

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 344**

51 Int. Cl.:

C07H 15/04 (2006.01)

C07K 16/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2012 E 12162640 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.10.2014 EP 2644613**

54 Título: **Polímeros de la pared celular de Enterococcus faecalis y sus usos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.02.2015

73 Titular/es:

**UNIVERSITÄTSKLINIKUM FREIBURG (50.0%)
Hugstetter Strasse 49
79106 Freiburg, DE y
FORSCHUNGSZENTRUM BORSTEL (50.0%)**

72 Inventor/es:

**HÜBNER, JOHANNES;
HOLST, OTTO;
THEILACKER, CHRISTIAN;
KRUSZYNSKA, KAROLINA;
GEISS-LIEBISCH, STEFAN y
BECZALA, AGNIESZKA**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 528 344 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

Polímeros de la pared celular de *Enterococcus faecalis* y sus usos

La presente invención se refiere a polímeros de la pared celular de enterococos y a sus usos en la prevención y terapia de la infección bacteriana.

5 **Antecedentes de la invención**

Enterococcus faecalis es un importante patógeno nosocomial y una causa frecuente de infección en pacientes críticamente enfermos (Vincent JL, et al. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. JAMA. 2 de diciembre de 2009; 302(21): 2323-9). Malignidad subyacente, neutropenia, quimioterapia antineoplásica y medicación inmunosupresora son factores de riesgo bien caracterizados para infecciones invasivas con enterococos (Ghanem G, et al. Outcomes for and risk factors associated with vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia in cancer patients. Infection Control Hosp Epidemiol. septiembre de 2007; 28(9): 1054-9; DiazGranados CA, Jernigan JA. Impact of vancomycin resistance on mortality among patients with neutropenia and enterococcal bloodstream infection. J Infect Dis. 15 de febrero de 2005;191(4):588-95; Peel T, et al. Differing risk factors for vancomycin-resistant and vancomycin-sensitive enterococcal bacteraemia. Clin Microbiol Infect. abril de 2012;18(4):388-94. Epub 16 de agosto de 2011) y el resultado clínico de infecciones invasivas por enterococos en esta población de pacientes es con frecuencia deficiente (Theilacker C, Jonas D, Huebner J, Bertz H, Kern W. Outcomes of Invasive Infection due to Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* during a Recent Outbreak. Infection. diciembre de 2009;37(6):540-3). Factores de riesgo que pueden contribuir en la susceptibilidad incrementada de grupos de alto riesgo a la infección por enterococos incluyen una colonización de alta densidad del tracto gastrointestinal (Ubeda C, et al. Vancomycin-resistant *Enterococcus* domination of intestinal microbiota is enabled by antibiotic treatment in mice and precedes bloodstream invasion in humans. J Clin Invest. 1 de diciembre de 2010; 120(12): 4332-41), lesión de la barrera de la mucosa gastrointestinal, dispositivos permanentes tales como catéteres venosos centrales, y disregulación inmunológica (Peel T, et al. Differing risk factors for vancomycin-resistant and vancomycin-sensitive enterococcal bacteraemia. Clin Microbiol Infect. abril de 2012;18(4):388-94. Epub 16 de agosto de 2011).

El sistema del complemento es una importante primera línea de defensa contra las infecciones invasivas y desempeña un papel crítico en el huésped inmuno-comprometido con una inmunidad adaptativa defectuosa. Comprende más de 30 proteínas, que son detectables en el suero humano, en superficies celulares y en fluidos tisulares. La vía clásica, la alternativa y la de la lectina convergen todas en la escisión del C3 para formar C3b, la molécula efectora clave del sistema del complemento. El receptor del complemento 3 de los neutrófilos se une a C3b depositado en la envuelta bacteriana que conduce a la fagocitosis y al exterminio de la bacteria ingerida. Estudios en ratones agotados del C3 han demostrado que C3 es también crítico para la opsonofagocitosis y el aclaramiento de enterococos a partir de órganos infectados (Leendertse M, et al. The complement system facilitates clearance of *Enterococcus faecium* during murine peritonitis. J Infect Dis. 15 de febrero de 2010; 201(4): 544-52). Además, múltiples estudios epidemiológicos han demostrado que una deficiencia de lectina de unión a manosa - el mejor factor descrito de la vía de la lectina - predispone a una infección grave y a una bacteriemia en los neonatos, pacientes neutropénicos y pacientes después de trasplante alogénico de células madre o de órganos sólidos (Vekemans M, et al. Low mannose-binding lectin concentration is associated with severe infection in patients with hematological cancer who are undergoing chemotherapy. Clin Infect Dis. 15 de junio de 2007; 44(12): 1593-601; Schlapbach LJ, et al. Differential role of the lectin pathway of complement activation in susceptibility to neonatal sepsis. Clin Infect Dis. 15 de Julio de 2010; 51(2): 153-62; Worthley DL, et al. Donor mannose-binding lectin deficiency increases the likelihood of clinically significant infection after liver transplantation. Clin Infect Dis. 2009 Feb 15;48(4):410-7; Mullighan CG, et al. Mannose-binding lectin status is associated with risk of major infection following myeloablative sibling allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Blood. 1 de septiembre de 2008; 112(5): 2120-8). En el curso de la evolución, las bacterias Gram-positivas han desarrollado numerosas estrategias para escapar del reconocimiento y la fijación como objetivo por el sistema del complemento. La flexibilidad de los patógenos para eludir la unión de factores del complemento se ilustra de manera admirable por *Staphylococcus aureus* (Serruto D, Rappuoli R, Scarselli M, Gros P, van Strijp JA. Molecular mechanisms of complement evasion: learning from staphylococci and meningococci. Nat Rev Microbiol. junio de 2010; 8(6): 393-9). Por el contrario, se sabe poco sobre la interacción de *E. faecalis* y el sistema del complemento.

El documento WO 2011/088843 describe componentes de la pared celular de enterococos y sus usos en la prevención y terapia de infecciones bacterianas.

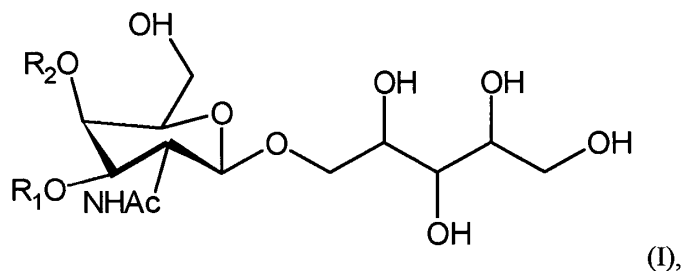
Con el fin de proporcionar estrategias más eficientes para tratar con eficacia y/o prevenir la infección en los vertebrados, provocada, al menos en parte, por enterococos, se necesitan nuevas dianas bacterianas antigénicas que podrían utilizarse en nuevas y mejoradas estrategias de vacunación, así como en el desarrollo y la producción de vacunas respectivas.

Glicolípidos, ácidos teicoicos (TA - siglas en inglés) y ácidos teicoicos de la pared (WTA- siglas en inglés) podrían servir como dianas potenciales para nuevos fármacos para el tratamiento de infecciones bacterianas Gram-positivas.

Aunque el polisacárido de la pared celular es asimismo un componente principal de la pared celular de bacterias Gram-positivas, poco se sabe acerca de cualesquiera posibles antígenos derivados de esta clase de componentes.

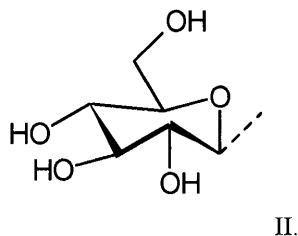
5 Como parte de la búsqueda de factores de resistencia del complemento de hidratos de carbono y el desarrollo de tratamientos alternativos tales como vacunas de glicoconjugados para combatir infecciones por enterococos, la presente invención satisface estas necesidades proporcionando nuevos polisacáridos capsulares aislados de la pared celular de enterococos.

Por lo tanto, los objetos de la presente invención, en un primer aspecto de la misma, se resuelven mediante un componente de la pared de células enterococales, seleccionado del grupo que consiste en estructuras β -D-GalpNAc-ribitol

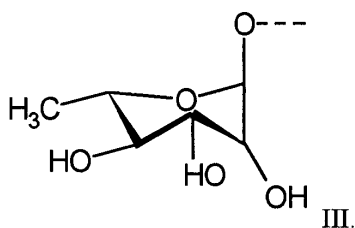


10 en donde R_1 se selecciona de β -D-Glcp o α -L-Rhap, y R_2 se selecciona de H o α -D-Glcp, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en donde Rhap es 6-desoxi-manopiranososa (ramnosa); GalpNAc es 2-acetamido-2-desoxi-galactopiranososa (*N*-acetil-galactosamina); y Glcp es glucopiranososa.

