

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200380102202.7

[51] Int. Cl.

C07H 1/00 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

A61K 39/09 (2006.01)

A61K 39/385 (2006.01)

A01N 65/00 (2006.01)

A01N 43/04 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 11 月 28 日

[11] 授权公告号 CN 100351260C

[22] 申请日 2003.11.12

[21] 申请号 200380102202.7

[30] 优先权

[32] 2002.11.12 [33] US [31] 60/425,425

[86] 国际申请 PCT/US2003/036358 2003.11.12

[87] 国际公布 WO2004/043405 英 2004.5.27

[85] 进入国家阶段日期 2005.4.27

[73] 专利权人 布赖汉姆妇女医院

地址 美国马萨诸塞州

[72] 发明人 杰拉尔德·B·皮尔

汤姆斯·梅拉-利特安

[56] 参考文献

WO2000/012689 A 2000.3.9

Immunochemical properties of the staphylococcal poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide. MAIRA. LITRAN T. et al. Infect. Immun, Vol. 70 No. 8. 2002

Purification and characterization of the staphylococcal slime-associated antigen and its occurrence among Staphylococcus epidermidis clinical isolates. BALDASSARRI L. et al. Infect. Immun, Vol. 64 No. 8. 1996

审查员 于海江

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 隗永良

权利要求书 17 页 说明书 58 页 附图 5 页

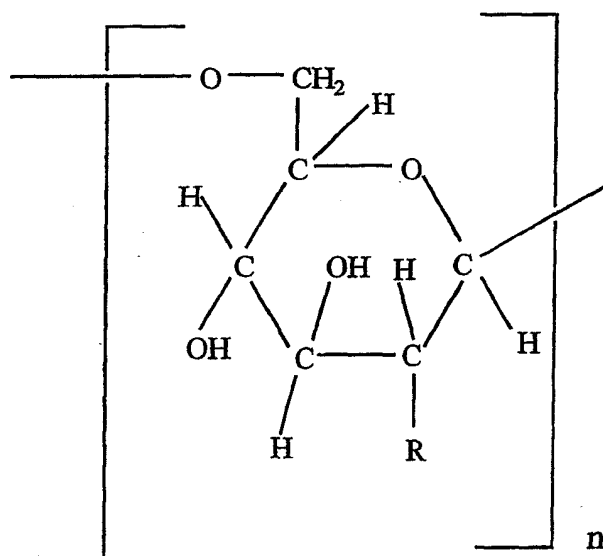
[54] 发明名称

葡萄球菌感染的多糖疫苗

[57] 摘要

本发明涉及葡萄球菌的脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺 (dPNAG) 的组合物。脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺可以从自然资源离析获得, 或者是重新合成。本发明还涉及使用脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺作为疫苗, 诱导了抗金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、其它有关的凝固酶-阴性或者凝固酶-阳性葡萄球菌、以及其它运载细胞内附着基因座有机体感染的主动免疫。本发明还提供了靶向脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺抗体的使用方法, 特别是诱导抗同类感染被动免疫的使用方法。

1. 一种含有离析多糖的组合物，此离析多糖含有长度至少为 4 个单体单元的 β -1, 6-葡糖胺聚合物，其中小于 40% 的葡糖胺氨基基团由乙酸取代，并且此组合物是无菌的。
2. 一种含有离析多糖的组合物，此离析多糖含有与载体化合物结合、长度至少为 2 个单体单元的 β -1, 6-葡糖胺聚合物，其中小于 40% 的葡糖胺氨基基团由乙酸取代。
3. 一种组合物，其包括具有下列结构的离析的多糖：



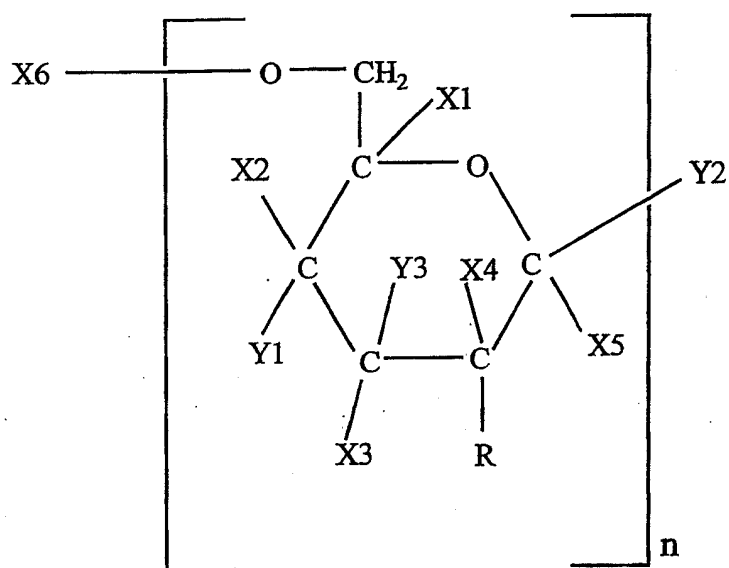
其中 n 是至少为 4 的整数， R 选自 $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$ 和 $-\text{NH}_2$ ，条件是小于 40% 的 R 基团是 $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$ ，并具有至少 800 道尔顿的总分子量。

4. 权利要求 3 的组合物，其中小于 35%、小于 30%、小于 25%、小于 20%、小于 15%、小于 10%、或者小于 5% 的 R 基团是 $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$ 。

5. 权利要求 3 的组合物, 其中 R 基团都不是-NH-CO-CH₃。
6. 权利要求 3 的组合物, 其中 n 选自至少为 6、至少为 10、至少为 20、至少为 50、至少为 100、至少为 200、至少为 300、至少为 400、至少为 500 的整数。
7. 权利要求 1、2 或 3 的组合物, 其中离析的多糖是不同取代的聚合物。
8. 权利要求 1 或 2 的组合物, 其中离析的多糖具有至少 800 道尔顿的分子量。
9. 权利要求 1、2 或 3 的组合物, 其中离析的多糖具有至少 1000 道尔顿、至少 1200 道尔顿、至少 1500 道尔顿、至少 2000 道尔顿、至少 2500 道尔顿、至少 5000 道尔顿、至少 7500 道尔顿、至少 10, 000 道尔顿、至少 25, 000 道尔顿、至少 50, 000 道尔顿、至少 75, 000 道尔顿、至少 100, 000 道尔顿的分子量。
10. 权利要求 1、2 或 3 的组合物, 其中离析的多糖具有至少 125, 000 道尔顿、至少 150, 000 道尔顿、至少 200, 000 道尔顿、至少 250, 000 道尔顿、至少 300, 000 道尔顿、至少 350, 000 道尔顿、至少 400, 000 道尔顿、至少 450, 000 道尔顿、至少 500, 000 道尔顿的分子量。
11. 权利要求 1 或 2 的组合物, 其中 β -1, 6-葡糖胺聚合物具有至少 6 个、至少 10 个、至少 20 个、至少 50 个、至少 100 个、至少 200 个、至少 300 个、至少 400 个、至少 500 个单体单元。

12. 权利要求 1 或 2 的组合物，其中小于 35%、小于 30%、小于 25%、小于 20%、小于 15%、小于 10%、或小于 5%的葡糖胺氨基基团由乙酸取代。
13. 权利要求 1 或 2 的组合物，其中葡糖胺的氨基基团都没有被乙酸取代。
14. 权利要求 1、2 或 3 的组合物，其中此组合物具有至少 90% 的纯度、至少 95%的纯度、至少 97%的纯度、或至少 99%的纯度。
15. 权利要求 1 的组合物，其中离析的多糖与载体化合物结合。
16. 权利要求 1、2 或 15 的组合物，其中离析的多糖通过连接基团与载体结合。
17. 权利要求 1、2 或 15 的组合物，其中载体化合物是肽载体。
18. 权利要求 1、2 或 3 的组合物，还含有药用可接受载体。
19. 权利要求 2 或 3 的组合物，其中此组合物是无菌的。
20. 权利要求 1 或 2 的组合物，其中离析的多糖配制成疫苗。

21. 权利要求 1 或 2 的组合物, 其中离析的多糖由下列结构构成:



其中 X1、X2、X3、X4、X5 和 X6 都单独可以是 H、载体化合物、或连接到载体化合物的连接基团; R 选自 -NH-CO-CH₃ 和 -NH₂ 所组成的组, 其中少于 40% 的 R 基团是 -NH-CO-CH₃; Y1、Y2、Y3 都单独可以是 OH、载体化合物、连接到载体化合物的连接基团。

22. 权利要求 21 的组合物, 其中只有唯一的载体化合物或者连接到载体化合物的连接基团与此结构结合。

23. 权利要求 22 的组合物, 其中 X1、X2、X3、X4、X5 或 X6 中只有唯一一个位置与载体化合物, 或者是与连接到载体化合物的连接基团结合。

24. 权利要求 21 的组合物, 其中 Y1、Y2 或 Y3 中只有唯一一个位置与载体化合物, 或者是与连接到载体化合物的连接基团结合。

25. 权利要求 22 的组合物，其中载体化合物是除 N-乙酰基 β 1-6 葡糖胺以外的多糖。

26. 一种制备权利要求 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、或 13 的离析多糖的方法，其中包括：

用乙醇沉淀来自浓缩的细菌细胞体制品的天然多糖制品；

使用溶菌酶和溶葡球菌素同时消化天然的多糖，然后，按顺序使用核糖酶与蛋白水解酶 K 消化，生成消化的多糖制品；

按尺寸分离消化的多糖制品；

离析乙酰化的多糖部分；

将乙酰化多糖部分脱乙酰处理，生成带有小于 40% 乙酸取代的多糖。

27. 一种制备权利要求 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、或 13 的离析多糖的方法，其中包括：

从细菌培养物制备搀杂的多糖；

使用酸或碱培养搀杂的多糖，生成半纯的多糖制品；

将此制品中和；

在氢氟酸中培养此中和的制品；

从上述制品中离析乙酰化的多糖；

对乙酰化多糖实施脱乙酰处理，生成带有小于 40% 乙酸取代的多糖。

28. 一种制备权利要求 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、或 13 的离析多糖的方法，其中包括：

从细菌培养物制备搀杂的多糖；

使用酸或碱培养搀杂的多糖，生成半纯的多糖制品；

将此制品中和；

在氢氟酸中培养此中和的制品；

从上述制品中离析带有小于 40%乙酸取代的多糖。

29. 权利要求 26、27 或者 28 的方法，其中细菌培养物是凝固酶-阴性葡萄球菌培养物，或者细菌细胞体生产是凝固酶-阴性葡萄球菌细胞体的生产。

30. 权利要求 26、27 或者 28 的方法，其中细菌培养物是金黄色葡萄球菌培养物或者表皮葡萄球菌培养物，或者细菌细胞体生产是凝固酶-阴性葡萄球菌细胞体的生产。

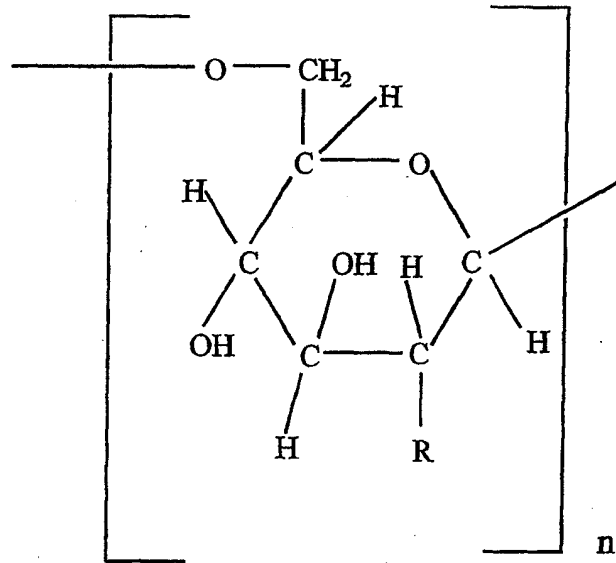
31. 权利要求 26、27 或者 28 的方法，其中离析的多糖具有至少 1000 道尔顿、至少 1200 道尔顿、至少 1500 道尔顿、至少 2000 道尔顿、至少 2500 道尔顿、至少 5000 道尔顿、至少 7500 道尔顿、至少 10,000 道尔顿、至少 25,000 道尔顿、至少 50,000 道尔顿、至少 75,000 道尔顿、或至少 100,000 道尔顿的分子量。

32. 权利要求 26、27 或者 28 的方法，其中离析的多糖具有至少 125,000 道尔顿、至少 150,000 道尔顿、至少 200,000 道尔顿、至少 250,000 道尔顿、至少 300,000 道尔顿、至少 350,000 道尔顿、至少 400,000 道尔顿、至少 450,000 道尔顿、或至少 500,000 道尔顿的分子量。

33. 权利要求 26、27 或 28 的方法，其中此离析的多糖具有至少 90%的纯度、至少 95%的纯度、至少 97%的纯度、或至少 99%的纯度。
34. 权利要求 26、27 或 28 的方法，还包括将至少一个载体化合物与离析的多糖相结合。
35. 权利要求 34 的方法，其中载体化合物通过连接基团与离析多糖相结合。
36. 权利要求 34 的方法，其中载体化合物是肽载体。
37. 权利要求 26 或 27 的方法，其中乙酰化多糖或乙酰化多糖的部分经化学脱乙酰处理。
38. 权利要求 37 的方法，其中乙酰化多糖或乙酰化多糖的部分在碱性溶液中培养进行脱乙酰化处理。
39. 权利要求 26 或 27 的方法，其中乙酰化多糖或乙酰化多糖的部分进行酶促脱乙酰化处理。
40. 权利要求 26 的方法，其中采用层析柱按尺寸分离消化的多糖制品。
41. 权利要求 26、27 或 28 的方法，还包括将离析的多糖配制成疫苗。
42. 一种药用组合物，其中含有加载在药用可接受载体中、具有能够激发免疫响应有效用量的、权利要求 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、15、16、17、21、22、23、24 或 25 的离析多糖。

-
43. 权利要求 42 的药用组合物，还含有辅助剂。
44. 权利要求 42 的药用组合物，其中免疫响应是抗原特异性免疫响应。
45. 如权利要求 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、15、16、17、21、22、23、24 或 25 任意一项所述的离析多糖在制备用于治疗或预防患有或有可能发展为葡萄球菌感染的非啮齿动物体内葡萄球菌感染的药物中的应用。
46. 权利要求 45 的应用，其中葡萄球菌是金黄色葡萄球菌。
47. 权利要求 45 的应用，其中葡萄球菌是表皮葡萄球菌。
48. (删除)
49. 权利要求 45 的应用，其中非啮齿动物病体可以选自灵长类动物、马、奶牛、猪、山羊、绵羊、狗和猫。
50. 权利要求 45 的应用，其中非啮齿动物病体有可能暴露于葡萄球菌。
51. 权利要求 45 的应用，其中非啮齿动物病体已经暴露于葡萄球菌。
52. 权利要求 45 的应用，其中离析的多糖结合辅助剂共同给药。
53. 权利要求 45 的应用，其中将离析的多糖配制成疫苗。

54. 权利要求 45 的应用，其中离析的多糖具有下列结构：



其中 n 至少为 4， R 选自 $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$ 和 $-\text{NH}_2$ ，条件是小于 40% 的 R 基团是 $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$ 。

55. 权利要求 54 的应用，其中病体从未接受过医疗装置移植。

56. 权利要求 45 的应用，其中离析的多糖全身给药。

57. 权利要求 45 的应用，其中离析的多糖与辅助剂共同给药。

58. 权利要求 45 的应用，其中离析的多糖与载体化合物相结合。

59. 权利要求 58 的应用，其中载体化合物是肽载体。

60. 一种制备抗体的方法，其中包括：

将能够产生葡萄球菌特异性抗体的有效用量的、权利要求 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、15、16、17、21、22、23、24 或 25 的离析多糖与辅助剂共同给药病体；

然后，从病体离析出抗体。

61. 一种生成单克隆抗体的方法，其中包括：

将能够产生葡萄球菌特异性抗体的有效用量的、权利要求 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、15、16、17、21、22、23、24 或 25 的离析多糖与辅助剂共同给药病体；

从病体收集脾细胞；

将上述的病体脾细胞与骨髓瘤细胞融合；

收集融合亚克隆产生的抗体。

62. 一种制备抗细菌多糖的多克隆抗体的方法，其中包括：

通过将权利要求 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、15、16、17、21、22、23、24 或 25 的离析多糖与辅助剂共同给药病体，激发抗细菌多糖的免疫响应；
从病体收集抗体。

63. 权利要求 62 的方法，还包括离析抗体。

64. 权利要求 62 的方法，其中病体是兔。

65. 权利要求 62 的方法，其中病体是人类。

66-67. (删除)

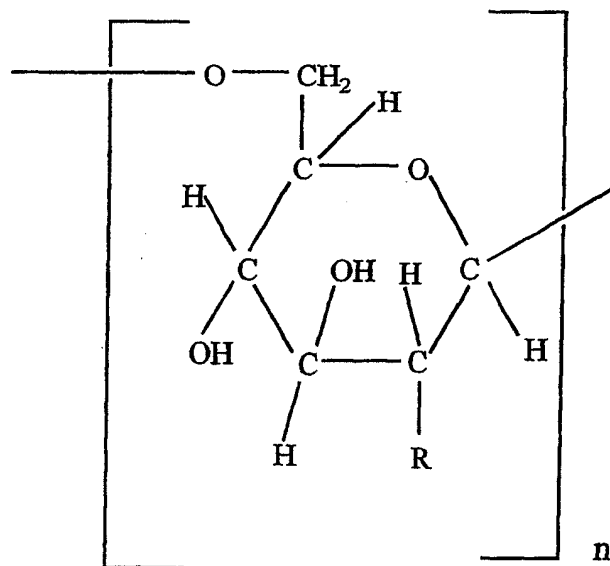
68. 一种含有离析结合剂的组合物，该离析结合剂可以通过其结合权利要求 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、15、16、17、21、22、23、24 或 25 的离析多糖的能力而被识别。

69. 权利要求 68 的组合物，其中离析结合剂是肽。

-
70. 权利要求 69 的组合物，其中肽是抗体、或者抗体的片段。
71. 权利要求 70 的组合物，其中抗体是多克隆抗体。
72. 权利要求 71 的组合物，其中抗体是人源化抗体，或者是嵌合抗体。
73. 权利要求 71 的组合物，其中抗体是人类抗体。
74. 权利要求 68 的组合物，其中离析的结合剂可以结合在可探测的标记上。
75. 权利要求 74 的组合物，其中可探测的标记选自放射性标记、酶、生物素、卵白素和荧光色素。
76. 权利要求 68 的组合物，其中离析的结合剂与杀细菌剂结合。
77. 权利要求 76 的组合物，其中杀细菌剂是抗生素。
- 78-81. (删除)
82. 权利要求 68 的离析结合剂在制备用于抑制葡萄球菌感染的药物中的应用。
83. 权利要求 82 的应用，其中葡萄球菌感染选自表皮葡萄球菌感染和金黄色葡萄球菌感染。
84. 权利要求 82 的应用，其中离析的结合剂与杀细菌剂结合。
85. 权利要求 84 的应用，其中杀细菌剂是抗生素。

86. 权利要求 60, 61 或 62 的方法所产生的抗体或其片断在制备用于抑制葡萄球菌感染的药物中的应用。
87. 权利要求 86 的应用, 其中抗体是人类抗体。
88. 一种权利要求 60, 61 或 62 的方法所产生的抗体或抗体部分, 所述抗体或抗体部分结合天然多糖和脱乙酰的多糖。
89. 权利要求 88 的抗体, 其中脱乙酰的多糖是权利要求 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 21, 22, 23, 24 或 25 的离析的多糖。
90. 一种组合物, 其包括:

具有以下结构的离析的多糖



其中 n 是至少为 4 的整数; R 选自 $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$ 和 $-\text{NH}_2$ 所组成的组, 小于 50% 的 R 基团是 $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$; 并具有至少 800 道尔顿的总分子量。

