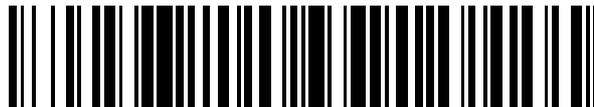


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 556 951**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/702** (2006.01)

**A61K 39/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2011 E 11004387 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.09.2015 EP 2526951**

54 Título: **Polisacárido ramno del complejo clonal 17 de Enterococcus faecium y usos del mismo**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**21.01.2016**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 556 951 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

Polisacárido ramno del complejo clonal 17 de *Enterococcus faecium* y usos del mismo

La presente invención se refiere a un antígeno de polisacárido ramno del complejo clonal 17 de *Enterococcus faecium* que es útil como un componente de vacuna para la terapia y/o profilaxis de la infección bacteriana.

## 5 Antecedentes de la invención

Los enterococos se encuentran entre los patógenos más importantes asociados con las infecciones nosocomiales. Especialmente, *E. faecium* han adquirido múltiples resistencias a antibióticos y son a menudo resistentes a la vancomicina, un antibiótico de último recurso contra las bacterias Gram-positivas multi-resistentes. Además, se ha demostrado que el determinante de la resistencia a la vancomicina puede ser transferido de *E. faecium* al *Staphylococcus aureus* mucho más virulento (Chang et al. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the vanA resistance gene. N Engl J Med (2003) vol. 348 (14) págs. 1342-7). Linajes específicos tales como el "complejo clonal" 17, se han asociado con brotes hospitalarios de *E. faecium* resistente a vancomicina en todo el mundo (Willems et al. Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. Emerging Infect Dis (2005) vol. 11(6) págs. 821-8) y estas cepas parecen estar adaptado particularmente bien a la configuración de hospital.

Si bien existe cierta información limitada en relación con la presencia y composición de polisacáridos capsulares en *E. faecalis*, casi nada se sabe acerca de los hidratos de carbono de la superficie en *E. faecium*. Huebner et al. (Huebner et al. Isolation and chemical characterization of a capsular polysaccharide antigen shared by clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. Infect Immun (1999) vol. 67 (3) págs. 1213-9) podrían demostrar que algunas cepas de *E. faecium* parecen estar no encapsuladas y son exterminadas con eficacia mediante sueros generados contra ácido lipoteicoico. Sin embargo, una mayoría de las cepas parece poseer una cápsula y son resistentes a la muerte debido a los anticuerpos generados contra ácidos lipoteicoicos (LTA) de enterococos (observación no publicada).

Puesto que virtualmente a menudo no hay antibióticos disponibles para tratar a pacientes con infecciones por VRE, el desarrollo de opciones alternativas de tratamiento es de suma importancia. Es por tanto objeto de la presente invención proporcionar antígenos nuevos y eficaces, y en particular antígenos polisacáridos (PS), con el fin de desarrollar nuevas vacunas prometedoras para una inmunoterapia activa o pasiva de las bacterias y, en particular, enterococos.

La presente invención satisface estas necesidades, proporcionando un antígeno polisacárido ramno de complejo clonal de *E. faecium*, que comprende una estructura antigénica de la siguiente fórmula



en donde Rha se selecciona de ramnosa, y en donde opcionalmente al menos un grupo -OH está reemplazado por -OW, en donde W se selecciona de acetilo, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>12</sub>, y alqueno C<sub>1</sub> a C<sub>12</sub>; y sales o solvatos del mismo. Preferiblemente, Rha se selecciona de ramnosa.

Con el fin de identificar los objetivos de anticuerpos opsonicos en *E. faecium*, los autores de la invención utilizaron un aislado clínico perteneciente al complejo clonal 17 (CC17) (*E. faecium* E155, Leavis et al. Insertion sequence-driven diversification creates a globally dispersed emerging multiresistant subspecies of *E. faecium*. PLoS Pathog (2007) vol. 3 (1) págs. E7) que fue exterminado por calor (65°C durante 45 min) e inyectado en un conejo. El suero resultante se ensayó en un ensayo opsonofagocítico, el mejor sustituto para una respuesta inmune protectora contra agentes patógenos bacterianos. Los sueros resultantes mostraron un exterminio de 72% a una dilución de 1:20 contra la cepa homóloga (véase la Fig. 2).

