



(19)  
 Bundesrepublik Deutschland  
 Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 10 2006 053 385 A1** 2008.05.15

(12)

## Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2006 053 385.2**

(22) Anmeldetag: **13.11.2006**

(43) Offenlegungstag: **15.05.2008**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **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)

(71) Anmelder:  
**Universitätsklinikum Freiburg, 79106 Freiburg, DE**

(74) Vertreter:  
**Lederer & Keller, 80538 München**

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

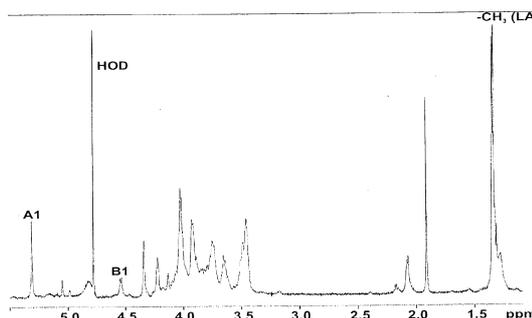
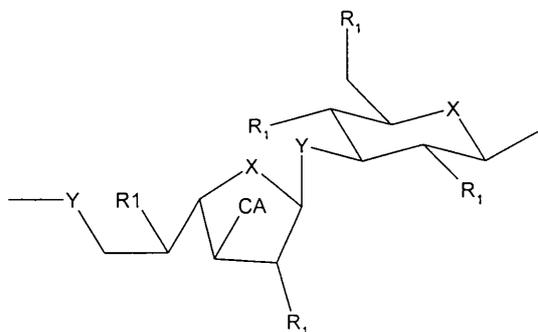
(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht gezogene Druckschriften:  
**Beynon, Linda M. u.a.:** "Identification of the common antigenic determinant shared by *Streptococcus pneumoniae* serotypes 35A and 20 capsular polysaccharides. Structural analysis of the *Streptococcus pneumoniae*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

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

(54) Bezeichnung: **Enterococcus faecalis- und/oder Enterococcus faecium-Antigen**

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein das Gebiet der Detektion und Prävention von Infektionskrankheiten, die durch *Enterococcus faecalis* und/oder *Enterococcus faecium* verursacht werden. Insbesondere betrifft die Erfindung ein *Enterococcus faecalis* und/oder *Enterococcus faecium*-Antigen, das wenigstens eine Einheit mit folgender allgemeiner Formel umfasst:



**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 14 und 33, Zusammensetzungen gemäß Anspruch 10 und 15, Verfahren gemäß Anspruch 19, 20, 32 und 34, ein Kit gemäß Anspruch 25 und 26 und eine Verwendung gemäß Anspruch 30.

**[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 krankenflegerischen 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 Zellwand-assoziierte und kapsuläre Polysaccharide bei *Enterococcus faecalis*.

**[0016]** 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.

**[0017]** 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.

**[0018]** Es ist daher eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, bisher unbekannte Antigene von *Enterococcus faecalis* und/oder *Enterococcus faecium* zur Verfügung zu stellen.

**[0019]** Es ist eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Antikörper gegen diese bisher unbekanntes Antigene von *Enterococcus faecalis* und/oder *Enterococcus faecium* zur Verfügung zu stellen.

**[0020]** Es ist eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine Zusammensetzung zur Verfügung zu stellen, die wenigstens ein Antigen von *Enterococcus faecalis* und/oder *Enterococcus faecium* oder einen Antikörper dagegen umfasst, die bevorzugt zur aktiven bzw. passiven Immunisierung gegen *Enterococcus faecalis*- und/oder *Enterococcus faecium*-Infektionen geeignet ist.

**[0021]** Es ist eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ein Verfahren zur Verfügung zu stellen, das die Detektion des bisher unbekanntes Antigens in einer Probe ermöglicht.

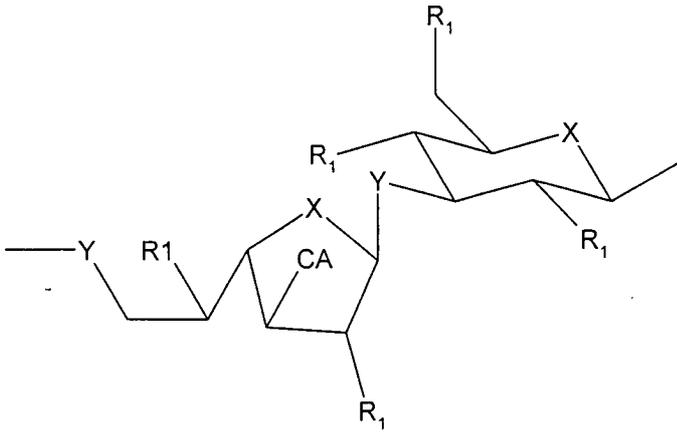
**[0022]** Es ist eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ein Verfahren zur Verfügung zu stellen, das die Detektion von Antikörpern gegen das bisher unbekanntes Antigen in einer Probe ermöglicht.

**[0023]** Es ist eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Kit zur Verfügung zu stellen, dass die Detektion des bisher unbekanntes Antigens oder von Antikörpern gegen dieses Antigen ermöglicht.

