

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 122**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/07** (2006.01)

**C07H 15/04** (2006.01)

**C08B 37/00** (2006.01)

**G01N 33/569** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.11.2007** **E 07846571 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.09.2014** **EP 2099824**

54 Título: **Antígeno de Enterococcus faecalis y/o Enterococcus faecium**

30 Prioridad:

**13.11.2006 DE 102006053385**

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

**17.12.2014**

73 Titular/es:

**UNIVERSITÄTSKLINIKUM FREIBURG (100.0%)  
HUGSTETTER STRASSE 49  
79106 FREIBURG, DE**

72 Inventor/es:

**HÜBNER, JOHANNES;  
HOLST, OTTO;  
THEILACKER, CHRISTIAN y  
KACZYNSKI, ZBIGNIEW**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 525 122 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**

Antígeno de *Enterococcus faecalis* y/o *Enterococcus faecium*

El presente invento se refiere en general al sector de la detección y la prevención de enfermedades infecciosas que son provocadas por *Enterococcus faecalis* y/o *Enterococcus faecium*.

5 En particular, el presente invento se refiere a un antígeno según la reivindicación 1, a unos anticuerpos de acuerdo con las reivindicaciones 8 y 26, a unas composiciones de acuerdo con la reivindicación 9, a unos procedimientos de acuerdo con las reivindicaciones 13 y 27, a un estuche de acuerdo con la reivindicación 19 y a una utilización de acuerdo con la reivindicación 24.

10 Las infecciones nosocomiales (infecciones hospitalarias) son unas infecciones provocadas por microorganismos que están en conexión causal con una permanencia en el hospital.

En los Estados Unidos de América (EE.UU.) la proporción de infecciones nosocomiales aumentó en un 36 % desde 1975 hasta 1995, de manera tal que en el año 1995 aproximadamente 10 de 1.000 pacientes habían resultado afectados por una infección de este tipo.

15 Las infecciones nosocomiales son por lo tanto responsables de 44.000 a 98.000 casos mortales por año, solamente en los EE.UU.

Las infecciones de hospitales son responsables de una gran parte de todas las complicaciones que aparecen en estos hospitales, y cuya evitación es esencial para la calidad del abastecimiento de los pacientes con medicinas y con cuidados a los enfermos.

20 Ellas son por lo tanto un problema que se ha de considerar como grave para cada hospital, puesto que, tal como es sabido, la meta más alta de todas las acciones orientadas hacia la calidad está en el tratamiento hospitalario de los pacientes sanos.

25 Las infecciones nosocomiales no solamente gravan a los pacientes propiamente dichos mediante trastornos adicionales, sino que en la mayor parte de los casos de los pacientes ellas prolongan también la permanencia en los hospitales – en promedio por aproximadamente 4 días – y contribuyen por consiguiente a la sobrecarga de los hospitales y del sistema sanitario. En los EE.UU. las infecciones nosocomiales causan por cada año unos gastos por el importe de 17 a 29 millardos de dólares USA.

A pesar del indiscutible progreso médico se espera que en el futuro aumente más bien la frecuencia de las infecciones nosocomiales.

Entre otros, los siguientes factores son hechos responsables de este desarrollo:

- 30 - está aumentando el número de los pacientes con una edad elevada,  
- los pacientes con una defensa debilitada propia del cuerpo contra infecciones son tratados en los hospitales en un número creciente,  
- se están llevando a cabo unas operaciones quirúrgicas más complicadas y más difíciles a causa de los progresos en la técnica quirúrgica,  
35 - se pueden llevar a cabo de modo creciente unas complicadas medidas técnicas invasivas en cuanto a aparatos, con un riesgo elevado de infecciones,  
- se están llevando a cabo de modo creciente unas medidas técnicas terapéuticas que disminuyen el poder de defensa; y  
40 - se están empleando de un modo multiplicado unos antibióticos, en particular unos antibióticos de amplio espectro, lo cual contribuye al aumento de los microorganismos multirresistentes.

Unos estudios más recientes que se llevaron a cabo en este contexto (Am. J. Infect. Control., 32:470-485, 2004) han mostrado que hasta un 25 % de los materiales aislados de *Enterococcus faecium* procedentes de hospitales son resistentes contra los antibióticos glicopeptídicos.

45 Los antibióticos glicopeptídicos atacan a las paredes celulares y se insertan directamente en la estructura de las paredes celulares, con lo cual resultan agujeros y puede penetrar agua. Un ejemplo de antibióticos glicopeptídicos es la vancomicina.

Diaz Granados, C.A., y colaboradores han mostrado hace poco tiempo que unos enterococos resistentes a la vancomicina causan una morbilidad y una mortalidad, considerables, en particular en el caso de unos pacientes que por lo demás ya tienen un sistema inmunológico debilitado (Clin. Infect. Dis., 41:327-333, 2005).

5 Existe por lo tanto un constante interés de desarrollar unos modos de aproximación inmunoterapéuticos que permitan evitar estas infecciones o por lo menos controlarlas.

Ciertamente en el estado de la técnica se ha conocido fundamentalmente utilizar antígenos de hidratos de carbono para el desarrollo de vacunas (Ada, G., y colaboradores, Clin. Microbiol. Infect., 9: 79-85, 2003), pero hasta ahora se sabe solamente poca cosa acerca de la acción de polisacáridos asociados con las paredes celulares y capsulares en el caso de *Enterococcus faecalis*.

10 Hasta hoy en día se han descrito cuatro antígenos del tipo de hidratos de carbono (Hancock y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 99:1574-1579, 2002; Hsu y colaboradores, BMC Microbiol., 6:62, 2006; Pazur y colaboradores, J. Biol. Chem., 248: 279-284, 1973; Wang y colaboradores, Carbohydr. Res. 316: 155-160, 1999; Xu y colaboradores, Infect. Immun., 65:4207-4215, 1997; Xu y colaboradores, Infect. Immun. 66:4313-4323, 1998; Xu y colaboradores, Infect. Immun., 68:815-823, 2000), pero se ha presentado un análisis estructural completo solamente para uno de ellos. Además, se ha descrito un antígeno del tipo de hidratos de carbono, que está expuesto en la superficie celular de la cepa FA2-2 de *Enterococcus faecalis* y que se compone de glucosa, galactosa y fosfato de glicerol.

20 El documento de solicitud de patente internacional WO 99/08705 y la cita bibliográfica de Theilacker y colaboradores (en Infect. Immun. 2006, 5703-5712 (2006)) describen unos antígenos del tipo de polisacáridos, que son aislables a partir de *Enterococcus faecalis*, los cuales sin embargo se diferencian en su estructura del antígeno del tipo de polisacárido que se describe en la presente solicitud.

25 Hufnagel y colaboradores (en J. Clin. Microbiol. 42, 2548-2557 (2004)) describen unos sueros con anticuerpos contra células bacterianas enteras de *E. faecalis* del tipo 5. Sin embargo, se describen solamente en general unos anticuerpos contra todos los antígenos capsulares posibles (antisueros policlonales, del tipo de sueros específicos en inglés "type specific sera"). Las citadas "cepas de Maekawa" de esta publicación son, además de esto, una mezcla de los tipos 2 y 5, y por consiguiente los antisueros no son específicos.

30 Con el fin de hacer frente a la problemática que ha sido causada por la aparición de cepas multirresistentes de *Enterococcus faecalis* y de las cepas de *Enterococcus faecium* estrechamente afines, existe en el estado de la técnica una considerable necesidad de caracterizar a unos antígenos que están expuestos sobre la superficie de *Enterococcus faecalis* y/o *Enterococcus faecium*, con el fin de utilizar a éstos para la superación de los problemas más arriba descritos.

Por lo tanto, una misión del presente invento es la de poner a disposición unos antígenos de *Enterococcus faecalis* y/o *Enterococcus faecium* hasta ahora desconocidos.

35 Otra misión del presente invento es la de poner a disposición unos anticuerpos contra estos antígenos de *Enterococcus faecalis* y/o *Enterococcus faecium* hasta ahora desconocidos.

Otra misión del presente invento es la de poner a disposición una composición, que comprenda por lo menos un antígeno de *Enterococcus faecalis* y/o *Enterococcus faecium* o un anticuerpo contra éste, que sea apropiada de manera preferida para la inmunización activa o respectivamente pasiva contra infecciones causadas por *Enterococcus faecalis* y/o *Enterococcus faecium*.

40 Otra misión del presente invento es la de poner a disposición un procedimiento que haga posible la detección del antígeno hasta ahora desconocido en una muestra.

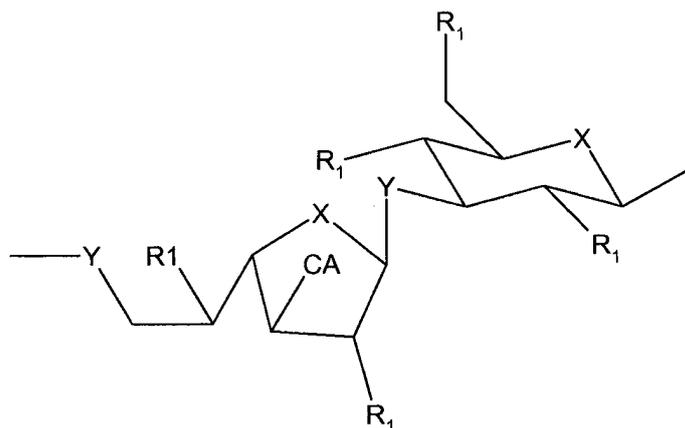
Otra misión del presente invento es la de poner a disposición un procedimiento que haga posible la detección de unos anticuerpos contra el antígeno hasta ahora desconocido en una muestra.