El antígeno polisacárido ramno de la invención proporciona una diana antigénica nueva y eficaz para el desarrollo de estrategias más eficientes para tratar con eficacia y/o prevenir la infección en vertebrados causada, al menos en parte, por enterococos u otras bacterias Gram-positivas, permite estrategias de vacunación mejoradas, y permite el desarrollo y la producción de vacunas respectivas tales como vacunas de glicoconjugados.

El antígeno polisacárido ramno de la invención del polisacárido de *E. faecium* consiste en una unidad repetitiva de trisacáridos de acuerdo con la fórmula anterior. Por lo tanto, aún más preferido es un antígeno polisacárido ramno de la invención, en el que dicho antígeno comprende 1 a 20 unidades repetitivas de trisacáridos, preferiblemente de 1 a 10 unidades tales como, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 ó 6, y lo más preferido de 1 a 3 unidades.

El antígeno polisacárido ramno anterior puede incluir, además al menos un (lo cual se prefiere) grupo enlazador L, que se fija preferiblemente a uno de los extremos de la cadena de la o las unidades de repetición y/o restos azúcar,

- 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 con las propiedades inmunológicas del antígeno polisacárido ramno. Enlazadores preferidos incluyen, pero no se limitan a enlazadores alquil C<sub>1</sub> a C<sub>12</sub>-amino, que están opcionalmente sustituidos con otros grupos, o enlazadores peptídicos. Otras modificaciones incluyen la adición de restos químicos al antígeno polisacárido ramno (también incluido en "L") con el fin de portar una etiqueta 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 ser capaz de purificar y/o utilizar el antígeno polisacárido ramno, por ejemplo, en ensayos de diagnóstico.
- Aunque se especula que la actividad inmunológica de dicha molécula aumenta con su longitud de unidades de antígeno polisacárido ramno, los autores de la invención asumen que las moléculas más cortas ya pueden ser bastante eficaces en su respuesta inmune.
- Otro aspecto de la invención se refiere entonces a una composición farmacéutica, que comprende al menos uno de los antígenos polisacárido ramno de acuerdo con la presente invención y/o al menos un anticuerpo de acuerdo con la presente invención según se describe a continuación, junto con al menos un soporte, adyuvante y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- Se prefiere particularmente una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención, en donde dicha composición comprende un antígeno polisacárido ramno tal como se describe en esta memoria.
- Adicionalmente preferida es una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención, en donde dicha composición se formula como una vacuna, en particular contra infecciones provocadas por enterococos, en particular enterococos resistentes a antibióticos, tales como cepas de VRE, preferiblemente de *E. faecalis* o *E. faecium*, p. ej., el complejo clonal 17 de *E. faecium*. La más preferida es una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención, en donde dicho antígeno polisacárido ramno de acuerdo con la presente invención está presente en una vacuna de glicoconjugados.
- El antígeno polisacárido ramno de acuerdo con la presente invención (ya esté presente como el antígeno solo o en un extracto bacteriano o fracción de la pared celular) se utiliza preferiblemente para una vacuna enterocócica, estafilocócica o neumocócica, ya sea para la inmunización activa o pasiva.
- Por lo tanto, la invención proporciona, además, una composición farmacéutica, y en particular una vacuna, para la prevención de infecciones enterocócicas en un vertebrado, comprendiendo dicha composición farmacéutica al menos un antígeno polisacárido ramno de acuerdo con la presente invención, opcionalmente junto con un soporte, adyuvante y/o diluyente farmacéuticamente aceptable. Soportes preferidos incluyen, pero no se limitan a, CRM (CRM197), hemocianina de *Tachypleus tridentatus* (TTH), hemocianina de *Limulus polyphemus* (LPH), toxoide tetánico (TT), toxoide diftérico (DT), albúmina de suero bovino (BSA) y la proteína ExoU.
- Típicamente, la vacuna puede comprender, además, células intactas vivas o muertas de al menos una cepa de enterococos, de preferencia de *E. faecium*, junto con el antígeno polisacárido ramno de la invención. Más típicamente, la vacuna comprende lisado celular de al menos una cepa de enterococos. Los métodos para la purificación de las fracciones bacterianas seleccionadas que contienen el antígeno polisacárido ramno enterocócico son conocidas por la persona experta. Otro aspecto se refiere a una composición farmacéutica o vacuna, en donde el antígeno polisacárido ramno como incluido se ha producido, al menos en parte, a través de síntesis química.
- Típicamente, el vertebrado es un animal monogástrico, herbívoro o rumiante o un sujeto humano. Incluso más típicamente, el vertebrado se selecciona del grupo que consiste en ser humano, primate no humano, murino, bovino, ovino, equino, porcino, caprino, leporino, aviar, felino y canino. Más típicamente, el vertebrado se selecciona entre el grupo que consiste en ser humano, ovino, camélidos, porcino, bovino, equino o canino.
- La composición farmacéutica se puede formular para la administración por vía intramuscular, subcutánea, tópica u otra vía 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. Preferiblemente, la vacuna se formula para administración por las vías intramuscular, subcutánea o por inhalación. La vacuna también puede incluir citoquinas tales como: G-CSF, GM-CSF, interleuquinas o factor de necrosis tumoral alfa, utilizados solos o en combinación.
- La composición farmacéutica puede incluir también un adyuvante. Más típicamente, el adyuvante se selecciona del grupo que consiste en Adyuvante Completo/Incompleto de Freund, Adyuvante de Montenide Macrol, Solución Salina Tamponada con Fosfato y emulsiones de aceite de Mannan, saponinas (QuiLA) dextrano (sulfato de dextrano, DEAE-dextrano), compuestos de aluminio (Imject Alum), N-acetilglucosamiiil-N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamina

(adyuvante Gerbu). Más típicamente, el adyuvante se selecciona del grupo según se describe en the Vaccine 1995, vol 13, página 1203; 1993 vol 11 página 293; y 1992 vol 10 página 427, cuyas descripciones se incorporan aquí como referencia.

5 Todavía otro aspecto importante de la presente invención se refiere entonces al antígeno polisacárido ramno 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 medicina y para el tratamiento de enfermedades tales como infecciones bacterianas, en particular por una bacteria Gram-positiva tales como, por ejemplo, infección bacteriana, infección enterocócica, infecciones del tracto urinario, bacteriemia, endocarditis bacteriana, peritonitis, heridas e infecciones de tejidos blandos y meningitis, o neumonía e infecciones de cuerpos extraños. Dicha bacteria Gram-positiva se puede seleccionar preferiblemente de enterococos, estafilococos o estreptococos tal como, por ejemplo, *E. faecium*, p. ej., el complejo clonal 17 de *E. faecium*, *E. faecalis*, *S. aureus*, estafilococos coagulasa-negativos, neumococo o *S. pyogenes* y, en particular, cepas resistentes a antibióticos de los mismos tales como las resistentes a VRE.

10 Otro aspecto de la invención se refiere entonces a un método para producir el antígeno polisacárido ramno de la invención, en el que dicho método comprende sintetizar dicho antígeno a través de síntesis química, que comprende, por ejemplo, química en fase de disolución y/o en fase sólida.

Se prefiere un método para producir el antígeno polisacárido ramno de acuerdo con la presente invención, que comprende sintetizar dicha molécula sobre un material de fase sólida. Los métodos de la presente invención son más preferiblemente en un formato de síntesis en fase sólida automatizada.

20 Otro aspecto de la invención se refiere a un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo monoclonal o un fragmento antigénico del mismo, que reconoce específicamente el antígeno polisacárido ramno de acuerdo con la presente invención. El término "anticuerpo" debe incluir tanto anticuerpos monoclonales como policlonales, anticuerpos recombinantes o fragmentos de los mismos tales como Fab y similares, así como anticuerpos humanos o humanizados.

25 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 el antígeno polisacárido ramno de acuerdo con la presente invención, o con la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención o, preferiblemente, la vacuna de acuerdo con la presente invención y, opcionalmente, aislar dicho anticuerpo de dicho animal. Métodos respectivos son conocidos para la persona experta, y se describen en el estado de la técnica.

30 Todavía otro aspecto de la presente invención se refiere entonces a un método para producir un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la presente invención que es específico para el antígeno polisacárido ramno 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 de la técnica.

35 Todavía otro aspecto de la presente invención se refiere entonces a un método para producir un anticuerpo anti-idiotípico que es específico para el anticuerpo de acuerdo con la presente invención según se describe arriba. Otro aspecto de la invención se refiere entonces a dicho anticuerpo anti-idiotípico, que también pueden ser anticuerpos monoclonales o policlonales, anticuerpos recombinantes o fragmentos de los mismos, tales como Fab y similares, así como anticuerpos humanos o humanizados.

40 Todavía otro aspecto importante de la presente invención se refiere entonces al uso del antígeno polisacárido ramno de acuerdo con la presente invención como un antígeno en la producción de anticuerpos que son específicos para dicho antígeno polisacárido ramno.