**[0024]** 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.

**[0025]** Diese Aufgaben der vorliegenden Erfindung werden durch das Antigen gemäß Anspruch 1, durch die Antikörper gemäß Anspruch 14 und 33, durch die Zusammensetzungen gemäß Anspruch 10 und 15, durch die Verfahren gemäß Anspruch 19, 20, 32 und 34, durch ein Kit gemäß Anspruch 25 und 26 sowie durch eine Verwendung gemäß Anspruch 30 gelöst.

**[0026]** Insbesondere stellt die vorliegende Erfindung ein *Enterococcus faecalis* und/oder *Enterococcus faecium*-Antigen zur Verfügung, das dadurch gekennzeichnet ist, dass es wenigstens eine Einheit mit folgender allgemeiner Formel umfasst:



wobei  $R_1$  unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus H, OH,  $OCH_3$ , OAc,  $OC_nH_m$ , OFo, OAcyl, SH,  $SCH_3$ ,  $SC_nH_m$ , SFo, SAc, SAcyl,  $NH_2$ ,  $NHCH_3$ ,  $NHC_nH_m$ , NHFo, NHAc, NHAcyl,  $PO_2(OR_2)_2$ , F, Cl, Br und J,

wobei Fo Formyl ist,  $R_2$  unabhängig ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus H,  $C_nH_m$ ,  $C_nH_{m-1}NHR^3$  und  $C_nH_{m-1}N(CH_3)_3$ ,

wobei  $R_3$  unabhängig ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus H, Fo, Ac und Acyl,

X unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus O, S,  $CH_2$ , NH und  $POOR_4$ , wobei  $R_4$  H,  $C_nH_m$ ,  $C_nH_{m-1}NHR^3$  und  $C_nH_{m-1}N(CH_3)_3$  ist,

Y unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus O, S,  $CH_2$  und  $HPO_4$ ,

CA unabhängig voneinander ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus  $C_1$ - $C_6$ -Acylresten, insbesondere Hydroxyacylresten, vorzugsweise Lactyl, H, OH,  $OCH_3$ , OAc,  $OC_nH_m$ , OFo, OAcyl, SH,  $SCH_3$ ,  $SC_nH_m$ , SFo, SAc, SAcyl,  $NH_2$ ,  $NHCH_3$ ,  $NHC_nH_m$ , NHFo, NHAc, NHAcyl,  $PO_2OR^2$ , F, Cl, Br und J,

wobei Fo Formyl ist,  $R_2$  unabhängig ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus H,  $OC_nH_m$ ,  $OC_nH_{m-1}NHR^3$  und  $OC_nH_{m-1}N(CH_3)_3$ ,

wobei  $R_3$  unabhängig ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus H, Fo, Ac und Acyl,

wobei  $m = 2n + 1$  ist und n ausgewählt ist aus der Menge der natürlichen Zahlen von 1 bis 10.

**[0027]** Vorzugsweise liegen in dieser Einheit die beiden Zucker in D-Konfiguration vor.

**[0028]** Besonders bevorzugt ist das Antigen der vorliegenden Erfindung dadurch gekennzeichnet, dass das aus einer Furanose Gal und aus einer Pyranose Glc bestehende Disaccharid eine Struktur hat, die ausgewählt ist aus den folgenden:

$\rightarrow$ -y)-D-Galf-(1 $\rightarrow$ -z)-D-Glcp-(1 $\rightarrow$ -,

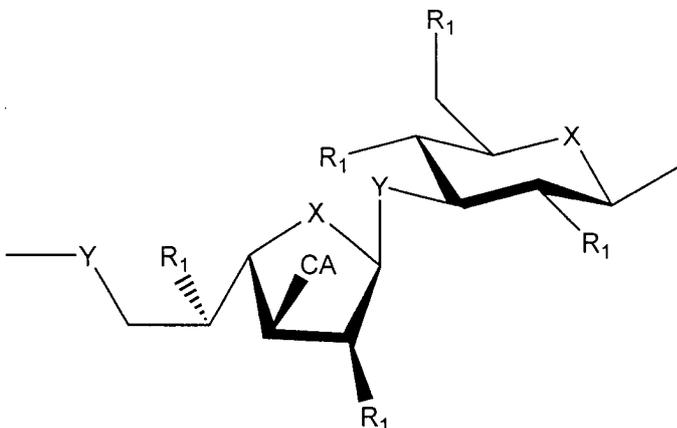
$\rightarrow$ -y)-D-Galf-(1 $\rightarrow$ -z)-D-Glcf-(1 $\rightarrow$ 4-,

$\rightarrow$ -y)-D-Galp-(1 $\rightarrow$ -z)-D-Glcp-(1 $\rightarrow$  oder

$\rightarrow$ -y)-D-Galp-(1 $\rightarrow$ -z)-D-Glcf-(1 $\rightarrow$ -,

wobei y und z jeweils 1, 2, 3, 4, 5 oder 6 sind.

**[0029]** Ein im Sinne der vorliegenden Erfindung insbesondere bevorzugtes Antigen weist die folgende Formel auf:



**[0030]** Weiter bevorzugt ist  $R_1$  OH, X O, Y O und CA Lactyl.

**[0031]** 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 Antigen oft schwierig zu synthetisieren sind und deren Haltbarkeit eingeschränkt ist.

