



(10) **DE 10 2006 053 385 B4** 2014.05.08

(12)

Patentschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2006 053 385.2**
(22) Anmeldetag: **13.11.2006**
(43) Offenlegungstag: **15.05.2008**
(45) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: **08.05.2014**

(51) Int Cl.: **C08B 37/00** (2006.01)
C07H 15/04 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01)
A61K 31/70 (2006.01)
A61K 31/715 (2006.01)
C07K 16/12 (2006.01)
A61K 39/40 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)

Innerhalb von neun Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 1 Patentkostengesetz).

(73) Patentinhaber:
Universitätsklinikum Freiburg, 79106, Freiburg, DE

(74) Vertreter:
BOEHMERT & BOEHMERT, 80336, München, DE

(72) Erfinder:
Hübner, Johannes, 79106, Freiburg, DE; Holz, Otto, 23843, Bad Oldesloe, DE; Theilacker, Christian, 79104, Freiburg, DE; Kaczynski, Zbigniew, Gdansk, PL

(56) Ermittelte Stand der Technik:
Beynon, Linda M. u.a.: "Characterization of the capsular antigen of Streptococcus pneumoniae

serotype 35B " in Canadian Journal of Chemistry (1995), 73(1), 41-8, ISSN: 0008-4042

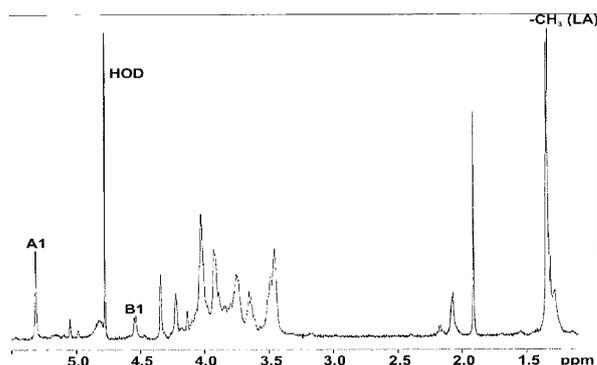
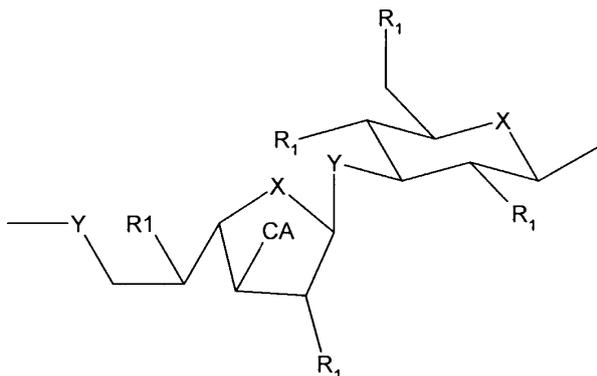
Beynon, Linda M. u.a.: "Identification of the common antigenic determinant shared by Streptococcus pneumoniae serotypes 35A and 20 capsular polysaccharides. Structural analysis of the Streptococcus pneumoniae serotype 35A capsular polysaccharide" in European Journal of Biochemistry (1997), 250(1), 163-167, ISSN: 0014-2956

Hufnagel, M. u.a.: "Serological and genetic diversity of capsular polysaccharides in Enterococcus faecalis" in G. clinc. microbiology 2004 2004, 42, S. 2548-2557, ISSN: 0095-1137

(54) Bezeichnung: **Enterococcus faecalis-Antigen**

(57) Hauptanspruch: Enterococcus faecalis Stamm Typ 5-Antigen, das wenigstens eine Disaccharideinheit, umfasst, welche die folgende Formel aufweist:

wobei R_1 OH ist,
 $X = O$,
 $Y = O$ und
CA Lactyl ist.



Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein das Gebiet der Detektion und Prävention von Infektionskrankheiten, die durch *Enterococcus faecalis* und/oder *Enterococcus faecium* verursacht werden.

[0002] Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung ein Antigen gemäß Anspruch 1, Antikörper gemäß Anspruch 10, Zusammensetzungen gemäß Anspruch 7 und 11 und eine Verwendung gemäß Anspruch 15.

[0003] Nosokomiale Infektionen (Krankenhausinfektionen) sind durch Mikroorganismen hervorgerufene Infektion, die in kausalem Zusammenhang zu einem Krankenhausaufenthalt stehen.

[0004] In den USA stieg der Anteil an Nosokomialinfektionen von 1975–1995 um 36% an, so dass im Jahre 1995 etwa 10 von 1000 Patienten von solch einer Infektion betroffen waren.

[0005] Nosokomialinfektionen sind so allein in den USA im Jahr für 44.000–98.000 Todesfälle verantwortlich.

[0006] Krankenhausinfektionen sind verantwortlich für einen Großteil aller im Hospital auftretenden Komplikationen, und deren Vermeidung ist wesentlich für die Qualität der medizinischen und krankenpflegerischen Versorgung der Patienten.

[0007] Sie sind daher ein ernstzunehmendes Problem eines jeden Krankenhauses, da bekanntlich das oberste Ziel aller qualitätsorientierten Handlungen in der Krankenhausbehandlung der gesunde Patient ist.

[0008] Nosokomiale Infektionen belasten nicht nur den Patienten selbst durch zusätzliche Beschwerden, sie verlängern meist auch den Krankenhausaufenthalt – im Durchschnitt um etwa 4 Tage – und tragen somit zur Überbelastung der Krankenhäuser und des Gesundheitssystems bei. In den USA verursachen nosokomiale Infektionen pro Jahr Kosten in Höhen von 17 bis 29 Milliarden US-Dollar.

[0009] Trotz des unbestreitbaren medizinischen Fortschritts wird für die Zukunft erwartet, dass die Häufigkeit nosokomialer Infektionen eher zunehmen wird.

[0010] Unter anderen werden die folgenden Faktoren für diese Entwicklung verantwortlich gemacht:

- Die Anzahl der Patienten mit hohem Alter steigt,
- Patienten mit geschwächter körpereigener Infektionsabwehr werden in den Krankenhäusern in zunehmender Anzahl behandelt,
- kompliziertere und schwierigere Operationen werden aufgrund der Fortschritte in der operativen Technik durchgeführt,
- komplizierte apparative, invasive Maßnahmen mit erhöhtem Infektionsrisiko können zunehmend durchgeführt werden,
- therapeutische Maßnahmen, die die Abwehrkraft herabsetzen, werden zunehmend durchgeführt, und
- Antibiotika, insbesondere Breitspektrum-Antibiotika, werden vermehrt eingesetzt was zur Zunahme von multiresistenten Mikroorganismen führt.

[0011] Jüngere Studien, die in diesem Zusammenhang durchgeführt wurden (Am. J. Infect. Control., 32: 470–485, 2004) haben gezeigt, dass bis zu 25% der *Enterococcus faecium*-Isolate aus Krankenhäusern gegen glykopeptidische Antibiotika resistent sind.

[0012] Glykopeptidische Antibiotika greifen die Zellwand an und fügen sich direkt in die Struktur der Zellwand ein, wodurch Löcher entstehen und Wasser eindringen kann. Ein Beispiel für glykopeptidische Antibiotika ist das Vancomycin.

[0013] DiazGranados, C. A., et al. haben kürzlich gezeigt, dass Vancomycin-resistente Enterokokken eine erhebliche Krankhaftigkeit und Sterblichkeit insbesondere bei Patienten verursachen, die ohnehin schon ein geschwächtes Immunsystem haben (Clin. Infect. Dis., 41: 327–333, 2005).

[0014] Es gibt daher ein fortwährendes Interesse, immuntherapeutische Herangehensweisen zu entwickeln, die es erlauben, solche Infektionen zu verhindern oder zumindest zu kontrollieren.

[0015] Es ist im Stand der Technik zwar grundsätzlich bekannt, Kohlenhydrat-Antigene bei der Entwicklung von Impfstoffen zu verwenden (Ada, G., et al., *Clin. Microbiol. Infect.*, 9: 79–85, 2003), jedoch weiß man bisher nur wenig über Zellwandassoziierte und kapsuläre Polysaccharide bei *Enterococcus faecalis*.

