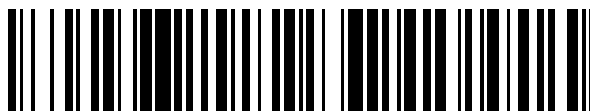


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 444 693**

51 Int. Cl.:

A61K 39/02 (2006.01)

C07K 16/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.05.2009** **E 09006113 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2013** **EP 2248533**

54 Título: **Polipéptido derivado de enterococo y su uso para vacunación**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.02.2014

73 Titular/es:

UNIVERSITÄTSKLINIKUM FREIBURG (100.0%)
Hugstetter Strasse 49
79106 Freiburg, DE

72 Inventor/es:

HÜBNER, JOHANNES;
KROPEC-HÜBNER, ANDREA y
SAVA, IRINA

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 444 693 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Polipéptido derivado de enterococo y su uso para vacunación

Los enterococos están entre los tres patógenos nosocomiales más comunes y, debido a sus resistencias a múltiples antibióticos, causan morbilidad y mortalidad sustanciales, especialmente entre pacientes de cuidados intensivos y los inmunodeprimidos. Aunque en la última década se han presentado varios nuevos antibióticos, la resistencia contra estos nuevos fármacos se está desarrollando y propagando rápidamente. Una enfermedad sistémica potencialmente letal tal como endocarditis causada por cepas resistentes puede ser, a veces, intratable. Por lo tanto, se necesitan desesperadamente estrategias de tratamiento y prevención alternativas para contrarrestar el incremento de clones resistentes de forma múltiple en hospitales y clínicas particulares en todo el mundo. Una mejor comprensión de las diferentes estructuras de la superficie celular de enterococos ayudará a dirigir nuevos enfoques terapéuticos y profilácticos.

Se sabe que todas las bacterias gram positivas (también aquellas que pertenecen al género *Enterococcus*) contienen en la pared celular varios carbohidratos y proteínas específicas. En el curso de la presente invención, se ha identificado una proteína que desempeña un posible papel en el equilibrio dinámico de un componente fundamental de la pared celular externa (es decir peptidoglucano). Las proteínas que pertenecen a esta familia pueden actuar como peptidasas de la pared celular que degradan el peptidoglucano de las bacterias durante el crecimiento y la división celular.

Teng Fang et al., (Infection and Immunity 71: 5033-5042, 2003) desvelan un homólogo de Sag A en *Enterococcus faecium*, que parece estar implicado en el metabolismo de la pared celular. La proteína es inmunógena.

El documento US 6 583 275 describe proteínas de *Enterococcus faecium*.

Sorprendentemente, se ha comprobado que un polipéptido que probablemente está ubicado en la superficie externa de la célula bacteriana puede usarse para la producción de vacunas, dado que han sido identificados anticuerpos protectores dirigidos contra partes de dicho polipéptido.

La respuesta inmunitaria humoral está mediada por moléculas de anticuerpo secretadas por células plasmáticas. El antígeno que se une al receptor antigénico de células B, señala células B y es, al mismo tiempo, internalizado y procesado a péptidos que activan células T auxiliares armadas. Las señales procedentes del antígeno unido y de la célula T auxiliar inducen a la célula B a proliferar y diferenciarse en células plasmáticas que secretan un anticuerpo específico. Estos anticuerpos protegen al huésped frente a la infección de tres maneras principales. En primer lugar, dichos anticuerpos pueden inhibir los efectos tóxicos o la infectividad de patógenos uniéndose a ellos. Dichos anticuerpos se denominan neutralizantes. En segundo lugar, recubriendo los patógenos, dichos anticuerpos pueden permitir que células accesorias que reconocen las partes Fc de matrices de anticuerpos ingieran e inactiven al patógeno. Este proceso se denomina opsonización. En tercer lugar, los anticuerpos pueden desencadenar la activación del sistema del complemento. Las proteínas del complemento pueden potenciar fuertemente la opsonización o pueden inactivar directamente ciertas células bacterianas.

Para la producción de vacunas, es importante que el antígeno produzca anticuerpos que inhiban la actividad patógena del microorganismo patógeno. Los anticuerpos protectores producidos por una vacuna tienen, por lo tanto, el efecto de neutralización, opsonización y activación del complemento, con lo cual anticuerpos inducidos por un antígeno específico también pueden tener dos o incluso tres de las actividades protectoras.

La presente invención proporciona el uso del polipéptido de acuerdo con la SEC ID N° 1 y el anticuerpo monoclonal, tal como se definen en las reivindicaciones adjuntas.