45 **Otra misión** del presente invento es la de poner a disposición un estuche que haga posible la detección del antígeno hasta ahora desconocido o de unos anticuerpos contra este antígeno.

Otra misión del presente invento es la de poner a disposición una posibilidad de utilización del antígeno hasta ahora desconocido para la detección o la producción de unos correspondientes anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, así como un correspondiente procedimiento.

Los problemas planteados por estas misiones del presente invento se resuelven mediante el antígeno de acuerdo con la reivindicación 1, los anticuerpos de acuerdo con las reivindicaciones 8 y 26, las composiciones de acuerdo con la reivindicación 9, los procedimientos de acuerdo con las reivindicaciones 13 y 27, un estuche de acuerdo con la reivindicación 19 y una utilización de acuerdo con la reivindicación 24.

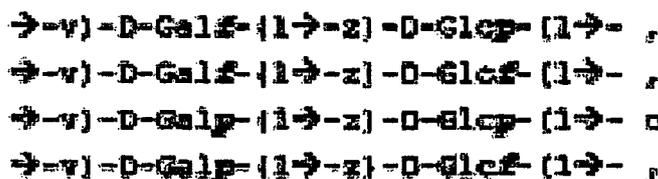
- 5 En particular el presente invento pone a disposición un antígeno de *Enterococcus faecalis* y/o *Enterococcus faecium*, el cual está caracterizado por que él tiene por lo menos una estructura de disacárido que se compone de una furanosa del tipo Gal y de una piranosa del tipo Glc, teniendo la estructura de disacárido la siguiente fórmula



- 10 siendo los  $R_1$ , independientemente unos de otros, OH, OAc,  $OC_nH_m$ , OFo, siendo Fo formilo,  $m = 2n + 1$  y n un número entero de 1 a 10, y siendo  
 $X = O$ ,  
 $Y = O$  y  
 los CA, independientemente unos de otros, un radical acilo de  $C_1-C_6$  o un radical hidroxiacilo.

De manera preferida, en esta unidad los dos azúcares se presentan en la configuración D.

- 15 De manera especialmente preferida, el antígeno del presente invento está caracterizado por el hecho de que el disacárido que se compone de una furanosa del tipo Gal y de una piranosa del tipo Glc tiene una estructura que se selecciona entre las siguientes:



siendo v y z en cada caso 1, 2, 3, 4, 5 ó 6.

- 20 De modo aún más preferido  $R_1$  es = OH, X es = O, Y es = O y CA es = lactilo.

- 25 El peso molecular de los antígenos del presente invento es fundamentalmente no crítico y por lo tanto no está restringido adicionalmente. Típicamente, los antígenos del presente invento tienen sin embargo unos pesos moleculares de aproximadamente 1.000 – 200.000 Da, de manera más preferida de aproximadamente 50.000-150.000 Da, de manera preferida de aproximadamente 100.000 Da. Unos pesos moleculares demasiado pequeños pueden tener como consecuencia posiblemente que el antígeno, a causa de las pocas interacciones intramoleculares no pueda formar epítopos estructuralmente estables de ningún tipo, mientras que unos pesos moleculares demasiado altos tienen como consecuencia que tales antígenos sean con frecuencia difíciles de sintetizar y que su estabilidad y durabilidad esté restringida.

- 30 Para el antígeno del presente invento es fundamentalmente suficiente que él contenga por lo menos 1 vez la unidad de la reivindicación 1. No obstante, la antigenicidad del antígeno del presente invento puede ser aumentada por el

hecho de que la unidad se presente para cada antígeno por lo menos 5 veces, de manera preferida por lo menos 10 veces, de manera más preferida por lo menos 100 veces, de manera especialmente preferida por lo menos 1.000 veces.

5 Para diferentes usos analíticos del antígeno del presente invento puede ser además preferido que el antígeno esté inmovilizado. De esta manera, se puede restringir localmente la presencia del antígeno, de manera tal que por ejemplo que en el marco de una agrupación (en inglés array) muchas muestras diferentes puedan ser puestas en contacto con el anticuerpo y analizadas al mismo tiempo y a pesar de ello por separado entre sí. También en el caso de unos procedimientos de purificación que se basan en la afinidad, por ejemplo para unos correspondientes anticuerpos, son útiles unos antígenos inmovilizados.

10 En una forma preferida de realización del presente invento, el antígeno está unido a un soporte, de manera preferida a un soporte de la inmunidad.

Fundamentalmente, la inmovilización se puede efectuar mediante cualquier tipo de interacciones tales como p.ej. fuerzas de Van der Waals, interacciones iónicas, interacciones entre un dipolo y otro dipolo, enlaces de puentes de hidrógeno o interacciones hidrófobas, pero se prefiere que la fijación a los soportes sea de naturaleza covalente.

15 De manera preferida el antígeno del presente invento se pone a disposición en forma de una composición. De acuerdo con una forma preferida de realización, una composición de este tipo comprende por lo menos un soporte farmacéuticamente aceptable. Una sustancia de soporte es, en este caso, cualquier sustancia a la que el antígeno se pueda adicionar y/o unir físicamente. Por ejemplo, de esta manera el antígeno, que por lo demás se puede dosificar solamente con dificultades, puede ser unido a un soporte que sea más fácil de dosificar. Unos ejemplos de  
20 tales soportes son un almidón y una maltodextrina. El concepto de "farmacéuticamente aceptable" significa que el soporte utilizado no es tóxico y no interfiere con la acción del antígeno.

El antígeno del presente invento puede ser administrado a un paciente como una medida preventiva en el marco de una vacunación activa contra enfermedades infecciosas de un paciente, que han sido provocadas por *Enterococcus faecalis* y/o *Enterococcus faecium*. Una meta de tal vacunación es la de estimular a un sistema inmunológico propio  
25 del cuerpo, a que forme anticuerpos específicos y de esta manera da lugar a una inmunidad específica contra *Enterococcus faecalis* y/o *Enterococcus faecium*. Como tales pacientes entran en consideración por lo tanto todos los seres vivos que disponen de un sistema inmunológico. Tienen importancia especial sin embargo unos mamíferos, tales como por ejemplo seres humanos, unos primates no humanos, perros, gatos, cerdos, vacas, caballos, cabras y corderos así como unas aves, tales como por ejemplo gallinas, patos, gansos, pavos o  
30 avestruces.

Por consiguiente, en una forma de realización preferida, el antígeno del presente invento constituye una vacuna contra *Enterococcus faecalis* y/o *Enterococcus faecium*.

Es asimismo objeto del presente invento un anticuerpo monoclonal que está dirigido contra el antígeno que más arriba se ha descrito.

35 Los anticuerpos se componen de dos cadenas pesadas (en inglés heavy chains, H) idénticas y de dos cadenas ligeras (en inglés light chains, L) idénticas, que están unidas unas con otras mediante unos puentes de disulfuro covalentes para dar una estructura en forma de ípsilon. Las dos cadenas ligeras son, dependiendo del organismo y de la subclase de inmunoglobulina, o bien del tipo kappa o del tipo lambda y forman en común con la porción de las cadenas pesadas que están situadas por encima de la región de articulación (en inglés hinge region), el fragmento  
40 Fab, que se fija a los antígenos, que puede ser separado por vía enzimática con respecto del fragmento cristalino Fc situado debajo de él.

La manifiesta variabilidad de los sitios de fijación a anticuerpos (abreviadamente CDR, del inglés Complementarity Determining Region = región determinante de complementariedad) la consigue el organismo a través de la recombinación V (D) J.

45 Las cadenas ligeras se componen en cada caso de un dominio variable y de un dominio constante. Éstos son designados como VL y CL. Por el contrario, las cadenas pesadas tienen en cada caso un dominio variable y 3 dominios constantes. Éstos, de una manera análoga, se designan como VH y CH1, CH2, CH3.

Unos anticuerpos en el sentido del presente invento son unos anticuerpos enteros o unos fragmentos Fab o scFv, estando supuesto que éstos están en situación de fijarse al antígeno por lo menos de una manera restringida.

50 Unos antígenos humanizados y quiméricos están abarcados asimismo por el presente invento.

Un anticuerpo de este tipo y/o el antígeno del presente invento se puede(n) emplear por ejemplo en el marco de

- un procedimiento de ELISA para la cuantificación de antígenos o anticuerpos, por ejemplo en un suero, en materiales sobrenadantes de cultivos celulares, etc., mediante unos anticuerpos acoplados a enzimas,
- un procedimiento ELISPOT para la detección de unas células que segregan anticuerpos o antígenos (células plasmáticas) mediante unos anticuerpos acoplados a enzimas,
- 5 - un procedimiento FACS para la cuantificación de células mediante unos anticuerpos acoplados con colorantes fluorescentes contra antígenos sobre la superficie de las células, en el citoplasma o en el núcleo celular,
- una transferencia de borrones Western,
- un experimento de Supergelshift (también denominado EMSA),
- 10 - una representación gráfica de fagos,
- un ensayo Drugwipe,
- un procedimiento Abzyme o
- un procedimiento para la purificación de los antígenos o respectivamente anticuerpos del presente invento mediante un correspondiente proceso de afinidad.