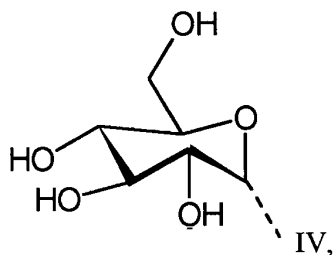
15 Preferiblemente, R_1 se selecciona de β -D-Glcp de acuerdo con la siguiente fórmula II



Preferiblemente, R_1 se selecciona de α -L-Rhap de acuerdo con la siguiente fórmula III



Preferiblemente, R_2 se selecciona de α -D-Glcp, de acuerdo con la siguiente fórmula IV



20

en donde las líneas de trazos discontinuos en II a IV indican la conexión a la estructura β -D- GalpNAc-ribitol como arriba.

Las más preferidas son las estructuras OS I y/o OS II tal como se muestra en la Figura 4.

5 En el contexto de la presente invención se investigó la interacción de las estructuras de la superficie celular de hidratos de carbono de *E. faecalis* con el sistema del complemento humano. Previamente, se construyó una genoteca de 177 mutantes de genes de inserción fijados como objetivo, implicados en factores de superficie o de respuesta al estrés putativos en *E. faecalis* cepa V583 y la genoteca de mutantes se rastreó en cuanto a la sensibilidad al exterminio opsonofagocítico y tres mutantes de genes supuestamente implicados en la biosíntesis de WTA fueron fácilmente exterminados por el complemento y neutrófilos en ausencia de un anticuerpo específico (Rigottier-Gois L, et al. Large-Scale Screening of a Targeted *Enterococcus faecalis* Mutant Library Identifies Envelope Fitness Factors. PLoS ONE. 15 de diciembre de 2011; 6(12): e29023). En contraposición, *E. faecalis* de tipo salvaje es resistente al exterminio por el complemento y neutrófilos solo. La presente invención se basa en el mecanismo de la susceptibilidad incrementada a la opsonofagocitosis mediada por el complemento y a la caracterización de diferencias estructurales de polímeros de hidratos de carbono de tipo salvaje y accesorios de la pared celular mutantes.

10 Se identificaron tres mutantes por inserción de los genes de síntesis del ácido teicoico de la pared (WTA) *tagA*, *tagB* y *tagO* en *E. faecalis* cepa V583 que exhibían una susceptibilidad incrementada a la opsonofagocitosis mediada por el complemento por parte de neutrófilos. Estudios adicionales revelaron un papel de complejos de L-ficolina/serina proteasa asociada a lectina de unión a manosa (MASP - siglas en inglés) en la opsonofagocitosis dependiente de Ca^{2+} , independiente de anticuerpo de *E. faecalis* V583 Δ 1172. Para entender el mecanismo de activación de la vía de la lectina por *E. faecalis* V583 Δ 1172, los autores de la invención caracterizaron estructuralmente fragmentos de la pared celular de *E. faecalis* tipo salvaje y V583 Δ 1172 obtenidos por digestión enzimática de peptidoglicano. Fragmentos de pared celular de V583 Δ 1172 carecían de los dos oligosacáridos de acuerdo con la presente invención con la estructura α -L-Rhap-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalpNAc-(1 \rightarrow 1)-ribitol y α -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)-[β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)-] β -D-GalpNAc-(1 \rightarrow 1)-ribitol, sugiriendo la ausencia de WTA en el mutante.

15 Por lo tanto, el componente de la pared celular de enterococos (en lo que sigue también designado como "antígeno enterococal") proporciona una nueva diana antigénica para el desarrollo de estrategias más eficientes para tratar con eficacia y/o prevenir infecciones en vertebrados provocadas, al menos en parte, por enterococos, permitir estrategias de vacunación mejoradas, y permite el desarrollo y la producción de vacunas respectivas tales como vacunas glicoconjugadas.

20 De acuerdo con la presente invención, la expresión un "derivado modificado" o "derivados modificados" incluirá antígenos enterococales química o enzimáticamente modificados de acuerdo con la fórmula I como antes, en donde dicho derivado modificado mantiene su función como un determinante antigénico enterococal y/o en la misma, o sustancialmente la misma medida que el antígeno enterococal de acuerdo con la fórmula I. Preferiblemente, dicho derivado modificado exhibe una reacción inmunológica cuantitativamente incrementada, en comparación con un antígeno enterococal no modificado. Un aumento de este tipo de la reacción inmunológica puede ser detectado con ensayos inmunológicos conocidos en la técnica.

25 Ejemplos de derivados modificados son preferiblemente compuestos de fórmula I que se modifican para incluir un grupo enlazador con el fin de ser acoplado o conjugado con otras entidades químicas. Estos grupos enlazadores son conocidos en el estado de la técnica, y habitualmente son inmunológicamente inactivos, es decir, no interfieren sustancialmente con las propiedades inmunológicas del antígeno enterococal.

30 Otras modificaciones incluyen la adición de restos químicos del antígeno enterococal con el fin de llevar un marcador detectable, tal como grupos quelantes o grupos enzimáticos. Además, se pueden añadir el péptido (p. ej., His) u otros "marcadores" o "etiquetas" con el fin de poder purificar y/o utilizar el antígeno enterococal en ensayos diagnósticos.

35 También se describe en esta memoria el antígeno enterococal que puede incluir modificaciones químicas, por ejemplo en los anillos de los componentes azúcar del antígeno enterococal, en donde el antígeno se puede modificar para reemplazar a un grupo lateral existente con H, un alquilo C_1 - C_{18} no sustituido, mono-sustituido o polisustituido, en donde dicho alquilo puede ser lineal, ramificado o cíclico, alqueno, un residuo arilo o heteroarilo no sustituido o monosustituido, un grupo benceno no sustituido, monosustituido o polisustituido, un grupo acilo tal como formilo, acetilo, tricloroacetilo, fumarilo, maleílo, succinilo, benzilo, o un grupo acilo ramificado o sustituido con un heteroátomo o arilo, un sustituyente alcoxi tal como -OMe, -OEt, -ONPr, -iPr, -ONBu, -OiBu, -OsecBu, -OtBu, cuyo grupo alquilo puede ser ramificado, lineal o cíclico, un grupo alquilo unido a través de un átomo de azufre tal como -SMe, -SEt, o un grupo sulfonilo tal como -SO₃H, -SO₂Me, -SO₂CF₃, -SO₂C₆H₄CH₃ o SO₂C₆H₄CH₂Br, o un sustituyente de nitrógeno tal como NH₂, NHR, -NRR' (con R, R' = alquilo, alqueno o arilo tal como arriba), NC o -NO₂, o flúor, cloro, bromo, yodo, -CN o un hetero-sustituyente. Como se mencionó anteriormente, estos derivados mejoran la solubilidad del antígeno, aumentan el efecto inmunológico de dicho antígeno (preferiblemente de manera cuantitativa), y/o permiten que el compuesto se acople a otros restos, p. ej., con el fin de ser acoplado a una superficie (tal como un pocillo o chip), y/o para ser utilizado en ensayos de diagnóstico.

