



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 26 691 T2** 2006.09.07

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 162 997 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 26 691.5**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US00/06922**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 916 405.4**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2000/056357**

(86) PCT-Anmeldetag: **17.03.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **28.09.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **19.12.2001**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **15.03.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **07.09.2006**

(51) Int Cl.⁸: **A61K 39/085** (2006.01)

A61K 39/40 (2006.01)

C07K 4/04 (2006.01)

C07K 16/12 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

A61M 25/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

272359 19.03.1999 US

(73) Patentinhaber:

Nabi Biopharmaceuticals, Rockville, MD, US

(74) Vertreter:

BOEHMERT & BOEHMERT, 28209 Bremen

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**PAVLIAK, Viliam, Potomac, MD 20854, US;
FATTOM, Ibrahim, Ali, Rockville, MD 20852, US**

(54) Bezeichnung: **STAPHYLOCOCCUS-ANTIGENE UND IMPSTOFFE**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Hintergrund der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein neuartiges Staphylococcus-Antigen und ein Verfahren zum Gewinnen und Verwenden des Antigens.

[0002] Staphylococcus verursacht mehrere Erkrankungen durch verschiedene pathogene Mechanismen. Die häufigsten und schwerwiegendsten dieser Erkrankungen sind Bakteriämie und ihre Komplikationen bei hospitalisierten Patienten. Insbesondere kann Staphylococcus Wundinfektionen und Infektionen, die mit Kathetern und prothetischen Einrichtungen verbunden sind, verursachen. Schwerwiegende Infektionen, die mit Staphylococcus-Bakteriämie verbunden sind, schließen Osteomyelitis, invasive Endokarditis und Blutvergiftung ein. Das Problem wird verschlimmert durch Mehrfachantibiotikaresistenz in Krankenhausstämmen, die die Wahl der Therapie stark beschränkt. In der Mehrzahl von Fällen ist der verursachende Organismus ein Stamm von *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* oder *S. hominis* oder eine Kombination von diesen. Das Problem mit Staphylococcus wird durch Mehrfachantibiotikaresistenz in Krankenhausstämmen verschlimmert, die die Wahl der Therapie stark beschränkt.

[0003] Ein *S. aureus*-Impfstoff würde eine Lösung für das Problem der Antibiotikaresistenz liefern. Ein Antigen, das mehreren Staphylococcus-Spezies gemeinsam ist, würde die Herstellung eines Impfstoffes ermöglichen, der ein einziges Antigen enthält, das gegen eine breite Vielfalt von Staph-Infektionen wirksam wäre.

Zusammenfassung der Erfindung

[0004] Es ist daher eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Antigen bereitzustellen, das einem Großteil der klinisch signifikanten Stämme von mehreren Staphylococcus-Spezies gemeinsam ist.

[0005] Es ist eine weitere Aufgabe, einen Impfstoff bereitzustellen, der ein Antigen enthält, das einem Großteil der klinisch signifikanten Stämme von mehreren Staphylococcus-Spezies gemeinsam ist.

[0006] Es ist eine weitere Aufgabe, eine hyperimmune Globulinzusammensetzung bereitzustellen, die Antikörper enthält, die gegen ein Antigen gerichtet sind, das einem Großteil der klinisch signifikanten Stämme von mehreren Staphylococcus-Spezies gemeinsam ist.

[0007] Es ist eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, einen Vollzellimpfstoff aus Zellen bereitzustellen, die ein Antigen tragen, das einem Großteil der klinisch signifikanten Stämme von mehreren Staphylococcus-Spezies gemeinsam ist, insbesondere einen, der den Koagulase-negativen Spezies von *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* und *S. huminis* gemeinsam ist.

[0008] Es ist noch eine weitere Aufgabe, einen Kit und Test zum Diagnostizieren von Staphylococcus-Infektion bereitzustellen.

[0009] Gemäß diesen und anderen Aufgaben gemäß der Erfindung wird ein isoliertes Staphylococcus-Antigen bereitgestellt, das (a) Aminosäuren und ein N-acetyliertes Hexosamin in einer α -Konfiguration umfasst, (b) keine O-Acetylgruppen enthält, die mit kernmagnetischer Resonanzspektroskopie nachweisbar sind, und (3) spezifisch mit Antikörpern zu einem Staphylococcus-Stamm, hinterlegt unter ATCC 202176, bindet.

[0010] Ebenfalls bereitgestellt wird eine Zusammensetzung, die das Staphylococcus-Antigen und einen sterilen, pharmazeutisch annehmbaren Träger dafür umfaßt. Ein Immuntherapieverfahren umfaßt einen Schritt der Verabreichung einer immunstimulatorischen Menge einer solchen Zusammensetzung an einen Patienten.

[0011] Es wird auch ein Vollzellimpfstoff bereitgestellt, der Zellen von einem Staphylococcus-Stamm umfaßt, der das Antigen trägt.

[0012] Ebenfalls bereitgestellt wird eine Zusammensetzung, die den Vollzellimpfstoff und einen sterilen, pharmazeutisch annehmbaren Träger dafür umfaßt. Der Impfstoff kann einem Patienten verabreicht werden, um Schutz gegen Staphylococcus-Infektion bereitzustellen.

[0013] Ein immuntherapeutisches Mittel gegen Staphylococcus-Infektion kann durch Immunisieren von Patienten mit einer Zusammensetzung gemäß der Erfindung, Sammeln von Plasma von dem immunisierten Pati-

enten und Ernten eines hyperimmunen Globulins, das Antikörper enthält, die gegen Staphylococcus gerichtet sind, aus dem gesammelten Plasma hergestellt werden. Das hyperimmune Globulin enthält Antikörper, die gegen das Antigen gerichtet sind. Ein Immuntherapieverfahren umfaßt einen Schritt der Verabreichung dieses hyperimmunen Globulins an einen Patienten.

[0014] Die vorliegende Erfindung stellt auch einen Katheter bereit, der mit einem Antigen gemäß der Erfindung beschichtet ist, und ein Verfahren zum Verhindern des Anhaftens von Staphylococcus-Bakterien an einem Katheter, das das Behandeln eines Katheters mit Antigen gemäß der Erfindung umfaßt. In einer bevorzugten Ausführungsform ist der Katheter ein intravenöser Katheter.

[0015] Weitere Aufgaben, Merkmale und Vorteile der vorliegenden Erfindung werden aus der folgenden detaillierten Beschreibung deutlich werden. Man sollte jedoch verstehen, daß die detaillierte Beschreibung und die spezifischen Beispiele, obgleich sie bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung zeigen, nur zur Veranschaulichung angegeben sind.

Kurze Beschreibung der Zeichnung

[0016] [Fig. 1](#) ist das chromatographische Profil auf Superose 6HR für das Staphylococcus-Antigen gemäß der Erfindung.

[0017] [Fig. 2a](#) und [Fig. 2b](#) sind NMR-Spektren für das Staphylococcus-Antigen gemäß der Erfindung.

Beschreibung bevorzugter Ausführungsformen

[0018] Es ist entdeckt worden, daß viele klinisch signifikante Isolate von *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* und *S. hominis* ein Antigen gemeinsam haben, das hierin als „das Antigen“ bezeichnet wird. Das Antigen stellt die Grundlage für einen Impfstoff dar, der Schutz gegen Infektion durch eine große Anzahl klinisch signifikanter Staphylococcus-Isolate bereitstellt. In dieser Hinsicht ist ein „klinisch signifikantes“ Isolat ein Isolat, das pathogen ist.

[0019] Bemerkenswerterweise haben die gegenwärtigen Erfinder festgestellt, daß ein Großteil klinischer Staphylococcus-Isolate sehr stark mit Antigen/konjugierter Antikörper-Seren reagierten und somit als Stämme typisierbar waren, die das Antigen enthalten. Insbesondere hat das Typisieren klinischer Isolate, die aus verschiedenen Quellen erhalten wurden, gezeigt, daß ungefähr 60% von *S. epidermidis*-, 50% von *S. haemolyticus*- und 40% von *S. hominis*-Isolaten das Antigen exprimieren, wie bestimmt durch Objektträgeragglutination. Wenn enzymatische Verdauung der *S. haemolyticus*- und *S. hominis*-Isolate einem Immundiffusionstest unterzogen wurden, wurden alle Isolate positiv auf das Vorhandensein des Antigens getestet.

[0020] Antikörper zum Antigen gehen keine Kreuzreaktion mit Polysacchariden ein, die aus irgendeinem von *S. aureus*-Typ 5, Typ 8, Typ 4 oder K73 (einem varianten Stamm von Typ 5) isoliert worden sind. Das Antigen ist daher spezifisch, d.h. es erzeugt nur eine einzige Bande mit Antiserum aus homologen Stämmen.

[0021] Das Antigen kann in gewinnbaren Mengen aus bestimmten Staphylococcus-Isolaten, die gemäß den hierin beschriebenen Protokollen kultiviert worden sind, in im wesentlichen reiner Form erhalten werden. Insbesondere enthält gereinigtes Antigen weniger als 1% Nukleinsäure. Eine „gewinnbare“ Menge bedeutet in dieser Hinsicht, daß die isolierte Menge des Antigens durch eine weniger empfindliche Methodik als radioaktive Markierung nachweisbar ist, wie etwa Immuntest, und weiteren Manipulationen unterzogen werden kann, die die Übertragung des Antigens per se in Lösung hinein umfassen.

[0022] Um das Antigen zu erhalten, wird ein Isolat gemäß der Erfindung zunächst in einer modifizierten Columbia-Brühe fermentiert, die mit 4% NaCl supplementiert ist. Im Anschluß an die Fermentation werden die Zellen abgetötet und dann zentrifugiert, um die Zellen vom Überstand abzutrennen.

[0023] Antigen wird aus Zellpaste extrahiert. Ein Teils des Antigens ist im Überstand vorhanden, aber die Menge ist nicht signifikant, verglichen mit der Menge, die in der Zellpaste zu finden ist. Wegen der geringen Ausbeute und dem Risiko der Hexose-Kontamination aus den Medien ist Extraktion aus dem Überstand nicht bevorzugt.

[0024] Eine Suspension der Zellpaste wird mit Pronase, Lysostaphin, DNase und RNase behandelt. Die Suspension wird 10% in Trichloressigsäure (TCA) gemacht und bei 60°C inkubiert. Nach Zentrifugation wird der

Überstand mit 1M NaOH auf pH 7,0 neutralisiert, gefolgt von sequentieller Ausfällung mit 25–75% kaltem Ethanol/ CHCl_3 , um Nukleinsäuren und Proteine mit hohem Molekulargewicht zu entfernen und dann antigenhaltiges Material auszufällen.