**[0032]** 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.

**[0033]** Für verschiedene analytische Anwendungen des Antigens der vorliegenden Erfindung kann es ferner bevorzugt sein, wenn das Antigen immobilisiert ist. Hierdurch kann die Präsenz des Antigens örtlich beschränkt werden, so dass beispielsweise im Rahmen eines Arrays viele unterschiedliche Proben gleichzeitig und doch getrennt voneinander mit dem Antikörper in Kontakt gebracht und analysiert werden. Auch bei affinitätsbasierenden Reinigungsverfahren, beispielsweise für entsprechende Antikörper, sind immobilisierte Antigen nützlich.

**[0034]** Daher ist in einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung das Antigen an einen Träger, vorzugsweise einen Immunträger gebunden.

**[0035]** Grundsätzlich kann die Immobilisierung durch jegliche Art von Wechselwirkungen erfolgen, wie bspw. Van-der-Waals-Kräfte, ionische Interaktionen, Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen oder hydrophobe Interaktionen. Bevorzugt ist jedoch, dass die Bindung an den Träger kovalenter Natur ist.

**[0036]** 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.

**[0037]** 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.

**[0038]** Insofern stellt in einer bevorzugten Ausführungsform das Antigen der vorliegenden Erfindung ein Vakzin gegen *Enterococcus faecalis* und/oder *Enterococcus faecium* dar.

**[0039]** Ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Antikörper, der gegen das oben beschriebene Antigen gerichtet ist.

**[0040]** Dieser Antikörper kann ein monoklonaler oder ein polyklonaler Antikörper sein.

**[0041]** 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.

**[0042]** Die ausgesprochene Variabilität der Antikörperbindungsstellen (abgekürzt CDR, Complementarity De-

termining Region) erreicht der Organismus über die V(D)J-Rekombination.

**[0043]** 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  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$ .

**[0044]** 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.

**[0045]** Humanisierte und chimäre Antikörper sind ebenfalls durch die vorliegende Erfindung umfasst.

**[0046]** 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.

**[0047]** 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.

**[0048]** 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.

**[0049]** Bei einer passiven Impfung wird mit Impfserum geimpft, welches den spezifischen Antikörper der vorliegenden Erfindung gegen *Enterococcus faecalis* und/oder *Enterococcus faecium* vorzugsweise in hoher Konzentration enthält.

**[0050]** 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.

**[0051]** Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung 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.

**[0052]** Ebenfalls durch die vorliegende Erfindung umfasst 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.

**[0053]** 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.

**[0054]** Alternativ ist es ebenso denkbar, dass die zu untersuchende Probe auf einer Matrix immobilisiert wird.

**[0055]** 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.

**[0056]** Die Detektion der Antigen-Antikörperkonjugate kann weiter dadurch erleichtert werden, dass die Antigen, bzw. die Antikörper der vorliegenden Erfindung mit einem detektierbaren Marker versehen werden.

**[0057]** 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.

**[0058]** 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.

**[0059]** Bevorzugte Marker im Sinne der vorliegenden Erfindung sind radioaktive Marker, farbige Marker, enzymatische Marker und magnetische Marker.

**[0060]** Das Detektionsverfahren der vorliegenden Erfindung 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.

**[0061]** Die vorliegende Erfindung sieht ebenfalls 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.

**[0062]** 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.

**[0063]** Weiterhin umfasst die vorliegende Erfindung die Verwendung des erfindungsgemäßen Antigens gemäß Anspruch 1 bis 10 zur Detektion oder Herstellung von *Enterococcus faecalis*- und/oder *Enterococcus faecium*-Antikörpern und/oder Antikörperfragmenten, insbesondere Fab oder scFv.

**[0064]** Die so hergestellten *Enterococcus faecalis*- und/oder *Enterococcus faecium*-Antikörper und/oder Antikörperfragmente sind insbesondere zur passiven Immuntherapie oder zur Prophylaxe gegen Enterokokkenantigene vorgesehen.

**[0065]** 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.

**[0066]** Zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern der vorliegenden Erfindung 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.

**[0067]** Zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern können – wie bei der polyklonalen Antikörperherstellung beschrieben – Tiere 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.

**[0068]** Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung 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.

**[0069]** 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 aufreimbaren Antikörperfragmenten der vorliegenden Erfindung.

**[0070]** 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.

**[0071]** Es ist dem Fachmann klar, dass er sämtliche Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung, die hierin beispielhaft aufgeführt sind, beliebig miteinander kombinieren kann, ohne hierbei vom Umfang der Offenbarung dieser Erfindung abzuweichen.

**[0072]** Ferner wird auf alle hierin zitierten Druckschriften vollinhaltlich Bezug genommen.

**[0073]** Weitere Vorteile und Ausführungsformen der Erfindung ergeben sich aus der Beschreibung einzelner Ausführungsbeispiele sowie aus der Zeichnung.

**[0074]** Es zeigt:

**[0075]** **Fig. 1:** Das <sup>1</sup>H 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.

**[0076]** **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.

**[0077]** **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.

**[0078] 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.

**[0079] 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:

**[0080]** 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.

**[0081]** 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.

**[0082]** Das isolierte Polysaccharid wird durch Zuckeranalyse, eindimensionale und zweidimensionale homonukleare and heteronukleare  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$  NMR Spektroskopie analysiert.

**[0083]** Es wird ein neues kapsuläres Polysaccharid aus *E. faecalis* identifiziert, das eine ungewöhnliche  $\rightarrow 6$ -3-O-[1-carboxyethyl]- $\beta$ -Galactose-(1 $\rightarrow$  - Einheit in der sich wiederholenden Einheit enthält.