91. 一种制造权利要求 90 的离析的多糖的方法，其包括：

用乙醇沉淀来自浓缩的细菌细胞体制品的天然多糖制品；

使用溶菌酶和溶葡球菌素同时消化天然的多糖，然后，按顺序使用核糖酶与蛋白水解酶 K 消化，生成消化的多糖制品；

按尺寸分离消化的多糖制品；

离析乙酰化的多糖部分；

将乙酰化多糖部分脱乙酰处理，生成带有小于 50% 乙酸取代的多糖。

92. 一种制造权利要求 90 的离析的多糖的方法，其包括：

从细菌培养物制备搀杂的多糖；

使用酸或碱培养搀杂的多糖，生成半纯的多糖制品；

将此制品中和；

在氢氟酸中培养此中和的制品；

从上述制品中离析乙酰化的多糖；

对乙酰化多糖实施脱乙酰处理，生成带有小于 50% 乙酸取代的多糖。

93. 一种制造权利要求 90 的离析的多糖的方法，其包括：

从细菌培养物制备搀杂的多糖；

使用酸或碱培养搀杂的多糖，生成半纯的多糖制品；

将此制品中和；

在氢氟酸中培养此中和的制品；

从上述制品中离析带有小于 40% 乙酸取代的多糖。

- 94.** 权利要求 91、92 或者 93 的方法，其中细菌培养物是凝固酶阴性葡萄球菌培养物，或者细菌细胞体生产是凝固酶-阴性葡萄球菌细胞体的生产。
- 95.** 权利要求 91、92 或者 93 的方法，其中细菌培养物是金黄色葡萄球菌培养物或者表皮葡萄球菌培养物，或者细菌细胞体生产是凝固酶-阴性葡萄球菌细胞体的生产。
- 96-98.** (删除)
- 99.** 权利要求 91、92 或 93 的方法，还包括将至少一个载体化合物与离析的多糖相结合。
- 100.** 权利要求 99 的方法，其中载体化合物通过连接基团与离析多糖相结合。
- 101.** 权利要求 99 的方法，其中载体化合物是肽载体。
- 102.** 权利要求 91 或 92 的方法，其中乙酰化多糖或乙酰化多糖的部分经化学脱乙酰处理。
- 103.** 权利要求 102 的方法，其中乙酰化多糖或乙酰化多糖的部分在碱性溶液中培养进行脱乙酰化处理。
- 104.** 权利要求 91 或 92 的方法，其中乙酰化多糖或乙酰化多糖的部分进行酶促脱乙酰化处理。
- 105.** 权利要求 91 的方法，其中采用层析柱按尺寸分离消化的多糖制品。
- 106.** 权利要求 91、92 或 93 的方法，还包括将离析的多糖配制成疫苗。

107.一种治疗或者预防非啮齿动物病体的细菌感染的方法，其中包括：

将能够诱导抗细菌感染的免疫响应的有效用量的、权利要求 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、15、16、17、21、22、23、24 25 或 90 的离析多糖给药于患有或者有可能发展成细菌感染的非啮齿动物病体。

108.权利要求 90 的组合物，其中，离析多糖具有至少 1000 道尔顿、至少 1200 道尔顿、至少 1500 道尔顿、至少 2000 道尔顿、至少 2500 道尔顿、至少 5000 道尔顿、至少 7500 道尔顿、至少 10, 000 道尔顿、至少（删除）25, 000 道尔顿、至少 50, 000 道尔顿、至少 75, 000 道尔顿、或至少 100, 000 道尔顿的分子量。

109.权利要求 90 的组合物，其中，离析的多糖具有至少 125, 000 道尔顿、至少 150, 000 道尔顿、至少 200, 000 道尔顿、至少 250, 000 道尔顿、至少 300, 000 道尔顿、至少 350, 000 道尔顿、至少 400, 000 道尔顿、至少 450, 000 道尔顿、或至少 500, 000 道尔顿的分子量。

110.权利要求 90 的组合物，其中，组合物具有至少 90%的纯度、至少 95%的纯度、至少 97%的纯度、或至少 99%的纯度。

111.权利要求 90 的组合物，其中离析的多糖与载体化合物结合。

112.权利要求 90 的组合物，其中离析的多糖通过连接基团与载体结合。

113.权利要求 90 的组合物，进一步包括药学上可接受的载体。

114. 权利要求 90 的组合物，其中离析的多糖配制成疫苗。

115. 权利要求 90 的组合物，其中少于 45% 的 R 基团是 -NH-CO-CH₃。

116. 权利要求 90 的组合物，其中 n 是至少为 6、至少为 10、至少为 20、至少为 50、至少为 100、至少为 200、至少为 300、至少为 400 和至少为 500 的整数。

117. 包括权利要求 90 的离析多糖的药物组合物，在药学可接受的载体中有足够的量能够刺激免疫反应。

118. 权利要求 117 的药物组合物，进一步包括一种辅助剂。

119. 权利要求 90 的离析多糖在制备用于治疗或预防患有或有可能发展为葡萄球菌感染的非啮齿动物体内葡萄球菌感染的药物中的应用。

120. 一种生产抗体的方法，包括：

将能够产生葡萄球菌特异性抗体的有效用量的、权利要求 90 的离析多糖与辅助剂共同给药病体；

然后，从病体离析出抗体。

121. 生成单克隆抗体的方法，其中包括：

将能够产生葡萄球菌特异性抗体的有效用量的、权利要求 90 的离析多糖与辅助剂共同给药病体；

从病体收集脾细胞；

将上述的病体脾细胞与骨髓瘤细胞融合；

收集融合亚克隆产生的抗体。

122. 制备抗细菌多糖的多克隆抗体的方法，其中包括：

通过将权利要求 90 的离析多糖与辅助剂共同给药病
体，激发抗细菌多糖的免疫响应；
从病体收集抗体。

123. 一种组合物包括：

一种离析的结合剂，该离析结合剂可以通过其结合权利
要求 90 的离析多糖的能力而被识别。

**124. 权利要求 123 的离析结合剂在制备用于抑制葡萄球菌感染的
药物中的应用。**

**125. 权利要求 120、121 或 122 的方法生产的抗体或其片段在制
备用于抑制葡萄球菌感染的药物中的应用。**

**126. 权利要求 3 的组合物，其中，离析的多糖与载体化合物结
合。**

葡萄球菌感染的多糖疫苗

发明领域

本发明涉及预防并治疗葡萄球菌感染的诱导免疫的多糖组合物。本发明还涉及多糖基抗原、相关抗体与诊断试剂盒的制备与使用方法，以及采用多糖材料及其抗体诱发主动和被动免疫的方法。

发明背景

葡萄球菌是正常栖息并定居在人类皮肤与粘膜上的革兰氏染色阳性细菌。如果在手术或其它创伤过程中皮肤或粘膜受损，葡萄球菌就有机会进入内部组织，造成感染加剧。如果葡萄球菌局部增生或者进入淋巴或血液系统，会造成严重感染并发症，例如与葡萄球菌型菌血症有关的并发症。这些并发症包括感染性休克、心内膜炎、关节炎、骨髓炎、肺炎、以及各种器官的脓肿。

葡萄球菌包括产生自由凝固酶的凝固酶阳性有机体和不产生自由凝固酶的凝固酶阴性有机体。金黄色葡萄球菌是最普通的凝固酶阳性葡萄球菌。金黄色葡萄球菌通常造成局部感染，不管是血管外部位还是血管内部位，最终都导致菌血症。金黄色葡萄球菌还是急性骨髓炎的主要原因，并导致葡萄球菌性肺炎感染。此外，金黄色葡萄球菌是造成大约 1-9%细菌性脑膜炎病例和 10-15%脑脓肿的原因。

凝固酶阴性葡萄球菌共有公知的至少 21 个种类，其中包括表皮葡萄球菌、腐生性葡萄球菌、溶血性葡萄球菌（*S.hominis*）、瓦氏葡萄球菌、溶血性葡萄球菌（*S.haemolyticus*）、腐生性葡萄球菌、*S.cohnii*、木糖葡萄球菌、溶血性葡萄球菌（*S.simulans*）和头葡萄球菌。表皮葡萄球菌是与静脉内存取设备有关的最经常造成感染的媒介物，也是原发医院菌血症最常见的离析物。表皮葡萄球菌还与人工瓣膜心内膜炎有关。

葡萄球菌还是动物细菌感染的普通来源。例如，葡萄球菌性乳腺炎是反刍动物常见的问题，例如牛、绵羊和山羊。此病症通常使用抗生素治疗消灭感染，但是此治疗过程是花费昂贵，并且仍会造成乳液生产的损失。迄今为止，最有效的识别疫苗是皮下给药的完整活疫苗。然而，活疫苗给药有可能会造成感染。基于此原因，许多研究者都试图制备灭活的金黄色葡萄球菌疫苗，或者离析出可以诱导抗金黄色葡萄球菌免疫的荚膜多糖或者细胞壁成份。然而，这些努力都还未见成功。

发明概述

本发明涉及免疫人类与动物抗凝固酶阴性和凝固酶阳性葡萄球菌感染的方法与产品。经发现，根据本发明，来自葡萄球菌、例如金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌的聚 N-乙酰基葡糖胺（PNAG）表面多糖基本不能被乙酸残基取代，此多糖在生命体内具有强烈的致免疫性，并优选诱导作为引起调理素致死媒介的抗体，保护机体免受感染。因此，此多糖可特别用于生成抗葡萄球菌的免疫响应，包括抗体依赖免疫响应。

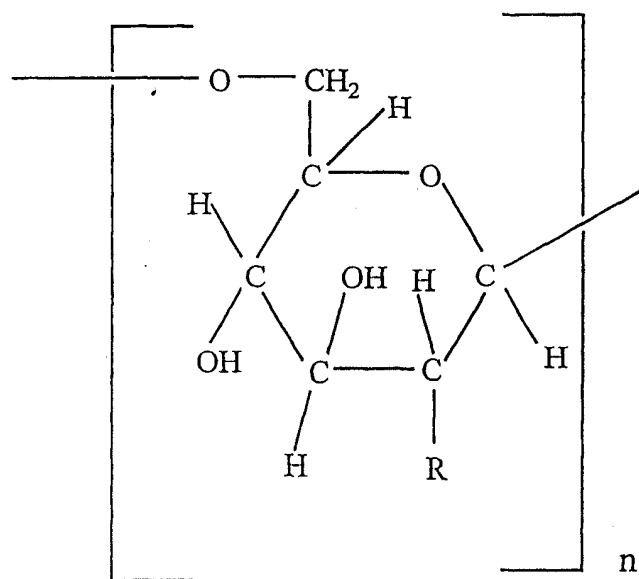
一方面，本发明提供了一种含有离析多糖的组合物，此多糖含有长度至少为 2 个单体单元的 β -1, 6-葡糖胺聚合物，其中小于 50% 的葡糖胺氨基基团由乙酸取代。一方面，此组合物是无菌

的（例如适合生命体内注射）。另一方面，本发明提供了含有离析多糖的组合物，此多糖含有长度至少为 2 个单体单元的 β -1,6-葡糖胺聚合物，其中小于 50% 的葡糖胺氨基基团由乙酸取代，并且此多糖与载体化合物相结合。

如全文中所用，“本发明多糖”指的是带有小于 50% 乙酸取代基的葡萄球菌聚 N-乙酰基葡糖胺（PNAG）表面多糖。可以理解，脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺可以经过全部或者部分地脱乙酰化处理，条件是所得产物的乙酰化范围是从 0 到小于 50%。如文中所用，天然聚 N-乙酰基葡糖胺是具有不同乙酰化程度的多种聚 N-乙酰基葡糖胺类型的混合物。天然聚 N-乙酰基葡糖胺可以包括脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺，然而，高乙酰化聚 N-乙酰基葡糖胺类型同样出现在混合物中。如文中所用，“高乙酰化”聚 N-乙酰基葡糖胺类型是带有大于 50% 乙酸取代基的聚 N-乙酰基葡糖胺。

一些具体实施方式同样地适用于本发明的各个方面。这些具体实施方式将在下文中描述。

在一具体实施方式中，离析的多糖以下述结构定义：



其中 n 是大于或者等于 4 的整数， R 选择 $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$ 和 $-\text{NH}_2$ ，其中小于 50% 的 R 基团是 $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$ 。在本发明的一些方面中，当多糖与载体化合物相结合或者作为与载体化合物连接的连接基团时， n 可以是 2、3、4 或者更大。

在一具体实施方式中，多糖具有至少 800 道尔顿的分子量，在另一具体实施方式中，多糖的分子量至少是 1000 道尔顿。在另一具体实施方式中，多糖的分子量选自至少 1200 道尔顿、至少大于 2000 道尔顿、至少 2500 道尔顿、至少 5000 道尔顿、至少 7500 道尔顿、至少 10,000 道尔顿、至少 25,000 道尔顿、至少 50,000 道尔顿、至少 75,000 道尔顿、至少 100,000 道尔顿。在另一具体实施方式中，多糖的分子量选自至少 125,000 道尔顿、至少 150,000 道尔顿、至少 200,000 道尔顿、至少 250,000 道尔顿、至少 300,000 道尔顿、至少 350,000 道尔顿、至少 400,000 道尔顿、至少 450,000 道尔顿、至少 500,000 道尔顿。

离析的多糖可以具有至少 2 个、至少 3 个、至少 4 个、至少 5 个、或至少 6 个单体单元的长度。在另一具体实施方式中，多糖长度选自至少 6 个、至少 10 个、至少 20 个、至少 50 个、至少 100 个、至少 200 个、至少 300 个、至少 400 个、和至少 500 个单体单元。

在另一具体实施方式中，等于或者小于 45%、等于或者小于 40%、等于或者小于 35%、等于或者小于 30%、等于或者小于 25%、等于或者小于 20%、等于或者小于 15%、等于或者小于 10%、等于或者小于 5%、或者等于或者小于 1% 的葡糖胺氨基基团（或者是 R 基团）由乙酸取代。在另一具体实施方式中，所有的葡糖胺氨基基团都未经乙酸取代。脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺指的是上述任何类型聚 N-乙酰基葡糖胺。

相应地，多糖可以是杂取代的聚合物，其中 R 基团是乙酸取代（即 -NH-CO-CH_3 ）和未经取代氨基基团（即 -NH_2 ）的混合，条件是小于 50% 的这些基团由乙酸取代。多糖也可以是同取代聚合物，条件是所有的 R 基团都是胺（即所有基团都未经乙酸取代）。

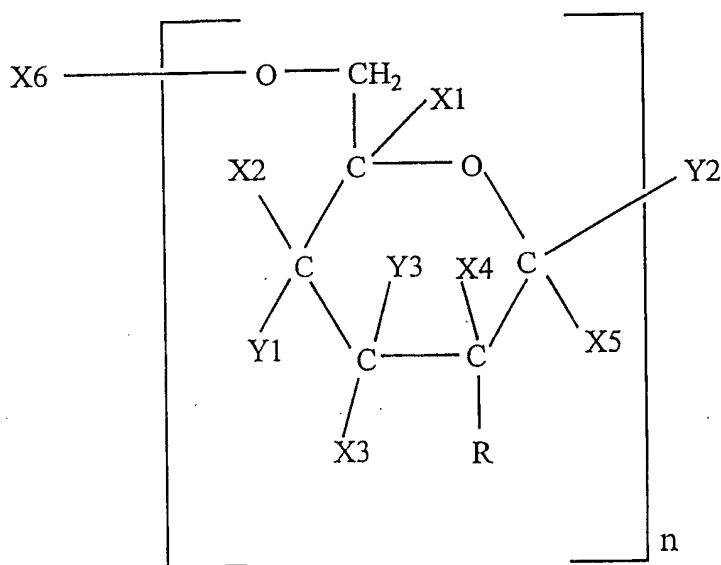
在本发明的一些具体实施方式中，离析的多糖可以与载体化合物相结合。载体化合物可以通过连接基团与多糖相连接。载体化合物可以是肽载体，但不限于此。

在这些或者其它具体实施方式中，含有离析多糖的组合物还可以包括药用可接受载体。

在一些具体实施方式中，本发明组合物具有至少 90% 纯度，至少 95% 纯度，至少 97% 纯度，或至少 99% 纯度（即，组合物中至少 90%、至少 95%、至少 97%、或至少 99% 的多糖是脱乙酰聚

N-乙酰基葡萄糖胺)。在另一具体实施方式中，本发明组合物基本不含有磷酸、或磷壁酸。优选的是，本发明组合物基本不含有在葡萄糖胺氨基（R）基团上带有大于 50%、大于 75%、或大于 90% 乙酸取代的多糖。

在一些具体实施方式中，此多糖由下述结构表示：



其中 X1、X2、X3、X4、X5 和 X6 都单独可以是 H、载体化合物、或连接到载体化合物的连接基团；Y1、Y2、Y3 都单独可以是 OH、载体化合物、或连接到载体化合物的连接基团。在一些具体实施方式中，只有一个载体化合物或者与载体化合物连接的连接基团与此结构相连接。在其它一些具体实施方式中，X1、X2、X3、X4、X5 和 X6 中只有一个位置与载体化合物相连接，或者是连接载体化合物的连接基团。在其它具体实施方式中，Y1、Y2、Y3 中只有一个位置与载体化合物相连接，或者是连接载体化合物的连接基团。在其它具体实施方式中，载体化合物或者连接载体化合物的连接基团只与 X1、X2、X3、X4、X5、X6、Y1、Y2、Y3 中唯一一个位置相连接。载体化合物可以是多糖。在其它具体实施方式中，载体分子可以是直接任意取代的多糖，或者

是通过连接基团与一个或者多个载体化合物（例如，其它多糖、肽等）连接的多糖。在一些具体实施方式中，载体多糖不是 N-乙酰 β 1-6 葡糖胺。在本发明的一些方面，当 X 是载体化合物或者是连接载体化合物的连接基团时，n 可以是 2、3、4 或者更大。

本发明提供了含有可用做疫苗、本发明任何多糖的药用组合物。这些组合物含有能够激发免疫响应、例如激发抗原特异性免疫响应有效用量的多糖。此疫苗还可以含有药用可接受载体和/或辅助剂。药用组合物可以含有直接连接或者通过连接基团连接到载体化合物的多糖。

本发明其它方面还提供了本发明多糖的制备方法。这些方面将在下文中描述。

一方面，本发明提供了根据下述方法制备的离析多糖：用乙醇沉淀来自浓缩的细菌细胞体制品的天然多糖制品；使用溶菌酶和溶葡球菌素同时消化天然多糖，然后，按顺序使用核糖酶与蛋白水解酶 K 消化，生成消化的多糖制品；按尺寸分离消化的多糖制品；离析乙酰化的多糖部分；将乙酰化多糖脱乙酰处理，生成脱乙酰多糖（即，带有小于 50% 乙酸取代的多糖）。

在另一方面，本发明还提供了含有按照下述方法制备含有多糖的多糖抗原：从细菌培养物制备搀杂多糖；使用酸或碱培养搀杂多糖，生成半纯的多糖制品；将此制品中和；在氢氟酸中培养上述中和制品。在一具体实施方式中，此方法还涉及从上述制品中离析乙酰化多糖，对乙酰化的多糖实施脱乙酰处理，生成脱乙酰的多糖。在一具体实施方式中，乙酰化多糖经过化学脱乙酰化处理，达到小于 50% 的所需程度。在另一具体实施方式中，乙酰化多糖经过酶方式的脱乙酰化处理。

各种具体实施方式适用于上述方法。一些附加的具体实施方式将在下文中描述。细菌培养物可以是凝固酶阴性或者凝固酶阳性葡萄球菌培养物。细菌培养物可以是金黄色葡萄球菌培养物，或者是表皮葡萄球菌培养物。在另一具体实施方式中，使用层析柱按尺寸分离多糖培养物。

本发明多糖的一个制备实例如下所述：用强酸或者强碱培养细菌培养物，生成酸或碱溶液。然后，将酸或碱溶液中和至 PH7，生成天然的抗原溶液。接着，渗析天然抗原悬液，去除溶液例如去离子水，并且收集不溶性的天然抗原。不溶性的天然抗原经过冻干处理后，再次悬浮在缓冲液中。缓冲液可以选自 50mM PBS 和含有 150mM 氯化钠的 100mM Tris 溶液。强酸或者强碱可以是大于 1N 的氢氧化钠或者 1M 盐酸。在一些具体实施方式中，强酸或者强碱可以是 5N 的氢氧化钠或者 5M 盐酸。在另一具体实施方式中，细菌培养物在强酸或者强碱中搅拌 18-24 小时。使用强酸或者强碱进行重复提取。此方法还涉及处理抗原制品，去除氨基连接的乙酸基团，直到获得乙酸取代的所需程度，由此生成脱乙酰的聚 N-乙酰基葡萄糖胺。可以采用化学方式或者酶方式实施脱乙酰处理。作为一个实例，在 37℃ 的 1.0N 氢氧化钠中培养抗原制品 2—20 个小时。在更弱碱条件下培养，需要进行更长的时间，或者更高的温度；在更强碱条件下培养，进行的时间可以更短些，或者温度可以更低些。

上述方法还涉及，在不需要额外脱乙酰化处理的条件下，从含有小于 50% 乙酸取代的制品中离析此部分。

在另一方面，本发明提供了一种制备药用组合物的方法。在一具体实施方式中，多糖与药用可接受载体和/或辅助剂相结合。在另一具体实施方式中，多糖直接或者通过连接基团与载体化合物相结合，然后，与药用可接受载体和/或辅助剂任意结合。

文中所用的任何脱乙酰多糖（即 dPNAG）可以适用于本发明的治疗或者预防方法。

在另一方面，本发明提供了预防病体葡萄球菌感染的方法，优选的是非啮齿动物病体。本发明涉及将能够诱导抗葡萄球菌免疫响应有效用量的本发明任何多糖给药于病体。在一些具体实施方式中，葡萄球菌可以是金黄色葡萄球菌，在其它具体实施方式中，葡萄球菌是表皮葡萄球菌。

病体是受葡萄球菌感染的任何病体，优选的是非啮齿动物。一些具体实施方式中，病体是人类病体，在其它具体实施方式中，病体是灵长动物、马、奶牛、猪、羊、绵羊、狗或猫。

在一些具体实施方式中，病体有可能暴露于葡萄球菌；在其它具体实施方式中，病体已经暴露于葡萄球菌。在一些具体实施方式中，病体是年龄超过 60 岁的人类。病体可以是健康的个体。在一些具体实施方式中，病体未接受过医疗装置移植。

优选的是，如文中所述以及如本领域所公知，将此多糖制备成疫苗。在相关的具体实施方式中，此多糖与辅助剂共同给药。在另一具体实施方式中，此多糖系统给药于病体。此抗原可以与载体化合物相结合。在一些具体实施方式中，载体化合物是肽载体，且不限于此。

在另一方面，本发明提供了诱导病体抗葡萄球菌感染主动免疫的方法。此方法包括将诱导抗葡萄球菌感染主动免疫有效用量的任何前述含多糖组合物给药于病体的步骤。在一些具体实施方式中，此方法是一种诱导抗金黄色葡萄球菌感染免疫的方法。在另一具体实施方式中，此方法是一种诱导抗表皮葡萄球菌感染免疫的方法。

在另一方面，本发明还提供了制备多克隆或者单克隆抗体的方法。此方法包括，将能够产生葡萄球菌特异性抗体有效用量的任何本发明多糖与辅助剂共同给药病体，然后，从病体离析抗体。在本发明的这些以及其它方面，多糖可以用做抗原。在一具体实施方式中，病体是人类，而在其它具体实施方式中，病体是非人类的病体，例如兔、小鼠或大鼠。本发明还包括提纯抗体。

在另一方面，本发明还提供了生成单克隆抗体的方法，其中包括将能够产生葡萄球菌特异性抗体有效用量的本发明离析多糖与辅助剂共同给药病体；从病体收集脾细胞；将上述病体脾细胞与骨髓瘤细胞融合；收集融合亚克隆产生的抗体。

在另一方面，本发明提供了识别本发明多糖特异性单克隆抗体的方法。此方法包括，诱导非人类病体针对抗原的免疫响应；从病体中离析抗体生成细胞；将抗体生成细胞制成永生细胞；使用本发明多糖，检测永生细胞生成单克隆抗体的能力。在一具体实施方式中，本发明还包括从永生细胞上清液离析单克隆抗体的步骤。

本发明还提供了一种组合物，其中含有与本发明离析多糖选择性结合的离析结合剂。在一具体实施方式中，离析结合剂是肽。此肽可以是抗体，或者是抗体的片段。此抗体可以是多克隆的抗体。此抗体可以是人源化抗体，或者是嵌合抗体。在一些重要的具体实施方式中，此抗体是人类的抗体。在一些具体实施方式中，离析结合剂与脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺特异性结合。在其它具体实施方式中，离析的结合剂既可以与脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺结合，也可以与高乙酰化聚 N-乙酰基葡萄糖胺类型结合。

在一些具体实施方式中，离析的结合剂与可测的标记相结合。可测的标记可以选自放射性标记、酶、生物素分子、卵白素

分子或者荧光色素。离析的结合剂可以与杀菌剂结合，例如抗生素。

在另一方面，本发明提供了诱导病体抗葡萄球菌感染被动免疫的方法。感染可以是金黄色葡萄球菌感染或者表皮葡萄球菌感染，且不限于此。本方法还包括将诱导调理作用葡萄球菌有效用量的任一种前述结合脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺抗体给药于病体的步骤。

上述预防葡萄球菌感染的方法可以在有可能获得感染的病体上实施。可以相似地实施这些方法，治疗患有葡萄球菌感染的病体。本发明的预防与治疗方法可以施用于获得或者有可能获得表达天然聚 N-乙酰基葡糖胺细菌种类感染的病体。

在另一方面，本发明提供了治疗患有葡萄球菌感染病体的方法，其中包括将能够抑制葡萄球菌感染有效用量的结合本发明离析多糖的离析结合剂给药。在一重要具体实施方式中，结合剂与高乙酰化聚 N-乙酰基葡糖胺类型以及脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺相结合。

在一具体实施方式中，葡萄球菌感染选自表皮葡萄球菌感染和金黄色葡萄球菌感染。在另一具体实施方式中，离析的结合剂与杀菌剂相结合，例如抗生素。

在另一方面，本发明提供了一种评价多糖保护病体免受葡萄球菌感染能力的方法。此方法涉及将有效用量的多糖给药病体，其中多糖诱导主动免疫，将病体暴露于葡萄球菌，然后测定病体中葡萄球菌的存在。

在另一方面,本发明提供了识别样品中脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺存在的方法,其中包括将样品与结合脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺的离析结合剂相接触;然后,测定离析结合剂与样品的结合。离析结合剂与样品的结合表明样品中脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺的存在。如果结合剂也可以结合聚 N-乙酰基葡糖胺,那么此方法还可以用于测定样品中聚 N-乙酰基葡糖胺的存在。在一具体实施方式中,样品是来自病体的生物样品。此生物样品可以选自尿液、血液、脓汁、皮肤、唾液、关节炎、淋巴和乳液。在一具体实施方式中,离析的结合剂可以与文中所述的可测标记相结合。实例还可以是来源于可移植或者已移植医疗装置的化验标本。

本发明的每个限定可以涵盖了本发明的各种具体实施方式。因此可以预见,涉及任何一种因素或者因素组合的本发明每种限制都包含在本发明的各个方面之中。

序列表简述

SEQ ID NO: 1 是来自金黄色葡萄球菌细胞内附着基因座的核苷酸序列,并以 AF086783 的登记编号保藏在基因库(Genbank)中。

附图简述

图 1 展示了抗体与天然聚 N-乙酰基葡糖胺的结合。产生了对应于与白喉类毒素结合天然聚 N-乙酰基葡糖胺的抗体。

图 2 展示了抗体与脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺的结合。产生了对应于与白喉类毒素结合脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺的抗体。

图 3 展示了,每隔一周使用与白喉类毒素(DTm)结合的天然聚 N-乙酰基葡糖胺,三次皮下免疫鼠(每组 10 只),获得的抗

体滴定度。采用图例所示的剂量免疫实验鼠。完成最后一次免疫的4周内每周获取血样。

图4展示了,每隔一周使用与白喉类毒素(DTm)结合的脱乙酰聚N-乙酰基葡萄糖胺,三次皮下免疫鼠(每组10只),获得的抗体滴定度。采用图例所示的剂量免疫实验鼠。完成最后一次免疫的4周内每周获取血样。

图5展示了,如图例所示使用来自用与白喉类毒素结合的脱乙酰聚N-乙酰基葡萄糖胺免疫兔血清的抗体,调理素致死葡萄球菌菌株的情况(兔1)。每个点表示所示稀释比例下平均致死百分比。

图6展示了,如图例所示使用来自用与白喉类毒素结合的脱乙酰聚N-乙酰基葡萄糖胺免疫兔血清的抗体,调理素致死葡萄球菌菌株的情况(兔2)。每个点表示所示稀释比例下平均致死百分比。

图7展示了,如图例所示使用来自用与白喉类毒素结合的天然聚N-乙酰基葡萄糖胺免疫兔血清的抗体,调理素致死葡萄球菌菌株的情况(兔3)。每个点表示所示稀释比例下平均致死百分比。

图8展示了,如图例所示使用来自用与白喉类毒素结合的天然聚N-乙酰基葡萄糖胺免疫兔血清的抗体,调理素致死葡萄球菌菌株的情况(兔4)。每个点表示所示稀释比例下平均致死百分比。

图9概括了,如X轴所示,4种兔血清抗体抑制葡萄球菌菌株的调理素致死滴定度。4种兔如上述图例所示。每个条形图表示杀死 $\geq 40\%$ 细菌条件下血清稀释率的倒数。小于10的条形图说明,在1:10血清稀释率条件下血清不能杀死40%的细菌。

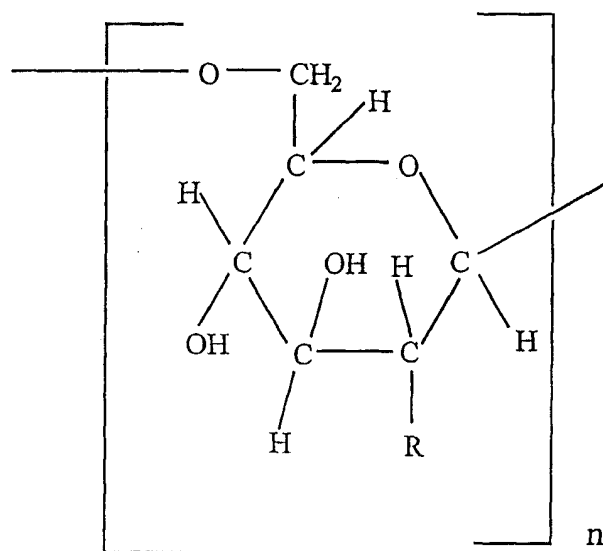
发明详述

本发明涉及来源于葡萄球菌的多糖抗原。这些抗原可以用于诱导抗细菌感染的免疫，还可以用于生成诊断和治疗目的的抗体。

本发明部分基于如下发现：低乙酰化（即脱乙酰）聚 N-乙酰葡糖胺（PNAG），在文中被称为脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺，具有高致免疫性，因此提供了生命体内激发保护性免疫反应的适合疫苗选择物。脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺是带有小于 50% 乙酸取代氨基基团的聚 N-乙酰基葡糖胺。在一些优选具体实施方式中，脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺带有小于 35% 乙酸取代；在另一些优选的具体实施方式中，脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺带有小于 15% 乙酸取代。根据本发明另据发现，与天然聚 N-乙酰基葡糖胺相比脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺能够更好地诱导调理素保护抗体。“天然”聚 N-乙酰基葡糖胺指的是带有乙酰化范围在 0—100% 的聚 N-乙酰基葡糖胺天然混合物。因此，制备的抗脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺抗体可以有效地抵抗葡萄球菌，例如金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌。相应地，根据本发明发现，乙酰化程度影响了基于生命体内抗原给药诱导免疫反应的程度。脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺给药后诱导的抗体识别脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺，在重要的具体实施方式中，也同样识别高乙酰化聚 N-乙酰基葡糖胺类型。

本发明提供了离析脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺的组合物及其离析方法，在一些情况下提纯脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺的方法，以及其使用方法，其中包括生命体内治疗、预防和诊断方法。如文中所用，脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺可以被称为脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺抗原。这两个名词可以互换使用。本发明还提供了可以用做疫苗的脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺药用组合物。

在一些方面，脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺具有下列结构：



其中 n 是从 2 到大于或等于 300 的整数， R 选自 $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$ 和 $-\text{NH}_2$ ，条件是小于 50% 的 R 基团是 $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$ 。脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺具有 β 1-6 链接（即脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺是由通过 β 1-6 链接连接在一起的葡糖胺单体构成）。

如果所有 R 基团未经取代（即， $R=\text{NH}_2$ ），脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺可以是同聚合物。同聚合物指的是葡糖胺残基的 R 基团都相同的聚合物。脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺也可以是在 R 位置上带有 $-\text{NH}_2$ 和 $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$ 基团混合的杂聚合物，条件是小于 50% 的 R 基团被乙酸取代。取决于具体实施方式，小于 49%、小于 45%、小于 40%、小于 35%、小于 30%、小于 25%、小于 20%、小于 15%、小于 10%、小于 5%、或小于 1% 的 R 基团可以被乙酸取代。

如文中所述，脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺的尺寸变化很大，取决于脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺是否与载体化合物相连接。在一些方面，脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺抗原具有至少 100,000 道尔顿的分子量。在其它方面，脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺抗原具有小于

2000 道尔顿的分子量。聚 N-乙酰基葡糖胺的分子量可以是至少 200 道尔顿，或者至少 400 道尔顿，或者至少 600 道尔顿，或者至少 800 道尔顿。根据本发明，当与载体化合物结合时，优选使用低分子量的脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺。这些脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺可以小到只有 2-3 个单体单元的程度，但是优选具有至少 4-6 个单体单元的长度。这些脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺对应的分子量大约是 400, 600, 800, 1000 和 1200 道尔顿。分子量在 500-20, 000, 000 道尔顿之间的多糖是常规的多糖。

可以理解的是，上述结构中的 n 值可以影响抗原的分子量。如果 n 大于或者等于 300，此结构最小多糖的分子量是 60,918 道尔顿（300 个单元 x 203 道尔顿/单元 + 末端残基上取代基的 18 道尔顿）。如果抗原具有 100, 000 道尔顿的最小分子量，那么多糖既可以含有大于 300 个单元，也可以与弥补分子量差的载体化合物相结合。

本发明提供了天然或者合成类型的脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺抗原。如文中所用，天然脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺是存在于天然来源或者可以从天然来源离析或获得的脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺。脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺抗原也可以以离析形式提供。离析的多糖，例如离析的脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺，是已经被提取的多糖，因此可以从其正常所在的环境中分离出来。在一些实例中，离析的多糖可以从以结构或者功能为特征的其它化合物中充分地分离出来。例如，为了确定其化学组合物，可以对离析的多糖进行排序。

可以从载有细胞内附着基因座的任何菌株制备脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺。这些菌株不限于此的包括表皮葡萄球菌和金黄色葡萄球菌，和已经由细胞内附着基因座的基因转化的其它菌株（例如肉葡萄球菌）。特别是，脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺可以从特

殊菌株制备,其中包括表皮葡萄球菌 RP62A(ATCC 编号 35984)、表皮葡萄球菌 RP12(ATCC 编号 35983)、表皮葡萄球菌 M187、肉葡萄球菌 TM300(pCN27)、金黄色葡萄球菌 RN4220(pCN27)和金黄色葡萄球菌 MN8 粘液样。

本发明的一种方法涉及,使用碱或者酸培养搀杂的聚 N-乙酰基葡糖胺,生成半纯的聚 N-乙酰基葡糖胺制品;中和上述的制品;再进一步处理中和的制品,生成脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺。

可以采用多种方法制备搀杂的天然聚 N-乙酰基葡糖胺,其中包括从含有细胞与细胞释放培养物上清液的细胞培养物中提取天然的聚 N-乙酰基葡糖胺制品;从天然的聚 N-乙酰基葡糖胺制品中可以离析出富含高分子量天然聚 N-乙酰基葡糖胺的材料;使用溶剂,例如甲醇、乙醇、丙酮或者本领域技术人员众所周知的、能够使多糖从水性溶液沉淀的任何其它有机溶剂,沉淀含有富含高分子量聚 N-乙酰基葡糖胺材料的搀杂聚 N-乙酰基葡糖胺。可以采用本领域公知的任何方法,例如美国专利 No.5055455 所公开的内容,实施提取天然聚 N-乙酰基葡糖胺制品、离析和沉淀搀杂天然聚 N-乙酰基葡糖胺抗原制品的步骤。然后,将搀杂材料提纯并脱乙酰处理,生成本发明的脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺。

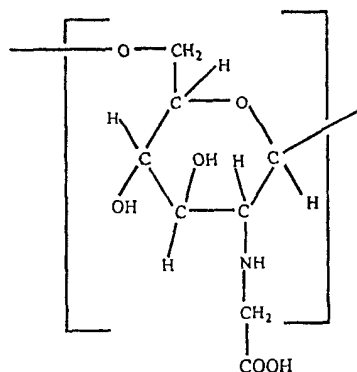
通过使用消化生物材料的生物酶培养搀杂的聚 N-乙酰基葡糖胺,实现提纯步骤,其中包括细胞壁破坏剂,例如溶菌酶和溶葡萄球菌素,蛋白酶 K,核酸酶、例如消化 DNA 和 RNA 的脱氧核糖核酸酶和核糖核酸酶。然后,加入能够将聚 N-乙酰基葡糖胺从溶液中沉淀出来的溶剂,收集沉淀物,将聚 N-乙酰基葡糖胺再次溶解在碱、例如 NaOH 中,或者酸、例如 HCl 中,接着,再中和。如果使用酸进行培养步骤,那么使用碱完成中和;如果使用碱进行培养步骤,那么使用酸完成中和。然后,处理来自中和材料的不溶性部分,例如在氢氟酸中培养生成天然纯态的聚 N-乙酰基葡

糖胺抗原，或者再次溶解于 $\text{PH} < 4.0$ 的缓冲液，然后，用分子筛和/或离子交换色谱法，生成天然纯态的聚 N-乙酰基葡糖胺抗原。

另一种离析方法包括通过使用强碱或强酸培养细菌从细菌培养物提取天然聚 N-乙酰基葡糖胺悬液的步骤。优选的是，细菌在强酸或者强碱中至少搅拌 2 小时，更优选的是，至少搅拌 5、10、15、18 或者 24 小时。强碱或者强酸可以是任何类型的强碱或者强酸，但是优选的是其强度至少是 1M 氢氧化钠或者盐酸。在一些具体实施方式中，强碱或者强酸是 5M 氢氧化钠或者 5M 盐酸。然后，离心处理酸溶液或者碱溶液，收集细胞体。在一些具体实施方式中，多次重复离析步骤。中和所得的酸或碱溶液至大约 $\text{PH} 7$ ，然后，渗析获得不溶性夹杂聚 N-乙酰基葡糖胺。

可以从大于 50% 乙酸取代的天然多糖合成脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺。例如，通过采用化学（例如，碱处理）或者酶方式将高乙酰葡糖胺聚合物脱乙酰处理，合成脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺抗原。

还可以重新合成脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺抗原（参见，例如，Melean 等人.《糖类研究》2002 年第 337 期第 1893-1916 页）。初始材料不限于此地包括多聚葡萄糖（即葡聚糖），聚葡糖胺、例如甲壳质或者脱乙酰壳多糖，聚葡萄糖胺糖醛酸。聚半乳糖胺糖醛酸还可以用于制备本发明的脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺抗原。还可以修饰带有各种取代基的聚葡糖胺，制备聚 N-乙酰基葡糖胺抗原。例如，多糖细胞间附着因子（PIA）是 β -1-6 连接葡糖胺残基的高乙酰化聚合物。PIA 具有下列结构：