- Otro aspecto de la invención se refiere a un método para producir el componente de la pared celular enterococal acuerdo con la presente invención, en el que dicho método comprende aislar dicho componente de la pared celular enterococal a partir de una fracción bacteriana, o comprende sintetizar dicho antígeno, al menos en parte, a través de síntesis química. El aislamiento puede incluir purificar dicho componente de la pared celular de las fracciones bacterianas para que quede sustancialmente libre de otros componentes bacterianos, pero también puede incluir el aislamiento como parte de determinadas fracciones bacterianas tales como fracciones de la pared celular, incluyendo otras partes de la pared celular tal como se describe en esta memoria.
- Otro aspecto de la invención se refiere a un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo monoclonal o un fragmento antigénico del mismo, que reconoce específicamente un antígeno enterococal de acuerdo con la presente invención. El término "anticuerpo" incluye tanto anticuerpos monoclonales como policlonales, anticuerpos recombinantes o fragmentos de los mismos, tales como Fab, así como anticuerpos humanos o humanizados.
- Otro aspecto de la invención se refiere entonces a un método para producir el anticuerpo de acuerdo con la presente invención, que comprende inmunizar a un mamífero, preferiblemente un conejo, con un componente de la pared celular enterococal de acuerdo con la presente invención, o una con la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención, y preferiblemente la vacuna de acuerdo con la presente invención. Métodos respectivos son conocidos para la persona experta, y se describen en el estado conocido de la técnica.
- Todavía otro aspecto de la presente invención se refiere entonces a un método para producir el anticuerpo de acuerdo con la presente invención, que comprende generar células de hibridoma que producen dicho anticuerpo como un anticuerpo monoclonal, o que comprende una producción recombinante de dicho anticuerpo en una célula huésped. Métodos respectivos son conocidos por la persona experta, y se describen en el estado conocido de la técnica.
- También se describe en esta memoria una cepa de *E. faecalis* en la que están presentes mutantes de inserción en al menos uno de los genes de síntesis de WTA *tagA*, *tagB* y *tagO* tales como, por ejemplo, la cepa *E. faecalis* V583Δ1172. Esta cepa se puede utilizar en ensayos y pruebas de rastreo de acuerdo con la presente invención, p. ej., para anticuerpos específicos y/o eficaces tal como se describe en esta memoria, o para el rastreo y la identificación de compuestos específicos (tales como moléculas pequeñas) capaces de inhibir la producción de antígenos arriba mencionados.
- Todavía otro aspecto importante de la presente invención se refiere entonces al uso del antígeno enterococal de acuerdo con la presente invención como un antígeno en la producción de anticuerpos que son específicos para dicho antígeno.
- Otro aspecto de la invención se refiere entonces a una composición farmacéutica que comprende al menos un antígeno enterococal de acuerdo con la presente invención y/o al menos un anticuerpo de acuerdo con la presente invención, junto con un soporte y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- Particularmente preferida es una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención, en donde dicha composición comprende un componente de la pared celular de acuerdo con la fórmula I, a saber, un respectivo polisacárido de la pared celular.
- Adicionalmente preferida es una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención, en donde dicha composición se formula como una vacuna, en particular contra las infecciones causadas por enterococos, en particular enterococos resistentes a antibióticos tales como cepas VRE, preferiblemente de *E. faecalis*. La más preferida es una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención, en donde dicho componente de la pared celular de acuerdo con la fórmula I está presente en una vacuna de glicoconjugado.
- El polisacárido de la pared celular de acuerdo con la presente invención (ya esté presente como el antígeno solo o en un extracto o una bacteria según se describe en esta memoria) se utiliza preferentemente para una vacuna de enterococos, ya sea para la inmunización activa o pasiva.
- Por lo tanto, de acuerdo con la invención, se proporciona una composición farmacéutica y, en particular, una vacuna, para uso en la prevención de infecciones enterococales en un vertebrado, comprendiendo dicha composición farmacéutica al menos un nuevo antígeno enterococal de acuerdo con la presente invención, opcionalmente junto con un soporte, adyuvantes y/o diluyente farmacéuticamente aceptables.
- Típicamente, la vacuna puede comprender células intactas vivas o muertas de al menos una cepa de enterococos, preferiblemente de *E. faecalis*, que comprende el antígeno enterococal de la invención. Más típicamente, la vacuna comprende lisado de células procedente de al menos una de dichas cepas enterococales que comprende el antígeno o antígenos enterococales. Incluso más típicamente, la vacuna comprende una mezcla bruta de antígeno enterococal o antígeno enterococal o antígenos de enterococales purificados de al menos una de dichas cepas enterococales, preferiblemente de *E. faecalis*. Aún más típicamente, la vacuna comprende una fracción de la pared celular y proteínas asociadas como antígeno enterococal de al menos una de dichas cepas de enterococos. La vacuna también puede estar compuesta de una combinación de uno de los componentes. La más preferida es una

- 5 vacuna de glicoconjugado que comprende un antígeno enterococal de acuerdo con la presente invención. Otro aspecto se refiere a una composición farmacéutica o vacuna, en donde el antígeno enterococal incluido se ha producido, al menos en parte, a través de síntesis química. Los métodos para purificar las fracciones bacterianas seleccionadas que contienen antígenos enterococales son conocidos para la persona experta, y se describen adicionalmente en esta memoria.
- Típicamente, el vertebrado es un animal herbívoro o rumiante, monogástrico, o un sujeto humano. Incluso más típicamente, el vertebrado se selecciona del grupo que consiste en primates humano, no humano, murino, bovino, ovino, equino, porcino, caprino, leporino, aviar, felino y canino. Más típicamente, el vertebrado se selecciona del grupo que consiste en ser humano, ovino, camélidos, porcino, bovino, equino o canino.
- 10 La composición farmacéutica se puede formular para la administración por vía intramuscular, subcutánea, tópica u otra ruta parenteral. En general, los microorganismos de la presente invención son comensales en la naturaleza. Por lo tanto, la administración oral no es generalmente una vía eficaz de vacunación y, como consecuencia, se prefiere la administración a través de una vía intramuscular, subcutánea, tópica u otra vía parenteral. La vacuna también puede incluir citoquinas tales como: G-CSF, GM-CSF, interleucinas o factor de necrosis tumoral alfa, utilizados solos o en combinación.
- 15 La composición farmacéutica también puede incluir un adyuvante. Más típicamente, el adyuvante se selecciona del grupo que consiste en adyuvante completo/incompleto de Freund, adyuvante macrol montanide, solución salina tamponada con fosfato y emulsiones en aceite de manano, saponinas (QuiLA) dextrano (sulfato de dextrano, DEAE-dextrano), compuestos de aluminio (Imject Alum), *N*-acetilglucosamiiil-*N*-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamina (adyuvante de Gerbu). Más típicamente, el adyuvante se selecciona del grupo según se describe en Vaccine 1995, vol. 13, pág. 1203; 1993 vol. 11 pág. 293; y 1992 vol. 10 pág. 427.
- 20 Todavía otro aspecto importante de la presente invención se refiere entonces a un componente de la pared celular enterococal (antígeno enterococal) de acuerdo con la presente invención, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención para uso en el tratamiento de enfermedades tales como infecciones bacterianas, en particular la infección por enterococos tal como la infección bacteriemia nosocomial, endocarditis, infecciones del tracto urinario, infecciones de heridas quirúrgicas e infecciones por cuerpos extraños.
- 25 Todavía otro aspecto importante de la presente invención se refiere entonces al uso del componente de la pared celular enterococal de acuerdo con la presente invención, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención (es decir, los antígenos enterococales) para el tratamiento contra infecciones bacterianas o para la preparación de un medicamento contra las infecciones bacterianas, en particular la infección por enterococos tal como la infección bacteriemia nosocomial, endocarditis, infecciones del tracto urinario, infecciones de heridas quirúrgicas e infecciones por cuerpos extraños, en particular provocadas por cocos gram-positivos resistentes a antibióticos tales como enterococos, cepas VRE, o tal como *E. faecalis*.
- 30 De acuerdo con todavía otra realización preferida de la invención, se proporciona un uso para inducir una respuesta inmune contra al menos una cepa enterococal que comprende el antígeno enterococal de la presente invención en un vertebrado, comprendiendo dicho uso administrar a dicho vertebrado una cantidad inmunológicamente eficaz de la vacuna de acuerdo con la invención, o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención.
- 35 De acuerdo con todavía otra realización preferida de la invención, se proporciona un uso para tratar o prevenir una infección bacteriana en un vertebrado, que comprende administrar a dicho vertebrado una cantidad terapéuticamente eficaz del componente de la pared celular enterococal de acuerdo con la presente invención, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención.
- 40 Se prefiere un uso de acuerdo con la presente invención, en donde dicha infección bacteriana es una infección enterococal tal como bacteriemia nosocomial, endocarditis, una infección del tracto urinario, infección de heridas quirúrgicas e infección por cuerpos extraños y, en particular, provocada por enterococos resistentes a antibióticos tales como una cepa VRE y, en particular, *E. faecalis*.
- 45 Para examinar el papel de WTA en la resistencia a la opsonofagocitosis mediada por el complemento, los autores de la invención buscaron genes de *E. faecalis* con similitud con genes implicados en la biosíntesis de WTA en *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* utilizando el análisis BLAST. En comparación con *B. subtilis*, el cromosoma de *E. faecalis* V583 porta sólo un operón ácido glicerol-teicoico (tag), que comprende *TagB* (EF_1172) y *TagA* (EF_1173). Estos dos genes son seguidos por un gen de función desconocida (EF_1174) y *TagD* (63% de identidad, 80% de similitud con TarA en *B. subtilis* W23, una glicerol-3-fosfato citidiltransferasa; EF_1175). El homólogo más obvio de la enzima que cataliza la primera etapa de la biosíntesis de WTA, *TagO*, en V583 es EF_2198 proteína (41% de identidad, 65% de similitud con *TagO* en *S. aureus* COL). Un trabajo previo, sin embargo, ha vinculado este gen también al locus *epa*, que es el racimo de genes implicados en la biosíntesis del polisacárido de la pared celular enterococal, también denominado antígeno polisacárido enterococal. Curiosamente, un mutante por interrupción de
- 50
- 55

EF_2198 en *E. faecalis* OG1RF todavía expresaba el polisacárido de la pared celular, según se evaluó por electroforesis en gel de agarosa y la reactividad a Abs específicos (Teng F, Singh KV, Bourgogne A, Zeng J, Murray BE. Further characterization of the epa gene cluster and Epa polysaccharides of *Enterococcus faecalis*. Infect Immun. septiembre de 2009; 77(9): 3759-67).

5 En el ensayo opsonofagocítico, los autores de la invención compararon el exterminio de bacterias de tipo salvaje y mutantes por inserción en *tagO* (EF_2198), *tagA* (EF_1173) y *tagB* (EF_1172) en presencia de complemento y neutrófilos solos o junto con Abs (anticuerpos) específicos para antígenos de la superficie de células enterococales. En contraposición con el tipo salvaje, los tres mutantes en genes de la biosíntesis de WTA eran altamente susceptibles al exterminio opsonofagocítico de suero agotado de Ab específico. El mayor exterminio se correlacionaba considerablemente con una fagocitosis incrementada por los neutrófilos y una mayor densidad de C3d unido a la superficie bacteriana de la cepa mutante. Experimentos adicionales excluyeron que las vías clásica y alternativa estuviesen implicadas en la deposición incrementada de C3b en *E. faecalis* V583Δ1172 y proporcionaron evidencia de que la deposición del complemento era debida a la activación de la vía de la lectina.