[0016] Beispielsweise beschreiben Beynon et al. die Strukturaufklärung der Polysaccharidantigene aus *Streptococcus pneumoniae* Serotyp 35A und 35B, wobei das Antigen aus repetitiven Polysacchariduntereinheiten besteht, die über Phosphodiester miteinander verknüpft sind (Beynon et al., *Eur. J. Biochem.* 250, 163–167, 1997 und *Can. J. Chem.* 73, 41–48, 1995).

[0017] Hufnagel et al. (in: Hufnagel M, Hancock LE, Koch S, Theilacker C, Gilmore MS, Huebner J. Serological and genetic diversity of capsular polysaccharides in *Enterococcus faecalis*. *J Clin Microbiol.* 2004 Jun; 42(6): 2548–57) beschreiben polyklonale Antiseren gegen Antigene aus *Enterococcus faecalis*.

[0018] Bis heute wurden vier Kohlenhydrat-Antigene beschrieben (Hancock, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 99: 1574–1579, 2002; Hsu et al., *BMC Microbiol.*, 6: 62, 2006; Pazur et al., *J. Biol. Chem.*, 248: 279–284, 1973; Wang et al., *Carbohydr. Res.* 316: 155–160, 1999; Xu et al., *Infect. Immun.*, 65: 4207–4215, 1997; Xu et al., *Infect. Immun.* 66: 4313–4323, 1998; Xu et al., *Infect. Immun.*, 68: 815–823, 2000), aber eine vollständige Strukturanalyse liegt nur für eines von ihnen vor. Es wird ferner ein Kohlenhydrat-Antigen beschrieben, das an der Zelloberfläche des *Enterococcus faecalis*-Stammes FA2-2 exponiert ist und das aus Glucose, Galactose und Glycerinphosphat besteht.

[0019] Um der Problematik Herr zu werden, die durch das Auftreten von multiresistenten *Enterococcus faecalis*-Stämmen und den nahe verwandten *Enterococcus faecium*-Stämmen verursacht wird, besteht ein erheblicher Bedarf im Stand der Technik, Antigene zu charakterisieren, die auf der Oberfläche von *Enterococcus faecalis* und/oder *Enterococcus faecium* exponiert sind, um diese zur Überwindung der oben beschriebenen Probleme zu verwenden.

[0020] Es ist daher eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, bisher unbekannte Antigene von *Enterococcus faecalis* zur Verfügung zu stellen.

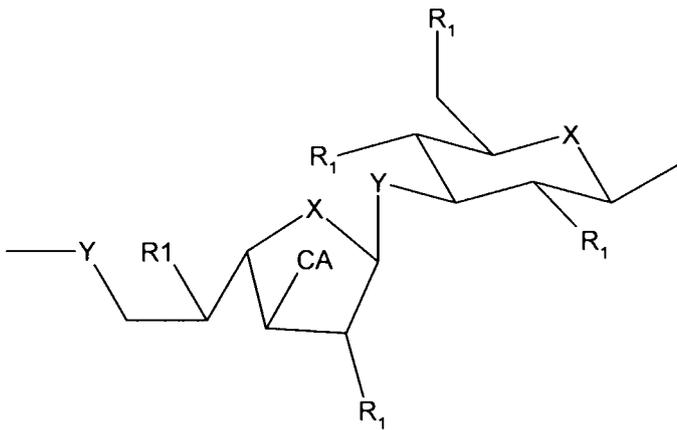
[0021] Es ist eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Antikörper gegen diese bisher unbekanntes Antigene von *Enterococcus faecalis* zur Verfügung zu stellen.

[0022] Es ist eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine Zusammensetzung zur Verfügung zu stellen, die wenigstens ein Antigen von *Enterococcus faecalis* oder einen Antikörper dagegen umfasst, die bevorzugt zur aktiven bzw. passiven Immunisierung gegen *Enterococcus faecalis*-Infektionen geeignet ist.

[0023] Es ist eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung eine Verwendungsmöglichkeit des bisher unbekanntes Antigens zur Detektion oder Herstellung entsprechender Antikörper oder Antikörperfragmente sowie ein entsprechendes Verfahren zur Verfügung zu stellen.

[0024] Diese Aufgaben der vorliegenden Erfindung werden durch das Antigen gemäß Anspruch 1, durch die Antikörper gemäß Anspruch 10, durch die Zusammensetzungen gemäß Anspruch 7 und 11, sowie durch eine Verwendung gemäß Anspruch 15 gelöst.

[0025] Insbesondere stellt die vorliegende Erfindung ein *Enterococcus faecalis*-Antigen zur Verfügung, das dadurch gekennzeichnet ist, dass es wenigstens eine Einheit mit folgender allgemeiner Formel umfasst:



wobei R_1 OH ist,
 X O ist,
 Y O ist und
 CA Lactyl ist.

[0026] Vorzugsweise liegen in dieser Einheit die beiden Zucker in D-Konfiguration vor.

[0027] Das Molekulargewicht der Antigene der vorliegenden Erfindung ist grundsätzlich unkritisch und daher nicht weiter eingeschränkt. Typischerweise haben die Antigene der vorliegenden Erfindung jedoch Molekulargewichte von ca. 1000–200000 Da, mehr bevorzugt von ca. 50000–150000 Da, besonders bevorzugt von ca. 100000 Da. Zu kleine Molekulargewichte können möglicherweise zur Folge haben, dass das Antigen aufgrund der wenigen intramolekularen Wechselwirkungen keine strukturell stabilen Epitope ausbilden kann, während zu hohe Molekulargewichte zur Folge haben, dass solche Antigene oft schwierig zu synthetisieren sind und deren Haltbarkeit eingeschränkt ist.

[0028] Für das Antigen der vorliegenden Erfindung ist es grundsätzlich ausreichend, wenn es die Einheit aus Anspruch 1 mindestens 1 mal enthält. Allerdings kann die Antigenizität des Antigens der vorliegenden Erfindung dadurch gesteigert werden, dass die Einheit pro Antigen mindestens 5 mal, bevorzugt mindestens 10 mal, mehr bevorzugt mindestens 100 mal, besonders bevorzugt mindestens 1000 mal vorkommt.

[0029] Bevorzugt wird das Antigen der vorliegenden Erfindung in Form einer Zusammensetzung zur Verfügung gestellt. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfasst eine solche Zusammensetzung mindestens einen pharmazeutisch akzeptablen Träger. Eine Trägersubstanz ist hierbei jede Substanz, an die das Antigen angelagert und/oder physikalisch gebunden werden kann. Beispielsweise kann so das Antigen, das sich sonst nur schwer dosieren lässt, an einen leichter zu dosierenden Träger gebunden werden. Beispiele für solche Träger sind Stärke und Maltodextrin. Pharmazeutisch akzeptabel bedeutet hierbei, dass der verwendete Träger nicht-toxisch ist und mit der Wirkung des Antigens nicht interferiert.

[0030] Das Antigen der vorliegenden Erfindung kann als eine vorbeugende Maßnahme im Rahmen einer aktiven Impfung gegen durch *Enterococcus faecalis* und/oder *Enterococcus faecium* ausgelöste Infektionskrankheiten einem Patienten verabreicht werden. Ziel einer solchen Impfung ist es, das körpereigene Immunsystem selbst zur Bildung von spezifischen Antikörpern anzuregen und so eine spezifische Immunität gegen *Enterococcus faecalis* und/oder *Enterococcus faecium* zu bewirken. Als Patient kommen daher sämtliche Lebewesen in Betracht, die über ein Immunsystem verfügen. Von besonderer Wichtigkeit sind jedoch Säugetiere, wie beispielsweise Menschen, nicht-humane Primaten, Hunde, Katzen, Schweine, Kühe, Pferde, Ziegen und Schafe und Vögel, wie beispielsweise Hühner, Enten, Gänse, Truthähne oder Strauße.

