Sun Y, Park MK, Diamond B, Solomon A, Nahm MH. Repertoire of human antibodies against the polysaccharide capsule of *Streptococcus pneumoniae* serotype 6B. *Infect Immun*. 1999;67:1172-9.

11. Peeters CC, Lagerman PR, de Weers O, Oomen LA, Hoogerhout P, Beurret M, et al. Preparation of polysaccharide-conjugate vaccines. *Methods Mol Med*. 2003;87:153-74.

curve, and the carbonyl group by the modified Park-Johnson's method [13], also against a glucose standard curve. Protein content of the conjugates was assessed by the Lowry's method [14], with a bovine serum albumin (BSA) standard curve.

RU structure was followed by NMR-¹H. The samples were prepared in D₂O. Spectra were obtained at 25 °C using a 250 MHz equipment (Bruker AC-250F). Signals were initially assigned according to van Dam *et al.* [15]. Chromatography analyses were done by SE-HPLC (Knauer Smartline, Germany) using a TSK 5000PW (TOSOH) column with refractive index detector. The distribution constant (K_D) was calculated as follows:

$$K_D = \frac{(T_r - T_0)}{(T_t - T_0)} \times 100$$

where:

T_r : sample retention time;

T_0 : retention time of a 2000 kDa dextran standard (Blue Dextran, Sigma);

T_t : NaN₃ retention time.

The relative molecular weight (M_{Wr}) was determined by using a calibration curve of dextran standards (American Polymer Standard Corp.). The width at half peak height was determined with the program ClarityChrom 2.4.4.80 (Knauer, Germany).

The unbound protein content was estimated by the same SE-HPLC system using a Superose 12 column (Pharmacia, USA) with ultraviolet detector. The area under the curve for each peak was integrated with the ClarityChrom 2.4.4.80 program.

Antigenicity determination

The antigenicity of polysaccharide derivatives was determined by an inhibition immunoenzymatic assay (ELISA). A standard serum against SP6B (factor 6c, Statem Serum Institute, Copenhagen, Denmark) diluted 1/3200 was used, followed by incubation with each inhibitor at concentrations ranging 0.005–500 µg/mL, overnight at 4 °C. The fragmented polysaccharides were used as inhibitors, either active or conjugated accordingly. Additionally, serotypes 18C and 19F PS were included as negative controls (non-related polysaccharides). For ELISA assays, polystyrene 96-well microtiter plates (Maxisorp, Nunc, Denmark) were coated with 10 µg/mL PS6B in phosphate buffer saline (PBS), pH 7.2, and incubated overnight at 37 °C. Plates were subsequently blocked with 1 % BSA for 30 min at 37 °C, and then, the anti-SP6B standard serum preincubated with the different inhibitors was added. Afterwards, the anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase conjugate (HRP; Sigma, Germany) was added at a 1:10 000 dilution (in PBS, 0.3 % Tween-20, 0.01 M EDTA, 1 % BSA) and further incubated for 90 min at room temperature. Microplates were washed thrice after each step with washing solution (PBS, 0.05 % Tween-20). Finally, the HRP substrate solution was added (0.5 mg/mL ortho-phenylenediamine and 0.1 % (v/v) H₂O₂) in citrate buffer solution, pH 5.6, and the reaction was developed for 20 min in the darkness. The reaction was stopped by adding 3 M HCl. Absorbance was determined at 492 nm and the percent inhibition (PI) was calculated as follows:

$$PI = 100 - \left(\frac{\text{absorbance of serum plus inhibitor}}{\text{absorbance of serum}} \times 100 \right)$$

Rabbit immunization

Two conjugates obtained from PS activated at ORU percentages ranging 13–18 % from fractions 10–30 kDa (Cj10–30) and 30–100 kDa (Cj30–100) were administered. Three groups of New Zealand White rabbits (Cenpalab, Havana, Cuba), five animals each, were immunized with 4 µg of conjugated PS, 25 µg of non-conjugated PS or placebo, in aluminum phosphate. Three doses of each immunogen were administered on days 0 (start of the study), 14 and 28 respectively. Blood was extracted from all the animals on days 7, 21 and 35. Sera were stored at -20 °C until use. The study was conducted in compliance with international guidelines for ethical conduct in the care and use of laboratory animals for scientific purposes. The Ethics Committee and the Quality Control Department of the Center of Biomolecular Chemistry (CQB, Havana, Cuba) approved all the experimental procedures.

Evaluation of the immune response induced by the conjugates

The IgG antibody response against PS was determined by an indirect ELISA, using the native PS6B for coating [16]. The antibody titer was calculated by a regression analysis between optical density (OD) values and the base ten log of the reciprocal of the serum dilution. Antibody titer was considered as the reciprocal of the serum dilution at which the absorbance reached twice the value of the 1/100 pre-immune serum. Titers above 50 were regarded as positive.

The IgG response against the TT carrier protein was determined as previously described to assess the response against the polysaccharide. In this case, plates were coated with 1 µg/mL TT in PBS, pH 7.2.

IgG antibody avidity against PS6B was determined by an ELISA similar to that used for characterizing the response against the polysaccharide, with some modifications. After serum incubation, a step of incubation with 0.5 M ammonium thiocyanate (NH₄SCN, Merck) for 15 min was applied to half of the replicates. The resulting two dilution curves for each sample, with and without NH₄SCN allowed the calculation of the avidity index (AI) as follows [17]:

$$AI = 100 \times \frac{\text{titer with NH}_4\text{SCN}}{\text{titer without NH}_4\text{SCN}}$$

The serum dilution showing an absorbance value of half the value of the serum diluted 1/100 without NH₄SCN was considered as titer.

Statistical analyses

Results of the physicochemical evaluations were expressed as arithmetic means ± standard deviation of five independent experiments (three in the case of conjugates); the variation coefficient was also calculated for fragmentation yields and PS oxidation levels. Immunological evaluations were expressed as arithmetic means ± standard deviation of five animals. The statistically significant differences between groups were determined by the non-parametric Kruskal-Wallis test, and when present, a Dunn's test was used *a posteriori*. Means were compared against reference

12. Brückner J. Estimation of monosaccharides by the orcinol-sulphuric acid reaction. *Biochem J.* 1955;60(2):200–5.

13. Porro M, Viti S, Antoni G, Neri P. Modifications of the Park-Johnson Ferricyanide submicromethod for the assay of reducing groups in carbohydrates. *Anal Biochem.* 1981;118:301–6.

14. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193:265–75.

15. van Dam JE, Breg J, Komen R, Kamerling JP, Vliegthart JF. Isolation and structural studies of phosphate-containing oligosaccharides from alkaline and acid hydrolysates of *Streptococcus pneumoniae* type 6B capsular polysaccharide. *Carbohydr Res.* 1989;187(2):267–86.

16. Chang J, Serrano Y, Garrido R, Rodríguez LM, Pedrosa J, Cardoso F, *et al.* Relevance of O-acetyl and phosphoglycerol groups for the antigenicity of *Streptococcus pneumoniae* serotype 18C capsular polysaccharide. *Vaccine.* 2012; 30(49):7090–6.

17. Anttila M, Eskola J, Ahman H, Käyhty H. Avidity of IgG for *Streptococcus pneumoniae* type 6B and 23F polysaccharides in infants primed with pneumococcal conjugates and boosted with polysaccharide or conjugate vaccines. *J Infect Dis.* 1998; 177(6):1614–21.

values by the Wilcoxon test. Probability values (p) lower than 0.05 were considered as statistically significant. All the analyses were done with the Graph Pad Prism 4.03 program.

Results

Fragmentation of the capsular PS6B

PS was fragmented by acid hydrolysis. The study was carried out by two acids dissolutions, assayed at different times. The conditions yielding the highest PS amounts were: 2 h in 0.25 M acetic acid for fraction 30-100 kDa, 1 h in 0.1 M TFA for fraction 10-30 kDa, and 2 h in 0.1 M TFA for fraction 1-10 kDa (Table 1). These conditions reproducibly yielded more than 50 % PS (Table 2). The three processes rendered variation coefficients (VC) below 6 %.

NMR-¹H spectra recorded for the fragmented PS were very similar to that of the native PS, indicating that the RU structure was preserved. Low intensity signals at 3.22 ppm and around 2.1 ppm in the native PS spectrum corresponded to polysaccharide C [18]. This contaminant, common among pneumococcal PS, was found at very low amounts in the starting material and decreased even more after fragmentation. There were no signals of end-product monosaccharides resulting from size reduction, not even in the 1-10 kDa PS fraction (Figure 1).

K_D increased conversely with size reduction. $W_{0.5}$ values for fragmented PS were lower than those of the native PS, indicating a decrease in polydispersion. The rMW for each fraction was higher than the cut-off values of the flat ultrafiltration membranes used (Table 2).

Antigenicity, evaluated by an inhibition ELISA and using a polyclonal serum specific for PS6B, was only similar to that of the native PS for fragmented PS fractions 30-100 kDa and 10-30 kDa. In fact, the concentrations of these two fractions required to achieve 50 % inhibition were in the same order of that of the native PS, while that of the PS fraction 1-10 kDa was two orders higher (Figure 2A). For this reason, fractions 30-100 kDa and 10-30 kDa were selected for further experimentation.

Activation of fragmented PS6B

Fragmented PS were activated by periodate oxidation. A study was conducted for this reaction in fractions 10-30 kDa and 30-100 kDa, varying the NaIO_4 /PS ratio (Table 3). A linear relationship was achieved for the equivalent amounts of NaIO_4 and the number of aldehyde groups generated ($R^2 = 1.0$ in the 10-30 kDa fraction and $R^2 = 0.99$ in the 30-100 kDa fraction). ORU VC obtained at the different conditions ranged 11-20 %. There were no differences between the results attained for both working fractions. More than 85 % of the starting amount of PS was recovered in all the experiments, indicating that the oxidation reaction conditions did not generate fragmentation.

NMR-¹H spectra of activated PS showed the chemical shifts and relative intensities of signals typical of the non-inactivated PS fragments (Figure 3A). There were no signals corresponding to the carbonyl proton at lower fields. Noteworthy, two new signals appeared at 5.10 and 5.09 ppm following those of the anomeric

Table 2. SE-HPLC evaluation (TSK 5000PW) of *Streptococcus pneumoniae* serotype 6B capsular polysaccharide fragmented under the conditions selected†

Fraction	Yield (%)	K_D	$W_{0.5}$ (min)	rMW (kDa)
30-100 kDa	84.0 ± 3.8	0.44 ± 0.02	1.47 ± 0.06*	134 ± 6
10-30 kDa	83.2 ± 3.0	0.57 ± 0.02	1.27 ± 0.11*	55 ± 8
1-10 kDa	69.2 ± 3.7	0.67 ± 0.02	1.04 ± 0.10*	20 ± 3
PsN	-	0.2	1.70	643

† Results reported as average ± standard deviation (n = 5).

* p vs. 1.70 (0.031).

K_D : distribution constant.

$W_{0.5}$: peak width at half peak height.

rMW: relative molecular weight.

PsN: native polysaccharide.

protons of ramnose and glucose superimposed at 5.15 ppm. The relative intensities of those two new signals were higher for PS showing the highest oxidation level (Figure 3B). These correspond to the signal of the anomeric proton of ramnose produced by the shortage in ORU of ribitol.

K_D values were the same as for the inactivated PS for the given fractions (Tables 2 and 3). These results confirmed that none of the oxidation conditions used seems to generate PS fragmentation.

While evaluating antigenicity, PS with a similar activation level up to 17.2 % ORU behaved similar to the fragmented PS of the same size. For these PS, concentrations required for a 50 % inhibition of serum were 1 and 2 times that of the native PS, respectively. On the contrary, the PS activated at 24.4 % ORU showed a drop in the inhibition capacity depending on its concentration, requiring a concentration 25-fold than that of the native PS to achieve a 50 % inhibition. Activation at 62.5 % ORU caused a drastic decrease in the inhibition capacity (Figure 3B). These results indicate that the activated PS antigenicity becomes affected when ORU is higher than 24.4 %.

Conjugation of activated PS6B

Activated PS of the working fractions 10-30 kDa and 30-100 kDa were conjugated at two ranges of

18. Abeygunawardana C, Williams TC, Summer JS, Hennessey JP. Development and validation of an NMR-based identity assay for bacterial polysaccharides. *Anal Biochem.* 2000;279:226-40.

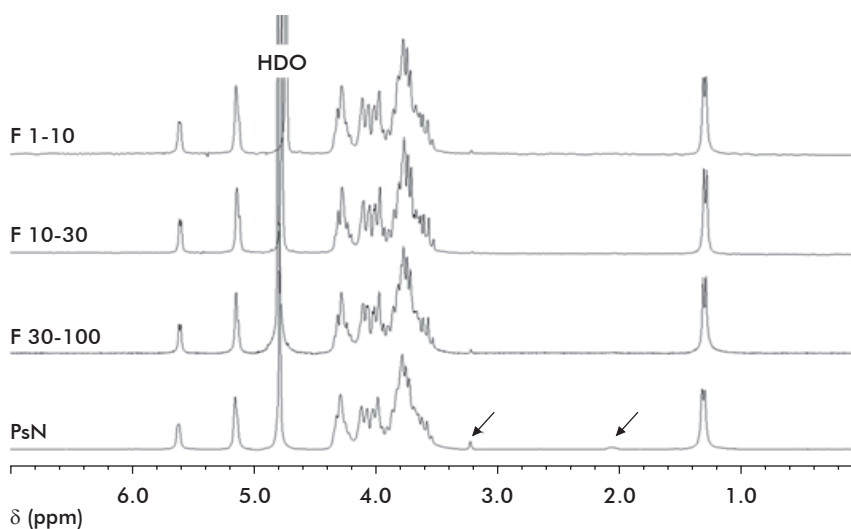


Figure 1. Evaluation of the preservation of repetitive unit structure in fragmented *Streptococcus pneumoniae* serotype 6B capsular polysaccharide (PS). Arrows indicate the signals corresponding to contaminant polysaccharide C. F1-10, F10-30 and F30-100: PS of the fragmented working fractions of 1-10 kDa, 10-30 kDa and 30-100 kDa, respectively. HDO: semiheavy water. PsN: Native PS.