对于含有亚胺部分 (C-NH) 的那些多糖, 可以采用本领域普通技术人员公知的常规化学技术, 形成游离的氨基基团。一种适合的方法涉及使用硼氢化钠。使用硼氢化钠还原亚胺基团, 生成游离的氨基基团。为了实现上述目的, 室温下向溶解在蒸馏水中的多糖加入超过 5 mg 硼氢化物, 同时搅拌并持续 2 小时; 然后, 渗析混合物去除水, 再冷冻干燥 (参见, 例如 DiFabio 等人, 期刊《生物化学》1987 年第 15 期第 244 页(1)第 27-33 行)。

本发明提供了各种纯度的脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺制品。如文中所用, “纯态脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺制品” 是经离析或者合成的、大于 92% 不含有杂质的脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺制品。这些杂质包括高乙酰取代的聚 N-乙酰基葡萄糖胺类型 (即大于 50% 乙酸取代), 半乳糖, 磷酸盐, 磷壁酸等。在一些具体实施方式中, 脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺组合物至少 93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 不含有杂质, 或者 100% 不含有杂质。

脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺组合物也被称之为 “基本不含有” 杂质。例如, 脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺基本不含有半乳糖, 说明在含有脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺制品中存在少于 10% 的半乳糖, 优选存在少于 5% 的半乳糖, 更优选存在少于 1% 的半乳糖。

采用本领域公知的任何方法，测定脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺组合物的纯度。例如，可以采用化学分析以及气相色谱和核磁共振，验证材料的结构特征，从而测定其纯度。

一些脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺制品的另一种主要杂质是含有磷酸盐的磷壁酸。磷壁酸杂质可以干扰本发明脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺抗原的化学特性和免疫原性。文中所述的本发明方法能够产生基本不含有磷壁酸的离析脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺制品。基本不含有磷壁酸的脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺制品是含有小于 1.0%磷酸盐的制品，优选的是含有小于 0.1%磷酸盐的制品。采用本领域任何公知的方法，测定样品中磷酸盐的含量。采用 Keleti,G 和 W.H. Lederer 所述方法，测定磷酸盐的含量（《生物学微量测定法手册》（1974 年），Van Nostrand Reinhold Co, 纽约），其全部内容通过在此引述合并于本文。简单地讲，测定按下述步骤进行：向 100 μ g 样品中加入 100 μ l 由加入 43.5ml 水、6.5ml 的 70%过氯酸（ HClO_4 ）和 50ml 的 20N 硫酸（ H_2SO_4 ）制成的溶液。将大理石放在试管顶部，在 95℃下加热 2 小时。然后，将混合物放入 165℃的恒温箱中，再加热 12 小时，接着，冷却至室温。然后，向样品中加入 1ml 按照下述方法制备而成的试剂 5：

试剂 1：溶解在 10ml 水中的 1.36 克三水乙酸钠。

试剂 2：溶解在 20ml 水中的 500mg 钼酸铵。

试剂 3：2ml 试剂 1，2ml 试剂 2 和 16ml 水。

试剂 4：溶解在 20ml 水中的 2gm 抗坏血酸，使用前立即制备。

试剂 5：冰浴下加入 9ml 试剂 3 和 1ml 试剂 4。

在加入试剂 5 后，充分混合试管，使用分光光度计在 820 纳米处读取吸收率。使用一元磷酸钠（每试管范围在 0.1-5 μg ）构成的标准曲线，计算测试样品中的磷酸盐含量（Lowry, OH NR. Roberts KY Leiner, MI Wu 和 AL Farr, 《生物化学》1954 年第 207,1 期）。

本发明组合物可以应用于各种不同的应用，其中包括生命体外、原位、生命体内诊断病理状态，例如感染。本发明组合物可以用于在生命体内免疫病体，从而预防或者治疗感染。本发明组合物还可以用于开发与本发明脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺组合物目的相同的抗体和其它结合肽。因此，本发明包括含有脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺或者对应结合剂（例如抗体）的药用组合物，其中脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺或者对应结合剂可以用于接种疫苗，诱导病体的主动免疫或者被动免疫。本发明还提供了制备结合剂的方法，例如与脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺结合的抗体，其可以用于诊断和治疗葡萄球菌感染及其相关症状。

可以采用结合或者非结合的方式使用脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺。作为结合的形式，脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺可以直接或者通过连接基团与载体化合物结合。连接可以出现在聚合物末端葡萄糖胺单体单元的任何位置。

如文中所述“载体化合物”是通过直接连接或者使用连接基团连接到多糖的、具有免疫活性或免疫惰性的化合物。

如文中所用“载体化合物”不限于此的包括蛋白、或者肽、多糖、核苷酸、或者其它聚合物、脂类、和小分子。蛋白包括，例如，血浆蛋白，例如血清蛋白、免疫球蛋白、载脂蛋白、运铁蛋白；细菌多肽，例如 TRPLE、 β -半乳糖苷酶，多肽，例如，疱疹 gD 蛋白、变应素、白喉和破伤风类毒素、沙门氏菌鞭毛蛋

白、嗜血杆菌菌毛蛋白、嗜血杆菌 15kDa、28-30kDa 和 40kDa 膜蛋白、大肠杆菌、热标记肠毒素 ltb、霍乱毒素，和病毒蛋白，其中包括轮状病毒 VP、呼吸合胞体病毒 f 和 g 蛋白。适用于本发明的蛋白包括安全给药哺乳动物的任何蛋白，任选是有效免疫的载体蛋白。

特别用于免疫的载体化合物包括蛋白，例如钥孔虫戚血兰素、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白、或者大豆胰蛋白酶抑制剂。可以相似地使用在免疫动物种类中致免疫的任何其它化合物。

将多糖与蛋白结合的许多方法在本领域中众所周知。通常，应该激活多糖，或者使其易于结合，即至少使多糖一部分能够与蛋白或者其它分子共价结合。此类许多方法在本领域众所周知。例如，Jennings 公开的美国专利 No.4356170 记载了，使用高碘酸在多糖上生成醛基团，然后使用氰基硼氢化物实现还原性胺化作用。Tsay 等人公开的美国专利 No.4663160 记载了，同样使用高碘酸生成醛基团，然后，在还原剂、例如氰基硼氢化物存在的条件下进行席夫碱反应，将多糖与 4—12 个碳部分派生的蛋白（缩合剂存在条件下制备而成）相连接。Gordon 公开的美国专利 No.4619828 记载了，使用溴化氰激活多糖，然后通过 4-8 个碳原子的间隔桥将多糖与蛋白相连。Anderson 和 Clements 公开的美国专利 No.4808700 记载了，使用高碘酸实施有限的氧化断裂，采用糖苷酶水解，或者酸水解，修饰多糖使其具有至少一个还原性末端，然后，在氰基硼氢化物存在的条件下通过还原性胺化反应将多糖与蛋白相连接。Porro 和 Costantino 公开的美国专利 No.4711779 记载了，通过使用氰基硼氢化钠，将伯氨基基团导入末端的还原基团，激活多糖；接着，在己二酸衍生物存在条件下转化成酯；再在有机溶剂条件下，例如二甲亚砜条件下，将多糖与类毒素相结合。其它结合方法在本领域众所周知。

载体化合物可以通过连接基团或者间隔基团与脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺相结合。可以采用本领域公知的任何方式，将多糖与连接基团或者间隔基团相结合，例如利用多糖的自由还原末端，与间隔基团或者连接基团生成共价键。共价键的生成是通过将脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺自由还原末端转换成自由 1-氨基葡萄糖苷，随后通过乙酰化作用自由 1-氨基葡萄糖苷与间隔基团共价连接（Lundquist 等人，期刊《糖化学》1991 年第 10 期第 377 页）。另外，使用 N-羧基琥珀酰亚胺活性酯作为间隔基团上的活性基团，将脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺共价连接到间隔基团上（Kochetkow,《糖类研究》1986 年第 146 期第 1 页）。还可以使用碘和氢氧化钾将脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺的自由还原末端转化为内酯（Isebell 等人，《糖化学的方法》，Academic Press, 纽约（1962 年））。通过间隔基团或者连接基团上的伯氨基基团内酯可以共价连接到间隔基团上。还可以利用还原性胺化作用，将脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺的自由还原末端共价连接到连接基团或者间隔基团上。

本发明包括结合脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺的抗体。抗体可以是单克隆抗体或多克隆抗体。脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺抗体可以与脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺结合，也可以与大于 50% 的乙酰化聚 N-乙酰基葡萄糖胺类型相结合。

通过在皮下或腹膜内多次注射抗原与辅助剂，通常在动物体内产生多克隆抗体。通过单独注射结合型或者非结合型脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺，或者与辅助剂结合注射，可以产生脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺的多克隆抗体。

制备多克隆抗体的实例如下所述：脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺或者其结合物与辅助剂相混合，例如弗氏完全佐剂（对于实验兔或鼠，在 1-3 倍体积弗氏完全佐剂中加入 100 μ g 结合物），然后，

在多个位置皮内注射。大约在一个月后,通过多个位置皮下注射,向动物追加辅助剂中 1/10-1/5 初始抗原或抗原结合物的剂量。一到二周后,抽取动物血液,化验血清测定抗体的存在。可以对动物重复追加剂量,直到抗体滴定度趋于平稳状态。向动物追加剂量可以单独使用脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺、脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺结合物、或者结合不同载体化合物的脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺,可以使用或不使用辅助剂。在一些具体实施方式中,追加剂量含有聚 N-乙酰基葡糖胺,而不是脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺,或者含有脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺和聚 N-乙酰基葡糖胺的混合物。

除了提供多克隆抗体来源外,免疫的动物还可以用于生成抗脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺的单克隆抗体。如文中所用,名词“单克隆抗体”指的是与脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺相同抗原表位(即抗原决定基)结合的免疫球蛋白同质种群。此抗原表位还存在于大于 50%乙酰化聚 N-乙酰基葡糖胺类型中。单克隆抗体具有相同的免疫球蛋白基因重排,因此表现出相同的结合特异性。可以采用本领域任何公知的方法制备单克隆抗体,例如使从免疫动物离析的脾细胞永生,例如通过与骨髓瘤细胞融合或者采用 EB 病毒转化;然后,筛选表达所需抗体的克隆。其它方法涉及离析重排的免疫球蛋白基因序列,再克隆到永生细胞系中。制备与使用单克隆抗体的方法在本领域众所周知。

可以采用以脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺作为免疫原的任何方法,制备鼠的抗脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺单克隆抗体。下述对开发抗脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺单克隆抗体方法的描述是示范性的,仅仅起到说明的作用。使用加入弗氏完全佐剂的大约 75-100 μg 提纯的脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺,腹膜内免疫 Balb/c 鼠。在初次注射后大约 15 和 35 天,通过追加注射给药加入弗氏不完全

佐剂的大约 25-50 μg 。在 60-65 天，实验鼠接受了不含辅助剂大约 25 μg 脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺的追加注射。追加剂量还可以含有天然聚 N-乙酰基葡萄糖胺制品或者脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺和聚 N-乙酰基葡萄糖胺的混合物。三天后，杀死实验鼠，按照例如 Oi(Oi VT:生成免疫球蛋白的杂交细胞系 in Herzenberg LA(ed):《细胞生物学的选择方法》，San Francisco, CA, Freeman(1980))所述的步骤，使用聚乙二醇，将离析的脾细胞与鼠骨髓瘤 NS-1 细胞融合。先使用次黄嘌呤、氨喋呤、胸腺嘧啶核苷 (HAT) 选择杂交瘤细胞，然后在培养物中培养。在融合后的 14-15 天，采用固相放射免疫测定法鉴别生成抗脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺单克隆抗体的杂交细胞：先使用固定的羊抗鼠 IgG 从特定介质中俘获抗脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺抗体，然后定量测定特定结合 ^{125}I 标记的脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺或者聚 N-乙酰基葡萄糖胺。通过限制稀释率，亚克隆对抗脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺抗体呈阳性的杂交瘤实验，并重复实验。然后，向异十八烷预处理的 BALB/c 鼠注射大约 1×10^6 个细胞/鼠，制备杂交瘤细胞的腹水。通过在 S200 上凝胶过滤并使用 NH_4SO_4 浓缩，由上述腹水制备出富含选定单克隆抗体的浓缩物。将所得的圆颗粒溶解在适当的存储溶液中，例如 50%甘油/ H_2O ，并在 4°C 下储存。

文中所用“抗脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺抗体”包括人源化抗体及其片段，以及可以与脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺结合、在一些情况下还可以与大于 50%乙酰化聚 N-乙酰基葡萄糖胺类型结合、完整的单克隆和多克隆抗体。文中所用“人源化单克隆抗体”是含有至少人类恒定区域和来自非人类哺乳动物的脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺结合区域的人类单克隆抗体或者其功能活性片段。离析型或药用制剂型完整的人源化抗脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺单克隆抗体特别适合本发明的一些方面。由于人源化抗体特定识别脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺，优选的是还同时识别天然聚 N-乙酰

基葡糖胺，所以具有特殊的临床用途，但是不能在人体中诱导针对抗体自身的免疫响应。在一优选具体实施方式中，鼠 CDR 嫁接到人类抗体的框架区域中，用于制备“人源化抗体”。参见，例如 L.Riechmann 等人，《自然》1988 年第 332 期第 323 页；M.S Neuberger 等人，《自然》1985 年第 314 期第 268 页和 EPA0239400 (1987 年 9 月 30 日公开)。

可以采用本领域任何公知的方法，制备人类单克隆抗体，例如 Borrebaeck 等人申请的美国专利 No.5567610 的公开内容，Ostberg 申请的美国专利 No.565354 的公开内容，Baker 等人申请的美国专利 No.5571893 的公开内容，Kozber 期刊《免疫》1984 年第 133 期第 3001 页，Brodeur 等人、《单克隆抗体制备技术和应用》第 51-63 页 (Marcel Dekker, Inc, 纽约, 1987 年)，和 Boerner 等人、期刊《免疫》1991 年第 147 期第 86-95 页。除了制备人类单克隆抗体的常规方法外，还可以通过免疫能够产生人类抗体的转基因动物，制备此类抗体(例如，Jakobovits 等人，《PNAS USA》1993 年第 90 期第 2551 页，Jakobovits 等人，《自然》1993 年第 362 期第 255-258 页，Bruggermann 等人，《Year in Immunol》1993 年第 7 期第 33 页和 lonberg 公开的美国专利 No.5569825)。

制备与脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺相互作用、优选也与其它天然聚 N-乙酰基葡糖胺相互作用的、人源化单克隆抗体方法的下述实例是示范性的，仅仅起到说明的作用。例如，在保留原始抗体抗原表位的特异性条件下，通过使用人类抗体的相似区域替换非人类哺乳动物抗体的非 CDR 区域，可以构建人源化单克隆抗体。例如，非人类 CDRs 和任选的一些框架区域可以与人类 FR 和/或 Fc/pFc' 区域共价连接，生成功能性抗体。这是可以从特定鼠抗体区域商业性合成人源化抗体的美国机构，例如蛋白设计实验室 (Mountain View California)，Abgenix, 和 Medarex。

欧洲专利申请 0239400 提供了制备与使用人源化单克隆抗体的实例说明，其中至少鼠（或者非人类的其它哺乳动物）抗体的 CDR 部分包含在人源化抗体中；此专利的全部内容通过在此引述合并于本文。简单地讲，下述方法可以用于构建含有至少一部分鼠 CDR 的人源化 CDR 单克隆抗体。制备第一可重复表达的载体，此载体含有连接到 DNA 序列的适当启动子和可变域，其中该 DNA 序列编码了 Ig 重链或者轻链的至少一个可变域，所述的可变域是由人类抗体的框架区域和鼠抗体的 CDR 区域构成。任选制备第二可重复表达的载体，该载体含有连接到 DNA 序列的适当启动子，其中该 DNA 序列编码了分别选自人类 Ig 互补的轻链或者重链的至少一个可变域。然后，用载体转化细胞系。优选的细胞系是永生的淋巴源哺乳动物细胞系，例如骨髓瘤细胞系、杂交瘤细胞系、三源杂交瘤细胞系、细胞杂交瘤细胞系，或者是通过病毒转化获得永生的正常淋巴细胞。接着，在本领域技术人员公知的条件下，培养转化的细胞系，生成人源化抗体。

如欧洲专利申请 0239400 所示，生成插入可重复载体的特殊抗体区域的多种技术在本领域众所周知（优选的载体与重组技术将在下文更详细地描述）。例如，通过低核苷酸合成可以制备编码区域的 DNA 序列。此外，缺少 CDR 的合成基因形成区域，在此区域内 4 个框架区域可以在交界处与适合的限制位点相融合，由此，带有粘端、双链合成的或者限制的亚克隆 CDR 弹夹可以连接到框架区域的连接处。另一种方法涉及通过低核苷酸位点引导的诱变制备编码含有可变 CDR 区域的 DNA 序列。上述每一种方法都在本领域众所周知。因此，在不破坏抗体对其抗原表位的特异性条件下，本领域技术人员可以构建含有鼠 CDR 区域的人源化抗体。

从产生脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺抗体的人类血液或者其它组织收集产生抗体的淋巴细胞，也可以获得人类抗体。这些淋巴细胞经过处理，生成在实验室中适当的培养条件下自我生长的细胞。细胞培养物经筛选生成脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺抗体，然后再克隆。克隆培养物可以用于产生脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺人类单克隆抗体，或者克隆编码抗体重链和轻链可变部分的遗传成分，然后插入核酸载体，用于生成不同类型的抗体。

本发明也涵盖了结合脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺的抗体片段。在本领域众所周知，只有抗体分子的一个小部分，抗体结合部位，涉及抗体与抗原表位的结合（通常参见，Clark, WR(1986)《现代免疫学实验基础》Wiley&Sons,Inc,纽约；Roitt,I(1991 年)《核心免疫学》第 7 版，Blackwell Scientific Publications,Oxford）。例如，抗体的 pFc'和 Fc 区域是补充级联的效应子，但并不涉及抗原结合。pFc'区域被酶断裂的抗体、或者制备出缺少 pFc'区域的抗体被命名为 F(ab')₂ 片段，保留了完整抗体的两个抗原结合位点。由于其具有两个抗原结合位点，离析的 F(ab')₂ 片段被称为二价单克隆片段。相似的是，Fc 区域被酶断裂的抗体、或者制备出缺少 Fc 区域的抗体被命名为 Fab 片段，保留了完整抗体分子的一个抗原结合位点。更进一步的是，Fab 片段是由共价连接抗体轻链和定义为 Fd（重链可变区域）的一部分抗体重链构成的。Fd 片段是抗体特异性的主要决定因子（在未改变抗体特异性条件下单独的 Fd 片段与 10 多条不同的轻链有关），并且离析的 Fd 片段保留着结合抗原表位的能力。

名词 Fab、Fc、pFc'、F(ab')₂ 和 Fv 还具有标准的免疫学含义 [Klein,《免疫学》(John Wiley,纽约,1982 年); Clark,WR (1986)《现代免疫学实验基础》(Wiley&Sons,Inc,纽约);Roitt, I (1991)《核心免疫学》第 7 版 (Blackwell Scientific Publication,Oxford)]。

众所周知的功能活性抗体片段不限于此的有抗体的 $F(ab')_2$ 、Fab、Fv 和 Fd 片段。与完整抗体相比，缺少完整抗体 F_c 片段的这些片段很显然在循环中更加迅速，更少发生非特异性组织结合（Wahl 等人，期刊《Nucl Med》1983 年第 24 期第 316-325 页）。例如，根据 Ladner 等人申请的美国专利 No.4946778 公开的方法，构建单链抗体。此单链抗体包括通过灵活连接部分连接的重链与轻链的可变区域。还报道了获得单一区域抗体（“Fd”）的方法（参见例如，Ward 等人，《自然》1989 年第 341 期第 644-646 页），此抗体含有离析的重链单一可变区域；并且公开了一种利用与目标抗原表位结合的充足亲和力鉴别抗体重链可变区域（ V_H 单区域抗体）的筛选方法。基于公知的抗体重链和轻链可变区域序列，制备重组 Fv 片段的方法在本领域众所周知并已经公开，例如 Moore 等人申请的美国专利 No.4462334。公开了使用并产生抗体片段的其它参考文献包括，例如 Fab 片段（Tijssen,《酶免疫测定的实施与理论》(Elsevier, Amsterdam, 1985)），Fv 片段（Hochman 等人，《生物化学》1973 年第 12 期第 1130 页；Sharon 等人，《生物化学》1976 年第 15 期第 1591 页；Ehrlich 等人，美国专利 No.4355023），和抗体分子部分（Audilore - Hargreaves, 美国专利 No.4470925）。因此，在不破坏抗体对于脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺抗原表位的特异性条件下，本领域技术人员可以从完整抗体的各个部分构建抗体片段。可以理解，由抗脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺抗体识别的抗原表位也可以存在于其它的天然聚 N-乙酰基葡萄糖胺类型中。

抗体片段也涵盖了“人源化抗体片段”。如本领域技术人员认定，此片段可以通过传统地酶断裂完整的人源化抗体制备而成。然而，由于涉及结构性质的原因，完整的抗体不易经受此断裂，可以使用免疫球蛋白片段作为初始材料制备上述结构；如果使用重组技术，可以编排 DNA 序列，使其编码所需的“片段”，

当 DNA 序列表达时，在生命体内或生命体外通过化学或者生物手段将上述“片段”结合起来，制备最终所需的完整免疫球蛋白片段。

具有脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺结合特异性的其它脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺结合剂可以应用于本发明的诊断方法。使用一些常规分析法，可以很容易地鉴别出脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺连接肽。例如使用噬菌体展示法，如 Hart 等人在期刊《生物化学》1994 年第 269 期第 12468 页中公开的内容，可以实施鉴别本发明肽的筛分测定法。Hart 等人报道了一种丝状噬菌体展示库，用于鉴别对应哺乳动物细胞受体的新型肽配合基。通常，使用常规的方法，例如前述参考文献公开的方法，制备使用例如 M13 或 fd 噬菌体的噬菌体展示库。此库显示了含有 4-80 个氨基酸残基的插入片段。这些插入片段任意提供了一批完全简并的或位移的肽。通过选择在其表面表达结合脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺配合基的噬菌体，可以获得选择性结合脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺的配合基。接着，这些噬菌体经过多次循环的反复筛选，从而鉴别出具有最有效结合特性的表达肽配合基的噬菌体。通常，表现为最佳结合特性的噬菌体还要进一步经过核酸分析使其特征化，用于确定在噬菌体表面表达的肽的特殊氨基酸序列，并且确定实现与脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺结合最佳状态的表达肽最佳长度。

此外，此肽配合基可以从含有一个或者多个氨基酸的肽的组合库中选出。此组合库还可以合成产生，其中含有非肽的合成部分；与天然组合库相比，此组合库很少经受酶降解。

可以使用任何的公知结合测定法，确定肽是否与脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺结合。例如，将肽固定在表面上，然后，与标记的脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺接触。接着，定量测定与肽相互作用脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺的用量、或者未与肽结合的用量，从而

确定肽是否与脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺结合。载有固定着的抗脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺抗体的表面可以作为正调节。结合测定法还可以测定出公认的脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺特异性抗体结合其它天然类型聚 N-乙酰基葡糖胺的程度。

本发明组合物可以用于生命体内和生命体外的多种用途。例如，本发明组合物可以用于产生抗体响应，例如，作为人类和动物主动免疫的疫苗，预防葡萄球菌感染和产生聚 N-乙酰基葡糖胺其它种类细菌造成的感染；作为人类或者动物免疫产生抗脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺抗体的疫苗，可以给药于其它人类或者动物用于预防或者治疗葡萄球菌感染；作为筛选生物试剂的抗原，例如筛选能够预防葡萄球菌感染的单克隆抗体，制备抗体涉及的基因库，或者肽拟态；作为葡萄球菌感染和产生聚 N-乙酰基葡糖胺其它种类细菌造成感染的诊断试剂；基于其对葡萄球菌感染和产生聚 N-乙酰基葡糖胺其它种类细菌造成感染的敏感度，作为测定人类或动物免疫状态的诊断试剂。

通过诱导抗葡萄球菌感染的主动免疫，脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺可以用于保护病体免受产生聚 N-乙酰基葡糖胺细菌的感染。通过将能够诱导免疫响应、例如诱导抗葡萄球菌抗体响应的有效用量的任何本发明脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺组合物给药于病体，实现此方法。文中所用“主动免疫”涉及将抗原导入病体，以致抗原造成一些淋巴细胞分化成产生抗体的细胞，在某些情况下，其它一些淋巴细胞分化成记忆细胞。记忆细胞并不分泌抗体，而是将抗体结合在其细胞膜上，为的是当抗原再次进入体内时可以加以识别。

此方法可以用于诱导抗葡萄球菌感染的免疫。文中所用“葡萄球菌”指的是表达聚 N-乙酰基葡糖胺的所有葡萄球菌菌株种类。尽管不希望受限于任何特殊机理，但是可以认定，高乙酰化

聚 N-乙酰基葡糖胺类型（即>50%乙酰化）不能够诱导产生与脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺相同含量的调理素保护性抗体。分类为葡萄球菌的细菌对本领域技术人员众所周知，并且记载在微生物学中。表达聚 N-乙酰基葡糖胺的葡萄球菌不限于此地包括表皮葡萄球菌（包括 RP62A（ATCC 编号 35984），RP12（ATCC 编号 35983），和 M187），金黄色葡萄球菌（包括 RN4220（pCN27）和 MN8 粘液样），和菌株、例如由细胞内附着基因座基因转化的肉葡萄球菌（包括 TM300（pCN27））。本领域技术人员很容易鉴别表达聚 N-乙酰基葡糖胺的其它细菌菌株。例如，表达细胞内附着基因座的葡萄球菌菌株可以表达聚 N-乙酰基葡糖胺。由于细胞内附着基因座的核酸序列是众所周知的（SEQ ID NO: 1 并且首次记载在 Heilmann, 公司 Schweitzer, C.Gerke, N Vanittanakom, D Mack 和 F Gotz 撰写的《在形成生物被膜的表皮葡萄球菌中细胞间附着的分子基础》文章中，《分子微生物学》1996 年第 20 期第 1083 页），所以本领域普通技术人员很容易筛选出与细胞内附着基因座有关的 mRNA 或者蛋白的表达。采用免疫电子显微术（或者其它免疫测定法），利用抗聚 N-乙酰基葡糖胺抗体或者抗脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺抗体测定细菌表面聚 N-乙酰基葡糖胺的存在，也可以鉴别表达聚 N-乙酰基葡糖胺的细菌菌株。此外，采用液相色谱法和质谱法，可以离析并分析细菌菌株的荚膜。

文中所用“病体”是暖血的哺乳动物，并且包括，例如人类、灵长动物、马、奶牛、猪、山羊、狗、和猫。在一些具体实施方式中，病体是非啮齿动物病体。非啮齿动物病体可以是任何上述定义的病体，但是特别排除了啮齿动物，例如小鼠、大鼠和兔。在一些具体实施方式中，优选的病体是人类。

脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺可以给药于能够诱导免疫响应、例如对抗原抗体响应的任何病体。对于能够产生免疫响应和有可能

发展成葡萄球菌感染的病体，此抗原尤其适合诱导抗葡萄球菌系统感染的主动响应。能够产生免疫响应和有可能发展成葡萄球菌感染的病体是有可能暴露在葡萄球菌环境中具有免疫系统的哺乳动物。例如，由于暴露于医院环境中的细菌，住院病人有可能发展成葡萄球菌感染。发展成金黄色葡萄球菌感染的特高危群体包括，例如体内存有医疗装置的病人，例如静脉内管路（例如中心管路）、或者假体（例如髌或者膝盖替换假体），因为由于细胞外材料（称为生物被膜或者粘质）的原因，临床分离株经常高度附着在塑料表面上。在一些具体实施方式中，病体是接受了医疗装置移植的病体；在另一些具体实施方式中，病体是未接受医疗装置移植的病体，但是计划接受移植。极大可能受到表皮葡萄球菌感染的病体还包括，例如不足月婴儿和接受化学治疗的病人。

脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺能够以诱导抗体响应的有效用量给药于病体。文中所用“诱导抗体响应的有效用量（例如抗体响应）”指的是脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺的充足用量：（1）辅助病体产生自身免疫保护，例如，诱导病体产生抗脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺抗体的保护（抗体可以识别脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺和高乙酰化聚 N-乙酰基葡糖胺类型），诱导产生记忆细胞，或许发生细胞毒性淋巴细胞反应等；（2）防止暴露于葡萄球菌的病体受到葡萄球菌感染。

在一些优选的具体实施方式中，诱导免疫响应的脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺疫苗有效用量指的是能够诱导产生与至少两种葡萄球菌（例如，金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌）交叉反应抗体的脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺疫苗用量。

本领域普通技术人员采用本领域常规方法，可以评价对于诱导主动免疫脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺的用量是否充足。例如，通

过在使用脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺抗原的鼠或者其它病体中筛选抗体，可以评价特定抗原在哺乳动物中产生抗体的能力。

本发明的抗脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺抗体可以用于诱导病体的被动免疫，从而防止可能暴露于感染物的病体受到系统感染。通过将能够诱导抗葡萄球菌免疫响应（例如，导致调理素作用葡萄球菌，例如金黄色葡萄球菌）有效用量的抗脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺抗体给药病体，实施诱导抗葡萄球菌（例如金黄色葡萄球菌）感染被动免疫的方法。文中所用“被动免疫”涉及将抗体给药于病体，其中抗体是在不同的病体中产生的（包括相同或者不同种类的病体），以致抗体附着在细菌表面上，并造成细菌被吞噬。

抗脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺抗体可以给药于可能受到葡萄球菌感染的任何病体，从而诱导被动免疫；在一些具体实施方式中，特别适合不能诱导抗脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺主动免疫的病体。由于带有脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺疫苗不能在高危免疫妥协病体中完全有效，采用抗葡萄球菌、例如抗金黄色葡萄球菌培养的抗体制剂治疗，使这些病体收益。不能诱导免疫响应的病体是免疫妥协病体（例如，经过化学治疗的病人、AIDS 病人等），或者是没有发育免疫系统的病体（例如，不足月婴儿）。

抗脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺抗体可以给药于可能受到葡萄球菌感染的病体，用于阻止感染物在病体体内繁殖，或者杀死感染物。抗脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺抗体还可以给药于已经受到葡萄球菌感染的病体，用于阻止感染物在病体体内繁殖，或者杀死感染物。

本发明抗脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺抗体能够以诱导抗葡萄球菌、例如抗金黄色葡萄球菌免疫响应的有效用量给药于病体。

文中所用“能够诱导抗葡萄球菌免疫响应的有效用量”指的是抗脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺抗体的充足用量，从而可以（1）预防暴露于葡萄球菌的病体出现葡萄球菌感染；（2）抑制感染的发展，即阻止或者减慢其发展；和/或（3）减轻感染，即根除感染病体中的细菌。

采用本领域普通技术人员公知的常规方法，可以确定在生命体外调理作用分析中抗脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺抗体的用量是否是“能够诱导抗葡萄球菌免疫响应的有效用量”，其中调理作用分析可以预测抗体调理作用的程度。调理作用葡糖胺的抗体是加入葡萄球菌样品后导致细菌被吞噬的抗体。调理作用分析法可以是比色测定法、化学发光测定法、荧光测定法、或者放射标记提取测定法、细胞介质杀菌测定法、或者测定材料调理能力的其它分析法。可以使用下述调理作用分析法，测定抗脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺抗体的有效用量。将抗脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺抗体与葡萄球菌细胞、真核巨噬细胞和任选的补充蛋白共同培养。培养后，基于保留的葡萄球菌含量，测定抗脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺抗体的调节能力。进行两次相似的测定，其中一次含有起调节作用的免疫球蛋白，通过比较两次测定中存活的葡萄球菌数量，可以完成此测定。与对照非特异性免疫球蛋白的培养相比，葡萄球菌数量的减少表明了调理作用。

通过将能够诱导调理作用葡糖胺有效用量的抗 dPNAG_{纯态} 抗体给药病体，本发明方法还可以用于诱导抗葡萄球菌的被动免疫。文中所用的抗 dPNAG_{纯态} 抗体指的是特别与本发明纯态脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺相互作用的、诱导调理作用凝固酶-阴性或者凝固酶-阳性的葡萄球菌、而不与脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺掺杂制品相互作用的抗体。如上所述，掺杂的脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺制品可以受到磷壁酸、或者干扰抗原致免疫性其它杂质的污

染。采用常规结合测定法，本领域普通技术人员可以很容易地鉴别出，抗脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺抗体是否是抗 dPNAG_{纯态} 抗体。例如，先将抗脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺抗体固定在表面上，然后，用标记的掺杂脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺制品或者标记的纯态脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺与之接触。接着，定量测定与抗体相互作用的脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺制品用量或者与抗体结合的用量，从而确定抗体是否与掺杂的脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺制品结合。在重要的具体实施方式中，抗 dPNAG_{纯态} 抗体可以有效地抑制凝固酶-阴性和凝固酶-阳性葡萄球菌，还可以有效地抑制在其表面上表达脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺或者高乙酰化聚 N-乙酰基葡糖胺的任何适当微生物有机体。

脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺抗原可以制备成疫苗。制备疫苗的适当载体介质包括磷酸钠缓冲盐溶液 (pH7.4)、悬浮在 pH6 磷酸钠缓冲盐溶液中的 0.125M 磷酸铝凝胶、以及其它常规介质。通常，为了引发暖血哺乳动物中抗体的有效含量，疫苗含有大约 5—100 μg 抗原，优选含有大约 10—50 μg 抗原。当作为疫苗给药时，脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺可以任选含有辅助剂。

名词“辅助剂”可以包括与脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺结合或者同时给药的任何物质，并且这样的物质可以加强病体的免疫响应。辅助剂不限于此地包括铝化合物，例如凝胶、氢氧化铝、磷酸铝、弗氏完全佐剂或者弗氏不完全佐剂（例如，其中脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺抗原结合在石蜡油乳浊液稳定水的液相中）。可以采用不同类型的油，例如鲨烯油或者花生油，替换石蜡油。具有辅助剂特性的其它材料包括 BCG（减毒的结核分支杆菌）、磷酸钙、左旋咪唑、异丙肌苷、多离子集合体（例如，多 A: U）、蘑菇多糖、白喉毒素、脂 A、皂甙、QS-21 和多肽，例如胞壁酰二肽。稀有的土盐，例如镧和铈，也可以用做辅助剂。辅助剂的

用量取决于病体和所用的特殊脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺抗原(例如, 乙酸取代水平), 并且不需要过度实验, 可以由本领域技术人员很容易地确定。

通常, 当以治疗目的给药时, 本发明配方可以应用于药用可接受的溶液。这样的配方通常含有药用可接受的浓缩盐、缓冲剂、保存剂、相容的载体、辅助剂、和任选的其它治疗成分。

本发明组合物可以自身(纯态)或者药用可接受盐的形式给药。当用于药品时, 上述盐应当是药用可接受的, 但是非药用可接受盐可以便利地用于制备其药用可接受盐, 也不应排除在本发明的保护范围之外。这样的药理和药用可接受盐不限于此的包括由下列酸制备的盐: 盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸、马来酸、乙酸、水杨酸、p-甲苯磺酸、酒石酸、柠檬酸、甲烷磺酸、蚁酸、丙二酸、琥珀酸、萘-2-磺酸、苯磺酸。另外, 可以使用碱金属或者碱土金属制备药用可接受盐, 例如羧酸基团的钠盐、钾盐、或钙盐。

适合的缓冲剂包括: 乙酸和一种盐(1-2%重量/体积); 柠檬酸和一种盐(1-3%重量/体积); 硼酸和一种盐(0.5-2.5%重量/体积); 磷酸与一种盐(0.8-2%重量/体积)。适合的保存剂包括苯扎氯铵(0.003-0.03%重量/体积)、氯丁醇(0.3-0.9%重量/体积)、对羟基苯甲酸酯类(0.01-0.25%重量/体积)和硫柳汞(0.004-0.02%重量/体积)。

本发明提供了医药用途的药物组合物, 其中含有脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺与一种或者多种药用可接受载体和任选的其它治疗成分。文中所用名词“药用可接受载体”在下文将做更详细的描述, 指的是适合给药人类或者其它动物的一种或者多种相容的固体或者液体填充物、稀释剂或者胶囊物质。本发明中, 名词

“载体”定义为与活性成分混合有利于应用的、天然或者合成的有机成分或者无机成分。本发明的药用组合物成分也可以一定方式与脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺相互混合,以致各成分之间不存在充分削弱所需药用效果的相互作用。

通常,适合非肠道用药的组合物含有等渗于受体血液的无菌多糖水性制品。可以使用的可接受载体与溶剂包括水、林格溶液、等渗的氯化钠溶液。此外,通常无菌的不挥发性油可以用做溶剂或者悬浮介质。为了此目的,可以使用任何温和的不挥发性油,其中包括合成的甘油一脂、甘油二脂。此外,脂肪酸,例如油酸,可以应用于可注射的制剂。适合皮下给药、肌肉内给药、腹膜内给药、静脉内给药等方式的载体配方可以参见《雷明顿药理学》(Mack Publishing Company, Easton, PA)。

本发明制品可以有效用量给药。如上文所述,有效用量指的是能够单独或者与附加剂量一起分别诱导主动免疫或者调理作用感染细菌的脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺或者抗脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺抗体的用量。可以认定,取决于用药形式,1毫微克—100毫克/千克的剂量范围是有效的。可以认定,优选的剂量范围是500毫微克—500微克/千克,最优选的剂量范围是1—100微克/千克。绝对用量取决于各种因素,其中包括,给药是否实施在尚未受细菌感染的高危病体或者是已经受感染的病体,共同施用的疗法,用药次数和个体病人的参数,其中包括年龄、身体状况、身高和体重。这些是本领域普通技术人员公知的因素,可以通过常规实验获得。通常优选的是,根据合理的医学判断,所用的最大剂量是最高安全药量。

可以设计本发明药用组合物的多种给药方式。通常,免疫方案涉及将高剂量的抗原给药,经过几周后,接着将低剂量的抗原给药。还可以同时给药附加剂量。如果需要,被动免疫的给药方

案完全不同于高频率的给药方案。可以使用增强抗细菌感染的免疫响应和/或随后保护病体免受感染的任何用药法。通过常规实验,本领域普通技术人员可以确定多次给药特殊脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺所需的给药间隔。

可以采用各种给药线路。当然,所选的特殊方式取决于所选的特殊脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺、待治疗的特殊症状、有效治疗所需的剂量。一般地讲,实施本发明方法可以采用医学可接受的任何给药方式,也就是,未造成临床不可接受副作用的条件下,产生有效免疫响应的任何方式。优选的给药方式是非肠道线路。名词“非肠道”包括皮下注射、静脉内注射、肌肉内注射、腹膜内注射、或者注入技术。其它线路不限于此地包括口腔线路、鼻线路、舌下线路、和局部线路。

通常,本发明组合物以单位剂量的形式出现,并且可以由药学领域任何公知的方法制备。所有方法都包括将脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺或者其结合剂与构成一种或者多种辅助成分的载体混合的步骤。通常,通过将聚合物与液态载体、或者磨碎的固态载体、或者与两种载体均匀充分地混合,如果需要,接着将产品成型,制备此组合物。此聚合物可以冻干储存。

其它传输系统可以包括限时释放传输系统、缓释传输系统、或者持续释放传输系统。这样的系统可以避免本发明多糖的重复给药,增加了病体与医生的便利。一些类型的释放传输系统是可用的,对于本领域普通技术人员众所周知。它们包括聚合物基系统,例如聚乳酸和聚乙醇酸、聚酐和聚己酸内酯;脂类的非聚合物系统,其中包括固醇,例如胆固醇、胆甾醇酯,和脂肪酸或者中性脂肪,例如甘油酯、甘油二酯、甘油三酯;水凝胶释放系统;硅橡胶系统;肽基系统;使用常规粘合剂和赋形剂的蜡涂布压缩片剂,部分融合的植入片等。特定实例不限于此地包括:(a)基

质中含有某种形式多糖的侵蚀系统，参见美国专利 No4452775 (Kent); 4667014 (Nestor 等人); 4748034 和 5239660 (Leonard); (b) 活性化合物以可控速率透过聚合物的扩散系统，参见美国专利 No.3832253 (Higuchi 等人)和 3854480(Zaffaroni)。此外，可以使用泵基设备传输系统，其中一些系统适合植入体内。

本领域普通技术人员还可以认定，本发明聚 N-乙酰基葡萄糖胺抗原自身具有辅助剂的性质。文中所述多糖达到增强人类免疫响应的程度时，它们可以作为辅助剂与其它材料结合。

本发明的脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺抗原和抗脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺抗体可以与另一种抗菌（杀菌）药物结合传输，或者以抗菌鸡尾酒的形式传输，或者与其它细菌抗原或者抗细菌抗体结合传输。抗菌抗生素鸡尾酒是本发明任何组合物与抗菌药物的混合物。治疗细菌感染中使用抗生素是常规用药。对于诱导主动免疫使用抗原，对于诱导被动免疫使用抗体也同样是常规应用。在此具体实施方式中，普通的给药赋形剂（例如，片剂、植入片、可注射溶液等）可以含有本发明组合物和抗菌抗生素药物和/或抗原或抗体。此外，抗菌抗生素药物和/或抗原或抗体可以分别用药。抗菌剂（例如，抗生素）也可以与脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺或者抗脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺抗体结合。

抗菌抗生素药物是众所周知的，并且包括：青霉素 G、青霉素 V、氨苄西林、阿莫西林、巴氨西林、环青霉素、依匹西林、海他西林、匹氨西林、甲氧西林、萘夫西林、苯唑西林、氯唑西林、两氯西林、氟氯西林、羧苄西林、替卡西林、avlocillin、美洛西林、哌拉西林、氮卓西林、头孢西林、头孢霉定、cefadoxil、头孢克洛、头孢唑林、头孢呋肟酯、头孢孟多、头孢尼西、头孢西丁、头孢塞肟、头孢唑肟、cefmenoxine、头孢曲松、拉氧头孢、头孢替坦、头孢哌酮、ceftazidime、亚胺培南、棒酸钾、特美汀、

舒巴坦、新霉素、红霉素、甲硝唑、氯霉素、克林霉素、林克霉素、万古霉素、甲氧苄啶-磺胺甲恶唑、氨基糖甙类、喹诺酮类、四环素类和利福平（参见《古德曼和吉尔曼治疗学药理学基础》第8版，1993年，McGraw Hill Inc）。

其它多糖抗原与抗体在本领域众所周知。例如，下列多糖抗原和/或其对应抗体可以与脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺抗原和/或抗体结合给药：伤寒沙门氏菌荚膜 Vi 抗原（Szu, SC X Li, AL Stone 和 JB Robbins, Vi 《荚膜多糖结构与免疫特性之间的关系》，《感染与免疫》1991 年第 59 期第 4555-4561 页）；大肠杆菌 K5 荚膜（Vann, W, MA Schmidt, B Jann 和 K Jann, 《泌尿道感染大肠杆菌的荚膜多糖（K5 抗原）结构，O10: K5: H4 与脱硫肝素相似的聚合物》，欧洲期刊《生物化学》1981 年第 116 期第 359-364 页）；金黄色葡萄球菌类型 5 的荚膜（Fournier JM K Hannon, M Moreau, WW Karakawa 和 WF Vann, 《从金黄色葡萄球菌离析类型 5 的荚膜多糖》，Ann. Inst Pasteur(巴黎), 《微生物学》1987 年第 138 期第 561-567 页）；根瘤菌 melilori 外多糖 II（Glazebrook J 和 GC Walker, 《通过根瘤菌 meliloti 一种新型外多糖能够功能性替代苜蓿生节瘤中卡尔科弗卢尔结合的外多糖》，《细胞》1989 年第 65 期第 661-672 页）；B 组葡萄球菌类型 III（Wessels MR, V. Pozsgay, DL Kasper 和 HJ Jennings, 《B 组类型 III 葡萄球菌荚膜多糖低聚糖重复单元的结构与免疫化学》，期刊《生物化学》1987 年第 262 期第 8262-8267 页）；绿脓假单胞菌 Fisher 7 氧-特异侧链（Knirel, YA, NA Paramonov, EV Vinogradov, AS Shashkow, BA NK Kochetkov, ES Stanislavsky 和 EV Kholodkova, 《绿脓假单胞菌的体细胞抗原，绿脓假单胞菌 O3(Lanyi), 025(Wokatsch) 和 Fisher 免疫类型 3 和 7 脂多糖的氧-特异多糖链的结构》，欧洲期刊《生物化学》1987 年第 167 期第 549 页）；宋内氏痢疾杆菌的氧-特异侧链（Kenne. L, B Lindberg 和 K Petersson, 《宋内氏痢

疾杆菌相 I 脂多糖氧特异侧链的结构研究》，《糖类研究》1980 年第 78 期第 119-126 页）；肺炎链球菌类型 I 荚膜（Lindberg,B,Lindqvist,B,Lonngren J, Powell DA, 《肺炎链球菌类型 I 荚膜多糖的结构研究》，《糖类研究》1980 年第 78 期第 111-117 页）；和肺炎链球菌属抗原（Jennings HJ, C. Lugowski 和 NM Young, 《肺炎链球菌类型 I 复合多糖碳物质的结构》，《生物化学》1980 年第 19 期第 4712-4719 页）。

其它非多肽抗原及其对应抗体对于本领域技术人员众所周知，并且可以与本发明的脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺组合物结合使用。

脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺抗原和抗体还可以用于确定病体或者样品免疫状态的诊断测定，或者可以作为免疫分析的试剂。例如，抗体可以用于检测细菌样品表面聚 N-乙酰基葡萄糖胺的存在。如果细菌存在于样品，那么抗体还可以用于治疗感染的病体。抗体还可以用于筛选存在聚 N-乙酰基葡萄糖胺抗原的细菌，并且可以从复杂的混合物中离析脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺或者聚 N-乙酰基葡萄糖胺抗原和含有脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺或者聚 N-乙酰基葡萄糖胺抗原的细胞。

通过标记脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺或者其抗体和/或将脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺或者其抗体固定在不溶性的基质上，实现上述测定或者本领域公知的任何其它测定。使用脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺和/或其抗体的分析与诊断方法使用了至少一种下列试剂：标记的分析物类似物、固定的分析物类似物、标记的结合配偶体、固定的结合配偶体、立体结合物。所用的标记可以是任何不干扰分析物与其结合配偶体结合的可测功能性标记。在免疫测定中使用的多种标记众所周知。例如，可以直接检测的化合物，如荧光色素、化学发光标记、放射性标记，以及通过反应或者衍生作用、

例如通过酶作用可以测得的化合物。这样类型标记的实例包括 ^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 和 ^{131}I 放射同位素，荧光基团、例如稀土螯合物或者荧光素及其衍生物，若丹明及其衍生物，丹酰，伞形酮，萤光素霉、例如萤火虫荧光素酶和细菌荧光素酶（美国专利 No4737456），萤光素，2, 3-dihydrophthalavinedione，辣根过氧化酶（HRP），碱性磷酸酶， β -半乳糖苷酶，葡糖淀粉酶，溶菌酶，糖基氧化酶、例如葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶、和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶。杂环氧化酶，例如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶，与利用过氧化氢氧化染料前体的酶结合，例如 HRP、乳过氧化物酶、微过氧化物酶、生物素卵白素、自旋标记、噬菌体标记、和稳定自由基。

通过本领域技术人员的公知方法，标记可以与脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺或者抗脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺抗体结合。例如，美国专利 No.3940475 和 3645090 举例说明了荧光基团、酶与抗体的结合。根据本发明采用、通常重复使用抗原与抗体的其它测定法包括竞争测定法和夹心测定法。

本发明包括制备脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺抗原的方法，其中包括先制备表达聚 N-乙酰基葡糖胺的宿主细胞，然后将细胞内附着的基因座导入宿主细胞，接着，从上述细胞离析聚 N-乙酰基葡糖胺抗原，最后，将所得抗原脱乙酰化处理，生成脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺。通过使用编码细胞内附着基因（SEQ ID NO: 1）的核酸转染、转导或者转化细胞，可以制备聚 N-乙酰基葡糖胺宿主细胞。细胞可以是真核细胞或者原核细胞，但是优选的是细菌细胞。细胞可以是非自然表达聚 N-乙酰基葡糖胺的葡萄球菌。

在一具体实施方式中，细胞内附着的核酸可操作地与在真核或者原核细胞内指导表达细胞内附着核酸的基因表达序列相连接。“基因表达序列”指的是促进与其可操作相连接细胞内附着

核酸有效转录和翻译的任何调节性核苷酸序列，例如促进子序列或者促进子-增强子的组合序列。基因表达序列可以是，例如哺乳动物或者病毒的促进子，例如组成型启动子或者诱导型启动子。组成型哺乳动物启动子不限于此地包括对应下列基因的启动子：次黄嘌呤转磷酸核糖基酶（HPTR）、腺苷脱氨酶、丙酮酸激酶、和 β -肌纤蛋白。在细胞中组合发挥功能的病毒启动子实例包括，例如猿猴病毒启动子、乳头瘤病毒启动子、腺病毒启动子、人类免疫性缺陷病毒（HIV）启动子、劳斯肉瘤病毒启动子、细胞巨化病毒启动子、莫洛尼氏白血病毒和其它逆转录病毒的长末端重复序列（LTR）、单纯疱疹病毒的胸腺嘧啶脱氧核苷激酶启动子。其它组成型启动子对于本领域普通技术人员众所周知。用做本发明基因表达序列的启动子还包括诱导型启动子。在诱导剂存在的条件下，诱导型启动子获得表达。例如，在某种金属离子存在的条件下，亲金属蛋白启动子被诱导促进了转录与翻译。其它诱导型启动子对于本领域普通技术人员众所周知。

一般而言，如果需要，基因表达序列应当分别包括涉及转录与翻译初始化的5'非转录序列和5'非翻译序列。这种5'非转录序列可以包括启动子区域，其中含有转录控制可操作连接细胞内附着核酸的启动子序列。基因表达序列任选含有所需的增强子序列或者上游活化子序列。

当在影响或者控制基因表达序列的条件下，细胞内附着核酸序列与基因表达序列以某种方式共价连接，导致细胞内附着编码序列的转录与翻译时，细胞内附着核酸序列与基因表达序列被称为“可操作地连接”。当需要将细胞内附着序列翻译成功能性蛋白时，如果诱导5'基因表达序列中的启动子，造成了细胞内附着序列的转录，并且如果两种DNA序列的连接本质未能（1）造成移码突变的导入，（2）干扰启动子区域引导细胞内附着序列转录

的能力，(3) 干扰对应转录 RNA 翻译成蛋白的能力，那么，这两种 DNA 序列被称为可操作地连接。因此，如果基因表达序列能够影响细胞内附着核酸序列的转录，以致所得转录产物可以翻译成所需的蛋白或者多肽，那么基因表达序列一定可操作地连接到细胞内附着的核酸序列。

本发明的细胞内附着核酸可以单独或者与媒介物结合共同传输到宿主细胞。从最广义上讲，“媒介物”是具有下述能力的任何载体：(1) 有助于传输含有细胞内附着基因座中基因的核酸分子，其中基因编码了涉及聚 N-乙酰基葡萄糖胺合成的蛋白；(2) 有助于目标细胞摄取含有细胞内附着基因座中基因的核酸分子，其中基因编码了涉及聚 N-乙酰基葡萄糖胺合成的蛋白。优选的是，媒介物传输细胞内附着分子到目标分子中，伴随着相对于缺少媒介物条件下造成降解程度的减量降解。通常，本发明所用的媒介物可以分为两种类型：生物媒介物和化学/物理媒介物。生物媒介物可以用于将细胞内附着核酸传输到目标细胞中，或者促使目标细胞摄取细胞内附着核酸。化学/物理媒介物可以用于将细胞内附着的核酸或多肽传输到目标细胞中，或者促使目标细胞摄取细胞内附着的核酸或多肽。

生物媒介物不限于此地包括质粒，噬菌粒，病毒，由病毒或者细菌来源获得的、经处理插入或与本发明核酸序列结合的其它媒介物，可以附着在本发明核酸序列的游离核酸片段。病毒媒介物是优选类型的生物媒介物，并且不限于此地包括来自下列病毒的核酸序列：逆转录病毒，例如：莫洛尼氏鼠白血病病毒、哈维鼠肉瘤病毒、鼠乳腺肿瘤病毒、劳斯肉瘤病毒、腺病毒伴随病毒、SV-40 类型病毒、多瘤病毒、EB 病毒、乳头瘤病毒、疱疹病毒、痘苗病毒、脊髓灰质炎病毒；RNA 病毒，例如任何逆转录病毒。人们可以很容易地使用本领域公知的未曾提及的其它媒介物。

优选的病毒媒介物是基于非细胞病变的真核病毒，其中其非核心基因已经被重要基因所替换。非细胞病变病毒包括逆转录病毒，其生命周期涉及基因组 RNA 反向转录为 DNA，随后前病毒式地整合到宿主细胞 DNA 上。一般而言，逆转录病毒具有复制缺陷（即能够引导合成所需的蛋白，但是不能制备感染的颗粒）。制备复制缺陷逆转录病毒的标准方案可以参见《基因传递与表达，实验手册》（Kriegler M,WH Freeman Co,纽约(1990)）和《分子生物学的方法》第 7 卷（Murry EJ 编辑，Humana Press,Inc,Cliffton,New Jersey(1991)），其中包括如下步骤：将外源性遗传物质与质粒合并，用质粒填充的包装细胞转染，通过包装细胞株制备重组的逆转录病毒，从组织培养物介质中收集病毒颗粒，再使用病毒颗粒感染目标细胞。

对于特定应用，另一个优选的病毒是腺病毒伴随病毒，一种双链 DNA 病毒。腺病毒伴随病毒可以设计成为复制缺陷病毒，并且可以感染范围广泛的细胞类型与细胞种类。腺病毒伴随病毒还具有多种优点，例如热稳定性和脂溶剂稳定性；在多种细胞系中的高转导频率；缺乏对重复感染的抑制，因此允许复联式转导。据报道，腺病毒伴随病毒能够以特定位点的方式整合入人类细胞 DNA，因此使插入突变可能性和插入基因表达可变性最小化。此外，在缺乏选择压力的条件下野生型腺病毒伴随病毒感染已经在组织培养物中传过至少 100 代，这表明，腺病毒伴随病毒染色体组整合是相对稳定的。腺病毒伴随病毒还能够以染色体外方式发挥作用。

除了生物媒介物，化学/物理媒介物可以用于将细胞内附着分子传输到目标细胞并且有利于目标细胞的摄取。如文中所用，“化学/物理媒介物”指的是，除了从细菌学或病毒来源获得的媒

介物外，能够传输细胞内附着分子到目标细胞的天然或者合成分子。

本发明优选的化学/物理媒介物是胶体分散系。胶体分散系包括脂基系统，其中包括水包油乳浊液、胶粒、混合胶粒、和脂粒体。本发明优选的胶体分散系是脂质体。脂质体是在生命体内或生命体外用做传输媒介物的人工膜容器。经证实，粒径范围在 0.2—4.0 μm 的单层大容器可以胶囊化大型大分子。RNA、DNA 和完整的毒粒可以被装入胶囊的水性内部，并以生物活性方式传输到目标分子中（Fraley 等人，《生物化学趋向》1981 年第 6 期第 77 页）。为了作为有效的基因转移媒介物，脂质体应当具有下列一种或者多种性质：（1）高效胶囊化重要基因，并保留其生物活性；（2）高效传输小囊泡水性内含物到目标细胞的细胞质中；（3）准确有效地表达基因信息。

脂质体可以从 Gibco BRL 商业获得，例如 LIPOFECTINTM 和 LIPOFECTACETM，其构成了阳离子型脂类，例如氯化 N-[1-（2，3-二油酰氧基）-丙基]-N，N，N-三甲基铵（DOTMA）和溴化二甲基二（十八烷基）铵（DDAB）。制备脂质体的方法在本领域众所周知，并且已经公开在许多文献中。Gregoriadis G 还对脂质体进行过评论，参见《生物化学趋势》1985 年第 3 期第 235-241 页。

还可以单独使用压紧剂，或者与本发明的生物媒介物或者化学/物理媒介物结合使用。如文中所用，“压紧剂”指的是中和核酸负电荷使其压紧成微粒的试剂，例如组蛋白。压紧核酸有利于目标分子摄取核酸。压紧剂可以单独使用，即以目标分子更有效摄取的形式传输细胞内附着分子，更优选的是，与一种或者多种上述媒介物结合使用。

有利于目标细胞摄取细胞内附着核酸的其它组合物实例包括磷酸钙、分子间输送的其它化学介质、微注射组合物、电穿孔组合物和同源重组组合物（例如，将细胞内附着核酸整合到目标细胞染色体的预定位置）。

下列实施例旨在加以说明，并非对本发明保护范围加以限制。

具体实施方式

实施例 1：脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺的提纯

经发现，根据本发明可以从表达细胞内附着基因座的任何细胞株制备脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺。特别是，这些细菌株包括表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、和其它葡萄球菌株，例如由细胞内附着基因座中基因转化的肉葡萄球菌。根据本发明，可以使用下述特定菌株，从包含物中提纯聚 N-乙酰基葡糖胺：表皮葡萄球菌 RP62A（ATCC 编码 35984），表皮葡萄球菌 RP12（ATCC 编码 35983），表皮葡萄球菌 M187，肉葡萄球菌 TM300（pCN27），金黄色葡萄球菌 RN4220（pCN27）和金黄色葡萄球菌 MN8 粘液样。

下述是从含有细胞内附着基因座葡萄球菌制备脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺的方法。

按照如下所述培养细菌，可以从表达细胞内附着基因的葡萄球菌培养物制备初始材料：从 16 升细菌培养介质的培养物制备多糖。优选的介质是基于 RPMI-1640AUTO-MOD 的化学成分确定的培养基（CDM），一种通过热压处理（Sigma Chemical Co, St, Mo）灭菌改进的 RPMI 制品。CDM 补充了额外的氨基酸、维生

素和核苷酸，将它们的浓度调节到其它 CDM 中的浓度（Hussain M, JGM Hastings 和 PJ White, 1991），一种由凝固酶-阴性葡萄球菌制备粘质的化学成分确定的培养基，医学期刊《微生物学》第 34 期第 143-147 页。上述的培养基还可以补充蔗糖和葡萄糖至 1% 最终浓度。

使用单克隆的产生多糖细菌株接种液体培养物。优选的菌株命名为金黄色葡萄球菌 MN8m，一种基本的多糖过剩生产者。从胰蛋白酶大豆琼脂平板或者相似的细菌培养介质平板提取单克隆，然后在 37℃ 下培养。10—42℃ 的温度范围也可以接受。在 37℃ 连续搅拌并且以 2 升/分钟的速度通入氧气的条件下，培养液体培养物 1-96 小时。在整个培养过程中，通过采用 PH 滴定计加入 10N 氢氧化钠，将 PH 值保持在 7.0。培养周期结束后，以 9000 个重力离心 30 分钟沉淀细胞体，然后，采用正切流动过滤（10,000—500,000 分子量截流膜），将上清液浓缩到大约 500 毫升。加入两倍体积的乙醇，沉淀天然多糖制品。通过离心收集沉淀物，再次悬浮在水中，过夜离析去除蒸馏水。抗原是不可溶的。将不可溶的天然抗原悬浮在 50 毫升磷酸盐缓冲液中（PBS，0.1M 磷酸，0.15M 氯化钠），接着，在 37℃ 下加入溶菌酶（0.5 毫克）和溶葡萄球菌酶（0.5 毫克）消化 0.5—16 个小时。在 37℃ 下，再用核酸酶（0.5 毫克）进一步处理抗原悬液，随后，在 37—56℃ 下用蛋白酶 K（5 毫克）培养 0.5—16 个小时。经渗析与冻干处理后，将干燥的提取物溶解在 5M 盐酸中，再使用 4N 氢氧化钠将 PH 值调节至 2。将 20 毫升此溶液的等分试样施用于填充 Sephacryl S-300（Pharmacia, Piscataway, NJ）的 5x88 厘米层析柱，使用 0.1N 盐酸/0.15M 氯化钠缓冲液，洗脱由 206nm 处吸光度鉴别出的多糖。将对应连续分子粒径范围多糖的部分集中起来，渗析脱水，再冻干处理。此外，可以采用本领域公知的多种替代方法实施按大小进行分级分离，例如使用渗滤膜。

通过化学处理天然多糖，调节乙酰化的程度。因此，先离析大于 50%乙酰化的多糖，然后再脱乙酰处理，获得所需的乙酰化程度。处理是在公知的碱溶液中进行，从葡糖胺去除氨基连接的乙酸基团。优选的方式是 37℃ 下在 1.0M 氢氧化钠中培养 2—20 个小时。碱性弱的溶液与更长的培养时间、或者更高的培养温度，或者，碱性强的溶液与更短的培养时间、或者更低的培养温度，同样是有用的。通常，在适当温度下，将 PH 值提升至 10 以上的任何处理都是有用的。

还存在脱乙酰化处理抗原的酶方式。这些酶方式包括脱乙酰酶，例如，与氯霉素脱乙酰酶和细胞内附着 B 基因产品有关的酶方式。

实施例 2: 脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺—白喉类毒素 (DTm) 结合物疫苗的制备

通过还原性氨基化作用，白喉类毒素共价结合到提纯的脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺上。如下文步骤 1 所述，通过使用戊二醛处理蛋白，首先将醛基团导入到白喉类毒素的表面上。随后，如下文步骤 2 所述，在还原剂氰硼氢化钠存在的条件下，通过其游离的氨基基团活化的白喉类毒素与脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺发生反应。

步骤 1: 使用戊二醛活化白喉类毒素

采用 10kDa MWCO 渗析盒，在室温下去除 0.1M 碳酸盐缓冲液 (PH10) 3 个小时，渗析出 10 毫克白喉类毒素 (4.86 毫克/毫升溶液，其中含有 20mM HEPES 缓冲液，50mM 氯化钠，PH8)。当蛋白溶液被碳酸盐溶液完全置换后，加入戊二醛至其最终浓度 1.25%，然后在室温下搅拌混合物 2 个小时。这样产生了活化的

白喉类毒素，通过使用 10kDa MWCO 过滤膜超滤，用磷酸盐缓冲液（PBS，PH7.4）交换活化的白喉类毒素，使其浓缩到大约 10 毫克/毫升。

步骤 2: 将活化的白喉类毒素与聚 N-乙酰基葡萄糖胺结合

按照 Maira 等人公开的内容 (Maira-Litran T, Kropec A, Abeygunawardana C, Joyce J, Mark IIIG, Goldmann DA, 和 Pier GB, 《葡萄球菌聚-N-乙酰葡萄糖胺表面多糖的免疫特性》，《传染与免疫》2002 年第 70 期第 4433—4440 页)，提纯聚 N-乙酰基葡萄糖胺。此材料的一部分，被 Maira 等人命名为 PNAG-II，可以用于制备脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺（dPNAG）。在 5M 氢氧化钠中将天然聚 N-乙酰基葡萄糖胺溶解至 2 毫克/毫升的浓度，然后在 37℃ 搅拌下培养。18 小时后，将样品放入冰浆中，冷却至小于等于 10℃。再将 5N 盐酸放在冰上冷却，然后加入 0.5 毫升等分试样，直到溶液达到中性 PH 值。接着，使用 10 千道尔顿分子量截流渗析盒（10k MWCO），过夜渗析脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺溶液，去除蒸馏水，然后，再冻干处理。此过程产生了带有 15—20% 乙酸取代的脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺。

将提纯的脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺（10 毫克）溶解到 0.25 毫升 5M 盐酸中，然后用等体积的 5M 氢氧化钠中和，再用 PBS 将最终体积调节到 2 毫升。在中性 PH 下脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺溶液是不可溶的，但是在微酸性或者微碱性 PH 值下完全溶解。因此，为了确保溶解性，可以将脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺溶液的 PH 值调节至 9.0。将脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺（10 毫克）与 1 毫升的 10 毫克/毫升含有活化白喉类毒素的 PBS 溶液混合，再调节反应的 PH 值至 7.5。接着，向混合物加入 200 毫克提纯的氰硼氢化钠，黑暗中对在 37℃ 搅拌下使反应持续 14 个小时。持续反应后，使用 PH10 含有 0.15M 氯化钠的 0.1M 碳酸盐缓冲液（10kDa

MWCO 渗析盒), 渗析交换反应混合物, 然后, 采用凝胶过滤层析法, 使用 Superose 6 预备级层析柱, 从未结合的成分中提纯高分子量的结合物。去除 PH8 含有 50mM 氯化钠的 20mM HEPES 缓冲液, 渗析出脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺-白喉类毒素结合物, 并在-2℃下冷冻储存。

实施例 3: 天然聚 N-乙酰基葡萄糖胺—白喉类毒素结合物疫苗的制备

如下文步骤 1 所述, 使用有机氰化剂 1-氰基-4-二甲基氨基吡啶四氟硼酸盐 (CDAP) 激活多糖羟基基团, 将天然的聚 N-乙酰基葡萄糖胺 (在此情况下, 带有 95—100% 乙酸取代) 与提纯的白喉类毒素共价结合。随后, 如步骤 2 所述, 在不需要额外间隔分子条件下, 将 CDAP 活化的聚 N-乙酰基葡萄糖胺与白喉类毒素结合。

步骤 1: 使用 CDAP 活化聚 N-乙酰基葡萄糖胺

将 10 毫克提纯的聚 N-乙酰基葡萄糖胺溶解到 150 微升 5M 盐酸中, 再用等体积 5M 氢氧化钠中和, 接着, 用 PH9.2 硼酸缓冲液稀释至 1 毫升。在乙腈中将 CDAP 制备成 100 毫克/毫升的浓度, 然后在-20℃下储存长达 1 个月。使用移液管将 200 微升 CDAP (含有 20 微克) 缓慢地移入先前混合的含有 PNAG-II (Maira 等人, 《传染与免疫》2002 年第 70 期第 4433-4440 页) 硼酸盐缓冲液 (迅速加入有机共溶剂沉淀多糖), 然后, 使反应进行 2 分钟。

步骤 2: CDAP-活化的聚 N-乙酰基葡萄糖胺与白喉类病毒的结合

采用 10Kda MWCO 渗析盒，去除 PH9.2 硼酸盐缓冲液 3 小时，渗析出 5 毫克白喉类毒素（PH8 含有 20mM HEPES 溶液、50mM 氯化钠的贮存液）。在用 CDAP 活化聚 N-乙酰基葡萄糖胺后，立即加入 5 毫克白喉类毒素，室温搅拌下混合物反应持续 3 个小时。经过反应时间后，采用凝胶过滤层析法，使用 Superose 6 预备级层析柱，从未结合的成分中提纯高分子量结合物。将含有聚 N-乙酰基葡萄糖胺-白喉类毒素结合物的部分集中起来，浓缩后在 -20℃ 下冷冻储存。

实施例 4: 兔抗血清的制备

通过两次皮下免疫 10 μ g 剂量的结合多糖，在新西兰白兔中培养提纯聚 N-乙酰基葡萄糖胺-白喉类毒素的抗体或者脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺-白喉类毒素的抗体，其中第一次结合多糖乳化在弗氏完全佐剂中，第二次结合多糖乳化在不完全佐剂中，此后一周三次静脉注射含有抗原的盐水，每次注射间隔三天。每两周从实验兔抽取血样，并且采用酶联免疫吸附测定法进行血清检测。采用酶联免疫吸附测定法从聚 N-乙酰基葡萄糖胺或者脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺-白喉类毒素结合物免疫的两只样本兔获得的结合曲线分别绘制在图 1 和 2 上。按照 Maira 等人公开的内容，确定滴定度（Maira-Litran T, Kropec A, Abeygunawardana C, Joyce J, Mark III G, Goldmann DA, 和 Pier GB, 葡萄球菌聚-N-乙酰葡萄糖胺表面多糖的免疫特性，《传染与免疫》2002 年第 70 期第 4433—4440 页）。

实施例 5: 鼠聚 N-乙酰基葡萄糖胺-白喉类毒素和脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺-白喉类毒素的免疫原性

每隔一周，将含有 1.5、0.75 或者 0.15 μ g 聚 N-乙酰基葡萄糖胺-白喉类毒素与脱乙酰聚 N-乙酰基葡萄糖胺-白喉类毒素结合多糖的 0.1 毫升 PBS 皮下免疫包括 10 只鼠的实验组，第三次免

疫后，连续四周每周抽取血样。使用相同比率未结合多糖与蛋白的混合物免疫对照组。使用天然和脱乙酰结合物免疫鼠的滴定度分别绘制在图 3 和 4 上。在所使用的任何剂量下对照组未显示出滴定度。

实施例 6: 对应聚 N-乙酰基葡糖胺和与白喉类毒素结合的脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺培养的鼠抗血清的调理素致死活性

如上所述，使用与白喉类毒素结合的聚 N-乙酰基葡糖胺免疫两只鼠，并且使用与白喉类毒素结合的脱乙酰聚 N-乙酰基葡糖胺免疫两只鼠。按照 Maira 等人公开的方法，确定调理素致死活性 (Maira-Litran T, Kropec A, Abeygunawardana C, Joyce J, Mark III G, Goldmann DA, 和 Pier GB, 葡萄球菌聚-N-乙酰葡糖胺表面多糖的免疫特性, 《传染与免疫》2002 年第 70 期第 4433—4440 页)。在杀死大于等于 40% 细菌的条件下，确定滴定度，并且定义为血清稀释率。抑制多种葡萄球菌菌株的四只鼠抗血清的结合曲线绘制在图 5—8 上。菌株 M187 是表皮葡萄球菌菌株；其它菌株是所有的金黄色葡萄球菌菌株。滴定度的比较显示在图 9 中。

等效说明

可以认定，上文所录的说明书足以使本领域技术人员实施本发明。由于上述实施例仅旨在说明本发明的一个方面，其它功能等效的具体实施方式同样属于本发明的保护范围，因此本发明并未受限于由提供实施例所确定的保护范围。除了文中所公开与记录的内容外，从上述说明书获得本发明的多种改进方式对于本领域技术人员显而易见，并且属于所附权利要求的保护范围。本发明的优点与目的不必涵盖于本发明的每个具体实施方式。

本申请所提及的所有参考文献、专利和专利申请的全部内容通过在此引述合并于本文。

序 列 表

<110> 布赖汉姆妇女医院

<120> 葡萄球菌感染的多糖疫苗

<130> B0801.70255WO00

<140> NOT YET ASSIGNED

<141> 2003-11-12

<150> US 60/425,425

<151> 2002-11-12

<160> 1

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 6520

<212> DNA

<213> Staphylococcus aureus

<400> 1

```

ggtaccgagc tgcgtaatag gtgactttgg ttgttcattg acaattaaac ttgatgtact      60
tcttcgtgta ttcgtcatgg taattcctcg taaattaaaa tttttgtatt gaacctaaaa      120
taggtaatcc tagttgcgat tcaacatctt cttctgtctt aatacgctta tctaataatt      180
cttttaagaa aataatcaat attgctaaaa caataccaac aataatgctg ataactaagt      240
tgacagatac tattggagat actttttacgg cattatcatg tgctgaggaa agtatcgtaa      300
cattatcaac actcataatt ttaggcattg catgagcaaa aacttttagat attttattaa      360
caattttgtc agattcagat ttattcccag tggttaactga tacagtaata atttgagagt      420
ttgtttgatt ggttactttt aaaaatgaat tcaactcagc tgttgaatac tgaccatcaa      480
attctctaga tactttatct agaattctag gacttttgat aatttcogta tatgtattaa      540
cagactgcaa actactttga acattttgga aagctaaatc acttgaggac tttttcatgt      600
tcactaatat ttgagtagaa gcagtatatt tgtcaggcat aacaaaaaag gttaatgccg      660
cacttactac aagacatatt gccggtaaaa taagcaataa tttaatattc ttcttttagaa      720
tatttaatag ttttactaaa tcaaactttt ctttcattgg ttcttcacaa taatcaatca      780
ttgtattcat tatgtatggt ttataaatcg gacaattata tctagtttaa cgaccacaaa      840
acatacacia ctacattttc tctaattatt tatataaata ttttatcggt taaaattata      900
tcatgattct ctaccattat gtataactta tttatatttt tgcacaagat ataattattgt      960
ccaactttta atatccaaac ctattaataa taaaactaga taccatcgta ctctgtcatg     1020
gttttcttat aatcgagtag aagcatcatc attacttgat tatttgctct ttacaacacc     1080
gagcgtgccc gtactcggtg attcaatacc ttgcgtaacc cgtcactgtg agttgggtta     1140

```

atgataataa agcccacacc ttttaaaaag atgtgggtaa tttatataat ttttatttac	1200
atTTTTaact tataaaaaaa agcgctatg tcatgattta ccatcacata ggcgcttacc	1260
aataaattat tacttattac tttccatttc atctaattta tgcggattcc ctgtaattag	1320
atgacaactt attcttttca ggggaacatt acacttttat aatatgttca aagacaaact	1380
taaccattca caaatataaa gaataatatt atcaaactcat tgaacaaatc gtattttgca	1440
acaattgata tttatattaa tgtattgcat ttaatttata aaattcatat acatcttaat	1500
attctcaata tcgatttgta ttgtcaactt tatatagatt taaaaaata atctcatgtc	1560
tttttttaca aaagtaagtt aattattaca aactagtaac aaaaattatt tcttcaaaaa	1620
tatatttagt agcgaataca cttcatcttt gaattgactt ttactttctt ccactgctcc	1680
aaatTTTTgc gaaaaggatg ctttcaaata ccaactttca agaaacagca atattaaatt	1740
ctgaaagtct tcttttgta tctttatctt tgattcatca tagaattttg ctatctcttt	1800
acttaatgat tgatttaaatt cttgtatttg tccgtaaata tttccagaaa attcctcagg	1860
cgtatttagat aattgaacgt acattctaatt atacctttct tcgatgtcga aaataaactc	1920
aaataagaat tgatataaag catcaattga atagttcgat ttattttgat tcatcataat	1980
aattattatta aggtaatcaa aacaacattt aacactttgt tcgtaaatac tttttttcga	2040
gtcaaaatgg taatataaac tcgctttctt tatatttaca ctttttagcta tatcatcaag	2100
tggtgtaccg tcataccctt tctctgaaaa taaggttatt gcgttatcaa taatcttacc	2160
cttcaatttt tataaccccc tactgaaaat taatcacact atgttacagg aaaattaagt	2220
tgcaattaca aatatttccg ttttaattata acaacaatct attgcaaatt aaaatactat	2280
caattaccat atggcttaca acctaaacta cgaaaggtag gtaaagaaat tgcaattttt	2340
taactttttg cttttttacc ctgtatttat gtctatttac tggattgtcg gttcaattta	2400
tttctatttc accagagaaa ttagatatct attgaacaag aagcctgaca taaatgtgga	2460
tgaattagaa ggcattacat ttttacttgc ctgttataac gaaagtgaac cgattgaaga	2520
tacgttgtct aatgttcttg cactcaaata cgagaagaaa gaaattatta tcattaatga	2580
tggaagttca gataatacag cagaactcat ctataaaatc aaagaaaata atgactttat	2640
tttcgtcgat ttacaagaaa acagaggtaa agccaacgca ctcaatcaag gcattaaaca	2700
ggcttcatat gattatgtaa tgtgcttgga tgcagatact atcgttgatc aagatgcacc	2760
atattatatg attgagaatt tcaaactatg tccaaaactt ggtgcggtta caggtaatcc	2820
tagaattcga aataagagtt ctatttttagg taaaattcaa acgatagaat atgcaagttt	2880
aattggctgt attaagcgaa gtcagacact tgctggcgca gtcaatacta tttcgggtgt	2940

cttcactcta	tttaaaaaaa	gtgcagttgt	cgacgttggc	tactgggata	ctgatatgat	3000
taccgaagat	attgcagttt	cttggaatt	gcatttacgt	ggatatcgta	ttaagtatga	3060
accgcttgcc	atgtgttgga	tgttggttcc	agaaacattg	ggaggtcttt	ggaagcaacg	3120
cgtgagatgg	gctcaagggg	gacacgaagt	attactacga	gactttttta	gcacaatgaa	3180
aacgaaaagg	tttcctttat	atattttgat	gtttgagcaa	atcatctcga	ttttatgggt	3240
atatatagt	cttctatatt	taggctat	gttcataaca	gcaaacttct	tagactatac	3300
atztatgaca	tatagttttt	caatatttct	actatcatca	tttactatga	cttttataaa	3360
cgttattcaa	tttacagtcg	cactctttat	tgatagtcgc	tacgagaaaa	agaatatggc	3420
tggactcata	tttgtaagtt	ggtatccgac	agtatactgg	attattaacg	cagcagtagt	3480
tcttgctgca	tttccaaaag	cattaaaacg	taagagaggt	ggttacgcaa	catggtcaag	3540
cccagacaga	gggaataccc	aacgctaaaa	tcatcgctaa	atattgtaag	agaaacagca	3600
cttatcgcta	tatcttgtgt	cttttggata	tattgttttag	ttgttctact	cgtttatatt	3660
gggtactatat	ttgaaattca	tgacgaaagt	atcaatacaa	tacgtgttgc	tttaaacatt	3720
gaaaatactg	aaatttttaga	tatatattgaa	actatgggca	ttttcgcgat	tatcattttt	3780
gtattttttta	caattagcat	attgattcaa	aaatggcaga	gaggagaga	atcgtgaagt	3840
atagaaaatt	tataattttta	gtgttgagta	tcttgatcat	attgcctgta	agcactctgg	3900
atggtcacat	tattgcaa	gcagatgacg	attcacctaa	aaaactgaaa	tataaagaaa	3960
atagtgtct	ggcattaa	tatcacctg	taagaaaagc	gaattttctg	aataattttta	4020
tttacttctt	ttctagtagt	aaagaaatta	aaaattatag	tgtagtcaa	tcacaatttg	4080
aatctcaa	aaaatggcta	aatcacatg	atgctaaatt	tttaaccttg	aaagaatttt	4140
tatattacaa	gaaaaaagg	aagtttccaa	aacgaagtga	gtgggttaac	tttgatgata	4200
tggatgaaac	tatttatgaa	aatgcttctc	caatcttaaa	aaaatataaa	ataccggcga	4260
ctgggtttat	tatcacaggt	catgttggg	gggaaaactt	tcacaacctc	gatatgatta	4320
gtaaaaaaga	actaaaagaa	atgtataaaa	ctgggttatg	ggaatttgaa	acacataccc	4380
acgatttgca	taacttatct	aaaaataata	agtcaaaatt	aatgaaagct	tctgaagcta	4440
caatcataaa	agattttaa	aaaagtga	aatatcta	taaaaacttt	aaaagtcgc	4500
agaaaactat	agcctatcct	tatggcttga	tgaatgacga	taaattaccg	gtaatcaaaa	4560
aagctgggtt	aaaatacgg	ttttcattag	aggaaaaagc	agtcactccg	aactccaatg	4620
attattacat	ccctagaata	ttaattagt	atgatgctt	tgagcattta	attaagagat	4680
gggacggatt	ccatgaaaa	gattagactt	gaactcgtat	atttacgtgc	tattatatgt	4740

```

gcaattatta ttatcacaca ttacttaca caaattactt taaaacatga aaatatggag 4800
ggtgggtcct tagtggtaca attttacatt cgtaatatg tgatttttgg tacaccttgc 4860
tttattatct tgtcacagtt actgacaacc ttgaattacc aaaaagtcac ctatagatac 4920
ttaactacac gcgtaaaata tatacttatt ccttacatat taatgggatt gttttacagt 4980
tatagtgaat cattattaac agattcaagt ttcaataaac aattcattga aaatgtccta 5040
ttaggtcaat ggtatggcta ttttatcggt gttatcatgc aattctttat tttgagttat 5100
atcattttta aaattaacta taacctattc aacagtaaaa tattattatt gttatctttt 5160
attttacagc aatcattttt atattacttt acgaacaaca cagcgtttca cgataccgtg 5220
ctacactatt atcccttaag tgaaaatact ataatatcg gatggatttt ttatttcttc 5280
ttaggtgcat atatgggtta taactacgaa cgtgtattaa atttcttaga acgttattta 5340
gttattatga ttgtattagc tgtagctact tttttgtgt ttattgcgtt agcaaagga 5400
gactattgga acgttaccag cttttcatat tcattaacac catataatag tattatgttt 5460
attgttatct tgggtatttg cagcattttt aaaacaatgt tatttaatac gattcaaag 5520
attagtgtt tctcattctt tattttattta ttacatccaa tcattctaga ctcatgttt 5580
gcataataaa atatatattga ggataatata atgggtctttc tagcgatatc actactattc 5640
attttaggat tatgtatagg tgcggcatg atattgcgtg aattctatat ctttaggttt 5700
attattggaa aacaaccata taaattgaac attaatgctt attaattatt aagctatgtt 5760
aaaaacacgc ggtgggagaa atcagtttga attgactgac ttcgttttac cgcgtgttta 5820
atattgttat acatatattc taattgcaca tttaaacttc gtaaatgcca atgggagtg 5880
gacagaaatg atattttcgc aaaatttatt tgcgtctccc accccaactt gcacattatt 5940
gtaacctgac tttccgccag cttctatgtt ggggccccgc caacttgac attattgtaa 6000
gctgactttc cgccagcttc tttgttgggg ccccgccaac ttgcattgtt tgtagaattt 6060
cttttcgaaa ttctttatgt tggggcctcg cccaatgttt tacttgaata attcttttag 6120
aattctaaat aatgatccga ttaattgaaa gaagtctgca gtcattatta attcctccct 6180
ttactttata aattatgctt gcttagtata agtcagcttt tcagttttca ctaaactgct 6240
tgctaaatga tgccaaaaat cttgtaattc ttctcttggt cgactgtat cagaactgtc 6300
ttgtcttaca aagtcaacat gatcccaatc atgttttgta ggcgtcactt gccaaatgcc 6360
tttttgaatt ttatctgtcg cttttgtata agcttgatta aatggatgtt gagaagaaat 6420
aacggatact aaaccatcgt tttctcgcca ttctttttca gtagctttac cgattaagtt 6480
accagtaatc acaaagggga aaaacatatt taagtctgct 6520

```

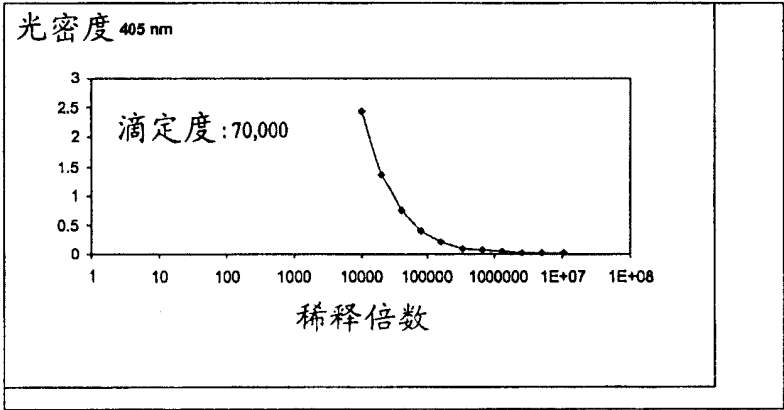


图 1

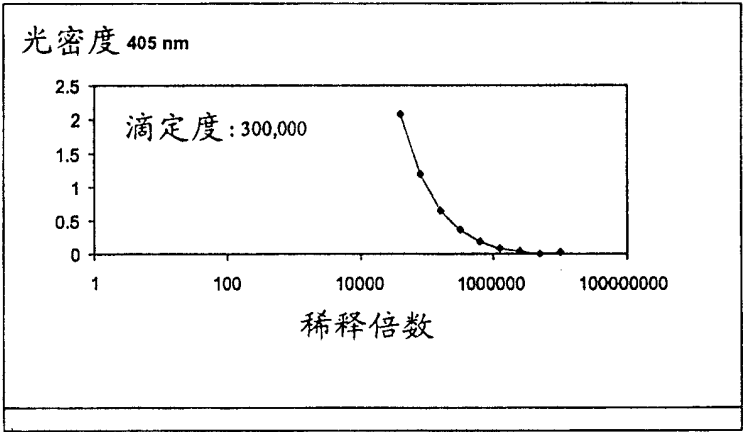


图 2

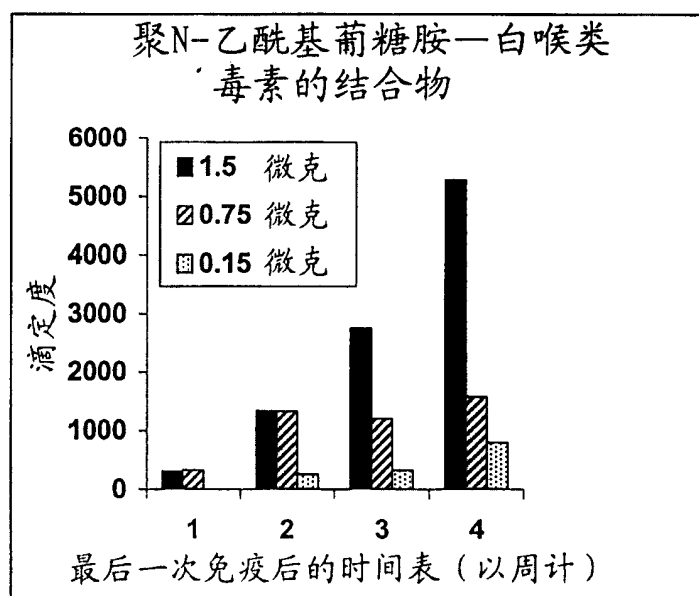


图 3

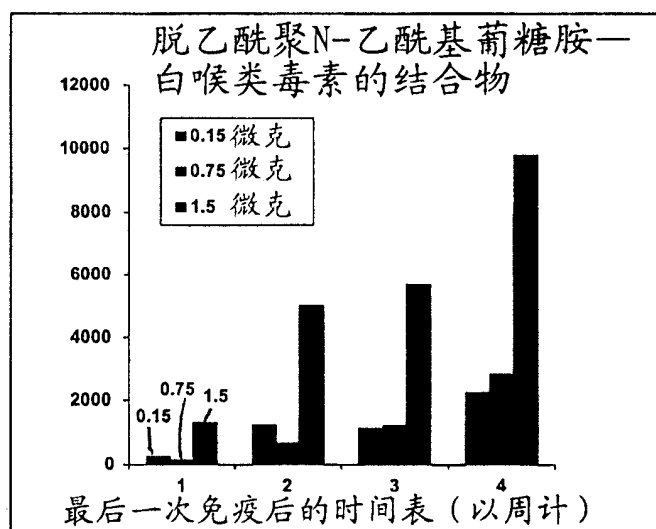


图 4

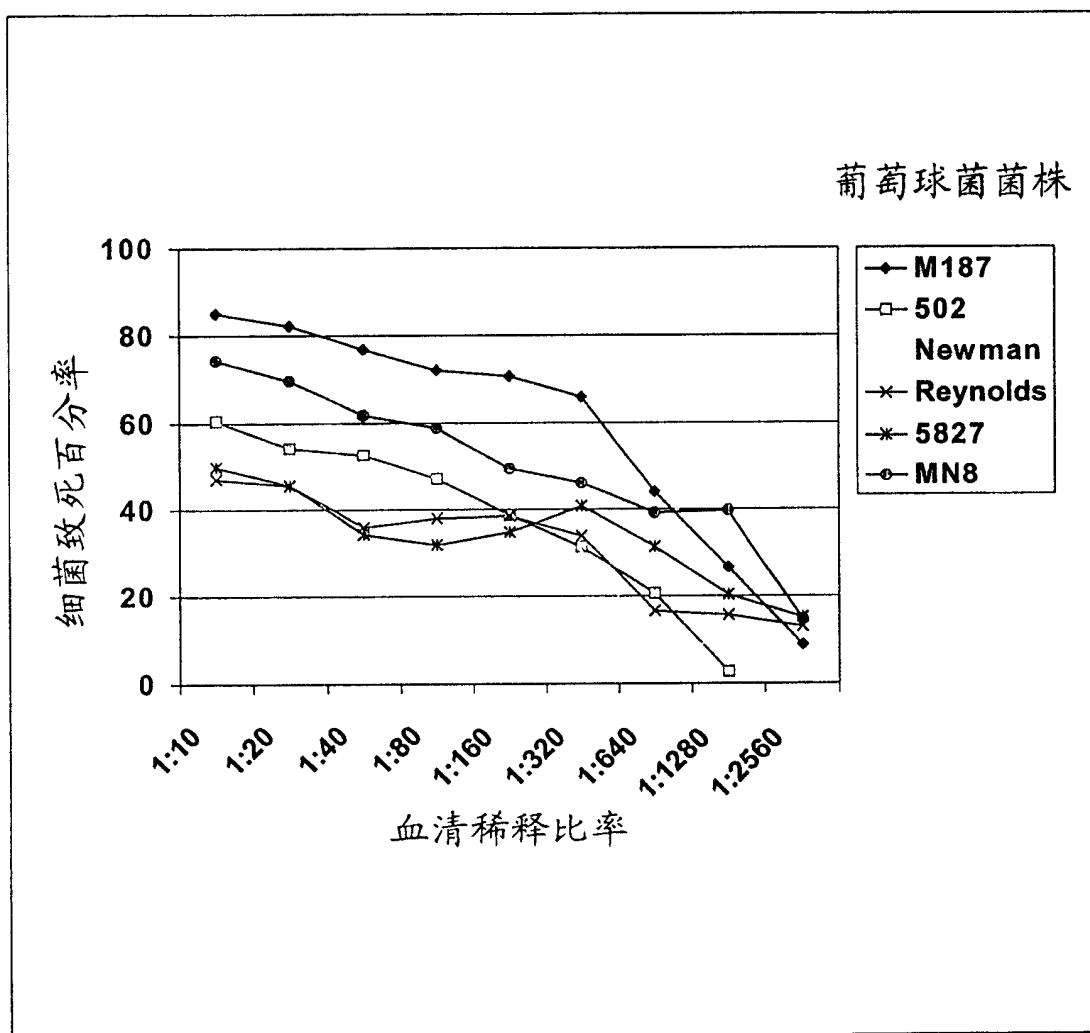


图 5

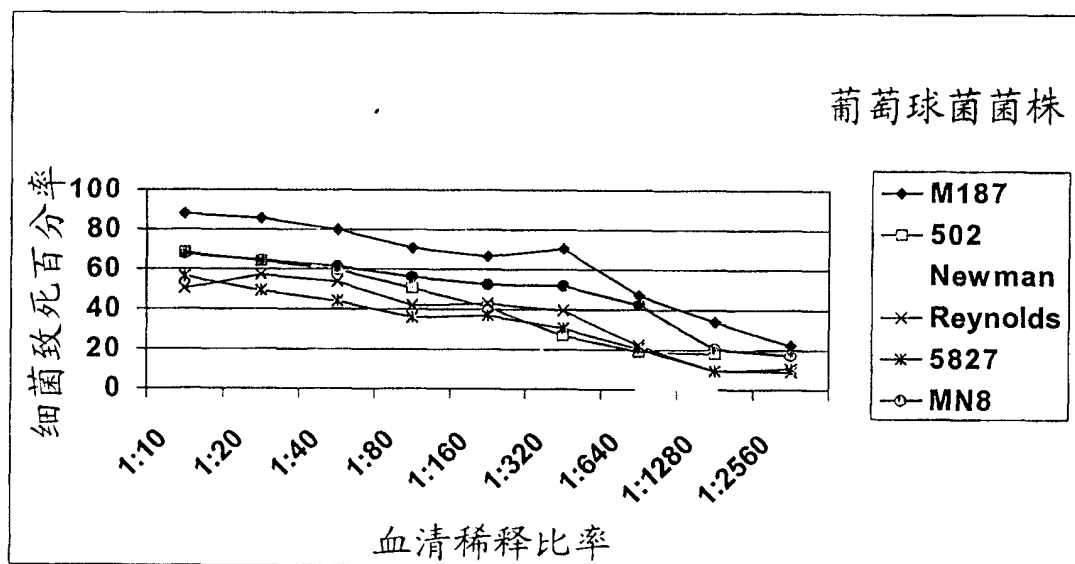


图 6

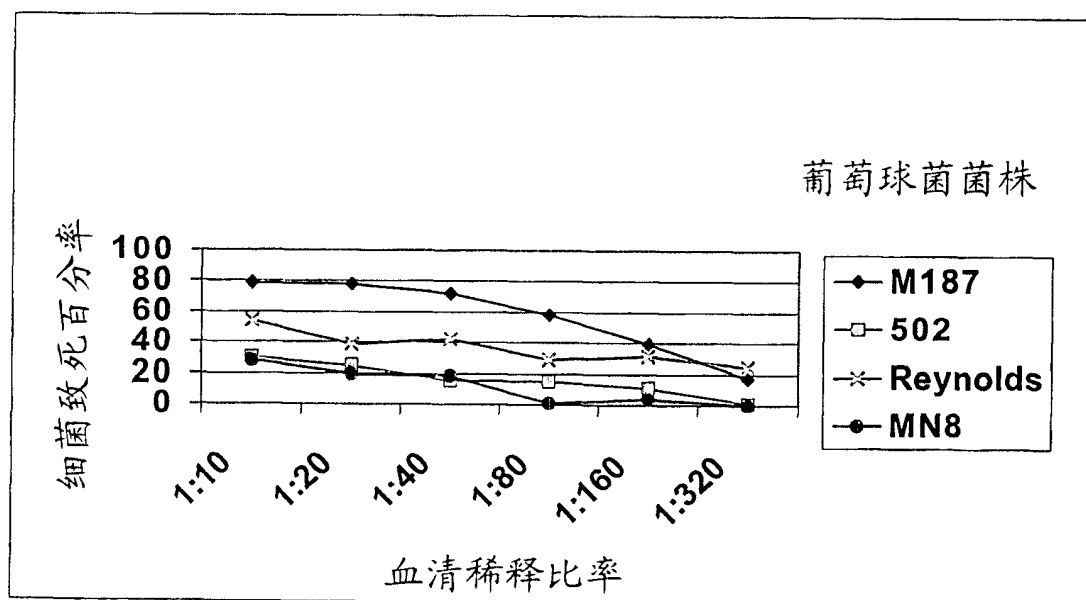


图 7

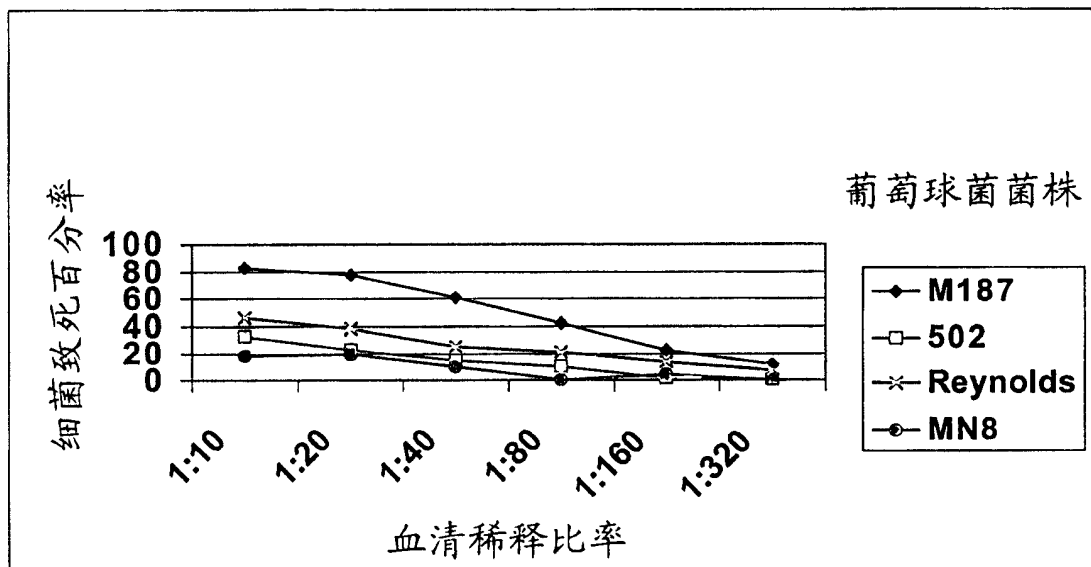


图 8

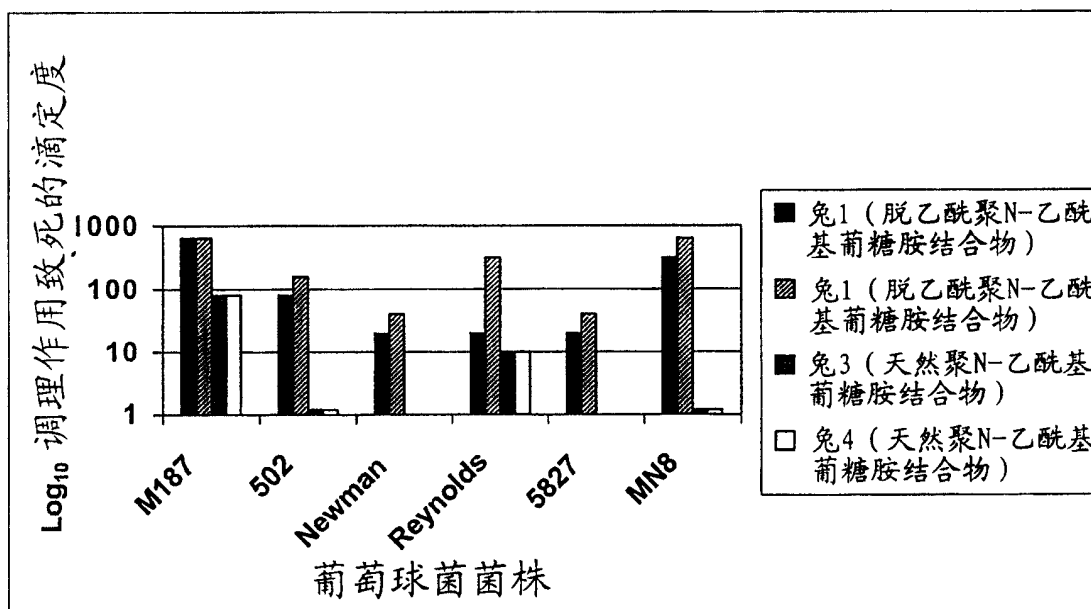


图 9