[0031] Insofern stellt in einer bevorzugten Ausführungsform das Antigen der vorliegenden Erfindung ein Vakzin gegen *Enterococcus faecalis* und/oder *Enterococcus faecium* dar.

[0032] Ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Antikörper, der spezifisch gegen das oben beschriebene Antigen gerichtet ist.

[0033] Dieser Antikörper kann ein monoklonaler oder ein polyklonaler Antikörper sein.

[0034] Antikörper bestehen aus zwei identischen schweren Ketten (heavy chains, H) und zwei identischen leichten Ketten (light chains, L), die durch kovalente Disulfidbrücken zu einer Ypsilon-förmigen Struktur miteinander verknüpft sind. Die beiden Leichtketten sind je nach Organismus und Immunglobulin-Subklasse entweder vom Typ kappa oder lambda und bilden zusammen mit den oberhalb der Gelenkregion (hinge region) liegenden Anteil der schweren Ketten das antigenbindende Fragment Fab, welches enzymatisch von dem darunterliegenden kristallinen Fragment Fc abgespalten werden kann.

[0035] Die ausgesprochene Variabilität der Antikörperbindungsstellen (abgekürzt CDR, Complementarity Determining Region) erreicht der Organismus über die V(D)J-Rekombination.

[0036] Die leichten Ketten bestehen aus jeweils einer variablen und einer konstanten Domäne. Bezeichnet werden diese als V_L und C_L . Die schweren Ketten hingegen haben jeweils eine variable und 3 konstante Domänen. Bezeichnet werden diese analog als V_H und C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} .

[0037] Antikörper im Sinne der vorliegenden Erfindung sind ganze Antikörper oder Fragmente davon, beispielsweise Fab oder scFv, vorausgesetzt, dass diese mindestens eingeschränkt in der Lage sind, an das Antigen zu binden.

[0038] Humanisierte und chimäre Antikörper sind ebenfalls durch die vorliegende Erfindung umfasst.

[0039] Ein solcher Antikörper und/oder das Antigen der vorliegenden Erfindung kann beispielsweise im Rahmen

- eines ELISA-Verfahrens zur Quantifizierung von Antigenen oder Antikörpern beispielsweise im Serum, in Zellkulturüberständen etc. mittels enzymgekoppelter Antikörper,
- eines ELISPOT-Verfahrens zum Nachweis von antikörper- oder antigensezernierenden Zellen (Plasmazellen) mittels enzymgekoppelter Antikörper,
- eines FACS-Verfahrens zur Quantifizierung von Zellen mittels fluoreszenzgekoppelter Antikörper gegen Antigene auf der Zelloberfläche, im Zytoplasma oder im Zellkern,
- eines Western Blots,
- eines Supergelshift-Experiments (auch EMSA),
- eines Phagen-Displays,
- eines Drugwipe-Tests,
- eines Abzyme-Verfahren oder
- eines Verfahrens zur Aufreinigung der Antigene bzw. Antikörper der vorliegenden Erfindung durch entsprechende Affinitätsverfahren

eingesetzt werden.

[0040] Wie das Antigen wird auch der Antikörper der vorliegenden Erfindung bevorzugt im Rahmen einer Zusammensetzung zur Verfügung gestellt, die wiederum – wie auch das Antigen – bevorzugt einen pharmazeutisch akzeptablen Träger umfasst.

[0041] Im Rahmen einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird der Antikörper der vorliegenden Erfindung zur passiven Impfung gegen *Enterococcus faecalis* und/oder *Enterococcus faecium* verwendet und stellt so ein Vakzin gegen *Enterococcus faecalis* und/oder *Enterococcus faecium* dar.

[0042] Bei einer passiven Impfung wird mit Impferum geimpft, welches den spezifischen Antikörper der vorliegenden Erfindung gegen *Enterococcus faecalis* und/oder *Enterococcus faecium* vorzugsweise in hoher Konzentration enthält.

[0043] Grundsätzlich sind die Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung bevorzugt pharmazeutische Zusammensetzungen. Diese zeichnen sich dadurch aus, dass sie für die Verabreichung im Rahmen einer Therapie oder Prophylaxe geeignet sind.

[0044] Beschrieben ist ein Verfahren zum Detektieren von *Enterococcus faecalis*- und/oder *Enterococcus faecium*-Antikörpern, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

- das in-Kontakt-bringen von Antigenen gemäß der vorliegenden Erfindung mit einer auf *Enterococcus faecalis*- und/oder *Enterococcus faecium*-Antikörper zu testenden Probe und
- das Detektieren von Antikörper-Antigen- oder Antikörper-Antigenkonjugat-Komplexen,

wobei das Vorhandensein solcher Komplexe das Vorhandensein von *Enterococcus faecalis*- und/oder *Enterococcus faecium*-Antikörpern in der Probe anzeigt.

[0045] Ebenfalls beschrieben ist ein Verfahren zum Detektieren von *Enterococcus faecalis*- und/oder *Enterococcus faecium*-Antigenen mit mindestens den folgenden Schritten:

- in-Kontakt-bringen von Antikörpern gemäß der vorliegenden Erfindung optional immobilisiert auf einem Träger mit einer auf *Enterococcus faecalis*- und/oder *Enterococcus faecium*-Antigenen zu testenden Probe, und
- Detektieren von Antigen-Antikörper- oder Antikörperkonjugat-Antigen-Komplexen,

wobei das Vorhandensein solcher Komplexe das Vorhandensein von *Enterococcus faecalis*- und/oder *Enterococcus faecium*-Antigenen in der Probe anzeigt.

[0046] Es ist bei den beiden obigen Verfahren bevorzugt, dass die Antigene bzw. Antikörper auf einer Matrix, insbesondere auf einer festen Matrix, vorzugsweise auf einer Mikrotiterplatte, immobilisiert werden.

[0047] Alternativ ist es ebenso denkbar, dass die zu untersuchende Probe auf einer Matrix immobilisiert wird.

[0048] Beides erleichtert insbesondere die Detektion von gebildeten Antigen-Antikörperkonjugaten, da nicht gebundene Probenbestandteile optional von der Matrix, beispielsweise durch Waschen, entfernt werden können, bevor die Komplexe detektiert werden. Dies vermindert Rauschen und erhöht die Messgenauigkeit, ferner wird durch die Verwendung einer festen Matrix die maschinelle Handhabung der Proben erleichtert, so dass das Verfahren der vorliegenden Erfindung sich unter anderem ausgezeichnet für eine Automatisierung und somit beispielsweise für ein High-Throughput-Screening eignet.

[0049] Die Detektion der Antigen-Antikörperkonjugate kann weiter dadurch erleichtert werden, dass die Antigene, bzw. die Antikörper der vorliegenden Erfindung mit einem detektierbaren Marker versehen werden.

[0050] Ist beispielsweise die zu untersuchende potentiell anti-*Enterococcus faecalis*- und/oder *Enterococcus faecium*-Antikörper enthaltende Probe auf einer Matrix immobilisiert, und wird diese immobilisierte Probe dann mit markierten erfindungsgemäßen Antigenen in Kontakt gebracht, so können nach erfolgtem Waschen Proben, die anti-*Enterococcus faecalis*- und/oder *Enterococcus faecium*-Antikörper enthalten, leicht durch das Signal erkannt werden, das der Marker auf dem Antigen freisetzt.

[0051] Als Marker verwendbar ist jede Verbindung geeignet, die mit den Antikörpern, bzw. Antigenen, der vorliegenden Erfindung in Kontakt gebracht werden kann, ohne dass durch diesen Kontakt die Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen vollständig unterbunden werden und ein wie auch immer geartetes detektierbares Signal direkt oder indirekt, gegebenenfalls nach entsprechender Aktivierung oder Substratvorlage, erzeugen.

[0052] Bevorzugte Marker im Sinne der vorliegenden Erfindung sind radioaktive Marker, farbige Marker, enzymatische Marker und magnetische Marker.