[0025] Der rohe Niederschlag wird in Wasser gelöst und restlicher Alkohol wird durch Dialyse entfernt. Restliche Teichonsäure wird durch Anionenaustauschchromatographie entfernt. Fraktionen werden durch Kapillarausfällung mit Antikörpern getestet, die für das Antigen spezifisch sind, um antigenhaltige Fraktionen zu bestimmen, die gepoolt, dialysiert, lyophilisiert und mit Lysozym behandelt werden, um restliches Peptidoglykan zu verdauen. Die enzymbehandelte rohe antigenhaltige Fraktion wird erneut suspendiert und erneut auf einer Anionenaustauschsäule in einem linearen 0,1–0,25M NaCl-Gradienten in Tris-HCl-Puffer, pH 7,0, chromatographiert. Phosphor-negative und Antigen-positive Fraktionen, bestimmt durch kolorimetrischen Test bzw. Kapillarausfällung mit monospezifischem Antiserum, werden gepoolt, gegen Wasser dialysiert und lyophilisiert. Der Großteil des Antigens eluiert bei 0,2M NaCl. Das rohe Antigen wird weiter durch Säulenchromatographie gereinigt, und antigenhaltige Fraktionen werden gepoolt, um im wesentlichen reines Antigen herzustellen.

[0026] Gereinigtes Antigen erzeugt eine einzige Fällungsbande, wenn umgesetzt mit Vollzellantiseren in einem Doppelimmundiffusionstest. Immunelektrophorese von gereinigtem Antigen und Elutionsmuster auf Ionenaustauschssäule während des Reinigungsverfahrens weisen auf ein negativ geladenes Molekül hin.

[0027] Sowohl im wesentlichen reines Antigen als auch durch Umkehrphasenchromatographie auf einer C18-Säule aufgereinigtes Antigen zeigten ein polydisperses Profil auf einer Superose 6HR-Säule ([Fig. 1](#)). Beide enthalten weniger als 1% Nukleinsäuren. Keine Hexosen, Phosphor- oder O-Acetyl-Gruppen werden durch kolorimetrische Tests nachgewiesen. Gereinigtes Antigen färbt Coomassie-Blau-SDS-PAGE nicht an.

[0028] Analyse von gereinigtem Antigen durch Gas-Flüssig-Chromatographie-Massenspektroskopie (GLC-MS) zeigt das Vorhandensein von GlcNAc als einer wichtigen Glykosylkomponente. Sie ist empfindlich auf milde Säure, was darauf hinweist, daß die GlcNAc-Reste nicht durch glykosidische Bindungen verknüpft sind. Das Antigen ist gegen die Wirkung proteolytischer Enzyme resistent.

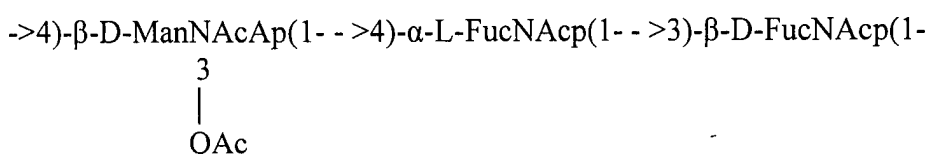
[0029] Das Vorhandensein von GlcNAc wird durch ¹H-NMR- und ¹³C-NMR-Spektroskopie des Antigens bestätigt, die ein anomeres Signal bei δ 4,88 bzw. δ 100,48 zeigen (siehe [Fig. 2a](#) und [Fig. 2b](#)). NMR-Spektroskopie bestätigt auch das Fehlen von O-Acetylgruppen. Dieses Fehlen einer O-Acetylierung steht in scharfem Kontrast zu anderen Staphylococcus-Antigenen, wie etwa Typ 5 und Typ 8, die von 20–80% O-Acetylierung enthalten.

[0030] Ein kleiner Wert für JH₁,H₂ (< 1,0 Hz) zeigt eine α-Konfiguration für das Glucosamin, die durch eine Messung von c = 173 Hz für die J_C,H-Kopplungskonstante bestätigt wird. Signale bei δ 24,860 ppm (NAac-CH₃) und δ 176,814 ppm (NAc-CO) im ¹³C-NMR-Spektrum legen nahe, daß das Glucosamin N-acetyliert ist, so daß der Kohlehydratteil des Antigens 2-Acetamido-2-desoxy-α-D-glucopyranosid ist.

[0031] Aminosäureanalyse des Antigens zeigt das Vorhandensein von Serin, Alanin, Asparaginsäure/Asparagin, Valin und Threonin in Molverhältnissen von ungefähr 39:25:16:10:7. Aminosäuren stellen etwa 32 Gew.-% des Antigenmoleküls dar.

[0032] Ein Vergleich der NMR-Spektren für das Antigen mit den NMR-Spektren für jedes der Antigene von *S. aureus* Typ 5 und Typ 8 und mit den NMR-Spektren für das 336-Antigen, das in U.S. 5,770,208 offenbart ist, zeigt, daß es chemisch von diesen Antigenen verschieden ist. Die Strukturen der Polysaccharid-Antigene Typ 5 und 8 sind von Moreau et al., Carbohydr. Res. 201:285 (1990) und Fournier et al., Infect. Imm. 45:87 (1984) aufgeklärt worden. Beide haben FucNAcp in ihrer Wiederholungseinheit sowie ManNAcA, das verwendet werden kann, um eine Sulfhydrylgruppe einzuführen. Die Strukturen sind wie folgt:

Typ 5:



$$\begin{array}{c} \rightarrow 3)-\beta-D-\text{ManNAcAp}(1- - \rightarrow 3)-\alpha-L-\text{FucNAcp}(1- - \rightarrow 3)-\beta-D-\text{FucNAcp}(1- \\ | \\ \text{OAc} \end{array}$$

[0033] Im Gegensatz dazu hat das Antigen gemäß der vorliegenden Erfindung Glucosamin als seine hauptsächliche Kohlehydratkomponente. Im Gegensatz zu den Antigenen von *S. aureus* Typ 5 und Typ 8 enthält es Aminosäuren.

[0034] Die Induktion von Bakteriämie in Säugern erfordert extrem hohe Zahlen von Organismen oder ein bestimmtes vorheriges Manöver, um die Wirtsresistenz zu senken. In-vitro-Phagocytose kann jedoch als ein Korrelat der Schutzimmunität in vivo untersucht werden. In diesem Modell wird die Fähigkeit Antigen-spezifischer monoklonaler und polyklonaler Antikörper, Staphylococcus-Isolate in vitro zu opsonieren, durch Phagocytose gemessen, gemäß dem Verfahren, das in Kojima et al., Infect. Dis. Immun. 58: 2367–2374 (1990) beschrieben ist. Von in-vitro-Opsonophagocytose-Tests ist auf diesem Gebiet anerkannt, daß sie die Wirksamkeit als ein Impfstoff vorhersagen. Fischer et al. offenbaren zum Beispiel eine Korrelation zwischen funktionalem Antikörper, bestimmt mit einem in-vitro-Opsonentest, und in-vivo-Aktivität. J. Inf. Dis. 169: 324–9 (1994).

[0035] Antikörper, die durch einen Impfstoff induziert sind, der das Antigen enthält, erleichtern typspezifische Phagocytose. Die in-vitro-Phagocytose-Tests zeigen somit, daß Antikörper zum Antigen gegen Infektion durch Staphylococcus-Stämme, die das Antigen tragen, schützen. Ein Impfstoff auf der Basis des Antigens kann verwendet werden, um gegen Infektion von einem Großteil klinischer Staphylococcus-Stämme zu schützen. In-vivo-Ergebnisse, die mit dem Mäuse-Letalitäts-Modell und dem Mäuse-Bakteriämie-Modell erhalten werden, sind konsistent mit Ergebnissen von in-vitro-Opsonophagocytose-Tests und zeigen, daß Antikörper zu Antigenkonjugaten Mortalität und Bakteriämie in Mäusen senkten, die mit Staphylococcus-Stämmen, die das Antigen tragen, provoziert worden sind.

[0036] Vorzugsweise „besteht“ eine Zusammensetzung des Antigens oder von Vollzellen, die das Antigen gemäß der Erfindung enthalten, „im wesentlichen aus“ dem Antigen oder Zellen, die das Antigen enthalten. In diesem Zusammenhang bedeutet die Phrase „besteht im wesentlichen aus“, daß die Zusammensetzung nicht irgendein Material enthält, das mit dem Auslösen einer Immunreaktion auf das Antigen (und auf andere Antigene, falls vorhanden) interferiert, wenn die Zusammensetzung einem Patienten als ein Impfstoff verabreicht wird, oder mit dem Antigen-Antikörper-Kopplungsmerkmal eines diagnostischen Tests, wenn das Antigen in der Diagnose verwendet wird.

[0037] Das Antigen gemäß der Erfindung ist nützlich bei der Herstellung diagnostischer Tests zum Nachweis des Vorhandenseins von Staphylococcus-Antigen und/oder anti-Staphylococcus-Antikörper in einer Probe. Das Antigen, oder der zum Antigen spezifische Antikörper, wird, allein oder in Kombination mit anderen Staphylococcus-Antigenen oder -Antikörpern, mit einer Probe vermischt, die in Verdacht steht, Staphylococcus-Antigen oder -Antikörper zu enthalten, und auf Antigen-Antikörper-Bindung überwacht. Das Antigen oder der Antikörper ist mit einer radioaktiven Markierung oder Enzymmarkierung markiert. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Antigen oder der Antikörper auf einer festen Matrix immobilisiert, so daß das Antigen oder der Antikörper für komplementären Antikörper oder komplementäres Antigen, die mit einer Oberfläche der Matrix in Kontakt kommen, zugänglich ist. Die Probe wird dann mit der Oberfläche der Matrix in Kontakt gebracht, und die Oberfläche wird auf Antigen-Antikörper-Bindung überwacht.

[0038] Das Antigen oder der Antikörper können zum Beispiel in einem enzymverknüpften Immunsorbenstest (ELISA) verwendet werden, in dem Antigen oder Antikörper an eine feste Phase gebunden sind und ein Enzym-Antikörper- oder Enzym-Antigen-Konjugat verwendet wird, um Antikörper oder Antigene, die in einer Probe vorhanden sind, nachzuweisen und/oder zu quantifizieren. Alternativ kann ein Western-Blot-Test verwendet werden, in dem löslich gemachtes) und abgetrenntes) Antigene) an Nitrocellulose-Papier gebunden wird (werden). Der Antikörper wird dann durch ein an ein Enzym oder eine Markierung konjugiertes anti-Immunglobulin (Ig), wie etwa Meerrettichperoxidase-Ig-Konjugat, durch Inkubieren des Filterpapiers in Gegenwart eines ausfällbaren oder nachweisbaren Substrats nachgewiesen. Western-Blot-Tests haben den Vorteil, daß sie keine Reinheit von mehr als 50% für das (die) gewünschte(n) Antigen(e) erfordern. Beschreibungen von ELISA und Western-Blot-Techniken sind zu finden in den Kapiteln 10 und 11 von Ausubel et al. (Hrg.), CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley and Sons (1988), deren gesamter Inhalt hierin durch Bezugnahme miteinbezogen ist.

[0039] Zur Verwendung in einem Impfstoff ist es bevorzugt, das Antigen an einen Immunträger zu konjugieren, üblicherweise ein Polypeptid oder ein Protein, um die Wechselwirkung zwischen T- und B-Zellen für die Induktion einer Immunreaktion gegen das Antigen zu verbessern. Dies ist besonders wichtig für Impfstoffe, die zur Verwendung bei Patienten mit verringerter Widerstandsfähigkeit gedacht sind. Ein Immunträger erhöht die Immunogenizität sowohl für aktive Immunisierung als auch zur Herstellung hochtitrierter Antisera bei Freiwilligen für passive Immunisierung. Geeignete Immunträger gemäß der vorliegenden Erfindung schließen Tetanus-Toxoid, Diphtherie-Toxoid, Exotoxin A von *Pseudomonas aeruginosa* oder seine Derivate, rekombinant erzeugte, nicht-toxische mutante Stämme von Exotoxin A, wie zum Beispiel beschrieben in Fattom et al., *Inf. and Imm.* 61: 1023–1032 (1993), sowie andere üblicherweise als Immunträger verwendete Proteine ein.

[0040] Um das Antigen an ein Trägerprotein zu konjugieren, wird das Antigen zunächst derivatisiert. Verschiedene Verfahren können verwendet werden, um Antigen zu derivatisieren und es kovalent an einen Immunträger zu binden. Aktivierte Carboxylatgruppen des Antigens können mit ADH, Cystamin oder PDPH derivatisiert werden, und dann an das Antigen entweder über eine Carbodiimid-vermittelte Reaktion des teilweise amidierten Antigens an eine Carboxylatgruppe auf dem Trägerprotein oder durch Disulfidaustausch von thioliertem Antigen mit einem SPDP-derivatisierten Trägerprotein an ein Trägerprotein gekoppelt werden.

[0041] Hydroxylgruppen auf dem Antigen können unter Verwendung von Bromcyan oder 1-Cyano-4-dimethylaminopyridiniumtetrafluorborat aktiviert werden, und dann kann das Antigen mit dem sechs Kohlenstoffe großen, bifunktionellen Spacer Adipinsäuredihydrazid (ADH) gemäß im Stand der Technik bekannten Techniken gemäß dem Verfahren von Kohn et al. *FEBS Lett.* 154: 209–219 (1993) derivatisiert werden. Dieses Material wird dann an Diphtherie-Toxoid (Dtd), rekombinantes Exoprotein A aus *Pseudomonas aeruginosa* (rE-PA), Tetanus-Toxoid (TTd) oder ein anderes geeignetes Trägerprotein durch 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDAC) gebunden. Die resultierenden Konjugate können von nicht-umgesetztem Antigen durch Ausschlußchromatographie getrennt werden. Ungeachtet des Verfahrens, das verwendet wird, um das Antigen an das Trägerprotein zu konjugieren, verstärkt kovalente Bindung des Antigens an das Trägerprotein die Immunogenizität des Antigens signifikant und führt zu erhöhten Gehalten an Antikörpern zum Antigen sowohl nach dem ersten als auch dem zweiten Boost in Mäusen.

[0042] Vorzugsweise wird das Antigen oder Antigen-Konjugat ohne ein Adjuvans verabreicht, um durch Adjuvans induzierte Toxizität zu vermeiden. Wenn ein Adjuvans verwendet wird, ist es bevorzugt, eines zu verwenden, das die Schutz-IgG-Untertyp-2-Antikörper fördert. Typische Adjuvantien schließen Aluminiumhydroxid, vollständiges Freund'sches Adjuvans (CFA) und unvollständiges Freund'sches Adjuvans (IFA) ein. Dextransulfat hat sich als ein potenter Stimulator von IgG₂-Antikörper gegen Staphylococcen-Zelloberflächen-Antigen erwiesen und ist auch als ein Adjuvans geeignet.

[0043] Die vorliegende Erfindung betrifft auch die Verwendung des Antigens, um polyklonale Antikörper oder monoklonale Antikörper (Maus oder Mensch) zu erzeugen, die an Staphylococcus-Stämme, die das Antigen tragen, binden oder diese neutralisieren. Protokolle zur Erzeugung dieser Antikörper sind beschrieben in Ausubel et al., (Hrg.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, (Cold Spring Harbor, NY), Kapitel 11; in *METHODS OF HYBRIDOMA FORMATION* 257–271, Barta & Hirsaut (Hrg.), Humana Press, Clifton, NJ (1988); in Vitetta et al., *Immunol. Rev.* 62:159–83 (1982); und in Raso, *Immunol. Rev.* 62:93–117 (1982).

[0044] Inokulum für die Erzeugung polyklonaler Antikörper wird typischerweise hergestellt durch Dispergieren des Antigen-Immunträgers in einem physiologisch tolerierbaren Verdünnungsmittel, wie etwa physiologischer Kochsalzlösung, um eine wäßrige Zusammensetzung zu bilden. Eine immunstimulierende Menge Inokulum, mit oder ohne Adjuvans, wird einem Säuger verabreicht, und der inokulierte Säuger wird dann für einen für das Antigen ausreichenden Zeitraum gehalten, um schützende anti-Antigen-Antikörper zu induzieren. Boosting-Dosen des Antigen-Immunträgers können in Individuen verwendet werden, die nicht bereits immunologisch aktiviert sind, um auf das Antigen zu reagieren.

[0045] Antikörper können Antikörperzubereitungen aus einer Vielzahl von üblicherweise verwendeten Tieren einschließen, z.B. Ziegen, Primaten, Eseln, Schweinen, Kaninchen, Pferden, Hennen, Meerschweinchen, Ratten und Mäusen, und sogar menschliche Antikörper nach geeigneter Selektion, Fraktionierung und Reinigung. Tier-Antisera können auch durch Inokulieren der Tiere mit mit Formalin abgetöteten Stämmen von Staphylococcus, die das Antigen tragen, mit herkömmlichen Verfahren, Aderlassen der Tiere und Gewinnen von Serum oder Plasma für weitere Verarbeitung erhöht werden.

[0046] Die auf diese Weise induzierten Antikörper können durch gut bekannte Techniken geerntet und im ge-

wünschten Umfang isoliert werden, wie etwa durch Alkoholfraktionierung und Säulenchromatographie oder durch Immunaффinitätschromatographie; d.h. durch Binden von Antigen an eine chromatographische Säulenpackung wie Sephadex®, Hindurchgehen des Antiserums durch die Säule, wodurch spezifische Antikörper zurückgehalten und andere Immunglobuline (IgGs) und Verunreinigungen abgetrennt werden, und anschließend des Gewinns gereinigter Antikörper durch Elution mit einem chaotropen Mittel, fakultativ gefolgt von weiterer Reinigung, zum Beispiel durch Hindurchgehen durch eine Säule mit gebundenen Blutgruppen-Antigenen oder anderen nicht-pathogenen-Spezies. Dieses Verfahren kann bevorzugt sein, wenn man die gewünschten Antikörper aus den Seren oder dem Plasma von Menschen isoliert, die einen Antikörpertiter gegen das fragliche Pathogen entwickelt haben, wodurch die Rückhaltung von Antikörpern sichergestellt wird, die in der Lage sind, an das Antigen zu binden. Sie können dann in Präparaten zur passiven Immunisierung gegen Staphylococcus-Stämme, die das Antigen tragen, verwendet werden.

[0047] Eine monoklonale Antikörperzusammensetzung enthält, innerhalb der Nachweisgrenzen, nur eine Spezies von Antikörper-kombinierender Stelle, die in der Lage ist, effektiv an das Antigen zu binden. Geeignete Antikörper in monoklonaler Form können unter Verwendung herkömmlicher Hybridom-Technologie hergestellt werden.

[0048] Um Hybridomas zu bilden, aus denen eine monoklonale Antikörperzusammensetzung der vorliegenden Erfindung erzeugt wird, wird ein Myelom oder eine andere selbstperpetuierende Zelllinie mit Lymphozyten verschmolzen, die aus peripherem Blut, Lymphknoten oder der Milz eines Säugers erhalten sind, der mit dem Antigen hyperimmunisiert worden ist. Es ist bevorzugt, daß die Myelom-Zelllinie aus derselben Spezies wie die Lymphozyten stammt. Splenozyten werden typischerweise mit Myelomzellen unter Verwendung von Polyethylenglykol 1500 verschmolzen. Verschmolzene Hybride werden nach ihrer Empfindlichkeit auf HAT ausgewählt. Hybridomas, die die Antikörpermoleküle dieser Erfindung sekretieren, können unter Verwendung eines ELISA identifiziert werden.

[0049] Eine Balb/C-Mäusemilz, menschliches peripheres Blut, Lymphknoten oder Splenozyten sind die bevorzugten Materialien zur Verwendung bei der Herstellung muriner oder menschlicher Hybridomas. Geeignete Mäuse-Myelome zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung schließen die gegen Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin (HAT) empfindlichen Zelllinien ein, wobei ein bevorzugtes Myelom P3X63-Ag8.653 ist. Der bevorzugte Fusionspartner für die Erzeugung menschlicher monoklonaler Antikörper ist SHM-D33, ein Heteromyelom, das erhältlich ist von der ATCC, Rockville, Md. unter der Bezeichnung CRL 1668.

[0050] Eine monoklonale Antikörperzusammensetzung der vorliegenden Erfindung kann erzeugt werden, indem eine monoklonale Hybridomkultur initiiert wird, die ein Nährstoffmedium umfaßt, das ein Hybridom enthält, das Antikörpermoleküle der geeigneten Spezifität sekretiert. Die Kultur wird unter Bedingungen und für einen Zeitraum gehalten, die ausreichend sind, damit das Hybridom die Antikörpermoleküle in das Medium sekretiert. Das antikörperhaltige Medium wird dann gesammelt. Die Antikörpermoleküle können dann weiter mit gut bekannten Techniken isoliert werden.

[0051] Medien, die für die Herstellung dieser Zusammensetzungen brauchbar sind, sind sowohl im Stand der Technik gut bekannt als auch kommerziell erhältlich und schließen synthetische Kulturmedien, Inzuchtmäuse oder dergleichen ein. Ein beispielhaftes synthetisches Medium ist Dulbecco's Minimal Essential Medium, supplementiert mit 20% fötalem Kalbsserum. Ein beispielhafter Inzuchtmäusestamm ist der Balb/c.

[0052] Weitere Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörperzusammensetzungen werden ebenfalls in Betracht gezogen, wie etwa Interspezies-Fusionen, da es primär die Antigenspezifität der Antikörper ist, die ihre Nützlichkeit in der vorliegenden Erfindung beeinflusst. Menschliche Lymphozyten, erhalten aus infizierten Individuen, können mit einer menschlichen Myelom-Zelllinie verschmolzen werden, um Hybridomas zu erzeugen, die auf die Produktion von Antikörpern gescreent werden können, die das Antigen erkennen. In dieser Hinsicht bevorzugter ist jedoch ein Verfahren, das nicht die Verwendung einer biologischen Probe aus einer infizierten menschlichen Person mit sich bringt. Eine Person, die mit einem Impfstoff immunisiert worden ist, wie hierin beschrieben, kann zum Beispiel als eine Quelle für Antikörper dienen, die geeigneterweise in einer Antikörperzusammensetzung innerhalb der vorliegenden Erfindung verwendet werden.

[0053] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform werden monoklonale Antikörper zum Antigen erzeugt, indem Verfahren verwendet werden, die ähnlich sind zu denjenigen, die für typspezifische Antikörper zu S. aureus Typ 5 und Typ 8 beschrieben sind. Die gereinigten monoklonalen Antikörper werden charakterisiert durch bakterielle Agglutinationstests unter Verwendung einer Sammlung klinischer Isolate.

[0054] Monoklonale und polyklonale Antikörperzusammensetzungen, die gemäß der vorliegenden Beschreibung hergestellt sind, können durch passive Immunisierung verwendet werden, um eine Immunreaktion für die Prävention oder Behandlung einer Infektion durch Staphylococcus-Stämme, die das Antigen tragen, zu induzieren. In dieser Hinsicht kann die Antikörperzubereitung eine polyklonale Zusammensetzung sein. Solch eine polyklonale Zusammensetzung schließt Antikörper ein, die an das Antigen binden, und kann zusätzlich Antikörper einschließen, die an die Antigene binden, die andere Staphylococcus-Stämme charakterisieren. Die polyklonale Antikörperkomponente kann ein polyklonales Antiserum, vorzugsweise affinitätsgereinigt, aus einem Tier sein, das mit dem Antigen provoziert worden ist, und möglicherweise auch mit anderen Staphylococcus-Antigenen. Alternativ kann eine „künstlich hergestellte oligoklonale“ Mischung verwendet werden, die eine Mischung aus monoklonalen Antikörpern zum Antigen und monoklonalen Antikörpern zu anderen Staphylococcus-Antigenen ist.

[0055] In beiden Arten von Mischungen kann es vorteilhaft sein, Antikörper chemisch miteinander zu verknüpfen, um ein einziges polyspezifisches Molekül zu bilden, das in der Lage ist, an das Antigen und an Antigene, die für andere Staphylococcus-Stämme charakteristisch sind, zu binden. Ein Weg, eine solche Verknüpfung zu bewirken, ist, zweiwertige $F(ab')_2$ -Hybridfragmente herzustellen, indem zwei unterschiedliche $F(ab')_2$ -Fragmente vermischt werden, die z.B. durch Pepsinverdauung zweier unterschiedlicher Antikörper, reduktive Spaltung, um eine Mischung von Fab'-Fragmenten zu bilden, gefolgt von oxidativer Wiederherstellung der Disulfidbindungen, um eine Mischung von $F(ab')_2$ -Fragmenten zu erzeugen, einschließlich Hybridfragmenten, die einen Fab'-Teil enthalten, der spezifisch für jedes der ursprünglichen Antigene ist, erzeugt sind. Verfahren zur Herstellung solcher hybriden Antikörperfragmente sind offenbart in Feteanu, LABELED ANTIBODIES IN BIOLOGY AND MEDICINE 321–23, McGraw-Hill Int'l Book Co. (1978); Nisonoff, et al., Arch Biochem. Biophys. 93: 470 (1961); und Hammerling et al., J. Exp. Med. 128: 1461 (1968); und in U.S.-Patent Nr. 4,331,647.

[0056] Weitere Verfahren sind im Stand der Technik bekannt, um zweiwertige Fragmente herzustellen, die vollständig heterospezifisch sind, z.B. Verwendung bifunktionaler Linker, um gespaltene Fragmente zu verknüpfen. Rekombinante Moleküle sind bekannt, die die leichten und schweren Ketten eines Antikörpers enthalten, z.B. gemäß dem Verfahren von Boss et al., U.S.-Patent Nr. 4,816,397. Analoge Verfahren zur Herstellung rekombinanter oder synthetischer Bindungsmoleküle mit den Eigenschaften von Antikörpern sind in der vorliegenden Erfindung eingeschlossen. Mehr als zwei unterschiedliche monospezifische Antikörper oder Antikörperfragmente können unter Verwendung verschiedener im Stand der Technik bekannter Linker verknüpft werden.

[0057] Eine Antikörperkomponente, die gemäß der vorliegenden Erfindung erzeugt worden ist, kann vollständige Antikörper, Antikörperfragmente oder Unterfragmente einschließen. Antikörper können vollständiges Immunglobulin jeder Klasse, z.B. IgG, IgM, IgA, IgD, IgE, chimäre Antikörper oder hybride Antikörper mit zweifachen oder mehrfachen Antigen- oder Epitop-Spezifitäten oder Fragmente, z.B. $F(ab')_2$, Fab', Fab und dergleichen, einschließlich hybriden Fragmenten, sein, und schließen zusätzlich jedes Immunglobulin oder jedes natürliche, synthetische oder gentechnologisch hergestellte Protein ein, das wie ein Antikörper durch Binden an ein spezifisches Antigen, um ein Komplex zu bilden, wirkt. Insbesondere können Fab-Moleküle in einem genetisch transformierten Wirt wie E. coli exprimiert und zusammengebaut werden. So ist ein Lambda-Vektorsystem verfügbar, um eine Population von Fabs mit einer potentiellen Diversität zu exprimieren, die der einer Person entspricht, die den Vorläufer-Antikörper erzeugt, oder diese übersteigt. Siehe Huse, W.D., et al., Science 246: 1275–81 (1989).

[0058] Das Antigen gemäß der vorliegenden Erfindung kann der aktive Inhaltsstoff in einer Zusammensetzung sein, die weiter einen pharmazeutisch annehmbaren Träger für den aktiven Inhaltsstoff umfaßt, der als ein Impfstoff verwendet werden kann, um eine zelluläre Immunreaktion und/oder in-vivo-Produktion von Antikörpern zu induzieren, die Staphylococcus-Infektion bekämpfen. In dieser Hinsicht ist ein pharmazeutisch annehmbarer Träger ein Material, das als ein Vehikel zur Verabreichung eines Arzneimittels verwendet werden kann, weil das Material inert oder ansonsten medizinisch annehmbar ist, sowie kompatibel mit dem aktiven Stoff, im Kontext der Impfstoffverabreichung. Zusätzlich zu einem geeigneten Vehikel kann ein pharmazeutisch annehmbarer Träger herkömmliche Impfstoffzusatzstoffe enthalten, wie Verdünnungsmittel, Adjuvantien, Antioxidationsmittel, Konservierungsmittel und Löslichmachungsmittel.

[0059] In einer alternativen Ausführungsform werden Zellen, die das Antigen tragen, in einem Vollzellimpfstoff verwendet. Zellen, die das Antigen tragen, können identifiziert und zur Verwendung im Vollzellimpfstoff ausgewählt werden, indem Antikörper zu einem Stamm verwendet werden, von dem bekannt ist, daß er das Antigen trägt, und bevorzugter indem monoklonale Antikörper zu isoliertem Antigen verwendet werden, wie hierin beschrieben. In dieser Hinsicht kann ein einfaches Objektträgeragglutinationsexperiment, in dem Antikörper

zum Antigen mit Zellen vermischt werden, verwendet werden.

[0060] Der hinterlegte Stamm ATCC 202176 ist ein repräsentativer Staphylococcus-Stamm, der das Antigen trägt, und er kann verwendet werden, um Antikörper zu erzeugen, die nützlich bei der Identifizierung anderer Stämme sind, die das Antigen tragen. Es ist jedoch nicht notwendig, den hinterlegten Stamm zu verwenden, um entweder das Antigen, den Vollzellimpfstoff oder Antikörper, die nützlich sind bei der Identifizierung anderer Zellen, die das Antigen tragen, zu verwenden. ATCC 302176 stellt lediglich ein immunologisches Mittel zur Identifizierung solcher Zellen dar.

[0061] Wie für gereinigten Antigen-Impfstoff oben beschrieben, umfaßt der Vollzellimpfstoff auch einen pharmazeutisch annehmbaren Träger. Der Vollzellimpfstoff kann fakultativ auch herkömmliche Impfstoffzusatzstoffe enthalten, wie etwa Verdünnungsmittel, Adjuvantien, Antioxidationsmittel, Konservierungsmittel und Lösungsmittel. In einer bevorzugten Ausführungsform enthält der Vollzellimpfstoff nur Zellen, die das Antigen tragen, und schließt keine Zellen aus Staphylococcus-Stämmen ein, die das Antigen nicht tragen.

[0062] Impfstoffe gemäß der Erfindung können einer Person verabreicht werden, die nicht bereits mit Staphylococcus infiziert ist, um dadurch eine gegen Staphylococcus schützende Immunreaktion (humoral oder zellulär) in dieser Person zu induzieren. Alternativ können Impfstoffe innerhalb der vorliegenden Erfindung einer Person verabreicht werden, in der Staphylococcus-Infektion bereits aufgetreten ist, aber in einem ausreichend frühen Stadium ist, daß die durch den Impfstoff erzeugte Immunreaktion eine weitere Verbreitung der Infektion wirkungsvoll hemmt.

[0063] Durch einen anderen Ansatz kann ein Impfstoff der vorliegenden Erfindung einer Person verabreicht werden, die dann als eine Quelle für Globulin wirkt, das in Reaktion auf die Provokation vom spezifischen Impfstoff erzeugt wird („hyperimmunes Globulin“), der gegen Staphylococcus gerichtete Antikörper enthält. Eine so behandelte Person würde Plasma spenden, aus dem dann hyperimmunes Globulin erhalten, über herkömmliche Plasmafraktionierungsmethodik, und einer weiteren Person verabreicht würde, um Resistenz gegen Staphylococcus-Infektion zu verleihen oder eine solche zu behandeln. Hyperimmune Globuline gemäß der Erfindung sind besonders nützlich für Individuen mit beeinträchtigtem Immunsystem, für Individuen, die invasive Verfahren durchlaufen, oder wo die Zeit es nicht erlaubt, daß das Individuum seine eigenen Antikörper in Reaktion auf die Impfung produziert. In ähnlicher Weise können monoklonale oder polyklonale anti-Staphylococcus-Antikörper, die gemäß der vorliegenden Erfindung erzeugt sind, an ein Immuntoxin konjugiert und einer Person verabreicht werden, in der Staphylococcus-Infektion bereits aufgetreten ist, sich aber noch nicht breit verteilt hat. Zu diesem Zweck würde Antikörpermateriale, das gemäß der vorliegenden Beschreibung erzeugt worden ist, in einem pharmazeutisch annehmbaren Träger, wie hierin definiert, verabreicht werden.

[0064] Die vorliegende Erfindung wird weiter durch Bezugnahme auf die folgenden, veranschaulichenden Beispiele beschrieben.

Beispiel 1: Fermentation von Staphylococcus

[0065] ATCC 202176, ein Stamm von *S. epidermidis*, der das Antigen trägt, wurde in einem 50-Liter-Fermenter in Columbia-Brühe, supplementiert mit 4% NaCl, fermentiert. Die Fermentation wurde mit einem Liter einer 16 Stunden alten Impfkultur gestartet. Zellen wurden 24 Stunden mit geringer Belüftung (1 v.v.m.) und milder Bewegung (200 UPM) bei 37°C fermentiert. Im Anschluß an die Fermentation wurden die Zellen mit 2% Endkonzentration von Phenol zu Ethanol (1:1) abgetötet und anschließend zentrifugiert, um die Zellen vom Überstand zu trennen.

[0066] Zellen, die als ein Impfstoff verwendet werden sollen, um Vollzellantiserum herzustellen, wurden über Nacht bei Raumtemperatur in 3% Formalin fixiert. Zellen zur Reinigung von Antigenen wurden durch Zugabe von Phenol-Ethanol (1:1, vol/vol) zum Fermenter auf eine Endkonzentration von 2% und langsames Mischen für 2 Stunden bei 15–20°C abgetötet. Keine lebensfähigen Zellen wurden nach dieser Behandlung nachgewiesen. Die Zellen wurden dann durch Zentrifugation bei $14.500 \times g$ geerntet und bei –70°C bis zur Verwendung aufbewahrt.

Beispiel 2: Herstellung von Vollzellantiserum

[0067] Formalin-fixierte Zellen aus Beispiel 1 wurden auf $OD_{540nm} = 1$ eingestellt und wurden intravenös in Kaninchen injiziert. Kein Adjuvans wurde verwendet. Die Kaninchen wurden wöchentlich zur Ader gelassen und positives Vollzellserum wurde gesammelt und gepoolt. IgG wurde aus Vollzellserum mit einer Protein G-Affini-

tätssäule gereinigt.

Beispiel 3: Reinigung von Antigen

[0068] Antigen wurde aus Zellpaste extrahiert. Eine Suspension der Zellpaste (0,5 g/ml) wurde für 4 Stunden bei 37°C mit Pronase (1 mg/g Zellen) und anschließend mit Lysostaphin (175 U/g Zellen), DNase und RNase (jeweils 0,1 mg/g) behandelt und dann über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Die Suspension wurde 10% in Trichloressigsäure (TCA) gemacht und für 4 Stunden bei 60°C inkubiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand mit 1M NaOH auf pH 7,0 neutralisiert, gefolgt von sequentieller Ausfällung mit 25–75% kaltem Ethanol in Gegenwart von 1 mM CaCl_2 . Nukleinsäuren und Proteine mit hohem Molekulargewicht wurden aus neutralisiertem Überstand ausgefällt, indem er auf 25% Ethanol eingestellt und bei 4°C für 4 Stunden inkubiert wurde. Nach Zentrifugation wurde der Überstand auf 75% Ethanol eingestellt und bei 4°C für 4–12 Stunden inkubiert, um antigenhaltiges Material auszufällen.

[0069] Der Niederschlag, der das rohe Antigen enthielt, wurde in Wasser gelöst, und restliches Ethanol wurde durch Dialyse entfernt. Das dialysierte Material wurde auf 0,01 M Tris-HCl pH 7,0, 0,3 M NaCl eingestellt, und restliche Teichonsäure wurde durch Anionenaustauschchromatographie auf einer Q-Sepharose-Säule in Durchflußmodus mit 0,01 M Tris-HCl pH 7,0, 0,3 M NaCl entfernt. Fraktionen wurden durch Kapillarfällung mit für das Antigen spezifischen Antikörpern getestet, um antigenhaltige Fraktionen zu bestimmen. Antigenhaltige Fraktionen wurden gegen Wasser (3×5 l) dialysiert, lyophilisiert und mit Lysozym (0,5 mg/g Zellpaste) für 3 Stunden bei 37°C behandelt, um restliches Peptidoglykan zu verdauen. Die enzymbehandelte, rohe antigenhaltige Fraktion wurde erneut in 0,01 M Tris-HCl pH 7,0 suspendiert und erneut auf einer Q-Sepharose-Säule in einem linearen Gradienten von 0,1–0,25 M NaCl chromatographiert. Phosphor-negative und Antigen-positive Fraktionen, bestimmt durch kolorimetrische Tests bzw. Kapillarfällung mit monospezifischem Antiserum aus Beispiel 2, wurden gepoolt, gegen Wasser dialysiert und lyophilisiert. Das meiste Antigen eluierte bei 0,2 M NaCl. Das rohe Antigen wurde weiter auf einer Sepharose-CL6B-Säule gereinigt, um im wesentlichen reines Antigen zu erhalten. Antigenhaltige Fraktionen wurden gepoolt, gegen Wasser dialysiert und gefriergetrocknet.

Beispiel 4: Charakterisierung von Antigen

[0070] Analyse von gereinigtem Antigen mit GLC-MS zeigte das Vorhandensein von GlcNAc als einer hauptsächlichen Glykosylkomponente. Dies wurde bestätigt durch $^1\text{H-NMR}$ - und $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektroskopie des Antigens, die ein anomeres Signal bei δ 4,88 bzw. δ 100,48 ppm zeigten. Das Vorhandensein eines einzelnen anomeren Signals bestätigt das Vorhandensein von Monosaccharid als einer Hauptkomponente. Signale, die O-Acetylgruppen entsprechen, sind nicht zu finden.

[0071] Ein kleiner Wert für $J_{\text{H1,H2}}$ ($< 1,0$ Hz) zeigte eine α -Konfiguration für das Kohlehydrat, die durch eine Messung von $c = 173$ Hz für die $J_{\text{C,H}}$ -Kopplungskonstante bestätigt wurde. Signale bei δ 24,860 ppm (NAc-CH_3) und δ 176,814 ppm (NAc-CO) in $^{13}\text{C-NMR}$ zeigten, daß das Glucosamin N-acetyliert war, was den Kohlehydratteil des Antigens zu 2-Acetamido-2-desoxy- α -D-glucopyranosid macht. Andere $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrumsignale erscheinen bei δ 75,122, 73,953, 73,865, 73,807, 72,939, 69,847, 69,638, 69,585, 63,515 bzw. 56,321.

[0072] Aminosäureanalyse des Antigens zeigte das Vorhandensein von Serin, Alanin, Asparaginsäure/Asparagin, Valin und Threonin in Molverhältnissen von ungefähr 39:25:16:10:7. Aminosäuren stellten etwa 32 Gew.-% des Antigenmoleküls dar.

[0073] Die Mobilität des gereinigten Antigens bei Immunelektrophorese (IEF) zeigte das Vorhandensein negativ geladener Gruppen. Das gereinigte Antigen enthielt keinen neutralen Zucker, nachgewiesen mit dem Phenol-Schwefelsäure-Test.

Beispiel 5: Herstellung von Antigen-Immunträger-Konjugaten

[0074] Gereinigtes Antigen wurde durch Hydrolyse in 50 mM Essigsäure bei 100°C für 30 Minuten oder 80°C für 90 Minuten teilweise depolymerisiert. Die Reaktionsmischung wurde gefriergetrocknet, und Essigsäure wurde durch Lyophilisation entfernt. Ein teilweise hydrolysiertes Antigen wurde in 0,5 M ADH bis zu seiner Endkonzentration von 5 mg/ml gelöst, und der pH wurde mit 0,1 M HCl auf 5,6 eingestellt. Eine Antigen-Lösung wurde 100 mM EDAC gemacht, durch Zugabe von EDAC (als einem Pulver), und der pH wurde mit 0,1 M HCl für 1 Stunde bei 5,6 gehalten. Die Reaktionsmischung wurde dann gegen 0,2 M NaCl (1X) dialysiert, dann auf einer Sephadex-G25-Säule ($2,6 \times 30$ cm) entsalzt und gefriergetrocknet. Die Menge an ADH, die in das Anti-

gen eingebaut ist, wurde kolorimetrisch mit dem Trinitrobenzolsulfonsäure(TNBS)-Test unter Verwendung von ADH als einem Standard bestimmt.

[0075] ADH-derivatisiertes Antigen (10 mg) wurde in 1.795 µl 0,1 M MES-Puffer pH 5,6 gelöst, und 205 µl rEPA-Lösung (48 mg/ml), die 10 mg rEPA darstellen, wurden zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde durch Zugabe von EDAC (als einem Pulver) 100 mM EDAC gemacht, und die Mischung wurde bei Raumtemperatur für 60 Minuten gerührt. Die Reaktion wurde gestoppt, indem der pH mit 1 M MES-Natriumsalz (pH 9,21) auf 7,0 gebracht wurde. Reines Konjugat wurde durch Ausschlußchromatographie auf Sephacryl-S-300-Säule, die mit PBS eluiert wurde, erhalten. Die Menge an Antigen und Protein im Konjugat wurde durch kompetitiven ELISA und Coomassie-Blau-Test (Pierce) unter Verwendung des entsprechenden Antigens oder von BSA als Standards bestimmt. Das gleiche Verfahren wurde verwendet, um Antigen-Dtd-Konjugat herzustellen.