15 Igual que el antígeno, también el anticuerpo del presente invento es puesto a disposición de manera preferida en el marco de una composición, que a su vez – al igual que también el antígeno - comprende de manera preferida un soporte farmacéuticamente aceptable.

20 El anticuerpo del presente invento se puede utilizar para la vacunación pasiva contra *Enterococcus faecalis* y/o *Enterococcus faecium* y de esta manera constituye una vacuna contra *Enterococcus faecalis* y/o *Enterococcus faecium*.

En el caso de una vacunación pasiva, se vacuna con un suero de vacunación que contiene los anticuerpos específicos del presente invento contra *Enterococcus faecalis* y/o *Enterococcus faecium*, de manera preferida en una alta concentración.

25 Fundamentalmente, las composiciones del presente invento son de manera preferida unas composiciones farmacéuticas. Éstas se distinguen por el hecho de que ellas son apropiadas para la administración en el marco de una terapia o profilaxia.

Otro objeto del presente invento es un procedimiento para la detección de anticuerpos de *Enterococcus faecalis* y/o *Enterococcus faecium*, comprendiendo el procedimiento las siguientes etapas:

- poner en contacto a unos antígenos de acuerdo con el presente invento con una muestra que se ha de ensayar para descubrir anticuerpos de *Enterococcus faecalis* y/o *Enterococcus faecium*
  - 30 - detectar complejos de anticuerpos y antígenos o de conjugados de anticuerpos y antígenos,
- indicando la presencia de tales complejos la presencia de anticuerpos de *Enterococcus faecalis* y/o *Enterococcus faecium* en la muestra.

35 Asimismo está abarcado por el presente invento un procedimiento para la detección de antígenos de *Enterococcus faecalis* y/o *Enterococcus faecium* con por lo menos las siguientes etapas:

- poner en contacto a unos anticuerpos de acuerdo con el presente invento, opcionalmente inmovilizados sobre un soporte, con una muestra que se ha de ensayar para descubrir antígenos de *Enterococcus faecalis* y/o *Enterococcus faecium*, y
  - 40 - detectar complejos de antígenos y anticuerpos o de conjugados de anticuerpos y antígenos,
- indicando la presencia de tales complejos la presencia de antígenos de *Enterococcus faecalis* y/o *Enterococcus faecium* en la muestra.

Es preferido en los dos procedimientos anteriores que los antígenos o respectivamente anticuerpos estén inmovilizados sobre una matriz, en particular sobre una matriz sólida, de manera preferida sobre una placa de microtitulación.

45 Alternativamente se puede concebir asimismo que la muestra que se ha de investigar esté inmovilizada sobre una matriz.

50 Ambas cosas facilitan en particular la detección de los conjugados de antígenos y anticuerpos que se han formado, puesto que los componentes no fijados de las muestras se pueden eliminar desde la matriz, por ejemplo por lavado, antes de que se detecten los complejos. Esto disminuye los ruidos y aumenta la precisión de las mediciones, y además de ello, mediante la utilización de una matriz sólida, se facilita la manipulación mecánica de las muestras, de manera tal que el procedimiento del presente invento es apropiado excelentemente, entre otras cosas, para una automatización y por consiguiente por ejemplo para una High-Throughput-Screening = exploración de alto caudal de realización.

La detección de los conjugados de antígenos y anticuerpos puede ser facilitada adicionalmente por el hecho de que el antígeno o respectivamente los anticuerpos del presente invento estén provistos de un marcador detectable.

5 Si, por ejemplo, la muestra que contiene anticuerpos potencialmente contra *Enterococcus faecalis* y/o *Enterococcus faecium*, que se ha de investigar está inmovilizada sobre una matriz y si esta muestra inmovilizada es entonces puesta en contacto con antígenos marcados conformes al invento, entonces, después de haberse efectuado un lavado, las muestras que contienen anticuerpos contra *Enterococcus faecalis* y/o *Enterococcus faecium*, son reconocidas con facilidad por la señal que el marcador pone en libertad sobre el antígeno.

10 Se puede utilizar como marcador cualquier compuesto apropiado que se pueda poner en contacto con los anticuerpos o respectivamente con los antígenos del presente invento sin que mediante este contacto sean reprimidas completamente las interacciones entre antígenos y anticuerpos y produzcan directa o indirectamente una señal detectable constituida como quiera que sea, eventualmente después de una correspondiente activación o de la disposición previa de un sustrato.

Unos apropiados marcadores en el sentido del presente invento son unos marcadores radiactivos, unos marcadores coloreados, unos marcadores enzimáticos y unos marcadores magnéticos.

15 El procedimiento de detección del presente invento puede ser acelerado aún más cuando el marcador, después de la fijación a un anticuerpo o a un antígeno, muestra una modificación de las propiedades. De esta manera, se podrían diferenciar a unos antígenos o respectivamente anticuerpos no fijados con respecto de los fijados, sin que por ejemplo sea necesaria una etapa de lavado.

20 El presente invento prevé asimismo un estuche para la detección de anticuerpos contra *Enterococcus faecalis* y/o *Enterococcus faecium* y/o de antígenos de *Enterococcus faecalis* y/o *Enterococcus faecium* que comprende el antígeno y/o los anticuerpos del presente invento en una de las formas de realización que más arriba se han descrito.

25 En particular, el antígeno conforme al invento y/o el anticuerpo conforme al invento puede(n) estar fijado(s) a un soporte, de manera preferida a una matriz sólida y/o puede(n) estar marcados con un marcador, de manera preferida con un marcador radiactivo, un marcador coloreado, un marcador enzimático o un marcador magnético.

Por lo demás, el presente invento comprende la utilización del anticuerpo conforme al invento de acuerdo con las reivindicaciones 1 hasta 7 para la detección o la producción de anticuerpos de *Enterococcus faecalis* y/o *Enterococcus faecium* y/o de sus fragmentos Fab o scFv de anticuerpos.

30 Los anticuerpos de *Enterococcus faecalis* y/o de *Enterococcus faecium* y/o sus fragmentos Fab o scFv de anticuerpos, que así se han producido, están previstos en particular para la inmunoterapia pasiva o para la profilaxia contra antígenos de enterococos.

35 Los anticuerpos o fragmentos Fab o scFv de anticuerpos conformes al invento se pueden producir por ejemplo con un procedimiento que comprende la administración del antígeno conforme al invento a un animal, en particular a un mamífero, en una cantidad que es suficiente como para producir anticuerpos o fragmentos Fab o scFv de anticuerpos.

40 Para la producción de anticuerpos policlonales, se puede seleccionar y producir en primer lugar el antígeno conforme al invento, contra el que debe de ser dirigido el anticuerpo. Esto puede conseguirse de diferentes maneras, por ejemplo, aislando un antígeno procedente de *Enterococcus faecalis* y/o *Enterococcus faecium*, sintetizándolo in vitro o produciéndolo por vía recombinante, por ejemplo en bacterias. A continuación el antígeno se administra a un animal, cuyo sistema inmunológico forma entonces anticuerpos contra el antígeno. Como productores de anticuerpos entran en consideración en particular ratones, ratas y conejos, pero también cabras, corderos y caballos. De manera preferida, la inmunización se repite múltiples veces. Después de un par de semanas se extraen unos anticuerpos policlonales desde la sangre o respectivamente desde el suero del productor de anticuerpos.

45 Para la producción de anticuerpos monoclonales se pueden inmunizar – tal como se ha descrito en el caso de los anticuerpos policlonales – unos animales, de manera preferida ratones y/o ratas y luego se pueden obtener y recuperar sus células plasmáticas (a partir del bazo o de los nodos linfáticos). Estas células plasmáticas se pueden fusionar con unos linajes de células tumorales y de este modo se pueden producir los denominados linajes de células de hibridoma, que teóricamente viven durante un período de tiempo infinito, pero segregan un único tipo de anticuerpos monoclonales, que a su vez se pueden aislar a partir del material sobrenadante de cultivo celular.

Otra forma de realización del presente invento es un procedimiento para la producción de un anticuerpo conforme al invento o de un fragmento Fab o scFv del mismo, en una forma recombinante, que comprende la clonación de una

secuencia de ADN que codifica este anticuerpo o un fragmento de éste, en un vector de expresión, la transformación de una célula, en particular de una célula de *E. coli* o de una célula de levadura o una célula eucariótica (tal como p.ej. una célula CHO) con esta construcción artificial y la expresión del anticuerpo recombinante o de un fragmento de éste.

5 Un anticuerpo recombinante, que es obtenible mediante un procedimiento de este tipo, está caracterizado por que él se corresponde estructuralmente con los anticuerpos del presente invento. Asimismo unos fragmentos Fab o scFv recombinantes del anticuerpo conforme al invento se corresponden con los fragmentos de anticuerpos purificables en estado nativo del presente invento.

10 Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos recombinantes del presente invento tienen en particular la ventaja de que ellos se pueden producir en gran cantidad sin un gran esfuerzo técnico, sin que unos animales tengan que servir como productores de anticuerpos. Además se puede conseguir una pureza considerablemente mayor de las preparaciones de anticuerpos, y se evitan el contacto directo con la sangre y el peligro de infecciones que está vinculado con éste.

15 Queda claro para un experto en la especialidad que él puede combinar arbitrariamente entre ellas a todas las formas de realización del presente invento, que se exponen aquí a modo de ejemplo, sin desviarse por ello del alcance de la divulgación de este invento.

Otras ventajas y formas de realización del invento se establecen a partir de la descripción de ejemplos de realización individuales así como de los dibujos.

Muestran:

20 La Figura 1: El espectro de <sup>1</sup>H RMN del polisacárido capsular procedente de una cepa de *E. faecalis* del tipo 5. El espectro se registró a 600 MHz y 27°C. Las letras se refieren a los radicales de hidratos de carbono que se muestran en la Fig. 3, y los números arábigos se refieren a los protones situados junto a los correspondientes radicales: LA representa al ácido láctico.

25 La Figura 2: Unos segmentos procedentes del espectro de ROESY del polisacárido capsular procedente una cepa de *E. faecalis* del tipo 5. El espectro se registró a 600 MHz y a 27°C. Las letras se refieren a los radicales de hidratos de carbono que se muestran en la Fig. 3, y los números arábigos se refieren a los protones situados junto a los correspondientes radicales. Los contactos NOE entre los radicales están subrayados y se representan en letra cursiva.

30 La Figura 3: La estructura química de la unidad repetida del polisacárido capsular procedente de una cepa de *E. faecalis* del tipo 5. LA representa al ácido láctico. Se supone la configuración D del radical Galf.

La Figura 4: La fijación de un antisuero de conejo contra las células bacterianas de una cepa de *E. faecalis* del tipo 5. Los antígenos utilizados se indican en las leyendas. Los valores indicados representan en cada caso el valor promedio de por lo menos dos mediciones.

35 La Figura 5: La inhibición de la opsonofagocitosis de las células bacterianas de una cepa de *E. faecalis* del tipo 5 mediante un antisuero de conejo. Todos los antisueros se utilizaron en una dilución de 1:200. Los agentes inhibidores se indican en las leyendas. Los valores indicados representan un valor promedio de por lo menos 4 valores medidos, y las columnas de error representan al SEM (error típico de la media). La actividad de opsonofagocitosis sin ningún agente inhibidor fue de > 70 % para todos los antisueros.

40 La Figura 6: La fijación de anticuerpos producidos en conejos contra el polisacárido capsular procedente de *E. faecalis* del tipo 2 y del tipo 5 contra el correspondiente antígeno purificado.

Figura 7: La determinación de la destrucción por opsonofagocitosis de unas *E. faecalis* del tipo 2, que se habían producido contra el antisuero purificado. Los valores demuestran inequívocamente que se pudieron producir unos anticuerpos protectores en conejos, que conducían en un ensayo in vitro a la destrucción de las bacterias.

Ejemplo 1

La eliminación de *Enterococcus faecalis* mediante una opsonofagocitosis se realiza, entre otras cosas, mediante unos anticuerpos que están dirigidos contra antígenos del tipo de hidratos de carbono de la pared celular y de las cápsulas bacterianas. Para la cepa de *E. faecalis* 12030, se identificó el ácido lipoteicoico (LTA) como una diana de los anticuerpos opsonizantes. Sin embargo, un suero que había sido extraído frente a un LTA purificado no destruye a ninguna cepa bacteriana con los serotipos CPS-C y-D.

En el marco de este ejemplo se aísla un nuevo polisacárido capsular a partir de la cepa de *E. faecalis* del tipo 5, que es una cepa CPS-D, mediante una digestión enzimática de las paredes celulares así como mediante una cromatografía de penetrabilidad sobre geles y por una cromatografía con intercambio de aniones.

El polisacárido aislado se analiza mediante un análisis de azúcares, y por una espectroscopia de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN homonuclear y heteronuclear, monodimensional y bidimensional.

Se identifica un nuevo polisacárido capsular procedente de *E. faecalis*, que contiene una desacostumbrada unidad  $\rightarrow 6$ -3-O-[1-carboxietil]- $\beta$ -Gal $\text{f}$ -(1 $\rightarrow$  en la unidad repetida.

Un antisuero de conejo, que había sido inducido mediante inmunización de unas células bacterianas desactivadas por calor de la *E. faecalis* del tipo 5, contenía unos anticuerpos, específicos tanto contra el nuevo polisacárido capsular como también contra LTA, de esta cepa.

La opsonofagocitosis de la *E. faecalis* del tipo 5 mediante este antisuero fue inhibida sin embargo solamente por el polisacárido purificado pero no por el LTA.

Por consiguiente, este Ejemplo ilustra una posibilidad de cómo un nuevo polisacárido capsular se puede identificar como un antígeno en la *E. faecalis* del tipo 5, que es inmunógeno y que puede servir como diana para anticuerpos opsonizantes.

Este Ejemplo ilustra además cómo se puede ensayar la inmunogenicidad de unos antígenos que se derivan de *E. faecalis*.

Ejemplo 2:25 2a) Cepas bacterianas y cultivos

Unos polisacáridos capsulares fueron aislados a partir de la *E. faecalis* del tipo 5 (Maekawa, S., y colaboradores, Microbiol. Immunol., 36:671-681, 1992), que es una cepa CPS-D, con un sistema de serotipificación que ha sido descrito recientemente (Hufnagel, M., y colaboradores, J. Clin. Microbiol. 42:2548-2557, 2004). Las células bacterianas fueron cultivadas a partir de los cultivos de partida en una solución nutritiva de Columbia (de Becton Dickinson, Sparks, MD, EE.UU.), que había sido enriquecida con 1 % de glucosa, sin agitación a 37°C durante 2 horas.

2b) Antisueros

En el pasado ya describieron unos antisueros contra células bacterianas enteras de la *E. faecalis* del tipo 5 (Hufnagel, M., y colaboradores, J. Clin. Microbiol. 42:2548-2557, 2004). El antisuero contra LTA se produjo con un LTA, que se había purificado a partir de la cepa 12030 como se ha descrito con anterioridad (Theilacker, C., y colaboradores, Infect. Immun. 74, 2006). Una coneja de Nueva Zelanda blanca hembra fue inmunizada por vía subcutánea con 100  $\mu\text{g}$  de un LTA que había sido suspendido en un coadyuvante de Freund completo y después de ello inmunizado con la misma dosis de LTA que había sido suspendido en un coadyuvante de Freund incompleto siete días más tarde y después de ello, en la semana siguiente cada tres días con unas dosis de vacunación posterior de 10  $\mu\text{g}$ .

2c) Producción y caracterización del polisacárido capsular.

Un LTA procedente de *E. faecalis* fue aislado como se ha descrito con anterioridad (Huebner, J., y colaboradores, Infect. Immun. 67:1213-1219, 1999; Theilacker, C., y colaboradores., Infect. Immun. 74, 2006). El antígeno que aquí se describe fue preparado previamente de la siguiente manera: Resumido brevemente, unas células bacterianas se cosechan por centrifugación y se digieren durante 18 horas a 37°C mediante una adición de mutanolisina y lisozima (en cada caso 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , de Sigma Chemicals, St. Louis, MO, EE.UU. en una PBS (solución salina tamponada con fosfato) enriquecida con 5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM de  $\text{CaCl}_2$  y 0,05 % de  $\text{NaN}_3$ ). El material insoluble se separó por centrifugación y el material sobrenadante se trató con unas nucleasas (DNase I y RNase A, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) a 37°C

durante 4 horas, seguido por una adición durante 18 horas de la proteinasa K (100 pg/ml, todas ellas obtenibles de Sigma Chemicals) a 56°C. El material sobrenadante se hizo precipitar mediante la adición de etanol (volumen final 80 %) y luego se reunió por medio de una centrifugación. Después de la diálisis frente a H<sub>2</sub>O desionizada, el material se liofilizó. Para realizar una cromatografía de penetrabilidad sobre geles, el material se disolvió en una solución tampón de hidrógenocarbonato de amonio 0,01 M y se aplicó sobre una columna de Sephacryl S-400 (1,6 x 90 cm) (GE Healthcare, Uppsala, Suecia). Las fracciones que se eluyeron con un valor de  $K_{av}$  de aproximadamente 0,45, se combinaron, dializaron y liofilizaron. El material se resuspendió en 20 mM de NaHCO<sub>3</sub>, de pH 8,4 y se aplicó sobre una columna de intercambio de aniones (Sephacrose Q FF, GE Healthcare). El antígeno fijado se eluyó a partir de la columna mediante un gradiente lineal de NaCl y las fracciones que comprendían polisacáridos se identificaron mediante un ensayo de Dubois (Dubois, M., y colaboradores, Anal. Chem. 28:350-356, 1956.) y mediante una transferencia inmunológica de borrones (en inglés Immunoblotting) mediante utilización de un suero inmunológico anti-tipo 5 de conejo. El material reactivo inmunológicamente, que se había eluido con 450 mM de NaCl, se combinó, dializó y liofilizó. Como etapa de purificación final se llevó a cabo una cromatografía de penetrabilidad sobre geles en una columna Toyopearl HW-40 de 1,5 x 75 cm (de Tosoh Corporation, Tokyo, Japón). La pureza del material aislado se confirmó mediante una SDS-PAGE mediante utilización de un gel de Bis-Tris al 10 % y de un tampón de elución con MOPS (de Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) y mediante una tinción con Coomassie (de Invitrogen) y PAS (de Sigma) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Además, una transferencia de borrones Western de un material que había sido separado mediante una SDS-PAGE, se tiñó con un antisuero de conejo anti-tipo 5.

#### 20 2d) Resultado de la purificación del polisacárido capsular

El polisacárido capsular procedente de la cepa de *E. faecalis* del tipo 5 se movilizó mediante una digestión enzimática de un péptidoglicano procedente de las células bacterianas. El material extraído se eluyó en forma de dos fracciones que contenían hidratos de carbono al realizar la cromatografía sobre geles con Sephacryl S-400. Una fracción, que se había eluido en el volumen de exclusión, se componía de un LTA, tal como se determina mediante un análisis por <sup>1</sup>H RMN (datos no indicados). Una segunda fracción grande con una  $K_{av}$  situada en la región de 0,45 se purificó adicionalmente mediante una cromatografía con intercambio de aniones mediante utilización de Q-Sepharose. Se eluyeron pequeñas cantidades de un material reactivo inmunológicamente con 450 mM de NaCl, que se componía solamente de glucosa y galactosa y que se había sometido a un análisis adicional según la cromatografía de penetrabilidad sobre geles sobre Toyopearl HW-40S. La SDS-PAGE con este material purificado mostró una única banda ancha a 100 kDa, que se teñía con PAS, pero no con el azul de Coomassie. Una fracción de transferencia de borrones Western, que se había teñido con un antisuero anti-tipo 5 mostró asimismo una única banda ancha a 100 kDa y ninguna otra banda (datos no indicados).

#### Ejemplo 3

##### Preparación de LTA

Un LTA se preparó mediante una extracción con butanol y una cromatografía con interacción hidrófoba tal como se ha descrito con anterioridad (Theilacker, C., y colaboradores, Infect. Immun. 74, 2006). La pureza de los preparados de LTA se valoró mediante un SDS-PAGE y un análisis por transferencia de borrones Western con el correspondiente antisuero contra células bacterianas enteras (compárese más arriba). La identidad estructural del LTA se confirmó mediante una espectroscopia por RMN tal como hace poco tiempo se ha descrito (Theilacker, C., y colaboradores, Infect. Immun. 74, 2006).

##### Procedimiento general y analítico

La hidrólisis se llevó a cabo con ácido trifluoroacético 2 M (120°C, 3 h). El monosacárido fue transformado en acetatos de alditol y analizado mediante una GC (cromatografía de gases) sobre un cromatógrafo de Hewlett-Packard 5890 con una columna SPB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, de Supelco, München, Alemania) mediante utilización de un programa de temperaturas que comprendía 150°C durante 3 minutos, luego con 3°C min<sup>-1</sup> hasta 300°C. La disposición absoluta de los radicales de azúcares se determinó como más arriba se ha descrito (Haseley, S. R., y colaboradores, Eur. J. Biochem. 244:761-766, 1997; Leontein, K., y colaboradores, Carb. Res. 62:359-362, 1978).

##### Espectroscopia por RMN

La muestra se intercambiaba tres veces con 99,0 % de <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O, se liofilizó y se volvió a dispersar en 99,9 % de <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O. Todos los espectros mono y bidimensionales fueron registrados con un espectrómetro Bruker DRX Avance a 600 MHz (frecuencias de trabajo 600,31 MHz en el caso de la <sup>1</sup>H RMN y 150,96 MHz en el caso de la <sup>13</sup>C RMN) mediante utilización de un software (programa lógico de Bruker habitual (Bruker, Rheinstetten, Alemania) a 27°C. Los desplazamientos químicos se indican en relación con la acetona (δH 2,225; δC 31,45). La espectroscopia por

correlación (COSY), y la espectroscopia por correlación global (TOCSY), y la ROESY se registraron mediante utilización de unas hojas de datos ( $t_1 \times t_2$ ) con  $4.096 \times 512$  puntos, y se llevaron a cabo 32 exploraciones.

Las TOCSY y ROESY se llevaron a cabo de un modo sensible a las fases de acuerdo con el procedimiento de States y colaboradores, y para la TOCSY se utilizó un período de tiempo de mezcladura de 100 ms [milisegundos] (States, D. J., y colaboradores, *J. Magn. Reson.* 48:286-292, 1982). Las correlaciones con  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  se midieron en el modo de detección de  $^1\text{H}$  mediante una coherencia de cuantos múltiples, del alemán Multiplen Quantum Koherenz (HMQC) con desacoplamiento de protones en el dominio de  $^{13}\text{C}$  mediante utilización de unos conjuntos de datos con  $2.048 \times 256$  puntos y para cada uno de los valores de  $t_1$  se registraron 128 exploraciones (Bax, A., y colaboradores, *J. Am. Chem. Soc.* 109:2093-2094, 1986; Summers, M. F., y colaboradores, *J. Am. Chem. Soc.* 108:4285-4294, 1986).

#### Análisis químico y espectroscopia por RMN

En la región de campo bajo, el espectro de  $^1\text{H}$  RMN del polisacárido purificado (Fig. 1) mostró dos señales de anómeros con  $\delta$  5.315 (radical A, [ $^3J_{\text{H}_1, \text{H}_2} < 2$  Hz]), y con  $\delta$  4.542 (radical B, [ $^3J_{\text{H}_1, \text{H}_2} = 7,8$  Hz]), que habían sido identificados como  $\beta$ -Gal $f$  y  $\beta$ -D-Glc $p$ . Por lo demás, el doblete con  $\delta$  1.361 fue reconocido como un grupo metilo que pertenece a un radical de ácido láctico (LA) (Knirel, Y. A., y colaboradores, *Carbohydr. Res.* 259, 1994; Knirel, Y. A., y colaboradores, *Carbohydr. Res.* 235:C19-23, 1992). La presencia de un radical de D-Glc $p$  fue confirmada mediante un análisis químico, la asignación de la configuración absoluta así como mediante los datos de espectroscopia de RMN. El radical Gal $f$  sustituido en la posición C-3 con ácido láctico fue identificado solamente mediante los datos de RMN (Beynon, L. M., y colaboradores, *Eur. J. Biochem.* 250:163-167, 1997; Knirel, Y. A., y colaboradores, *Carbohydr. Res.* 259, 1994; Knirel, Y. A., y colaboradores, *Carbohydr. Res.* 235:C19-23, 1992). Todos los desplazamientos químicos con  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  del polisacárido capsular procedente de *E. faecalis* del tipo 5 (Tab. 1) se determinaron a partir de unos espectros de  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  COSY y TOCSY, y a partir de unos espectros de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMQC.

Radical	Desplazamiento químico de $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ [ $\delta$ ]						
	H1	H2	H3	H4	H5	H6 <sup>a</sup>	H6 <sup>b</sup>
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	
A	5,315	4,346	3,932	4,225	4,040	3,768	4,019
$\rightarrow 6$ )- $\beta$ -Gal $f$ -	109,26	80,26	<u>84,96</u>	82,41	70,55	<u>71,90</u>	
B	4,542	3,460	3,663	3,465	3,500	3,742	3,930
$\rightarrow 3$ )- $\beta$ -D-Glc $p$ -	103,22	74,05	<u>82,44</u>	68,80	76,26	61,26	
LA		4,038	1,361				
Ácido láctico	181,29	77,72	19,21				

25 - Tabla 1 -

Unas señales, desplazadas hacia el campo bajo, de los átomos de carbono mostraron unas sustituciones en C-6 y C-3 de  $\beta$ -Gal $f$  (radical A,  $\delta$  71,90 y  $\delta$  84,96) y unas sustituciones en C-3 de  $\beta$ -D-Glc $p$  (radical B,  $\delta$  82,44). La secuencia de los radicales en la unidad repetida se determinó mediante unos experimentos de ROESY. Unos fuertes contactos NOE entre los radicales fueron hallados entre los protones A1 ( $\delta$  5,315) y B3 ( $\delta$  3.663), y B1 ( $\delta$  4.542) y A6a ( $\delta$  3.768) (Fig. 2). Por consiguiente, la estructura de la unidad repetida del polisacárido aislado era tal como se ha representado en la Figura 3.

#### Ejemplo 4

##### Investigaciones por ELISA

35 Unos experimentos de ELISA se llevaron a cabo mediante unos procedimientos habituales tal como se han descrito con anterioridad (Theilacker, C., y colaboradores, *Infect. Immun.* 74, 2006). Dicho brevemente, unas placas de microtitulación se revistieron con unos antígenos del tipo de hidratos de carbono, que proceden de *E. faecalis* (10 pg/ml en un tampón de fosfato de 0,04 M, de pH 7,0) y se dejaron a 4°C durante 18 horas. Con una PBS que contenía 0,05 % de Tween 20 se llevaron a cabo unas etapas de lavado. Las placas se bloquearon con 3 % de leche desnatada en una PBS con 0,02 % de aziduro de sodio durante 2 horas a 37°C. Un conjugado de IgG anti-conejo de cabra y de una fosfatasa alcalina, diluido a 1:1.000, se utilizó como anticuerpo secundario, y el fosfato de p-nitrofenilo (de Sigma) se utilizó como sustrato. Después de una incubación durante 60 minutos a 37°C se midió la absorción a 405 nm.

Ejemplo 5Ensayo de opsonofagocitosis

Un ensayo de opsonofagocitosis se realizó tal como más arriba se ha descrito (Theilacker, C., y colaboradores, Infect. Immun. 74, 2006). Un suero de conejo infantil (de Cedarlane Laboratories, Hornby, Ontario, Canadá), que había sido absorbido con la cepa bacteriana diana, sirvió como fuente del complemento. La actividad opsónica del suero inmunológico se comparó con la de los testigos, que contenían un antisuero de conejo normal. El suero inmunológico se desactivó mediante calor a 56°C durante 30 minutos antes de la utilización. Los testigos negativos comprendían unos tubitos de muestras, que no contenían o bien nada de leucocitos polimorfonucleares, nada del complemento o nada de suero. La actividad opsónica del suero se calculó de la siguiente manera: [1 - (CFU de un suero inmunológico a los 90 min/CFU de un suero inmunológico preliminar a 90 los min)] x 100.

Para la investigación de la inhibición de la opsonofagocitosis, un antisuero se incubó en una concentración de 1:200 durante 60 minutos a 4°C con 0,08 hasta 100 µg/ml. Después de la incubación se añadió el suero absorbido y se prosiguió el ensayo de opsonofagocitosis tal como más arriba se ha descrito. Sin ninguna inhibición todos los sueros tenían una actividad mínima de opsonofagocitosis de > 70 % del inóculo.

15 Ejemplo 6Caracterización inmunológica

Un suero contra células bacterianas de *E. faecalis* del tipo 5 (Maekawa, S., y colaboradores, Microbiol. Immunol. 36:671-681, 1992) era reactivo frente al polisacárido purificado (Fig. 4). El antisuero contenía asimismo un alto nivel de anticuerpos de IgG contra el LTA de *E. faecalis* (Fig. 4). Puesto que los anticuerpos anti-LTA median en la opsonofagocitosis de la cepa de *E. faecalis* 12030, se pretende determinar la especificidad de anticuerpos opsonizantes frente a la cepa de *E. faecalis* del tipo 5. En consonancia con la observación de que hay poca reactividad cruzada de anticuerpos opsonizantes entre la *E. faecalis* del tipo 5 y la *E. faecalis* 12030 (Hufnagel, M., y colaboradores, J. Clin. Microbiol. 42:2548-2557, 2004), un LTA purificado no inhibía la actividad de opsonofagocitosis de un antisuero del tipo 5 (Fig. 5). Sin embargo, el polisacárido capsular purificado era un potente agente inhibidor de anticuerpos opsonizantes contra el tipo 5 (Fig. 5). Un suero de conejo contra un LTA purificado, que fomenta la opsonofagocitosis de la cepa 12030 en el ensayo de opsonofagocitosis, no era opsonizante contra la cepa del tipo 5, lo cual confirma los resultados de nuestros estudios de inhibición (datos no mostrados).

Ejemplo 7

Contra los dos polisacáridos del tipo 2 así como del tipo 5 se produjeron unos anticuerpos en conejos: una coneja de Nueva Zelanda blanca hembra se inmunizó por vía subcutánea con 100 µg de un polisacárido purificado del tipo 2 y tipo 5, que había sido suspendido en un coadyuvante completo de Freund y después de ello se inmunizó con la misma dosis de un polisacárido, que había sido suspendido en un coadyuvante de Freund incompleto, siete días más tarde y después de esto, en la siguiente semana cada tres días con unas dosis de vacunación posterior de 10 µg.

Los polisacáridos se obtuvieron de acuerdo con el método descrito en el apartado 2d). Para la inmunización se emplearon en cada caso dos conejos y a continuación se obtuvo el antisuero de los conejos. Los antisueros obtenidos de los conejos se investigaron en un ensayo ELISA. Para esto, tanto el polisacárido del tipo 2 como también el polisacárido del tipo 5 se fijaron sobre las placas de microtitulación. De un modo sorprendente, se comprobó que se habían formado anticuerpos tanto contra un polisacárido purificado del tipo 5 como también contra un polisacárido del tipo 2. De esta manera se pudo mostrar que el antígeno es inmunógeno, lo cual no era de esperar indispensablemente en consideración al hecho de que se trata de un denominado antígeno independiente de las células T. La formación de los anticuerpos es representada en la Figura 6.

Ejemplo 8Ensayo opsonofagocítico

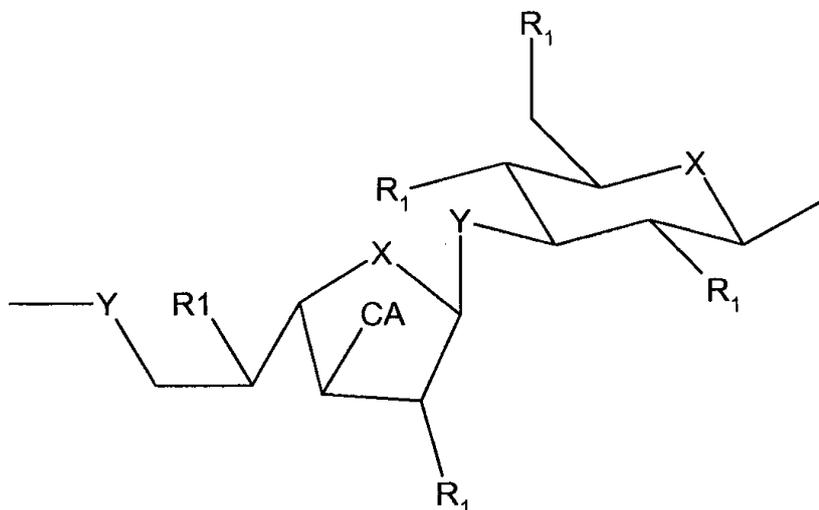
En el caso de este ensayo in-vitro se reunieron unos granulocitos, un antisuero así como unas bacterias y se comprobó si mediante los anticuerpos producidos se podía alcanzar una destrucción de las bacterias de *Enterococcus faecalis*. Las condiciones exactas del tramo de ensayo fueron como sigue: una sangre entera recientemente extraída se obtuvo a partir de unos donantes sanos y se reunió con un tampón de heparina y dextrano. A continuación, los leucocitos se purificaron y se ajustaron a un número definido ( $5 \times 10^6$  células/ml). Las bacterias que se tenían que investigar se separaron por centrifugación a partir de un cultivo en un crecimiento logarítmico mediano y se ajustaron por espectrometría asimismo a  $5 \times 10^6$  células/ml. Como fuente del complemento se utilizó un suero de conejo infantil liofilizado, que había sido diluido a 1:15 con un cultivo de células y había sido absorbido con la cepa bacteriana diana, con el fin de eliminar los anticuerpos presentes contra la cepa de enterococos que se había utilizado. El suero de conejo se diluyó asimismo con un medio de cultivo celular de un

5 modo correspondiente a la estructura del ensayo. Para el ensayo se mezclaron en cada caso 100 µl de la  
suspensión de bacterias, 100 µl de los leucocitos (relación de bacterias a leucocitos 1:1), 100 µl de la fuente del  
complemento, así como 100 µl de la correspondiente dilución de anticuerpos. El número de gérmenes de partida se  
comprobó mediante una dilución y una siembra en placas y la tanda de ensayo se incubó a continuación a 37°C  
durante 90 minutos en un rotor colocado boca abajo. Al final del ensayo, las bacterias presentes en la tanda de  
ensayo fueron asimismo diluidas y sembradas en placas de nuevo y se recontó al día siguiente el número de las  
colonias. La reducción del número de bacterias entre el inóculo y el número de gérmenes al final del ensayo se  
expresó como la destrucción mediada por opsonofagocitosis en tantos por ciento. Este valor constituye el mejor  
10 marcador de material reemplazado (surrogate) para una respuesta inmunológica protectora contra patógenos de  
infecciones bacterianas.

Los resultados del ensayo se representan en la Figura 7. Se muestra que unas diluciones del suero de desde 1:50  
hasta 1:200 conducen a una manifiesta destrucción de aproximadamente 80 %, mientras que en el caso de otras  
diluciones del suero se pierde este efecto. Esto ha de entenderse como una indicación de que unos títulos de  
anticuerpos más altos con este antígeno constituyen una protección del organismo frente a la infección con  
15 *E. faecalis*.

## REIVINDICACIONES

1. Antígeno de *Enterococcus faecalis* y/o *Enterococcus faecium*, caracterizado por que tiene una estructura de disacárido que se compone de una furanosa del tipo Gal y de una piranosa del tipo Glc, teniendo la estructura de disacárido la siguiente fórmula



- 5
- siendo los  $R_1$ , independientemente unos de otros, OH, OAc,  $OC_nH_m$ , OFo, siendo Fo formilo,  $m = 2n + 1$  y  $n$  un número entero de 1 a 10, y siendo  
 $X = O$ ,  
 $Y = O$  y  
 10 los CA, independientemente unos de otros, un radical acilo de  $C_1-C_6$  o un radical hidroxiacilo.
2. Antígeno de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que  $R_1$  es = OH, X es = O, Y es = O y CA es = lactilo.
3. Antígeno de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, caracterizado por que tiene un peso molecular de aproximadamente 1.000-200.000 Da, de manera más preferida de aproximadamente 50.000-150.000 Da y de  
 15 manera especialmente preferida de aproximadamente 100.000 Da.
4. Antígeno de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 hasta 3, caracterizado por que la unidad se presenta por lo menos 5 veces, de manera preferida por lo menos 10 veces, de manera más preferida por lo menos 100 veces y de manera especialmente preferida por lo menos 1.000 veces por cada antígeno.
5. Antígeno de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 hasta 4, caracterizado por que está fijado a un soporte.
- 20 6. Antígeno de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado por que la fijación al soporte es de naturaleza covalente.
7. Antígeno de acuerdo con la reivindicación 5 ó 6, caracterizado por que el soporte es un soporte inmunológico.
8. Anticuerpo monoclonal específico contra un antígeno de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 hasta 7.
9. Composición que comprende un antígeno de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 hasta 7 o un anticuerpo  
 25 de acuerdo con la reivindicación 8.
10. Composición de acuerdo con la reivindicación 9, que comprende un soporte farmacéuticamente aceptable.
11. Composición de acuerdo con la reivindicación 9 ó 10, caracterizada por que ella es una vacuna contra *Enterococcus faecalis* y/o *Enterococcus faecium*.

12. Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 9 hasta 11, caracterizada por que ella es una composición farmacéutica.
13. Procedimiento para la detección de *Enterococcus faecalis* y/o *Enterococcus faecium*, que comprende,  
 5 - poner en contacto unos antígenos de acuerdo con una reivindicación 1-7 con una muestra que se ha de ensayar para descubrir anticuerpos de *Enterococcus faecalis* y/o *Enterococcus faecium*, y  
 - detectar unos complejos de anticuerpos y antígenos o unos conjugados de anticuerpos y antígenos, indicando la presencia de tales complejos la presencia de anticuerpos de *Enterococcus faecalis* y/o *Enterococcus faecium* en la muestra.
14. Procedimiento para la detección de *Enterococcus faecalis* y/o *Enterococcus faecium* que comprende  
 10 - poner en contacto unos anticuerpos monoclonales de acuerdo con la reivindicación 8 opcionalmente inmovilizados sobre un soporte con una muestra que se ha de ensayar para descubrir antígenos de *Enterococcus faecalis* y/o *Enterococcus faecium* y  
 - detectar unos complejos de anticuerpos y antígenos o un conjugado de anticuerpos y antígenos, indicando la presencia de tales complejos la presencia de antígenos de *Enterococcus faecalis* y/o *Enterococcus faecium*.
- 15 15. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13 o 14, caracterizado por que los antígenos o respectivamente anticuerpos son inmovilizados sobre una matriz, en particular sobre una matriz sólida, de manera preferida sobre una placa de microtitulación.
16. Procedimiento de acuerdo con la reivindicaciones 13 hasta 15, caracterizado por que el antígeno o el anticuerpo  
 20 es provisto de un marcador.
17. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 16, caracterizado por que el marcador se selecciona entre el conjunto que compone de marcadores radiactivos, marcadores coloreados, marcadores enzimáticos y marcadores magnéticos.
18. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 16 ó 17, caracterizado por que el marcador muestra una  
 25 modificación de las propiedades después de la fijación de un anticuerpo.
19. Estuche para la detección de anticuerpos de *Enterococcus faecalis* y/o - *Enterococcus faecium*, que comprende un antígeno de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 hasta 7.
20. Estuche para la detección de antígenos de *Enterococcus faecalis* y/o *Enterococcus faecium* en una muestra, que comprende un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 8, opcionalmente fijado a un soporte.
- 30 21. Estuche de acuerdo con la reivindicación 19 ó 20, caracterizado por que el antígeno o respectivamente el anticuerpo está marcado con un marcador.
22. Estuche de acuerdo con la reivindicación 21, caracterizado por que el marcador es un marcador radiactivo, un marcador coloreado, un marcador enzimático o un marcador magnético.
- 35 23. Estuche de acuerdo con una de las reivindicaciones 19 hasta 22, caracterizado por que el antígeno o respectivamente el anticuerpo está unido con una matriz, de manera preferida con una matriz sólida.
24. Utilización de un antígeno de acuerdo con las reivindicaciones 1 hasta 7, para la detección o la producción no terapéutica de unos específicos anticuerpos de *Enterococcus faecalis* y/o *Enterococcus faecium* y/o de fragmentos de anticuerpos, en particular Fab o scFv,.
- 40 25. Utilización de acuerdo con la reivindicación 24, estando previstos los anticuerpos de *Enterococcus faecalis* y/o *Enterococcus faecium* y/o los fragmentos que se han producido para la inmunoterapia pasiva o para la profilaxia contra antígenos de enterococos.
26. Anticuerpo recombinante, caracterizado por que él se corresponde estructuralmente con el anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 8, o un fragmento Fab o scFv recombinante.
- 45 27. Procedimiento para la producción de un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 8 o de un fragmento Fab o scFv del mismo en forma recombinante, que comprende la clonación de una secuencia de ADN que codifica este anticuerpo o su fragmento Fab o scFv en un vector de expresión, la transformación de una célula, en particular de una célula de *E. coli* o de una célula de levadura con esta construcción artificial y la expresión del anticuerpo recombinante o de un fragmento Fab o scFv del mismo.

Figura 1

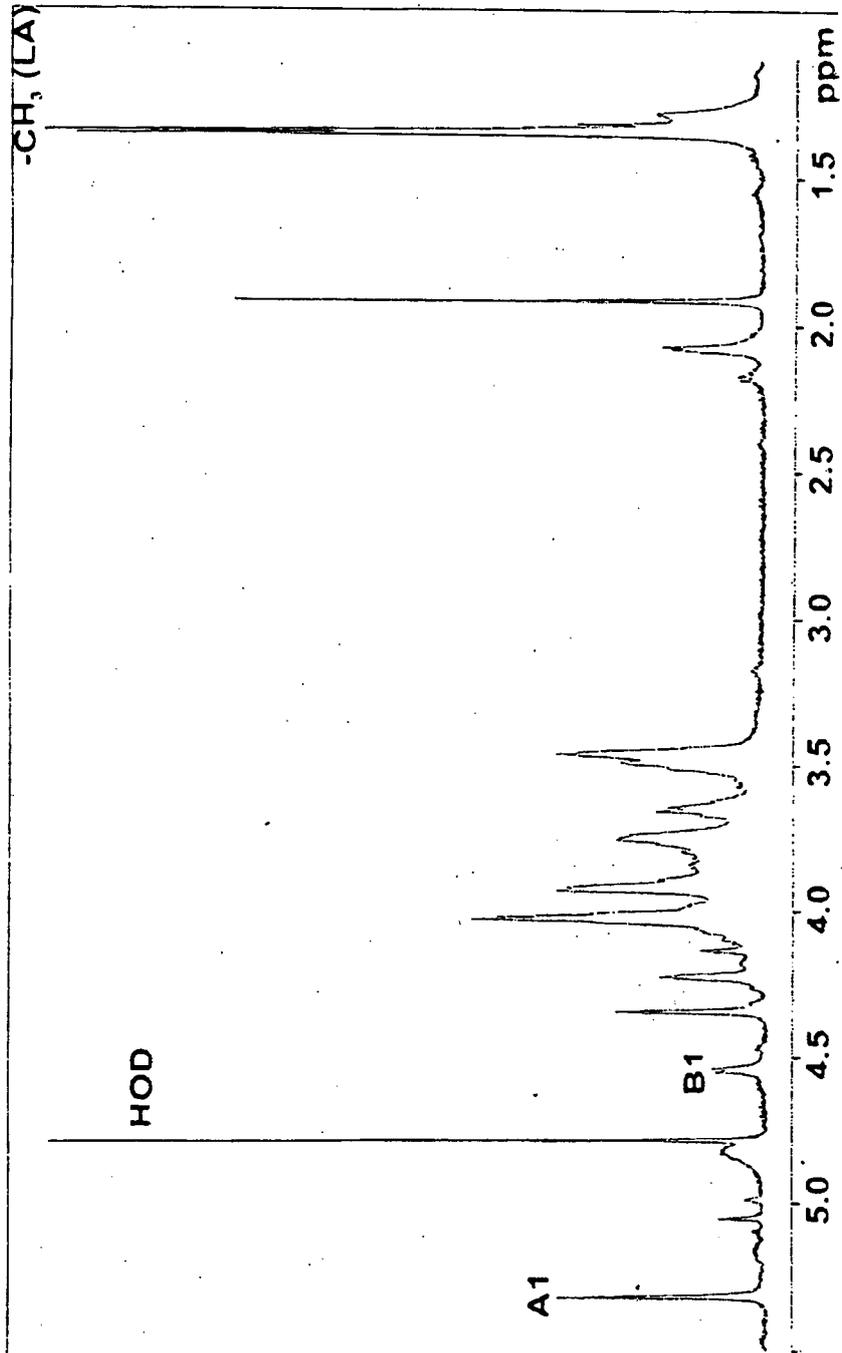


Figura 2

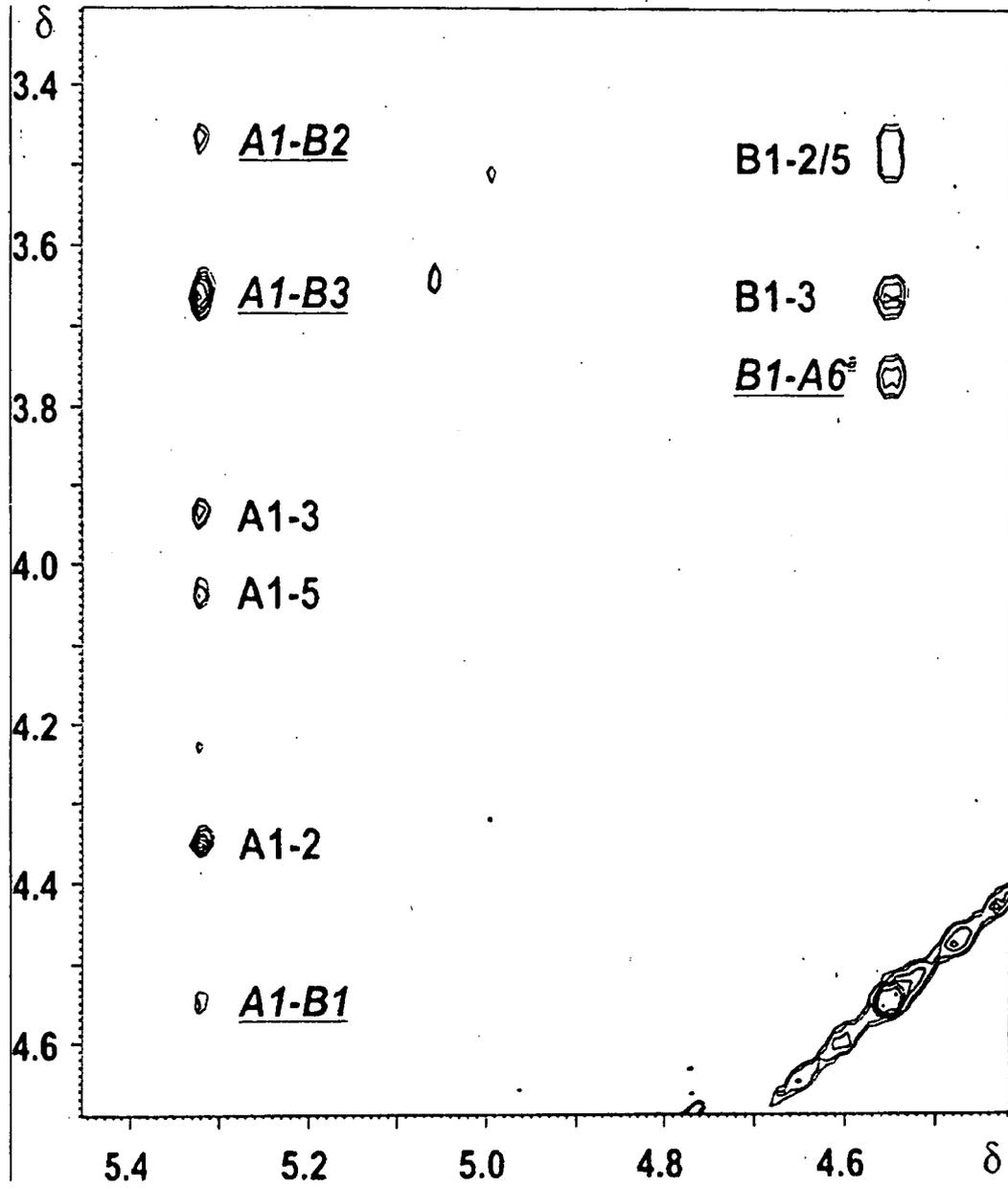




Figura 4

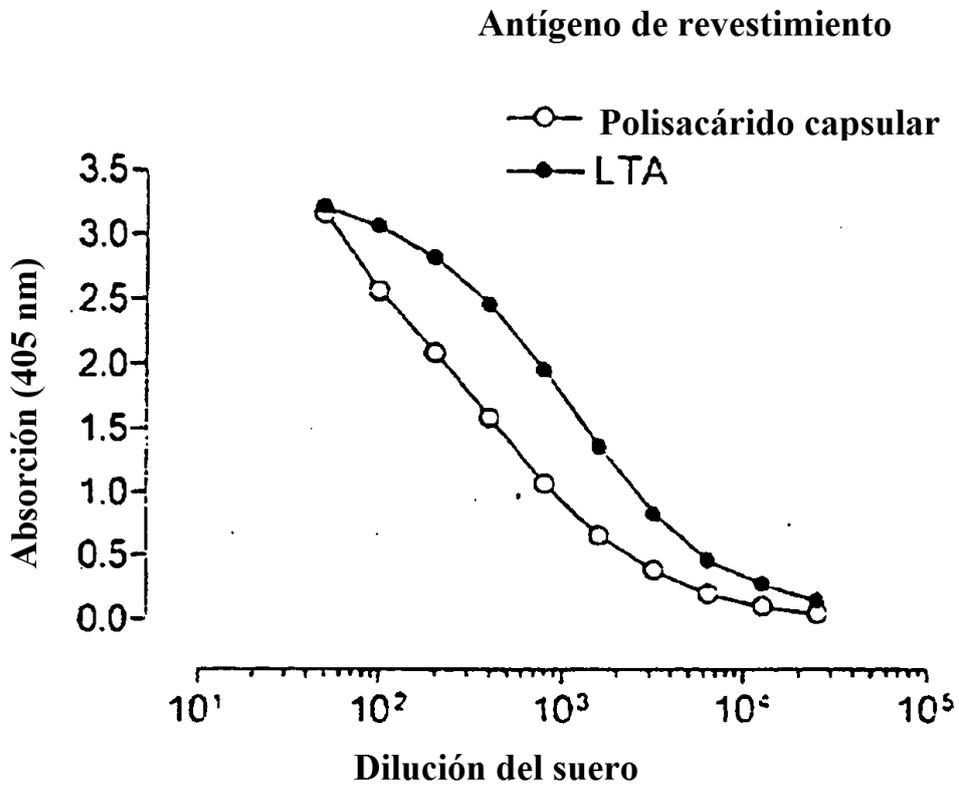


Figura 5

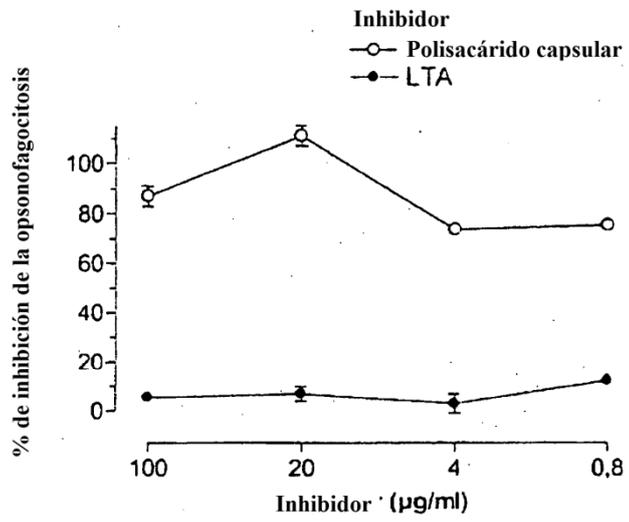


Figura 6

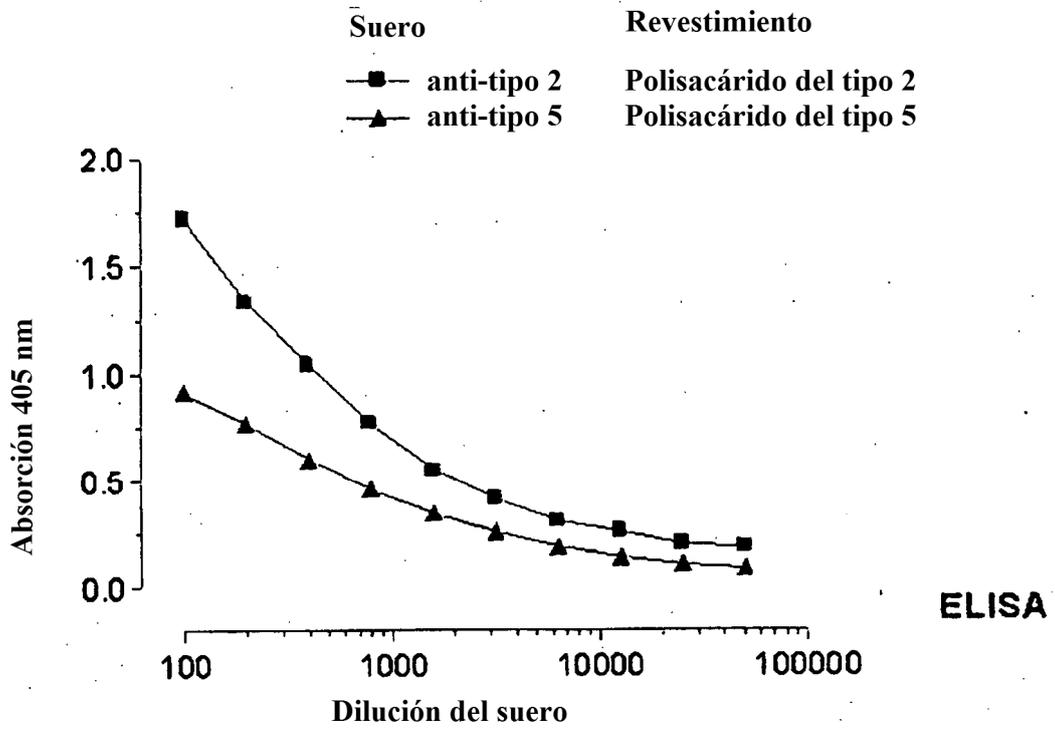


Figura 7