[0053] Das Detektionsverfahren kann weiter beschleunigt werden, wenn der Marker nach dem Binden an einen Antikörper oder an ein Antigen eine Eigenschaftsänderung zeigt. Hierdurch könnte man ungebundene markierte Antigene, bzw. Antikörper, von gebundenen unterscheiden, ohne dass beispielsweise ein Waschschritt erforderlich ist.

[0054] Ebenfalls beschrieben ist ein Kit zum Detektieren von *Enterococcus faecalis*- und/oder *Enterococcus faecium*-Antikörpern und/oder *Enterococcus faecalis*- und/oder *Enterococcus faecium*-Antigenen vor, das das Antigen und/oder den Antikörper der vorliegenden Erfindung in einer der oben beschriebenen Ausführungsformen umfasst.

[0055] Insbesondere kann das erfindungsgemäße Antigen und/oder der erfindungsgemäße Antikörper an einen Träger, vorzugsweise an eine feste Matrix, gebunden sein und/oder mit einem Marker, vorzugsweise einem radioaktiven Marker, einem farbigen Marker, einem enzymatischen Marker oder einem magnetischen Marker markiert sein.

[0056] Weiterhin umfasst die vorliegende Erfindung die Verwendung des erfindungsgemäßen Antigens zur Detektion oder Herstellung von *Enterococcus faecalis*- und/oder *Enterococcus faecium*-Antikörpern und/oder Antikörperfragmenten, insbesondere Fab oder scFv.

[0057] Die so hergestellten *Enterococcus faecalis*- und/oder *Enterococcus faecium*-Antikörper und/oder Antikörperfragmente sind insbesondere zur passiven Immuntherapie oder zur Prophylaxe gegen Enterokokken-antigene vorgesehen.

[0058] Herstellbar sind die erfindungsgemäßen Antikörper oder Antikörperfragmente, insbesondere Fab oder scFv, beispielsweise mit einem Verfahren, umfassend die Verabreichung des erfindungsgemäßen Antigens an ein Tier, insbesondere ein Säugetier in einer Menge, die ausreicht, um Antikörper oder Antikörperfragmente herzustellen.

[0059] Zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern kann zunächst das erfindungsgemäße Antigen, gegen das der Antikörper gerichtet sein soll, ausgewählt und produziert werden. Dies kann auf verschiedene Weisen erreicht werden, zum Beispiel, indem ein Antigen aus *Enterococcus faecalis*- und/oder *Enterococcus faecium* isoliert wird, in vitro synthetisiert wird oder rekombinant, beispielsweise in Bakterien, hergestellt wird. Anschließend wird das Antigen einem Tier verabreicht, dessen Immunsystem dann Antikörper gegen das Antigen bildet. Als Antikörper-Produzenten kommen insbesondere Mäuse, Ratten und Kaninchen, aber auch Ziegen, Schafe und Pferde in Betracht. Bevorzugt wird die Immunisierung mehrfach wiederholt. Nach ein paar Wochen werden dem Blut bzw. dem Serum des Antikörperproduzenten polyklonale Antikörper entnommen.

[0060] Zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern können – wie bei der polyklonalen Antikörperherstellung beschrieben – Tiere, bevorzugt Mäuse und/oder Ratten immunisiert und dann deren Plasmazellen (aus Milz oder Lymphknoten) gewonnen. Diese Plasmazellen können mit Tumorzell-Linien verschmolzen werden, und so können sog. Hybridoma-Zell-Linien erzeugt werden, die theoretisch unendlich lange leben, aber eine einzige Art von monoklonalen Antikörpern sezernieren, die wiederum aus dem Zellkulturüberstand isoliert werden können.

[0061] Beschrieben ist ein Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Antikörpers oder eines Fragmentes davon, insbesondere Fab oder scFv, in rekombinanter Form, umfassend das Klonieren einer DNA-Sequenz, die für diesen Antikörper oder dessen Fragment kodiert, in einen Expressionsvektor, das Transformieren einer Zelle, insbesondere einer *E. coli* – Zelle oder einer Hefezelle oder einer eukaryoten Zelle (wie z. B. einer CHO-Zelle) mit diesem Konstrukt und die Expression des rekombinanten Antikörpers oder eines Fragmentes davon.

[0062] Ein durch ein solches Verfahren erhältlicher rekombinanter Antikörper ist dadurch gekennzeichnet, dass er strukturell den Antikörpern der vorliegenden Erfindung entspricht. Ebenso entsprechen rekombinante Fragmente des erfindungsgemäßen Antikörpers, insbesondere Fab oder scFv, den nativ aufreinigbaren Antikörperfragmenten der vorliegenden Erfindung.

[0063] Die rekombinanten Antikörper und Antikörperfragmente der vorliegenden Erfindung haben insbesondere den Vorteil, dass sie ohne großen technischen Aufwand in großer Menge herstellbar sind, ohne dass Tiere als Antikörperproduzenten dienen müssen. Es ist ferner eine erheblich größere Reinheit der Antikörperpräparationen erzielbar, und der direkte Kontakt mit Blut und die damit verbundene Infektionsgefahr wird vermieden.

[0064] Weitere Vorteile und Ausführungsformen der Erfindung ergeben sich aus der Beschreibung einzelner Ausführungsbeispiele sowie aus der Zeichnung.

[0065] Es zeigt:

[0066] Fig. 1: Das ¹H NMR-Spektrum des kapsulären Polysaccharids aus *E. faecalis* Stamm Typ 5. Das Spektrum wurde bei 600 MHz und 27°C aufgenommen. Die Buchstaben beziehen sich auf die Kohlenhydrat-Reste, wie in Fig. 3 gezeigt, und die arabischen Zahlen beziehen sich auf die Protonen an den entsprechenden Resten; LA, Milchsäure.

[0067] Fig. 2: Ausschnitte aus dem ROESY-Spektrum von dem kapsulären Polysaccharid aus *E. faecalis* Stamm Typ 5. Das Spektrum wurde bei 600 MHz und bei 27°C aufgenommen. Die Buchstaben beziehen sich auf die Kohlenhydrat-Reste, wie in Fig. 3 gezeigt, und die arabischen Zahlen beziehen sich auf die Protonen an den entsprechenden Resten. Die NOE-Kontakte zwischen den Resten sind unterstrichen und in Schrägschrift dargestellt.

[0068] Fig. 3: Die chemische Struktur der sich wiederholenden Einheit des kapsulären Polysaccharids aus *E. faecalis* Stamm Typ 5. LA, Milchsäure. Die D-Konfiguration des Galactose Restes wird vermutet.

[0069] Fig. 4: Binden eines Kaninchen-Antiserums gegen die bakteriellen Zellen von *E. faecalis* Stamm Typ 5. Die verwendeten Antigene sind in der Legende angegeben. Die angegebenen Werte stellen jeweils den Durchschnitt aus mindestens zwei Messungen dar.

[0070] Fig. 5: Inhibierung der Opsonophagozytose von Bakterienzellen vom *E. faecalis* Stamm Typ 5 durch Kaninchen-Antiserum. Alle Antiseren wurden in einer 1:200 Verdünnung verwendet. Die Inhibitoren sind in der Legende angegeben. Die angegebenen Daten stellen einen Durchschnitt von mindestens 4 Messwerten dar, und die Fehlerbalken representieren den SEM. Die Opsonophagozytose-Aktivität ohne Inhibitor betrug > 70% für alle Antiseren.

Ausführungsbeispiel:

[0071] Die Eliminierung von *Enterococcus faecalis* durch Opsonophagozytose wird unter anderem durch Antikörper bewerkstelligt, die gegen Kohlenhydrat-Antigene der Zellwand und der bakteriellen Kapsel gerichtet sind. Für den *E. faecalis* Stamm 12030, wurde Lipoteichonsäure (LTA) kürzlich als Ziel der opsonisierenden Antikörper identifiziert. Jedoch tötet Serum, das gegen aufgereinigtes LTA gezogen wurde, keine bakteriellen Stämme mit dem CPS-C und -D-Serotyp.