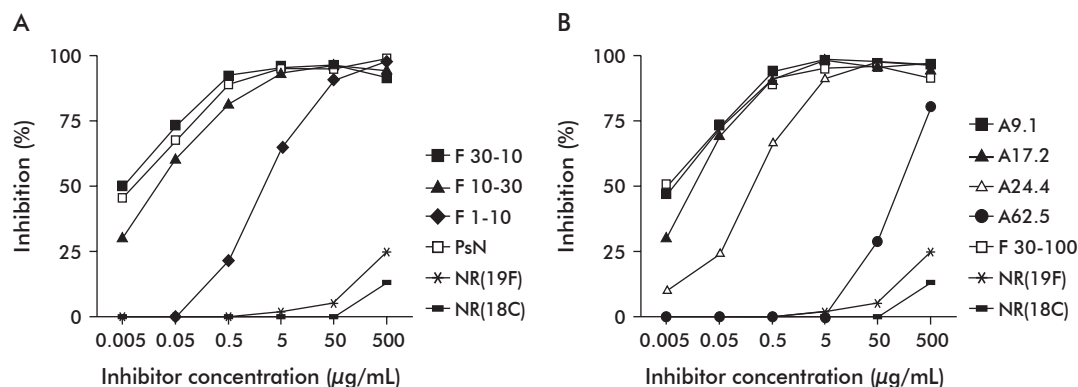


Figure 2. Antigenicity evaluations by inhibition ELISA of a polyclonal serum specific against the capsular polysaccharide (PS) of *Streptococcus pneumoniae* serotype 6B. A) Evaluation of PS fragmented working fractions. B) Evaluation of PS with different levels of activation. PsN: native PS; F1-10, F10-30 and F30-100: PS of the fragmented working fractions of 1-10 kDa, 10-30 kDa and 30-100 kDa, respectively. A9.1, A17.2, A24.4 and A62.5: PS activated with 9.1, 17.2, 24.4 and 62.5 % of oxidized repetitive units, respectively. NR (19F) and NR (18C): Non-related PS from serotypes 19F and 18C.

activation levels to TT. There was no free protein detected in the conjugates obtained. Figure 4A shows the typical chromatograms. The differences detected in the PS activation levels had no influence on the properties evaluated. Otherwise, PS from the 10-30 kDa had higher K_D and lower PS/protein ratio than that obtained from the 30-100 kDa (Table 4).

NMR- ^1H of PS conjugates retained the typical chemical shifts and relative intensities. There were new signals of low intensities in the range 1.0-0.8 ppm, corresponding to the aliphatic amino acids of the protein (Figure 4B). On the other hand, the capacity to inhibit the reference serum remained almost the same. The concentration required to achieve 50 % inhibition were of the same order of magnitude compared to that of the activated PS prior to conjugation (Figure 4C). These results indicated that conjugation did not significantly affect either the structure or the exposure of PS.

Evaluation of the antibody immune response generated by the conjugates

The conjugates obtained from the fractions 10-30 kDa (Cj10-30) and 30-100 kDa (Cj30-100) were tested by subcutaneous immunization of New Zealand White rabbits in three doses. The non-conjugated PS was administered as control and did not induce positive anti-PS6B antibody titers at any of the time points evaluated, and the response remained at baseline level as placebo (Figure 5). On the contrary, both conjugates generated IgG antibody titers against PS, with logarithmic titers above 2 after the second dose. On day 21, the Cj30-100 conjugate antibody titer was very highly statistically significant compared to that of the Cj10-30 ($p < 0.001$). This difference did not remain after the third immunization, due to an increase in the immune response generated by Cj10-30 ($p < 0.001$); but not by Cj30-100 (Figure 5A).

The quality of the response was evaluated by determining the AI for antibodies against PS on days 21 and 35. After the second dose, sera from the group receiving Cj10-30 overcame the 50 % of inhibitory activity (IA), in contrast to those of the group immunized with Cj30-100, which were lower ($p < 0.001$).

Table 3. Results of the periodate oxidation reaction for the *Streptococcus pneumoniae* serotype 6B capsular polysaccharide fractions 10-30 kDa and 30-100 kDa[†]

Fraction	mol NaIO_4 / mol RU	ORU (%)	Yield (%)	K_D
10-30 kDa	0.18	9.9 ± 1.6	92.7 ± 4.5	0.57 ± 0.05
	0.35	15.7 ± 2.1	92.6 ± 6.1	0.56 ± 0.05
	0.71	27.6 ± 6.4	95.4 ± 3.2	0.56 ± 0.05
30-100 kDa	0.18	9.0 ± 1.0	92.5 ± 4.0	0.43 ± 0.02
	0.35	15.1 ± 2.5	95.8 ± 4.2	0.43 ± 0.02
	0.71	27.9 ± 5.4	93.7 ± 4.9	0.44 ± 0.02

[†] Results reported as average $\pm$ standard deviation ($n = 5$).

RU: repetitive units.

ORU: oxidized repetitive units.

K_D : distribution constant.

Following the third dose, IA increased in both groups ($p < 0.001$) to near 90 %, reaching a level similar to that of the reference serum (Figure 5B).

Regarding the response against the carrier protein, there were no differences after three doses among the groups immunized with both conjugates ($p > 0.05$) (Figure 5C); in spite of the TT dose being 70 % higher in the Cj10-30.

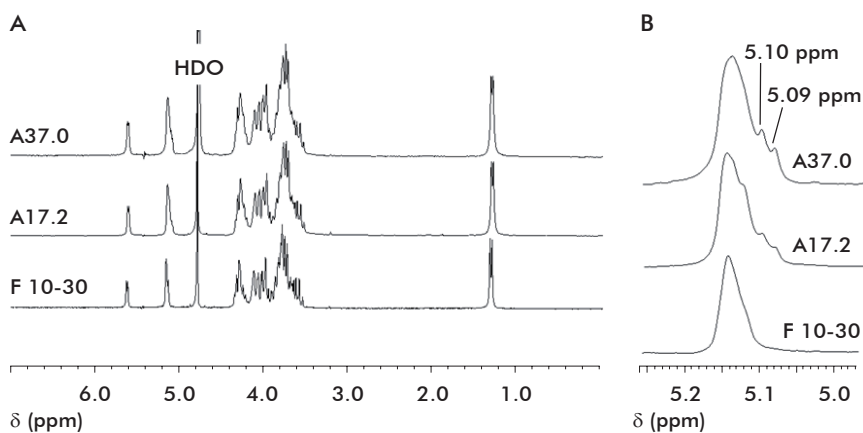


Figure 3. Preservation of the repetitive unit of the activated capsular polysaccharide (PS) fractions of *Streptococcus pneumoniae* serotype 6B. A) Superposition of NMR- ^1H spectra from PS at different activation levels and the respective fragmented PS. B) Detail of the spectral area from 5.0 to 5.25 ppm showing the new signals corresponding to the activated PS. A37.0 and A17.2: PS activated with 37.0 and 17.2 %, respectively of oxidized RU; F10-30: Fragmented PS.