**[0084]** 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.

**[0085]** Die Opsonophagozytose von *E. faecalis* type 5 durch dieses Antiserum wurde jedoch nur durch das aufgereinigte Polysaccharid, aber nicht durch LTA, inhibiert.

**[0086]** 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.

**[0087]** Dieses Beispiel illustriert ferner, wie die Immunogenität von Antigenen, die von *E. faecalis* abgeleitet sind, getestet werden kann.

#### Bakterienstämme und Kulturen

**[0088]** 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

**[0089]** 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  $\mu\text{g}$  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  $\mu\text{g}$  immunisiert.

**[0090]** Herstellung und Charakterisierung des kapsulären Polysaccharids.

**[0091]** 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 MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub> und 0.05% NaN<sub>3</sub>) 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 H<sub>2</sub>O, 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<sub>av</sub> von etwa 0,45 eluierten, wurden kombiniert, dialysiert und lyophilisiert. Das Material wurde in 20 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,4 resuspendiert und auf eine Anionenaustauschsäule (Sephacryl 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.

**[0092]** 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

**[0093]** 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 Kohlenhydrat-haltige Fraktionen bei der Sephacryl S-400 Gelchromatographie. Eine Fraktion, die im Ausschlussvolumen eluierte, bestand aus LTA, wie durch <sup>1</sup>H NMR-Analyse (Daten nicht angegeben) bestimmt. Eine große, zweite Fraktion bei einem K<sub>av</sub> im Bereich von 0,45 wurde durch eine Anionenaustauschchromatographie unter Verwendung von Q-Sephacryl 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

**[0094]** 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

**[0095]** 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<sup>-1</sup> 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; Leontin, K., et al., *Carb. Res.* 62:359–362, 1978) bestimmt.

## NMR-Spektroskopie

**[0096]** 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  $^1\text{H}$  NMR und 150,96 MHz bei  $^{13}\text{C}$  NMR) unter Verwendung einer gewöhnlichen Bruker Software (Bruker, Rheinstetten, Germany) bei 27°C aufgezeichnet. Die chemischen Verschiebungen sind relativ zu Aceton ( $\delta\text{H}$  2,225;  $\delta\text{C}$  31,45) angegeben. Korrelationsspektroskopie (COSY), Gesamtkorrelationsspektroskopie (TOCSY), und ROESY wurden unter Verwendung von Datenblättern ( $t_1 \times t_2$ ) mit  $4096 \times 512$  Punkten aufgezeichnet, und 32 Scans wurden durchgeführt.

**[0097]** 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  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -Korrelationen wurden in dem  $^1\text{H}$ -Detektionsmodus mittels einer Multiplen-Quantum-Koherenz (HMQC) mit Protonenkoppelung in der  $^{13}\text{C}$ -Domäne unter Verwendung von Datensets mit  $2048 \times 256$  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

**[0098]** Im niedrig-Feld-Bereich zeigte das  $^1\text{H}$  NMR-Spektrum des aufgereinigten Polysaccharids ([Fig. 1](#)) zwei anomere Signale bei  $\delta$  5.315 (Rest A, [ $^3J_{\text{H}_1, \text{H}_2} < 2$  Hz]), und bei  $\delta$  4.542 (Rest B, [ $^3J_{\text{H}_1, \text{H}_2} = 7.8$  Hz]), welche als  $\beta$ -Galf und  $\beta$ -D-Glcp identifiziert wurden. Weiterhin wurde das Dublett bei  $\delta$  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  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$  chemischen Verschiebungen des kapsulären Polysaccharids aus *E. faecalis* Typ 5 (Tab. 1) wurden aus  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  COSY and TOCSY, und aus  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMQC Spektren bestimmt.

Rest	Chemische Verschiebung $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ [ $\delta$ ]						
	H1 C1	H2 C2	H3 C3	H4 C4	H5 C5	H6 <sup>a</sup> C6	H6 <sup>b</sup>
A	5.315	4.346	3.932	4.225	4.040	3.768	4.019
$\rightarrow 6$ )- $\beta$ -Galf -	109.26	80.26	84.96	82.41	70.55	71.90	
B	4.542	3.460	3.663	3.465	3.500	3.742	3.930
$\rightarrow 3$ )- $\beta$ -Glc p-	103.22	74.05	82.44	68.80	76.26	61.26	
LA		4.038	1.361				
Milchsäure	181.29	77.72	19.21				

-Tabelle 1-

**[0099]** Ins Niedrigfeld verschobene Signale der Kohlenstoffatome zeigten Substitutionen an C-6 und C-3 von  $\beta$ -Galf (Rest A,  $\delta$  71.90 und  $\delta$  84.96) und Substitutionen an C-3 von  $\beta$ -D-Glcp (Rest B,  $\delta$  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 ( $\delta$  5.315) und B3 ( $\delta$  3.663), und B1 ( $\delta$  4.542) und A6a ( $\delta$  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

**[0100]** ELISA-Experimente wurden durch herkömmliche Verfahren wie vorher beschrieben (Theilacker, C., et al., Infect. Immun. 74, 2006) durchgeführt. Kurz gesagt wurden Mikrotiterplatten mit verschiedenen Kohlenhy-

dratantigenen, 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 enthielt, 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

**[0101]** 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 Immunsere wurde mit derjenigen der Kontrollen, die normales Kaninchenserum enthielten, verglichen. Das Immunsere 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:  $[1 - (\text{CFU Immunsere bei 90 min} / \text{CFU Preimmunsere bei 90 min})] \times 100$ .

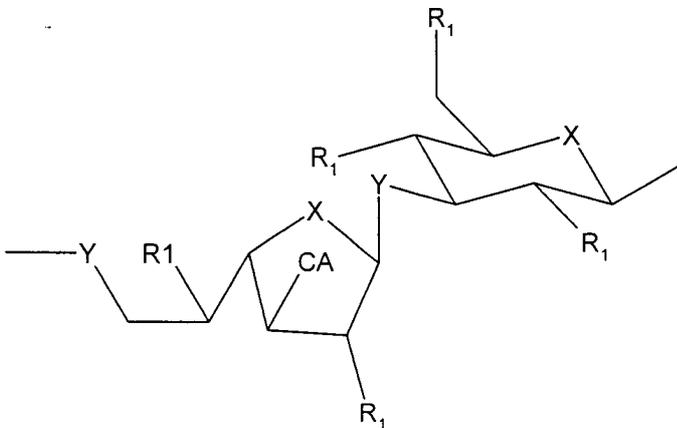
**[0102]** Zur Untersuchung der Inhibierung Opsonophagozytose wurde Antiserum in einer Konzentration von 1:200 60 Minuten lang bei 4°C mit 0,08 bis 100 µg/ml inkubiert. Nach der Inkubation wurde das absorbierte Serum hinzugefügt und der Opsonophagozytose-Assay wurde wie oben beschrieben fortgesetzt. Ohne Inhibierung wiesen alle Seren eine minimale Opsonophagozytose-Aktivität von > 70% des Inokulums auf.

#### Immunochemische Charakterisierung

**[0103]** 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 aufgereingte 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 und/oder Enterococcus faecium-Antigen, **dadurch gekennzeichnet**, dass es wenigstens eine Einheit mit folgender allgemeiner Formel umfasst:



wobei  $R_1$  unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus H, OH,  $OCH_3$ ,  $OAc$ ,  $OC_n$ ,  $H_m$ ,  $OFo$ ,  $OAcyl$ , SH,  $SCH_3$ ,  $SC_nH_m$ ,  $SFo$ ,  $SAc$ ,  $SAcyl$ ,  $NH_2$ ,  $NHCH_3$ ,  $NHC_nH_m$ ,  $NHFo$ ,  $NHAc$ ,  $NHAcyl$ ,  $PO_2(OR_2)_2$ , F, Cl, Br und J,

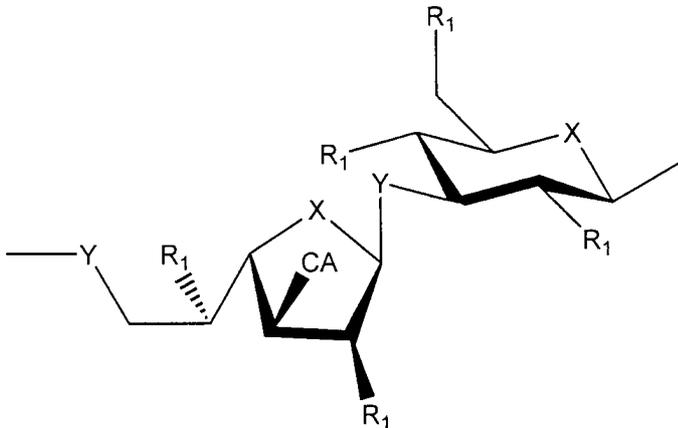
wobei Fo Formyl ist,  $R_2$  unabhängig ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus H,  $C_nH_m$ ,  $C_nH_{m-1}NHR_3$  und  $C_nH_{m-1}N(CH_3)_3$ ,  
wobei  $R_3$  unabhängig ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus H, Fo, Ac und Acyl,  
X unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus O, S,  $CH_2$ , NH und  $POOR_4$ ,  
wobei  $R_4$  H,  $C_nH_m$ ,  $C_nH_{m-1}NHR_3$  und  $C_nH_{m-1}N(CH_3)_3$  ist,  
Y unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus O, S,  $CH_2$  und  $HPO_4$ ,  
CA unabhängig voneinander ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus  $C_1$ - $C_6$ -Acylresten, insbesondere Hydroxyacylresten, vorzugsweise Lactyl, H, OH,  $OCH_3$ , OAc,  $OC_nH_m$ , OFo, OAcyl, SH,  $SCH_3$ ,  $SC_nH_m$ , SFo, SAc, SAcyl,  $NH_2$ ,  $NHCH_3$ ,  $NHC_nH_m$ , NHFo, NHAc, NHAcyl,  $PO_2OR_2$ , F, Cl, Br und J,  
wobei Fo Formyl ist,  $R_2$  unabhängig ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus H,  $OC_nH_m$ ,  $OC_nH_{m-1}NHR_3$  und  $OC_nH_{m-1}N(CH_3)_3$   
wobei  $R_3$  unabhängig ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus H, Fo, Ac und Acyl,  
wobei  $m = 2n + 1$  ist und n ausgewählt ist aus der Menge der natürlichen Zahlen von 1 bis 10.

2. Antigen gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die beiden Zucker in D-Konfiguration vorliegen.

3. Antigen gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das aus einer Furanose Gal und aus einer Pyranose Glc bestehende Disaccharid eine Struktur hat, die ausgewählt ist aus den folgenden:

$\rightarrow y$ -D-Galf-(1 $\rightarrow$ z)-D-Glcp-(1 $\rightarrow$ -,  
 $\rightarrow y$ -D-Galf-(1 $\rightarrow$ z)-D-Glcf-(1 $\rightarrow$ -,  
 $\rightarrow y$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ z)-D-Glcp-(1 $\rightarrow$ - oder  
 $\rightarrow y$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ z)-D-Glcf-(1 $\rightarrow$ -,  
wobei y und z jeweils 1, 2, 3, 4, 5 oder 6 sind.

4. Antigen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass es die folgende Formel aufweist:



5. Antigen nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet dass  $R_1$  OH, X O, Y O und CA Lactyl ist.

6. Antigen nach einem der Ansprüche 1 bis 5, 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.

7. Antigen nach einem der Ansprüche 1 bis 6, 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.

8. Antigen nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass es an einen Träger gebunden ist.

9. Antigen nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Bindung an den Träger kovalenter Natur ist.

10. Antigen nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, dass der Träger ein Immunträger ist.
11. Zusammensetzung umfassend ein Antigen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10.
12. Zusammensetzung nach Anspruch 11 umfassend einen pharmazeutisch akzeptablen Träger.
13. Zusammensetzung nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, dass sie ein Vakzin gegen *Enterococcus faecalis* und/oder *Enterococcus faecium* ist.
14. Antikörper gegen ein Antigen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10.
15. Zusammensetzung umfassend einen Antikörper gemäß Anspruch 14.
16. Zusammensetzung gemäß Anspruch 15 umfassend einen pharmazeutisch akzeptablen Träger.
17. Zusammensetzung gemäß Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, dass sie ein Vakzin gegen *Enterococcus faecalis* und/oder *Enterococcus faecium* ist.
18. Zusammensetzung gemäß Anspruch 11 bis 13 oder 15 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine pharmazeutische Zusammensetzung ist.
19. Verfahren zum Detektieren von *Enterococcus faecalis*- und/oder *Enterococcus faecium*-Antikörpern umfassend
  - das in-Kontakt-bringen von Antigenen gemäß Anspruch 1–10 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.
20. Verfahren zum Detektieren von *Enterococcus faecalis*- und/oder *Enterococcus faecium*-Antigenen umfassend
  - das in-Kontakt-bringen von Antikörpern gemäß Anspruch 14 optional immobilisiert auf einem Träger mit einer auf *Enterococcus faecalis*- und/oder *Enterococcus faecium*-Antigenen zu testenden Probe, und
  - das 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.
21. Verfahren nach Anspruch 19 oder 20, dadurch gekennzeichnet, dass die Antigene bzw. Antikörper auf einer Matrix, insbesondere auf einer festen Matrix, vorzugsweise auf einer Mikrotiterplatte, immobilisiert werden.
22. Verfahren nach Anspruch 19 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass das Antigen oder der Antikörper mit einem Marker versehen wird.
23. Verfahren gemäß Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass der Marker ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus radioaktiven Markern, farbigen Markern, enzymatischen Markern und magnetischen Markern.
24. Verfahren nach Anspruch 22 oder 23, dadurch gekennzeichnet, dass der Marker nach dem Binden eines Antikörpers eine Eigenschaftsänderung zeigt.
25. Kit zum Detektieren von *Enterococcus faecalis*- und/oder *Enterococcus faecium*-Antikörpern in einer Probe umfassend ein Antigen nach einem der Ansprüche 1 bis 10.
26. Kit zum Detektieren von *Enterococcus faecalis*- und/oder *Enterococcus faecium*-Antigenen in einer Probe umfassend einen Antikörper nach Anspruch 14 optional gebunden an einen Träger.
27. Kit nach einem der Ansprüche 25 oder 26, dadurch gekennzeichnet, dass das Antigen bzw. der Antikörper mit einem Marker markiert ist.

28. Kit nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, dass der Marker ein radioaktiver Marker, ein farbiger Marker, ein enzymatischer Marker oder ein magnetischer Marker ist.

29. Kit nach einem der Ansprüche 25 bis 28, dadurch gekennzeichnet, dass das Antigen bzw. der Antikörper mit einer Matrix, bevorzugt mit einer festen Matrix, verbunden ist.

30. Verwendung des Antigens gemäß Anspruch 1 bis 10 zur Detektion oder Herstellung von *Enterococcus faecalis*- und/oder *Enterococcus faecium*-Antikörpern und/oder Antikörperfragmenten, insbesondere Fab oder scFv.

31. Verwendung gemäß Anspruch 30, wobei die hergestellten *Enterococcus faecalis*- und/oder *Enterococcus faecium*-Antikörper und/oder Antikörperfragmente zur passiven Immuntherapie oder zur Prophylaxe gegen Enterokokkenantigene vorgesehen sind.

32. Verfahren zur Herstellung von Antikörpern und/oder Antikörper-Fragmenten, insbesondere Fab oder scFv, umfassend die Applikation des Antigens gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10 an einem Tier, insbesondere ein Säugetier, in einer Menge, die ausreicht, um Antikörper oder Antikörperfragmente herzustellen.

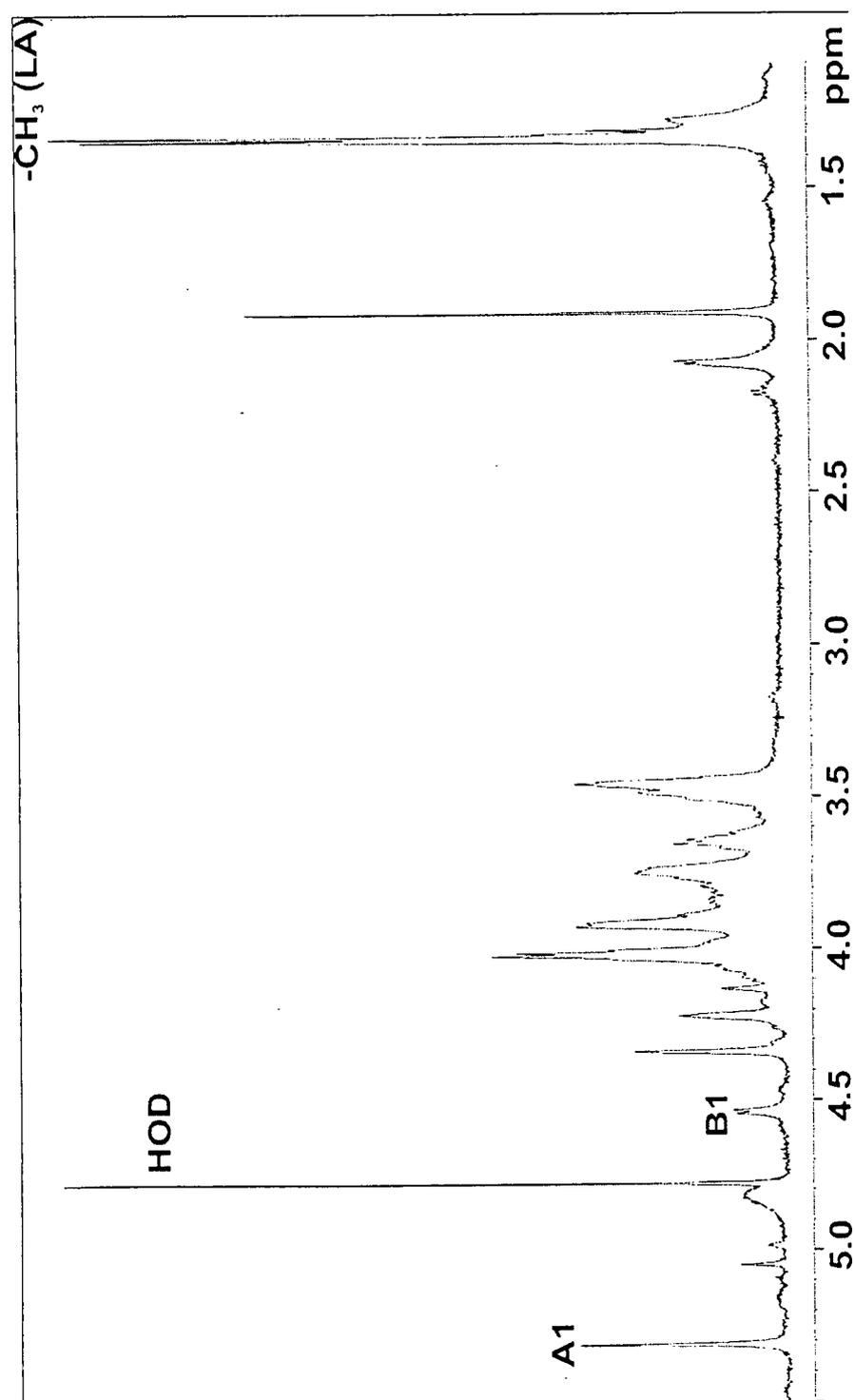
33. Rekombinanter Antikörper dadurch gekennzeichnet, dass er strukturell dem Antikörper gemäß Anspruch 14 entspricht oder ein rekombinantes Fragment davon, insbesondere Fab oder scFv.

34. Verfahren zur Herstellung eines Antikörpers gemäß Anspruch 14 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 mit diesem Konstrukt und die Expression des rekombinanten Antikörpers oder eines Fragmentes davon.

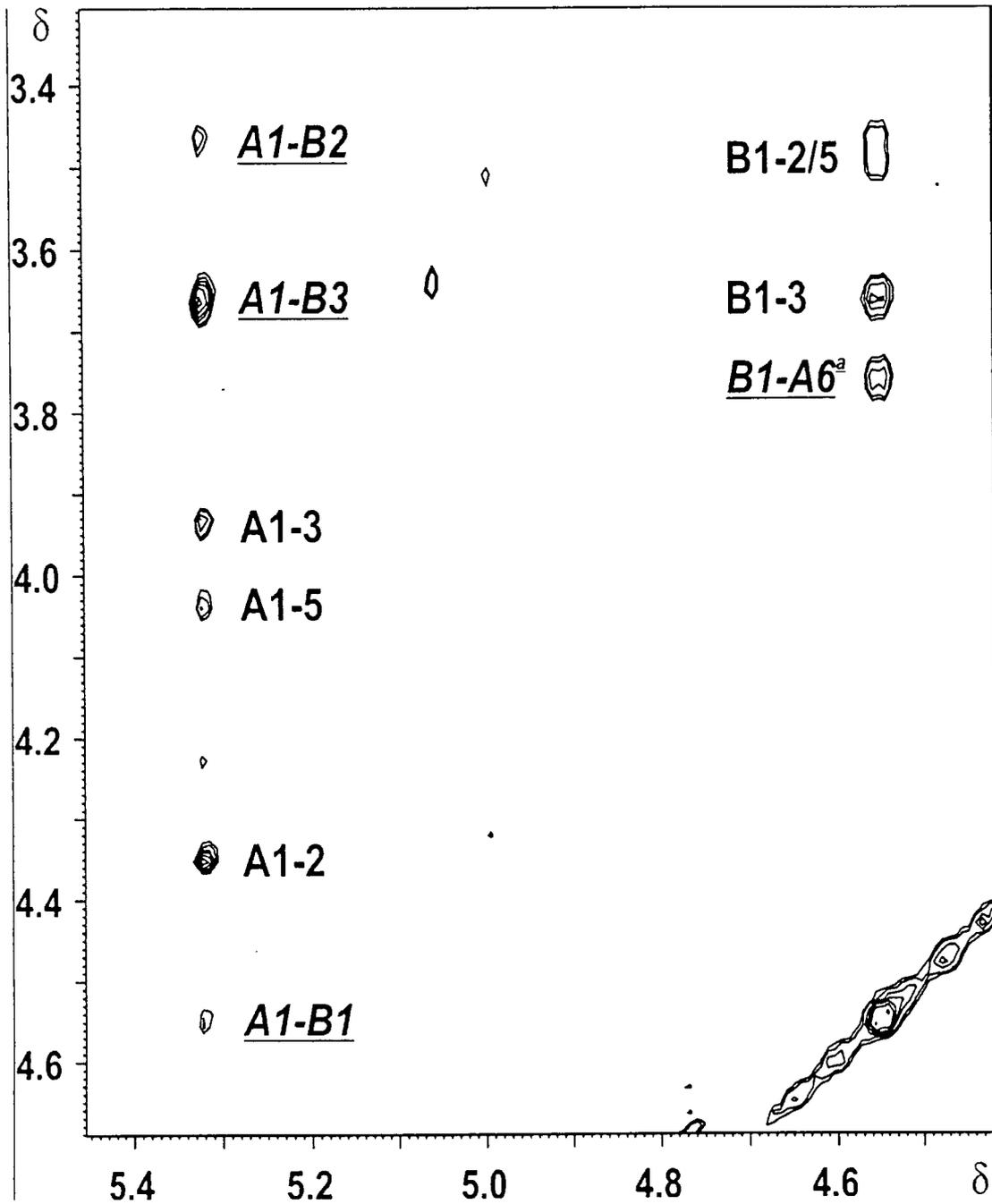
Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

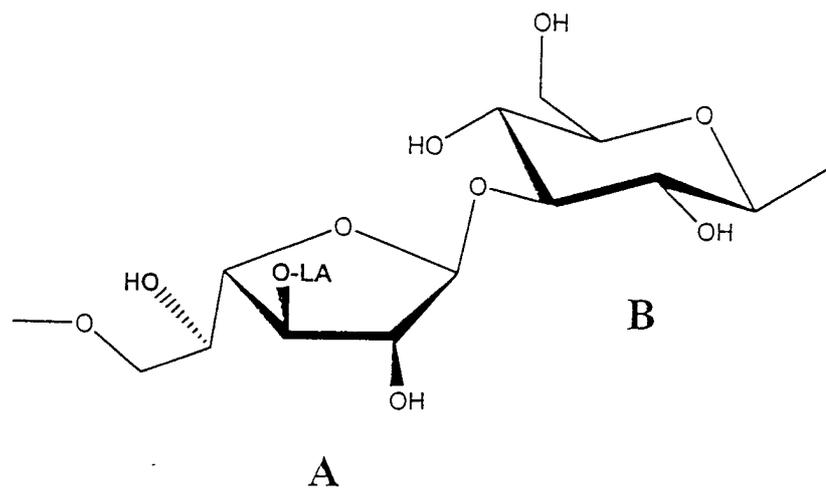
Figur 1:



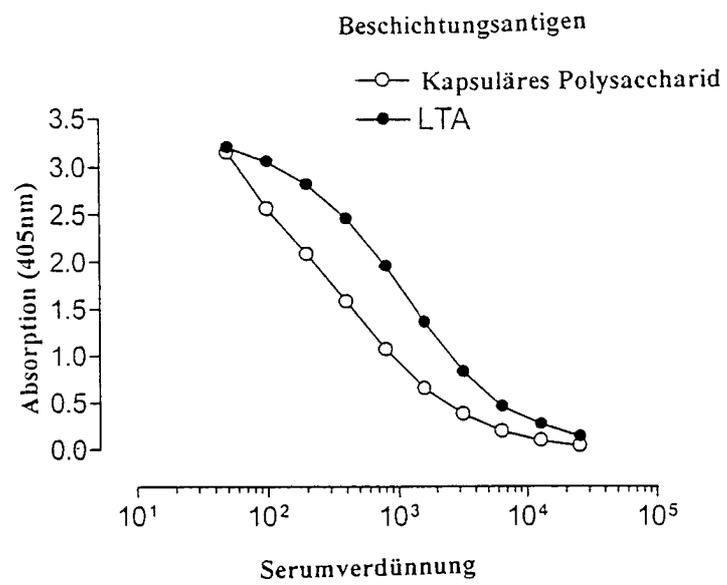
Figur 2:



Figur 3:



Figur 4:



Figur 5:

