

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 308 818**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/09 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **98951058 .1**

(96) Fecha de presentación : **14.10.1998**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1028749**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **23.08.2000**

(54) Título: **Vacunas y antígenos de *Enterococcus*.**

(30) Prioridad: **14.10.1997 US 949757**

(73) Titular/es: **Nabi Biopharmaceuticals
12276 Wilkins Avenue
Rockville, Maryland 20852, US**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2008

(72) Inventor/es: **Fattom, Ali, Ibrahim;
Sood, Ramesh, K. y
Stradley, Sara, E.**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2008

(74) Agente: **Arias Sanz, Juan**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Vacunas y antígenos de *Enterococcus*.

5 Antecedentes de la invención

La presente invención se refiere a antígenos de *Enterococcus* que son útiles como vacunas y a métodos para obtener y usar tales antígenos

10 La prevalencia de la infección por *Enterococcus* está aumentando continuamente. Cepas de *Enterococcus* ahora son responsables del 12% de todas las infecciones nosocomiales entre pacientes hospitalizados y son el segundo microorganismo más común aislado de pacientes con infecciones nosocomiales. Este aumento de la prevalencia de *Enterococcus* se debe al menos en parte a la aparición de cepas de enterococos que son resistentes a agentes antimicrobianos y por tanto difíciles de tratar con antibióticos disponibles actualmente. El aumento en la resistencia a antibióticos entre *Enterococcus* ha aumentado la importancia de enfoques terapéuticos y profilácticos alternativos contra infecciones por enterococos.

20 Diversos grupos han dado a conocer polisacáridos aislados de *Enterococcus*. Por ejemplo, se han aislado ácidos lípoteicoicos que contienen una estructura principal de poliglicerofosfato unido en 1,3 a partir de “*S. faecalis*” que según la clasificación actual es *E. faecalis*. La posición 2 está glicosilada con disacáridos o trisacáridos de residuos de glicosilo que pueden esterificarse con residuos de alanilo, y se denota ácido teicoico intracelular debido a su predominio entre la pared celular y la membrana del protoplasto. Wicken *et al.*, J. Gen. Microbiol. 33: 231-39 (1963).

25 Pazur *et al.*, J. Biol. Chem. 246: 1793-98 (1971), han aislado otros dos polisacáridos de la pared celular de la cepa N de *E. faecalis*. Uno de estos polisacáridos se caracteriza como un diheteroglucano que consiste en glucosa y D-galactosa, mientras que el otro polisacárido se dice que es un tetraheteroglucano de 2-acetamida-2-desoxi-galactosa, galactosa, ramnosa y glucosa en razón molar de 1:1:2:4.

30 Bleiweis *et al.*, J. Bacteriol. 94: 1381-87 (1967), han aislado un tercer polisacárido a partir de la cepa D76 de estreptococos del grupo D. La composición de azúcares de este material incluye glucosa, glucosamina, galactosamina, ramnosa, ribitol y fósforo; sin embargo, no se proporciona información estructural. Se postula que este material puede ser ácido ribitol-fosfato-teicoico con sustituyentes de azúcar unidos. También se ha supuesto que la glucosa y la N-acetilglucosamina son los posibles componentes del sitio antigénico.

35 El/los antígeno(s) de *Enterococcus* que pueden provocar anticuerpos protectores proporcionarían un medio eficaz de prevención y/o tratamiento de la infección por *Enterococcus*. Mientras que la técnica da a conocer una variedad de antígenos de *Enterococcus*, no todos los antígenos son eficaces como vacuna. De hecho, ningún material notificado en la bibliografía ha mostrado ser eficaz en la protección frente a la infección por *Enterococcus*. Con respecto a esto, incluso una descripción de que un antígeno es inmunogénico, es decir, que provoca la producción de anticuerpos, proporciona una base insuficiente para una conclusión de que los anticuerpos son protectores y que por tanto el antígeno es útil en una vacuna.

40 Finalmente, la técnica sugiere que *Enterococcus* es serológicamente un género muy diverso. Esta diversidad serológica sugirió que no era viable una vacuna compuesta por un número práctico de componentes activos. Maekawa *et al.*, Microbiol. Immunol. 36: 671-681 (1992).

Sumario de la invención

45 Por tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar antígenos de *Enterococcus* a partir de *E. faecalis* que pueden provocar la producción de anticuerpos protectores.

Un objeto adicional es proporcionar una vacuna que contiene antígenos de *Enterococcus*, más particularmente una vacuna que contiene antígenos a partir tanto de *E. faecalis* como de *E. faecium*.

50 Otro objeto es proporcionar una composición de globulina hiperinmunitaria que contiene anticuerpos dirigidos contra antígenos de *Enterococcus* a partir de *E. faecalis*.

Según estos y otros objetos según la invención, se proporciona un antígeno de *Enterococcus* aislado que reacciona con anticuerpos frente a células de ATCC 202013. Más particularmente, un antígeno de *Enterococcus faecalis* aislado comprende 2-acetamido-2-desoxi-glucosa, ramnosa, glucosa y 2-acetamido-2-desoxi-galactosa en una razón molar aproximada de 1:2:2:2.

60 El antígeno puede usarse en ensayos de diagnóstico o en métodos de inmunoterapia. Se proporciona un conjugado en el que el antígeno está covalentemente unido a un soporte inmunitario, preferiblemente una cepa mutante no tóxica, producida de manera recombinante del toxoide de la difteria o la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*. Los conjugados de antígeno-soporte son útiles en una vacuna, particularmente en una vacuna multivalente, para inmunoterapia activa. El antígeno o la vacuna también puede usarse para producir una inmunoglobulina para inmunoterapia pasiva o en la producción de anticuerpos monoclonales para uso diagnóstico o terapéutico.

ES 2 308 818 T3

Otros objetos, características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Sin embargo, debe entenderse que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones preferidas de la invención, se facilitan sólo a modo de ilustración, dado que resultarán evidentes diversos cambios y modificaciones dentro del espíritu y alcance de la invención para los expertos en la técnica a partir de esta descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1, 2 y 3 son espectros de RMN para antígenos de *Enterococcus*.

Descripción de realizaciones preferidas

Se ha descubierto de manera sorprendente que la mayoría de los aislados clínicos de *E. faecalis* se dividen en dos grupos y que la mayoría de los aislados clínicos humanos de *E. faecium* se dividen en tres grupos. El descubrimiento de que la mayoría de los aislados clínicos se caracteriza sólo por unos pocos antígenos no está anunciado en la técnica y permite el desarrollo de vacunas multivalentes que comprenden un número mínimo de componentes activos aunque son protectoras contra la mayoría de los aislados clínicos.

Los antígenos característicos de cada uno de los dos grupos de *E. faecalis* y los tres grupos de *E. faecium* pueden extraerse, purificarse e identificarse. Con respecto a esto, un antígeno es característico de un grupo o una cepa de bacterias si se expresa por la bacteria en una cantidad suficiente para provocar una respuesta inmunitaria significativa cuando se inyecta una vacuna de células completas del grupo o cepa en un animal, es decir, un animal produce anticuerpos protectores cuando se le inyecta de ese modo.

Los antígenos característicos de *E. faecalis* se denotan en el presente documento como EFS1 y EFS2, y los antígenos característicos de *E. faecium* como EFM3, EFM4 y EFM5. Estos antígenos se denominan conjuntamente en el presente documento "antígenos de *Enterococcus*". Una cepa de bacterias se denomina una cepa EFS1 si una vacuna de células completas de la cepa produce una respuesta inmunitaria significativa principalmente hacia EFS1 cuando se inyecta en un sujeto, y sólo una respuesta minoritaria frente a EFS2. De manera similar, una cepa de bacterias se denomina una cepa EFS2 si una vacuna de células completas de la cepa produce una respuesta inmunitaria significativa principalmente hacia EFS2 cuando se inyecta en un sujeto, etcétera.

Mientras que cada uno de los grupos clínicos principales de *E. faecalis* y *E. faecium* expresa un antígeno característico diferente que puede extraerse y purificarse fácilmente en una cantidad recuperable, los grupos también pueden expresar antígeno característico del/de los otro(s) grupo(s) en cantidades minoritarias. Sin embargo, cuando se inmunizan con células completas de uno de los grupos, los conejos producen una respuesta inmunitaria significativa sólo hacia el antígeno característico de ese grupo, y en absoluto o sólo escasamente frente a las cantidades minoritarias del antígeno más característico del/de los otro(s) grupo(s), tal como se muestra mediante la ausencia de una banda de precipitina entre anticuerpos del conejo inmunizado y el antígeno purificado característico del otro grupo.