Table 4. Physicochemical properties of the *Streptococcus pneumoniae* serotype 6B capsular polysaccharide (PS) conjugates to tetanus toxoid †

PS fraction	ORU (%)	PS/Prot.	K _D
10-30 kDa	13-18	0.7 ± 0.3	0.42 ± 0.02
	8-12	0.8 ± 0.3	0.41 ± 0.04
30-100 kDa	13-18	1.7 ± 0.4	0.28 ± 0.02
	8-12	1.6 ± 0.4	0.31 ± 0.05

† Results reported as average ± standard deviation (n = 3). None of the fractions contained unbound protein.
ORU: oxidized repetitive units.
PS/prot.: Carbohydrate/protein ratio (w/w).
K_D: distribution constant.

Discussion

The methods available to obtain PS-protein conjugates are quite varied [19]; but few are suitable for vaccine development. The controlled periodate oxidation of PS was selected, followed by reductive amination of the produced aldehyde groups by the amino groups of the protein. This is a simple and scalable method, applicable to PS from pneumococcal serotypes included in the Cuban vaccine project. It is also the method used to produce the Prevenar® and Prevenar13® vaccines [20]. In contrast to procedures used to generate commercial vaccines against pneumococci, PS was fragmented and the desired size range selected. By these means, a more efficient and consistent process is guaranteed, also favoring the quality of the immune response generated while administering the conjugate [21].

Moreover, the difference in the rMW distribution of the conjugate supported the exclusion of part of the free PS, as indicated by the change in the PS/protein ratio of the final conjugates compared to the reaction mix. A significant amount of free PS for this serotype could decrease the conjugate immunogenicity, more significantly for PS at higher rMW [22]. Acid hydrolysis was selected among the PS fragmentation methods available, due to its applicability to most PS molecules of the vaccine candidate and the easiness for scale up.

A methodology was followed considering all the factors needed, even those counteracting, to find the most adequate reaction conditions. Particularly relevant were the preservation of PS natural epitopes and the enhancement of the thymus-dependent character of the antigen once conjugated, reaction times no longer than 3 h a day, highly reproducible and potentially robust processes, rendering PS yields above 50 %.

The fragmentation study involved two acids of different strengths. Acetic acid supported to obtain PS in the 30-100 kDa fraction and TFA in the fractions 10-30 kDa and 1-10 kDa. Yields were higher than predicted and the reproducibility was regarded as adequate. These conditions would require further adjustment when working with native PS batches of other rMW distributions.

The fragments retained the RU chemical structure in the three fractions, as expected, regarding the absence of PS6B side chains susceptible to hydrolysis. Significantly, antigenicity was preserved at the higher

19. Kamerling J. Pneumococcal Polysaccharides: A Chemical View. In: *Streptococcus pneumoniae. Molecular biology & mechanisms of disease*. New York: Mary Ann Liebert, Inc.; 1999. p.81-112.

20. Hausdorff WP, Siber JR, Paradiso PR, inventors; Wyeth Lederley, Inc., assignee. Multivalent pneumococcal polysaccharide-protein conjugate composition. US patent US 0130137. 2009 may 21.

21. Bröker M, Dull PM, Rappuoli R, Costantino P. Chemistry of a new investigational quadrivalent meningococcal conjugate vaccine that is immunogenic at all ages. *Vaccine*. 2009;27:5574-80.

22. Rodríguez ME, van den Dobbelsteen GP, Oomen LA, de Weers O, van Buren L, Beurret M, et al. Immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae* type 6B and 14 polysaccharide-tetanus toxoid conjugates and the effect of uncoupled polysaccharide on the antigen-specific immune response. *Vaccine*. 1998;16(20):1941-9.