Beispiel 6: Herstellung von Antiseren zu Antigen-Immunträger-Konjugaten

[0076] Weiße weibliche Neuseeland-Kaninchen wurden durch subkutane Injektion mit 50 µg Antigen-Immunträger-Konjugat, hergestellt gemäß Beispiel 5, an den Tagen 0, 14 und 28 immunisiert. Die erste Injektion wurde mit einem gleichen Volumen von vollständigem Freund'schen Adjuvans (CFA) verabreicht und anschließende Injektionen wurden mit unvollständigem Freund'schen Adjuvans (IFA) verabreicht. Testaderlasse, die von den Kaninchen abgenommen wurden, wurden auf das Vorhandensein von ausfallenden Kaninchen-Antikörpern, die zum Antigen spezifisch waren, mit dem sie immunisiert wurden, überwacht. Weitere Injektionen wurden nach Erfordernis verabreicht, um den Titer zu boosten.

[0077] Kaninchen wurden zur Ader gelassen, um Kaninchen-Antiseren mit hohem Titer zu erhalten, die Antikörper enthielten, die spezifisch zum Antigen waren, mit dem sie immunisiert wurden. Die Antikörper waren in der Lage, das Abtöten von Zellen, die das Antigen tragen, durch HL 60 in Gegenwart von Komplement zu vermitteln. Mit Antigen-rEPA- oder Antigen-Dtd-Konjugaten immunisierte Kaninchen waren auch in der Lage, antigenspezifische Antikörper auszulösen. Diese Antikörper ergaben Niederschläge mit dem Antigen in Kapillare.

[0078] Es wurde mit ELISA gezeigt, daß gereinigtes Konjugatseren-IgG 16,0 mg/ml Gesamt-IgG und 1,54 mg/ml antigenspezifisches IgG enthielt. Konjugat-IgG wurde in Opsonophagozytose-Tests verwendet, um die Fähigkeit der spezifischen Antikörper zu bewerten, Opsonophagozytose entsprechender Staphylococcus-Bakterien durch HL-60-Zellen in in-vitro-Tests zu vermitteln, und in Tiermodellen, um Wirksamkeit in vivo zu bewerten.

Beispiel 7: In-vitro-Opsonophagozytose-Tests

[0079] Bakterien von ATCC 202176, einem Staphylococcus-Stamm, der das Antigen trägt, wurden von Vorratsperlen auf eine neue Platte mit tryptischem Sojaagar übertragen. Die Platte wurde für 18–20 Stunden bei 37°C in 5% CO₂ inkubiert. Die Bakterien wurden von der Platte abgekratzt und für Inokulation von 200 ml Columbia-Brühe, supplementiert mit 4% NaCl, verwendet. Bakterien wurden 18–20 Stunden bei 37°C inkubiert, dann bei 2.000 UPM für 10 Minuten bei 25–35°C zentrifugiert, und der Überstand wurde entfernt. Die pelletierten Bakterien wurden in 2 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung erneut suspendiert und verwendet, um eine Bakteriensuspension mit einer optischen Dichte von 0,1 bei 650 nm herzustellen.

[0080] Eine 1:200-verdünnte Probe, hergestellt aus der oben beschriebenen Bakterien-Suspension, in MEM-Medium, supplementiert mit 0,1 % Gelatine, wurde als Arbeitsvorrat der Bakterienlösung verwendet. Dieses Bakterien-Präparat wurde gegen entsprechende Antiseren auf positive Objektträgeragglutination getestet. Der Bakterien-Arbeitsvorrat wurde in Mikrotiterplattenvertiefungen mit der entsprechenden Verdünnung von MEM-Medium geladen.

[0081] PMNs wurden aus HL-60-Zellen erhalten, eingestellt auf eine Konzentration von $1,0 \times 10^6$ Zellen pro ml in MEM-Medium, supplementiert mit 0,1% Gelatine. Die PMN-Zellen wurden bei 1.000 UPM für 10 Minuten bei 30–35°C zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in 5 ml MEM-Medium, supplementiert mit 0,1% Gelatine, erneut suspendiert und bei 1.000 UPM für 10 Minuten zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in 1 ml MEM-Medium, supplementiert mit 0,1% Gelatine, erneut suspendiert, um eine Arbeitskonzentration von 1×10^6 /ml zu liefern.

[0082] Ein menschliches Komplement, hergestellt aus menschlichem Serum, wurde auf 1:80 in MEM-Medium, supplementiert mit 0,1% Gelatine, verdünnt. Die Reaktionsmischung in den Mikrotiterplattenvertiefungen enthielten 50 µl Bakterien [10^6 Zellen/ml], 50 µl verdünnte Seren, 50 µl PMN [1×10^6 Zellen/ml] und 50 µl Kom-

plement [1:80], um ein Gesamtvolumen von 200 µl zu ergeben. Zum Zeitpunkt 0 wurde eine 10 µl-Probe von der Reaktionsplatte 1:5, 1:10 und 1:50 reihenverdünnt. Eine 10 µl-Probe jeder Verdünnung wurde auf eine Platte mit tryptischem Sojaagar (TSA) plattiert. Die TSA-Platten wurden über Nacht bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Nach der Verdünnung zum Zeitpunkt 0 wurde die Reaktionsplatte bei 37°C für 90 Minuten inkubiert. Die Proben wurden erneut vermischt. Eine 10 µl-Probe von der Reaktionsplatte wurde 1:5, 1:10 und 1:50 reihenverdünnt. Eine 10 µl-Probe jeder Verdünnung wurde auf eine TSA-Platte plattiert, die dann über Nacht bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert wurde.

[0083] Die Bakterienkolonien wurden für jede Verdünnung/Probe/Platte gezählt und die prozentuale Abtötung von Bakterien wurde mit der Formel berechnet:

$$\% \text{ Abtötung} = \frac{\text{Anzahl Kolonien bei } T_0 - \text{Anzahl Kolonien bei } T_{90} \times 100}{\text{Anzahl Kolonien bei } T_0}$$

[0084] Sowohl Vollzellenantiserum von Kaninchen, die mit ATCC 202176 immunisiert worden waren, als auch Kaninchen-Antikörper, die gegen Antigen-Dtd-Konjugate gezogen worden waren, vermittelten die Opsonophagozytose von Staphylococcus durch HL-60 in Gegenwart von menschlichem Komplement. Opsonische Aktivität von sowohl Vollzellenantisera als auch anti-Antigen-rEPA-Konjugat-Kaninchen-Antikörpern wurden durch Antigen vollständig herausabsorbiert.

Beispiel 8: In-vivo-Schutz von Mäusen vor letaler Staphylococcus-Provokation durch Impfung mit Antigen-rEPA-Konjugat

[0085] Insgesamt 24 Mäuse wurden in drei Gruppen mit 8 Mäusen in jeder Gruppe aufgeteilt. Die Mäuse in der ersten Gruppe wurden mit einer intraperitonealen Injektion von 2,5 µg gereinigtem Antigen-rEPA-Konjugat, hergestellt gemäß Beispiel 5, und IFA immunisiert. Den Mäusen in der zweiten Gruppe wurde PBS plus IFA injiziert, während den Mäusen in der dritten Gruppe PBS injiziert wurde. Die Mäuse wurden zweimal, in Zwei-Wochen-Intervallen, mit demselben Impfstoff oder derselben Kontrolldosis geboostet.

[0086] Eine Woche nach der dritten Injektion (zweiter Boost) wurden die Mäuse mit $1,15 \times 10^8$ cfu von Stamm #V01048 provoziert, einem schleimproduzierenden Stamm von *S. epidermidis*, der das Antigen trägt, in 5% Schweinemucin. Die provozierten Mäuse wurden auf Morbidität und Mortalität überwacht. Die Ergebnisse zeigten, daß 75% (2/8) der Mäuse in der ersten Gruppe letale Provokation überlebten und an Tag 216 im Anschluß an die Provokation immer noch am Leben waren, während alle Mäuse in der zweiten und der dritten Gruppe bis Tag 41 im Anschluß an die Provokation starben.

Beispiel 9: In-vivo-Schutz von Mäusen vor letaler Staphylococcus-Provokation mit Antigen-spezifischen monoklonalen Antikörpern

[0087] Die prophylaktische Wirkung von Antigen-spezifischem monoklonalen Antikörper wurde im selben Mäusemodell unter Verwendung des schleimproduzierenden *S. epidermidis*-Stammes #977, der das Antigen trägt, für die Provokation bewertet. Gruppen von Mäusen wurden subkutan mit entweder 0,5 mg oder 1,0 mg von *S. epidermidis*-Antigen-spezifischem monoklonalen Antikörper, 1 mg von *E. coli*-spezifischem monoklonalen Antikörper bzw. 1 mg *S. epidermidis*-Schleim-spezifischem monoklonalen Antikörper immunisiert. 24 Stunden nach Immunisierung wurden die Mäuse intraperitoneal mit 1×10^8 CFU Bakterien in 6% Schweinemucin provoziert, und die Mäuse wurden auf Morbidität und Mortalität überwacht.

[0088] Die Ergebnisse zeigten dosisabhängigen Schutz durch zu Antigen spezifizieren monoklonalen Antikörper gemäß der Erfindung. Weder der Antikörper, der für Schleim spezifisch ist, noch der Antikörper, der spezifisch für *E. coli* ist, lieferte Schutz gegen die Provokation.

Beispiel 10: In-vivo-Schutz von Mäusen vor Antibakteriämie durch Impfung mit Antigen-Dtd-Konjugat

[0089] Insgesamt 80 Mäuse wurden in zwei Gruppen mit 40 Mäusen in jeder Gruppe aufgeteilt. Die Mäuse in der ersten Gruppe wurden mit einer subkutanen Injektion von 2,5 µg von gereinigtem Antigen-Dtd-Konjugat, hergestellt gemäß Beispiel 5, und IFA immunisiert. Den Mäusen in der zweiten Gruppen wurde MEP-Konjugat (ein Konjugat von Mucoïdexpolysaccharid aus *Pseudomonas aeruginosa* und Dtd) plus IFA injiziert. Die Mäuse wurden zweimal, in Zwei-Wochen-Intervallen, mit demselben Impfstoff oder derselben Kontrolldosis geboostet.

[0090] Eine Woche nach der dritten Injektion wurden die Mäusen intraperitoneal mit einer subletalen Dosis ($5,0 \times 10^7$ cfu) von Stamm #V01048, einem schleimproduzierenden Stamm von *S. epidermidis*, der das Antigen trägt, in 5% Schweinemucin provoziert. Provozierte Mäuse wurden ausgeblutet und auf positive Bakterienkulturen nach 6, 24, 30 und 48 Stunden getestet (10 Mäuse zu jedem Zeitpunkt). Die Ergebnisse zeigten, daß Immunisierung mit Antigen-rEPA-Konjugat Bakteriämie in den provozierten Mäusen signifikant verringerte, durch Erleichterung der Ausscheidung von Bakterien aus dem Blut. Die Kontrollgruppe, die mit dem MEP-Konjugat immunisiert worden war, war nicht gegen Bakteriämie geschützt.

Beispiel 11: Fähigkeit von Antigen, in vitro das Anhaften von Staphylococcus-Bakterien an intravenösen Kathetern zu blockieren

[0091] Die Fähigkeit des Antigens, das Anhaften des schleimproduzierenden *S. epidermidis*-Stammes #977, der das Antigen trägt, und des *S. haemolyticus*-Stammes 4162, der das Antigen trägt, (bestimmt durch Doppelimmundiffusion von rohem Bakterienextrakt), an intravenösen Kathetern zu vermitteln, wurde in einem in-vitro-Anhaftungstest bewertet. Die Bakterien wurden über Nacht bei 37°C auf einer Columbia-Agarplatte, supplementiert mit 4% Natriumchlorid, angezogen. Am folgenden Morgen wurde eine isolierte Kolonie von dieser Platte in 5 ml Columbia-Brühe, supplementiert mit 4% Natriumchlorid, inokuliert. Diese Kultur wurde dann für 4 Stunden unter Rütteln bei 37°C angezogen und dann auf eine OD von 0,12 bei 650 nm eingestellt.

[0092] Ein einzelner 1¼" IV-Insyte-Katheter [Radiopaque Vialon®-Material, Becton Dickinson Vascular Access, Sandy, Utah] wurde bei 37°C für 30 Minuten in einem 1 ml-Volumen einer 0,5 mg/ml Antigen-Lösung in PBS inkubiert. Die Katheter wurden dann vorsichtig mit kaltem PBS gewaschen, in 1 ml Bakterien-Suspension untergetaucht und für 30 Minuten bei 37°C ohne Rütteln inkubiert. Die Katheter wurden dann vorsichtig wieder mit kalter PBS-Lösung gewaschen und in drei gleiche Stücke geschnitten. Die zerschnittenen Katheter wurden in 500 µl PBS untergetaucht und für 1 Minute auf Eis beschallt, um an den Katheter gebundene Bakterienzellen durch Beschallung zu entfernen. Diese Suspension wurde 1:10, 1:100 und 1:1.000 in PBS verdünnt und auf TFA-Platten plattiert und 18–20 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Bakterienkolonien wurden gezählt, und die Unterschiede in der Bakterienrückgewinnung von verschiedenen Antigen-beschichteten Kathetern wurden bestimmt.

[0093] Die Ergebnisse zeigten, daß Vorinkubation der intravenösen Katheter mit Antigen, isoliert aus *S. epidermidis* 202176, das Anhaften des schleimproduzierenden *S. epidermidis*-Stammes #977, der das Antigen trägt, um 97,5% verringerte, und das Anhaften von *S. haemolyticus* um 92% verringerte. Das mit dem Antigen, das aus *S. epidermidis* 202176 aufgereinigt war, identische Antigen wurde in rohem Zellwandextrakt von *S. haemolyticus* und *S. hominis* nachgewiesen, was nahelegt, daß *S. epidermidis*-Antigen für das Anhaften von Koagulase negativen Staphylococci an intravenösen Kathetern verantwortlich ist.

Beispiel 12: Fähigkeit von Fab-Fragmenten aus Antigen-spezifischen Antikörpern, das Anhaften von Staphylococcus-Bakterien an intravenösen Kathetern in vitro zu blockieren

[0094] Die Fähigkeit der aus Antigen-spezifischen Antikörpern hergestellten Fab-Fragmente, das Anhaften des schleimproduzierenden *S. epidermidis*-Stammes RP62A, eines Stammes, der das Antigen trägt, an einem intravenösen Katheter, der in menschlichem Plasma vorinkubiert worden war, zu blockieren, wurde in einem in-vitro-Anhaftungstest bewertet. Die Bakterien wurden über Nacht bei 37°C auf einer Columbia-Agarplatte, supplementiert mit 4% Natriumchlorid, angezogen. Am folgenden Morgen wurde eine isolierte Kolonie von dieser Platte in 5 ml Columbia-Brühe, supplementiert mit 4% Natriumchlorid, inokuliert. Diese Kultur wurde für 4 Stunden unter Rütteln bei 37°C angezogen und dann auf eine OD von 0,12 bei 650 nm eingestellt. Bakterien-Suspension (1 ml) wurde bei 3.000 UPM zentrifugiert und der Pellet wurde in 1 ml Fab-Lösung (1 mg/ml) erneut suspendiert und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

[0095] Ein einzelner 1¼" IV-Insyte-Katheter [Radiopaque Vialon®-Material, Becton Dickinson Vascular Access, Sandy, Utah] wurde bei 37°C für 30 Minuten in einem 1 ml-Volumen einer 0,5 mg/ml Antigen-Lösung in PBS inkubiert. Die Katheter wurden dann vorsichtig mit kaltem PBS gewaschen, in 1 ml Bakterien-Suspension untergetaucht und für 30 Minuten bei 37°C ohne Rütteln inkubiert. Die Katheter wurden dann vorsichtig wieder mit kalter PBS-Lösung gewaschen und in drei gleiche Stücke geschnitten. Die zerschnittenen Katheter wurden in 500 µl PBS untergetaucht und für 1 Minute auf Eis beschallt, um an den Katheter gebundene Bakterienzellen durch Beschallung zu entfernen. Diese Suspension wurde 1:10, 1:100 und 1:1.000 in PBS verdünnt und auf TFA-Platten plattiert und 18–20 Stunden bei 37°C inkubiert.

[0096] Die Bakterienkolonien wurden gezählt, und die Unterschiede in der Bakterienrückgewinnung von ver-

schiedenen Antigen-beschichteten Kathetern wurden bestimmt.

[0097] Die Ergebnisse zeigten, daß das Anhaften von schleimproduzierendem *S. epidermidis*-Stamm RP62A, der das Antigen trägt, durch die Vorbehandlung von Kathetern mit Fab-Fragmenten, hergestellt aus normalen Kaninchen-Antikörpern, nicht beeinflusst wurde. Vorbehandlung derselben Bakterien mit Fab-Fragmenten, hergestellt aus Antigen-spezifischen Kaninchen-Antikörpern, hemmte das Anhaften von Bakterien an den intravenösen Katheter wirkungsvoll. Diese Daten und die Daten aus Beispiel 11 legen nahe, daß Antigen eine wichtige Rolle beim Anhaften von Koagulase-negativen Staphylococci an biologischen Materialien spielt. Das Hemmen der Anhaftung durch Antigen und Antigen-spezifische Antikörper kann eine wichtige Rolle bei der Verhinderung von mit Fremdkörpern zusammenhängenden Infektionen spielen, die durch Koagulase-negativen Staphylococcus verursacht werden.

Patentansprüche

1. Isoliertes Staphylococcus-Antigen, das (a) Aminosäuren und ein N-acetyliertes Hexosamin in einer α -Konfiguration umfasst, (b) keine O-Acetylgruppen enthält, die mit kernmagnetischer Resonanzspektroskopie nachweisbar sind, und (3) spezifisch mit Antikörpern zu einem Staphylococcus-Stamm, hinterlegt unter ATCC 202176, bindet.
2. Antigen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß besagtes N-acetylierte Hexosamin 2-Acetamido-2-desoxy-alpha-D-glucopyranosid ist.
3. Antigen nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß besagte Aminosäuren Serin, Alanin, Asparaginsäure/Asparagin, Valin und Threonin umfassen.
4. Antigen nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß besagtes Serin, Alanin, Asparaginsäure/Asparagin, Valin und Threonin in einem Molverhältnis von 39:25:16:10:7 stehen.
5. Antigen-Träger-Konjugat, das ein Antigen nach Anspruch 1 umfasst, gebunden an einen Immunträger.
6. Antigen-Träger-Konjugat nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß besagter Immunträger ein rekombinant erzeugtes, nicht-toxisches Exotoxin A eines mutanten Stammes von *Pseudomonas aeruginosa* ist.
7. Zusammensetzung, die aus einem Antigen nach Anspruch 1 und einem sterilen, pharmazeutisch annehmbaren Träger dafür besteht.
8. Zusammensetzung, die aus einem Antigen-Immunträger-Konjugat nach Anspruch 5 und einem sterilen, pharmazeutisch annehmbaren Träger dafür besteht.
9. Zusammensetzung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß besagter Immunträger ein rekombinant erzeugtes, nicht-toxisches Exotoxin A einer Mutante von *Pseudomonas aeruginosa* ist.
10. Zusammensetzung nach Anspruch 9 zur Verwendung in einem Immuntherapieverfahren, das einen Schritt der Verabreichung einer immunstimulierenden Menge besagter Zusammensetzung an einen Patienten umfasst.
11. Verfahren zur Herstellung eines immuntherapeutischen Mittels gegen Staphylococcus-Infektion, das das Ernten eines hyperimmunen Globulins, das Antikörper enthält, die gegen Staphylococcus gerichtet sind, aus Plasma umfasst, das von Patienten gesammelt ist, die mit einer Zusammensetzung nach Anspruch 9 immunisiert worden sind.
12. Hyperimmunes Globulin, das Antikörper enthält, die gegen ein Antigen nach Anspruch 1 gerichtet sind.
13. Monoklonaler Antikörper, der gegen ein Antigen nach Anspruch 1 gerichtet ist.
14. Hyperimmunes Globulin nach Anspruch 12 zur Verwendung in einem Immuntherapieverfahren, das einen Schritt der Verabreichung besagten Globulins an einen Patienten umfaßt.
15. Impfstoff, der Zellen von Staphylococcus, die ein Antigen tragen, das spezifisch mit Antikörpern zu einem Staphylococcus-Stamm, hinterlegt unter ATCC 202176, bindet, und einen pharmazeutisch annehmbaren

Träger umfasst.

16. Zusammensetzung nach Anspruch 15 zur Verwendung in einem Immuntherapieverfahren, das das Verabreichen einer immunstimulierenden Menge besagter Zusammensetzung an einen Patienten umfasst.

17. Verfahren zur Herstellung eines immuntherapeutischen Mittels gegen Staphylococcus-Infektion, welches umfaßt:

Ernten von Antikörpern, die gegen Staphylococcus gerichtet sind, aus Plasma, das von Patienten gesammelt ist, die mit einer Zusammensetzung nach Anspruch 15 immunisiert worden sind.

18. Immuntherapeutisches Mittel gegen Staphylococcus-Infektion, das Antikörper, die mit dem Verfahren von Anspruch 17 hergestellt sind, in einem pharmazeutisch annehmbaren Träger umfasst.

19. Diagnostischer Test zum Nachweis des Vorhandenseins von anti-Staphylococcus-Antikörper in einer Probe, der umfasst:

Mischen eines Staphylococcus-Antigens nach Anspruch 1 mit einer Probe, die in Verdacht steht, Staphylococcus-spezifischen Antikörper zu enthalten; und

Überwachen besagter Mischung auf Bindung zwischen besagtem Antigen und Staphylococcus-spezifischem Antikörper in besagter Probe.

20. Diagnostischer Test nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß besagtes Antigen auf einer festen Matrix immobilisiert ist.

21. Kit zum Nachweis des Vorhandenseins von anti-Staphylococcus-Antikörper in einer Probe, der: ein Staphylococcus-Antigen nach Anspruch 1 umfasst.

22. Kit nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß besagtes Antigen auf einer festen Matrix immobilisiert ist.

23. Diagnostischer Test zum Nachweis des Vorhandenseins von anti-Staphylococcus-Antigen in einer Probe, der umfasst:

Mischen eines monoklonalen Antikörpers zu einem Staphylococcus-Antigen nach Anspruch 1 mit einer Probe, die in Verdacht steht, Staphylococcus-Antigen zu enthalten; und

Überwachen besagter Mischung auf Bindung zwischen besagtem Antigen und besagtem monoklonalen Staphylococcus-Antikörper.

24. Diagnostischer Test nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß besagter Antikörper auf einer festen Matrix immobilisiert ist.

25. Kit zum Nachweis des Vorhandenseins von anti-Staphylococcus-Antikörper in einer Probe, der: einen monoklonalen Antikörper zu einem Staphylococcus-Antigen nach Anspruch 1 umfasst.

26. Kit nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß besagter monoklonale Antikörper auf einer festen Matrix immobilisiert ist.

27. Verfahren zum Verhindern des Anhaftens von Staphylococcus-Bakterien an einem Katheter, das das Behandeln besagten Katheters mit Antigen nach Anspruch 1 umfasst.

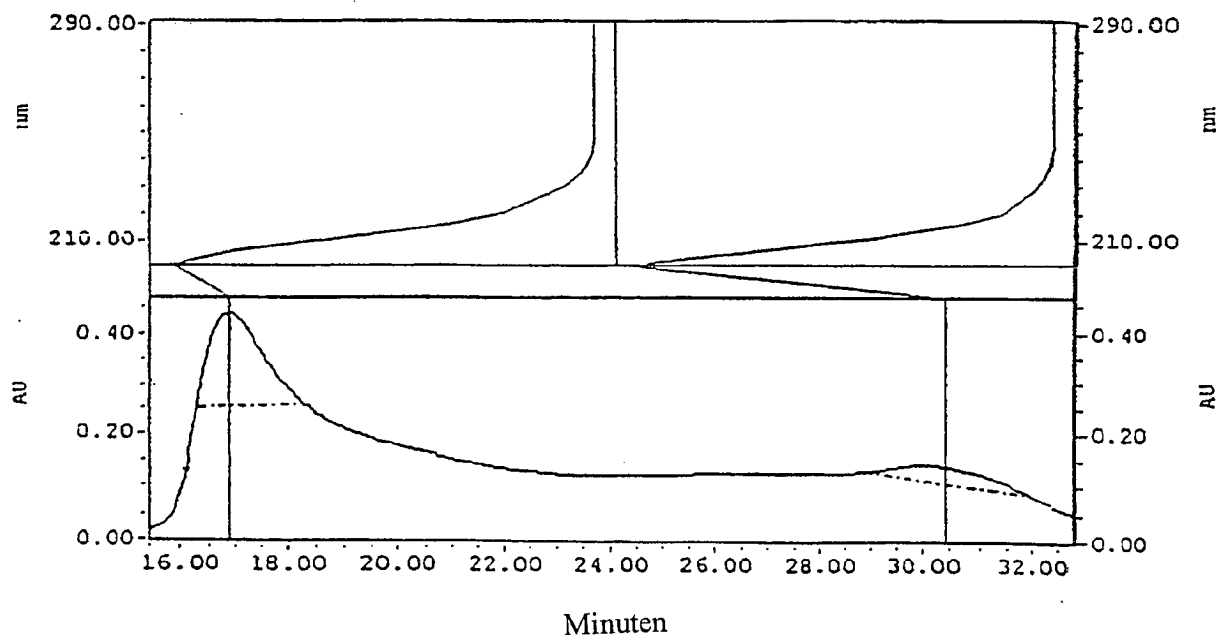
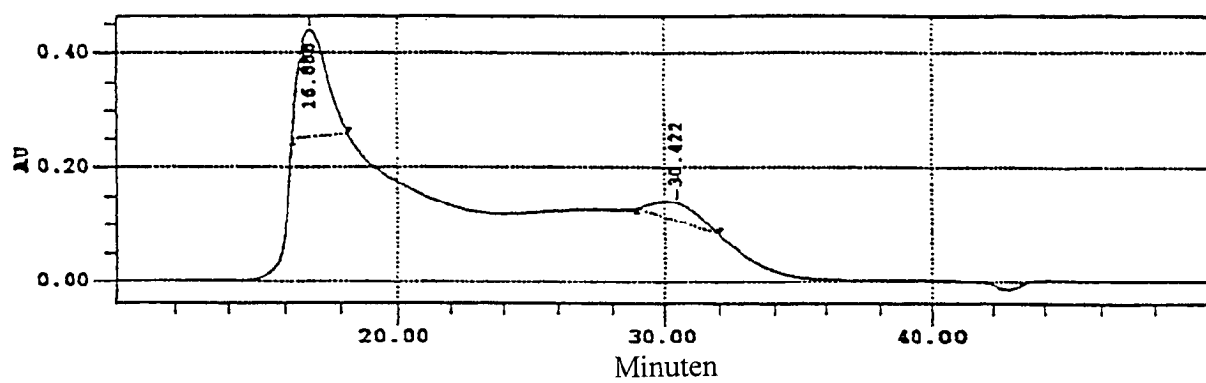
28. Katheter, der mit einem Antigen nach Anspruch 1 beschichtet ist.

29. Impfstoff nach Anspruch 15 zur Verwendung in einem Immuntherapieverfahren, das den Schritt der Verabreichung einer immunstimulierenden Menge besagter Zusammensetzung an einen Patienten umfasst.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

FIG. 1

Chromatographische Profile



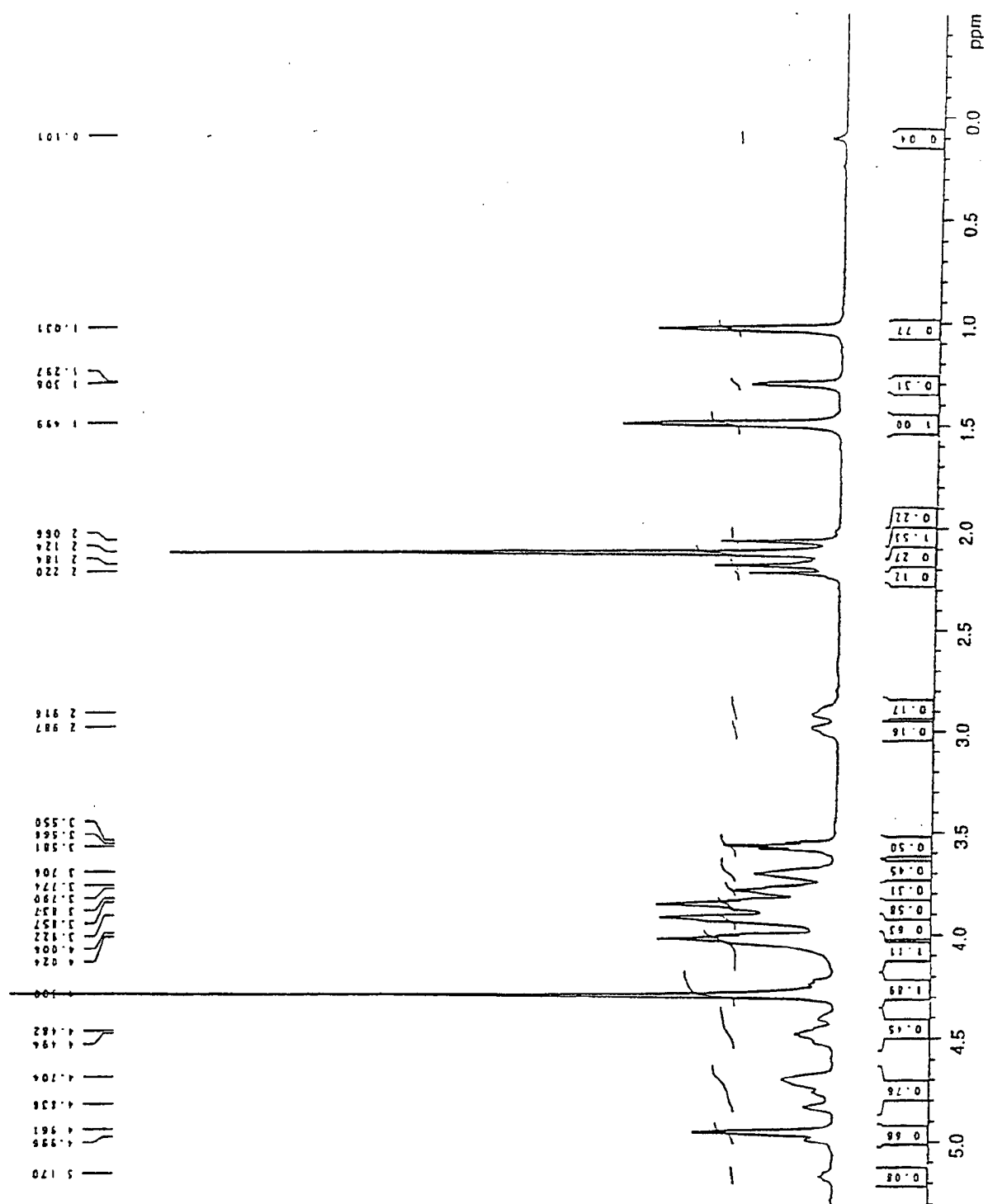


FIG. 2a
1H-NMR-Spektrum

FIG. 2b

¹³C-NMR-Spektrum

STAPH.EPI. 526 93VP05-608 IN D2O AT 353 K



Mdd

SEP1526.003
DATE 2-4-94SF 100.614
SI 74.0
U1 33000.000
S1 32768
TD 8192
SW 20000.000
HZ/PT 1.221PW 9.5
RD 780
AD 203
RG 800
NS 170000
TE 353FW 25000
DZ 6750.000
DP 14H CPDLB 2.000
GB 0.0
CX 40.00
CY 0.0
F1 209.314P
F2 10.740P
HZ/CH 499.481
PPH/CH 4.964
SR 43920.59