45 Todavía otro aspecto importante de la presente invención se refiere entonces al uso del antígeno polisacárido ramno de acuerdo con la presente invención, el anticuerpo o anticuerpo anti-idiotípico de acuerdo con la presente invención, o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención para el tratamiento contra infecciones bacterianas o para la producción de un medicamento para el tratamiento profiláctico o terapéutico de una enfermedad o afección provocada por infecciones bacterianas, en particular la infección enterocócica tal como la infección nosocomial, bacteriemia, endocarditis, infecciones del tracto urinario, infecciones de heridas quirúrgicas, peritonitis, infecciones de heridas y tejidos blandos, meningitis, neumonía e infecciones de cuerpos extraños, en particular provocadas por enterococos resistentes a antibióticos tales como cepas de VRE, tales como *E. faecalis*, y también estafilococos y estreptococos. Preferiblemente, dicho medicamento es una vacuna según se describe en esta memoria.



establecieron utilizando  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  correlacionado (COSY y TOCSY), así como experimentos  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC RMN correlacionados.

5 Las configuraciones anoméricas de monosacáridos se definieron sobre la base de las constantes de acoplamiento  $^1J_{\text{C-1,H-1}}$  derivadas de experimentos  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC RMN (registrados sin disociación). Los valores de  $^1J_{\text{C-1,H-1}}$  eran ~ 173 Hz, que reveló la configuración  $\alpha$ -anomérica de todos los residuos. Los anillos de seis miembros de todos los monosacáridos fueron asignados por la falta de señales de átomos de carbono en  $\delta \sim 83$ -88 en el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN.

10 El espectro  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC RMN mostró tres señales de carbono anoméricas en  $\delta$  100,69 (A),  $\delta$  102,06 (B) y  $\delta$  101,85 (C). Este espectro también contenía las resonancias de carbono de azúcar restantes. Las señales desplazadas de bajo campo de átomos de carbono demostraron sustituciones en residuos C-2 de A ( $\delta$  78,04), C-3 de B ( $\delta$  77,73) y C-3 de C ( $\delta$  78,04).

La secuencia de azúcar dentro de la unidad repetitiva de trisacárido del PS fue asignado a partir del experimento ROESY, que exhibía contactos NOE inter-residuales entre protones anoméricos siguientes y los correspondientes protones glucosídicamente enlazados: A1/B3 ( $\delta$  5,165/3,853), B1/C3 ( $\delta$  4,980/3,792) y C1/A2 ( $\delta$  4,906/4,037).

15 El análisis de la composición y los datos de RMN revelaron la estructura de la unidad repetitiva de PS tal como se muestra en la Figura 1:  $\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1} \rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1} \rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1} \rightarrow$

Tabla 1. Desplazamientos químicos de datos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN de PS aislado de *E. faecium* E-155

Residuo	Desplazamientos químicos $^1\text{H}$ ; y $^{13}\text{C}$ [ppm]					
	H1	H2	H3	H4	H5	H6
$^1J_{\text{C-1,H-1}}$ [Hz]	C1	C2	C3	C4	C5	C6
$\rightarrow 2\text{-L-}\alpha\text{-Rha}$ (A)	5.165	4.037	3.910	3.460	3.789	1.269
173	100.69	<u>78.04</u>	69.73	72.12	69.20	16.64
$\rightarrow 3\text{-L-}\alpha\text{-Rha}$ (B)	4.980	4.090	3.853	3.517	3.846	1.268
173	102.06	69.90	<u>77.73</u>	71.42	69.16	16.64
$\rightarrow 3\text{-L-}\alpha\text{-Rha}$ (C)	4.906	4.130	3.792	3.510	3.708	1.232
173	101.85	69.77	<u>78.04</u>	71.34	69.29	16.69

20 Los sueros opsonicos descritos anteriormente fueron absorbidos con el polisacárido ramno a diferentes concentraciones. Se pudo observar una inhibición dependiente de la dosis del exterminio, indicando que el PS ramno es la diana de anticuerpos opsonicos contra *E. faecium* E155.

**REIVINDICACIONES**

1. Un antígeno polisacárido ramno de complejo clonal de *Enterococcus faecium*, que comprende una estructura antigénica de la siguiente fórmula



- 5 en donde Rha se selecciona de ramnosa, y en donde opcionalmente al menos un grupo -OH está reemplazado por -OW, en donde W se selecciona de acetilo, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>12</sub> lineal o ramificado y alqueno C<sub>1</sub> a C<sub>12</sub> lineal o ramificado; y sales o solvatos del mismo, para uso en el tratamiento de enfermedades.
2. El antígeno polisacárido ramno de complejo clonal de *Enterococcus faecium* para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde Rha es ramnosa, y sales o solvatos del mismo.
- 10 3. El antígeno polisacárido ramno para uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2, en donde dicho antígeno comprende 1 a 20 unidades repetitivas de trisacárido, preferiblemente 1 a 10 unidades tal como, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 ó 6, y lo más preferido 1 a 3 unidades.
4. El antígeno polisacárido ramno para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho antígeno incluye, además, al menos un grupo enlazador L, en donde L está preferiblemente fijado a uno de los extremos de la cadena y/o los restos azúcar de dicho antígeno.
- 15 5. Una composición farmacéutica que comprende el antígeno polisacárido ramno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y un soporte, adyuvante y/o diluyente farmacéuticamente aceptable, para uso en el tratamiento de enfermedades.
6. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde dicha composición es una vacuna.
- 20 7. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 5 ó 6, que comprende, además, al menos una citoquina.
8. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en donde dicha vacuna se formula para administración a través de las vías intramuscular, subcutánea o por inhalación.
- 25 9. El antígeno polisacárido ramno o la composición farmacéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para el tratamiento terapéutico de la infección bacteriana por enterococos, en donde dicha bacteria se selecciona del complejo clonal 17 de *E. faecium*, *E. faecalis* y cepas resistentes a antibióticos de los mismos.
- 30 10. Un anticuerpo que se une específicamente al antígeno polisacárido ramno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o un anticuerpo anti-idiotípico contra el mismo, para uso en el tratamiento de una infección bacteriana por enterococos, en donde dicha bacteria se selecciona del complejo clonal 17 de *E. faecium*, *E. faecalis* y cepas resistentes a antibióticos de los mismos.

Figura 1

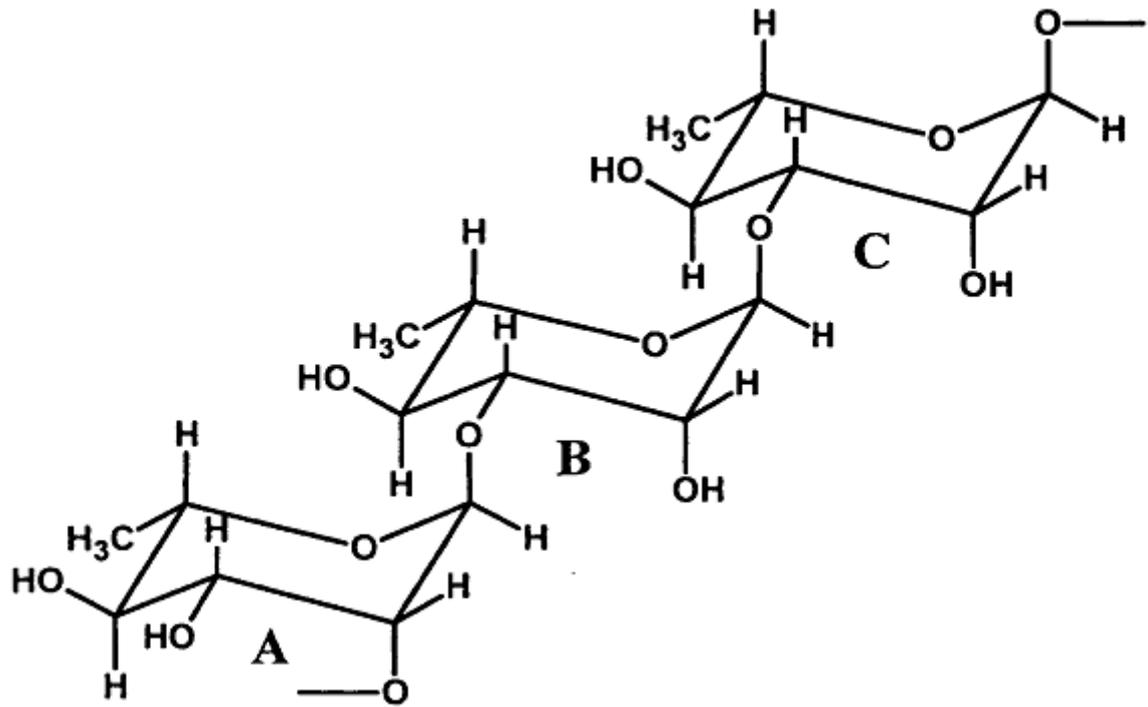


Figura 2