10 Con el fin de identificar las estructuras de hidratos de carbono que pueden servir como ligandos para la vía de la lectina en *E. faecalis* V583Δ1172, los autores de la invención investigaron las diferencias estructurales en los polímeros de la pared celular complementaria entre la cepa mutante y la de tipo salvaje. Después de la escisión enzimática de peptidoglicano, los autores de la invención identificaron una banda PAS-positiva en el análisis de SDS-PAGE que ha sido previamente identificada como el polisacárido de la pared celular enterococcal (Theilacker C, et al. Serodiversity of Opsonic Antibodies against *Enterococcus faecalis* glycans of the Cell Wall Revisited. PLoS ONE. 2011; 6(3): e17839).

15 En la cepa de delección *E. faecalis* V583Δ1172, la banda característica del polisacárido de la pared celular mostraba un patrón de migración mucho más lento. Además, el polisacárido había perdido su capacidad para unirse al colorante catiónico Stains All y tampoco se unió a Q-Sepharose, lo que sugiere una pérdida de carga aniónica. Utilizando la cromatografía de exclusión por tamaño y de intercambio aniónico, los autores de la invención obtuvieron fragmentos de la pared celular purificada a partir de *E. faecalis* V583 de tipo salvaje y el mutante de *E. faecalis* V583Δ1172. Material del mutante *E. faecalis* V583Δ1172 contenía menos GalNAc, ribitol y fosfato, lo que indica una pérdida de WTA de la envuelta de la célula del mutante (Weidenmaier C, McLoughlin RM, Lee JC. The zwitterionic cell wall teichoic acid of *Staphylococcus aureus* provokes skin abscesses in mice by a novel CD4+ T-cell-dependent mechanism. PLoS ONE. 2010; 5(10):e13227; Neuhaus FC, Baddiley J. A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. Microbiol Mol Biol Rev. diciembre de 2003; 67(4):686-723; Swoboda JG, Campbell J, Meredith TC, Walker S. Wall teichoic acid function, biosynthesis, and inhibition. ChemBiochem. 4 de enero de 2010; 11(1):35-45).

25 No fue posible una aclaración definitiva de la estructura del polisacárido de la pared celular complementario nativo purificado por espectroscopía de RMN debido a la naturaleza compleja y heterogénea de este hidrato de carbono en las dos cepas. Por lo tanto, los autores de la invención despolimerizaron los fragmentos de pared celular por desfosforilación con HF. Después del fraccionamiento por cromatografía en gel, los autores de la invención obtuvieron tres agrupaciones distintas. La agrupación de masa molecular alta contenía Rha, Glc, GlcN y GalN, indicativos del polisacárido de la pared celular enterococcal. El análisis de metilación sugirió una cadena de poli-Rha con residuos Glc y hexosamina terminales. La agrupación de tamaño medio contenía Rha, Glc, GlcN, GalN y fragmentos de peptidoglicano, según se indica por la presencia de ácido murámico y los aminoácidos Ala, Glu y Lys en una relación molar de ~ 4:1:1, consistente con la composición del peptidoglicano de *E. faecalis* (Bouhss A, Josseaume N, Severin A, Tabei K, Hugonnet JE, Shlaes D, et al. Synthesis of the L-alanyl-L-alanine cross-bridge of *Enterococcus faecalis* peptidoglycan. J Biol Chem. 29 de noviembre de 2002; 277(48):45935-41).

30 Por lo tanto, el oligosacárido representaba probablemente la unidad de enlace del polisacárido de la pared celular al peptidoglicano. La agrupación de masa molecular pequeña consistía en GalN, ribitol, Glc, y Rha en una relación molar de ~3:2:1:1. Después de etapas de purificación adicionales, se detectaron dos oligosacáridos que eran rectificables para la espectroscopía de RMN. El análisis estructural reveló dos fragmentos de ácido teicoico con contenido en ribitol, a saber, α -L-Rhap-(1→3)- β -D-GalpNAc-(1→1)-ribitol y α -D-Glcp-(1→4)-[β -D-Glcp-(1→3)-] β -D-GalpNAc-(1→1)-ribitol.

Digno de mención es que la escisión sin éxito de un puente peptidoglicano que une el hidrato de carbono del grupo B estreptococcal y el polisacárido capsular mediante mutanolisina se ha descrito previamente (Deng L, Kasper DL, Krick TP, Wessels MR. Characterization of the linkage between the type III capsular polysaccharide and the bacterial cell wall of group B Streptococcus. J Biol Chem. 17 de marzo de 2000; 275(11):7497-504).

35 En resumen, los autores de la invención observaron dos diferencias principales en los fragmentos de pared celular de *E. faecalis* V583Δ1172 en comparación con el tipo salvaje: a) un mayor contenido en Rha del polisacárido putativo de la pared celular y b) la pérdida de ácido teicoico con contenido en ribitol en el mutante.

40 Estudios en patógenos Gram-positivos han descrito la interacción del complemento con una diversidad de antígenos de hidratos de carbono bacterianos, incluyendo el polisacárido capsular (Aoyagi Y, Adderson EE, Rubens CE, Bohnsack JF, Min JG, Matsushita M, et al. L-Ficolin/mannose-binding lectin-associated serine protease complexes

bind to group B streptococci primarily through N-acetylneuraminic acid of capsular polysaccharide and activate the complement pathway. Infect Immun. enero de 2008; 76(1):179-88; Krarup A, Sorensen UB, Matsushita M, Jensenius JC, Thiel S. Effect of capsulation of opportunistic pathogenic bacteria on binding of the pattern recognition molecules mannan-binding lectin, L-ficolin, and H-ficolin. Infect Immun. febrero de 2005; 73(2):1052-60), peptidoglicano (Nadesalingam J, Dodds AW, Reid KB, Palaniyar N. Mannose-binding lectin recognizes peptidoglycan via the N-acetyl glucosamine moiety, and inhibits ligand-induced proinflammatory effect and promotes chemokine production by macrophages. J Immunol. 1 de agosto de 2005;175(3):1785-94), LTA (Lynch NJ, et al. L-ficolin specifically binds to lipoteichoic acid, a cell wall constituent of Gram-positive bacteria, and activates the lectin pathway of complement. J Immunol. 15 de enero de 2004; 172(2):1198-202) y WTA (Park KH, et al. Human serum mannan-binding lectin senses wall teichoic acid Glycopolymer of Staphylococcus aureus, which is restricted in infancy. J Biol Chem. 27 de agosto de 2010; 285(35):27167-75). Las profundas alteraciones en los polímeros de la pared celular complementarios dan como resultado una mayor susceptibilidad a la deposición del complemento por la vía de la lectina y un exterminio opsonofagocítico incrementado de bacterias mutantes. Así, los resultados ponen de manifiesto la importancia de la estructura de los polímeros de la pared celular complementarios en la evasión inmune del sistema del complemento.

La presente invención se describirá ahora adicionalmente en los siguientes ejemplos preferidos, con referencia a las figuras adjuntas.

La figura 1 muestra la opsonofagocitosis y la deposición del complemento de *E. faecalis* V583 y mutantes en la biosíntesis de WTA. **A:** exterminio opsonofagocítico de *E. faecalis* V583 y mutantes en la biosíntesis de WTA en presencia de 1,7% de complemento de conejo bebé absorbido solo, complemento en combinación con leucocitos (WBC - siglas en inglés) humanos, o complemento, WBC y Ab de conejo específico. El porcentaje de exterminio se determinó como una relación a unidades formadoras de colonias a partir de tubos control que contenían bacterias y WBCs. **B:** Fagocitosis de bacterias marcadas con FITC y exterminadas con formalina mató después de 15 min de incubación con suero humano. **C:** deposición de C3b en células bacterianas enterococales medida por FACS después de incubación con suero humano.

La Figura 2 muestra la SDS-PAGE de extractos de la pared celular digeridos enzimáticamente. **A** Tinción con ácido peryódico y reactivo de Schiff (PAS). **B** Tinción con Stains All. Pista 1: marcador de masa molecular; pista 2: *E. faecalis* V583 tipo salvaje; pista 3: *E. faecalis* V583Δ1172.

La Figura 3 muestra la espectroscopía de RMN de dos oligosacáridos (OS) I y II preferidos de la presente invención. Se muestran a continuación **A** Espectros de ¹H-RMN de la región anomérica de OS I y OS II. Espectros ROESY de V583 wt (tipo salvaje) OS I (**B**) y OS II (**C**). Las señales positivas se representan en verde, indicando conectividades ¹H,¹H a través de enlaces covalentes, las señales negativas se representan en azul, indicando las conectividades ¹H,¹H a través del espacio. Todas las mediciones se realizaron a 27°C en D₂O a 700 MHz con la acetona patrón interno (δ_H 2,225).

La Figura 4 muestra las estructuras de OS I (A) y OS II (B).

Ejemplos

Métodos y Materiales

Cepas bacterianas, condiciones de crecimiento y medio

E. faecalis se cultivó a 37°C sin agitación en caldo de soja trípico (TSB) (Carl Roth, Karlsruhe) que se suplementó con los respectivos antibióticos según se indica. Cultivos a corto plazo se cultivaron en agar de soja trípico (TSA) y se almacenaron a 4°C. Los cultivos para el aislamiento de polisacáridos de la pared de células enterococales se cultivaron hasta la fase estacionaria durante 18 h y se recogieron por centrifugación. Cultivos de *E. coli* se cultivaron en condiciones aerobias en medio Luria Bertani (LB) (Carl Roth, Karlsruhe), que estaba suplementado con antibióticos según se indica.

45 Construcción de un mutante de inserción de genes EF1172 en *E. faecalis* V583

Un mutante de inserción fijado como objetivo de gen EF_1172 en *E. faecalis* V583 se realizó según se describe por Rigottier-Gois et al. (Rigottier-Gois L, Alberti A, Houel A, Taly J-F, Palcy P, Manson J, et al. Large-Scale Screening of a Targeted *Enterococcus faecalis* Mutant Library Identifies Envelope Fitness Factors. PLoS ONE. 15 de diciembre de 2011; 6(12):e29023), y la localización de la inserción fijada como objetivo se verificó mediante PCR y transferencia Southern según se describió previamente.

Sueros y Abs en estudios de unión del complemento

Suero humano normal agrupado se obtuvo de voluntarios sanos, que dieron su consentimiento informado. Suero de conejo bebé se obtuvo de Cederlane Laboratories. Suero agotado en C1q se adquirió de Quidel. La inactivación por calor del suero se realizó mediante incubación durante 20 min a 56°C. El suero se agotó de Ab específico para *E.*

faecalis V583 por absorción con células bacterianas a 4°C durante 60 min. Después de la absorción, las bacterias se sedimentaron mediante centrifugación y el sobrenadante se hizo pasar a través de un filtro de 0,2 µm.

Ensayo de exterminio opsonofagocítico

5 La opsonofagocitosis bacteriana mediante leucocitos (WBC) humanos se midió como se ha descrito previamente (Theilacker C, et al. Serodiversity of Opsonic Antibodies against *Enterococcus faecalis*-Glycans of the Cell Wall Revisited. PLoS ONE. 2011; 6(3): e17839). En síntesis, las cepas bacterianas fueron cultivadas en la fase logarítmica media ($DO_{600} = 0,4$) en TSB y se diluyeron con RPMI suplementado con suero de ternero fetal al 15%. Los WBCs se purificaron a partir de la sangre de voluntarios sanos mediante sedimentación con tampón de heparina-dextrano y los eritrocitos restantes se retiraron mediante lisis hipotónica en disolución de NH_4Cl al 1%.
 10 Suero de conejo bebé, diluido en la relación 1:15 sirvió como fuente de complemento. Para separar Abs naturales frente a las cepas diana el complemento fue absorbido con *E. faecalis* V583 según se describe arriba. Como fuente de Ab servía suero de conejo generado contra *E. faecalis* V583 exterminado por calor a una dilución de 1:2500. En los tubos de control, Ab, complemento, o PMNs se omitieron en el ensayo. Para la medición de la opsonofagocitosis se combinaron volúmenes iguales de $2,5 \times 10^6$ PMNs, $2,5 \times 10^6$ UFCs de bacterias, complemento y suero de conejo
 15 inmune inactivado por calor. Después de 90 min de incubación, se detuvo la reacción a 4°C, PMNs se lisaron mediante lisis hipotónica, y los recuentos de células viables se determinaron mediante siembra de diluciones en serie.

Ensayo de la fagocitosis

20 El ensayo de fagocitosis se realizó como se describe con modificaciones (Rooijackers SH, et al. Immune evasion by a staphylococcal complement inhibitor that acts on C3 convertases. Nat Immunol. septiembre de 2005; 6(9):920-7). Suero agrupado humano fue absorbido con *E. faecalis* según se describe arriba y fue diluido en medio RPMI con la adición de albúmina de suero humano (HSA - siglas en inglés) al 0,05% hasta la concentración respectiva. A continuación, se añadieron $7,5 \times 10^4$ neutrófilos humanos recién aislados y $7,5 \times 10^5$ de *E. faecalis* V583 tipo salvaje o *E. faecalis* V583Δ1172 exterminados por calor y marcados con FITC y se incubaron durante 15 min a 37°C al
 25 tiempo que se agitaba a 750 rpm. La reacción se detuvo mediante la adición de paraformaldehído al 1,5% enfriado con hielo en RPMI y HSA al 0,1%. La fagocitosis se analizó mediante citometría de flujo (FACSCalibur; Becton Dickinson) midiendo la fluorescencia de 10.000 neutrófilos con barrera. Suero inactivado por calor se utilizó como control para la fagocitosis independiente del complemento. **Deposición de C3b en *E. faecalis***

30 Cepas de *E. faecalis* se hicieron crecer hasta una DO_{600} de 0,5 en TSB y se lavaron en tampón HEPES⁺⁺ (HEPES 20 mM, NaCl 140 mM, $CaCl_2$ 5 mM, $MgCl_2$ 2,5 mM) con BSA al 0,1%. $12,5 \times 10^5$ bacterias se incubaron con suero durante 30 min al tiempo que se agitaba a 900 rpm. Las bacterias se lavaron con PBS suplementado con BSA al 0,1%. La deposición de C3b se detectó utilizando Abs de C3d anti-humanos de ratón (Quidel) e IgG anti-ratón de cabra conjugado con FITC (Protos). La fluorescencia de 10.000 bacterias se midió mediante citometría de flujo. La vía clásica y de lectina fue abolida mediante la incubación de bacterias con complemento en presencia de tampón
 35 HEPES⁺⁺ más $MgCl_2$ 5 mM y EGTA 10mM, pH 7,5. Para la inactivación específica de la vía clásica, se utilizó suero agotado en C1q (Quidel). El complejo convertasa C3 (C4bC2a) se midió utilizando un anticuerpo monoclonal contra C4/C4d humano (Quidel) y conjugado de FITC anti-ratón policlonal de cabra como anticuerpo secundario (Dako). La deposición de MASP-2 se detectó utilizando un Ab anti-MASP-2 policlonal de cabra (Santa Cruz Biotechnology).

Aislamiento de la pared celular de polisacárido

40 Para el aislamiento de polisacáridos de la pared de células enterococales, las bacterias se cultivaron como se describe arriba. Las bacterias se lavaron y se resuspendieron en tampón de digestión (PBS más $CaCl_2$ 20 mM, $MgCl_2$ 20 mM, NaN_3 al 0,05%) y se escindieron enzimáticamente con mutanolisina (0,01 mg/mL) y lisozima (0,5 mg/mL) a 37°C durante 18 h. Después, el material insoluble se separó mediante centrifugación y el sobrenadante fue tratado con nucleasas (DNasa I y RNasa, concentración final de 0,1 mg/mL) durante 18 h a 37°C. Las proteínas
 45 se degradan mediante digestión con proteinasa K (0,1 mg/mL) durante 8 h a 56°C. El sobrenadante se dializó ampliamente (10 ku MMCO) frente a H_2O y se liofilizó. Para la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC - siglas en inglés), la muestra se disolvió en tampón carbonato de amonio 50 mM (pH 8,8; NaN_3 al 0,02%) y se aplicó en una columna Sephacryl S 200 (1,6 x 100 cm, GE Healthcare). Se midieron hexosa y el contenido de fósforo como se ha descrito previamente (Theilacker C, et al. Opsonic antibodies to *Enterococcus faecalis* strain 12030 are directed against lipoteichoic acid. Infect Immun. octubre de 2006; 74(10):5703-12), y se combinaron, dializaron y liofilizaron fracciones positivas que eluyen a una K_{av} de 0,29 y 0,31, respectivamente. El material resultante se disolvió en $NaHCO_3$ 20 mM (pH 8,0, NaN_3 al 0,02%) y se sometieron a cromatografía de intercambio de aniones (Q Sepharose FF, GE Healthcare).

55 Para escindir los enlaces fosfodiéster, 10 mg de la muestra se disolvieron en 50 µL de HF al 48% y se incubaron a 4°C durante 2 d. El material se neutralizó y se separó mediante SEC en Sephadex G50 (columna de 1,6 x 100 cm, BioRad). Fracciones de la masa molecular más baja fueron purificadas adicionalmente mediante SEC en Biogel P2 (Columna de 1 x 120 cm, Biorad), seguido de cromatografía de intercambio de aniones de alto rendimiento (HPAEC - siglas en inglés, Dionex) empleando una columna CarboPak PA 100 (9 x 250 mm) y un detector electroquímico ED50 (Dionex). El análisis de los datos se realizó utilizando el software Chromeleon versión 6.6.

SDS-PAGE

Para la SDS-PAGE de hidratos de carbono de la pared de células enterococales brutos se centrifugaron 40 mL de cultivo y el sedimento se digirió con mutanolisina, lisozima, nucleasas y proteinasa K como se ha descrito arriba. Después de una amplia diálisis frente a H₂O, 100 µg del material liofilizado se separaron mediante un gel NuPAGE Novex BisTris al 10% prefabricado (Invitrogen) en tampón de desarrollo Nupage SDS-MES (Invitrogen). Los hidratos de carbono se tiñeron con Stains All o reactivo de Schiff de ácido periódico (PAS) según se describe previamente (Theilacker C, Kaczynski Z, Kropec A, Sava I, Ye L, Bychowska A, et al. Serodiversity of Opsonic Antibodies against Enterococcus faecalis-Glycans of the Cell Wall Revisited. PLoS ONE. 2011; 6(3):e17839; Hancock LE, Gilmore MS. The capsular polysaccharide of Enterococcus faecalis and its relationship to other polysaccharides in the cell wall. Proc Natl Acad Sci U S A. 5 de febrero de 2002; 99(3):1574-9).

Análisis cualitativos y cuantitativos de azúcares neutros se realizaron mediante cromatografía de gases (GC) de acetatos de alditol hidrolizados y peracetilados según se ha descrito previamente (Haseley SR, Holst O, Brade H. Structural and serological characterisation of the O-antigenic polysaccharide of the lipopolysaccharide from *Acinetobacter haemolyticus* strain ATCC 17906. Eur J Biochem. 15 de marzo de 1997; 244(3):761-6). Se llevaron a cabo separaciones mediante GC con un sistema Agilent GC (6890N) equipado con una columna capilar SPB-5 de poli-(5%-difenil-95%-dimetil)-siloxano (30 m, d.i. 0,32 mm). Las señales fueron detectadas mediante ionización de llama y fueron analizadas con el software Agilent ChemStation versión B 01.01. La configuración absoluta de los azúcares se determinó mediante GC de (S)-2-butanoglicósidos peracetilados.

El análisis de metilación se llevó a cabo analizando los acetatos de alditol parcialmente metilados del material tratado con HF mediante GC-MS (Ciucanu I, Kerek F. A Simple and Rapid Method for the Permethylation of Carbohydrates. Carbohydrate Research. 1984;131(2):209-17). En síntesis, 150 µg del material liofilizado tratado con HF fue metilado (yoduro de metilo) tres veces en DMSO anhidro (almacenado sobre tamiz molecular [4 Å]) con la adición de NaOH en polvo. La mezcla se mantuvo durante 1 h a 20°C bajo agitación. Después, los polisacáridos metilados se extrajeron tres veces con 2 mL de cloroformo, se secaron y se hidrolizaron con CF₃COOH 4 M durante 4 h a 100°C. Subsiguientemente, el material se evaporó con H₂O desionizada para separar el CF₃COOH residual y se redujo con borodeuteruro de sodio (18 h en la oscuridad). La peracetilación se realizó como se describe arriba, seguido de análisis por GC-MS.

Espectroscopia de resonancia magnética nuclear

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) se llevó a cabo en un espectrómetro Bruker Avance III 700 MHz Ultrashield Plus, empleando un software estándar (Bruker). Las frecuencias de trabajo para los experimentos de ¹H-RMN eran 700,75 MHz, para experimentos de ¹³C-RMN eran 176,20 MHz y para experimentos de ³¹P-RMN eran 283,67 MHz. Para el intercambio de H-D, las muestras se resolvieron repetidamente en D₂O (99,9%) y se evaporaron bajo nitrógeno, y para las mediciones finales la muestra se resolvió en D₂O (99,99%). Todos los espectros se registraron a 27°C. Los desplazamientos químicos se asignan en ppm y se calibran de acuerdo con los valores de acetona (δ_H: 2,225; δ_C: 31,45) utilizados como patrón interno.

Espectros de espectroscopía de correlación (COSY), espectroscopia de correlación total (TOCSY), espectroscopia de efecto Overhauser nuclear (NOESY) y espectroscopia de efecto Overhauser nuclear en su plano rotatorio (ROESY) se registraron con conjuntos de datos (t₂ × t₁) de 2048 × 512 puntos bits. Se llevaron a cabo experimentos TOCSY y NOESY sensibles en fase con tiempos de mezcla de 400 ms y 180 ms, respectivamente. Las correlaciones ¹H-¹³C heteronucleares 2D se realizaron mediante experimentos de coherencia de quantum múltiple heteronuclear (HMQC), correlación por enlace múltiple heteronuclear (HMBC) y correlación por quantum sencillo heteronuclear (HSQC) con conjuntos de datos de 4096 × 512 puntos bits.

Resultados**Mutantes de *E. faecalis* con deficiencias en la biosíntesis de WTA son más susceptibles a la opsonofagocitosis en ausencia de Ab específico**

Mutantes por inserción de genes con alta homología con genes de ácido glicerol-teicoico (tag) *tagO* (EF2198), *tagA* (EF1173) y *tagB* (EF1172) se han construido previamente (Tabla 1) (Rigottier-Gois L, Alberti A, Houel A, Taly J-F, Palcy P, Manson J, et al. Large-Scale Screening of a Targeted Enterococcus faecalis Mutant Library Identifies Envelope Fitness Factors. PLoS ONE. 15 de diciembre de 2011; 6(12):e29023).

Tabla 1: Análisis de homología de genes de la biosíntesis de ácido teicoico de *B. subtilis* W23y *S. aureus* COL con genes de *E. faecalis* V583 mediante el algoritmo BLAST.

		B. subtilis		S. aureus		Función
		% Id	% Si	% Id	%Si	
5						
	EF2198 TagO	24	40	41	65	UDP- <i>N</i> -acetilglucosamina-undecaprenil- <i>P</i> <i>N</i> -acetilglucosaminil-1- <i>P</i> transferasa
	EF1173 TarA	38	60	33	59	<i>N</i> -acetilglucosaminil-difosfo-undecaprenol <i>N</i> -acetil-manosaminil-transferasa
10	EF1172 TagB	28	48	26	47	glicerofosfotransferasa

Los autores de la invención estudiaron estos mutantes en un ensayo de exterminio opsonofagocítico heterólogo utilizando suero de conejo bebé al 1,7% agotado de Ab específico mediante absorción a la cepa diana como fuente de complemento (Figura 1). *E. faecalis* V583 tipo salvaje era resistente a la opsonofagocitosis dependiente del complemento por parte de neutrófilos humanos. Sólo después de la adición de Ab específico, las bacterias fueron exterminadas fácilmente. En contraposición, mutantes por inserción de *E. faecalis* en *tagO* (EF2198), *tagA* (EF1173) y *tagB* (EF1172) eran altamente susceptibles al exterminio mediado por el complemento y la adición de Ab específico no fomentaba aún más la opsonofagocitosis (Figura 1, A). A continuación, los autores de la invención incubaron células de *E. faecalis* marcadas con FITC y exterminadas por calor con suero humano absorbido para medir la absorción por parte de neutrófilos humanos por análisis FACS. A concentraciones séricas de hasta 10%, la tasa de *E. faecalis* V583Δ1172 fagocitada era mucho mayor en comparación con bacterias de tipo salvaje (Figura 1B).

La inactivación de *tagB* (EF1172) en *E. faecalis* V583 conduce a una deposición incrementada de C3b por la vía de la lectina

Para someter a ensayo si una absorción fagocítica elevada de *E. faecalis* V583Δ1172 era debida a una deposición incrementada de complemento, los autores de la invención midieron mediante citometría de flujo la cantidad de C3b unida a células bacterianas. Suero humano agotado de Ab específico mediante absorción con la cepa diana se utilizó como fuente de complemento. Comparado con bacterias de tipo salvaje, se detectaron concentraciones más altas de C3b unido a *E. faecalis* V583Δ2198 (homólogo *tagO*) y a *E. faecalis* V583Δ1172 (Figura 1C). C3b es el producto final de la vía clásica, de la lectina y alternativa de activación del complemento. La vía clásica y de la lectina conducen ambas a la formación del complejo de convertasa C3 C4bC2b, que escinde C3 en C3a y C3b. Ca²⁺ es un cofactor esencial para la activación de la vía clásica y de la lectina.

La sensibilidad al exterminio opsonofagocítico inducido por el complemento se asocia a hidratos de carbono de la envuelta de la célula alterada

Para investigar esta hipótesis, los autores de la invención caracterizaron la estructura de los polisacáridos asociados a la pared celular de *E. faecalis* de tipo salvaje y V583Δ1172. Para este fin, fragmentos de la pared celular después de la despolimerización de peptidoglicano por mutanolisina y lisozima fueron separadas mediante SDS-PAGE y se tiñeron mediante PAS y Stains All (Figura 2). La SDS-PAGE de los fragmentos de pared celular de la cepa de tipo salvaje reveló una banda ancha de alrededor de 60 ku. En *E. faecalis* V583Δ1172, en contraposición, esta banda migró considerablemente de forma más lenta y no fue teñida mediante el colorante catiónico Stains All, lo que sugiere una pérdida de motivos de carga negativa (Figura 2).