[0072] Im Rahmen dieses Beispiels wird ein neues kapsuläres Polysaccharid aus dem *E. faecalis* Typ 5-Stamm, einem CPS-D-Stamm, durch enzymatischen Verdau der Zellwand sowie durch Gel-Permeation und durch Anionen-Austausch-Chromatographie isoliert.

[0073] Das isolierte Polysaccharid wird durch Zuckeranalyse, eindimensionale und zweidimensionale homonukleare and heteronukleare ^1H und ^{13}C NMR Spektroskopie analysiert.

[0074] Es wird ein neues kapsuläres Polysaccharid aus *E. faecalis* identifiziert, das eine ungewöhnliche $\rightarrow 6$ -3-O-[1-carboxyethyl]- β -Galf-(1 \rightarrow – Einheit in der sich wiederholenden Einheit enthält.

[0075] Kaninchenantiserum, das mittels Immunisierung von hitzeinaktivierten Bakterienzellen vom *E. faecalis* Typ 5 induziert wurde, enthielt sowohl Antikörper spezifisch gegen das neue kapsuläre Polysaccharid wie gegen LTA dieses Stammes.

[0076] Die Opsonophagozytose von *E. faecalis* type 5 durch dieses Antiserum wurde jedoch nur durch das aufgereinigte Polysaccharid, aber nicht durch LTA, inhibiert.

[0077] Somit illustriert dieses Beispiel eine Möglichkeit, wie ein neues kapsuläres Polysaccharid als Antigen in *E. faecalis* type 5 identifiziert werden kann, das immunogen ist und das als Target für opsonisierende Antikörper dienen kann.

[0078] Dieses Beispiel illustriert ferner, wie die Immunogenität von Antigen, die von *E. faecalis* abgeleitet sind, getestet werden kann.

Bakterienstämme und Kulturen

[0079] Kapsuläre Polysaccharide wurden aus *E. faecalis* Typ 5 (Maekawa, S., et al., *Microbiol. Immunol.*, 36: 671–681, 1992), einem CPS-D Stamm, mit einem neulich beschriebenen Serotypisierungssystem (Hufnagel, M., et al., *J. Clin. Microbiol.* 42: 2548–2557, 2004) isoliert. Bakterienzellen wurden aus den Ausgangskulturen in einer Columbia-Nährlösung (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA), die mit 1% Glucose angereichert war, ohne Agitation bei 37°C 2 Stunden lang kultiviert.

Antiseren

[0080] In der Vergangenheit wurden bereits Antiseren gegen ganze Bakterienzellen von *E. faecalis* Typ 5 beschrieben (Hufnagel, M., et al., *J. Clin. Microbiol.* 42: 2548–2557, 2004). Das Antiserum gegen LTA wurde mit LTA, das aus dem Stamm 12030 wie vorher beschreiben (Theilacker, C., et al., *Infect. Immun.* 74, 2006) gereinigt wurde, hergestellt. Ein weibliches weißes Neuseeland-Kaninchen wurde subkutan mit 100 μg LTA, das in vollständigem Freund-Adjuvans suspendiert war, immunisiert und danach mit derselben Dosis LTA, das in unvollständigem Freund-Adjuvans suspendiert war, sieben Tage später und danach in der folgenden Woche alle drei Tage mit Nachimpfungsdosen von 10 μg immunisiert.

Herstellung und Charakterisierung des kapsulären Polysaccharids.

[0081] LTA aus *E. faecalis* wurde wie vorher beschrieben (Huebner, J., et al., *Infect. Immun.* 67: 1213–1219, 1999; Theilacker, C., et al., *Infect. Immun.* 74, 2006, isoliert. Das hier beschriebene Antigen wurde folgendermaßen präpariert: Kurz zusammengefasst wurden Bakterienzellen durch Zentrifugieren geerntet und durch das Hinzufügen von Mutanolysin und Lysozym (jeweils 100 pg/ml, Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA in PBS angereichert mit 5 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂ und 0.05% NaN₃) bei 37°C 18 Stunden lang verdaut. Unlösliches Material wurde abzentrifugiert, und der Überstand wurde mit Nukleasen (DNase I und RNase A, 100 pg/ml) bei 37°C 4 Stunden lang behandelt, gefolgt von einer 18-stündigen Hinzufügung von Proteinase K (100 pg/ml, alle erhältlich von Sigma Chemicals) bei 56°C. Der Überstand wurde durch das Hinzufügen von Ethanol (Endvolumen 80%) präzipitiert und dann durch Zentrifugieren gesammelt. Nach der Dialyse gegen entionisiertes H₂O, wurde das Material lyophilisiert. Für eine Gelpermeationschromatographie wurde das Material in 0,01 M Ammoniumhydrogencarbonatpufferlösung aufgelöst und auf eine Sephacryl S-400-Säule (1,6 × 90 cm) (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) aufgetragen. Fraktionen, die bei einem K_{av} von etwa 0,45 eluierten, wurden kombiniert, dialysiert und lyophilisiert. Das Material wurde in 20 mM NaHCO₃, pH 8,4 resuspendiert und auf eine Anionenaustauschsäule (Sephacrose Q FF, GE Healthcare) aufgetragen. Gebundenes Antigen wurde durch einen linearen NaCl-Gradienten aus der Säule eluiert und Fraktionen, die Polysaccharide umfassten, wurden durch einen Dubois-Assay (Dubois, M., et al., *Anal. Chem.* 28: 350–356, 1956.) und Immunoblotten unter Verwendung eines Kaninchen-Anti-Typ 5 Immunsersums identifiziert. Immunoreaktives Material, das bei 450 mM NaCl eluiert, wurde kombiniert, dialysiert und lyophilisiert. Als abschließenden Reinigungsschritt wurde eine Gelpermeationschromatographie in einer 1,5 × 75 cm Toyopearl HW-40 (Tosoh Corporation, Tokyo, Japan)-Säule durchgeführt. Die Reinheit des isolierten Materials wurde mittels einer SDS-PAGE unter Verwendung eines 10% Bis-Tris-Gels und eines MOPS-Laufpuffers (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) und durch Coomassie (Invitrogen) und PAS(Sigma)-Färbung gemäß der Anleitung des Herstellers bestätigt.

[0082] Ferner wurde ein Western-Blot von Material, das durch SDS-PAGE abgetrennt wurde, mit einem Anti-Typ 5 Kaninchenantiserum gefärbt.

Ergebnis der Reinigung des kapsulären Polysaccharids

[0083] Kapsuläres Polysaccharid aus dem *E. faecalis* Stamm Typ 5 wurde durch enzymatischen Verdau von Peptidoglycan aus den Bakterienzellen mobilisiert. Das extrahierte Material eluierte als zwei Kohlenhydrathaltige Fraktionen bei der Sephacryl S-400 Gelchromatographie. Eine Fraktion, die im Ausschlussvolumen eluierte, bestand aus LTA, wie durch ¹H NMR-Analyse (Daten nicht angegeben) bestimmt. Eine große, zweite Fraktion bei einem K_{av} im Bereich von 0,45 wurde durch eine Anionenaustauschchromatographie unter Verwendung von Q-Sephacrose weiter gereinigt. Geringe Mengen an immunoreaktivem Material eluierten bei 450 mM NaCl, das nur aus Glucose und Galactose bestand, und das nach der Gelpermeationschromatographie auf Toyopearl HW-40S einer weiteren Analyse unterzogen wurde. Die SDS-PAGE mit diesem gereinigten Material zeigte eine einzelne breite Bande bei 100 kDa, das sich mit PAS färbte, aber nicht bei Coomassie-Blau. Ein Western-Blot, das mit Anti-Typ 5 Antiserum gefärbt wurde, zeigte ebenfalls eine einzelne breite Band bei 100 kDa und keine weiteren Banden (Daten nicht angegeben).

Herstellung von LTA

[0084] LTA wurde durch Butanolextraktion und hydrophobe Interaktionschromatographie wie vorher beschrieben (Theilacker, C., et al., *Infect. Immun.* 74, 2006) hergestellt. Die Reinheit der LTA-Präparate wurde durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse mit dem entsprechenden Antiserum gegen ganzen Bakterienzellen (vgl. oben) bewertet. Die strukturelle Identität von LTA wurde durch NMR-Spektroskopie wie kürzlich beschreiben (Theilacker, C., et al., *Infect. Immun.* 74, 2006) bestätigt.