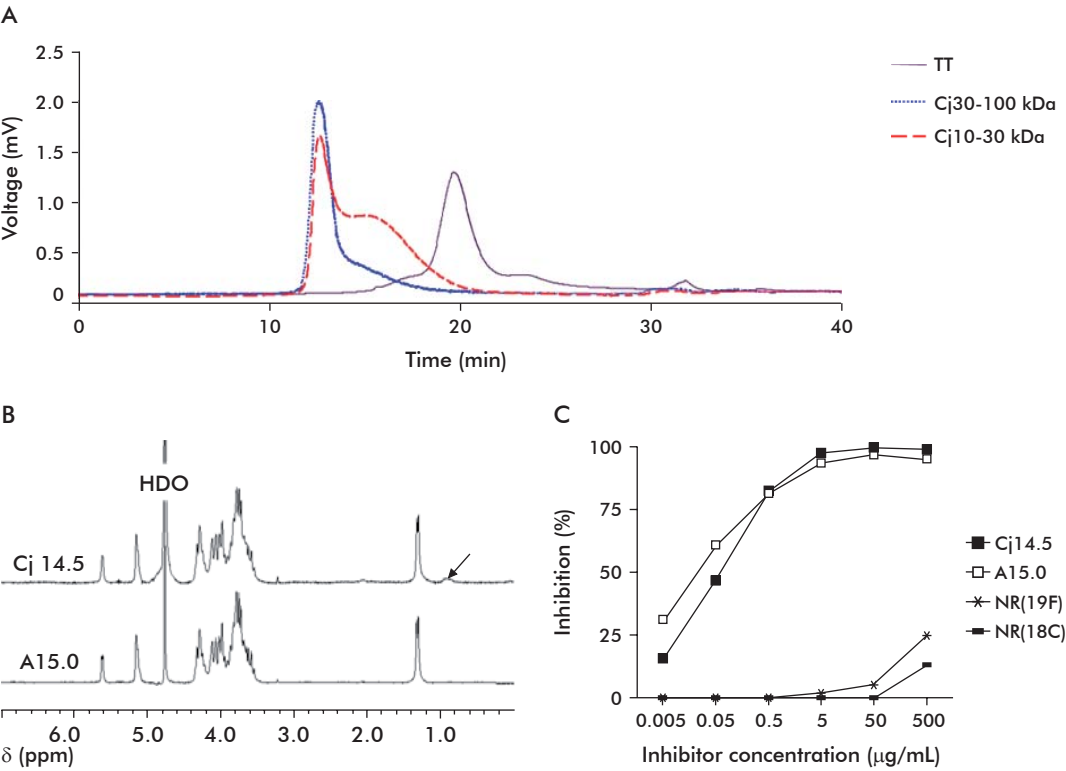


Figure 4. Physicochemical and immunochemical characterization of the capsular polysaccharide (PS) of *Streptococcus pneumoniae*, serotype 6B conjugates. A) Superposition of chromatograms of the conjugates and the tetanus toxoid (TT) carrier protein. B) Superposition of PS NMR-1H spectra. The arrow indicates the signal corresponding to the aliphatic amino acids of the carrier protein. C) Chart of inhibition vs. inhibitor concentration. Cj10-30 kDa and Cj30-100 kDa: conjugates obtained from PS fractions 10-30 kDa and 30-100 kDa, respectively. Cj14.5: conjugate obtained from PS with 14.5 % of oxidized repetitive units (ORU). A15.0: PS activated with 15.0 % ORU. NR (19F) and NR (18C): Non-related PS from serotypes 19F and 18C.

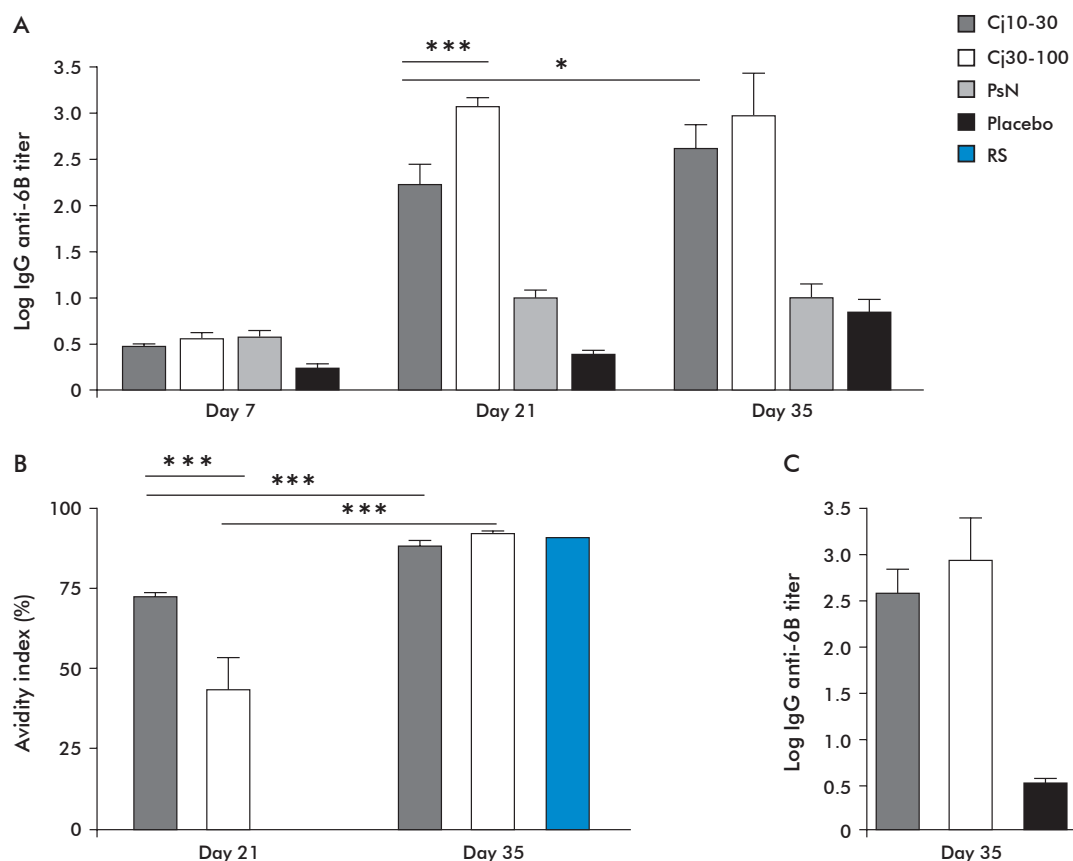


Figure 5. Immunological evaluation of the capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae*, serotype 6B (PS6B) conjugates. Groups of five New Zealand White rabbits were immunized with three doses of either 4 μ g of PS6B conjugated to tetanus toxoid (TT), 10 μ g of non-conjugated PS6B or placebo on days 0, 14 and 28. Bars indicate average values plus standard deviation. A) Titers of IgG antibodies against PS6B. B) Avidity index of IgG antibodies against PS6B. C) Titers of IgG antibodies against TT after the third dose. Cj10-30 and Cj30-100 are the conjugates obtained from PS6B fractions in the molecular weight ranges 10-30 kDa and 30-100 kDa, respectively; PsN: Native PS; SR: reference serum. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

size PS fractions, but was affected in the 1-10 kDa fraction. This evidenced the preservation of the conformational epitopes essential for recognizing the native PS which are absent at lower sizes. Although previous reports on this matter were not found in the literature for PS6B, there were previous studies with other PS, such as those from *Streptococcus B* type III [23, 24], *Neisseria meningitidis* serogroups Y and W₁₃₅ [25] and *S. pneumoniae* serotype 14 [26, 27]. In this last PS, conformational epitopes were also relevant for the generation of functional antibodies by the conjugates [28].

Reproducible conditions for PS oxidation were established while studying the PS6B activation. A linear relation was found between the equivalent amount of NaIO₄ and the number of aldehyde groups generated, which supported the generation of an activation level in a preselected narrow range.

The periodate oxidation reaction occurs between adjacent hydroxyl groups followed by the rupture of the bond between the involved carbons which become aldehydes. The PS6B RU bears three of such sites: between positions C1-C2 and C2-C3 in ribitol and C3-C4 in galactose. Following the reactivity order described by Kim *et al.* [29], the oxidation of this PS must occur completely in ribitol since it is a linear

chain. In support of this affirmation, it is known that under oxidation conditions of 0.87 moles of NaIO₄/mol of UR, the *N. meningitidis* serogroup W₁₃₅ oxidation proceeds in the side chain of sialic acid at C7-C8 and C8-C9 positions, and not at the C2-C3 and C3-C4 of galactose [30].

In this work, the NMR-¹H revealed signals congruent with the shielded anomeric proton of ramnose, due to a shortage of the adjacent ribitol residue. On the contrary, there was no signal for the unshielded anomeric proton of galactose, present when it is oxidized. This implies that no monosaccharide ring was broken, what should minimize any perturbation in the PS conformation. Nevertheless, there was a decrease in antigenicity for RU above 24 % in spite of the fact that no PS fragmentation was detected. This indicates that more than ¾ of ribitol residues were required intact for a proper antigenic recognition. Based on these results, the 0.71 moles of NaIO₄/mol of RU oxidation conditions were avoided.

Conjugates obtained from PS of 8-12 % and 13-18 % ORU, and activated with 0.18 and 0.35 moles of NaIO₄/mol of RU, respectively, showed no differences in any of the physicochemical parameters evaluated. Conjugate immunogenicity is not expected to vary when generated from PS of the same size without any

23. Wessels MR, Muñoz A, Kasper DL. A model of high-affinity antibody binding to type III group B *Streptococcus capsular polysaccharide*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987;84(24):9170-4.

24. Zou W, Mackenzie R, Thérien L, Hiram T, Yang Q, Gidney MA, *et al.* Conformational epitope of the type III group B *Streptococcus capsular polysaccharide*. *J Immunol*. 1999;163(2):820-5.

25. Moore SL, Uitz C, Ling CC, Bundle DR, Fusco PC, Michon F. Epitope specificities of the group Y and W-135 polysaccharides of *Neisseria meningitidis*. *Clin Vaccine Immunol*. 2007;14(10):1311-7.

26. Wessels MR, Kasper DL. Antibody Recognition of the type 14 pneumococcal capsule. evidence of conformational epitope in a neutral polysaccharide. *J Exp Med*. 1989;169(6):2121-31.

27. Mawas F, Niggemann J, Jones C, Corbel MJ, Kamerling JP, Vliegenthart JF. Immunogenicity in a mouse model of a conjugate vaccine made with a synthetic single repeating unit of type 14 pneumococcal polysaccharide coupled to CRM197. *Infect Immun*. 2002; 70(9):5107-14.

other difference than in the activation level. It has been observed that PS conjugates of group B *Streptococcus* type III with higher 18-89 % ORU range, higher than the one evaluated by our group, showed increased immunogenicity due to a rise in conjugate cross-linking [31]. Besides, this result was not further reproduced, due to a slight decrease in immunogenicity at a higher ORU percentage [32].

Otherwise, the PS size did influence in the physico-chemical properties of the conjugates, the 30-100 kDa fraction generating the highest rMW and PS/protein ratio. The characterization of conjugates generated from a similar size PS was highly reproducible.

The immune response induced by the conjugates was quantitatively and qualitatively higher than that obtained by the non-conjugated PS. The raise of IgG antibody titers and avidity after each dose of conjugate indicated a thymus-dependent response, involving affinity maturation [33]. The increase in antibody avidity tends to correlate with the increase in protective capacity [34].

The Cj30-100 was more immunogenic than Cj10-30 although no statistically significant after the third dose. This result coincides with that obtained by Daum et al. [35] in children immunized with oligosaccharide or polysaccharide conjugate vaccines. These differences in the elicited immune responses could be influenced by the PS length, but also by the conjugate size [36], the PS/protein ratio [37] or a combination of both factors. In fact, several studies addressing the influence of

PS length on the immunogenicity of their respective conjugates achieved different results [32, 38]. At the same time, the response induced by the Cj10-30 conjugate seems to be more thymus-dependent, due to a faster increase in avidity. The native structure of the polysaccharide determines its thymus-independent type 2 nature, and part of this characteristic was preserved once conjugated to a protein [39]; while conjugates of lower rMW could favor better antigen recognition, a T-dependent one, therefore maximizing the effect of the carrier protein [11]. Nevertheless, those differences after three doses for both conjugates generated IgG antibody responses similar in titers and avidity.

In summary, the procedures described herein, which included the fragmentation of PS6B at molecular size cut-offs of 10-30 and 30-100 kDa, respectively, and their activation at levels from 8 to 18 % of oxidized repetitive units, allowed to obtain reproducibly PS6B conjugates to TT which demonstrated to be immunogenic. The methodology followed to find and establish each reaction conditions is also applicable for establishing polysaccharide conjugation procedures for other pneumococcal serotypes and bacteria.

Acknowledgements

The authors thank to Dr. Cs. Lila Castellanos Serra for the assistance and advice while preparing the manuscript.

28. Laferrière CA, Sood RK, de Muys JM, Michon F, Jennings HJ. *Streptococcus pneumoniae* type 14 polysaccharide-conjugate vaccines: length stabilization of opsonophagocytic conformational polysaccharide epitopes. *Infect Immun.* 1998;66(6):2441-6.

29. Kim JS, Laskowich ER, Michon F, Kaiser RE, Arumugham RG. Monitoring activation sites on polysaccharides by GC-MS. *Anal Biochem.* 2006;358(1):136-42.

30. Gudlavalleti SK, Lee CH, Norris SE, Paul-Satyaseela S, Vann WF, Frasch CE. Comparison of *Neisseria meningitidis* serogroup W135 polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccines made by periodate activation of O-acetylated, non-O-acetylated and chemically de-O-acetylated polysaccharide. *Vaccine.* 2007;25(46):7972-80.

31. Wessels MR, Paoletti LC, Guttormsen HK, Michon F, D'Ambra AJ, Kasper DL. Structural properties of group b streptococcal type III polysaccharide conjugate vaccines that influence immunogenicity and efficacy. *Infect Immun.* 1998;66(5):86-2192.

32. Michon F, Uitz C, Sarar A, D'Ambra AJ, Laude-Sharp M, Moore S, Fusco PC. Group B Streptococcal Type II and III Conjugate Vaccines. Physicochemical Properties that Influence Immunogenicity. *Clin Vaccine Immunol.* 2006;13(18):936-43.

33. Wuorimaa T, Dagan R, Väkeväinen M, Bailleux F, Haikala R, Yaich M, et al. Avidity and subclasses of IgG after immunization of infants with an 11-valent pneumococcal conjugate vaccine with or without aluminum adjuvant. *J Infect Dis.* 2001;184(9):1211-5.

34. Usinger WR, Lucas AH. Avidity as a determinant of the protective efficacy of human antibodies to pneumococcal capsular polysaccharides. *Infect Immun.* 1999;67:2366-70.

35. Daum RS, Hogerman D, Rennels MB, Bewley K, Malinoski F, Rothstein E, et al. Infant immunization with pneumococcal CRM197 vaccines: effect of saccharide size on immunogenicity and interactions with simultaneously administered vaccines. *J Infect Dis.* 1997; 176(2):445-55.

36. An SJ, Yeon YK, Kothari S, Kothari N, Kim JA, Lee E, et al. Physico-chemical properties of *Salmonella typhi* Vi polysaccharide-diphtheria toxoid conjugate vaccines affect immunogenicity. *Vaccine.* 2011;29(44):7618-23.

37. Dick WE Jr, Beurret M. Glycoconjugates of bacterial carbohydrate antigens. A survey and considerations of design and preparation factors. *Contrib Microbiol Immunol.* 1989; 10:48-114.

38. Laferrière CA, Sood RK, de Muys JM, Michon F, Jennings HJ. The synthesis of *Streptococcus pneumoniae* polysaccharide-tetanus toxoid conjugates and the effect of chain length on immunogenicity. *Vaccine.* 1997; 5(2):179-86.

39. Mäkelä O, Péterfy F, Ootschoorn IG, Richter AW, Seppälä I. Immunogenic properties of alpha (1→6) dextran, its protein conjugates, and conjugates of its breakdown products in mice. *Scand J Immunol.* 1984;19(6):541-50.

Received in January 2013.

Accepted in April, 2013.