Extractos de pared celular de *E. faecalis* V583Δ1172 contienen menos fósforo y glucosamina, pero más ramnosa

Extractos de pared celular de la *E. faecalis* V583 de tipo salvaje y su mutante insertado V583Δ1172 se purificaron adicionalmente mediante cromatografía. En primer lugar, el material se separó mediante SEC. A pesar del diferente patrón de migración en SDS PAGE, extractos de pared celular del tipo salvaje y mutante se eluyeron a volúmenes similares en SEC, lo que indica una masa molecular similar. Sin embargo, el material de *E. faecalis* V583Δ1172 contenía menos fósforo. Para un análisis adicional, se combinaron las fracciones del pico principal que contenía hidratos de carbono (K_{AV} 0,30) y se sometieron a cromatografía de intercambio de aniones. Material procedente de *E. faecalis* de tipo salvaje eluyó como un pico principal, que contiene fósforo, a NaCl 175 mM de Q Sepharose. En contraposición, el pico principal en *E. faecalis* V583Δ1172 no se fijó a la columna de intercambio de aniones,

sugiriendo de nuevo una pérdida de carga negativa. El análisis de la composición de los extractos purificados reveló que el polisacárido de las dos cepas contenía Rha, Glc, GalN, GlcN, ribitol y fosfato. La comparación de las relaciones molares de los azúcares, ribitol y fosfato reveló que el polisacárido V583Δ1172 contenía aproximadamente cuatro veces menos galactosamina y ribitol, y aprox. 2,5 veces menos fosfato en comparación con el tipo salvaje. En espectroscopía de ¹H-RMN, diferían las señales de protones anoméricos del polisacárido de la pared celular de *E. faecalis* tipo salvaje y V583Δ1172, pero la heterogeneidad de la región anomérica impidió un análisis detallado sin degradación ulterior de la molécula.

El polisacárido de la pared celular de *E. faecalis* V583Δ1172 carece de WTA unido covalentemente

Para investigar adicionalmente la estructura de los dos polisacáridos de la pared celular, se hidrolizaron enlaces fosfodiéster mediante HF acuoso y el hidrolizado se fraccionó mediante SEC (Figura 1 y 3A suplementaria). En comparación con los fragmentos de pared celular de la cepa de tipo salvaje, el perfil de elución del polisacárido mutante carecía de un pico de baja masa molecular, eluyendo cerca del volumen total de la columna. Este material de baja masa molecular de la cepa de tipo salvaje se purificó adicionalmente mediante cromatografía de exclusión por tamaño y se realizó un análisis de la composición. Se confirmó la presencia de D-GalN, L-Rha, D-Glc, y ribitol como componentes típicos de un TA que contiene ribitol (Tabla 2). La separación adicional de este material mediante HPAEC reveló la presencia de dos oligosacáridos diferentes designados OS I y OS II, que luego se aislaron mediante HPAEC preparativa.

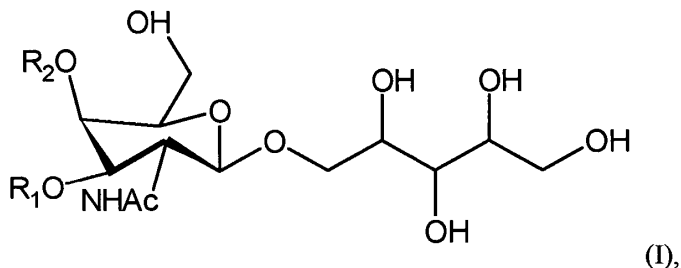
Tabla 2: Análisis de la composición de polímeros de la pared celular complementarios de *E. faecalis* después de desfosforilación con HF y SEC en Sephadex G50. En *E. faecalis* V583Δ 1172 estaba ausente la agrupación 3. N.D.: no detectado. Rha - ramnosa, Glc - glucosa, GlcN - glucosamina, GalN - galactosamina, Ala - alanina, Glu - glutamina, Lys - lisina Las concentraciones se expresan como nmol/mg.

		Rha	Glc	Ribitol	GlcN	GalN	Ala	Glu	Lys
25	V583 wt agrupación 1	2116	643	N.D.	280	154	112	28	28
	V583 wt agrupación 2	363	170	27	198	178	972	274	287
	V583 wt agrupación 3	589	690	1180	N.D.	1668	14	6	7
	V583Δ1172 agrupación 1	3337	762	N.D.	268	123	129	30	28
30	V583Δ1172 agrupación 2	524	110	N.D.	10	6	64	16	16

El espectro de ¹H-RMN de OS I (véase la Figura 4) mostró dos señales diferentes en la región anomérica, es decir, en δ 4,88 (A1) que fue asignada como el protón anomérico de α-L-Rhap y en δ 4,58 (B1) que fue anotado como protón anomérico de β-D-GalpN. La señal en δ 1,27 (A6) fue asignada a los protones metílicos de Rha. El espectro de ¹H-RMN de OS II (véase la Figura 4) comprendía por tres señales diferentes en la región anomérica. Una señal en δ 4,59 (E1) representó el protón anomérico de un residuo de β-D-GalpN, otro en δ 4,98 fue asignado al protón anomérico de α-D-Glcp (D1), y el situado en δ 4,45 (F1) al protón anomérico de β-D-Glcp. Los espectros de ¹H-RMN exhibían señales a δ 2,06 (OS I) y δ 2,03 (OS II), indicando la N-acetilación de GalpN en ambas muestras. Por lo tanto, las estructuras correspondientes eran el trisacárido α-L-Rhap-(1→3)-β-D-GalpNAc(1→1)-ribitol para OS I y el tetrasacárido ramificado α-D-Glcp-(1→4)-[β-D-Glcp-(1→3)-]β-D-GalpNAc-(1→1)-ribitol para OS II.

REIVINDICACIONES

1. Un componente de la pared de células enterococales, seleccionado del grupo que consiste en estructuras β -D-GalpNAc-ribitol



5 en donde R_1 se selecciona de β -D-Glcp o α -L-Rhap, y

R_2 se selecciona de H o α -D-Glcp,

y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

2. Un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo monoclonal o un fragmento antigénico del mismo, que reconoce específicamente un componente de la pared de células enterococales de acuerdo con la reivindicación 1.

10 3. Una composición farmacéutica que comprende al menos un componente de la pared de células enterococales de acuerdo con la reivindicación 1 y/o al menos un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 2, junto con un soporte y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

4. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicha composición comprende un componente de la pared celular de acuerdo con la fórmula I.

15 5. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 3 ó 4, en donde dicha composición se formula como una vacuna.

6. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en donde dicho componente de la pared celular de acuerdo con la fórmula I está presente en una vacuna de glicoconjugado.

20 7. Un método para producir el componente de la pared de células enterococales de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende aislar dicho componente de la pared de células enterococales a partir de una fracción bacteriana, o que comprende sintetizar dicho antígeno, al menos en parte, a través de síntesis química.

25 8. Un método para producir el anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende inmunizar un mamífero, preferiblemente un conejo, con un componente de la pared de células enterococales de acuerdo con la reivindicación 1, o con la composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, y preferiblemente la vacuna de acuerdo con la reivindicación 5 ó 6.

9. Un método para producir el anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende generar células de hibridoma que producen dicho anticuerpo como un anticuerpo monoclonal, o que comprende una producción recombinante de dicho anticuerpo en una célula huésped.

30 10. El componente de la pared de células enterococales de acuerdo con la reivindicación 1, el anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 2 o la composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6 para uso en el tratamiento de enfermedades.

35 11. El componente de la pared de células enterococales de acuerdo con la reivindicación 1, el anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 2 o la composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6 para uso en inducir una respuesta inmune contra al menos una cepa enterococal en un vertebrado, administrando a dicho vertebrado una cantidad inmunológicamente eficaz de dicho componente de la pared de células enterococales de acuerdo con la reivindicación 1, dicho anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 2 o dicha composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6.

40 12. El componente de la pared de células enterococales de acuerdo con la reivindicación 1, el anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 2 o la composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6 para uso en tratar o prevenir una infección bacteriana en un vertebrado, administrando a dicho vertebrado una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho componente de la pared de células enterococales de acuerdo con la reivindicación 1, dicho anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 2 o dicha composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6.

5 13. El componente de la pared de células enterococales de acuerdo con la reivindicación 1, el anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 2 o la composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6 para uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde dicha infección bacteriana es una infección por enterococos tal como infección bacteriemia nosocomial, endocarditis, una infección del tracto urinario, infección de herida quirúrgica e infección por cuerpos extraños y es provocada, en particular, por enterococos resistentes a antibióticos.

14. El componente de la pared de células enterococales de acuerdo con la reivindicación 1, el anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 2 o la composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6 para uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde dicho enterococo resistente a antibióticos es una cepa VRE tal como, por ejemplo, *E. faecalis*.

Figura 1

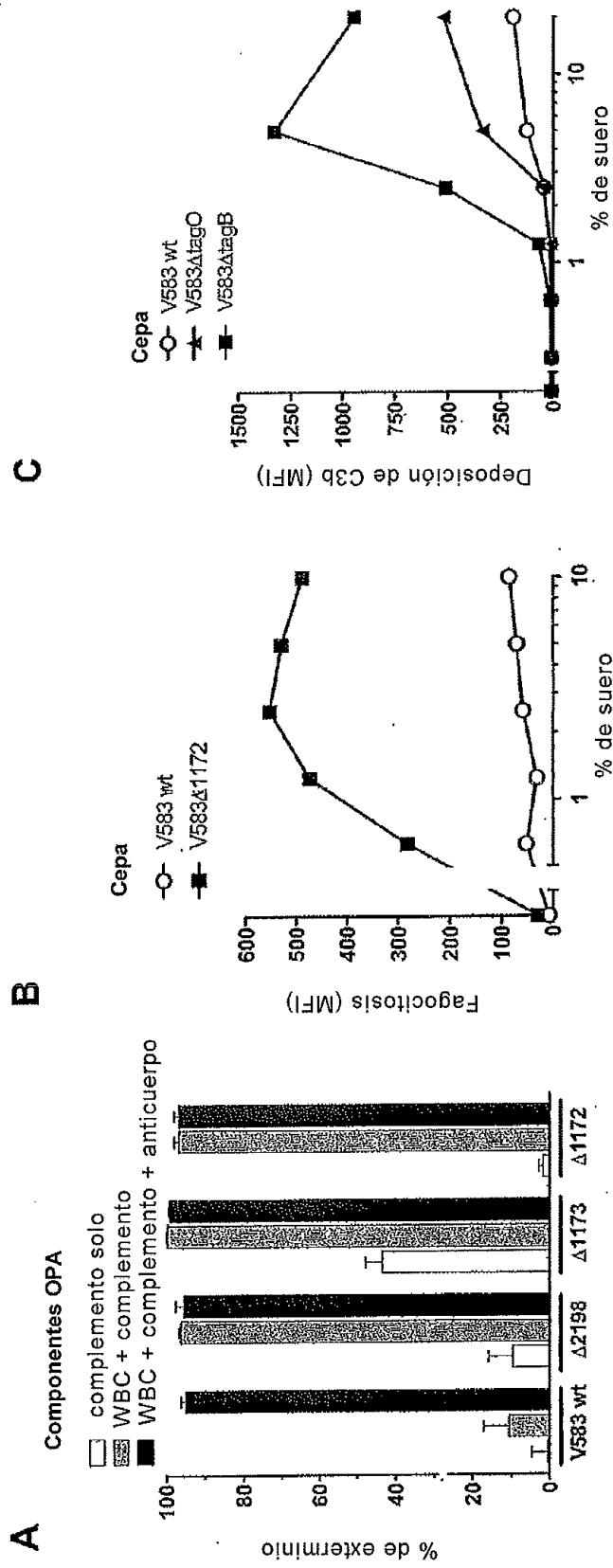


Figura 2

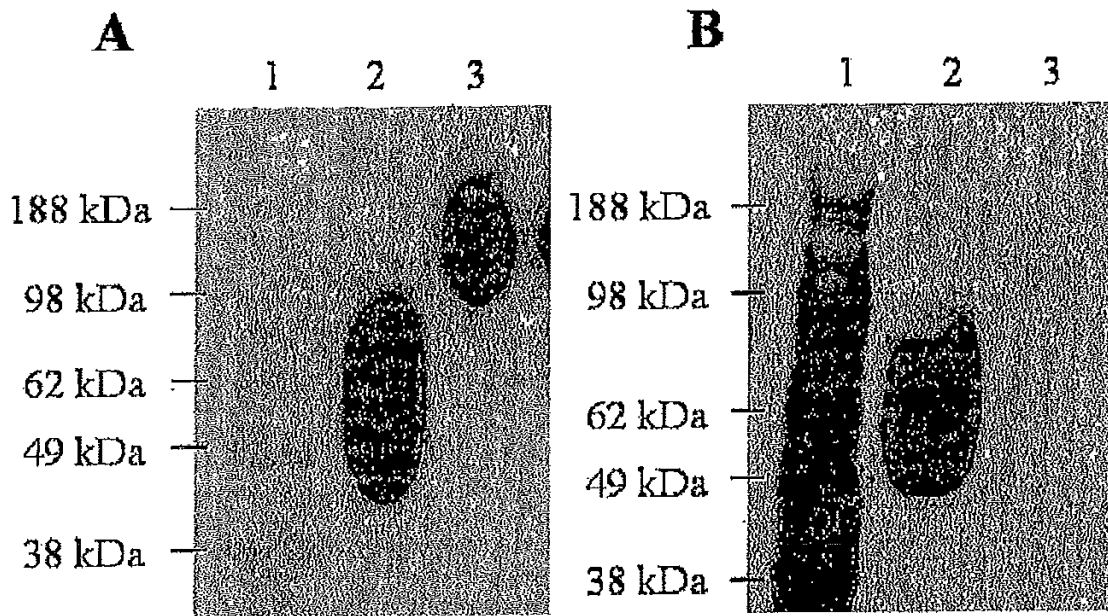
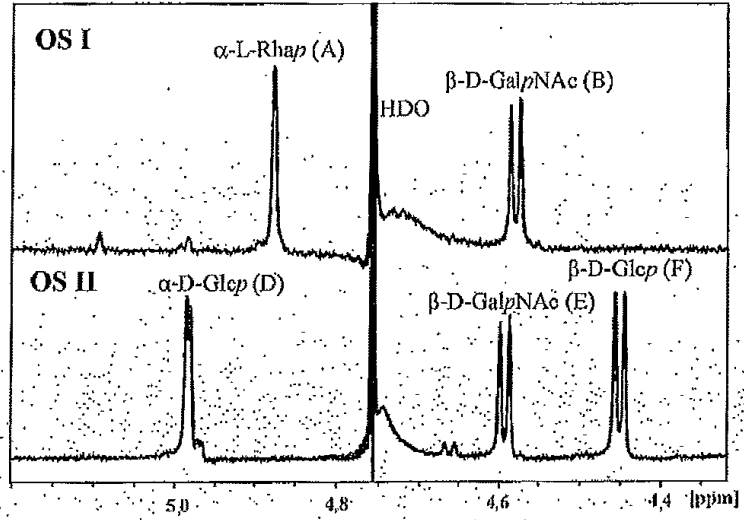
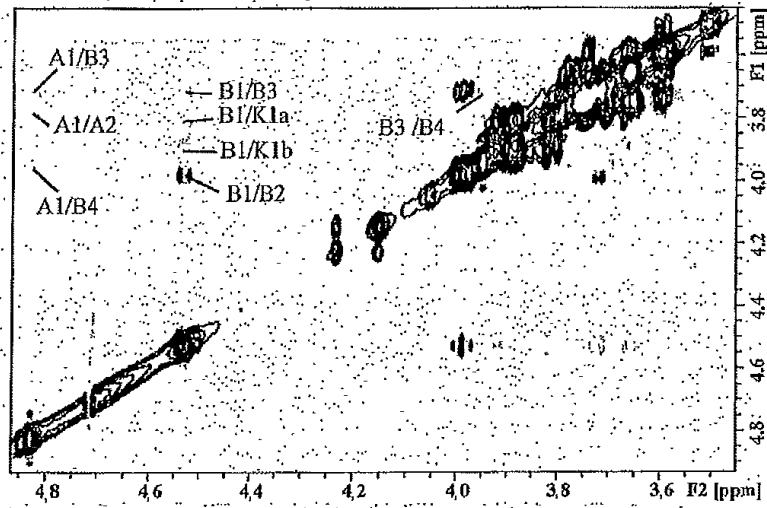


Figura 3

A



B



C

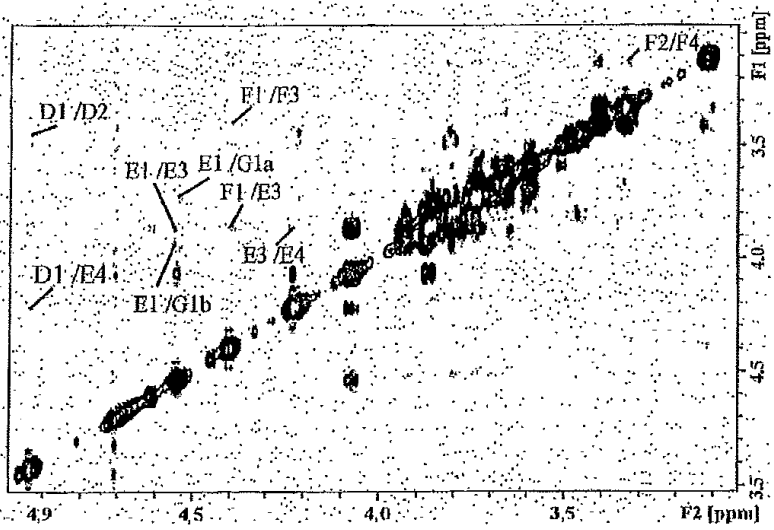


Figura 4