El grado hasta el cual se expresa un antígeno no característico por las células varía. Por ejemplo, los antisueros generados contra una vacuna de células completas de una cepa EFS1 contienen anticuerpos frente a EFS2 en cantidades detectables tanto mediante aglutinación en portaobjetos como mediante ensayo de opsonofagocitosis (citado a continuación). Por otro lado, los antisueros generados contra una vacuna de células completas de una cepa EFS2 no contienen anticuerpos que precipitan con EFS1.

Los antígenos de *Enterococcus* se obtienen fácilmente a partir de cepas de *E. faecalis* y *E. faecium*, de acuerdo con protocolos proporcionados en el presente documento, y pueden provocar la producción de anticuerpos protectores cuando se conjugan con soportes inmunitarios. Por tanto, pueden usarse para preparar vacunas que proporcionan protección a seres humanos y otros mamíferos, por ejemplo, caballos, reses, cerdos, perros y gatos frente a la infección por aislados clínicamente significativos de enterococos. Con respecto a esto, un aislado "clínicamente significativo" es uno que es patogénico en seres humanos y otros mamíferos.

Los aislados clínicos de *E. faecalis* y *E. faecium* pueden agruparse mediante experimentos de aglutinación en portaobjetos, usando una preparación de anticuerpos apropiada para la aglutinación de las bacterias. Los experimentos de aglutinación en portaobjetos con *E. faecalis* muestran que la mayoría de los aislados clínicos se dividen en dos grupos, EFS1 y EFS2. Los antisueros generados contra una cepa EFS1 de *E. faecalis* aglutinan las cepas tanto EFS1 como EFS2 de *E. faecalis*. La reactividad de antisueros generados contra una cepa EFS1 de *E. faecalis* puede absorberse con células de la cepa EFS1. Entonces, los sueros absorbidos pueden continuar aglutinando sólo una cepa EFS2.

Los antisueros generados contra una cepa EFS2 de *E. faecalis* aglutinan sólo cepas EFS2, y esta reactividad no puede absorberse con bacterias EFS1. Tal como se esperaba, la absorción con células de una cepa EFS2 elimina la reactividad de estos antisueros con células de una cepa EFS2. Aunque sin querer restringirse a ninguna teoría, se supone que las cepas EFS1 y EFS2 de *E. faecalis* contienen antígeno EFS2, pero que este antígeno está cubierto o enmascarado de otra manera por antígenos EFS1 en células EFS1.

Los experimentos de aglutinación en portaobjetos con *E. faecium* muestran que la mayoría de aislados clínicos se dividen en tres grupos. Los antisueros producidos contra dos de los grupos dan resultados similares a los obtenidos

ES 2 308 818 T3

con *E. faecalis*. Es decir, los antisueros generados contra una cepa EFM3 de *E. faecium* aglutinan tanto bacterias EFM3 como EFM5, y la reactividad de este antisuero con una cepa EFM3 puede absorberse con células de una cepa EFM3. Los sueros absorbidos aglutinan entonces sólo cepas EFM5 de bacterias. Esta absorción también provoca una reducción en la reactividad con células de cepas EFM5, lo que indica que se exponen pequeñas cantidades de antígeno EFM5 sobre la superficie de células EFM3.

Los antisueros generados contra una cepa EFM5 de *E. faecium* aglutinan sólo aislados en ese grupo, y esta reactividad no puede absorberse fácilmente con células de una cepa EFM3. Tal como se esperaba, la absorción con células de una cepa EFM5 reduce la reactividad de estos antisueros con células. De manera similar, las cepas EFM3 y EFM5 de *E. faecium* contienen ambas antígeno EFM5. De nuevo, se supone que este antígeno está cubierto o enmascarado de otra manera por el antígeno EFM3 en células EFM3.

Los antisueros producidos contra una cepa EFM4 de *E. faecium* son específicos sólo para células de cepas EFM4 en experimentos de aglutinación en portaobjetos. Estos antisueros no demuestran reactividad cruzada con bacterias EFM3 y EFM5.

Los anticuerpos generados contra la vacuna de células completas no se dirigen hacia proteínas sobre la superficie celular, tal como se muestra mediante el tratamiento de células destruidas con formalina con pronasa E. Cuando se incuban las células destruidas durante 3 horas a 37°C con 500 µg/ml de pronasa E y luego se someten a prueba en la aglutinación en portaobjetos contra sueros de células completas, no existe diferencia en el patrón de aglutinación respecto al observado con *E. faecium* o *E. faecalis* no tratadas, es decir, el tratamiento con pronasa no elimina el antígeno de superficie contra el que se dirigen los anticuerpos.

Se han depositado representantes de cada una de las dos cepas de *E. faecalis* y tres de *E. faecium* según el Tratado de Budapest con la Colección Americana de Cultivos Tipo, y se les ha dado los números de registro 202013 (*E. faecalis* EFS1), 202014 (*E. faecalis* EFS2), 202015 (*E. faecium* EFM3), 202016 (*E. faecium* EFM4) y 202017 (*E. faecium* EFM5) respectivamente. El antígeno según la invención puede aislarse a partir de las cepas depositadas, o pueden usarse las cepas depositadas para identificar otras cepas que expresen el antígeno según la invención, a partir de las que puede extraerse y purificarse el antígeno según protocolos descritos en el presente documento.

Los antígenos de *Enterococcus* según la invención pueden obtenerse en cantidad recuperable y en forma sustancialmente pura, a partir de sus aislados de *E. faecalis* y *E. faecium* respectivos cultivados de acuerdo con los protocolos descritos en el presente documento. Una “cantidad recuperable” con respecto a esto significa que la cantidad aislada del antígeno puede detectarse mediante una metodología menos sensible que el radiomarcaje, tal como inmunoensayo, y puede someterse a manipulaciones adicionales que implican la transferencia del antígeno *per se* en disolución.

En un enfoque ilustrativo para obtener antígenos según la presente invención, en primer lugar se hace crecer una cepa de *E. faecalis* o *E. faecium* en una placa de agar sangre y luego se transfiere a un matraz iniciador con NaCl al 2%/Columbia. Se inocula un fermentador de 80 litros que contiene el mismo medio con glucosa al 4% añadida con el matraz iniciador. Se fermentan las células durante 16-24 horas. Se centrifugan las células para separar las células del sobrenadante. Puede extraerse cada uno de los cinco antígenos de o bien la pasta celular o bien el sobrenadante.

Cuando se usa la pasta celular, se extrae el antígeno agitando la pasta con ácido tricloroacético (TCA) al 10% frío, y luego se precipita en la disolución de TCA mediante una o más precipitaciones secuenciales con CaCl₂/etanol frío. Cuando se usa el sobrenadante, se somete el sobrenadante directamente a precipitación con CaCl₂/etanol frío. Esto produce un extracto antigénico bruto.

El extracto bruto se vuelve a disolver en agua, se dializa y se liofiliza. Se disuelve el material liofilizado en tampón y se purifica mediante cromatografía de intercambio iónico. Las fracciones que contienen antígeno pueden agruparse, dializarse, concentrarse y liofilizarse, y se usa la cromatografía de exclusión por tamaño para purificar el antígeno adicionalmente por tamaño en una columna adecuada. Se agrupan las fracciones que contienen antígeno, se concentran, se dializan y se liofilizan. Se analiza el antígeno purificado mediante espectroscopía por ¹H-RMN.

Una composición del antígeno de *Enterococcus* según la presente invención “consiste esencialmente en” el/los antígeno(s) o un conjugado del/de los antígeno(s), lo que significa que la composición no contiene ningún material que interfiera con la producción de una respuesta inmunitaria frente al/a los antígeno(s) cuando se usa la composición en un contexto terapéutico, o con la característica de acoplamiento antígeno-anticuerpo de un ensayo de diagnóstico. En una realización preferida, la composición contiene tanto antígenos de *E. faecalis* como de *E. faecium*.

Los antígenos según la invención son útiles en la producción de ensayos de diagnóstico para detectar la presencia de antígeno de *Enterococcus* y/o anticuerpo anti-*Enterococcus* en una muestra. O bien el antígeno de *Enterococcus* o bien el anticuerpo específico frente al antígeno de *Enterococcus* se mezcla con una muestra sospechosa de contener anticuerpo o antígeno de *Enterococcus* y se monitoriza para detectar la unión antígeno-anticuerpo. El antígeno o anticuerpo se marca con un marcador radiactivo o enzimático. En una realización preferida, se inmoviliza el antígeno o anticuerpo sobre una matriz sólida de modo que el antígeno o anticuerpo es accesible a antígeno o anticuerpo complementario que se pone en contacto con una superficie de la matriz. Entonces se pone en contacto la muestra con la superficie de la matriz y se monitoriza la superficie para detectar la unión antígeno-anticuerpo.

Por ejemplo, puede usarse el antígeno o anticuerpo en un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), en el que el antígeno o anticuerpo se une a una fase sólida y se usa un conjugado de enzima-anticuerpo o enzima-antígeno para detectar y/o cuantificar el anticuerpo o antígeno presente en una muestra. Alternativamente, puede usarse un ensayo de inmunotransferencia de tipo Western en el que los antígenos solubilizados y separados se unen a

- 5 papel de nitrocelulosa. Entonces se detecta el anticuerpo mediante un anticuerpo anti-inmunoglobulina (Ig) conjugado con enzima o marcador, tal como conjugado de peroxidasa del rábano-Ig, incubando el papel de filtro en presencia de un sustrato precipitable o detectable. Los ensayos de inmunotransferencia de tipo Western tienen la ventaja de no requerir una pureza superior al 50% para el antígeno deseado. Se encuentran descripciones de técnicas de ELISA e inmunotransferencia de tipo Western en los capítulos 10 y 11 de Ausubel, *et al.* (eds.), CURRENT PROTOCOLS IN
- 10 MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley and Sons (1988), cuyo contenido se incorpora al presente documento como referencia.

En un contexto de vacuna, es preferible conjugar el/los antígeno(s) con un portador inmunitario, habitualmente un polipéptido o proteína, para mejorar la interacción entre células T y B para la inducción de una respuesta inmunitaria frente al antígeno. Esto es particularmente importante para vacunas destinadas para su uso en pacientes con resistencia reducida. Un portador inmunitario potencia la inmunogenicidad tanto para la inmunogenización activa como para preparar antisueros de título alto en voluntarios para inmunización pasiva. Los soportes inmunitarios adecuados según la presente invención incluyen toxoide tetánico, toxoide de la difteria, exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* o sus derivados, cepas mutantes no tóxicas producidas de manera recombinante de exotoxina A, tal como se describe, 20 por ejemplo, en Fattom *et al.*, Inf. and Imm. 61: 1023-32 (1993), así como otras proteínas usadas comúnmente como soportes inmunitarios.

Con el fin de conjugar el antígeno con un soporte, en primer lugar se derivatiza el antígeno. Pueden usarse diversos métodos para derivatizar el antígeno y unirlo covalentemente a un soporte inmunitario. En un método preferido, se 25 activan grupos hidroxilo sobre el antígeno usando tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino-piridinio, y entonces se derivatiza con una dihidrazida de ácido adípico (ADH) espaciadora bifuncional de seis carbonos, según técnicas conocidas en la técnica, según el método de Kohn *et al.* FEBS Lett. 154: 209-210 (1993). Entonces se une este material al toxoide de la difteria (TD), la exoproteína A recombinante de *Pseudomonas aeruginosa* (rEPA), toxoide tetánico (TT) u otra proteína transportadora adecuada mediante 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC). Los 30 conjugados resultantes pueden separarse del antígeno sin reaccionar mediante cromatografía de exclusión molecular.

Preferiblemente, se administra el conjugado antigénico con un adyuvante que estimula los anticuerpos IgG subtipo 2. Los adyuvantes típicos incluyen adyuvante completo de Freund (CFA), adyuvante incompleto de Freund (IFA), 35 alumbré y otros adyuvantes adecuados para su uso en animales o seres humanos. Se ha mostrado que el sulfato de dextrano es un potente estimulador de anticuerpos IgG₂ contra antígenos de la superficie celular de estafilococos, y también es adecuado como adyuvante.

La inducción de bacteremia en algunos mamíferos, por ejemplo, animales de laboratorio, requiere números extremadamente altos de microorganismos o alguna maniobra previa para disminuir la resistencia del huésped. Sin embargo, 40 puede estudiarse la fagocitosis *in vitro* como una correlación de la inmunidad protectora *in vivo* para seres humanos y otros mamíferos. En este modelo, se mide la capacidad de anticuerpos monoclonales y policlonales específicos de antígeno para opsonizar cepas de *Enterococcus* *in vitro* mediante fagocitosis, según el método descrito en Kojima *et al.*, Infect. Dis. Immun. 58: 2367-74 (1990). Se reconoce en el campo que los ensayos de opsonofagocitosis *in vitro* son predictivos de la eficacia como vacuna. Por ejemplo, Fischer *et al.* dan a conocer una correlación entre anticuerpos 45 funcionales determinada con un ensayo opsónico *in vitro* y la actividad *in vivo*. J. Inf. Dis. 169: 324-9 (1994).

Los anticuerpos inducidos por los antígenos de *Enterococcus* según la invención son opsónicos y facilitan la fagocitosis específica de tipo. Los anticuerpos de conejo producidos contra los antígenos de *Enterococcus* pueden mediar específicamente la opsonofagocitosis de las cepas que portan los antígenos mediante células de leucocitos polimorfonucleares (PMN) humanos en presencia de complemento humano. Por tanto, los ensayos de fagocitosis *in vitro* indican que los anticuerpos frente a los antígenos de *Enterococcus* son protectores frente a la infección por *E. faecalis* y *E. faecium*. Puede usarse una vacuna basada en una combinación de antígenos de *E. faecalis* y *E. faecium* para proteger frente a la infección debida a la mayoría de las cepas clínicas de *Enterococcus*.

55 Los resultados *in vivo* están de acuerdo con los resultados de los ensayos de opsonofagocitosis *in vitro*. Los anticuerpos frente al conjugado EFS1 disminuyeron la bacteremia en ratones expuestos a *E. faecalis*.

La presente invención también se refiere al uso del/de los antígeno(s) de *Enterococcus* para producir anticuerpos policlonales o anticuerpos monoclonales (de ratón o ser humano) que se unen a o neutralizan *Enterococcus*. Se describen protocolos ilustrativos para producir estos anticuerpos en el capítulo 11 de MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory (Cold Spring Harbor, NY); en METHODS OF HYBRIDOMA FORMATION 257-271, Humana Press (Clifton, NJ); en Vitetta *et al.*, Immunol. Rev. 62: 159-83 (1982); y en Raso, Immunol. Rev. 62: 93-117 (1982).

65 El inóculo para la producción de anticuerpos policlonales se prepara normalmente dispersando el antígeno-soporte inmunitario en un diluyente fisiológicamente tolerable tal como solución salina, para formar una composición acuosa. Se administra una cantidad inmunoestimuladora de inóculo, con o sin adyuvante, a un mamífero, y entonces se mantiene el mamífero inoculado durante un periodo de tiempo suficiente para que el antígeno induzca anticuerpos anti-

ES 2 308 818 T3

antígeno de *Enterococcus* protectores. Pueden usarse dosis de refuerzo del antígeno-soporte inmunitario en individuos que todavía no están sensibilizados para responder al antígeno.

Los anticuerpos pueden incluir preparaciones de anticuerpos de una variedad de animales usados comúnmente, tales como cabras, primates, burros, cerdos, conejos, caballos, gallinas, cobayas, ratas y ratones, e incluso anticuerpos humanos tras la selección, fraccionamiento y purificación apropiados. También pueden producirse antisueros animales inoculando los animales con cepas destruidas con formalina de *E. faecalis* mediante métodos convencionales, extrayendo sangre a los animales y recuperando el suero o plasma para procesamiento adicional.

Los anticuerpos inducidos de esta forma pueden recogerse y aislar hasta el grado deseado mediante técnicas bien conocidas, tales como fraccionamiento con alcohol y cromatografía en columna, o mediante cromatografía de inmunoadsorción; es decir, uniendo el antígeno a un relleno de columna cromatográfica como Sephadex™, haciendo pasar el antisero a través de la columna, reteniendo de ese modo anticuerpos específicos y separando otras inmunoglobulinas (IgG) y contaminantes, y luego recuperando anticuerpos purificados mediante elución con un agente caotrópico, seguido opcionalmente por purificación adicional, por ejemplo, mediante el pase a través de una columna de antígenos de grupo sanguíneo unidos u otras especies no patógenas. Este procedimiento puede preferirse cuando se aíslan los anticuerpos deseados de los sueros o plasma de seres humanos que han desarrollado un título de anticuerpos contra el patógeno en cuestión, garantizando así la retención de anticuerpos que pueden unirse al antígeno. Entonces pueden usarse en preparaciones para inmunización pasiva contra cepas de *E. faecalis*.

Una composición de anticuerpo monoclonal contiene, dentro de límites detectables, sólo una especie de sitio de combinación de anticuerpo que puede unirse eficazmente al antígeno de *Enterococcus*. Pueden prepararse anticuerpos adecuados en forma monoclonal usando la tecnología del hibridoma convencional.