Allgemeine und Analytische Verfahren

[0085] Die Hydrolyse wurde mit 2 M Trifluoressigsäure (120°C, 3 h) durchgeführt. Monosaccharide wurde zu Alditolacetaten umgewandelt und durch GC auf einem Hewlett-Packard 5890 Chromatograph mit einer SPB-5-Säule (30 m × 0,25 mm × 0,25 pm, Supelco, München, Deutschland) unter Verwendung eines Temperaturprogrammes 150°C für 3 Minuten, dann 3°C min⁻¹ bis zu 300°C analysiert. Die absolute Anordnung der Zuckerreste wurde wie vorher beschrieben (Haseley, S. R., et al., *Eur. J. Biochem.* 244: 761–766, 1997; Leontein, K., et al., *Carb. Res.* 62: 359–362, 1978) bestimmt.

NMR-Spektroskopie

[0086] Die Probe wurde drei Mal mit 99,0% $^2\text{H}_2\text{O}$ ausgetauscht, lyophilisiert, und in 99,9% $^2\text{H}_2\text{O}$ redispergiert. Alle ein- und zweidimensionalen Spektren wurden mit einem Bruker DRX Avance 600 MHz Spektrometer (Arbeitsfrequenzen 600,31 MHz bei ^1H NMR und 150,96 MHz bei ^{13}C NMR) unter Verwendung einer gewöhnlichen Bruker Software (Bruker, Rheinstetten, Germany) bei 27°C aufgezeichnet. Die chemischen Verschiebungen sind relativ zu Aceton (δH 2,225; δC 31,45) angegeben. Korrelationspektroskopie (COSY), Gesamtkorrelationspektroskopie (TOCSY), und ROESY wurden unter Verwendung von Datenblättern ($t_1 \times t_2$) mit 4096×512 Punkten aufgezeichnet, und 32 Scans wurden durchgeführt.

[0087] TOCSY und ROESY wurden auf eine Phasen-sensitive Art und Weise gemäß dem Verfahren von States et al. durchgeführt und für TOCSY wurde eine Mischzeit von 100 ms verwendet (States, D. J., et al., J. Magn. Reson. 48: 286–292, 1982). Die ^1H , ^{13}C -Korrelationen wurden in dem ^1H -Detektionsmodus mittels einer Multiplen-Quantum-Koherenz (HMQC) mit Protonenkoppelung in der ^{13}C -Domäne unter Verwendung von Datensets mit 2048×256 Punkten gemessen, und für jeden t_1 -Wert wurden 128 Scans aufgenommen (Bax, A., et al., J. Am. Chem. Soc. 109: 2093–2094, 1986; Summers, M. F., et al., J. Am. Chem. Soc. 108: 4285–4294, 1986).

Chemische Analyse und NMR-Spektroskopie

[0088] Im niedrig-Feld-Bereich zeigte das ^1H NMR-Spektrum des aufgereinigten Polysaccharids (**Fig. 1**) zwei anomere Signale bei δ 5.315 (Rest A, [$^3J_{\text{H}_1, \text{H}_2} < 2$ Hz]), und bei δ 4.542 (Rest B, [$^3J_{\text{H}_1, \text{H}_2} = 7.8$ Hz]), welche als β -Galf und β -D-Glcp identifiziert wurden. Weiterhin wurde das Dublett bei δ 1.361 als eine Methylgruppe erkannt, die zu einem Milchsäurerest (LA) gehört (Knirel, Y. A., et al., Carbohydr. Res. 259, 1994; Knirel, Y. A., et al., Carbohydr. Res. 235: C19–23, 1992). Die Gegenwart eines D-Glcp-Restes wurde durch chemische Analyse, der Zuweisung der absoluten Konfiguration, sowie durch NMR-Spektroskopiedaten bestätigt. Der mit Milchsäure an Position C-3 substituierte Galf-Rest wurde nur durch NMR-Daten identifiziert (Beynon, L. M., et al., Eur. J. Biochem. 250: 163–167, 1997; Knirel, Y. A., et al., Carbohydr. Res. 259, 1994; Knirel, Y. A., et al., Carbohydr. Res. 235: C19–23, 1992). Alle ^1H und ^{13}C chemischen Verschiebungen des kapsulären Polysaccharids aus *E. faecalis* Typ 5 (Tab. 1) wurden aus ^1H , ^1H COSY and TOCSY, und aus ^1H , ^{13}C HMQC Spektren bestimmt.

Rest	Chemische Verschiebung ^1H and ^{13}C [δ]						
	H1	H2	H3	H4	H5	H6 ^a	H6 ^b
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	
A	5.315	4.346	3.932	4.225	4.040	3.768	4.019
$\rightarrow 6$)- β -Galf-	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
$\rightarrow 3$)- β -S-Glcp-	103.22	74.05	<u>82.44</u>	68.80	76.26	61.26	
LA		4.038	1.361				
Milchsäure	181.29	77.72	19.21				

– Tabelle 1 –

[0089] Ins Niedrigfeld verschobene Signale der Kohlenstoffatome zeigten Substitutionen an C-6 und C-3 von β -Galf (Rest A, δ 71.90 und δ 84.96) und Substitutionen an C-3 von β -D-Glcp (Rest B, δ 82.44) an. Die Sequenz der Reste in der sich wiederholenden Einheit wurde durch ROESY Experimente bestimmt. Starke NOE-Kontakte zwischen den Resten wurden zwischen den Protonen A1 (δ 5.315) und B3 (δ 3.663), und B1 (δ 4.542) und A6a (δ 3.768) (**Fig. 2**) gefunden. Somit war die Struktur der sich wiederholenden Einheit des isolierten Polysaccharids so, wie sie in **Fig. 3** dargestellt ist.

ELISA Untersuchungen

[0090] ELISA-Experimente wurden durch herkömmliche Verfahren wie vorher beschrieben (Theilacker, C., et al., Infect. Immun. 74, 2006) durchgeführt. Kurz gesagt wurden Mikrotiterplatten mit verschiedenen Kohlenhydratantigenen, die von *E. faecalis* (10 pg/ml in 0,04 M Phosphatpuffer, pH 7,0) abstammen, beschichtet, und

18 Stunden lang bei 4°C belassen. Mit PBS, das 0,05% Tween 20 enthält, wurden Waschschriffe durchgeführt. Die Platten wurden mit 3% Magermilch in PBS-0,02% Natriumazid 2 Stunden lang bei 37°C blockiert. Ein Ziegen Anti-Kaninchen IgG Alkaliphosphatasekonjugat (Sigma), verdünnt auf 1:1000, wurde als sekundärer Antikörper verwendet, und p-Nitrophenylphosphat wurde als Substrat verwendet (Sigma). Nach 60-minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Absorption bei 405 nm gemessen.

Opsonophagozytose-Assay

[0091] Ein Opsonophagozytose-Assay wurde wie vorher beschreiben (Theilacker, C., et al., Infect. Immun. 74, 2006) ausgeführt. Babykaninchenserum (Cedarlane Laboratories, Hornby, Ontario, Canada), das mit dem Targetbakterienstamm absorbiert wurde, diente als Komplementquelle. Die opsonische Aktivität der Immunsereen wurde mit derjenigen der Kontrollen, die normales Kaninchenserum enthielten, verglichen. Das Immunsereum wurde vor der Verwendung 30 Minuten lang bei 56°C durch Hitze inaktiviert. Negative Kontrollen umfassten Probenröhrchen, die entweder keine polymorphonuklearen Leukozyten, kein Komplement oder kein Serum enthielten. Die opsonische Aktivität des Serums wurde wie folgt berechnet: $[1 - (\text{CFU Immunsereum bei 90 min} / \text{CFU Preimmunsereum bei 90 min})] \times 100$.

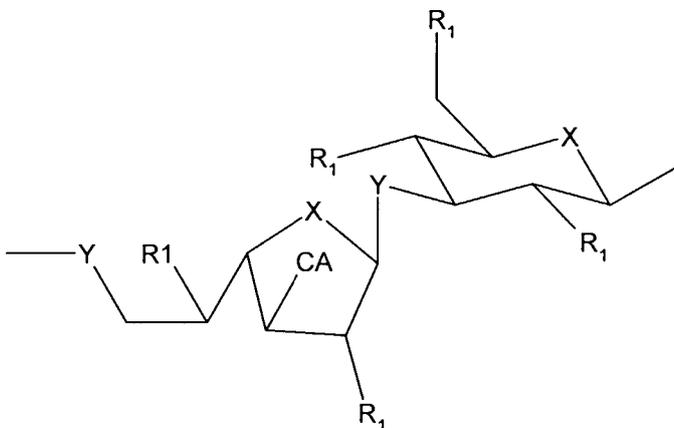
[0092] Zur Untersuchung der Inhibierung Opsonophagozytose wurde Antiserum in einer Konzentration von 1:200 60 Minuten lang bei 4°C mit 0,08 bis 100 µg/ml inkubiert. Nach der Inkubation wurde das absorbierte Serum hinzugefügt und der Opsonophagozytose-Assay wurde wie oben beschrieben fortgesetzt. Ohne Inhibierung wiesen alle Seren eine minimale Opsonophagozytose-Aktivität von > 70% des Inokulums auf.

Immunochemische Charakterisierung

[0093] Serum gegen Bakterienzellen von *E. faecalis* type 5 (Maekawa, S., et al., Microbiol. Immunol. 36: 671–681, 1992) war gegenüber dem aufgereinigtem Polysaccharid reaktiv (**Fig. 4**). Das Antiserum enthielt ebenso hohe IgG Antikörperspiegel gegen *E. faecalis* LTA (**Fig. 4**). Da anti-LTA-Antikörper die Opsonophagozytose des *E. faecalis*-Stammes 12030 vermitteln, ist angestrebt, die Spezifität opsonisierender Antikörper gegenüber dem Stamm *E. faecalis* Typ 5 zu ermitteln. In Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass es wenig Kreuz-Reaktivität von opsonisierenden Antikörpern zwischen *E. faecalis* Typ 5 und *E. faecalis* 12030 gibt (Hufnagel, M., et al., J. Clin. Microbiol. 42: 2548–2557, 2004), inhibierte aufgereinigtes LTA die Opsonophagozytose-Aktivität von anti-Typ 5-Serum nicht (**Fig. 5**). Jedoch war das aufgereinigte kapsuläre Polysaccharid ein potenter Inhibitor opsonisierender Antikörper gegen Typ 5 (**Fig. 5**). Kaninchenserum gegen aufgereinigtes LTA, das die Opsonophagozytose des Stammes 12030 in dem Opsonophagozytose-Assay fördert, war gegen den Stamm Typ 5 nicht opsonierend, was die Ergebnisse aus unseren Inhibierungsstudien bestätigt (Daten nicht gezeigt).

Patentansprüche

1. Enterococcus faecalis Stamm Typ 5-Antigen, das wenigstens eine Disaccharideinheit, umfasst, welche die folgende Formel aufweist:



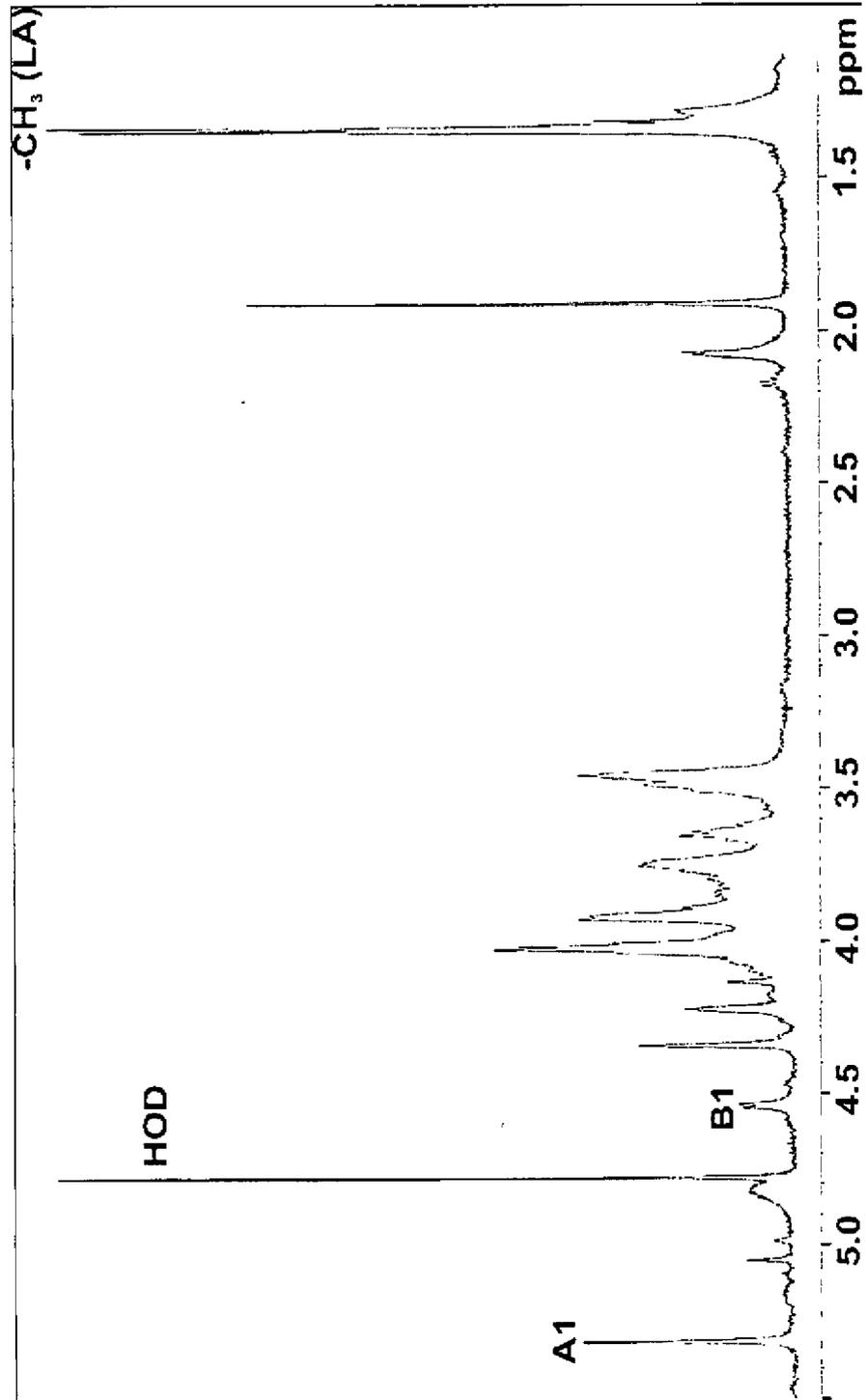
wobei R_1 OH ist,
 $X = O$,
 $Y = O$ und
 CA Lactyl ist.

2. Antigen nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass es ein Molekulargewicht von ca. 1000–200000 Da, mehr bevorzugt von ca. 50000–150000 Da, besonders bevorzugt von ca. 100000 Da aufweist.
3. Antigen nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Einheit pro Antigen mindestens 5 mal, bevorzugt mindestens 10 mal, mehr bevorzugt mindestens 100 mal, besonders bevorzugt mindestens 1000 mal vorkommt.
4. Antigen nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass es an einen Träger gebunden ist.
5. Antigen nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Bindung an den Träger kovalenter Natur ist.
6. Antigen nach Anspruch 4 oder 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Träger ein Immunträger ist.
7. Zusammensetzung umfassend ein Antigen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6.
8. Zusammensetzung nach Anspruch 7, umfassend einen pharmazeutisch akzeptablen Träger.
9. Zusammensetzung nach Anspruch 7 oder 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass sie ein Vakzin gegen *Enterococcus faecalis* ist.
10. Antikörper, die spezifisch gegen ein Antigen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 reagieren.
11. Zusammensetzung umfassend einen Antikörper gemäß Anspruch 10.
12. Zusammensetzung gemäß Anspruch 11 umfassend einen pharmazeutisch akzeptablen Träger.
13. Zusammensetzung gemäß Anspruch 11 oder 12, **dadurch gekennzeichnet**, dass sie ein Vakzin gegen *Enterococcus faecalis* und/oder *Enterococcus faecium* ist.
14. Zusammensetzung gemäß Anspruch 7 bis 9 oder 11 bis 13, **dadurch gekennzeichnet**, dass sie eine pharmazeutische Zusammensetzung ist.
15. Verwendung des Antigens gemäß Anspruch 1 bis 6 zur Detektion oder Herstellung von *Enterococcus faecalis*- und/oder *Enterococcus faecium*-Antikörpern und/oder Antikörperfragmenten, insbesondere Fab oder scFv.
16. Verwendung gemäß Anspruch 15, wobei die hergestellten *Enterococcus faecalis*- und/oder *Enterococcus faecium*-Antikörper und/oder Antikörperfragmente zur passiven Immuntherapie oder zur Prophylaxe gegen Enterokokkenantigene vorgesehen sind.

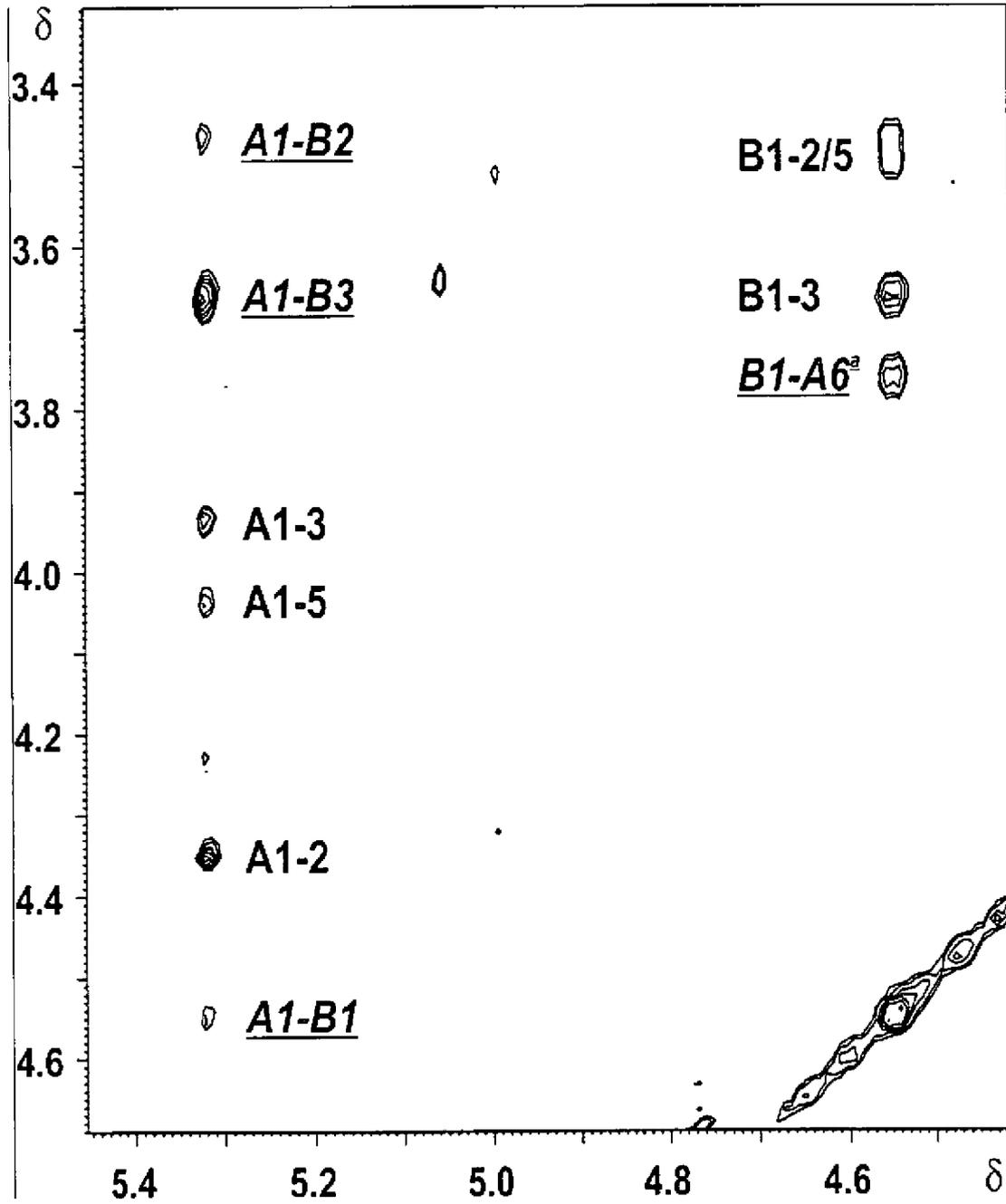
Es folgen 5 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

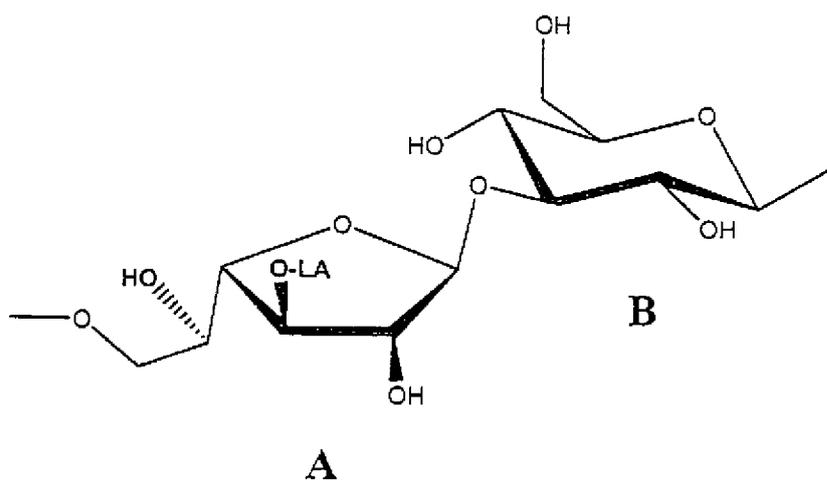
Figur 1:



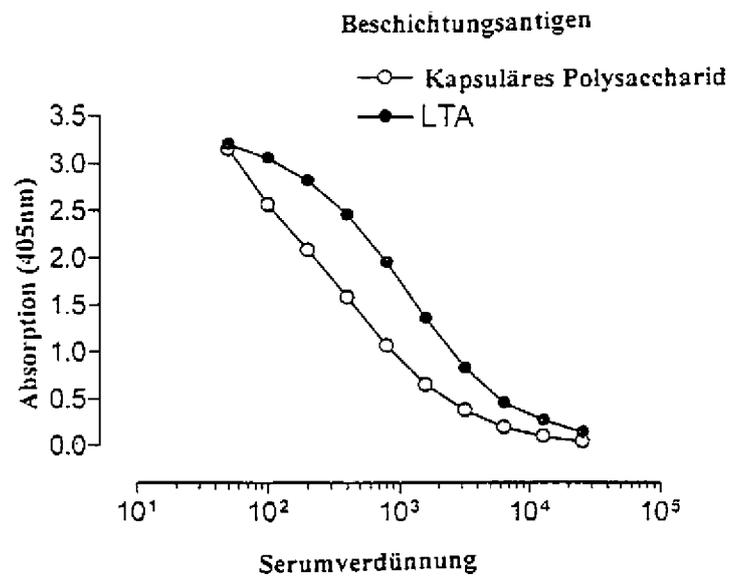
Figur 2:



Figur 3:



Figur 4:



Figur 5:

