

(11) Número de Publicação: **PT 1028749 E**

(51) Classificação Internacional:  
**A61K 39/09** (2007.10)

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **1998.10.14**

(30) Prioridade(s): **1997.10.14 US 949757**

(43) Data de publicação do pedido: **2000.08.23**

(45) Data e BPI da concessão: **2008.06.04**  
**173/2008**

(73) Titular(es):

**NABI BIOPHARMACEUTICALS**  
**12276 WILKINS AVENUE ROCKVILLE, MD 20852**  
**US**

(72) Inventor(es):

**ALI IBRAHIM FATTOM** **US**  
**RAMESH K. SOOD** **US**  
**SARA E. STRADLEY** **US**

(74) Mandatário:

**MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA**  
**AV LIBERDADE, Nº. 69 1250-148 LISBOA** **PT**

(54) Epígrafe: **ANTIGÉNIOS E VACINAS DE ENTEROCOCCUS**

(57) Resumo:

**RESUMO****"ANTIGÉNIOS E VACINAS DE ENTEROCOCCUS"**

A maior parte de isolados clínicos de *E. faecalis* e *E. faecium* enquadram-se em dois grupos e três grupos, respectivamente. Antigénios distintos são associados a cada um dos cinco grupos. Os antigénios de *Enterococcus* podem ser prontamente obtidos a partir de estirpes de *E. faecalis* e *E. faecium* e podem induzir a produção de anticorpos protectores. Em conformidade, os antigénios são úteis para vacinas que protegem contra infecção por isolados de *Enterococcus* (patogénicos) clinicamente significativos. Os antigénios e os anticorpos gerados contra os antigénios são também úteis em ensaios diagnósticos.

## **DESCRIÇÃO**

### **"ANTIGÉNIOS E VACINAS DE ENTEROCOCCUS"**

#### **ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

A presente invenção relaciona-se com antigénios de *Enterococcus* que são úteis como vacinas, e com métodos para a obtenção e utilização de tais antigénios.

A prevalência de infecção por *Enterococcus* está a aumentar de forma constante. Estirpes de *Enterococcus* são agora responsáveis por 12% de todas as infecções nosocomiais entre doentes hospitalizados e são o segundo organismo mais comum isolado de doentes com infecções nosocomiais. Esta prevalência aumentada de *Enterococcus* é devida, pelo menos em parte, ao aparecimento de estirpes de enterococci que são resistentes a agentes antimicrobianos e, portanto, difíceis de tratar com os antibióticos actualmente disponíveis. O aumento na resistência a antibiótico entre *Enterococcus* tem aumentado a importância de abordagens profiláticas e terapêuticas alternativas contra as infecções causadas por enterococci.

Vários grupos descreveram polissacáridos isolados de *Enterococcus*. Por exemplo, os ácidos lipoteicóicos que contêm uma estrutura de base de poligliceronofosfato 1,3-ligado foram isolados de "*S. faecalis*" que, de acordo com a classificação

actual, é *E. faecalis*. A posição 2 é glicosilada com dissacáridos ou trissacáridos de resíduos de glicosil que podem ser esterificados com resíduos de alanil e é denominado ácido teicóico intracelular por causa da sua predominância entre a parede da célula e a membrana protoplasmática. Wicken et al., *J. Gen. Microbiol.* 33: 231-39 (1963).

Pazur et al., *J. Biol. Chem.* 246: 1793-98 (1971), isolaram dois outros polissacáridos da parede celular da estripe N de *E. faecalis*. Um destes polissacáridos é caracterizado como um di-heteroglicano consistindo em glucose e D-galactose, enquanto diz-se que o outro polissacárido é um tetra-heteroglicano de 2-acetamida-2-deoxi-galactose, galactose, ramnose, e glucose numa proporção molar de 1:1:2:4.

Bleiweis et al., *J. Bacteriol.* 94: 1381-87 (1967), isolaram um terceiro polissacárido da estripe D76 do grupo D Streptococci. A composição de açúcar deste material inclui glucose, glucosamina, galactosamina, ramnose, ribitol e fósforo; a informação estrutural, no entanto, não é fornecida. Pressupõe-se que este material possa ser fosfato de ribitol ácido teicóico com substituintes de açúcar ligados. Supõe-se também que a glucose e a N-acetil glucosamina sejam os possíveis componentes do sítio antigénico.

O(s) antigénio(s) de *Enterococcus* capazes de provocar anticorpos protectores proporcionariam um meio eficaz de prevenir e/ou tratar a infecção causada por *Enterococcus*.

Embora a técnica descreva uma variedade de antigénios, nem todo antigénio é eficaz como uma vacina. De facto, nenhum do material relatado na literatura demonstrou ser eficaz na protecção contra a infecção causada por *Enterococcus*. Neste sentido, mesmo uma descrição que um antigénio é imunogénico, isto é, que provoca a produção de anticorpos, proporciona uma base insuficiente para a conclusão de que os anticorpos sejam protectores e que, assim sendo, o antigénio é útil numa vacina.

Finalmente, a técnica sugere que serologicamente, o *Enterococcus* é um género muito diversificado. Esta diversificação serológica sugeriu que uma vacina compreendida de número prático de componentes activos não era viável. Maekawa et al., *Microbiol. Immunol.* 36: 671-681 (1992).

### **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

É, portanto, um objectivo da presente invenção proporcionar antigénios de *Enterococcus* a partir de *E. faecalis* que sejam capazes de dar inicio à produção de anticorpos protectores.

É um outro objectivo proporcionar uma vacina que contenha antigénios de *Enterococcus*, mais particularmente uma vacina que contenha antigénios tanto de *E. faecalis* como *E. faecium*.

É um outro objectivo proporcionar uma composição de

globulina hiperimune que contenha anticorpos dirigidos contra os抗igénios de *Enterococcus* de *E. faecalis*.

De acordo com estes e outros objectivos da invenção, é proporcionado um抗igénio de *Enterococcus* isolado que reage com anticorpos contra células de ATCC 202013. Mais particularmente, um抗igénio de *Enterococcus faecalis* isolado compreende 2-acetamido-2-deoxi-glucose, ramnose, glucose e 2-acetamido-2-deoxi-galactose numa proporção molar aproximada de 1:2:2:2.

O抗igénio pode ser utilizado em ensaios diagnósticos ou em métodos de imunoterapêutica. É proporcionado um conjugado em que o抗igénio é ligado de forma covalente a um imuno-transportador, preferencialmente uma estirpe mutante, não-tóxica, produzida de forma recombinante, de exotoxina A de *Pseudomonas Aeruginosa* ou toxóide diftérico. Os conjugados transportadores de抗igénio são úteis numa vacina, particularmente uma vacina multivalente para imunoterapêutica activa. O抗igénio ou vacina também pode ser utilizado para produzir imunoglobulina para imunoterapêutica passiva, ou na produção de anticorpos monoclonais para utilização em diagnóstico ou terapêutica.

Outros objectos, características e vantagens da presente invenção tornar-se-ão evidentes a partir da seguinte descrição pormenorizada. Deve ser entendido, no entanto, que a descrição pormenorizada e os exemplos específicos, enquanto indicam formas de realização preferidas da invenção, são dados a pena a título de ilustração, uma vez que várias

alterações e modificações dentro do espírito e âmbito da invenção tornar-se-ão evidentes aos especialistas na técnica a partir desta descrição pormenorizada.

#### **BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS**

A Figura 1, 2 e 3 são espectros de RMN para抗igénios de *Enterococcus*.

#### **DESCRIÇÃO DE FORMAS DE REALIZAÇÃO PREFERIDAS**

Verificou-se, surpreendentemente, que a maior parte dos isolados clínicos de *E. faecalis* se enquadra em dois grupos, e que a maior parte dos isolados clínicos humanos de *E. faecium* se enquadra em três grupos. A verificação de que a maior parte dos isolados clínicos é caracterizada por apenas uns poucos抗igénios comuns é desconhecida na técnica e permite o desenvolvimento de vacinas multivalentes que compreendem um número mínimo de componentes activos e ainda assim são protectoras contra a maior parte dos isolados clínicos.

Os抗igénios característicos de cada um dos dois grupos de *E. faecalis* e dos três grupos de *E. faecium* podem ser extraídos, purificados e identificados. Neste sentido, um抗igénio é característico de um grupo ou estirpe de bactérias se o mesmo é expresso pelas bactérias numa quantidade suficiente para provocar uma resposta imunológica.

quando uma vacina de célula inteira do grupo ou da estirpe é injectada num animal, isto é, um animal produz anticorpos protectores quando assim injectado.

Os antigénios característicos de *E. faecalis* são aqui indicados como EFS1 e EFS2 e os antigénios característicos de *E. faecium* como EFM3, EFM4 e EFM5. Estes antigénios são aqui referidos, colectivamente, como "antigénios de *Enterococcus*". Uma estirpe de bactérias é chamada uma estirpe EFS1 se uma vacina de célula inteira da estirpe produz uma resposta imunológica significativa primariamente para EFS1 quando injectada num indivíduo e apenas uma resposta menor a EFS2. De modo semelhante, uma estirpe de bactérias é chamada uma estirpe EEFS2 se uma vacina de célula inteira da estirpe produz uma resposta imunológica significativa primariamente para EFS2 quando injectada num indivíduo, e assim por diante.

Enquanto cada um dos grupos clínicos principais de *E. faecalis* expressa um antigénio característico diferente que pode ser prontamente extraído e purificado em quantidade recuperável, os grupos também podem expressar características de antigénio de outro(s) grupo(s) em quantidades menores. No entanto, quando imunizados com células inteiras de um dos grupos, os coelhos desenvolvem uma resposta imunológica significativa apenas para o antigénio característico daquele grupo e nada ou apenas muito pouco para as quantidades menores do antigénio mais característico do(s) outro(s) grupo(s), conforme demonstrado pela ausência de uma banda de precipitina entre os anticorpos dos coelhos imunizados e o antigénio purificado característico do outro grupo.

O grau em que um antigénio não-característico é expresso por células varia. Por exemplo, o anti-soro gerado contra a vacina de célula inteira de uma estirpe EFS1 contém anticorpos para EFS2 em quantidades detectáveis tanto por ensaio de aglutinação em lâmina como por opsonofagocitose (*infra*). O anti-soro gerado contra uma vacina de célula inteira de uma estirpe EFS2, por outro lado, não contém anticorpos que se precipitam com EFS1.

Os antigénios de *Enterococcus* são prontamente obtidos a partir de estirpes de *E. faecalis* e *E. Faecium*, de acordo com protocolos aqui proporcionados e são capazes de dar inicio à produção de anticorpos protectores quando conjugados com imuno-transportadores. Deste modo, os mesmos podem ser utilizados para preparar vacinas que proporcionam a protecção de seres humanos e outros animais, por exemplo, cavalos, bovinos, suíños, cães e gatos contra infecção por isolados clinicamente significativos de *Enterococci*. Neste sentido, um isolado "clinicamente significativo" é um que é patogénico em seres humanos e outros mamíferos. Os isolados clínicos de *E. faecalis* e *E. faecium* podem ser agrupados por experiências de aglutinação em lâmina, utilizando uma preparação de anticorpo apropriada para a aglutinação das bactérias. As experiências de aglutinação em lâmina com *E. faecalis* demonstram que a maior parte dos isolados clínicos se enquadra em dois grupos, EFS1 e EFS2. O anti-soro gerado contra uma estirpe EFS1 de *E. faecalis* aglutina tanto estirpes de EFS1 como de EFS2 de *E. faecalis*. A reactividade do anti-soro gerado contra uma estirpe EFS1 de *E. faecalis* pode ser absorvida com células da

estirpe EFS1. O soro absorvido pode, então, continuar a aglutinar apenas uma estirpe EFS2.

O anti-soro gerado contra uma estirpe EFS2 de *E. faecalis* aglutina apenas estirpes EFS2 e esta reactividade não pode ser absorvida com bactérias EFS1. Como esperado, a absorção com células de uma estirpe EFS2 remove a reactividade deste anti-soro com células de uma estirpe EFS2. Embora sem desejar estar ligado por qualquer teoria, presume-se que as estirpes EFS1 e EFS2 de *E. faecalis* contêm o antigénio de EFS2, mas que este antigénio é coberto ou então mascarado por antigénios de EFS1 em células EFS1.

As experiências de aglutinação em lâmina com *E. faecium* demonstram que a maior parte dos isolados clínicos se enquadra em três grupos. O anti-soro produzido contra dois dos grupos dá resultados semelhantes daqueles obtidos com *E. faecalis*. Isto é, o anti-soro gerado contra uma estirpe EFM3 de *E. faecium* aglutina tanto as bactérias EFM3 como EFM5 e a reactividade deste anti-soro com uma estirpe EFM3 pode ser absorvida com células de uma estirpe EFM3. O soro absorvido, então aglutina apenas estirpes de bactérias EFM5. Esta absorção também provoca uma redução em reactividade com células de estirpes EFM5, indicando que pequenas quantidades de antigénio de EFM5 é exposto sobre a superfície das células EFM3.

O anti-soro gerado contra uma estirpe EFM5 de *E. faecium* aglutina apenas isolados naquele grupo e esta reactividade não pode ser prontamente absorvida com células

de uma estirpe EFM3. Como esperado, a absorção com células de um estirpe EFM5 reduz a reactividade deste anti-soro com células. De modo semelhante, as estirpes EFM3 e EFM5 de *E. faecium* ambas contêm antigénio de EFM5. Uma vez mais, supõe-se que este antigénio seja coberto ou, então, mascarado, por antigénio de EFM3 em células EFM3.

O anti-soro produzido contra a estirpe EFM4 de *E. faecium* é específico apenas para células das estirpes EFM4 em experiências de aglutinação em lâmina. Este anti-soro não demonstra reactividade cruzada com as bactérias EFM3 e EFM5.

Os anticorpos gerados contra a vacina de célula inteira, de um modo geral, não são dirigidos para as proteínas na superfície da célula, conforme demonstrado por tratamento de células mortas com formalina com pronase E. Quando as células mortas são incubadas durante 3 horas a 37 °C com 500 µg/mL de pronase E e depois testadas em aglutinação em lâmina contra o soro de célula inteira, não há diferença no padrão de aglutinação daquele observado com *E. faecium* ou *E. faecalis* não tratados, isto é, o tratamento com pronase não remove o antigénio da superfície contra o qual os anticorpos são dirigidos.

Representantes de cada uma das duas estirpes de *E. faecalis* e três de *E. faecium* foram depositados, de acordo com o Tratado de Budapeste, na American Type Collection e receberam os Números de Acesso 202013 (*E. faecalis* EFS1), 202014 (*E. faecalis* EFS2), 202015 (*E. faecium* EFM3), 202016 (*E. faecium* EFM4) e 202017 (*E. faecium* EFM5),

respectivamente. O antigénio de acordo com a invenção pode ser isolado a partir das estirpes depositadas ou as estirpes depositadas podem ser utilizadas para identificar outras estirpes que expressam o antigénio de acordo com a invenção, das quais o antigénio pode ser extraído e purificado de acordo com os protocolos aqui descritos.

Os antigénios de *Enterococcus* de acordo com a invenção podem ser obtidos numa quantidade recuperável e numa forma substancialmente pura a partir dos seus respectivos isolados de *E. faecalis* e *E. faecium* cultivados de acordo com os protocolos aqui descritos. Uma quantidade "recuperável" neste sentido significa que a quantidade isolada do antigénio é detectável por meio de uma metodologia menos sensível do que radiomarcação, tal como imunoensaio, e pode ser submetida a manipulações adicionais envolvendo a transferência do antigénio *per se* para a solução.

Numa abordagem ilustrativa para obter o antigénio de acordo com a presente invenção, uma estirpe de *E. faecalis* ou *E. faecium* é primeiro crescida numa placa sangue-agar e, depois, transferida para um frasco de arranque de 2% de NaCL/Columbia. Um digestor de 80 litros que contém o mesmo meio com 4% de glucose adicionada é inoculado com o frasco de arranque. As células são fermentadas durante 16-24 horas. As células foram centrifugadas para separar as células do sobrenadante. Cada um dos cinco antigénios pode ser extraído tanto da pasta de células como do sobrenadante.

Quando se utiliza a pasta celular, o antigénio é extraído agitando a pasta com de 10% ácido tricloroacético (TCA) frio e, depois, precipitado da solução de TCA por uma ou mais precipitações sequenciais com etanol/CaCl<sub>2</sub> frio. Quando se utiliza o sobrenadante, o sobrenadante é directamente submetido a precipitação com etanol/CaCl<sub>2</sub> frio. Isto produz um extracto de antigénio em bruto.

O extracto em bruto é de novo dissolvido em água, dialisado e liofilizado. O material liofilizado é dissolvido em tampão e purificado por cromatografia de permuta iônica. Fracções contendo o antigénio podem ser agrupadas, dialisadas, concentradas e liofilizadas e é utilizada a cromatografia de exclusão por tamanho para purificar adicionalmente o antigénio por tamanho numa coluna adequada. As fracções contendo o antigénio são agrupadas, concentradas, dialisadas e liofilizadas. O antigénio purificado é analisado por espectroscopia de RMN de <sup>1</sup>H.

A composição do antigénio de *Enterococcus* de acordo com a presente invenção "consiste essencialmente em" antigénio(s) ou um conjugado de antigénio(s), o que significa que a composição não contém qualquer material que interfira com a evocação de uma resposta imunológica ao(s) antigénio(s) quando a composição é utilizada num contexto terapêutico ou com a característica de acoplamento antigénio-anticorpo de um ensaio diagnóstico. Numa forma de realização preferida, a composição contém tanto o antigénio *E. faecalis* como o *E. faecium*.

Os antigénios de acordo com a invenção são úteis na produção de ensaios diagnósticos para detectar a presença de antigénios de *Enterococcus* e/ou anticorpos anti-*Enterococcus* numa amostra. Tanto o antigénio de *Enterococcus* como o anticorpo específico para o antigénio de *Enterococcus* é misturado com uma amostra que se suspeite conter anticorpos ou antigénios *Enterococcus* e depois monitorada para verificação da ligação antigénio-anticorpo. O antigénio ou o anticorpo são marcados com um marcador radioactivo ou enzimático. Numa forma de realização preferida, o antigénio ou anticorpo é imobilizado sobre uma matriz sólida, de tal modo que o antigénio ou anticorpo fique acessível ao anticorpo ou ao antigénio complementar em contacto com a superfície da matriz. A amostra é, então, posta em contacto com a superfície da matriz e a superfície é monitorada para verificação da ligação antigénio-anticorpo.

Por exemplo, o antigénio ou anticorpo pode ser utilizado num ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), no qual o antigénio ou anticorpo é ligado a uma fase sólida e um conjugado enzima-anticorpo ou enzima-antigénio é utilizado para detectar e/ou quantificar o anticorpo ou antigénio presente numa amostra. Alternativamente, pode ser utilizado um ensaio de imunotransferência Western (Western blot) no qual os antigénios solubilizados e separados são ligados a papel de nitrocelulose. O anticorpo é, então, detectado por uma enzima ou anti-imunoglobulina (Ig) conjugada com marcador, tal como o conjugado de peroxidase do rábano silvestre-Ig incubando o papel de filtro na presença de um precipitado ou substrato detectável. Os ensaios Western blot

têm a vantagem de não exigir uma pureza superior a 50% para o antigénio desejado. Descrições de técnicas de ELISA e Western blot são encontradas nos Capítulos 10 e 11 de Ausubel, *et al.* (eds), CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley and Sons (1988), cujo teor aqui é dado como incorporado por citação.

Num contexto de vacina, é preferível conjugar o(s) antigénio(s) a um imuno-transportador, em geral um polipéptido ou proteína, a fim de melhorar a interacção entre as células T e B para a indução de uma resposta imunológica contra o antigénio. Isto é particularmente importante para as vacinas destinadas a serem utilizadas em doentes com resistência reduzida. Um imuno-transportador intensifica a imunogenicidade tanto para a imunização activa como para preparar o anti-soro de alta titulação em voluntários para a imunização passiva. Os imuno-transportadores adequados de acordo com a presente invenção incluem toxóide tetânico, toxóide diftérico, Exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* ou seus derivados, estirpes mutantes não-tóxicas, produzidas de forma recombinante, de exotoxina A, conforme descrito, por exemplo em Fattom *et al.*, *Inf. And Imm.* 61: 1023-32 (1993), bem como outras proteínas em geral utilizadas como imuno-transportadoras.

A fim de conjugar o antigénio a um transtransportador, o antigénio é, primeiro, derivatizado. Vários métodos podem ser utilizados para derivatizar um antigénio e o ligar de forma covalente a um imuno-transportador. Num método preferido, os grupos hidroxilo no antigénio são activados

utilizando tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino-piridínio e o antigénio é, então, derivatizado com uma dihidrazida do ácido adípico (ADH) espaçador bifuncional de seis carbonos de acordo com processos conhecidos na técnica, de acordo com o método de Kohn *et al.*, *FEBS Lett.* 154: 209:210 (1993). Este material é, então, ligado a toxóide diftérico (DT) Exoproteína A recombinante de *Pseudomonas aeruginosa* (rEPA), toxóide tetânico (TT) ou outra proteína transportadora adequada por 1-etyl-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC). Os conjugados resultantes podem ser separados do antigénio não-reagido por meio de cromatografia de exclusão por tamanho.

Preferencialmente, o conjugado de antigénio é administrado com um adjuvante que promove os anticorpos protectores IgG subtipo 2. Os adjuvantes típicos incluem o adjuvante completo de Freund (CFA), adjuvante incompleto de Freund (IFA), alúmen e outros adjuvantes adequados para utilização por seres humanos e animais. O sulfato de dextrano demonstrou ser um estimulante potente do anticorpo IgG<sub>2</sub> contra antigénios na superfície de células de *staphylococci* e também é adequado como adjuvante.

A indução de bacteremia em alguns mamíferos, por exemplo, animais de laboratório, exige números extremamente altos de organismos ou alguma táctica prévia para diminuir a resistência. A fagocitose *in vitro*, no entanto, pode ser estudada como um correlato de imunidade protectora *in vivo* para seres humanos e outros mamíferos. Neste modelo, a capacidade dos anticorpos monoclonais e policlonais

específicos para o抗igénio em opsonizar as estirpes de *Enterococcus* *in vivo* é medida pela fagositose, de acordo com o método descrito por Kojima *et al.*, *Infect. Dis. Immun.* 58: 2367-74 (1990). Os ensaios de opsonofagocitose *in vitro* são reconhecidos no campo como sendo preditivos de eficácia como vacina. Por exemplo, Fischer *et al.*, descreve uma correlação entre anticorpo funcional determinado com um ensaio opsónico *in vitro* e a actividade *in vivo*. *J. Inf. Dis.* 169: 324-9 (1994).

Os anticorpos induzidos pelos抗igénios de *Enterococcus* de acordo com a invenção são opsónicos e facilitam a fagocitose específica do tipo. Os anticorpos de coelho produzidos contra os抗igénios de *Enterococcus* são capazes de especificamente mediar a opsonofagocitose das estirpes que transportam os抗igénios por células de leucócitos polimorfonucleares humanas (PMN) na presença de complemento humano. Os ensaios de fagocitose *in vitro*, deste modo, indicam que os anticorpos para os抗igénios de *Enterococcus* são protectores contra infecção causada por *E. faecalis* e *E. faecium*. Uma vacina com base numa combinação de抗igénios de *E. faecalis* e *E. faecium* pode ser utilizada contra infecção da maior parte das estirpes clínicas de *Enterococcus*.

Os resultados *in vivo* são consistentes com os resultados dos ensaios de opsonofagocitose *in vitro*. Os anticorpos para o conjugado EFS1 reduziram a bacteremia em murganhos desafiados com *E. faecalis*.

A presente invenção também se relaciona com a utilização dos(s) antigénio(s) de *Enterococcus* para produzir anticorpos policlonais ou anticorpos monoclonais (de murganho e humano) que se ligam ou neutralizam o *Enterococcus*. Os protocolos ilustrativos para produzir estes anticorpos estão descritos no Capítulo 11 de MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory (Cold Spring Harbor, NY); em METHODS OF HYBRIDOMA FORMATION 257-271, Humana Press (Clifton, NJ); em Vitetta *et al.*, *Immunol. Rev.* 62: 159-83 (1982); e em Raso, *Immunol. Rev.* 62: 93-117 (1982).

Tipicamente, o inóculo para a produção de anticorpo policlonal é preparado dispersando o antigénio-imuno-transportador num diluente fisiologicamente tolerável, tal como soro fisiológico, para formar uma composição aquosa. Uma quantidade imunoestimuladora de inóculo, com ou sem adjuvante, é administrada a um mamífero e o mamífero inoculado, depois, é mantido durante um período de tempo suficiente para o antigénio induzir os anticorpos protectores do antigénio anti-*Enterococcus*. Doses de reforço do antigénio-imuno-transportador podem ser utilizadas em indivíduos que ainda não estão sensibilizados para responder ao antigénio.

Os anticorpos podem incluir preparações de anticorpos de uma variedade de animais habitualmente utilizados, tais como cabras, primatas, burros, suíños, coelhos, cavalos, galinhas, porquinhos-da-índia, ratos e murganhos e mesmo anticorpos humanos depois de selecção, fraccionamento e purificação apropriadas. O anti-soro animal também pode ser

produzido inoculando os animais com estirpes mortas por formalina de *E. faecalis* por meio de métodos convencionais, sangrando os animais e recuperando o soro ou plasma para processamento adicional.

Os anticorpos induzidos desta maneira podem ser colhidos e isolados até o ponto desejado por meio de técnicas bem conhecidas, tais como fraccionamento em álcool e cromatografia em coluna ou por cromatografia de imunoafinidade; isto é, ligando o antigénio a um empacotamento de coluna cromatográfica como Sephadex™, passando o anti-soro pela coluna, deste modo retendo os anticorpos específicos e separando outras imunoglobulinas (IgGs) e contaminantes e, depois, recuperando os anticorpos purificados por eluição com um agente caotrópico, opcionalmente seguido por purificação adicional, por exemplo, pela passagem por uma coluna de antigénios de grupo sanguíneo ligado ou outras espécies não-patogénicas. Este procedimento pode ser preferido quando são isolados os anticorpos desejados do soro ou plasma de seres humanos que desenvolveram uma titulação de anticorpo contra o patogénio em questão, deste modo assegurando a retenção de anticorpos que são capazes de se ligaram ao antigénio. Estes podem, então, ser utilizados em preparações para imunização passiva contra estirpes de *E. faecalis*.

Uma composição de anticorpos monoclonais contém, dentro de limites detectáveis, apenas uma espécie de sítio de combinação de anticorpo capaz de eficazmente ligar-se ao antigénio de *Enterococcus*. Anticorpos adequados na forma

monoclonal podem ser preparados utilizando a tecnologia de hibridoma convencional.

Para formar hibridomas dos quais uma composição de anticorpo monoclonal da presente invenção é produzida, um mieloma ou outra linha celular que se auto-perpetua é fundida com linfócitos obtidos do sangue periférico, nódulos linfáticos ou do baço de um mamífero hiperimunizado com o抗igénio *Enterococcus*. É preferido que a linha celular de mieloma seja da mesma espécie que os linfócitos. Os esplenócitos são tipicamente fundidos com células de mieloma utilizando polietileno glicol 1500. Os híbridos fundidos são seleccionados pela sua sensibilidade a HAT. Os hibridomas que segregam as moléculas de anticorpo desta invenção podem ser identificados utilizando um ensaio ELISA.

Um baço de murganho Balb/C, sangue periférico humano, nódulos linfáticos ou esplenócitos são os materiais preferidos para a utilização na preparação de hibridomas murinos ou humanos. Os mielomas de murganho adequados para utilização na presente invenção incluem as linhas celulares sensíveis a hipoxantina aminopterina e timidina (HAT) um mieloma preferido sendo P3X63-Ag8.653. O parceiro de fusão preferido para a produção de anticorpo monoclonal humano é SHM-D33, um heteromieloma disponível de ATCC, Rockville, Md. sob a designação de CRL 1668.

Uma composição de anticorpo monoclonal da presente invenção pode ser produzida por iniciação de uma cultura de hibridoma monoclonal compreendendo um meio nutritivo contendo

um hibridoma que segregá moléculas de anticorpo da especificidade apropriada. A cultura é mantida em condições e durante um período de tempo suficiente para o hibridoma segregar as moléculas de anticorpo no meio. O meio contendo o anticorpo é, então, colhido. As moléculas de anticorpo, então, podem ser isoladas adicionalmente por meio de técnicas bem conhecidas.

Os meios úteis para a preparação destas composições são bem conhecidos e também disponíveis comercialmente e incluem meios de cultura sintéticos, murganhos consanguíneos e outros. Um meio sintético exemplificativo é o meio essencial Mínimo da Dulbecco suplementado com 20% de soro fetal bovino. Uma estirpe de murganho consanguíneo exemplificativo é o Balb/c.

Outros métodos para preparar as composições de anticorpos monoclonais são também levados em consideração, tais como as fusões entre-espécies, uma vez que é principalmente a especificidade do抗énio dos anticorpos que afecta a sua utilidade na presente invenção. Os linfócitos humanos obtidos de indivíduos infectados podem ser fundidos com uma linha de célula de mieloma humano para produzir hibridomas que podem ser rastreados para a produção de anticorpos que reconhecem o抗énio de *Enterococcus*. Mais preferível neste sentido, no entanto, é um processo que não implica na utilização de uma amostra biológica de um indivíduo humano infectado. Por exemplo, um indivíduo imunizado com uma vacina, conforme aqui descrito, pode servir como uma fonte para os anticorpos utilizados de forma

adequada numa composição de anticorpos na presente invenção. Os anticorpos monoclonais purificados podem ser caracterizados por ensaios de aglutinação bacteriana utilizando uma colecção de isolados clínicos ou por meio de ensaio ELISA utilizando placas revestidas com o antigénio purificado.

As composições de anticorpos monoclonais e policlonais produzidas de acordo com a presente descrição podem ser utilizadas por imunização passiva para induzir uma resposta imunológica para a prevenção ou o tratamento de infecção por estirpes de *E. faecalis*. Neste sentido, a preparação de anticorpos pode ser uma composição polyclonal. Tal composição polyclonal inclui anticorpos que se ligam ao(s) antigénio(s) de *Enterococcus*. O componente do antícorpo polyclonal pode ser um anti-soro polyclonal, preferencialmente, purificado por afinidade, de um animal que foi desafiado com o(s) antigénio(s) de *Enterococcus*.

Outros métodos são conhecidos na técnica para fazer fragmentos bivalentes que são totalmente heteroespecíficos, por exemplo, a utilização de ligantes bifuncionais para unir fragmentos clivados. São conhecidas moléculas recombinantes que incorporam as cadeias leves e pesadas de um antícorpo. Ver, por exemplo, os produtos de uma metodologia descrita por Boss, et al., Patente U.S. N° 4.816.397. Métodos análogos para produzir moléculas de ligação recombinantes ou sintéticas tendo as características de anticorpos estão incluídas na presente invenção. Mais de dois anticorpos monoespecíficos diferentes ou fragmentos de anticorpos podem

ser ligados utilizando vários ligantes conhecidos na técnica.

Um componente de anticorpo produzido de acordo com a presente invenção pode incluir anticorpos inteiros, fragmentos ou subfragmentos de anticorpos. Os anticorpos podem ser imunoglobulinas inteiras de qualquer classe, por exemplo, IgG, IgM, IgA, IgD, IgE, anticorpos quiméricos ou anticorpos híbridos com especificidades de抗原 ou epítopo duplas ou múltiplas, ou fragmentos, por exemplo,  $F(ab')_2$ ,  $Fab'$ ,  $Fab$  e outros, incluindo fragmentos híbridos, e adicionalmente, inclui qualquer imunoglobulina ou qualquer proteína natural, sintética ou geneticamente modificada que actue como um anticorpo ligando-se a um抗原 específico para formar um complexo. Em particular, as moléculas  $Fab$  podem ser expressas e montadas num hospedeiro geneticamente transformado como *E. coli*. Um sistema de vector lambda é disponível para, deste modo, expressar uma população de  $Fab$  com uma diversidade potencial igual ou excedendo àquela do indivíduo que gera o anticorpo predecessor. Ver Huse, W. D., et al., *Science* 246: 1275-81 (1989).

O(s) conjugado(s) de抗原 de acordo com a presente invenção pode(m) ser o componente activo numa composição, compreendendo ainda um veículo farmaceuticamente aceitável para o componente activo, que pode ser utilizado como uma vacina para induzir uma resposta imunológica celular e/ou a produção *in vivo* de anticorpos que combatem a infecção causada por *Enterococcus*. Neste sentido, um veículo farmaceuticamente aceitável é um material que pode ser utilizado como um veículo para administrar um medicamento

pelo facto do material ser inerte ou, então, medicamente aceitável, bem como compatível com o agente activo, no contexto de administração de uma vacina. Para além de um excipiente adequado, um veículo farmaceuticamente aceitável pode conter aditivos de vacina convencionais como diluentes, adjuvantes, antioxidantes, conservantes e agentes de solubilização.

Em conformidade com a presente invenção, tal vacina pode ser administrada a um indivíduo ainda não infectado com *E. faecalis* ou *E. faecium*, para, deste modo, induzir uma resposta imunológica protectora contra *Enterococcus* (humoral ou celular) naquele indivíduo. Alternativamente, uma vacina de acordo com a presente invenção pode ser administrada a um indivíduo em que a infecção por *E. faecalis* e/ou *E. faecium* já ocorreu mas encontra-se num estágio suficientemente inicial para que a resposta imunológica produzida pela vacina efectivamente iniba a disseminação adicional da infecção.

Por uma outra abordagem, uma vacina da presente invenção pode ser administrada a um indivíduo que, então, actua como uma fonte de imunoglobulina produzida em resposta ao desafio da vacina específica que contém anticorpos dirigidos contra *Enterococcus*. Um indivíduo assim tratado poderia dar plasma do qual a imunoglobulina seria, então, obtida, por meio de metodologia de fraccionamento do plasma, e administrado a outro indivíduo a fim de conferir resistência contra a infecção por *Enterococcus* ou tratar a mesma. As imunoglobulinas de acordo com a invenção são particularmente úteis para indivíduos imunocomprometidos,

para indivíduos a serem submetidos a procedimentos invasivos ou em que o tempo não permite que o indivíduo produza os seus próprios anticorpos em resposta à vacinação.

De modo semelhante, os anticorpos monoclonais ou policlonais anti-*Enterococcus* produzidos de acordo com a invenção podem ser conjugados a uma imunotoxina e administrados a um indivíduo no qual a infecção causada por *Enterococcus* já ocorreu mas ainda não se tornou amplamente disseminada. Com esta finalidade, o material antícorpo produzido em conformidade com a presente descrição seria administrado num veículo farmaceuticamente aceitável, conforme aqui definido.

A presente invenção é ainda descrita por referência aos seguintes exemplos ilustrativos.

Exemplo 1: Fermentação de *E. faecalis* e *E. faecium*

*E. faecalis* e *E. faecium* foram cultivados em caldo Columbia suplementado com 2% de NaCl e 4% de glucose em digestor de 80 litros contendo 60 litros do meio de cultura a 37 °C. A fermentação foi iniciada com um litro de uma cultura de semente de 16 horas de idade. As células foram desenvolvidas com agitação a 200 rpm durante 16-24 horas.

As células a serem utilizadas como vacina para preparar o anti-soro de célula inteira foram fixas em formalina de um dia para o outro à temperatura ambiente. As células para

purificação foram colhidas por centrifugação a 14.500 x g e armazenadas a -70 °C até a utilização. Aproximadamente 500 g, 180 g e 350 g de pasta celular (peso líquido) foram obtidos de um digestor de 80 litros para EFS1, EFS2 e EFN3, respectivamente.

Exemplo 2: Preparação de anti-soro de célula inteira

Células mortas e fixas em formalina de duas estirpes de *E. faecalis* e três estirpes de *E. faecium* cultivadas como no Exemplo 1 foram ajustadas em  $OD_{540nm}=1$  e foram injectadas em coelhos por via intravenosa. Não foram utilizados adjuvantes. Os coelhos receberam 10 injeções e foram sangrados a intervalos semanais depois da última injeção e o soro positivo de célula inteira foi colhido e agrupado. A IgG foi purificada do soro de célula inteira por uma coluna de afinidade da proteína G.

Exemplo 3: Estudos de aglutinação com *E. faecalis* e *E. faecium*

Soros de coelho imune obtidos de coelhos imunizados com as duas estirpes mortas e fixadas em formalina de *E. faecalis* e três estirpes mortas e fixadas em formalina de *E. faecium* foram utilizados para tipificar os isolados de *E. faecalis* e *E. faecium* por aglutinação em lâmina. Os anti-soros foram utilizados para tipificar 67 isolados clínicos de *E. faecalis* e 85 isolados clínicos de *E. faecium*. Sessenta dos 67 isolados de *E. faecalis* (89,5%) reagiram com os anti-soros obtidos por meio da imunização de coelhos com células ATCC

202013. Quarenta e um dos 85 isolados de *E. faecium* reagiram com os anti-soros obtidos por meio da imunização de coelhos com células ATCC 202015.

#### Exemplo 4: Purificação de antigénio

Com base nos resultados registados no Exemplo 3, os antigénios foram isolados de ATCC 202013, ATCC 202014 e ATCC 202015, respectivamente. Os antigénios foram extraídos da pasta celular ou do sobrenadante obtido de acordo com o Exemplo 1.

#### **Purificação do antigénio EFS1**

Este antigénio foi isolado da pasta celular de ATCC 202013. O antigénio foi extraído da superfície da célula por meio de agitação da pasta celular (434 g) com 10% de TCA frio a 4 °C durante um período de 48 horas. Um sobrenadante límpido foi concentrado ao seu volume original de 1/5 por meio de evaporação a pressão reduzida em temperatura inferior a de 40 °C. Um volume igual de etanol 95% foi adicionado a esta solução e a solução foi incubada a 4 °C de um dia para o outro. Uma pequena quantidade de precipitados foi separada do sobrenadante por meio de centrifugação. Outros quatro volumes de etanol foram adicionados ao sobrenadante límpido e uma quantidade suficiente de  $\text{CaCl}_2$  1 M foi adicionada para perfazer uma concentração final de  $\text{CaCl}_2$  10 mM na solução. A mistura foi incubada uma vez mais a 4 °C de um dia para o outro. Os precipitados foram recuperados por meio de centrifugação.

Os precipitados foram de novo dissolvidos numa quantidade mínima de 10% de TCA frio e os passos de precipitação acima de 50% e 80% de etanol foram repetidos para remover mais impurezas. Os precipitados finais recuperados depois do passo de precipitação de 80% de etanol foram dissolvidos em água, dialisados contra água fria destilada e liofilizados. Este material foi eluído sequencialmente com Tris 0,01 M -Tampão HCl contendo NaCl 0,1 e 0,2 M. A fracção de NaCl 0,2 M foi dialisada contra água fria destilada e liofilizada. O material liofilizado foi purificado adicionalmente em coluna de Sephacryl S-300 e eluído com fosfato salino tamponado (PBS) para obter-se 258 mg do抗igénio purificado final.

### **Purificação do抗igénio EFS2**

O抗igénio foi purificado a partir do sobrenadante obtido da fermentação de ATCC 202014. O material em bruto foi obtido do sobrenadante pela precipitação de etanol 25-75% contendo  $\text{CaCl}_2$  10 mM. A fracção obtida da precipitação de etanol 75% foi parcialmente purificada por cromatografia de permuta iónica numa coluna Q-Sepharose. A coluna foi eluída sequencialmente com Tris 0,01 M-Tampão HCl contendo NaCl 0,2 e 0,5 M. A fracção de NaCl 0,5 M foi tratada com protease de um dia para o outro para remover as proteínas contaminantes e subsequentemente purificada adicionalmente por cromatografia de exclusão por tamanho numa coluna Sephacryl S-300. As fracções que reagiram com os anti-soros de célula inteira para ATCC 202014 foram agrupadas e purificadas adicionalmente

por um segundo passo de permuta iônica numa coluna Q-Sepharose. O material foi eluído com um gradiente linear de cloreto de sódio 0,2-0,5 M em Tris-tampão HCl a um pH 7. O mesmo material foi também isolado das células seguindo passos semelhantes depois da libertação deste material da superfície da célula por meio de tratamento químico ou enzimático.

### **Purificação do antigénio EFS3**

O antigénio foi extraído de ATCC 202015 por meio de agitação da pasta celular com 10% de TCA frio a 4 °C durante um período de 48 horas, conforme descrito para EFS1. Um sobrenadante límpido foi obtido por centrifugação. Este sobrenadante foi concentrado ao seu volume original de 1/5 por meio de evaporação a pressão reduzida a uma temperatura inferior a 40 °C. Um volume igual de etanol 95% foi adicionado a esta solução e a solução foi incubada a 4 °C de um dia para o outro. Uma pequena quantidade de precipitados foi separada do sobrenadante por meio de centrifugação. Outros quatro volumes de etanol foram adicionados ao sobrenadante límpido e uma quantidade suficiente de  $\text{CaCl}_2$  1 M foi adicionada para perfazer uma concentração final de  $\text{CaCl}_2$  10 mM na solução. A mistura foi incubada uma vez mais a 4 °C de um dia para o outro. Os precipitados foram recuperados por meio de centrifugação.

Os precipitados foram de novo dissolvidos numa quantidade mínima de 10% de TCA frio e os passos acima de precipitação de 50% e 80% de etanol foram repetidos para remover mais impurezas. Os precipitados finais recuperados

depois do passo de precipitação de etanol 80% foram dissolvidos em Tris 0,01 M-Tampão HCl, pH 7,0 e carregados numa coluna de permuta aniónica Q-Sepharose. A coluna foi eluída pelo tampão acima contendo NaCl 0,1 M. A fracção foi dialisada contra água fria destilada e liofilizada. O material liofilizado foi purificado adicionalmente em coluna de Sephacryl S-300 e eluído com PBS. As fracções contendo抗igénio foram agrupadas, dialisadas contra água fria destilada e liofilizadas.

Exemplo 5: Caracterização do抗igénio

Os抗igénios isolados no Exemplo 4 foram analisados para determinar a sua composição. O EFS1 compreende quantidades importantes de quatro açúcares: 2-acetamido-2-deoxi-glucose, ramnose, glucose e 2-acetamido-2-deoxi-galactose numa proporção molar calculada aproximadamente de 1:2:2:2. Uma análise bioquímica completa do抗igénio é dada na Tabela 1.

Tabela 1. EFS1

Ensaio realizado	Resultado
Fenol-Ácido sulfúrico	25-41%
Fósforo	1,5-2,5%
Ácido nucleico residual	<1%
Proteína residual	<1%
Ácido Urónico	Indetectável
O-acetilo	Indetectável

O material foi também analisado por espectroscopia de RMN de  $H^1$ . Os picos maioritários de campo baixo observados foram em  $\delta$  5,14 (s), 5,03 (s), 5,01 (d,  $J_{1,2} = 7,8$  Hz), 4,78-4,67 (complexo). Na região de campo alto o espectro apresentou ressonâncias em 2,21 e 2,18 devido a grupos N-acetilo e em 1,43 (d,  $J_{5,6} = 6$  Hz) devido ao grupo 6-metilo do açúcar 6-deoxi. Um espectro completo do material está apresentado na Figura 1.

O antigénio EFS2 comprehende uma repetição de trissacárido, conforme determinado por RMN de  $H^1$  (Figura 2). Um dos açúcares é um açúcar 6-deoxi. Os açúcares constituintes não contêm substituintes N- ou O-acetilo. O antigénio deu uma cor positiva no ensaio fenol-ácido sulfúrico, indicando a presença de resíduos de açúcares neutros. O antigénio foi eluído por coluna de permuta aniónica com tampão contendo NaCl >0,20 M e moveu-se na direcção do ânodo em imunolectroforese quantitativa (rocket), o que significa que contém grupos ácidos.

A análise de açúcar do antigénio EFM3 revelou a presença de 2-acetamido-2-deoxi-galactose e galactose como os dois açúcares principais. Uma análise bioquímica completa do antigénio é dada na Tabela 2.

Tabela 2. EFS3

Ensaio realizado	Resultado
Fenol-Ácido sulfúrico	23-39%
Fósforo	1,12-3,6%
Ácido nucleico residual	<1%
Proteína residual	<2%

Ácido Urônico	Indetectável
O-acetilo	Indetectável

O antigénio EFM3 também foi analisado por espectroscopia de RMN de  $H^1$  e o espectro completo está apresentado na Figura 3. As ressonâncias características observadas na região de campo baixo foram em  $\delta$ . 5,01 (s), 4,73 (d,  $J = 7,8$  Hz), 4,6-4,55, (complexo) e 4,52 (d,  $J = 7,8$  Hz). Os protões dos grupos N-acetilo apresentaram ressonância na região de campo alto em  $\delta$ . 2,14, 2,20 e 2,21.

O EFS1 e o EFS2, cada um, reagiu especificamente em capilar com anti-soros obtidos de coelhos imunizados com uma vacina de célula inteira de ATCC 202013 e ATCC 202014, respectivamente. Adicionalmente, o EFS2 reagiu com anti-soros de célula inteira contra ATCC 202013 em capilar, devido à expressão de quantidades mínimas de EFS2 por estirpes EFS1. O EFS1 não reagiu com anti-soros de célula inteira contra ATCC 202014 em capilar, e técnicas mais sensíveis, tais como "dot blot" são necessárias para detectar a presença de anticorpos específicos contra EFS1 em soros de coelho imunizados com EFS2. O antigénio EFM3 reagiu especificamente com soros de coelhos imunizados com células de ATCC 202015. O antigénio EFM3 não têm reacção cruzada com anti-soros específicos obtidos de coelhos imunizados seja com ATCC 202013, seja com ATCC 202014.

Num ensaio *in vitro*, anti-soros de coelho contra ATCC 202013 especificamente depositaram o componente C3b de complemento humano sobre placas revestidas com antigénio

EFM3, e anti-soros de coelhos contra ATCC 202015 especificamente depositaram o componente C3b de complemento humano sobre placas revestidas com antigénio EFM3. Não ocorreu deposição cruzada de C3b.

Exemplo 6: Preparação de conjugados antigénio-imuno-transportador

Uma solução de antigénio em água (10 mg/mL) foi arrefecida num banho de água gelada. Uma solução aquosa fria (100 mg/mL) de tetrafluroborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridina (CDAP) foi adicionada a esta solução, numa quantidade 1,2 vezes o volume da solução do antigénio acima. Um volume de solução de trietil amina aquosa 0,2 M igual ao volume da solução de CDAP adicionada anteriormente foi, então, adicionada, gota a gota. Depois de agitar a mistura num total de 3 minutos a 4 °C, foi adicionado um volume igual de solução de ADH 0,5 M preparada em hidrogénio carbonato de sódio 0,5 M. A solução acima foi agitada a 4 °C de um dia para o outro, dialisada contra água destilada fria e liofilizada para obter o produto final derivatizado. A quantidade de ADH incorporada no antigénio foi determinada por colorimetria por meio de ensaio de ácido trinitobenzeno sulfónico (TNBS).

Quantidades iguais de polissacárido derivatizado por ADH e DT foram dissolvidas em água para obter a concentração final de 5-10 mg/mL de cada componente. Esta solução foi ajustada ao pH 5,6 utilizando ácido clorídrico 0,1 M. A esta solução foi adicionada uma solução preparada de fresco de 1-

etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC) numa quantidade mínima de água, numa quantidade quatro vezes em peso do antigénio. A solução foi agitada vigorosamente à temperatura ambiente e o pH da solução foi mantido em 5,6 utilizando HCl 0,1 M. A reacção foi interrompida depois de 1 hora levando o pH para 7,0 com NaOH 0,1 M. Foi obtido o conjugado puro por meio de cromatografia de exclusão por tamanho em coluna Sephacryl S-100 eluída com PBS. A quantidade de antigénio e de proteína nos conjugados foi determinada por ensaio de ácido fenol sulfúrico e ensaio BCA utilizando o antigénio correspondente ou BSA como padrões, respectivamente.

Exemplo 7: Preparação de anti-soros de conjugados de antigénio-imuno-transportador para *Enterococcus*

Coelhos Nova Zelândia fêmeas, brancos foram imunizados por meio de injecção subcutânea com 50 µg de conjugado de antigénio-imuno-transportador preparado de acordo com o Exemplo 6 nos dias 0, 14 e 28. A primeira injecção foi dada com um volume igual de adjuvante completo de Freund (CFA) e as injecções subsequentes foram dadas com adjuvante incompleto de Freund (IFA). Testes de sangramento tomados dos coelhos foram monitorados para verificação da presença de anticorpos de coelho precipitados específicos para o antigénio com o qual foram imunizados. Injecções adicionais foram dadas conforme necessário para reforçar a titulação.

Os coelhos foram sangrados para obter anti-soro de coelho com alta titulação que continha anticorpos específicos contra o

antigénio com o qual foram imunizados. O anti-soro foi utilizado para avaliar a capacidade dos anticorpos específicos de mediar a opsonofagocitose das bactérias *Enterococcus* correspondentes por células HL-60 nos ensaios *in vitro*.

Os soros obtidos dos coelhos imunizados com o conjugado *E. faecalis* EFS1-DT tinham alta titulação e deram precipitados com EFS1 em capilar. Os anticorpos foram capazes de mediar a morte de células transportadoras de EFS1 por HL 60 na presença de complemento. Os coelhos imunizados com o conjugado antigénio *E. faecalis* EFS1-DT também foram capazes de produzir anticorpos específicos para o antigénio. Estes anticorpos deram precipitados com antigénio de *E. faecium* em capilar.

Exemplo 8: Ensaios de opsonofagositose *in vitro*

As bactérias foram transferidas das pérolas da cultura-mãe para uma nova placa de ágar tioglicolato Todd Hewitt. A placa foi incubada durante 18-20 horas a 37 °C em 5% de CO<sub>2</sub>. As bactérias foram raspadas da placa e suspensas em dois mililitros de solução salina estéril. O tubo foi centrifugado a 2000 rpm durante 10 minutos a 25-35 °C e o sobrenadante foi removido. A bactéria granulada foi de novo suspensa em dois mililitros de solução salina estéril e utilizada para preparar uma suspensão de bactérias de uma densidade óptica de 0,1 a 540 nm.

Uma amostra diluída numa proporção de 1:100 preparada a partir da suspensão bacteriana acima descrita em meio RP-5 foi utilizada como cultura-mãe de trabalho da solução de bactérias.

Esta preparação bacteriana foi testada contra o anti-soro correspondente para aglutinação em lâmina positiva. A cultura-mãe de trabalho bacteriano foi carregado em poços de placas de microtitulação com a diluição apropriada de meio RP-5.

PMNs foram obtidos de células HL-60 ajustadas a uma concentração de  $1,0 \times 10^7$  células por mL em meio RP-5. As células PMN foram centrifugadas a 1000 rpm durante 10 minutos a 30-35 °C. As células granuladas foram de novo suspensas em cinco mililitros de meio RP-5 e centrifugadas a 1000 rpm durante 10 minutos. As células granuladas foram de novo suspensas em um mililitro de meio RP-5 para dar uma concentração de trabalho de  $1 \times 10^7$ /mL.

Um complemento humano preparado a partir de soro humano foi diluído numa proporção de 1:40 em meio RP-5. A mistura de reacção nos poços da placa de microtitulação continham 50 µL de bactérias [ $10^6$ - $10^7$  células/mL], 50 µL de soro diluído, 50 µL de PMN [ $1 \times 10^7$  células/mL] e 50 µL de complemento [1:40] para dar um volume total de 200 µL. No tempo zero, uma amostra de 20 µL da placa de reacção foi serialmente diluída  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ . Uma amostra de 10 µL de cada diluição foi plaqueada numa placa de ágar soja tríptica (TSA). As placas de TSA foram incubadas de um dia para o outro a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>. Depois da diluição do tempo zero, a placa de reacção foi incubada a 37 °C durante 90 minutos. As amostras foram remisturadas. Uma amostra de 20 µL da placa de reacção foi diluída serialmente  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ . Uma amostra de 10 µL de cada diluição foi plaqueada em placas TSA que, então, foram incubadas de um dia para o outro a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>.

As colónias bacterianas foram contadas para cada diluição/amostra/placa e a percentagem de morte das bactérias foi calculada pela fórmula:

$$\% \text{ de morte} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de colónias no } T_0 - \text{n}^{\circ} \text{ de colónias no } T_{90}}{\text{número de colónias no } T_0} \times 100$$

Tanto o anti-soro de células inteiras de coelhos imunizados com ATCC 202013 como os anticorpos produzidos contra os conjugados EFS1-DT mediaram a opsonofagocitose de *E. faecalis* por HL-60 na presença de complemento humano. A actividade opsónica dos anticorpos de coelho do conjugado anti-EFS1-DT foi completamente absorvida pelo conjugado EFS1. A actividade opsónica do anti-soro de célula inteira foi apenas parcialmente absorvida com o conjugado EFS1-DT indicando que parte da actividade opsónica do anti-soro de célula inteira surge de anticorpos dirigidos para um抗ígeno que não seja o EFS1. A actividade opsónica tanto do conjugado anti-EFS1-DT como dos anticorpos de células inteiras foi completamente absorvida pelo ATCC 202013. Os anticorpos de células inteiras produzidos contra ATCC 202014 não reagiram com EFS1 em ensaios de aglutinação, indicando claramente que o EFS1 e o EFS2 são抗ígenos distintos.

O anti-soro de célula inteira de coelhos imunizados com ATCC 202014 mediaram a opsonofagocitose de *E. faecalis* por HL-60 na presença de complemento humano. Os anticorpos de coelho de célula inteira também foram capazes de mediar a opsonofagocitose de isolados múltiplos de *E. faecalis*,

incluindo isolados de EFS1, por HL-60 na presença de complemento humano. Esta actividade opsónica poderia ser absorvida pelo EFS2. O conjugado EFS1-DT não conseguiu absorver a actividade opsónica do anti-soro de célula inteira de coelhos imunizados com ATCC 202014. Esta observação sugere que a resposta imunológica provocada pelos isolados EFS2 em coelhos é contra o抗ígeno EFS2 e que os anticorpos contra o抗ígeno EFS2 podem mediar a opsonofagocitose de isolados múltiplos de *E. faecalis* por HL-60 na presença de complemento humano.

Exemplo 9: Protecção *in vivo* de murganhos de desafio com *E. faecalis* por anticorpos do conjugado EFS1-DT

Um total de 42 murganhos ICR foram divididos em três grupos com 15 murganhos em cada um dos dois primeiros grupos e 12 murganhos no terceiro grupo. Os murganhos nos dois primeiros grupos foram imunizados com uma injecção intraperitoneal de 0,75 mg de coluna de proteína G-IgG de coelho purificado obtido seja de coelhos imunizados conjugados (I-IgG), seja de coelhos normais (N-IgG). O terceiro grupo foi imunizado com PBS. Vinte e quatro horas mais tarde, todos os animais foram desafiados com  $5 \times 10^7$  CFU de uma estirpe de EFS1 diferente de ATCC 202013, misturada com 5% de mucina de porco. Foram tomadas amostras de sangue de todos os murganhos através dos seus olhos às 6, 24, 48, 72 e 168 horas. Estas amostras foram plaqueadas em placas de TSA e os níveis de bacteremia nos murganhos foi quantificado por contagens bacterianas no sangue. Os resultados estão apresentados na Tabela 3.

Depois de 48 horas, apenas 17% dos murganhos apresentavam bacteremia no grupo I-IgG, enquanto nos grupos imunizados com NOIgG e PSB os números correspondentes eram de 60% e 79%, respectivamente. Depois de 7 dias, todos os animais foram sacrificados e os seus fígados e rins foram isolados e colhidas amostras destes órgãos foram para verificação de colonização de bactérias. Poucos animais no grupo I-IgG (4/30) tinham colonização bacteriana detectável nos rins em comparação com o grupo N-IgG (9/30) ou o grupo PBS (13/24). Estas observações demonstram claramente que os anticorpos específicos contra EFS1 são capazes de proteger murganhos contra o desafio bacteriano de *E. faecalis*.

Tabela 3

Contagem de Bacteremia e Colonização de Órgão de Murganho			
Média Geométrico de Amostras Positivas/Número de Amostras Positivas			
(Uma amostra positiva tem contagem $\geq 10^2$ CFU/mL)			
Tempo Pós-desafio (Tipo de amostra)	Grupo 1 E1DTd-RIgG, 0,75 mg	Grupo 2 NR IgG, 0,75 mg	Grupo 3 PBS
Seis Horas (Amostras de sangue)	2,66E+03 24/30	9,68E+03 30/30	1,33E+04 24/24
Vinte e Quatro Horas (Amostras de sangue)	2,28E+02 12/30	7,91E+02 25/30	2,46E+03 22/24
Quarenta e Oito Horas (Amostras de sangue)	3,72E+02 5/30	9,68E+02 18/30	3,43E03 19/24
Setenta e Duas Horas (Amostras de sangue)	8,68E+02 4/30	1,11E+03 15/30	9,81E+02 16/24
Seis ou sete dias (Amostras de sangue)	3,86E+02 2/30	4,63E+02 9/30	3,81E+02 11/24
Seis ou sete dias (Amostras de rim)	7,48E+02 4/30	3,42E+02 9/30	1,36E0+03 13/24
Seis ou sete dias (Amostras de fígado)	1,90E+03 18/30	3,59E+03 28/30	9,20E+03 22/24

## REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para a conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento de Patente Europeia. Embora muito cuidado tenha sido tomado na compilação das referências, erros e omissões não podem ser excluídos e o EPO nega qualquer responsabilidade neste sentido.

### Documentos de Patente citados na descrição

- US 4816397 A, Boss [0051]

### Documentos não Patente citados na descrição

- **WICKEN et al.** J. Gen. Microbiol., 1963, vol. 33, 231-39 [0003]
- **PAZUR et al.** J. Biol. Chem., 1971, vol. 246, 1793-98 [0004]
- **BLEIWEIS et al.** J. Bacteriol., 1967, vol. 94, 1381-87 [0005]
- **MAEKAWA et al.** Microbiol. Immunol., 1992, vol. 36, 671-681 [0007]
- CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY. John Wiley and Sons, 1988 [0033]
- **FATTOM et al.** Inf. and Imm., 1993, vol. 61, 1023-32 [0034]
- **KOHN et al.** FEBS Lett., 1993, vol. 154, 209-210 [0035]
- **KOJIMA et al.** Infect. Dis. Immun., 1990, vol. 58, 2367-74 [0037]
- **FISCHER et al.** discloses a correlation between functional antibody determined with an *in vitro* opsonic assay and *in vivo* activity. J. Inf. Dis., 1994, vol. 169, 324-9 [0037]
- MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. Cold Spring Harbor Laboratory [0040]
- METHODS OF HYBRIDOMA FORMATION. Humana Press, 257-271 [0040]
- **VITETTA et al.** Immunol. Rev., 1982, vol. 62, 159-83 [0040]
- **RASO.** Immunol. Rev., 1982, vol. 62, 93-117 [0040]
- **HUSE, W. D. et al.** Science, 1989, vol. 246, 1275-81 [0052]

**REIVINDICAÇÕES**

1. Antigénio de *Enterococcus faecalis* isolado compreendendo 2-acetamido-2-desoxi-glucose, ramnose, glucose e 2-acetamido-2-desoxi-galactose numa proporção molar aproximada calculada de 1:2:2:2.
2. Antigénio de acordo com a reivindicação 1, que reage com anticorpos contra ATCC 202013.
3. Antigénio de acordo com a reivindicação 1 ou 2, tendo um espectro de RMN conforme apresentado na Figura 1.
4. Conjugado antigénio-transportador compreendendo um antigénio de acordo com qualquer das reivindicações 1-3 ligado de forma covalente a um imuno-transportador.
5. Conjugado antigénio-transportador de acordo com a reivindicação 4, em que o referido imuno-transportador é toxóide diftérico ou um mutante não-tóxico, produzido por recombinação, de exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*.
6. Composição consistindo essencialmente num antigénio de acordo com qualquer das reivindicações 1-3 e um veículo estéril farmaceuticamente aceitável do mesmo.
7. Composição consistindo essencialmente num conjugado antigénio-imuno-transportador de acordo com a

reivindicação 4 ou 5 e um veículo estéril farmaceuticamente aceitável do mesmo.

8. Composição de acordo com a reivindicação 6 ou 7, que compreende um antigénio de *E. faecium* adicional.
9. Composição de acordo com a reivindicação 8, em que cada um dos referidos antigénios é conjugado com um imuno-transportador.
10. Composição de acordo com a reivindicação 9, em que cada um dos referidos antigénios é conjugado com o mesmo imuno-transportador.
11. Composição de acordo com a reivindicação 10, em que o referido imuno-transportador é um mutante não-tóxico, produzido por recombinação, de exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*.
12. Antigénio de acordo com qualquer das reivindicações 1-3 para ser utilizado como um medicamento.
13. Conjugado antigénio-transportador de acordo com a reivindicação 4 ou 5 para ser utilizado como um medicamento.
14. Utilização de um antigénio de acordo com qualquer das reivindicações 1-3 para a preparação de um agente imunoterapêutico para o tratamento de infecção causada por *Enterococcus*.

15. Utilização de um conjugado antigénio-transportador de acordo com a reivindicação 4 ou 5 para a preparação de um agente imunoterapêutico para o tratamento de infecção causada por *Enterococcus*.

16. Ensaio diagnóstico para detectar a presença de anticorpos anti-*Enterococcus* numa amostra, compreendendo os passos de:

misturar um antigénio de *Enterococcus* de acordo com qualquer das reivindicações 1-3 com uma amostra que se suspeite conter anticorpos específicos contra *Enterococcus*; e

monitorar a referida mistura para verificar a ligação entre o referido antigénio e o anticorpo específico contra *Enterococcus* na referida amostra.

17. Ensaio diagnóstico de acordo com a reivindicação 16, em que o referido antigénio é imobilizado sobre uma matriz sólida.

18. Kit para detectar a presença de um anticorpo anti-*Enterococcus* numa amostra compreendendo:

um antigénio de *Enterococcus* isolado de acordo com qualquer das reivindicações 1-3, sendo o antigénio marcado com um marcador radioisotópico ou um marcador enzimático; e

instruções para levar a cabo um ensaio diagnóstico compreendendo os passos de misturar o antigénio de *Enterococcus* com uma amostra que se suspeite conter um anticorpo específico contra *Enterococcus* e monitorar a mistura para verificar a ligação entre o anticorpo específico contra *Enterococcus* na amostra.

19. Imunoglobulina contendo anticorpos dirigidos contra um antigénio de *Enterococcus* de acordo com qualquer das reivindicações 1-3, tendo a referida imunoglobulina sido preparada por meio de um processo que inclui imunizar um animal com o referido antigénio.
20. Imunoglobulina contendo anticorpos dirigidos contra um conjugado antigénio de *Enterococcus*-transportador de acordo com a reivindicação 4 ou 5, tendo a referida imunoglobulina sido preparada por meio de um processo que inclui imunizar um animal com o referido conjugado antigénio-transportador.
21. Anticorpo contra um antigénio de *Enterococcus* de acordo com qualquer das reivindicações 1-3, tendo o referido anticorpo sido preparado por um processo que inclui imunizar um animal com o referido antigénio.
22. Anticorpo contra um conjugado antigénio de *Enterococcus*-transportador de acordo com a reivindicação 4 ou 5, tendo o referido anticorpo sido preparado por um

processo que inclui imunizar um animal com o referido conjugado antigénio-transportador.

23. Anticorpo de acordo com a reivindicação 21, sendo o referido anticorpo um anticorpo monoclonal.
24. Anticorpo de acordo com a reivindicação 22, sendo o referido anticorpo um anticorpo monoclonal.

Lisboa, 25.08.2008

FIGURA 1

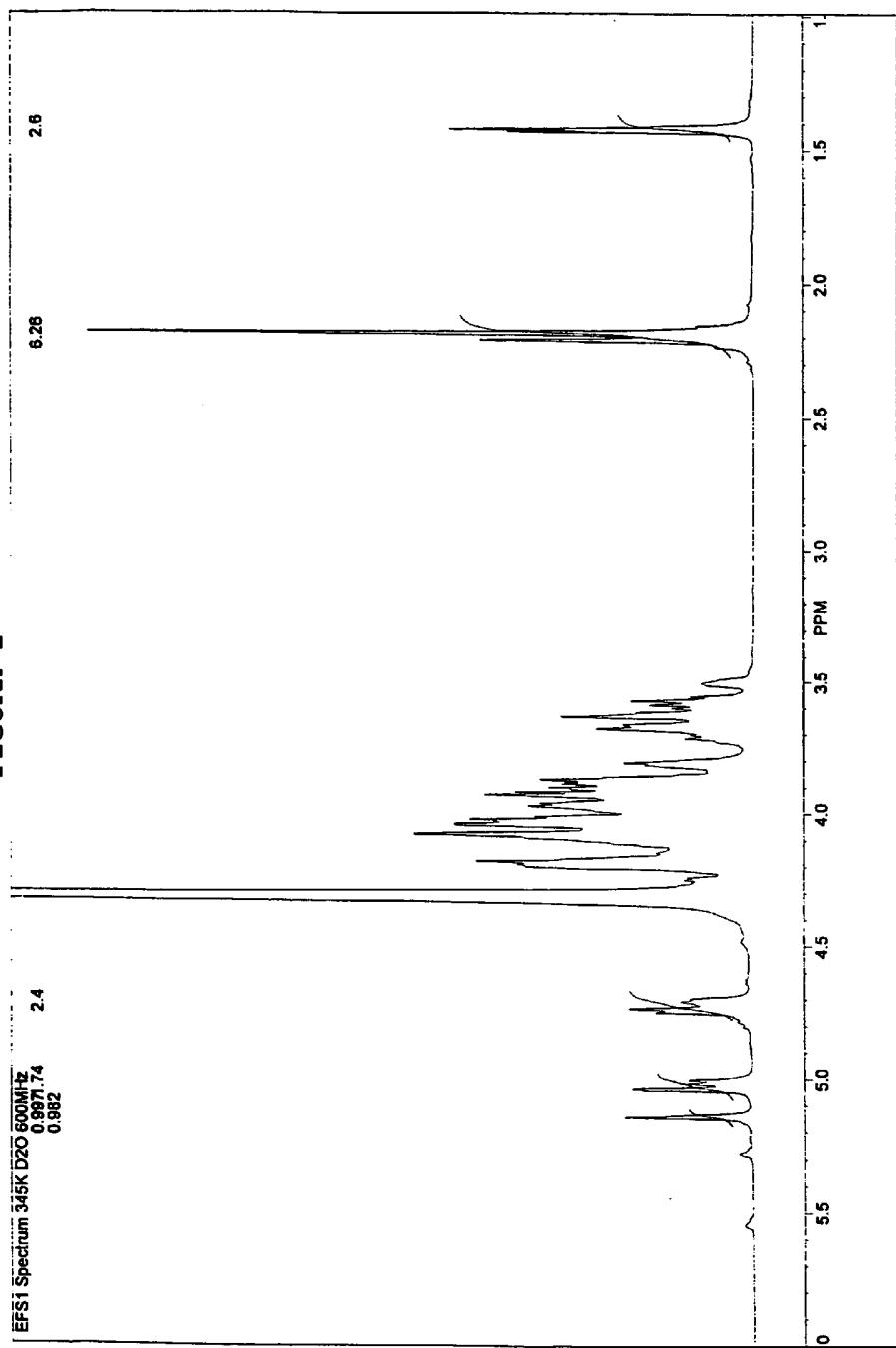


FIGURA 2