Para formar hibridomas a partir de los cuales se produce una composición de anticuerpos monoclonales de la presente invención, se fusiona un mieloma u otra línea celular de autoperpetuación con linfocitos obtenidos de sangre periférica, ganglios linfáticos o el bazo de un mamífero hiperinmunizado con el antígeno de *Enterococcus*. Se prefiere que la línea celular de mieloma sea de la misma especie que los linfocitos. Se fusionan normalmente esplenocitos con células de mieloma usando polietilenglicol 1500. Se seleccionan híbridos fusionados mediante su sensibilidad a HAT. Pueden identificarse hibridomas que secretan las moléculas de anticuerpo de esta invención usando un ELISA.

Un bazo de ratón Balb/c, sangre periférica humana, ganglios linfáticos o esplenocitos son los materiales preferidos para su uso en la preparación de hibridomas murinos o humanos. Los mielomas de ratón adecuados para su uso en la presente invención incluyen las líneas celulares sensibles a hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT), siendo un mieloma preferido el P3X63-Ag8.653. El componente de fusión preferido para la producción de anticuerpos monoclonales humanos es SHM-D33, un heteromieloma disponible de la ATCC, Rockville, Md. con la denominación CRL 1668.

Puede producirse una composición de anticuerpos monoclonales de la presente invención iniciando un cultivo de hibridoma monoclonal que comprende un medio nutritivo que contiene un hibridoma que secreta moléculas de anticuerpo de la especificidad apropiada. El cultivo se mantiene en las condiciones y durante un tiempo suficiente para que el hibridoma secrete las moléculas de anticuerpo en el medio. Entonces se recoge el medio que contiene anticuerpos. Entonces pueden aislarse las moléculas de anticuerpo adicionalmente mediante técnicas bien conocidas.

Medios útiles para la preparación de estas composiciones son tanto bien conocidos en la técnica como están disponibles comercialmente, e incluyen medios de cultivo sintéticos, ratones consanguíneos y similares. Un medio sintético a modo de ejemplo es medio esencial mínimo de Dulbecco complementado con suero de ternero fetal al 20%. Una cepa de ratón consanguíneo a modo de ejemplo es la Balb/c.

También se contemplan otros métodos de preparación de composiciones de anticuerpos monoclonales, tales como fusiones entre especies, dado que es principalmente la especificidad de antígeno de los anticuerpos la que afecta a su utilidad en la presente invención. Pueden fusionarse linfocitos humanos obtenidos de individuos infectados con una línea celular de mieloma humano para producir hibridomas que pueden examinarse para determinar la producción de anticuerpos que reconocen el antígeno de *Enterococcus*. Sin embargo, más preferible en este aspecto es un procedimiento que no supone el uso de una muestra biológica de un sujeto humano infectado. Por ejemplo, un sujeto inmunizado con una vacuna tal como se describe en el presente documento puede servir como fuente de anticuerpos usados adecuadamente en una composición de anticuerpos dentro de la presente invención. Pueden caracterizarse anticuerpos monoclonales purificados mediante ensayos de aglutinación bacteriana usando una colección de aislados clínicos, o mediante ELISA usando placas recubiertas con antígeno purificado.

Las composiciones de anticuerpos monoclonales y policlonales según la presente descripción pueden usarse mediante inmunización pasiva para inducir una respuesta inmunitaria para la prevención o el tratamiento de la infección por cepas de *E. faecalis*. En este aspecto, la preparación de anticuerpos puede ser una composición policlonal. Una composición policlonal de este tipo incluye anticuerpos que se unen al/los antígeno(s) de *Enterococcus*. El componente de anticuerpos policloniales puede ser un antisero policlonal, preferiblemente purificado por afinidad, de un animal que se ha expuesto con el/los antígeno(s) de *Enterococcus*.

ES 2 308 818 T3

Se conocen en la técnica otros métodos para preparar fragmentos bivalentes que sean completamente heteropecíficos, por ejemplo, el uso de ligadores bifuncionales para unir fragmentos escindidos. Se conocen moléculas recombinantes que incorporan las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo. Véase, por ejemplo, los productos de una metodología descrita por Boss *et al.*, patente estadounidense número 4.816.397. Se incluyen en la presente invención 5 métodos análogos de producción de moléculas de unión recombinantes o sintéticas que tienen las características de anticuerpos. Pueden unirse más de dos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos monopecíficos diferentes usando diversos ligadores conocidos en la técnica.

Un componente de anticuerpos producido según la presente invención puede incluir anticuerpos completos, fragmentos de anticuerpo o subfragmentos. Los anticuerpos pueden ser inmunoglobulina completa de cualquier clase, por ejemplo, IgG, IgM, IgA, IgD, IgE, anticuerpos químéricos o anticuerpos híbridos con especificidades de antígeno o epítopo duales o múltiples, o fragmentos, por ejemplo, F(ab')₂, Fab', Fab y similares, incluyendo fragmentos híbridos, e incluye adicionalmente cualquier inmunoglobulina o cualquier proteína natural, sintética o modificada genéticamente que actúe como un anticuerpo uniéndose a un antígeno específico para formar un complejo. En particular, pueden 10 expresarse moléculas Fab y ensamblarse en un huésped como *E. coli* transformado genéticamente. Está disponible así 15 un sistema de vector lambda para expresar una población de Fab' con una diversidad potencial igual a o que supera la del sujeto que genera el anticuerpo predecesor. Véase Huse, W.D., *et al.*, Science 246: 1275-81 (1989).

El/los conjugado(s) de antígeno según la presente invención pueden ser el principio activo en una composición, 20 que comprende además un soporte farmacéuticamente aceptable para el principio activo, que puede usarse como una vacuna para inducir una respuesta inmunitaria celular y/o la producción *in vivo* de anticuerpos que combatan la infección por *Enterococcus*. En este aspecto, un soporte farmacéuticamente aceptable es un material que puede usarse como vehículo para administrar un medicamento porque el material es inerte o medicinalmente aceptable por lo demás, así como compatible con el principio activo, en el contexto de la administración de la vacuna. Además de 25 un excipiente adecuado, un soporte farmacéuticamente aceptable puede contener aditivos de vacuna convencionales como diluyentes, adyuvantes, antioxidantes, conservantes y agentes solubilizantes.

De acuerdo con la presente invención, una vacuna de este tipo puede administrarse a un sujeto todavía no infectado 30 *E. faecalis* o *E. faecium*, para inducir de ese modo una respuesta inmunitaria protectora frente a *Enterococcus* (humoral o celular) en ese sujeto. Alternativamente, puede administrarse una vacuna dentro de la presente invención a un sujeto en el que ya se ha producido una infección por *E. faecalis* y/o *E. faecium* pero está en un estadio suficientemente temprano para que la respuesta inmunitaria producida frente a la vacuna inhiba eficazmente la propagación adicional de la infección.

35 Mediante otro enfoque, puede administrarse una vacuna de la presente invención a un sujeto que actúa luego como fuente de inmunoglobulina, producida en respuesta a la exposición a la vacuna específica que contiene anticuerpos dirigidos contra *Enterococcus*. Un sujeto así tratado donaría plasma a partir del cual podría obtenerse entonces inmunoglobulina, mediante metodología de fraccionamiento de plasma convencional, y administrarse a otro sujeto con el fin de conferir resistencia contra o para tratar la infección por *Enterococcus*. Las inmunoglobulinas según la 40 invención son particularmente útiles para individuos inmunocomprometidos, para individuos que se someten a procedimientos invasivos o en los que el tiempo no permite producir al individuo sus propios anticuerpos en respuesta a la vacunación.

45 De manera similar, pueden conjugarse anticuerpos anti-*Enterococcus* monoclonales o policlonales producidos según la presente invención con una inmunotoxina, y administrarse a un sujeto en el que ya se ha producido una infección por *Enterococcus* pero no se ha propagado ampliamente. Para este fin, se administraría material de anticuerpos producido de acuerdo con la presente invención en un soporte farmacéuticamente aceptable, tal como se define en el presente documento.

50 La presente invención se describe adicionalmente por referencia a los siguientes ejemplos ilustrativos.

Ejemplo 1

55 *Fermentación de E. faecalis y E. faecium*

Se cultivaron *E. faecalis* y *E. faecium* en caldo Columbia complementado con NaCl al 2% y glucosa al 4% en un fermentador de 80 litros que contenía 60 litros de medio de caldo a 37°C. Se inició la fermentación con un litro de un cultivo semilla viejo de 16 horas. Se hicieron crecer las células con agitación a 200 rpm durante 16-24 horas.

60 Se fijaron con formalina las células que van a usarse como vacuna para preparar antisuero de células completas durante la noche a temperatura ambiente. Se recogieron las células para la purificación mediante centrifugación a 14.500 x g y se almacenaron a -70°C hasta su uso. Se obtuvieron aproximadamente 500 g, 180 g y 350 g de pasta celular (peso neto) a partir de un fermentador de 80 litros para EFS1, EFS2 y EFM3, respectivamente.

ES 2 308 818 T3

Ejemplo 2

Preparación de antisuero de células completas

5 Se ajustaron a $\text{DO}_{540 \text{ nm}} = 1$ células destruidas y fijadas con formalina de dos cepas de *E. faecalis* y tres cepas de *E. faecium* cultivadas como en el ejemplo 1 y se inyectaron por vía intravenosa en conejos. No se usó adyuvante. Los conejos recibieron 10 inyecciones y se les extrajo sangre a intervalos semanales tras la última inyección y se recogió y agrupó el suero de células completas positivas. Se purificó IgG a partir de suero de células completas mediante una columna de afinidad de proteína G.

10

Ejemplo 3

*Estudios de aglutinación con *E. faecalis* y *E. faecium**

15 Se usaron sueros de conejos inmunitarios obtenidos de conejos inmunizados con las dos cepas de *E. faecalis* destruidas y fijadas con formalina y de las tres cepas de *E. faecium* destruidas y fijadas con formalina para tipificar aislados de *E. faecalis* y *E. faecium* mediante aglutinación en portaobjetos. Se usaron los antisueros para tipificar 67 aislados clínicos de *E. faecalis* y 85 aislados clínicos de *E. faecium*. Sesenta de los 67 aislados de *E. faecalis* (89,5%) reaccionaron con antisueros obtenidos mediante inmunización de los conejos con células de ATCC 202013. Cuarenta y uno de los 85 aislados clínicos de *E. faecium* reaccionaron con antisueros obtenidos mediante inmunización de los conejos con células de ATCC 202015.

25 Ejemplo 4

Purificación del antígeno

30 Basándose en los resultados notificados en el ejemplo 3, se aislaron antígenos de ATCC 202013, ATCC 202014 y ATCC 202015, respectivamente. Se extrajeron antígenos de la pasta celular o del sobrenadante obtenido según el ejemplo 1.

Purificación del antígeno EFS1

35 Se aisló este antígeno de la pasta celular de ATCC 202013. Se extrajo el antígeno de la superficie celular agitando la pasta celular (434 g) con TCA al 10% frío (1735 ml) a 4°C durante un periodo de 48 horas. Se obtuvo un sobrenadante transparente mediante centrifugación. Se concentró este sobrenadante hasta 1/5 de su volumen original mediante evaporación a presión reducida por debajo de 40°C. Se añadió un volumen igual de etanol al 95% a esta disolución y se incubó la disolución a 4°C durante la noche. Se separó una pequeña cantidad de precipitados del sobrenadante mediante centrifugación. Se añadieron otros cuatro volúmenes de etanol al sobrenadante transparente y se añadió una cantidad suficiente de CaCl_2 1 M para preparar una concentración de CaCl_2 10 mM final en la disolución. Se incubó la mezcla de nuevo a 4°C durante la noche. Se recuperaron los precipitados mediante centrifugación.

40 Se redissolvieron los precipitados en una cantidad mínima de TCA al 10% frío y se repitieron las etapas de precipitación con etanol al 50% y al 80% anteriores para eliminar más impurezas. Se disolvieron en agua los precipitados finales tras la etapa de precipitación con etanol al 80%, se dializaron en agua destilada fría y se liofilizaron. Se disolvió este material en tampón Tris-HCl 0,01 M, pH 7,0, y se cargó sobre una columna de intercambio aniónico Q-Sepharose. Se eluyó la columna secuencialmente con tampón Tris-HCl 0,01 M que contenía NaCl 0,1 y 0,2 M. Se dializó la fracción de NaCl 0,2 M en agua destilada fría y se liofilizó. Se purificó adicionalmente el material liofilizado en una columna Sephadryl S-300 y se eluyó con solución salina tamponada con fosfato (PBS) para obtener 258 mg del antígeno purificado final.

Purificación del antígeno EFS2

55 Se purificó el antígeno del sobrenadante obtenido de la fermentación de ATCC 202014. Se obtuvo material bruto del sobrenadante mediante precipitación con etanol al 25-75% que contenía CaCl_2 10 mM. Se purificó parcialmente la fracción obtenida de la precipitación con etanol al 75% mediante cromatografía de intercambio iónico en una columna Q-Sepharose. Se eluyó la columna secuencialmente con tampón Tris-HCl 0,01 M que contenía NaCl 0,2 y 0,5 M. Se trató la fracción de NaCl 0,5 M con proteasa durante la noche para eliminar proteínas contaminantes y posteriormente se purificó además mediante cromatografía de exclusión molecular en una columna Sephadryl S-300. Se agruparon las fracciones que reaccionaban con los antisueros de células completas frente a ATCC 202014 y se purificaron además mediante una segunda etapa de intercambio iónico en una columna Q-Sepharose. Se eluyó el material con un gradiente de cloruro de sodio 0,2-0,5 M lineal en tampón Tris-HCl a pH 7. También se aisló el mismo material de las células siguiendo etapas similares tras la liberación de este material de la superficie celular mediante tratamiento químico o enzimático.

ES 2 308 818 T3

Purificación del antígeno EFM3

Se extrajo antígeno de ATCC 202015 agitando la pasta celular con TCA al 10% frío a 4°C durante 48 horas, tal como se describió para EFS1. Se obtuvo un sobrenadante transparente mediante centrifugación. Se concentró este sobrenadante hasta 1/5 de su volumen original mediante evaporación a presión reducida por debajo de 40°C. Se añadió un volumen igual de etanol al 95% a esta disolución y se incubó la disolución a 4°C durante la noche. Se separó una pequeña cantidad de precipitados del sobrenadante mediante centrifugación. Se añadieron otros cuatro volúmenes de etanol al sobrenadante transparente y se añadió una cantidad suficiente de CaCl₂ 1 M para preparar una concentración de CaCl₂ 10 mM final en la disolución. Se incubó la mezcla de nuevo a 4°C durante la noche. Se recuperaron los precipitados mediante centrifugación.

Se redissolvieron los precipitados en una cantidad mínima de TCA al 10% frío y se repitieron las etapas de precipitación con etanol al 50% y al 80% anteriores para eliminar más impurezas. Se disolvieron los precipitados finales recuperados tras la etapa de precipitación con etanol al 80% en tampón Tris-HCl 0,01 M, pH 7,0, y se cargó sobre una columna de intercambio aniónico Q-Sepharose. Se eluyó la columna mediante el tampón anterior que contenía NaCl 0,1 M. Se dializó la fracción en agua destilada fría y se liofilizó. Se purificó el material liofilizado adicionalmente en una columna Sephadryl S-300 y se eluyó con PBS. Se agruparon las fracciones que contenían antígeno, se dializaron en agua destilada fría y se liofilizaron.

Ejemplo 5

Caracterización del antígeno

Se analizaron los antígenos aislados en el ejemplo 4 para determinar su composición. EFS1 comprende cantidades principales de cuatro azúcares: 2-acetamido-2-desoxi-glucosa, ramnosa, glucosa y 2-acetamido-2-desoxi-galactosa en una razón molar calculada aproximada de 1:2:2:2. Se facilita un análisis bioquímico completo en la tabla 1.

30

TABLA 1

EFS1

35	Ensayo realizado	Resultado
	Fenol-ácido sulfúrico	25-41%
40	Fósforo	1,5-2,5%
	Ácido nucleico residual	<1%
45	Proteína residual	<1%
	Ácido urónico	indetectable
	O-acetilo	indetectable

50

También se analizó el material mediante espectroscopía de H¹-RMN. Los picos principales de campo inferior observados fueron a δ 5,14 (s), 5,03 (s), 5,01 (d, J_{1,2}=7,8 Hz), 4,78-4,67 (complejo). En la región de campo alto el espectro mostró resonancias a 2,21 y 2,18 debido a grupos N-acetilo, y a 1,43 (δ, J_{5,6} = 6Hz) debido al grupo 6-metilo del 6-desoxi-azúcar. Se muestra en la figura 1 un espectro completo del material.

55

El antígeno EFS2 comprende una repetición de trisacárido, tal como se determina mediante ¹H-RMN (figura 2). Uno de los azúcares es un 6-desoxi-azúcar. Los azúcares constituyentes no contienen sustituyentes de N- u O-acetilo. El antígeno dio un color positivo en el ensayo con fenol-ácido sulfúrico, indicando la presencia de residuos de azúcar neutros. Se eluyó el antígeno de la columna de intercambio aniónico con tampón que contenía NaCl >0,20 M y se movió hacia el ánodo en la inmunoelectroforesis en cohete, lo que significa que contiene grupos ácidos.

60

El análisis de azúcar del antígeno EFM3 reveló la presencia de 2-acetamido-2-desoxi-galactosa y galactosa como los dos azúcares principales. Se facilita en la tabla 2 un análisis bioquímico completo del antígeno.

65

ES 2 308 818 T3

TABLA 2

EFM3

Ensayo realizado	Resultado
Fenol-ácido sulfúrico	23-39%
Fósforo	1,12-3,6%
Ácido nucleico residual	<1%
Proteína residual	<2%
Ácido urónico	indetectable
O-acetilo	indetectable

También se analizó el antígeno EFM3 mediante espectroscopía de H¹-RMN y se muestra el espectro completo en la figura 3. Las resonancias características observadas en la región de campo bajo fueron a δ . 5,01 (s), 4,73 (d, J=7,8 Hz), 4,6-4,55, (complejo) y 4,52 (δ , J=7,8 Hz). Los protones de los grupos N-acetilo resonaron en la región de campo alto a δ . 2,14, 2,20 y 2,21.

EFS1 y EFS2 reaccionaron cada uno específicamente en capilaridad con antisueros obtenidos de conejos inmunizados con una vacuna de células completas de ATCC 202013 y ATCC 202014, respectivamente. Adicionalmente, EFS2 reaccionó con los antisueros de células completas frente a ATCC 202013 en capilaridad, debido a la expresión de cantidades minoritarias de EFS2 por cepas EFS1. EFS1 no reaccionó con antisueros de células completas frente a ATCC 202014 en capilaridad, y se requieren técnicas más sensibles tales como inmunotransferencia puntual para detectar la presencia de anticuerpos específicos de EFS1 en sueros de conejos inmunizados con EFS2. El antígeno EFM3 reaccionó específicamente con sueros de conejos inmunizados con células de ATCC 202015. El antígeno EFM3 no reaccionó de manera cruzada con antisueros específicos obtenidos o bien de ATCC 202013 o bien de ATCC 202014.

En un ensayo *in vitro*, antisueros de conejo contra ATCC 202013 depositaron específicamente componente C3b del complemento humano sobre placas recubiertas con antígeno EFS1, y antisueros de conejo contra ATCC 202015 depositaron específicamente componente C3b del complemento humano sobre placas recubiertas con antígeno EFM3. No se produjo deposición cruzada de C3b.

Ejemplo 6

Preparación de conjugados de antígeno-soporte inmunitario

Se enfrió una disolución de antígeno en agua (10 mg/ml) en un baño de agua enfriada con hielo. Se añadió a esta disolución una disolución acuosa fría (100 mg/ml) de tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridina (CDAP), en una cantidad 1,2 veces el volumen de la disolución de antígeno anterior. Se añadió gota a gota un volumen de disolución de trietilamina acuosa 0,2 M igual al volumen de disolución de CDAP añadido anteriormente. Tras agitar la mezcla durante un total de 3 minutos a 4°C, se añadió un volumen igual de disolución de ADH 0,5 M preparada en hidrogenocarbonato de sodio 0,5 M. Se agitó la disolución anterior a 4°C durante la noche, se dializó en agua destilada fría y se liofilizó para obtener el producto final derivatizado. Se determinó la cantidad de ADH incorporado en el antígeno de manera colorimétrica mediante ensayo con ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS).

Se disolvieron cantidades iguales de polisacárido derivatizado con ADH y DT en agua para obtener una concentración final de 5-10 mg/ml de cada componente. Se ajustó esta disolución hasta pH 5,6 usando ácido clorhídrico 0,1 M. A esta disolución se le añadió una disolución recién preparada de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC) en una cantidad mínima de agua, en una cantidad de cuatro veces en peso del antígeno. Se agitó la disolución vigorosamente a temperatura ambiente y se mantuvo el pH de la disolución a pH 5,6 usando HCl 0,1 M. Se detuvo la reacción tras 1 hora llevando el pH hasta 7,0 con NaOH 0,1 M. Se obtuvo el conjugado puro mediante cromatografía de exclusión molecular sobre una columna Sephadex G-100 eluída con PBS. Se determinó la cantidad de antígeno y proteína en los conjugados mediante ensayo con fenol-ácido sulfúrico y ensayo de BCA usando el antígeno correspondiente o BSA como patrones, respectivamente.

ES 2 308 818 T3

Ejemplo 7

Preparación de antisueros frente a conjugados de antígeno de Enterococcus-soporte inmunitario

- 5 Se inmunizaron conejos New Zealand hembra blancos mediante inyección subcutánea con 50 µg de conjugado de antígeno-soporte inmunitario preparado según el ejemplo 6 en los días 0, 14 y 28. Se administró la primera inyección con un volumen igual de adyuvante completo de Freund (CFA) y las inyecciones posteriores se administraron con adyuvante incompleto de Freund (IFA). Se monitorizaron las extracciones de sangre de prueba tomadas de conejos para determinar la presencia de anticuerpos de conejo precipitantes específicos frente al antígeno con el que se inmunizaron.
- 10 Se administraron inyecciones adicionales tal como se necesitaba para reforzar el título.

15 Se extrajo sangre de los conejos para obtener antisueros de conejo de título alto que contenían anticuerpos específicos frente al antígeno con el que se inmunizaron. Se usaron los antisueros para evaluar la capacidad de los anticuerpos específicos para mediar la opsonofagocitosis de bacterias de *Enterococcus* correspondientes por células HL-60 en ensayos *in vitro*.

20 Los sueros obtenidos de conejos inmunizados con el conjugado de EFS1 de *E.faecalis*-DT tenían un título alto y dieron precipitados con EFS1 en capilaridad. Los anticuerpos pudieron mediar la destrucción de células que portaban EFS1 por HL 60 en presencia de complemento. Los conejos inmunizados con el conjugado de antígeno de *E.faecium*-DT también pudieron producir anticuerpos específicos para antígeno. Estos anticuerpos dieron precipitados con antígeno de *E. faecium* en capilaridad.

Ejemplo 8

Ensayos de opsonofagocitosis in vitro

25 Se transfirieron bacterias de perlas de reserva a una nueva placa de agar de tioglicolato Todd Hewitt se incubó la placa durante 18-20 horas a 37°C en CO₂ al 5%. Se rascaron las bacterias de la placa y se suspendieron en dos mililitros de solución salina estéril. Se centrifugó el tubo a 2000 rpm durante 10 minutos a 25-35°C, y se eliminó el sobrenadante. Se resuspendieron las bacterias sedimentadas en dos mililitros de solución salina estéril y se usaron para preparar una suspensión de bacterias de una densidad óptica de 0,1 a 540 nm.

30 Se usó una muestra diluida 1:100 preparada a partir de la suspensión bacteriana descrita anteriormente en medio RP-5 como reserva de trabajo de la disolución de bacterias. Se sometió a prueba esta preparación bacteriana frente a antisueros correspondientes para determinar la aglutinación en portaobjetos positiva. Se cargó la reserva de trabajo bacteriana en pocillos de placa de microtitulación con la dilución apropiada de medio RP-5.

35 Se obtuvieron PMN de células HL-60 ajustadas hasta una concentración de 1,0 x 10⁷ células por ml en medio RP-5. Se centrifugaron las células PMN a 1000 rpm durante 10 minutos a 30-35°C. Se resuspendieron las células sedimentadas en cinco mililitros de medio RP-5 y se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos. Se resuspendieron las células sedimentadas en un mililitro de medio RP-5 dando una concentración de trabajo de 1 x 10⁷/ml.

40 Se diluyó hasta 1:40 en medio RP-5 un complemento humano preparado a partir de suero humano. La mezcla de reacción en los pocillos de la placa de microtitulación contenía 50 µl de bacterias [10⁶-10⁷ células/ml], 50 µl de sueros diluidos, 50 µl de PMN [1x10⁷ células/ml] y 50 µl de complemento, dando un volumen total de 200 µl. A tiempo cero, se diluyó en serie una muestra de 20 µl de la placa de reacción 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ y 10⁻⁴. Se sembró en placas una muestra de 10 µl de cada dilución sobre una placa de agar soja tríptico (TSA). Se incubaron las placas de TSA durante la noche a 37°C, CO₂ al 5%. Tras la dilución a tiempo cero, se incubó la placa de reacción a 37°C durante 90 minutos.

45 50 Se volvieron a mezclar las muestras. Se diluyeron en serie 20 µl de la placa de reacción 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ y 10⁻⁴. Se sembró en placa una muestra de 10 µl de cada dilución sobre placas de TSA, que luego se incubaron durante la noche 37°C, CO₂ al 5%.

55 Se contaron las colonias bacterianas para cada dilución/muestra/placa, y se calculó la destrucción en porcentaje de las bacterias mediante la fórmula

$$\frac{\% \text{ de destrucción} = n^{\circ} \text{ de colonias a } T_0 - n^{\circ} \text{ de colonias a } T_{90}}{\text{número de colonias a } T_0} \times 100$$

60 Tanto el antisuero de células completas de conejos inmunizados con ATCC 202013 como los anticuerpos de conejo producidos contra conjugados de EFS1-DT mediaron la opsonofagocitosis de *E. faecalis* por HL-60 en presencia de complemento humano. Se absorbió la actividad opsónica de los anticuerpos anti-conjugado de EFS1-DT de conejo completamente por el conjugado EFS1-DT. La actividad opsónica de los antisueros de células completas sólo se absorbió parcialmente con el conjugado de EFS1-DT, indicando que parte de la actividad oposónica de los anticuerpos de células completas surge de anticuerpos dirigidos hacia un antígeno diferente de EFS1. Se absorbió completamente

ES 2 308 818 T3

la actividad opsónica tanto de los anticuerpos anti-conjugado de EFS1-DT como los anticuerpos de células completas por ATCC 202013. Los anticuerpos de células completas producidos contra ATCC 202014 no reaccionaron con EFS1 en ensayos de aglutinación, indicando claramente que EFS1 y EFS2 son antígenos distintos.

- 5 El antisuero de células completas de conejos inmunizados con ATCC 202014 medió la opsonofagocitosis de *E. faecalis* por HL-60 en presencia de complemento humano. Los anticuerpos de conejo de células completas también pudieron mediar la opsonofagocitosis de múltiples aislados de *E. faecalis*, incluyendo aislados EFS1, por HL-60 en presencia de complemento humano. Esta actividad opsónica pudo absorberse por el EFS2. El conjugado de EFS1-DT no pudo absorber la actividad opsónica del antisuero de células completas de conejos inmunizados con ATCC 202014.
- 10 Esta observación sugiere que la respuesta inmunitaria provocada por los aislados de EFS2 en conejos es contra el antígeno EFS2 y que los anticuerpos contra el antígeno EFS2 pueden mediar la opsonofagocitosis de múltiples aislados de *E. faecalis* por HL-60 en presencia de complemento humano.

15 Ejemplo 9

Protección in vivo de ratones de la exposición a E. faecalis mediante anticuerpos conjugado de EFS1-DT

20 Se dividieron un total de 42 ratones ICR en tres grupos con 15 ratones en cada uno de los primeros dos grupos y 12 ratones en el tercer grupo. Se inmunizaron los ratones en los dos primeros grupos con una inyección intraperitoneal de 0,75 mg de IgG de conejo purificada mediante columna de proteína G obtenida o bien a partir de conejos inmunizados con el conjugado (I-IgG) o conejos normales (N-IgG). El tercer grupo se inmunizó con PBS. Veinticuatro horas más tarde, se expusieron todos los animales con 5×10^7 CFU de una cepa EFS1 distinta de ATCC 202013, se mezclaron con mucina porcina al 5%. Se tomaron muestras de sangre de todos los ratones a través de sus ojos a las 6, 24, 48, 72 y

25 168 horas. Estas muestras se sembraron en placas de TSA y se cuantificaron los niveles de bacteremia en los ratones mediante recuentos bacterianos en la sangre. Los resultados se muestran en la tabla 3.

30 Tras 48 horas, sólo el 17% de los ratones eran bacterémicos en el grupo de I-IgG, mientras que en los grupos inmunizados con NOIgG y PBS el número correspondiente fue del 60% y el 79%, respectivamente. Tras 7 días, se sacrificaron todos los animales y se aislaron sus hígados y riñones y se tomaron muestras para determinar la colonización bacteriana. Pocos animales en el grupo de I-IgG (4/30) tenían colonización bacteriana detectable en los riñones en comparación con el grupo de N-IgG (9/30) o el grupo de PBS (13/24). Estas observaciones demuestran claramente que los anticuerpos específicos frente al antígeno EFS1 pueden proteger a ratones de la exposición bacteriana con *E. faecalis*.

35

(Tabla pasa a página siguiente)

40

45

50

55

60

65

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Tabla 3

Recuentos de colonización de órganos de ratón y bacteremia	
Tiempo tras la exposición (tipo de muestra)	Media geométrica de número/muestras positivas de muestras positivas (Una muestra positiva tiene recuentos $\geq 10^2$ UFC/mL)
Seis horas (muestras de sangre)	ElDrd-RIGG, 0,75 mg 2,66 E+03 24/30
Veinticuatro horas (muestras de sangre)	2,28 E+03 12/30
Cuarenta y ocho horas (muestras de sangre)	3,72 E+02 5/30
Setenta y dos horas (muestras de sangre)	8,68 E+02 4/30
Seis o siete días (muestras de sangre)	3,86 E+02 2/30
Seis o siete días (muestras de riñón)	7,48 E+02 4/30
Seis o siete días (muestras de hígado)	1,90 E+03 18/30
Grupo 1	NR IgG, 0,75 mg 9,68 E+03 30/30
Grupo 2	NR IgG, 0,75 mg 7,91 E+02 25/30
Grupo 3	1,33 E+04 24/24
	2,46 E+03 22/24
	3,43 E+03 19/24
	9,81 E+02 16/24
	3,81 E+02 11/24
	1,36 E+03 13/24
	9,20 E+03 22/24

REIVINDICACIONES

- 5 1. Antígeno de *Enterococcus faecalis* aislado que comprende 2-acetamido-2-desoxi-glucosa, ramnosa, glucosa y 2-acetamido-2-desoxi-galactosa en una razón molar calculada aproximada de 1:2:2:2.
- 10 2. Antígeno según la reivindicación 1, que reacciona con anticuerpos frente a ATCC 202013.
- 15 3. Antígeno según la reivindicación 1 ó 2, que tiene un espectro de RMN tal como se muestra en la figura 1.
- 20 4. Conjugado de antígeno-soporte que comprende un antígeno según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, unido covalentemente a un soporte inmunitario.
- 25 5. Conjugado de antígeno-soporte según la reivindicación 4, en el que dicho soporte inmunitario es toxoide de la difteria o un mutante no tóxico, producido de manera recombinante de exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*.
- 30 6. Composición que consiste esencialmente en un antígeno según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y un soporte estéril, farmacéuticamente aceptable para el mismo.
- 35 7. Composición que consiste esencialmente en un conjugado de antígeno-soporte inmunitario según la reivindicación 4 ó 5 y un soporte estéril, farmacéuticamente aceptable para el mismo.
- 40 8. Composición según la reivindicación 6 ó 7, que comprende un antígeno de *E. faecium* adicional.
- 45 9. Composición según la reivindicación 8, en la que cada uno de dichos antígenos se conjuga a un soporte inmunitario.
- 50 10. Composición según la reivindicación 9, en la que cada uno de dichos antígenos se conjuga a el mismo soporte inmunitario.
- 55 11. Composición según la reivindicación 10, en la que dicho soporte inmunitario es un mutante no tóxico, producido de manera recombinante de exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*.
- 60 12. Antígeno según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para su uso como medicamento.
- 65 13. Conjugado de antígeno-soporte según la reivindicación 4 ó 5 para su uso como medicamento.
- 70 14. Uso de un antígeno según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para la preparación de un agente inmunoterapéutico para el tratamiento de la infección por *Enterococcus*.
- 75 15. Uso de un conjugado de antígeno-soporte según la reivindicación 4 ó 5 para la preparación de un agente inmunoterapéutico para el tratamiento de la infección por *Enterococcus*.
- 80 16. Ensayo de diagnóstico para detectar la presencia de anticuerpo anti-*Enterococcus* en una muestra, que comprende las etapas de:
mezclar un antígeno de *Enterococcus* según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 con una muestra sospechosa de contener anticuerpo específico de *Enterococcus*; y
monitorizar dicha mezcla para la unión entre dicho antígeno y anticuerpo específico de *Enterococcus* en dicha muestra.
- 85 17. Ensayo de diagnóstico según la reivindicación 16, en el que dicho antígeno se inmoviliza sobre una matriz sólida.
- 90 18. Kit para detectar la presencia de anticuerpo anti-*Enterococcus* en una muestra, que comprende:
un antígeno de *Enterococcus* aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, estando marcado el antígeno con un marcador de radioisótopo o un marcador enzimático; e
instrucciones para llevar a cabo un ensayo de diagnóstico que comprende las etapas de mezclar el antígeno de *Enterococcus* con una muestra sospechosa de contener anticuerpo específico de *Enterococcus* y monitorizar la mezcla para la unión entre el antígeno y el anticuerpo específico de *Enterococcus* en la muestra.
- 95 19. Inmunoglobulina que contiene anticuerpos dirigidos contra un antígeno de *Enterococcus* según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, habiéndose preparado dicha inmunoglobulina mediante un procedimiento que incluye inmunizar un animal con dicho antígeno.

ES 2 308 818 T3

20. Inmunoglobulina que contiene anticuerpos dirigidos contra un conjugado de antígeno de *Enterococcus*-soporte según la reivindicación 4 ó 5, habiéndose preparado dicha inmunoglobulina mediante un procedimiento que incluye inmunizar un animal con dicho conjugado de antígeno-soporte.
- 5 21. Anticuerpo frente a un antígeno de *Enterococcus* según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, habiéndose preparado dicho anticuerpo mediante un procedimiento que incluye inmunizar un animal con dicho antígeno.
- 10 22. Anticuerpo frente a un conjugado de antígeno de *Enterococcus*-soporte según la reivindicación 4 ó 5, habiéndose preparado dicho anticuerpo mediante un procedimiento que incluye inmunizar un animal con dicho conjugado de antígeno-soporte.
- 15 23. Anticuerpo según la reivindicación 21, siendo dicho anticuerpo un anticuerpo monoclonal.
24. Anticuerpo según la reivindicación 22, siendo dicho anticuerpo un anticuerpo monoclonal.

15

20

25

30

35

40

45

50

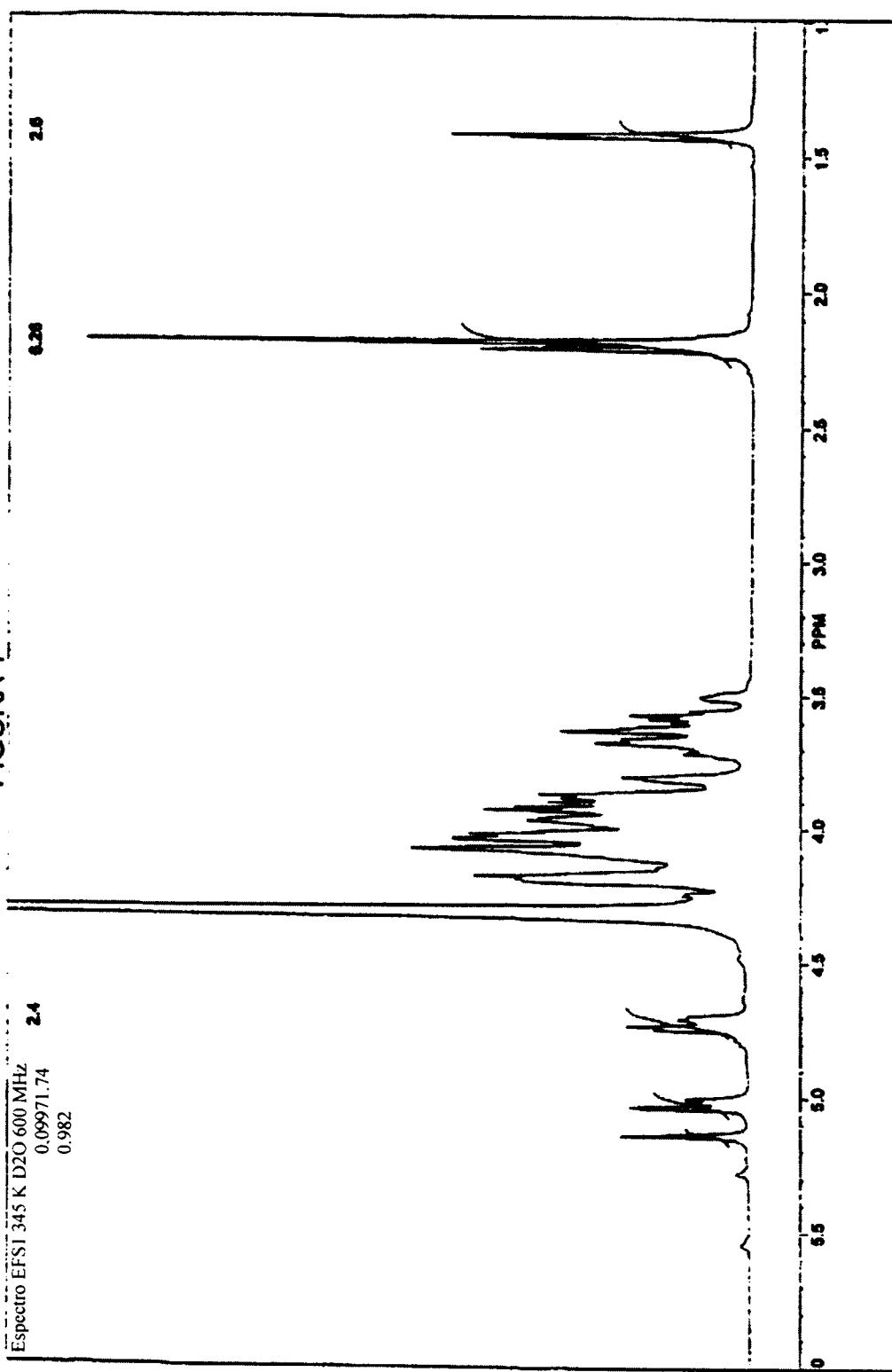
55

60

65

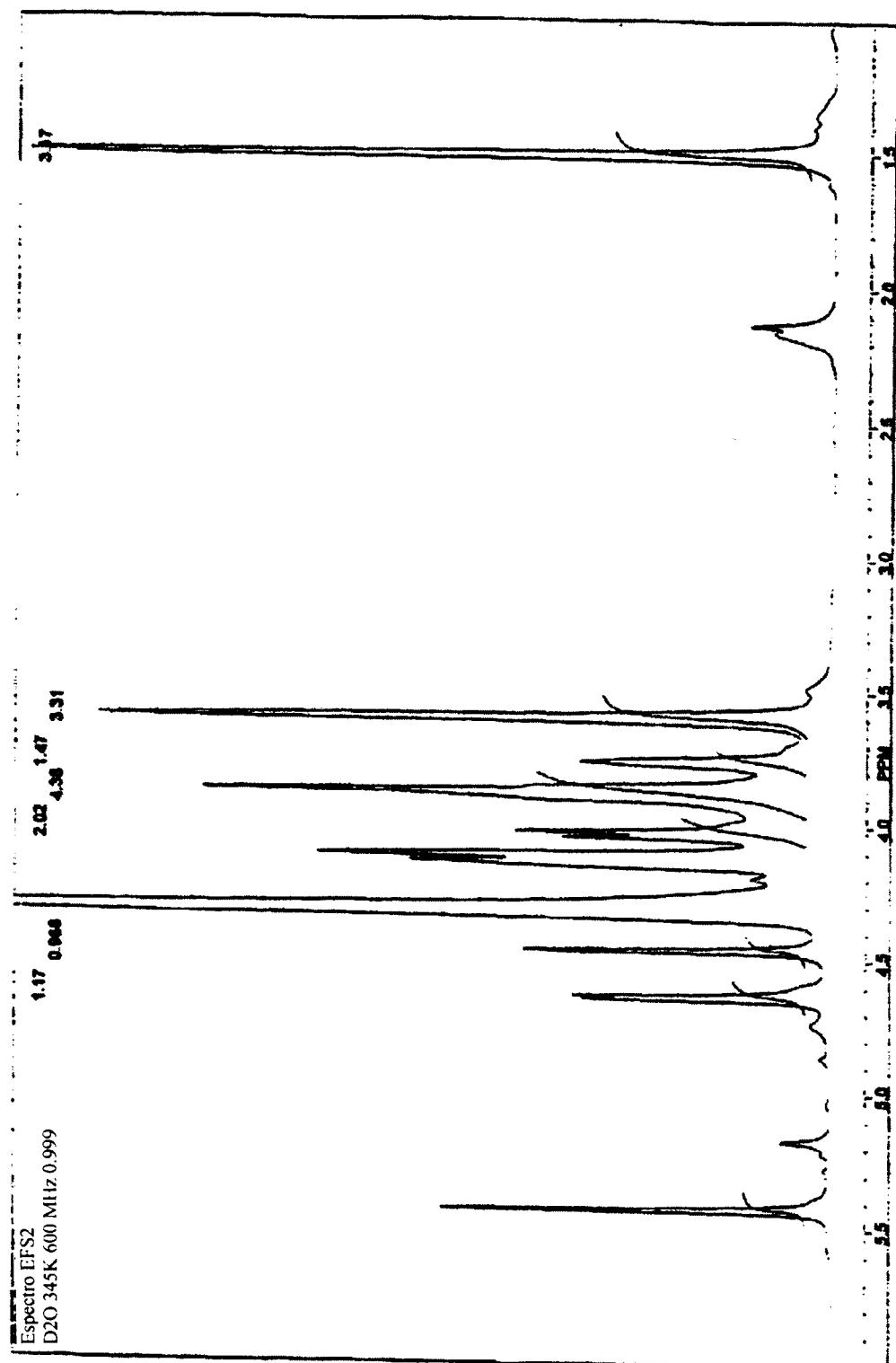
ES 2 308 818 T3

FIGURA 1



ES 2 308 818 T3

FIGURA 2



ES 2 308 818 T3