La SEC ID N° 1 tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

MKKSLISAVMVCSMTLTAVASPIAAAADDFDSQIQQQDQKIADLKNQQADAQSQIDALESQVSEINTQAAQ
 DLLAKQDTRLQESAQLVKDIADLQERIEKREDTIQKQAREAQVSNSTSSNYIDAVLNADSLADAIGRVQAM
 TTMVKANNLMEQKQDKKAVEDKKAENDAKLKEAENQAALLESQKGDLLSKQADLNVLKTSLAAEQATA
 EDKKADLNRQKAEAEAEQARIREQQRLAEQARQQAQAEKAEKEAREQAEAEQATQASSTAQSSATEESS
 ATQSSMTEESSSATQSSATEESTTPESSTEESTAPESSATEESTTAPESSTATEESTTVPESSATEESTTV
 PESSTTEESTTPAPPTPSTDDQSVDTGNGTGSSTPAPTPTPTPEQPKPVPAPAPSGSVNGAAIVAEAYKY
 IGTPTYVWGGKDPGSGFDCSGFTRYVYMQVTGRDIGGWTPQESAGTKISVSQAKAGDLLFWGSQGGTYHVA
 IALGGGQYIHAPQPGESVKVGSVQWFAPDFAVSM

(SEC ID N° 1)

En una realización preferida, el polipéptido de la SEC ID N° 1 se usa como conjugado, con lo que el antígeno está unido covalentemente a un inmunoportador. Dicho inmunoportador puede ser un polipéptido o una proteína o una molécula que contiene carbohidratos (tal como por ejemplo un polisacárido capsular o glucoconjugado) que mejora la interacción entre células T y B para la inducción de una respuesta inmunitaria contra el antígeno. Esto puede preferirse para vacunas destinadas al uso en pacientes con actividad reducida del sistema inmunitario. Dado que las

infecciones por enterococos son, frecuentemente, un problema en hospitales y clínicas particulares, dichos conjugados son particularmente preferidos para dichos pacientes. Los inmuoportadores adecuados de acuerdo con la presente invención comprenden toxoide tetánico, toxoide diftérico, toxina A de *Pseudomonas aeruginosa* o sus derivados de la misma. Moléculas que contienen carbohidratos tales como polisacáridos capsulares o ácidos teicoicos también pueden servir como socio de conjugación para el polipéptido mencionado anteriormente o fragmentos del mismo. En una realización espacialmente preferida, se usan dichos fragmentos del inmuoportador que estimulan la respuesta inmunitaria en el paciente a tratar sin tener, sin embargo, el efecto secundario no deseado que dichas proteínas pueden producir cuando se usan en una forma no modificada.

El enlace covalente entre el antígeno y el inmuoportador puede proporcionarse mediante un enlace químico directo o mediante un separador. Algunas veces, moléculas cortas que tienen dos grupos reactivos en ambos extremos se hacen reaccionar con el antígeno y el inmuoportador para producir una molécula enlazada covalentemente.

En una alternativa, la molécula usada como vacuna (antígeno e inmuoportador) puede producirse de forma recombinante, con lo que fragmentos de genes adecuados son enlazados entre sí y son insertados en un vector apropiado. Dicho vector es introducido en una célula huésped adecuada y la célula huésped (por ejemplo *E. coli*, *Bacillus*, levadura o células de insecto) produce el polipéptido o fragmento del mismo tal como se ha definido anteriormente, junto con el inmuoportador como una molécula.

El polipéptido, en solitario o acoplado a un inmuoportador, puede usarse para el tratamiento o la prevención de infecciones bacterianas. Dicho medicamento es una vacuna que comprende preferentemente también un adyuvante farmacéuticamente aceptable. El adyuvante promueve los anticuerpos protectores del subtipo IgG. Los adyuvantes típicos incluyen adyuvante completo de Freund (ACF), adyuvante incompleto de Freund (AIF), alumbre y otros adyuvantes adecuados para uso humano (por ejemplo partículas similares a virus). Polímeros como sulfato de dextrano han demostrado ser también un potente estimulador de anticuerpos IgG contra el antígeno de la superficie celular bacteriana.

Una vacuna activa es administrada al paciente, preferentemente antes de que se produzca una infección. Dicha vacunación puede aplicarse, por lo tanto, regularmente a pacientes en riesgo (por ejemplo ancianos, pacientes antes de un trasplante de un órgano sólido o de médula ósea) para estimular su respuesta inmunitaria y para evitar una infección en un hospital o una clínica particular.

En circunstancias específicas también puede ser posible, sin embargo, aplicar la vacuna en fases tempranas de la infección para producir anticuerpos protectores que inactivan las bacterias que pertenecen al género *Enterococcus*. En una realización preferida, la vacuna de la presente invención proporciona protección contra diferentes cepas de *Enterococcus faecium* y posiblemente también contra cepas de *Enterococcus faecalis*, dado que existe una amplia homología de secuencia entre estas especies.

Los anticuerpos inducidos por la proteína de la SEC ID N° 1 son protectores y facilitan la fagocitosis. Dado que dichos anticuerpos protectores y, en particular, opsónicos son preferidos, se desea usar aquellas partes del polipéptido de la SEC ID N° 1 que producen anticuerpos que tienen propiedades opsónicas.

La formulación farmacéutica de un medicamento que se usará como vacuna es conocida por el experto en la materia. Habitualmente, una solución del antígeno posiblemente acoplado a un inmuoportador es disuelta en una solución fisiológicamente aceptable como un tampón. La solución debe estabilizarse para evitar una precipitación no deseada de los compuestos inmunológicamente activos. La vacuna es producida preferentemente en forma de una solución adaptada para inyección, preferentemente inyección por vía intramuscular. Otras formas de formulaciones farmacéuticas como emplastos o pulverizados también son aceptables, siempre que el antígeno entre en contacto suficiente con el sistema inmunitario y se desencadene la formación de anticuerpos específicos.

Por otro lado, a veces no es posible tratar pacientes con una vacuna activa, dado que el sistema inmunitario está gravemente alterado. En esas circunstancias el polipéptido de la SEC ID N° 1 tal como se ha definido anteriormente puede usarse para producir anticuerpos policlonales o anticuerpos monoclonales que se unen a u opsonizan *Enterococcus*. El experto en la materia es muy consciente de cómo pueden prepararse dichos anticuerpos.

El inóculo para la producción de anticuerpos policlonales se prepara típicamente dispersando el antígeno o el conjugado antígeno-inmuoportador en un diluyente fisiológicamente tolerable tal como solución salina, para formar una composición acuosa. Una cantidad inmuoestimuladora del inóculo preferentemente con adyuvante es administrada a un mamífero y el mamífero inoculado es mantenido a continuación durante un periodo de tiempo suficiente para que el antígeno induzca anticuerpos anti-*Enterococcus* protectores. Después de periodos de tiempo adecuados, de dos semanas hasta cuatro meses, pueden aplicarse dosis de refuerzo del antígeno-inmuoportador y el valor cuantitativo del antígeno es monitorizado. En un momento adecuado, cuando el valor cuantitativo de los anticuerpos neutralizantes u opsónicos está en su máximo, los anticuerpos son recogidos. Dichos anticuerpos pueden incluir preparaciones de anticuerpos de diversos animales usados habitualmente (tales como ratones, cabras, primates, burros, conejos o caballos) y seres humanos, con lo que los anticuerpos se aíslan a partir de donaciones de sangre.

Los anticuerpos inducidos en el mamífero son recogidos, aislados y purificados en la medida deseada mediante técnicas bien conocidas tales como mediante fraccionamiento alcohólico y cromatografía en columna o preferentemente mediante cromatografía por inmutafinidad con lo que el antígeno se une a una columna cromatográfica. El antisuero pasa por la columna, con lo que anticuerpos específicos son retenidos y todos los demás componentes del suero son eliminados por lavado. A continuación, los anticuerpos purificados son eluidos con gradientes adecuados. Puede requerirse una purificación adicional.

Como alternativa, pueden prepararse anticuerpos monoclonales de acuerdo con técnicas bien conocidas por el experto en la materia. Cuando se obtiene un anticuerpo monoclonal adecuado, las regiones de unión pueden ser identificadas y pueden proporcionarse toda la molécula de anticuerpo así como derivados del anticuerpo como fragmentos o subfragmentos de anticuerpo. La técnica general para producir anticuerpos monoclonales está ampliamente descrita en libros de texto. Después de haber preparado los hibridomas o haber seleccionado el anticuerpo monoclonal entre bibliotecas o animales modificados genéticamente, debe determinarse a qué parte del polipéptido de la SEC ID N° 1 se une el mAb. A continuación, debe verificarse si el anticuerpo es opsónico.

Descripción de las figuras

La figura 1 muestra la inactivación opsónica de un antisuero policlonal producido en conejos contra la cepa E155 de *Enterococcus faecium*. Se ensayaron diferentes diluciones séricas e incluso a diluciones elevadas, podía observarse una actividad opsónica sustancial de los anticuerpos generados.

La figura 2 muestra una Transferencia de Western de anticuerpos contra la cepa E155 de *Enterococcus faecium* que se hicieron reaccionar con proteínas derivadas de la cepa homóloga. La pista 1 es un marcador de peso molecular. En la pista 2 se aplicó un lisado de células de *E. faecium* E155. En la pista 3, se aplicó el sobrenadante de cultivo de *E. faecium* E155.

La figura 3 es una Transferencia de Western con un polipéptido expresado de forma recombinante y purificado que tiene la SEC ID N° 1. El polipéptido purificado se había obtenido originalmente de la cepa E155 de *Enterococcus faecium*. Usando cebadores apropiados, el gen se amplificó mediante PCR y se clonó en un vector de expresión para bacterias gram-negativas. La proteína producida por las células huésped se purificó con una columna de Ni a través de un *His-Tag*. La proteína purificada se usó para la producción de anticuerpos policlonales en conejos. Los anticuerpos se usaron en la Transferencia de Western tal como se muestra en la figura 3 y se ensayó su actividad opsónica. La especificidad de los anticuerpos opsónicos se confirmó mediante absorción con la proteína purificada.

La figura 4 muestra los resultados de un ensayo ELISA realizado con el polipéptido purificado que tiene la SEC ID N° 1 y, en comparación con ello, con suero generado contra bacterias termoinactivadas (alfa E155) y suero normal de conejo (NSA).

La figura 5 muestra los resultados de la inhibición opsonofagocítica obtenida con el polipéptido que tiene la SEC ID N° 1.

Ejemplo 1:

En un intento de identificar dianas de anticuerpos opsónicos en *E. faecium*, un conejo se inmunizó con la cepa E155 de *E. faecium* termoinactivada [Leavis, H.L. et al., (2007). Insertion sequence-driven diversification creates a globally dispersed emerging multiresistant subspecies of *E. faecium*. PLoS Pathog 3: e7] que pertenece al complejo clonal 17 (CC17) que está asociado con brotes hospitalarios de enterococos resistentes a vancomicina (ERV) [Top, J. et al., (2008). Emergence of CC17 *Enterococcus faecium*: from commensal to hospital-adapted pathogen. FEMS Immunol Med Microbiol 52: 2997-308]. Las bacterias fueron termoinactivadas a 65°C durante 1 hora y una concentración final de $1,4 \times 10^{12}$ ufc/dosis se inyectó i.v. 3 veces por semana durante un total de 3 semanas. Los sueros resultantes eran opsónicos contra la cepa homóloga (77,8% de inactivación a una dilución sérica de 1:100). Los resultados se muestran en la figura 1.

Ejemplo 2:

El análisis por transferencia de Western mostraba una banda de proteína distinta de aproximadamente 54 kD que estaba presente en extractos celulares y aún más pronunciada en el sobrenadante de cultivo. (Los resultados se muestran en la figura 2.).

Ejemplo 3:

Las 5 cepas de *E. faecium* ensayadas hasta ahora expresaban una banda de proteína del mismo tamaño que la que será detectada mediante el suero de conejo inmune (no se muestran los datos). El análisis Nano LC-ES-MS/MS (análisis a escala nanométrica de cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem) de la banda de gel teñida con azul de Coomassie dio como resultado datos de secuencia que se compararon con las bases de datos NCBI y MASCOT. La homología más alta (valor 1253) se obtuvo con NLP/P60, una proteína de 55 kD de *E. faecium* DO (N° de entrada GI|69245436) [Anantharaman, V. et al. (2003). Evolutionary history, structural

features and biochemical diversity of the NlpC/P60 superfamily of enzymes. Genome Biol 4: R11].

El gen se amplificó posteriormente a partir de *E. faecium* E155 mediante PCR y se clonó en un vector de expresión His-Tag (Champion pET Directional TOPO Expression Kit, Invitrogen). La proteína expresada se purificó en columnas de níquel en condiciones desnaturizantes y la proteína purificada demostró ser reactiva con los sueros de conejo generados contra células completas de *E. faecium* E155. (Los resultados se muestran en la figura 3).

Ejemplo 4:

Un conejo se inmunizó con la proteína purificada (2 veces 10 µg por vía subcutánea (SC) mezclados con adyuvante incompleto de Freuds y administrados a intervalos de 2 semanas y en la tercera semana 3 veces 5 µg IV) sin adyuvante. Dos semanas después de la última inyección, los valores cuantitativos se verificaron mediante ELISA (véase la figura 4), y mediante ensayo opsonofagocítico (véase la figura 5).

Ejemplo 5:

Para confirmar la especificidad, se realizó un ensayo de inhibición opsonofagocítica que mostraba que 100 µg de proteína purificada eran capaces de inhibir la inactivación en casi el 100%, mientras que cantidades inferiores inhibían la inactivación de manera dependiente de la dosis (véase la figura 5). El ensayo opsonofagocítico se realizó tal como se describe en otra parte [Theilacker, C. et al., Opsonic antibodies to Enterococcus faecalis strain 12030 are directed against lipoteichoic acid. Infect Immun (2006) 74: 5703-12]. En resumen, suero de cría de conejo (dilución 1:15), PMN humanos, y diluciones séricas apropiadas se mezclaron con bacterias cultivadas hasta la fase logarítmica (relación bacterias con respecto a PMN 1:1). La mezcla se incubó en una gradilla giratoria a 37°C. Después de 90 minutos, los leucocitos se lisaron y diluciones apropiadas se colocaron en placas de agar de soja triptico. Las placas se incubaron durante una noche y al día siguiente se contaron las colonias.

En resumen, estos datos confirman que el polipéptido que tiene la SEC ID N° 1 de *E. faecium* es un candidato a vacuna que induce anticuerpos opsonicos contra aislados clínicos de *E. faecium* resistente a vancomicina.

Ejemplo 6:

La eficacia protectora de anticuerpos contra el polipéptido que tiene la SEC ID N° 1 se demostró en un modelo de bacteriemia en ratón. Ratones balb/c hembra (8 ratones por grupo) recibieron 200 µl de suero normal de conejo (NRS) o suero generado contra el polipéptido que tiene la SEC ID N° 1 (IRS). Los animales fueron estimulados con *E. faecium* E155 después de 24 horas ($1,18 \times 10^{10}$ ufc/ratón) y recibieron una segunda dosis de 200 µl de suero de conejo (NRS o IRS) 2 h después de la inoculación. Los ratones fueron sacrificados 8 horas después de la infección y se determinaron los recuentos de colonias en la sangre. Estos resultados muestran una reducción estadísticamente significativa de los recuentos de colonias de sangre cuando los ratones recibían IRS.

E. faecium posee una proteína asociada a la superficie celular de aproximadamente 54 kD que es secretada al medio de cultivo e induce anticuerpos específicos en conejos inmunizados con *E. faecium* termoinactivada. La proteína se identificó mediante análisis Nano LC-ES-MS/MS, se amplificó mediante PCR y se clonó en un vector de expresión gram-negativo. La proteína recombinante purificada se usó para inmunizar a un conejo y el antisuero resultante demostró mediante ELISA unirse específicamente a la proteína. Los sueros de conejo inactivaron la cepa homóloga >50% a una dilución sérica de 1:10 y la actividad de inactivación podía absorberse completamente con el antígeno purificado. Dos aplicaciones de suero (24 h antes y 2 h después de la inoculación) reducían estadísticamente los recuentos de colonias en la sangre de ratones, confirmando que este antígeno es una diana de vacuna prometedora para bacteriemia por *Enterococcus* resistente a vancomicina (ERV).

LISTA DE SECUENCIAS

<110> universitätsklinikum Freiburg

<120> Polipéptido derivado de enterococo y su uso para vacunación

<130> ZEE20090202

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 524

<212> PRT

<213> Enterococo

<400> 1

Met Lys Lys Ser Leu Ile Ser Ala Val Met Val Cys Ser Met Thr Leu
1 5 10 15

Thr Ala Val Ala Ser Pro Ile Ala Ala Ala Asp Asp Phe Asp Ser
20 25 30

Gln Ile Gln Gln Gln Asp Gln Lys Ile Ala Asp Leu Lys Asn Gln Gln
35 40 45

Ala Asp Ala Gln Ser Gln Ile Asp Ala Leu Glu Ser Gln Val Ser Glu
50 55 60

Ile Asn Thr Gln Ala Gln Asp Leu Leu Ala Lys Gln Asp Thr Leu Arg
65 70 75 80

Gln Glu Ser Ala Gln Leu Val Lys Asp Ile Ala Asp Leu Gln Glu Arg
85 90 95

Ile Glu Lys Arg Glu Asp Thr Ile Gln Lys Gln Ala Arg Glu Ala Gln
100 105 110

Val Ser Asn Thr Ser Ser Asn Tyr Ile Asp Ala Val Leu Asn Ala Asp
115 120 125

Ser Leu Ala Asp Ala Ile Gly Arg Val Gln Ala Met Thr Thr Met Val
130 135 140

Lys Ala Asn Asn Asp Leu Met Glu Gln Gln Lys Gln Asp Lys Lys Ala
145 150 155 160

Val Glu Asp Lys Lys Ala Glu Asn Asp Ala Lys Leu Lys Glu Leu Ala
165 170 175

Glu Asn Gln Ala Ala Leu Glu Ser Gln Lys Gly Asp Leu Leu Ser Lys
180 185 190

Gln Ala Asp Leu Asn Val Leu Lys Thr Ser Leu Ala Ala Glu Gln Ala

195	200	205
Thr 210	Ala 215	Glu Asp Lys Lys Ala Asp Leu Asn Arg Gln Lys Ala Glu Ala 220
Glu 225	Ala Glu Gln Ala Arg 230	Ile Arg Glu Gln Gln Arg Leu Ala Glu Gln 235 240
Ala Arg Gln Gln Ala 245	Ala Gln Glu Lys Ala 250	Glu Lys Glu Ala Arg Glu 255
Gln Ala Glu Ala Glu Ala Gln Ala Thr 260 265	Gln Ala Ser Ser Thr 270	Ala Gln
Ser Ser Ala Thr Glu Glu Ser 275 280	Ser Ala Thr Gln Ser Ser Met Thr Glu 285	
Glu Ser Ser Ser Ala Thr 290 295	Gln Ser Ser Ala Thr Glu Glu Ser Thr Thr 300	
Pro Glu Ser Ser Thr 305 310	Glu Glu Ser Thr Ala Pro Glu Ser Ser Ala Thr 315 320	
Glu Glu Ser Thr Thr 325	Ala Pro Glu Ser Ser Ala Thr Glu Glu Ser Thr 330 335	
Thr Val Pro Glu Ser Ser Ala Thr 340 345	Glu Glu Ser Thr Thr Val Pro Glu 350	
Ser Ser Thr Thr Glu Glu Ser 355 360	Thr Thr Pro Ala Pro Thr Thr Pro Ser 365	
Thr Asp Gln Ser Val Asp Thr 370 375	Gly Asn Gly Thr Gly Ser Ser Thr Pro 380	
Ala Pro Thr Pro Thr 385 390	Pro Thr Pro Glu Gln Pro Lys Pro Val Thr Pro 395 400	
Ala Pro Ala Pro Ser 405	Gly Ser Val Asn Gly Ala Ala Ile Val Ala Glu 410 415	
Ala Tyr Lys Tyr Ile Gly Thr Pro Tyr 420 425	Val Trp Gly Gly Lys Asp Pro 430	
Ser Gly Phe Asp Cys Ser Gly Phe Thr Arg Tyr Val 435 440	Tyr Met Gln Val 445	
Thr Gly Arg Asp Ile Gly 450 455	Gly Trp Thr Val Pro Gln Glu Ser Ala Gly 460	
Thr Lys Ile Ser Val Ser Gln Ala Lys Ala Gly Asp Leu Leu Phe Trp		

ES 2 444 693 T3

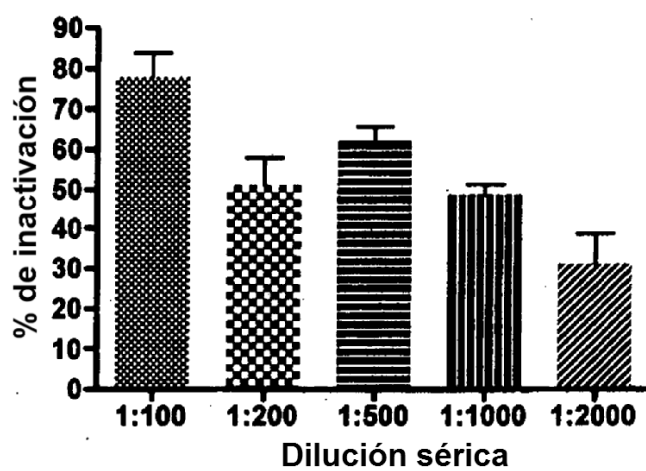
465					470						475				480
Gly	Ser	Gln	Gly	Gly	Thr	Tyr	His	Val	Ala	Ile	Ala	Leu	Gly	Gly	Gly
				485					490					495	
Gln	Tyr	Ile	His	Ala	Pro	Gln	Pro	Gly	Glu	Ser	Val	Lys	Val	Gly	Ser
			500					505					510		
Val	Gln	Trp	Phe	Ala	Pro	Asp	Phe	Ala	Val	Ser	Met				
		515					520								

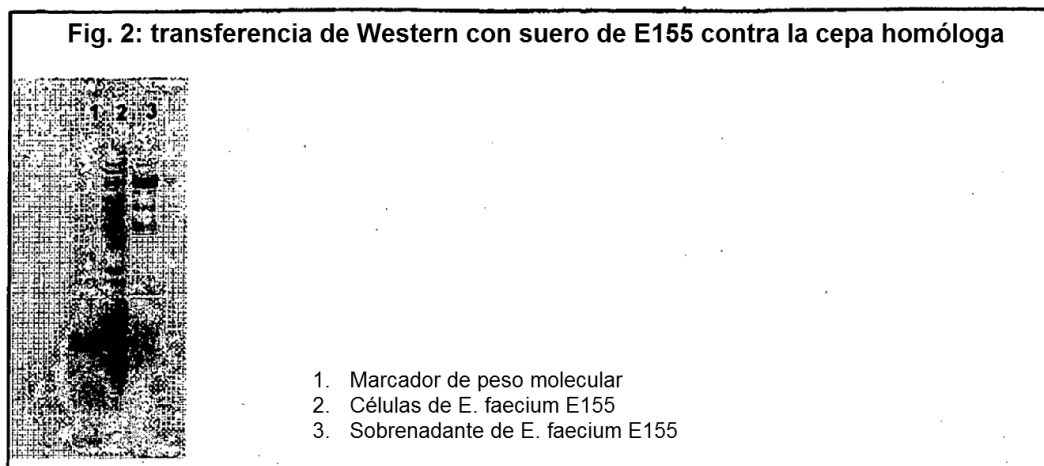
REIVINDICACIONES

1. Uso de un polipéptido de acuerdo con la SEC ID N° 1 para la generación de anticuerpos opsónicos contra *Enterococcus*.
- 5 2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polipéptido está enlazado covalentemente a un inmuoportador, en particular una proteína, un carbohidrato y/o un glucoconjugado.
3. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicho polipéptido se usa junto con un adyuvante farmacéuticamente aceptable.
4. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dichos anticuerpos opsónicos son contra *Enterococcus faecium* o *E. faecalis*.
- 10 5. Uso de un polipéptido de acuerdo con la SEC ID N° 1 para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una infección bacteriana.
6. El uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el polipéptido está enlazado covalentemente a un inmuoportador, en particular una proteína, un carbohidrato y/o un glucoconjugado.
7. El uso de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, en el que el medicamento es una vacuna.
- 15 8. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que dicho polipéptido se usa junto con un adyuvante farmacéuticamente aceptable.
9. Anticuerpo monoclonal que reacciona específicamente con un polipéptido de acuerdo con la SEC ID N° 1, o dicho polipéptido enlazado covalentemente a un inmuoportador, **caracterizado porque** el anticuerpo es opsónico contra *Enterococcus*.

20

Fig. 1: Inactivación opsónica de suero de conejo contra *E. faecium* E155





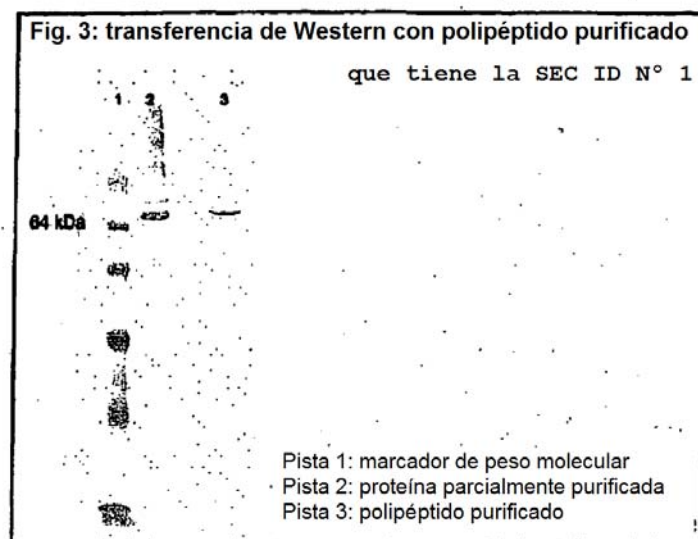
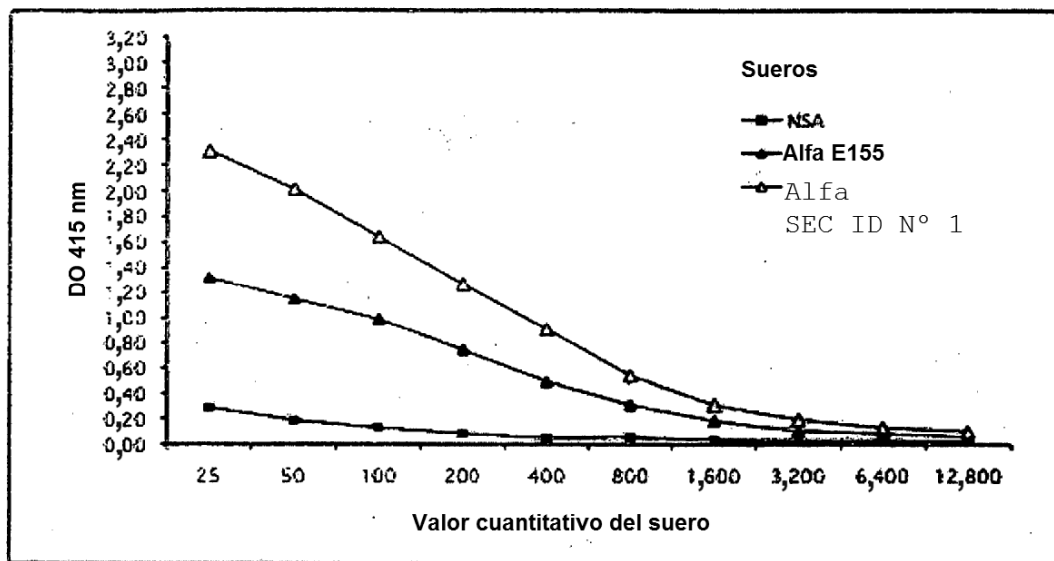


Fig. 4: ELISA con polipéptido purificado que tiene la SEC ID N° 1



NSA: suero de conejo antes de la inmunización
 Alfa E155: suero generado contra bacterias termoinactivadas
 Alfa SEC ID N° 1: suero generado contra la proteína recombinante

**Fig. 5: Inhibición opsonofagocítica
con el polipéptido que tiene la SEC ID N° 1**

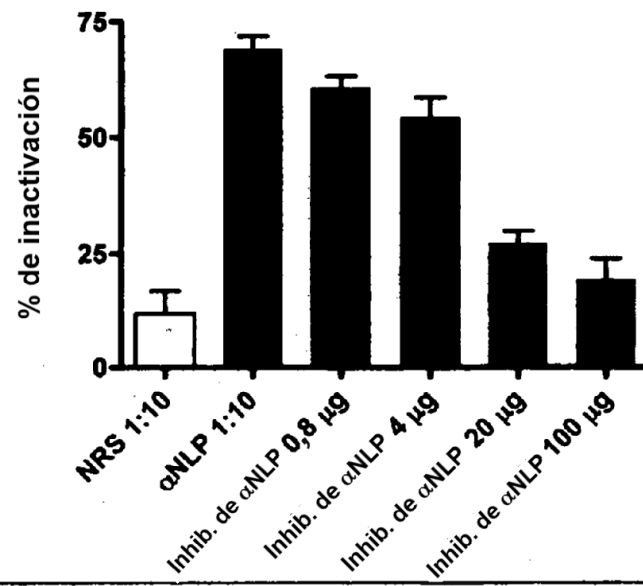
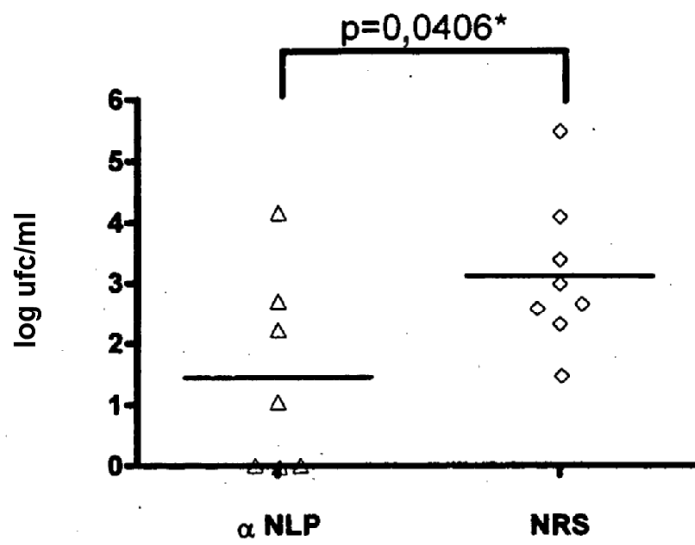


Fig. 6: Bacteriemia en ratón con *E. faecium* E155



* test t para datos independientes