



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201610153 A

(43)公開日：中華民國 105 (2016) 年 03 月 16 日

(21)申請案號：104126578

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 07 月 15 日

(51)Int. Cl.：

C12N15/13 (2006.01)

C07K14/46 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P31/04 (2006.01)

(30)優先權：2009/07/15

歐洲專利局

09165558.9

2009/07/15

美國

61/225

(71)申請人：埃姆醫療私人有限公司 (荷蘭) AIMM THERAPIUTICS B.V. (NL)

荷蘭

基因技術公司 (美國) GENENTECH, INC. (US)

美國

(72)發明人：貝蒙特提姆 BEAUMONT, TIM (NL)；卡肯柏斯馬克約洛 KWAKKENBOS, MARK

JEROEN (NL)；布朗艾立克 J BROWN, ERIC J. (US)；森崎約翰弘

MORISAKI, JOHN HIROSHI (US)；哈森柏斯伍特 L W HAZENBOS, WOUTER

L.W. (NL)；馬里亞沙森山吉 MARIATHASAN, SANJEEV (CA)；卡吉哈拉金百莉

KAJIHARA, KIMBERLY (US)；席亞伊 XIA, YI (US)

(74)代理人：黃志揚

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：32 項 圖式數：8 共 90 頁

(54)名稱

革蘭氏陽性菌特異性結合的化合物

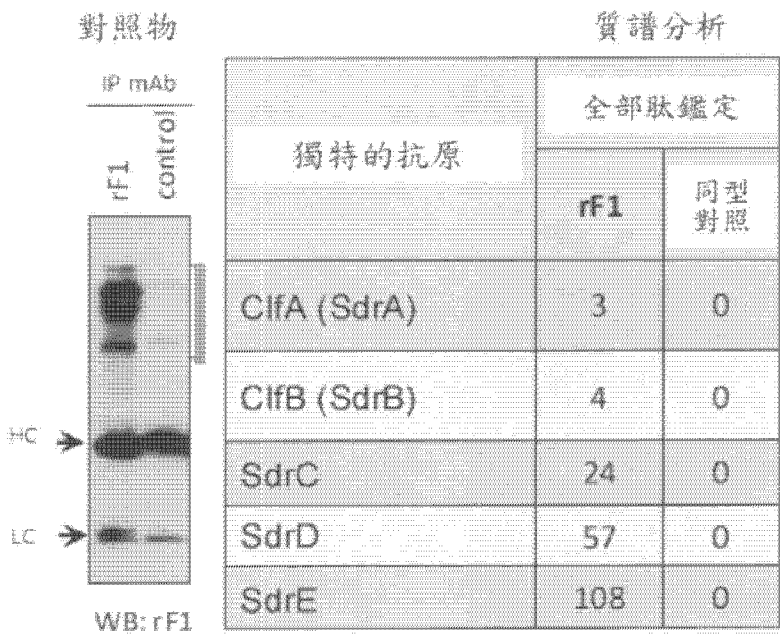
GRAM-POSITIVE BACTERIA SPECIFIC BINDING COMPOUNDS

(57)摘要

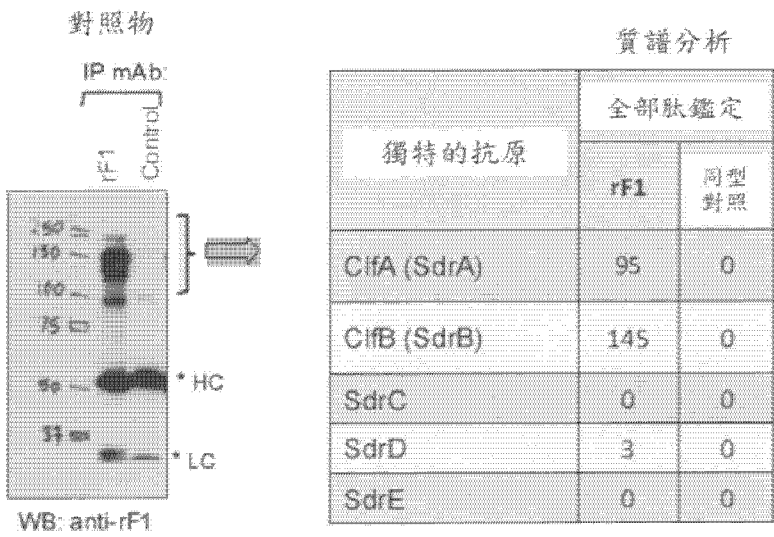
本發明提供具有結合約束力的改進化合物，其能夠特異性結合革蘭氏陽性菌。結合約束力化合物完整的人源化，能應用於人類個體之治療。

The present invention provides improved binding compounds capable of specifically binding Gram-positive bacteria. Binding compounds are provided that are fully human, enabling therapeutic applications in human individuals.

指定代表圖：



【圖 5A】



【圖 5B】



	rF1		ITC52 *	
	U	T	U	T
ScF	27	100		0
ScCt	8	25		0
ScHt	3	4		0

【圖 5C】

【發明說明書】 *Patent*

【中文發明名稱】 革蘭氏陽性菌特異性結合的化合物

【英文發明名稱】 GRAM-POSITIVE BACTERIA SPECIFIC BINDING
COMPOUNDS

【技術領域】

【0001】本發明涉及生物學，免疫學和醫學的領域。

【先前技術】

【0002】革蘭氏陽性菌(Gram-positive microorganisms)引起大多數的全身性感染。革蘭氏陽性病原體中一個重要成員是金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)。約有 20%的人口是金黃色葡萄球菌長期的帶菌者。金黃色葡萄球菌可引起的一系列疾病，從輕微的皮膚感染，如丘疹，膿疱病（也可能是由化膿性鏈球菌引起），癤，蜂窩組織炎，毛囊炎，癬病，癰，燙傷皮膚症候群和膿腫，到嚴重的危及生命的疾病，如肺炎，腦膜炎，骨髓炎，心內膜炎，中毒性休克症候群（TSS），和敗血症。金黃色葡萄球菌能感染各種器官和組織。金黃色葡萄球菌感染發生在有免疫能力的以及免疫受損的人。大約 50%美國重症加護病房的感染是這種病原體造成。據報導在美國每年有三十萬人感染金黃色葡萄球菌，導致 12,000 人死亡（也見 Moran 等氏，NEMJ，355 期，666-674 頁（2006 年））。

【0003】主要的問題是金黃色葡萄球菌不斷增加的抗生素耐藥性。"耐甲氧苯青黴素之金黃色葡萄球菌"（以下略為 MRSA）的出現在 20 世紀 60 年代。初步鑑定係在衛生保健機構。然而，目前看來 MRSA(耐甲氧苯青黴素之金黃色葡萄球菌)亦存在於沒有住院的社群中。治療 MRSA 是困難和昂貴的，由於 MRSA 對抗生素的敏感性有限。然而，只有極少數之抗生素替代品可用。萬古黴素是常用

於治療耐青黴素的 MRSA。美國專利第6,939,543號描述一種對抗"脂磷壁酸"

(lipoteichoic acid, 以下略為LTA)之小鼠抗體能夠結合金黃色葡萄球菌。在此小鼠抗體基礎上,所產生重組嵌合鼠/人源抗體含有人類重鏈和輕鏈不斷域(恒定區)。然而,這種嵌合鼠/人源抗體的缺點是鼠類序列都存在,給人體使用時涉及嚴重副作用的風險。

【發明內容】

● 【0004】本發明之目的是提供抵制和/或防止革蘭氏陽性菌有關疾病的手段和方法。本發明之另一目的是提供對各種革蘭氏陽性菌,較佳為葡萄球菌屬,尤佳為 MRSA 有結合約束力之非傳統的和/或改善的化合物。本發明之進一步目的是提供對革蘭氏陽性菌,較佳為葡萄球菌屬,最好是 MRSA,具有結合約束力的化合物。

● 【0005】本發明提供的抗體(antibody)或其抗原結合部或"免疫球蛋白鏈"(immunoglobulin chain),在自然環境中特別能結合葡萄球菌種。因此,他們是有用的抵制和/或預防和/或診斷葡萄球菌種存在有關的疾病。最好是,對抗金黃色葡萄球菌。在一個特別優先的具體內涵是對抗 MRSA。較佳為另一種要對抗的葡萄球菌是表皮葡萄球菌。

● 【0006】表皮葡萄球菌通常不致病,但患者的免疫系統往往在發展感染風險。感染可以是在醫院和社區得到,但感染更威脅到醫院的病人。最易受表皮葡萄球菌感染的是靜脈注射毒品使用者,新生兒,老人,和那些使用導管或其他人工裝置者。但在血管內裝置(人工心臟瓣膜,分流器等)之感染,也常發生在人工關節,導管,大傷口。症狀包括發燒,頭痛,乏力,厭食及呼吸困難。

● 【0007】在一較佳的具體內涵中,本發明提供分離或重組之人類抗體,其抗原結合部。根據本發明之人類抗體和其抗原結合部在自然背景下有能力結合

約束葡萄球菌屬，使得施用抗體或其抗原結合部，可抵制各種葡萄球菌種。因此該人類抗體或其抗原結合部特別適用於治療或預防金黃色葡萄球菌等物種之感染。和嵌合抗體相比，由於缺乏非人類序列，故本發明之人類抗體或其抗原結合部更適合治療和/或預防人類個體疾病。這大大降低副作用的風險。

【0008】根據本發明一個特佳抗體是“F1”抗體，如序列表所示，其具重鏈(heavy chain)和輕鏈(light chain)的“可變區序列”(variable domain sequences)。在此使用的“F1”一詞為涵蓋所有 F1 的抗體，例如分離或重組所得的“F1”。重組所得的“F1”在此亦稱之為“rF1”。F1 的 CDR(Complementary-determining region：互補決定區序列，以下略為 CDR)，其中對 F1 的抗原結合特性特別有貢獻，也描繪在序列表。F1 抗體是完全人源化，能夠特異性結合金黃色葡萄球菌的物種，如金黃色葡萄球菌和表皮葡萄球菌，因此較佳為使用於人類個體之治療。

【0009】重要的是，F1 抗體能夠在體內和體外結合整個細菌。因此，進一步提供一個分離的或重組的人類抗體或其抗原結合部，能夠特異性結合金黃色葡萄球菌和/或表皮葡萄球菌。此外，F1 抗體能夠結合細菌，該細菌生長在已感染的組織(例如動物的組織)中。因此，只要是分離的抗體，它可結合在活體內成長之金黃色葡萄球菌，其中“在活體內成長”是指生長在受金黃色葡萄球菌感染的動物組織中。另外提供的一個分離的、重組或合成免疫球蛋白鏈，其中包括至少一種人類免疫球蛋白可變區之 CDR 序列，該區專屬金黃色葡萄球菌和/或表皮葡萄球菌。

【0010】抗體的一個抗原結合部被定義為含量不拘而具有抗體之至少一個共同性質的部件。該抗原結合部是和抗體一樣，能夠結合相同的抗原，雖然不一定要在同一程度。抗體的抗原結合部最好包含單域抗體，單鏈抗體，奈米抗體，一體式抗體，單鏈可變區片段(single chain variable fragment，以下略為 scFv)，免疫球蛋白上結合抗原的片段(Fab 片段)或 F(ab')₂ 片段。

【0011】抗體的一個抗原結合部也是一種抗體改變而產生之抗體，由此產生的化合物具有至少一個屬性 - 較佳為抗原結合特性，在本質上是一樣的，而含量不拘。此點在許多方面可執行，例如通過保守的氨基酸替代，即氨基酸殘基另一個屬性（大小，疏水性等）大致相同的殘基取代，這樣，整體運作是不可能受到嚴重影響。

【0012】如熟悉技藝者所周知，抗體重鏈係免疫球蛋白分子兩種類型的鏈中較大者。重鏈包括不變域和可變域，其中可變域參與抗原結合。抗體的輕鏈係"免疫球蛋白" (immunoglobulin) 分子兩種類型的鏈中較小者。輕鏈包括不變域和可變域。該可變域，連同重鏈的可變域，參與抗原結合。

【0013】互補決定區（CDRs）是存在於在重鏈可變域和輕鏈可變域中之超變區。抗體重鏈和所連接輕鏈的 CDR 一起形成抗原結合位點。

【0014】在此免疫球蛋白鏈的功能等同體之定義是一種具有結合約束力之人工合成化合物，包括至少一 CDR 序列的免疫球蛋白鏈。

【0015】現在，本發明洞察序列表所述之 CDR(互補決定區)序列，提供所需的具有結合約束力的特點，熟練的人也能製作變種，包括至少一個改變的 CDR 序列者。舉例來說，採接保守的氨基酸替代。也有可能改變至少一個在序列表所示之 CDR 序列，以便產生變形抗體，或其抗原結合部；和 F1 相比，其中至少有一個改變性質。較佳為，所提供抗體或其抗原結合部之 CRD 序列至少 70% 和序列表所示之 CDR 序列相同，這樣至少部分維持 F1 有利結合特性，甚至有改良。較佳為改變序列表所示之 CDR 序列，導致所得抗體或其抗原結合部包括至少一個改進性能，例如和 F1 相比，具有改進的結合親和力，選擇性和/或穩定性。變形抗體或其抗原結合部包含氨基酸序列，至少有 70% 和序列表所示之 CDR 序列相同，因此也屬於本發明的範圍。文獻上有多種方法可用於改變氨基酸排序。例如，具預期的 CDR 序列之重鏈或輕鏈序列是人工合成的。較佳為具 CDR 序列之核酸序列編碼經突變，例如使用隨機- 或定點-致突變。

【0016】因此，在本發明之具體內涵中，提供一種抗體或其抗原結合部，其中包括：

- 重鏈 CDR1 序列，包含至少 70%的序列相同於 RFAMS(SEQ ID NO:1) 序列，和/或
- 重鏈 CDR2 序列，包含至少 70%的序列相同於 SINNGNNPYYARSVQY(SEQ ID NO:2) 或 SINSGNNPYYARSVQY (SEQ ID NO:60)，和/或
- 重鏈 CDR3 序列，包含至少 70%的序列相同於 DHPSSGWPTFDS(SEQ ID NO:3)。

進一步提供一種抗體或其抗原結合部，其中包括：

- 輕鏈 CDR1 序列，包含至少 70%的序列相同於 RASENVGDWLA(SEQ ID NO:4)，和/或
- 輕鏈 CDR2 序列，包含至少 70%的序列相同於 KTSILES(SEQ ID NO:5)，和/或
- 輕鏈 CDR3 序列，包含至少 70%的序列相同於 QHYXRFPYT，其中 X 是 I 或 M (SEQ ID NO:6)。

【0017】上述的 CDR 序列是抗體 F1；VH IgHV3 23 和 VH IgHV3 23，及其變種的 CDR 序列。結合化合物包含至少 70%序列相同於 F1 CDR 之 CDR 序列，特別適合抵制和/或防止金黃色葡萄球菌和/或表皮葡萄球菌的感染(之影響)。結果表明，F1 變種包含 VH IgHV3 23 和 VL IgKV1 5，其中在輕鏈 CDR3 之異亮氨酸修改為蛋氨酸，仍然能夠特異性結合例如金黃色葡萄球菌和表皮葡萄球菌之葡萄球菌。

【0018】較佳為，根據本發明有結合約束力的化合物包括其 CDR 序列和列表所示之 CDR 序列相同至少 75%，較佳為至少 80%，尤佳為至少多 85%，更佳為至少 86%，尤其佳為至少 87%，更尤其佳為至少 88%，特佳為至少 89%，而最好為至少 90%。最好，根據發明具有結合約束力的化合物包括一個 CDR 序列，至少 91%，較佳為至少 92%，尤佳為至少 93%，更佳為至少 94%，最好至少 95%相同於列表所示之 CDR 序列。特佳的 F1 抗體，如上所述，包括序

第 5 頁，共 38 頁(發明說明書)

列表所示之 CDR 序列。於是本發明之特佳具體內涵提供一個分離的、合成或重組抗體，能夠特異性結合金黃色葡萄球菌和/或表皮葡萄球菌，而它包括：

- 重鏈 CDR1 序列，包含序列 RFAMS (SEQ ID NO：1)，和/或
- 重鏈 CDR2 序列，包含序列 SINNGNNPYYARSVQY (SEQ ID NO：2) 或 SINSGNNPYYARSVQY (SEQ ID NO:60)，和/或
- 重鏈 CDR3 序列，包含序列 DHPSSGWPTFDS (SEQ ID NO：3) 和/或
- 輕鏈 CDR1 序列，包含序列 RASENVGDWLA (SEQ ID NO：4)，和/或
- 輕鏈 CDR2 序列，包含序列 KTSILES (SEQ ID NO：5)，和/或
- 輕鏈 CDR3 序列，包含序列 QHYXRFPYT，其中 X 是 I 或 M (SEQ ID NO：6)。

【0019】在一具體內涵中，一種有結合約束力的化合物包括序列表所示之重鏈 CDR1 和 CDR2 序列，和輕鏈 CDR1 之和 CDR2 序列，或至少 70%，較佳為至少 75%，尤佳為至少 80%，更佳為至少 81%，，尤其佳為至少 82%，更尤其佳為至少 84%，最好至少 85%的序列與之相同。因此，進一步提供分離的、合成或重組抗體或其抗原結合部，包括重鏈 CDR1 序列，其至少 70%的序列相同於 RFAMS (SEQ ID NO：1) 和重鏈 CDR2 序列，其至少 70%的序列相同於 SINNGNNPYYARSVQY (SEQ ID NO:2) 或 SINSGNNPYYARSVQY (SEQ ID NO:60) 和輕鏈 CDR1 序列，其至少 70%的序列相同於 RASENVGDWLA (SEQ ID NO：4) 和輕鏈 CDR2 序列，其至少 70%的序列相同於 KTSILES (SEQ ID NO：5)。該具有結合約束力的化合物較佳為包含 CDR 序列，至少 75%，較佳為至少 80%，尤佳為至少 85%，更佳為至少 86%，，尤其佳為至少 87%，更尤其佳為至少 88%，特佳為至少 89%，更特佳為至少 90%，更更特佳為至少 91%，尤其特佳為至少 92%，尤其更特佳為至少 93%，尤其更更特佳為至少 94%，最好為至少 95%的序列相同於上述重鏈 CDR 序列和輕鏈 CDR 序列。較佳為，該具有結合約束力的化合物還包括重鏈 CDR3 序列，其序列至少 70%相同於序列 DHPSSGWPTFDS (SEQ ID NO：3)，和/或輕鏈 CDR3 序列，其序列至少 70 % 相同於序列 QHYXRFPYT，其中 X 是 I 或 M (SEQ ID NO：6)。也提供具有結合約束力的化合物，包括上述重鏈 CDR1，CDR2 和 CDR3 序列，以及上述輕鏈 CDR1，CDR2 和 CDR3 序列。

【0020】其中，上述抗體或其抗原結合部，更包含一重鏈序列如 SEQ ID NO：55 所示，以及一輕鏈序列如 SEQ ID NO：57 所示；或更包含一重鏈序列如 SEQ ID NO：56 所示，以及一輕鏈序列如 SEQ ID NO：58 所示。

【0021】現在，本發明提供能夠特異性結合葡萄球菌屬的人類抗體，它已可能產生免疫球蛋白鏈，包括至少一種人類免疫球蛋白可變區之 CDR 序列，其特別能對付葡萄球菌屬。因此，進一步提供分離的、重組或合成免疫球蛋白鏈，其中包括至少一種特別能對付葡萄球菌屬之人類免疫球蛋白可變區的 CDR 序列。在一較佳的具體內涵中，提供人類抗體。或者，至少有一種人類 CDR 序列或至少一種序列，其中至少一框架區內進行優化，較佳為改善結合約束力的效率或穩定性。這是例如在做致突變實驗後，較佳為進行測試所得化合物之穩定性和/或結合約束效率，並選擇改進的結合化合物。

【0022】除了優化 CDR 序列，以提高結合約束效率或穩定性，往往是有利的是在至少一個框架區優化至少一個序列。較佳為如此做以改善結合約束效率或穩定性。例如藉由核酸分子突變，將框架序列加以編碼，而使框架序列優化，然後較佳為檢驗所得抗體或其抗原結合部之特徵。這樣，就可以得到改善的抗體或其抗原結合部。在一較佳的具體內涵中，人類生殖細胞序列於本發明之抗體或其抗原結合部，用為框架序列區。較佳為使用生殖細胞序列，使抗體或其抗原結合部的免疫原性之風險最小化。因為這些序列是不太可能包含細胞體改建，其對於導出框架區的個體有它獨特性，並且應用到另一個人時可能導致免疫反應。

【0023】還提供抗體或其抗原結合部或免疫球蛋白鏈，包含重鏈氨基酸序列，其中至少有 70% 序列相同於序列表所描繪之序列。這種重鏈序列提供所欲的像 F1 抗體的結合約束性。此外，輕鏈氨基酸序列有至少 70% 相同於序列表所示之序列，且 CDR3 異亮氨酸變更為蛋氨酸之輕鏈序列亦提供所需的結合約束性，如 F1 抗體和 F1 的變種所表明者。因此，進一步提供根據發明之抗體或其抗原結合部，具有重鏈可變域序列，其中至少 70% 的序列相同於序列

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNGN
NPYYARSVQYRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSSGWPTFDS
WGPGTLVTVSS (SEQ ID NO:7)

和/或具有輕鏈可變域序列，其中至少 70%的序列相同於序列

DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILES
GVPSRFGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQHYXRFPTYTFGQGTKLEIKRTV，其
中 X 是 I 或 M (SEQ ID NO:8)。

【0024】除上述異亮氨酸輕鏈 CDR3 被改變為蛋氨酸的變種外，F1 抗體的
幾種變體已開發出來。這些變種都能夠結合到金黃色葡萄球菌物種。根據本發
明的抗體變種或其抗原結合部例子包括重鏈可變域序列
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNG
NNPYYARSVQYRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSSGWPTFD
SWGPGTLVTVSS (SEQ ID NO:9),

和/或序列

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNGN
NPYYARSVQYRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSSGWPTFDS
WGPGTLVTVSS (SEQ ID NO:7),

和/或序列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINSGN
NPYYARSVQYRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSSGWPTFDS
WGPGTLVTVSS (SEQ ID NO:62)

和輕鏈可變域序列

DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILES
GVPSRFGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQHYXRFPTYTFGQGTKLEIKRA，其中
X 是 I 或 M (SEQ ID NO:10),

和/或序列

DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILES
GVPSRFGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQHYXRFPTYTFGQGTKVEIKRTV，其
中 X 是 I 或 M (SEQ ID NO:11),

和/或序列

DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILES
GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQHYXRFYTFGQGTKLEIKRTV, 其
中 X 是 I 或 M (SEQ ID NO:8)

【0025】此外, 根據本發明的抗體變種或其抗原結合部例子包括重鏈不變域序列

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP
(SEQ ID NO:63),

或序列

CSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
(SEQ ID NO:66),

和/或輕鏈不變域序列

AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
NO:64),

或序列

AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPCTKSFNRGEC (SEQ ID
NO:65)

【0026】根據發明之抗體或其抗原結合部能特異性結合蛋白質, 包含"絲氨酸、天門冬氨酸"(以下略為SD)重複體。絲氨酸-天門冬氨酸重複體 (serine-aspartate repeat, 以下略為 SDR, 或 Sdr) 的蛋白質是細胞表面相關的蛋白質, 存在於一些細菌如金黃色葡萄球菌物種中。Sdr 蛋白質一般包括氨基末端信號序列, 功能域稱為 A 區, 絲氨酸-天門冬氨酸重複區, 細胞壁-跨越區, LPXTG 主題, 疏水膜跨越域和帶正電的殘基系列。該 LPXTG 主題是針對具有切割蘇氨酸和甘氨酸殘基之間的基本序列之轉肽酶和使蛋白質合於革蘭氏陽性菌細胞壁的肽聚糖。Sdr 蛋白質被認為與宿主分子有相互作用。已知的 Sdr 蛋白質包括金黃色葡萄球

菌之 ClfA(Clf：聚叢因子) (SdrA)，ClfB (SdrB)，SdrC, SdrD 和 SdrE；表皮葡萄球菌之 SdrF, SdrG 和 SdrH, 腐生葡萄球菌之 SdrI, 凱普迪森葡萄球菌之 SdrX，以及馬鞍藤葡萄球菌之 SdrY 和 SdrZ。

【0027】因此，根據本發明首選的抗體或其抗原結合部特別能結合金黃色葡萄球菌，表皮葡萄球菌，腐生葡萄球菌，凱普迪森葡萄球菌和馬鞍藤葡萄球菌。較佳為抗體，免疫球蛋白鏈或其抗原結合部能結合金黃色葡萄球菌之 ClfA (SdrA)，ClfB (SdrB)，SdrC, SdrD 和 SdrE，表皮葡萄球菌之 SdrF, SdrG 和 SdrH，腐生葡萄球菌之 SdrI，凱普迪森葡萄球菌之 SdrX，以及馬鞍藤葡萄球菌之 SdrY 及 SdrZ。根據本發明抗體、免疫球蛋白鏈或其抗原結合部的"抗原決定部位"(epitope)，包括 Sdr 蛋白質的絲氨酸-天門冬氨酸重複體依賴之抗原決定部位，例如存在於金黃色葡萄球菌 ClfA，ClfB，SdrC, SdrD 和 SdrE 之絲氨酸-天門冬氨酸重複體依賴之抗原決定部位。在此絲氨酸-天門冬氨酸重複體依賴之抗原決定部位定義為抗體 F1 所認知的抗原決定部位，該抗原決定部位需要至少一部分絲氨酸-天門冬氨酸重複體的存在，就例如存在於，但不限於，金黃色葡萄球菌 ClfA，ClfB，SdrC, SdrD 和 SdrE 和表皮葡萄球菌 SdrF, SdrG 和 SdrH 中。在一具體內涵中，抗原決定部位包含至少部分結合之分子，或 Sdr 蛋白質。這些分子的例子包括，但不僅限於，氨基酸、肽、蛋白質、糖及糖殘基。在另一項具體內涵中，該抗原決定部位包括修改的絲氨酸-天門冬氨酸重複區。該修改包括，例如，但不限於，糖基化，醯胺化和/或磷酸化。對此領域之熟悉技藝者將是明白這兩個具體內涵的結合也是可能的。

【0028】因此，本發明提供一種抗體或其抗原結合部、根據發明能夠結合絲氨酸-天門冬氨酸重複體依賴之抗原決定部位。另外提供的一種能夠結合到金黃色葡萄球菌 ClfA，ClfB，SdrC, SdrD 和 SdrE 之抗體或其抗原結合部。根據本發明進一步提供能夠結合到葡萄球菌屬，較佳為金黃色葡萄球菌和/或表皮葡萄球菌和/或腐生葡萄球菌和/或凱普迪森葡萄球菌和/或馬鞍藤葡萄球菌，尤佳為 MRSA(耐甲氧苯青黴素之金黃色葡萄球菌)之一種抗體或其抗原結合部。

【0029】抗體的缺點是他們的穩定性(例如在苛刻的條件下)可能會減少。比如可能會出現去醯胺化而失去醯胺功能基。去醯胺化是一種蛋白質降解途徑，可能會影響蛋白質的生物功能，並主要發生在天冬醯胺殘基，並在較低程度上發生在谷氨醯胺殘基。因此在一本發明之具體內涵中，以另一個氨基酸取代天冬醯胺和谷氨醯胺，則能防止發明抗體或其抗原結合部之去醯胺化。天冬醯胺較佳為被谷氨醯胺以外的氨基酸取代，因為去醯胺化可能發生在谷氨醯胺殘基。天冬醯胺之取代較佳為不大幅影響本發明抗體對抗原之結合親和力。在一具體內涵中，在重鏈位置 53 天冬醯胺酸的去醯胺化（編號根據卡貝特氏，1991 年）之防止是以另一個氨基酸取代天冬醯胺。較佳為藉由防止天冬醯胺酸在 53 位置去醯胺化，可提升根據發明抗體或其抗原結合部的穩定性。正如例子所示，儘管該天冬醯胺是坐落在 CDR 中，並在該位置取代天冬醯胺，並沒有實質上影響發明抗體或其抗原結合部的抗原親和力。在重鏈位置 53 的天冬醯胺較佳為被非谷氨醯胺之氨基酸取代，尤佳為在該位置的天冬醯胺被絲氨酸替換。因此，本發明還提供一種根據本發明之抗體或其抗原結合部，其中天冬醯胺，較佳為在重鏈位置 53 的天冬醯胺，被另一個氨基酸(較佳為絲氨酸)替換。

【0030】在一本發明之具體內涵中，一種根據本發明之抗體或其抗原結合部耦合到另一個基團，而形成抗體藥物的共軛體。根據本發明之抗體或其抗原結合部，可例如耦合到細胞抑制劑(如抗生素)。在此所謂“細胞抑制劑”是指可減少或阻止細菌的功能或生長和/或破壞細菌的物質。該其他基團，例如細胞抑制劑，較佳為藉由巰基耦合到抗體或其抗原結合部。因此，較佳為一個或多個半胱氨酸被納入該抗體或其抗原結合部。半胱氨酸含有巰基，因此，在按照本發明之抗體或其抗原結合部中納入到一個或多個半胱氨酸，或由一個或多個半胱氨酸替換一個或多個氨基酸則能耦合到另一個基團。該一個或多個半胱氨酸較佳為引入根據本發明之抗體或其抗原結合部於特定位置，該位置並不影響抗體或其抗原結合部之折疊，並且不改變抗原之結合或效應或功能。因此，本發明提供根據本發明之抗體或其抗原結合部，其中至少有一個半胱氨酸以外的氨基酸被半胱氨酸取代。較佳為至少兩個非半胱氨酸的氨基酸已被半胱氨酸取代。在一較佳的具體內涵中，至少有一個非半胱氨酸的氨基酸係在輕鏈的位置 15 之纈氨酸，和/或在輕鏈的位置 144 之丙氨酸，和/或在輕鏈的位置 168 之絲氨酸，

和/或在輕鏈的位置 205 之纈氨酸，和/或在輕鏈的位置 110 之纈氨酸，和/或在重鏈的位置 84 之丙氨酸，和/或在重鏈的位置 114 之丙氨酸，和/或在重鏈的位置 158 之丙氨酸，和/或在重鏈的位置 172 之絲氨酸，尤佳為在輕鏈的位置 205 之纈氨酸，和/或在輕鏈的位置 110 之纈氨酸，和/或在重鏈的位置 114 之丙氨酸（編號根據 Kabat 氏，1991 年）。一個熟練的人都會認識到如果取代不影響抗體或其抗原結合部之折疊，且不改變抗原之結合或效應或功能，則重鏈和/或輕鏈的一種或多種其他氨基酸可被半胱氨酸取代，作為一種替代或補充。

【0031】在國際專利申請案 WO2006/034488，WO2008/141044，WO2009/052249，WO2009/012256，WO2009/012268 和 WO2009/099728 中，描述抗體和反應性半胱氨酸殘基之工程方法以及適合半胱氨酸工程之氨基酸位置。

【0032】根據本發明之抗體或其抗原結合部較佳為包含可變重鏈序列和/或可變輕鏈序列，其中至少 75%，較佳為至少 80%，尤佳為至少 85%，更佳為至少 90%，最好為至少 95% 相同於序列表所示之重鏈序列，和/或序列表所示之輕鏈序列，其中在 CDR3 中異亮氨酸修改為蛋氨酸。相似越高，該結合化合物就越類似於 F1 抗體。根據發明之抗體或其抗原結合部較佳為包含類似於 F1 的重鏈和輕鏈之重鏈和輕鏈。因此，進一步提供抗體或其抗原結合部，包括重鏈序列和輕鏈序列，其中至少 70%，較佳為至少 80%，尤佳為至少 85%，更佳為至少 90%，最好為至少 95% 相同於序列表所示之重鏈序列和輕鏈序列，或 CDR3 中異亮氨酸修改為蛋氨酸之序列表所示之輕鏈序。在一具體內涵中，提供一種抗體或其抗原結合部，具有序列表所描繪之重鏈序列和序列表所描繪之輕鏈序列，或 CDR3 中異亮氨酸修改為蛋氨酸之序列表所示之輕鏈序列。

【0033】在一具體內涵提供一種抗體或其抗原結合部，包含如序列表所示之重鏈序列的重鏈序列，和/或如序列表所示之輕鏈序列的輕鏈序列，或 CDR3 中異亮氨酸修改為蛋氨酸之序列表所描繪之輕鏈序列。另外，如熟練的人所周知，可以生成一種縮短的重鏈或輕鏈序列，同時保持具有所欲結合約束力。較佳為，生成這種縮短之重鏈或輕鏈，和原來的重或輕鏈比較起來，其具有較短恆定區。較佳為維持可變域。例如，生產基於序列表所示之重鏈序列或輕鏈序

列之 Fab 片段或 F(ab')₂ 片段或單域抗體或單鏈抗體或奈米抗體或一體式抗體或 scFv 抗體片段。因此也提供一種抗體的抗原結合部，包括至少一部分如序列表所示序列之抗原結合部，或 CDR3 中異亮氨酸修改為蛋氨酸之序列表所示之輕鏈序列。該抗原結合部具有至少 20 種氨基酸的長度，並包括至少一組序列選自具下列序列的群組：至少 70% 相同於序列表所示之重鏈 CDR1 序列和至少 70% 相同於序列表所示之重鏈 CDR2 序列和至少 70% 相同於序列表所示之重鏈 CDR3 序列，和至少 70% 相同於序列表所示之輕鏈 CDR1 序列和至少 70% 相同於序列表所示之輕鏈 CDR2 序列和至少 70% 相同於序列表所示之輕鏈 CDR3 序列，或序列表所示之輕鏈 CDR3，其中異亮氨酸修改為蛋氨酸。

【0034】本發明還提供一種具至少 15 個核苷酸，較佳為至少 30 個核苷酸，尤佳為至少 50 個核苷酸，最好為至少 75 個核苷酸長度之分離、合成或重組的核酸序列，其編碼本發明具有結合約束力的化合物。這種核酸是例如從 B 細胞分離出來，其能夠產生根據發明之抗體。一較佳的具體內涵提供核酸序列，包含至少 70% 序列相同於序列表所示之核酸序列中至少 15 個核苷酸。根據本發明之核酸序列較佳為包括一序列，其中至少 75%，較佳為至少 80%，尤佳為至少 85%，更佳為至少 90%，最好為至少 95% 的序列相同於序列表所示之核酸序列中至少 15 個核苷酸。較佳為，該序列表所示之核酸序列包括至少一個 CDR(互補決定區)的編碼序列。

【0035】一較佳的具體內涵提供一種分離、合成或重組的長度至少有 15 個核苷酸之核酸序列，具至少有一種根據本發明抗體或免疫球蛋白鏈的 CDR(互補決定區)序列的編碼。較佳為該核酸序列編碼序列至少有一個 CDR 具有至少 70% 序列相同於 F1 抗體的 CDR(互補決定區)。F1 CDR(互補決定區)編碼的核酸序列如序列表所示。因此，進一步提供一種分離、合成或重組之核酸序列，其中至少 70% 序列相同於一組序列選自 cgctttgccatgagc(SEQ ID NO:12), tcgatcaataatgggaataacccatactacgcacggtcggtacaatac (SEQ ID NO:13), gatcacctagtagtggtggccaccttgactcc (SEQ ID NO:14), cgggccagtgaacacgttggtgactggtggcc (SEQ ID NO:15), aagacatctattctagaaagt (SEQ ID NO:16) 和 caacactatatacgtttcccgtaact (SEQ ID NO:17)。

【0036】該核酸序列較佳為包括一個序列，至少 75%，較佳為至少 80%，尤佳為至少 85%，最好為至少 90%相同於任何上述序列。此外還提供一個核酸序列，包括一個序列，至少 70%相同於至少部分序列表所示核苷酸序列，該部分至少具 15 個核苷酸和至少有一個 CDR(互補決定區)之編碼。

【0037】根據本發明之核酸序列較佳為具有至少 70%序列相同於 F1 CDR(互補決定區)、F1 重鏈和/或 F1 輕鏈之編碼區。一具體內涵提供一種分離、合成或重組的核酸序列，包括氨基酸編碼的序列，其中至少有 70%的序列相同於序列 RFAMS (SEQ ID NO:1)，和/或至少 70%的序列相同於序列 SINNGNNPYYARSVQY (SEQ ID NO:2) 或 SINSGNNPYYARSVQY (SEQ ID NO:60)，和/或至少 70%的序列相同於序列 DHPSSGWPTFDS (SEQ ID NO:3)，和/或至少 70%序列相同於序列 RASENVGDWLA (SEQ ID NO:4)，和/或至少 70%序列相同於序列 KTSILES (SEQ ID NO:5)，和/或至少 70%序列相同於序列 QHYXRFPYT，其中 X 是 I 或 M (SEQ ID NO:6)，和/或至少 70%序列相同於序列 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNGN NPYARSVQYRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSSGWPTFDS WPGTLVTVSS (SEQ ID NO:7)，和/或至少 70%序列相同於該序列 DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILES GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQHYXRFPYTFGQGKLEIKRTV，其中 X 是 I 或 M (SEQ ID NO:8)。另外提供核酸序列，具根據發明 F1 抗體變體的編碼。本發明所提供的是，例如，具重鏈可變序列編碼的核酸序列，包含序列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNG NNPYYARSVQYRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSSGWPTFD SWPGTLVTVSS (SEQ ID NO:9)，和 / 或 序 列 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNGN NPYARSVQYRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSSGWPTFDS WPGTLVTVSS (SEQ ID NO:7)，和 / 或 序 列 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINSGN

NPYYARSVQYRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSGWPFTFDS
WPGGTLVTVSS (SEQ ID NO:62)和具輕鏈可變序列編碼的核酸序列包含序列
DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLA WYRQKPGKAPNLLIYKTSILES
GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPD FAYYCQH YXRFPYTFGQGTKLEIKRA,
wherein X is I of M (SEQ ID NO:10) , 和 / 或 序 列
DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLA WYRQKPGKAPNLLIYKTSILES
GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPD FAYYCQH YXRFPYTFGQGTKVEIKRTV , 其
中 X 是 I 或 M (SEQ ID NO:11) , 和 / 或 序 列
DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLA WYRQKPGKAPNLLIYKTSILES
GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPD FAYYCQH YXRFPYTFGQGTKLEIKRTV , 其
中 X 是 I 或 M (SEQ ID NO : 8) 。

【0038】上述重鏈可變域包含以下框架序列：
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLS (SEQ ID NO: 61)或
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLS (SEQ ID NO: 38)；和
WVRQAPGRGLEWVA (SEQ ID NO: 40)；和
RFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAK (SEQ ID NO: 42)；以及
WPGGTLVTVSS (SEQ ID NO: 44)；

【0039】該輕鏈可變域包含以下框架序列：
DIQLTQSPSALPASVGDRVSITC (SEQ ID NO: 48)；
WYRQKPGKAPNLLIY (SEQ ID NO: 50)；
GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPD FAYYC (SEQ ID NO: 52)；以及
FGQGTKLEIKRTV (SEQ ID NO: 54)。

【0040】在一具體內涵中，於重鏈位置 53 之天冬醯胺（編號根據 Kabat 氏，
1991 年）被另一個谷氨醯胺以外的氨基酸替換，以防止在該天冬醯胺的去醯胺
化。較佳為該天冬醯胺被絲氨酸替換。

【0041】這裡術語“%序列相同”是指在對準兩個序列和引進的差距後，
候選核酸氨基酸殘留物相同於參考序列的百分比，如有必要，須達到最大百分
之相同率。對準之方法和計算機程序是文獻上眾所周知的。

【0042】如此處使用，本發明核酸分子或核酸序列較佳為包括核苷酸鏈，更好為 DNA(Deoxyribonucleic acid：脫氧核糖核酸)和/或 RNA(Ribonucleic acid：核糖核酸)。在另一具體內涵中，本發明核酸分子或核酸序列包括其他種類的核酸結構，比如 DNA / RNA 螺旋，肽核酸 (PNA)，鎖核酸 (LNA) 和/或一個核酶。這些其他核酸結構被稱為核酸序列的功能等同體。所謂“核酸序列的功能等同體”還包括和自然核苷酸同樣功能的非天然核苷酸、修改核苷酸和/或非核苷酸構成要素之鏈。

【0043】根據本發明的核酸序列是特別有用的，可產生具有結合約束力的化合物，特別能對付金黃色葡萄球菌和/或表皮葡萄球菌。舉例來說，這是藉由引進這樣的核酸序列進入細胞，使細胞的核酸翻譯機產生編碼的結合性化合物。在一具體內涵中，基因編碼本發明之重鏈和/或輕鏈均以所謂生產者細胞，比如中國倉鼠卵巢 (CHO)，NSO (小鼠骨髓瘤) 或 293 (T) 的細胞系表達，其中有些是適應商業化抗體之生產。該生產者細胞增殖的結果形成能夠生產據本發明之抗體或其抗原結合部的生產者細胞系。較佳為，該生產者細胞系適用於生產人類使用之化合物。因此，該生產者細胞系較佳為不含致病劑，如致病微生物。最好，具人類序列之結合性化合物是依照本發明藉核酸序列產生。

【0044】因此，根據本發明還提供一種能夠產生抗體或其抗原結合部的分離或重組抗體之細胞，以及生產本發明抗體或其抗原結合部的的方法，包括提供一種根據本發明具核酸序列之細胞，及根據本發明讓該細胞轉化該核酸序列，從而產生本發明之抗體或其抗原結合部。

【0045】在此，生成抗體之細胞被定義為有能力生產和/或分泌抗體或其抗原結合部之細胞，和/或有能力發展成為一種能夠生產和/或分泌抗體或其抗原結合部之細胞。一種根據本發明生成抗體之細胞較佳為一個適合商業化抗體生產之生產者細胞。較佳為，該生產者細胞生產適合人類使用的化合物。

【0046】根據本發明的方法，較佳為進一步包括一個步驟：收穫，純化和/或分離根據本發明之抗體或其抗原結合部。由此所獲得根據本發明具有結合約

束力的化合物較佳為用於金黃色葡萄球菌感染的診斷，葡萄球菌細菌之隔離或檢測，金黃色葡萄球菌物種和其他革蘭氏陽性菌之區分，和在任意之額外純化，分離和/或其他處理步驟後，用於人體的治療。

【0047】根據發明之抗體或其抗原結合部特別適合用於診斷用途。例如，一個樣品，如組織或血液樣品，可得自從懷疑感染金黃色葡萄球菌細菌，較佳為金黃色葡萄球菌和/或表皮葡萄球菌，尤佳為 MRSA(耐甲氧苯青黴素之金黃色葡萄球菌)之個人或從任何其他來源。隨後，該樣品可混合根據本發明之抗體或其抗原結合部。該抗體，免疫球蛋白鏈或其抗原結合部可特異性結合葡萄球菌細菌，較佳為金黃色葡萄球菌和/或表皮葡萄球菌。結合到抗體、免疫球蛋白鏈或其抗原結合部之細菌可以藉由文獻上任何已知的方法自樣品分離出來，例如，但不限於，使用磁珠、生物素塗層珠分離或藉由使用固定在圓柱之次級抗體分離。結合之細菌和抗體，免疫球蛋白鏈或其抗原結合部經清洗後，藉由文獻上任何已知的方法，細菌可以從該抗體，免疫球蛋白鏈或其抗原結合部洗脫。例如，細菌和抗體，免疫球蛋白鏈或其抗原結合部之間的結合，可以藉由增加鹽濃度和/或減少或增加 pH 值，和/或增加超額抗原決定部位而洗脫。

【0048】金黃色葡萄球菌(較佳為金黃色葡萄球菌和/或表皮葡萄球菌)的分離，可用於各種應用。例如，幾個不同革蘭氏陽性菌的感染，可能會導致個體產生重疊症狀。在這種情況下，可能難以區分金黃色葡萄球菌和/或表皮葡萄球菌和其他革蘭氏陽性菌。根據本發明之抗體或其抗原結合部可以用來檢測金黃色葡萄球菌和/或表皮葡萄球菌之存在，或區分金黃色葡萄球菌和/或表皮葡萄球菌及其他細菌。細菌自涉嫌遭受金黃色葡萄球菌和/或表皮葡萄球菌或任何其他來源(如細菌培養基)感染的個人樣品中分離可以促進檢出該金黃色葡萄球菌，因為分離造成該金黃色葡萄球菌濃度增加和/或純度更高。

【0049】葡萄球菌屬，較佳為金黃色葡萄球菌和/或表皮葡萄球菌，尤佳為 MRSA(耐甲氧苯青黴素之金黃色葡萄球菌)的分離，例如可以進一步用來鑑別樣品中特定的金黃色葡萄球菌和/或表皮葡萄球菌株，較佳為 MRSA 菌株。該菌株

之鑑別可以例如藉由執行細菌 DNA 序列的鑑定。在這種情況下，較佳為先取得分離的金黃色葡萄球菌和/或表皮葡萄球菌。

【0050】在一本發明之具體內涵中，根據本發明之抗體或免疫球蛋白鏈或其抗原結合部可加以標記(但不限於熒光標記，或放射性標記)，以便例如能夠偵測該抗體或免疫球蛋白鏈或其抗原結合部。另外，使用標記次級抗體偵測本發明之抗體或其抗原結合部，該標記次級抗體是針對本發明之抗體或免疫球蛋白鏈或其抗原結合部。如果偵測該抗體或免疫球蛋白鏈或其抗原結合部之結合約束力，可發現金黃色葡萄球菌和/或表皮葡萄球菌之存在。

【0051】因此本發明提供使用根據本發明之抗體或其抗原結合部診斷金黃色葡萄球菌的感染，較佳為金黃色葡萄球菌的感染，尤佳為 MRSA 的感染，並檢測金黃色葡萄球菌和檢測/或表皮葡萄球菌，較佳為 MRSA，並區分金黃色葡萄球菌和/或表皮葡萄球菌，較佳為 MRSA 和其他革蘭氏陽性菌。另外提供根據本發明之抗體或其抗原結合部用於診斷金黃色葡萄球菌的感染，較佳為金黃色葡萄球菌的感染，尤佳為 MRSA 的感染。

【0052】此外還提供藉由根據本發明之抗體或其抗原結合部，從溶液中分離金黃色葡萄球菌和/或表皮葡萄球菌之方法。該方法較佳為包括提供懷疑患有金黃色葡萄球菌和/或表皮葡萄球菌，尤佳為 MRSA，或從任何其他來源(如細菌培養基)感染的個人樣品，在該樣品中加入根據本發明之抗體或其抗原結合部，使得本發明之抗體或其抗原結合部能結合於存在之金黃色葡萄球菌和/或表皮葡萄球菌細菌，和使結合於本發明之抗體或其抗原結合部金黃色葡萄球菌和/或表皮葡萄球菌分離出來。

【0053】因此現在已提供本發明之革蘭氏陽性菌特異性結合化合物和核酸序列的編碼，包括人體結合性化合物，使得改善之治療應用成為可行。本發明之革蘭氏陽性菌特異性結合化合物可抵制革蘭氏陽性細菌如金黃色葡萄球菌和/或表皮葡萄球菌。因此根據本發明具有結合約束力的化合物特別適合用作藥物或預防劑。較佳為所用的具有結合約束力化合物包含人類序列，或至多有 5% 的

非人類序列，以減少治療人類個體時產生不良副作用的機會。因此也提供根據本發明之抗體或其抗原結合部或核酸序列用作藥物和/或預防劑。當服用本發明之核酸時，它將現場轉化成根據本發明有結合約束力的化合物。在一特佳的具體內涵中，該抗體包括抗體 F1，或其抗原結合部。該藥劑或預防劑較佳為用於抵制或至少部分防止金黃色葡萄球菌和/或表皮葡萄球菌的感染或抵制或至少部分防止金黃色葡萄球菌和/或表皮葡萄球菌感染的不良影響。因此，進一步提供根據本發明之抗體或其抗原結合部或核酸序列，用作藥物和/或預防劑，至少在部分治療和/或預防金黃色葡萄球菌和/或表皮葡萄球菌引起之徵候。非限制範圍的例子有皮膚感染、粉刺、膿疱病、癬、蜂窩組織炎、毛囊炎、癬病、癰、燙傷皮膚綜合症、膿腫、肺炎、腦膜炎、骨髓炎、心內膜炎、中毒性休克綜合徵候和敗血症。較佳為，抵制或至少部分阻止金黃色葡萄球菌感染。最好為抵制、降低或至少部分阻止 MRSA 感染。因此亦提供根據本發明之抗體或其抗原結合部或核酸序列之應用為藥劑和/或預防劑，至少在部分治療和/或預防金黃色葡萄球菌和/或表皮葡萄球菌之感染，以及提供方法，至少部分治療或預防金黃色葡萄球菌和/或表皮葡萄球菌相關的徵候，包括較佳為在個人被診斷為感染金黃色葡萄球菌和/或表皮葡萄球菌後，使需要的個人服用有效治療量的本發明之抗體或其抗原結合部。該徵候較佳為至少包括上面列出的金黃色葡萄球菌有關之徵候，最好是 MRSA 的有關徵候。該抗體較佳為抗體 F1，或其抗原結合部。

【0054】為了對付革蘭氏陽性菌，較佳為在感染之前，使個人服用本發明具有結合約束力的化合物。或是，使已感染個人服用本發明具有結合約束力的化合物。較佳為使並發症風險增加的個人，例如住院病患和/或免疫力受損個人服用該具有結合約束力的化合物。老人也有越來越大的細菌感染危險。本發明具有結合約束力的化合物較佳為藉由一次或多次注射施用。本發明具有結合約束力的化合物用於治療應用之劑量範圍係基於具嚴格協議規定的臨床試驗之增加劑量臨床研究。典型的劑量為 0.1 和 10 毫克/每公斤體重。本發明具有結合約束力化合物的治療應用通常配用藥學上可接受的載體、稀釋劑和/或賦形劑。合適的載體例子包括例如鑰匙孔血藍蛋白（KLH），血清白蛋白（如牛血清白蛋白或 RSA）和卵清蛋白。在一較佳的具體內涵中，該合適的載體包括例如生理鹽水之溶液。

【0055】在另一具體內涵中，本發明具有結合約束力化合物使用核酸編碼。正如已經說明，服用這類核酸後，人體會製造具有結合約束力的化合物。所生產的具有結合約束力的化合物是能夠預防和/或對抗革蘭氏陽性細菌感染和/或感染所衍生之不良影響。因此也提供用為藥物和/或預防劑本發明的核酸序列。該核酸較佳為用於對抗金黃色葡萄球菌和/或表皮葡萄球菌，尤佳為抵制金黃色葡萄球菌，最好為 MRSA。因此，進一步提供本發明的核酸序列於製備藥劑和/或預防劑之應用，至少部分治療和/或防止革蘭氏陽性菌有關的徵候。該革蘭氏陽性菌有關的徵候較佳為包括金黃色葡萄球菌或表皮葡萄球菌的感染，尤佳為金黃色葡萄球菌的感染，最好為 MRSA 的感染。

【0056】進一步提供包含根據本發明之抗體或其抗原結合部或核酸序列和可以接受的載體，稀釋劑或賦形劑之藥劑組成物。該藥劑組成物較佳為適合人類使用。

【圖式簡單說明】

【0057】第 1 圖：F1 的抗體結合於從幾個革蘭氏陽性菌所得之：LTA(脂磷壁酸)製劑。(a)LTA(脂磷壁酸)製劑均來自西格瑪公司，和以具小鼠多無性繁殖抗-LTA 之 ELISA 捕獲法測試，或 (b) 高度純化 LTA(脂磷壁酸)製劑來自菲舍爾公司之 D25，人體抗-RSV(呼吸道合體細胞病毒)抗體被用來作為非特異性陰性對照，而小鼠多無性繁殖抗-LTA 抗體作為陽性對照。

【0058】第 2 圖：重組 F1 抗體結合到金黃色葡萄球菌，但不是肺炎鏈球菌。(a) 細菌以 F1 抗體，或對照 IgG (D25，人體抗呼吸道合體細胞病毒抗體) 或無第一抗體 (只用 IgG-PE) 培養。洗滌後加入次級抗體 (IgG-PE)。(b) 在兩個獨立實驗中，測試 6 株臨床分離體的 F1 結合性。測試 PVL+株 (SA - 1)，三正常株 (SA - 2、SA - 3 和 SA - 4)，兩株 MRSA (SA - 5 和 SA - 6)。

【0059】第 3 圖：(a) rF1 抗體結合於 14 株金黃色葡萄球菌。(b) rF1 抗體結合於表皮葡萄球菌，但不結合於枯草芽孢桿菌、糞腸球菌、李斯特菌和化膿性鏈球菌。

【0060】第 4 圖：(a) rF1 抗體結合在不同生長階段的活體外-MRSA(耐甲氧苯青黴素之金黃色葡萄球菌)，ISO C：同型對照，Med：介體對照；(b) rF1 抗體結合於來自感染組織分離的活體內 MRSA(耐甲氧苯青黴素之金黃色葡萄球菌)。

【0061】第 5 圖：rF1 抗體結合於 SDR(絲氨酸-天門冬氨酸重複體)蛋白質。(a) 金黃色葡萄球菌 (Wood46 株) 藉由 rF1 或同型對照抗體的商業化磷壁酸製劑之免疫沉澱 (IP)，其次是藉由 rF1 抗體 (左) 作免疫印跡，和質譜分析得自 rF1 抗體 (右) 結合於 WTA 製劑之片段，(b) 金黃色葡萄球菌 (USA300 株) 細胞壁溶解液藉由 rF1 或對照抗體作免疫沉澱 (IP)，其次是藉由 rF1 抗體 (左) 作免疫印跡 (WB) 與質譜分析得自 rF1 抗體 (右) 結合於細胞壁片段 (USA300 株)，(c) 藉由 rF1 或同型對照抗體對表皮葡萄球菌壁溶解液作免疫沉澱，其次是藉由 rF1 抗體 (左) 作免疫印跡，並用質譜分析 rF1 抗體 (右) 結合之細胞壁片段。

【0062】第 6 圖：rF1 對表達於金黃色葡萄球菌和大腸桿菌之 SDR(絲氨酸-天門冬氨酸重複體)蛋白質之結合約束力。(a) 藉由抗-His(六聚組氨酸)抗體 (左) 和 rF1 (右) 抗體，使含高表達六聚組氨酸-標籤的 ClfA(聚叢因子-A)之金黃色葡萄球菌和大腸桿菌分解液作免疫印跡。(b) 含有六聚組氨酸-標籤的 ClfA, ClfB, SdrC, SdrD 和 SdrE 的大腸桿菌細胞溶解液作免疫印跡，接著以具 rF1 (上) 或抗-His(六聚組氨酸)抗體 (下) 之金黃色葡萄球菌溶解液孵育。

【0063】第 7 圖：rF1 結合於金黃色葡萄球菌表達的 SDR(絲氨酸-天門冬氨酸重複體)域。測試金黃色葡萄球菌表達的結構對 rF1 (左) 之結合性，具抗-MBP (麥芽糖結合蛋白質)，抗-His(六聚組氨酸)和 rF1 抗體 (右) 的金黃色葡萄球菌溶解液之免疫印跡。

【0064】第8圖：抗體 rF1的重鏈 A114C (a) 和輕鏈 V205C (b) 變體的序列。
根據Kabat氏 (1991年)，及匣：CDR(互補決定區) 編碼。

【實施方式】

【0065】茲以下面的實施例進一步解釋本發明。這些實施例並不限制本發明的範圍，而只是有助於明瞭本發明。

【0066】在此詳細引述之所有專利文件和其他出版物均可供所有目的納入參考。

實施例 1

方法

B 細胞分離

【0067】B 細胞係採用費苛爾(Ficoll)分離法及 CD4/CD8 具微珠之陰性選擇法(參閱製造商-米爾泰尼生物技術公司所描述的說明)，自成年人的新鮮血液取得。要獲取記憶 B 細胞，細胞分類為 CD19⁺CD3⁺CD27⁺IgD⁺IgA⁺型/FACSAria (Becton Dickinson 公司)。這些組織的使用已被醫療機構倫理委員會批准，並在知情的情況而同意。根據醫院欲獲得具基因型群組 109 和 16 之 MRSA 菌株而選擇捐血者。

細胞培養

【0068】採用 50 奈克/毫升之保持在含 IMDM 培養液 (Gibco 公司)，8% 胎牛血清 (HyClone 公司) 和青黴素/鏈黴素 (羅氏公司) 之標準培養基的 B 細胞，該 B 細胞係在 γ -照射 (50Gy) 穩定表達 CD40L (CD40L- L 細胞， 10^5 個細胞 / 毫升) 之小鼠 L 纖維原細胞和重組小鼠 IL - 21 (25 奈克/毫升，研發系統)

上共培養。細胞進行常規的 PCR 檢測，被發現在支原體和 EBV（數據未顯示）存在下呈陰性。

【0069】批量轉導人類記憶 B 細胞雙陽性 NGFR 和 GFP 用 FACS(fluorescent activated cell sortor：熒光激活細胞分類器)進行純化，和在 96 孔板培養，細胞密度為每孔 500 個細胞。在 ELISA(酶聯免疫吸附試驗)儀測試培養基上清液，使用紐曼株和 SH1000 株之溶菌產物。陽性培養基進行細胞株的次株化，在 96 孔板培養，細胞密度為每孔 10 個細胞，亦用 ELISA(酶聯免疫吸附試驗)儀測試。隨後在每孔接種 1 個陽性培養基細胞，並用 ELISA 儀測試其對金黃色葡萄球菌株紐曼和 SH1000 的反應性。

逆轉錄病毒轉換作用(Retroviral transduction)

【0070】以往已有記載 BCL6 逆轉錄病毒結構（參閱 Shvarts A 等氏，基因開發 16 期，681-686 頁（2002 年））。Stanley Korsmeyer 博士熱心提供 cDNA(互補 DNA)基因編碼人類 Bcl-xL。BCL6 和 Bcl - xL 分別無性繁殖(clone)成為 BCL6 - NGFR 和 BclxL - GFP 的結構。以往已有記載這些結構基因轉染成逆轉錄病毒包裝細胞 LZRS(參閱 Jaleco A.C.等氏，血液 94 期，2637~2646 期(1999 年); Scheeren F.A. 氏，自然免疫 6 期，303-313 期（2005 年））。文獻上有記載在 rmIL-21 存在下，於 CD40L-L 細胞上激活後，藉由含 BCL6 和 Bcl-xL 之逆轉錄病毒，使記憶性 B-細胞雙轉換 36 小時（參閱 Diehl S.A.等氏，免疫學期刊，180 期，4805-4815 頁（2008 年）；Kwakkenbos M.等氏，Nat Med 新聞（2009 年））。藉由 rmIL-21，使轉換細胞保持在 CD40L-L 細胞上。

ELISA(酶聯免疫吸附試驗)儀

【0071】為了確定抗體含量，在 37°C 或 4°C 使 5 微克/毫升在 PBS(磷酸鹽緩衝液)中之抗人體 IgG（傑克遜免疫研究實驗室）塗 ELISA 板上 1 小時，和在 ELISA 儀中以洗滌緩衝液（磷酸鹽緩衝液，0.5 %Tween-20-一種聚山梨酯界面活性劑）洗滌。在細胞培養基上層清液連續稀釋和添加酶-共軛檢測抗體[1:2500 稀

第 23 頁，共 38 頁(發明說明書)

釋的 HRP(辣根過氧化物酶)-共軛抗-IgG (傑克遜公司)]之前，4%在磷酸鹽緩衝液中之牛奶被用來作為阻斷劑。TMB 基板/中止溶液 (Biosource 公司) 用於發展 ELISA(酶聯免疫吸附試驗)試法。

【0072】為篩選之目的，我們用得自紐曼株和 SH1000 株之溶菌產物。兩者均在磷酸鹽緩衝液中製造，並在 B 細胞培養基上層清液進行測試和/或 1:2 稀釋之前，直接以 5 至 10 微克/毫升之濃度塗佈。

【0073】為了探討人體 IgG1 無性繁殖 F1 的抗原特異性，開發 LTA(脂磷壁酸)檢測的 ELISA 法。在加入次級抗體前，使由金黃色葡萄球菌、枯草芽孢桿菌、糞腸球菌及化膿性鏈球菌 (Sigma 公司) 所得純化 LTA 製劑加入塗有多無性繁殖的鼠抗-LTA (1/200 原汁，1 毫克/毫升，QED 生命科學公司) 之 ELISA 板。

【0074】此外，我們以直接 ELISA 法測試幾個源於菲舍爾開發之庫藏 (生化研究所，埃爾蘭根大學，德國)，及由 B.Appelmelk 公司 (VU，阿姆斯特丹，荷蘭) 提供的 LTA 製劑，[詳情見 (Keller R.等氏，感染與免疫期刊，60 期，3664-3672 頁 (1992 年)；Polotsky V.Y.等氏，感染與免疫期刊，64 期，380-383 頁 (1996 年) 和 Greenberg J.W.等氏，感染與免疫期刊，64 期，3318-332 頁 (1996 年) 以及綜述 (Weidenmaier C.等氏，國家微生物學綜述，6 期，276-287 頁 (2008 年)]。在加入 rF1 (10 微克/毫升) 或對照抗體 (1:5 稀釋之雜交瘤細胞上層清液) 並進一步以抗人類或鼠共軛抗體檢測之前，塗佈 LTA 1 微克/毫升製劑。純化 LTA 製劑盤包括：枯草芽孢桿菌、金黃色葡萄球菌、乳酸乳球菌、格氏乳球菌、雙歧桿菌、米球菌、乳酸桿菌、腸膜明串珠菌、地衣芽孢桿菌、威爾斯李斯特氏菌、小腸腸球菌、棉子糖乳球菌、變形鏈球菌和肺炎鏈球菌。幾個變種含有或缺乏丙氨酸殘基和/或脂質側鏈 (這裡不描述)。

F1 抗體對細菌培養基的結合約束力

【0075】使用紐曼金黃色葡萄球菌和肺炎鏈球菌株 (血清型 3)。使紐曼菌株培養於 50 毫升的 TSH(O / N)，然後取 1 毫升再懸浮於 100 毫升中歷 2 至 2.5

小時，至 OD：1，其後收集細菌。肺炎鏈球菌培養於托德休伊特介質與酵母之混合介質中。在此之前，細菌與 F1 抗體，對照 IgG（D25，一種人類抗-呼吸道合體細胞病毒抗體）一起培養，或僅與次級抗體（IgG-PE）培養，細胞以 100 %總小鼠血清進行預處理，以防止背景染色。洗滌後加入次級抗體（IgG-PE）。抗體在冰上孵育 20 分鐘。

F1 序列測定和無性繁殖表達

【0076】我們用 Trizol 試劑（Invitrogen 公司）提取總 RNA(核糖核酸)，用上標 RT 生成 cDNA，進行 PCR 和複製重鏈和輕鏈可變區到 pCR2.1 TA 無性繁殖載體（Invitrogen 公司）。為了排除逆轉錄酶或 DNA 聚合酶引起的突變，我們進行一些獨立的無性繁殖實驗。為了產生重組抗體 F1 mAb，我們在人體 IgG1 和 Kappa 恆定區框架結構中複製重鏈和輕鏈可變區成為 pcDNA3.1（Invitrogen 公司）系載體，瞬時轉染 293T 細胞。我們藉由蛋白質 A 從培養基上層清液純化重組的 F1。

結果

F1 無性繁殖的產生

【0077】從三個對 MRSA(耐甲氧苯青黴素之金黃色葡萄球菌)呈陽性但未生病者收集 50~60 毫升肝素血液，和採用費柯爾(Ficoll)純化步驟後，分離外周 B 細胞中。從幾個 B 細胞群中取出之 B 細胞藉由含 BCL6 - NGFR 和 Bcl - XL 的逆轉錄病毒（Diehl 等氏與 Kwakkenbos 等氏）雙轉導。從對 IgG，CD27 呈陽性群，開始在 96 孔板(細胞密度為 500 個/孔)小型培養基多無性繁殖 B 細胞培養基。收集這些小型培養基上層清液，使用於 ELISA 試驗，以篩選存在之金黃色葡萄球菌特異性 IgG 抗體（在這些 ELISA 試驗中，塗層為兩種金黃色葡萄球菌菌株 -SH1000 和紐曼菌株之細胞溶解液）。篩選出對 SH1000 以及紐曼金黃色葡萄球菌呈陽性之小型培養基，接種在新的小型培養基，其密度為 10 個/細胞孔。再次，收集這些小型培養基上層清液，以 ELISA 法篩選紐曼和 SH1000 菌株。在此兩次 ELISA 試驗篩選陽性之無性系都接種到單無性繁殖系培養基(亦即 1 個細胞/孔)。

測試後，這些單無性繁殖系培養基上層清液被發現有一單無性繁殖系(命名為 F1)產生金黃色葡萄球菌特異性單無性繁殖系抗體 IgG。

F1 無性繁殖系培養基上層清液中抗體結合於由金黃色葡萄球菌 LTA 製劑

【0078】在無性繁殖系 F1 生成過程中，我們已經發現 F1 的上層清液結合到 SH1000 和紐曼兩株金黃色葡萄球菌細胞的溶解液。革蘭氏陽性菌主要細胞壁化合物是 LTA(脂磷壁酸)，因此，我們決定在 ELISA 法中測試 F1 上層清液對金黃色葡萄球菌 LTA 製劑之結合約束力。如表 1 所示，F1 無性繁殖系上層清液結合於 SH1000 和紐曼的金黃色葡萄球菌株細胞溶解液，而且也能結合於商業化購買純化的金黃色葡萄球菌 LTA 製劑。然而，我們注意到，對 LTA 製劑之結合約束力明顯低於整個細菌所觀察之結合約束力。

表 1：F1 無性繁殖系上層清液結合於金黃色葡萄球菌 LTA 製劑

【0079】使用抗鼠- HRP 共軛次級抗體作為陰性對照。另一個對照物是只檢測出流感 H3 蛋白質之抗流感病毒抗體。

	F1 無性繁殖系	小鼠抗-LTA	抗-flu 對照
SH1000 株	1.004	-0.100	-0.007
紐曼株	0.753	-0.007	0.007
SA LTA(ε)	0.176	-0.005	-0.009
Flu H3	0.003	-0.002	1.523
未塗佈	-0.013	-0.014	-0.015

重組所製之 F1 抗體結合於從多種來源的 LTA 製劑

【0080】抗體基因經過無性繁殖到表達介體，並在表達系統中產生重組 F1 (rF1) 抗體，以該 rF1 抗體測試來自幾種細菌之純化 LTA 製劑。如第 1A 圖所示，抗體 rF1 穩固結合得自金黃色葡萄球菌和枯草芽孢桿菌之市售 LTA 樣品，

並較沒那麼穩固地結合於得自乳酸菌和化膿性鏈球菌的 LTA 樣品。該 rF1 抗體沒有結合到得自肺炎鏈球菌的 LTA 樣品（數據未顯示）。此外 rF1 認得來自枯草芽孢桿菌、地衣芽孢桿菌和兩株分離之金黃色葡萄球菌的高純化 LTA 樣品（第 1B 圖）。rF1 並不能結合於從變形鏈球菌（第 1B 圖）或從乳酸乳球菌、格氏乳球菌、雙歧桿菌、藤黃微球菌、乳酸桿菌、腸膜明串珠菌、威氏利斯特菌、腸球菌、棉子糖乳球菌、變形鏈球菌和肺炎鏈球菌之 LTA 製劑（結果未顯示）。

重組的 F1 抗體結合於活生之金黃色葡萄球菌細菌

【0081】為了研究是否 rF1 抗體也認得活生之革蘭氏陽性菌，藉由流式細胞儀檢測流式細胞儀檢測 rF1 抗體對金黃色葡萄球菌和肺炎鏈球菌的結合約束力。如第 2A 圖所示，rF1 抗體能結合於活生金黃色葡萄球菌細菌（紐曼株），而不是肺炎鏈球菌。此外，我們還表明 rF1 認得 6 種臨床金黃色葡萄球菌分離株；其一是 PVL 陽性之致病株，3 種普通株和 2 種 MRSA 菌株（第 2B 圖）。

實施例 2

方法

細菌菌株和培養基

【0082】耐甲氧苯青黴素之金黃色葡萄球菌(MRSA)菌株-USA300(1114)、USA400、N315、USA100、USA1000、COL，MRSA252、以及對甲氧苯青黴素敏感之金黃色葡萄球菌(MSSA)菌株-雷諾茲、貝克爾、史密斯擴散、MN8 和萬古黴素中介敏感(VISA)菌株 Mu50，都是從耐藥性金黃色葡萄球菌網絡(NARSA)獲得；MSSA 菌株紐曼和羅森巴赫得自 ATCC。表皮葡萄球菌，枯草芽孢桿菌，糞腸球菌及化膿性鏈球菌得自瓦德氏自然科學；李斯特菌得自 ATCC。細菌生長在"胰蛋白酶大豆瓊脂"(TSA)板上，在 37°C 輔以 5% 羊血 18 小時。就液體培養而言，從 TSA 板之單一菌落接種於胰蛋白酶大豆肉湯(TSB)等，於 37°C 孵育，並以 200 轉/分鐘震動 18 小時。以新的 TSB100 倍稀釋這些培養基，進一步經歷不同時間再培養。

rF1 結合於體外生長的整個細菌之荧光激活細胞計數器分析

【0083】對於整個細胞之抗體沾染，細菌從 TSA(胰蛋白酶大豆瓊脂)板或 TSB(胰蛋白酶大豆肉湯)培養基收穫，並以無酚紅之漢克氏緩衝鹽溶液 (HBSS) 清洗，輔以 0.1%牛血清白蛋白 (不含 IgG; ϵ) 和 10 mM 肝素鈉，pH 值 7.4 (HB 緩衝液)，在 1700 倍重力下離心 20 分鐘。在 630 奈米讀取光密度，以估計細菌濃度。使 20×10^8 CFU(菌落形成單位)/毫升在 HB(血紅蛋白)緩衝液中細菌懸浮液混合相同體積 300 克 /毫升兔 IgG (Sigma 公司)，並在室溫 (RT) 孵育 1 小時以阻止非特異性 IgG 之結合。加入初級抗體(包括 rF1 和人類 IgG1 同型對照)使最終濃度為 2 微克/毫米，在室溫孵育這些混合物 15 分鐘。經過 HB(血紅蛋白)緩衝液洗兩次後，使細菌顆粒再懸浮在荧光抗人體 IgG 二次抗體 (傑克遜免疫研究所) 溶液中，並室溫孵育 15 分鐘。這種細菌用 PBS(磷酸鹽緩衝液)清洗兩次，和 1%多聚甲醛再懸浮於 PBS，並作流式細胞法分析。

以荧光激活細胞分類器分析 rF1 對感染組織整個細菌的結合

【0084】為分析抗體對感染組織之細菌的結合，用 PBS(磷酸鹽緩衝液)洗滌 TSB(胰蛋白酶大豆肉湯)中 USA300 之次培養基 4 小時。小鼠靜脈注射 100 微升 USA300/PBS(磷酸鹽緩衝液)懸浮液，估計濃度為 10×10^8 CFU(菌落形成單位)/毫升。三天後，收集腎臟、肝臟和肺，並用錐形組織研磨管 (VWR 公司) 均化。若有加註，則在不同的感染時間點收集器官。為溶解小鼠細胞，使勻漿在室溫於含 0.1% Triton- X100(一種非離子界面活性劑, Thermo 公司), 10 微克 / 毫升 DNaseI (羅氏公司) 和完全迷你蛋白酶抑制劑雞尾酒 (羅氏公司) 之 PBS(磷酸鹽緩衝液)中孵育 10 分鐘，並通過一 40 微米過濾器 (Falcon 公司)。用 PBS 洗細胞懸液兩次，並在 HB(血紅蛋白)緩衝液中再懸浮，混合等體積之 600 微克/毫升的人體 IgG (Sigma 公司)，並在室溫孵育 1 小時。加入包括 rF1 和人體 IgG1 同型對照之初混合物，使得最終濃度為 2 微克/毫升。為了區分得自小鼠器官殘骸之細菌，加入兔 IgG 抗-金黃色葡萄球菌 (Abcam 公司)，濃度為 20 微克/毫升。在室溫孵化 15 分鐘後，以 HB(血紅蛋白)緩衝液洗細胞兩次，並再懸浮於抗人體 IgG 和抗兔 IgG 次抗體的混合物中，每一個均加不同的荧光染料 (傑克遜

免疫研究所)作標記。經過用 PBS(磷酸鹽緩衝液)洗滌兩次，細胞再懸浮於具 2 %多聚甲醛之 PBS，和流式細胞儀分析。藉由兔 IgG 抗-金黃色葡萄球菌篩選雙重熒光染色之細菌，作為陽性沾染，而製作 rF1 和同型控制物熒光強度的之覆蓋直方圖。

結果

rF1 強力結合至 14 株金黃色葡萄球菌和表皮葡萄球菌

【0085】測試 rF1 抗體結合於七種耐甲氧苯青黴素之金黃色葡萄球菌 (MRSA) 菌株、六種對甲氧苯青黴素敏感之金黃色葡萄球菌 (MSSA) 菌株、一種對萬古黴素中間體敏感的金黃色葡萄球菌 (VISA) 菌株、表皮葡萄球菌和其他一些革蘭氏陽性菌種之能力。如圖 4 所示，rF1 強烈結合於所有 14 種金黃色葡萄球菌 (第 3A 圖) 和表皮葡萄球菌 (第 3B 圖) 菌株，但沒有結合到其他革蘭氏陽性物種 (第 3B 圖)。

rF1 結合於不同生長階段的 MRSA 及從體內感染的 MRSA(耐甲氧苯青黴素之金黃色葡萄球菌)

【0086】我們測試單抗 mAb rF1 結合於兩個不同的組織中的細菌及防止在這一過程中感染的能力。我們發現 rF1 結合於小鼠感染兩天後腎臟、肝臟和肺組織分離出來之細菌，並發現其對感染腎臟分離出來之細菌有穩定的結合能力，感染後 2，3 和 8 天均能結合約束細菌。

【0087】測試 rF1 抗體對不同生長階段-即在 TSB(胰蛋白酶大豆肉湯)培養基中對數生長早期 (2 小時) 和後指數增長 (8 小時) 的 MRSA (耐甲氧苯青黴素之金黃色葡萄球菌-USA300 菌株) 之結合能力，及在 TSA(胰蛋白酶大豆瓊脂)板上堅實菌落生長情形。結果顯示 rF1 強烈結合到所測試之所有生長階段的細菌 (第 4A 圖)。

【0088】在小鼠系統感染 MRSA (耐甲氧苯青黴素之金黃色葡萄球菌) 三天後，取出小鼠腎臟勻漿，測試 rF1 抗體對感染到整個組織的 MRSA (USA300 菌株) 細菌之結合能力。如第 4B 圖所示，rF1 能結合於自感染組織取得的 MRSA (耐甲氧苯青黴素之金黃色葡萄球菌)。

實施例 3

【0089】進一步的實驗來確定 rF1 抗體結合約束抗原決定部位之能力。雖然已觀察到對 LTA (脂磷壁酸) 製劑之結合約束力 (例如，見例 1)，但結合約束力不盡如人意，不若結合於整個細菌之能力，暗示 rF1 可能參與結合另一抗原決定部位。

方法

金黃色葡萄球菌、表皮葡萄球菌和商業化 WTA 製劑之細胞壁溶解液的免疫沉澱，免疫印跡和質譜

【0090】得自 Wood ®46 金黃色葡萄球菌菌株 (生物設計部 / 子午線生命科學公司，緬因州) 之 40 微克商業化壁磷垣酸 (WTA) 製劑被分成兩部分，並藉由 1 微克/毫升 rF1 或同型對照人類抗體，使之免疫沉澱。以蛋白質 A / G Ultralink 樹脂 (皮爾斯公司) 抓獲的抗體。然後樣品進行處理-使用 50mM (mM 毫摩爾濃度) 二硫蘇糖醇，10mM 2-碘乙醯胺和 8% Tris ® (三 (羥甲基) 氨基甲烷)-甘氨酸凝膠，隨後以 rF1 作免疫印跡。

【0091】在 37°C 利用 100 毫克/毫升的溶菌酶在 30% 棉子糖緩衝液中處理培養基 30 分鐘，製得細胞壁在 20 毫升隔夜 USA300 金黃色葡萄球菌菌株培養基 (40 毫克細胞顆粒/毫升) 之製劑。過濾整個細胞壁製劑，稀釋至 10 毫升 NP40 溶解液和以抗旗® M2 瓊脂糖 (西格瑪公司) 培養兩次，盡量從細胞壁製劑消耗蛋白質-A。最後細胞壁製劑分為兩部分，以 1 微克/毫升 rF1 或同型對照人類抗體作免疫沉澱。以蛋白質 A / G Ultralink 樹脂 (皮爾斯) 獲取的抗體。然後樣品進行處理-使用 50mM 二硫蘇糖醇，10mM 2-碘乙醯胺和 8% Tris -甘氨酸凝膠，隨後銀染或以 rF1 作免疫印跡。

【0092】得自 20 毫升表皮葡萄球菌過夜培養基之溶解液製備係在 NP40 溶解緩衝液中以珠擊完成之。由此產生的溶解液製劑以 NP40 溶解緩衝液稀釋到 10 毫升，分為兩部分，以 1 微克/毫升 rF1 或對照抗體作免疫沉澱。以蛋白質 A / G Ultralink ®超聯樹脂（皮爾斯公司）抓獲抗體。然後樣品進行處理-使用 50mM 二硫蘇糖醇，10mM 2-碘乙醯胺和 8% Tris -甘氨酸凝膠，隨後銀染或以 rF1 作免疫印跡。

【0093】將樣本加入預製的 SDS PAGE 迷你凝膠和溶解蛋白質，並用考馬斯藍染色(Coomassie Blue)，以便作蛋白質體分析。切除得自凝膠區而對應 rF1 免疫印跡可視帶的凝膠片，並以碘乙醯胺還原與烷基化，且在現場以胰蛋白酶消化。在數據依賴實驗中，將所得胰蛋白酶肽藉由微毛細管反相液相層析-奈米級電噴霧串聯質譜法，利用混合線性離子阱傅立葉變換離子迴旋加速器共振質譜儀（LTQ -FT; Thermo Fisher 公司）進行分析。串聯質譜法結果提交給數據庫檢索，藉由吉祥物(Mascot)軟體（矩陣科學公司）加以分析。

顯示為金黃色葡萄球菌和大腸桿菌之外源 ClfA(聚叢因子-A)的表達

【0094】His(六聚組氨酸)-標籤 ClfA 之金黃色葡萄球菌表達：該"聚叢因子-A" (ClfA) 基因係擴增自 USA300 基因組 DNA 的 LPXTG 主題中甘氨酸序列編碼之信號序列之 PCR(聚合酶鏈反應)。C -末端 His-標記設計在 LPXTG 主題的最後和結紮到 pTet 金黃色葡萄球菌的表達載體（Genentech 公司之 pSAS10）。然後使由此產生的結構經電穿孔於金黃色葡萄球菌 WT RN4220。從隔夜培養基（起始 OD₆₀₀ 值 0.15）接種 20 毫升無論是電穿孔 RN4220 或 RN4220 空（不攜帶 pTet 表達載體）的培養基，在胰蛋白酶大豆肉湯（TSB）生長 1 小時，然後以脫水四環素（200 奈克/毫升）誘導蛋白質表達 2 小時。在誘導期結束時，金黃色葡萄球菌培養基藉由溶葡萄球菌酶（50 微克/毫升）預溶解，然後再於溶解緩衝液（150 mM 氯化鈉，20mM Tris pH 值 7.5，1% triton-X(一種非離子界面活性劑)和無 EDTA 之羅氏蛋白酶抑制劑錠片）中，以珠擊溶解。然後在 4 °C 於 10 mM

的咪唑的存在下，用 NiNta 樹脂（Qiagen 公司）培養清淨之溶解液 1 小時，以便下拉重組 ClfA 蛋白質。

His(六聚組氨酸)-標籤 ClfA 的大腸桿菌表達：

【0095】 該"聚叢因子-A " (ClfA) 基因係擴增自 USA300 基因組 DNA 的 C-款 LPXTG 主題中甘氨酸序列編碼之 N-款信號序列（以蛋氨酸開始）之 PCR(聚合酶鏈反應)。然後擴增的 PCR 產物藉由 C-端 His 標籤在框架中結紮於 pET 21b(+) 大腸桿菌表達載體（Novagen 公司）。由此產生的結構轉化成大腸桿菌 BL21-金（DE3）活性細胞（Stratagene 公司）和根據製造商的指示，藉由 IPTG(異丙基硫代半乳糖苷)誘導蛋白表達 3.5 小時。誘導的大腸桿菌培養基於溶解緩衝液（150 mM 氯化鈉，20mM Tris pH 值 7.5，1% triton-X 和無 EDTA 之羅氏蛋白酶抑制劑錠片）中，以珠擊溶解。然後在 4 °C 於 10 mM 的咪唑的存在下，用 NiNta 樹脂（Qiagen 公司）培養清淨之溶解液 1 小時，以便下拉重組 ClfA 蛋白質。

顯示為大腸桿菌之外源 ClfA 的表達並以金黃色葡萄球菌溶解液培養

【0096】在大腸桿菌中金黃色葡萄球菌細胞表面 SDR 蛋白質 ClfA, ClfB, SdrC, SdrD, SdrE 的表達和純化；該 ClfA, ClfB, SdrC, SdrD 和 SdrE 基因係擴增自 USA300 基因組 DNA 的 LPXTG 主題中甘氨酸序列蛋白質開始成熟編碼之信號序列之 PCR(聚合酶鏈反應)，和藉由 N-末端 Unizyme 標籤於 ST239 介體（Genentech 公司）結紮在框架內。該結構轉化成大腸桿菌 58F3（Genentech 公司），誘導蛋白質表達和其後加以純化。

【0097】 NiNta 樹脂捕捉 NT Unizyme 標籤之 SDR 蛋白質：500 微克純化的 N-末端 Unizyme 標籤之 SDR 蛋白質（ClfA, ClfB, SdrC, SdrD, SdrE）稀釋於含有蛋白酶抑制劑（無 EDTA）之 PBS(磷酸鹽緩衝液)，並在 4°C 以 NiNta 樹脂（Qiagen 公司）培養 1.5 小時。然後具捕獲的 Unizyme 標籤 SDR (絲氨酸-天門冬氨酸重複體)蛋白質之 NiNta 樹脂用洗滌緩衝液(50 mM 的磷酸二氫鈉，300mM 氯化鈉; pH 值 8.0) 清洗一次。

【0098】藉由金黃色葡萄球菌溶解液使大腸桿菌所生產的 SDR 蛋白質改性：25 毫升培養基先從 Δ Pan Sdr 突變體 (ClfA - ClfB - SdrCDE 空；添福斯特，都柏林三一學院之禮品) 及紐曼金黃色葡萄球菌 (起始 OD₆₀₀ 值 0.15) 通宵培養，並在 37°C 及 200 轉/分鐘之條件下，於 TSB(胰蛋白酶大豆肉湯) 中生長 3 小時 (指數相)。然後該指數相培養基再在懸浮於 1 毫升 PBS，並在 37°C 於 250 個單位的苯酮酶核酸 (Novagen 公司) 存在下，以 200 微克/毫升溶葡萄球菌酶溶解 30 分鐘。於 4°C 用微型離心機以最大速度旋轉 10 分鐘，使該溶解物清除碎片。NiNta 樹脂抓獲之大腸桿菌蛋白質在 37°C 藉由清淨化 Δ Pan Sdr 突變體金黃色葡萄球菌溶解液進行孵育 1 小時，進行改性。

【0099】改性大腸桿菌 SDR 蛋白質之免疫印跡：然後未改性或改性之 NiNta 樹脂抓獲大腸桿菌 SDR 蛋白質樣本，用洗滌緩衝液 (50 mM 磷酸二氫鈉，300mM 氯化鈉，10 mM 咪唑，pH 值 8.0) 洗三次，準備作免疫印跡，並在 8% Tris 甘氨酸凝膠 (Invitrogen 公司) 上操作。免疫印跡以 rF1 抗體或抗 Unizyme 抗體 (Genentech 公司) 抹除。

SDR(絲氨酸-天門冬氨酸重複體)域作為抗原以識別 rF1

【0100】MBP-SD 結構之金黃色葡萄球菌表達："麥芽糖結合蛋白質"(MBP) 基因藉由 pMAL - c5x 載體 (新英格蘭生物實驗所[略為 NEB]，伊普斯維奇，麻州，美國) 從一開始對成熟蛋白質序列編碼，直到 Factor Xa 裂解位點序列編碼，而以 PCR 擴增。

【0101】合成不同長度的 C-末端 His-標籤 SD (SD, SDS, DSD, SDSD, SDSDS, SDSDSD) 成為單鏈寡核苷酸，並共同退火而得雙鏈 DNA。ClfA 基因之 Sdr 區係從 Sdr 區開始 (560D) 序列編碼的 PCR(聚合酶鏈反應) 擴增，其中包括 SD 區之 618A 或 709S 序列編碼，其次由各自的質體基因 pTet.ClifA.SD618A 或 pTet.ClifA.SD709S (Genentech 公司) 之 His-標籤作 DNA 序列編碼。作為對照的是，開始從成熟蛋白質的 ClfA 基因 A 區編碼序列，直到最後一區 (538G) 的編

第 33 頁，共 38 頁(發明說明書)

碼序列，其次 His-標籤編碼序列係由質體基因 pTet.ClfA.Adom.538G (Genentech 公司) 的 PCR 擴增。MBP(麥芽糖結合蛋白質)隨著各種 SD 插入或 ClfA A 域插入，而結紮到 pTet 金黃色葡萄球菌表達載體 (Genentech 公司之 pSAS10)。然後使所產生的結構電穿孔成為金黃色葡萄球菌 RN4220 Δ 分選酶 (在 RN4220 背景之分選酶缺失突變株)。

【0102】20 毫升培養基-無論是電穿孔 RN4220 Δ 分選酶或空 RN4220 Δ 分選酶 (不攜帶 pTet 表達載體) 從隔夜培養基 (開始 OD₆₀₀ 值 0.15) 接種，在胰蛋白酶大豆肉湯 (TSB) 並輔以葡萄糖 (2 克/升) 生長 1 小時，然後藉由脫水四環素 (200 奈克/毫升) 誘導蛋白質表達 2 小時。在誘導期結束時，使金黃色葡萄球菌培養基再懸浮於緩衝柱 (150 mM 氯化鈉，20mM Tris pH 值 7.5 和羅氏蛋白酶抑制劑-無 EDTA 錠)，並在 37°C 於 250 個單位苯酮酶核酸 (Novagen 公司) 的存在下，以 200 微克/毫升溶葡萄球菌酶溶解 30 分鐘。在 4°C 藉由微型離心機以最大旋轉速度離心 10 分鐘，清理該溶解物除去碎片。然後在 4°C 用直鏈澱粉樹脂 (NEB 公司) 配用最後 EDTA 濃度為 1mM 培養該清理後的細胞溶解液 1.5 小時，以便捕捉表達的 MBP - SD 蛋白質。

【0103】金黃色葡萄球菌表達的 MBP - SD 的結構之免疫印跡：具被俘的 MBP-SD 蛋白質直鏈澱粉樹脂以緩衝柱洗三次，進一步準備供免疫印跡分析，並在 8% Tris - 甘氨酸凝膠上操作。免疫印跡以 rF1 抗體或抗五 His-抗體 (Qiagen 公司) 或抗-MBP 抗體 (NEB 公司) 抹除。

結果

rF1 在金黃色葡萄球菌和表皮葡萄球菌中反應生成一種獨特的 SDR (絲氨酸-天冬氨酸重複體)蛋白質族

【0104】在免疫沉澱後，測試商業化磷壁酸製劑和金黃色葡萄球菌 (USA300 株) 細胞壁溶解液 (WTA 公司) 對 rF1 的結合能力。rF1 能結合於商業化磷壁酸製劑 (第 5A 圖，左側板) 之幾個成分和金黃色葡萄球菌之細胞壁溶解液 (第 5B 圖，左側板)。利用質譜儀鑑別這些 WTA 製劑的成分和細胞壁溶解液，確定為

第 34 頁，共 38 頁(發明說明書)

ClfA (SdrA), ClfB (SdrB), SdrC, SdrD 和 SdrE (第 5A 圖, 右側板和第 5B 圖, 右側板)。

【0105】在免疫沉澱後, 測試表皮葡萄球菌細胞壁溶解液結合於 rF1 的能力。第 5C 圖 (左側板) 顯示 rF1 對表皮葡萄球菌細胞壁溶解液的幾個成分的結合約束力。這些成分未用對照抗體鑑定。利用質譜分析這些細胞壁成分, 鑑定為 SdrF, SdrG 和 SdrH (第 5C 圖右側板)。

在金黃色葡萄球菌和大腸桿菌中外源 ClfA 之表達

【0106】表達在金黃色葡萄球菌中之外源 ClfA 對 rF1 呈反應性, 而表達在大腸桿菌中之 ClfA 則不反應 (第圖 7A)。不過, 表達在大腸桿菌中之 Sdr 蛋白質 ClfA (SdrA), ClfB (SdrB), SdrC, SdrD 和 SdrE 以金黃色葡萄球菌溶解物孵育, 則能恢復 rF1 之反應性 (第 6B 圖)。

rF1 結合於表達在金黃色葡萄球菌中之 SDR 域

【0107】rF1 抗體結合於 ClfA Sdr 域, 其包含表達在金黃色葡萄球菌中之 ClfA 560D - 618S 和 ClfA 560D - 709S (第 7 圖), rF1 並不結合於 ClfA 的 A 域或含最多重複三個 SD 之小肽序列。

實施例 4

方法

rF1 之可變區無性繁殖成 pRK 載體

【0108】Phusion[®] DNA 聚合酶, 限制性酶 EcoRV, KpnI, PvuII, ApaI, AgeI, 及 AhdI, T4 DNA 連接酶均購自英格蘭生物實驗所, 伊普斯維奇, 麻州, 美國。Pfu DNA 聚合酶, 快速變化二定點突變試劑盒均購自 Stratagene / Agilent 科技公司, 聖克拉拉, 加利福尼亞州, 美國。2%瓊脂糖凝膠購自 Invitrogen 公司, 卡爾斯巴德,

第 35 頁, 共 38 頁(發明說明書)

加利福尼亞州，美國。PRK 治療載體 pRK.LPG3.HuKappa 和 pRK.LPG4.HumanHC 得自基因泰克/羅氏公司，南舊金山，加利福尼亞州，美國。

【0109】將得自 pCPEO 載體的 rF1 Mab(單無性繁殖抗體)的重鏈和輕鏈變量域放入 pRK 哺乳動物表達載體。總量 50 微升的 Pfu DNA 聚合酶按照標準 PCR(聚合酶鏈反應)程序進行 PCR 聚合酶鏈反應。重鏈可變區(V_H) 藉由下列引物擴增：YiHCF) 5' -ATG GCT GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT G-3' (SEQ ID NO:18) and YiHCR2 5' -GAA CAC GCT GGG GCC CTT GGT GCT GGC ACT CGA GAC TGT GAC CAG GGT GCC AGG T*CC CCA G-3' (SEQ ID NO:19) (PvuII 和 ApaI 限制位置以畫底線和*標出表示單核苷酸 G 到 T 改變成消除內部 ApaI 位置)；輕鏈可變區(V_L) 藉由下列引物擴增：YiLCF 5' -CGG CTC GAC CGA TAT CCA GCT GAC CCA GAG-3' (SEQ ID NO:20) and YiLCR 5' -GAT TTC CAG CTT GGT ACC CTG GCC G-3' (SEQ ID NO:21) (EcoRV 和 KpnI 畫底線標出)。分別具有 393 (V_H)和 328(V_L)bp 之獨特 PCR 產物可直接被 PvuII 及 ApaI (對 V_H 而言)，EcoRV 及 KpnI (對 V_L 而言)消化，其次是凝膠純化(採用 Invitrogen 公司，產品目錄 # K2100 - 12)。藉由 T4 DNA 連接酶，V_H 和 V_L 分別單獨配位成重鏈用的 pRK/PvuII, ApaI PRK，和輕鏈用的 pRK/EcoRV, KpnI 之治療載體片段。DNA 原核質體以限制酶消化模式證實，即在 2%瓊脂糖凝膠上，AgeI 釋出 rF1V_H~300 bp 和 5.8 kb 帶，而 AhdI 釋出 rF1V_L~ 2.3 和 3.1 kb 帶。

化工壓力測試

【0110】比較抗體主要序列數據和實驗觀察到退化的情況，它已經很清楚，某些序列基元可能會有退化(亦即天門冬氨酸在 DD, DG, 及 DS 序列之異構化和天冬醯胺在 NG 序列之去醯胺化)。如果這種退化的“熱點”出現在抗體的 CDR (互補決定區)，則結合約束力和影響力可能會受到負面影響。對於含有熱點的分 子而言，化工壓力測試提供一種方法來評估這些圖案的降解敏感性，包含將抗體放在平台配方緩衝區和比較對照樣本在 40 °C 施壓兩個星期。如果觀察到退化，則主要序列可以重新設計，以消除熱點。

【0111】樣本在 40 °C 施壓兩個星期後，進行各種化驗分析，以評估那裡發生多少退化。進行影像毛細管等電聚焦（icIEF）分析，以研究荷電變種，而利用質譜驗證完整和減少之抗體質量，以及進行 LC-MS/MS 肽圖，以獲得特定點的退化資訊。

突變

【0112】rF1 pRK 原核質體進行一系列的定點突變，藉由具 FHV 5' -GGT GGC CAG CAT CAA CAG CGG CAA CAA CCC CTA CTA CG-3' (SEQ ID NO:22) 及 RHV 5' -CGT AGT AGG GGT TGT TGC CGC TGT TGA TGC TGG CCA CC-3' (SEQ ID NO:23) 之重鏈 CDR2 中的 N (AAC) 53S (AGC)，穩定 rF1 Mab。（突變位址畫底線標出）藉由奎克改變 II 定點工具包。突變體加以排序。

結果

【0113】抗體 rF1 的主要序列在輕鏈 CDR2：NNGNN (SEQ IDNO：24) 含一個潛在的天冬醯胺去醯胺位址。壓力測試顯示受壓樣品在 N53 增加去醯胺化（編號根據 Kabat 氏，1991 年）。執行定點突變，藉由 N (AAC, (SEQ ID NO:25)) 至 53S(AGC, (SEQ ID NO:26)) 替代重鏈 CDR2，以穩定 rF1Mab(單無性繁殖抗體)。突變體之排序證實 N53S 突變。

實施例 5

開發半胱氨酸變體在抗體藥物共軛體（ADC）的應用

【0114】使 rF1 pRK 原核質體進行一系列定點突變的方法包含藉由寡聚物 rF1pRK.LC(205/210)VCF (468075) 5' -GGG CCT GAG CTC GCC CTG CAC AAA GAG CTT CAA CAG-3' (SEQ ID NO:27) 及 F1pRK.LC(205/210)VCR (468076) 5' -CTG TTG AAG CTC TTT GTG CAG GGC GAG CTC AGG CCC-3' (SEQ ID NO:28)，（半胱氨酸突變畫底線標出）來產生輕鏈rF1硫代Mab之連接器，和 rF1pRK.HCN53S.A121CF (468464)

5' -CTG GTC ACA GTC TCG AGT TGC AGC ACC AAG GGC CCA TC-3'
(SEQ ID NO:29) 及 rF1pRK.HCN53S.A121CR (468465) 5' -GAT GGG CCC
TTG GTG CTG CAA CTC GAG ACT GTG ACC AG-3' (SEQ ID NO:30) (半胱
氨酸突變畫底線標出)，藉由Stratagene的定點方法，產生rF1 硫代Mab重鏈
之連接器完成之。輕鏈V205C與重鏈A114C均以變體的排序確認之(第8圖)。

【符號說明】

● 無

【生物材料寄存】

無

●

【序列表】

<110> 貝蒙特,提姆

卡肯柏斯, 馬克 約洛

布朗, 艾立克 J.

森崎, 約翰 弘

哈森柏斯, 伍特 L.W.

馬里亞沙森, 山吉

卡吉哈拉, 金百莉

席亞, 伊

<120> 革蘭氏陽性菌特異性結合的化合物

<130> 146392008243

<140> TW 099123405

<141> 2010-07-15

<150> US 61/225,878

<151> 2009-07-15

<150> EP 091655589

<151> 2009-07-15

<160> 66

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic construct

<220>
<223> CDR1 Heavy Chain

<400> 1
Arg Phe Ala Met Ser
1 5

<210> 2
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic construct

<220>
<223> CDR2 Heavy Chain

<400> 2
Ser Ile Asn Asn Gly Asn Asn Pro Tyr Tyr Ala Arg Ser Val Gln Tyr
1 5 10 15

<210> 3
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic construct

<220>
<223> CDR3 Heavy Chain

<400> 3
Asp His Pro Ser Ser Gly Trp Pro Thr Phe Asp Ser
1 5 10

<210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic construct

<220>
<223> CDR1 Light Chain

<400> 4
Arg Ala Ser Glu Asn Val Gly Asp Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic construct

<220>
<223> CDR2 Light Chain

<400> 5
Lys Thr Ser Ile Leu Glu Ser
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic construct

<220>
<223> CDR3 Light Chain

<220>
<221> VARIANT
<222> 4
<223> Xaa = M or I

<400> 6
Gln His Tyr Xaa Arg Phe Pro Tyr Thr
1 5

<210> 7
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic construct

<220>
<223> F1 Anitbody Variant Heavy Chain

<400> 7
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Arg Phe
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Ser Ile Asn Asn Gly Asn Asn Pro Tyr Tyr Ala Arg Ser Val Gln
50 55 60
Tyr Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Val Ser Gln Asn Thr Val Ser Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
85 90 95
Lys Asp His Pro Ser Ser Gly Trp Pro Thr Phe Asp Ser Trp Gly Pro
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 8
<211> 110
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<220>

<223> F1 Antibody Variant Light Chain

<220>

<221> VARIANT

<222> 92

<223> Xaa = M or I

<400> 8

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Leu Pro Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Val Gly Asp Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Lys Thr Ser Ile Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Xaa Arg Phe Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val
100 105 110

<210> 9

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<220>

<223> F1 Antibody Variant Heavy Chain

<400> 9

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Arg Phe
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Ser Ile Asn Asn Gly Asn Asn Pro Tyr Tyr Ala Arg Ser Val Gln
50 55 60
Tyr Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Val Ser Gln Asn Thr Val Ser Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
85 90 95
Lys Asp His Pro Ser Ser Gly Trp Pro Thr Phe Asp Ser Trp Gly Pro
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 10
<211> 109
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic construct

<220>
<223> F1 Antibody Variant Light Chain

<220>
<221> VARIANT
<222> 92
<223> Xaa = M or I

<400> 10
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Leu Pro Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Val Gly Asp Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Lys Thr Ser Ile Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80
Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Xaa Arg Phe Pro Tyr
 85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala
 100 105

<210> 11
<211> 110
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic construct

<220>
<223> F1 Antibody Variant Light Chain

<220>
<221> VARIANT
<222> 92
<223> Xaa = M or I

<400> 11
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Leu Pro Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Val Gly Asp Trp
 20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile
 35 40 45
Tyr Lys Thr Ser Ile Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Xaa Arg Phe Pro Tyr
 85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
 100 105 110

<210> 12
<211> 15

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic construct

<220>
<223> F1 Heavy Chain CDR1

<400> 12
cgctttgccca tgagc 15

<210> 13
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic construct

<220>
<223> F1 Heavy Chain CDR2

<400> 13
tcgatcaata atgggaataa cccatactac gcacggtcgg tacaatac 48

<210> 14
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic construct

<220>
<223> F1 Heavy Chain CDR3

<400> 14
gatcaccta gtagtggtg gccaccttt gactcc 36

<210> 15
<211> 33
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<220>

<223> F1 Light Chain CDR1

<400> 15

cgggccagtg aaaacgttgg tgactggtg gcc 33

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<220>

<223> F1 Light Chain CDR2

<400> 16

aagacatcta ttctagaaag t 21

<210> 17

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<220>

<223> F1 Light Chain CDR3

<400> 17

caacactata tacgtttccc gtacact 27

<210> 18

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic construct

<220>
<223> Primer

<400> 18
atggctgagg tgcagctggt ggagtctg 28

<210> 19
<211> 61
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic construct

<220>
<223> Primer

<400> 19
gaacacgctg gggcccttgg tgctggcact cgagactgtg accagggtgc caggtcccca 60
g 61

<210> 20
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic construct

<220>
<223> Primer

<400> 20
cggctcgacc gatatccagc tgacccagag 30

<210> 21
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>	
<223> Synthetic construct	
<220>	
<223> Primer	
<400> 21	
gatttcagc ttgtaccct ggccg	25
<210> 22	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic construct	
<220>	
<223> Primer	
<400> 22	
ggtggccagc atcaacagcg gcaacaaccc ctactacg	38
<210> 23	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic construct	
<220>	
<223> Primer	
<400> 23	
cgtagtaggg gttgttgccg ctgtgatgc tggccacc	38
<210> 24	
<211> 5	
<212> PRT	
<213> Artificial Sequence	

<223> Synthetic construct

<223> Part of CDR2 Heavy Chain to Show Amidation

<221> MOD_RES

<223> Amidation

Asn Asn Gly Asn Asn

1 5

 $\langle 211 \rangle$ 3

<213> Artificial Sequence

<223> Synthetic construct

<223> Codon for N

aac

3

 $\langle 211 \rangle_3$

<213> Artificial Sequence

<223> Synthetic construct

<223> Codon for S

<400> 26

agc	3
<210> 27	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic construct	
<220>	
<223> Oligo	
<400> 27	
gggcctgagc tcgccctgca caaagagctt caacag	36
<210> 28	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic construct	
<220>	
<223> Oligo	
<400> 28	
ctgttgaagc tctttgtgca gggcgagctc aggccc	36
<210> 29	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic construct	
<220>	
<223> Oligo	
<400> 29	
ctggtcacag tctcgagttg cagcaccaag ggcccatc	38

<210> 30
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic construct

<220>
<223> Oligo

<400> 30
gatgggccct tgggtgctgca actcgagact gtgaccag 38

<210> 31
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic construct

<220>
<223> Motif

<220>
<221> VARIANT
<222> 3
<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 31
Leu Pro Xaa Thr Gly
1 5

<210> 32
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic construct

<220>
<223> His-tagged SD insert

<400> 32
Ser Asp Ser Asp
1

<210> 33
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic construct

<220>
<223> His-tagged SD insert

<400> 33
Ser Asp Ser Asp Ser
1 5

<210> 34
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic construct

<220>
<223> His-tagged SD insert

<400> 34
Ser Asp Ser Asp Ser Asp
1 5

<210> 35
<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<220>

<223> F1 Heavy Chain

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(360)

<400> 35

gag gtg caa ctg ttg gag tgc ggg ggg ggc ttg gtg cag ccg ggg ggg 48
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ctt agc cgc ttt 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Arg Phe
20 25 30

gcc atg agc tgg gtc cgc cag gct cca gga agg gga ctg gaa tgg gtc 144
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

gca tgc atc aat aat ggg aat aac cca tac tac gca cgg tgc gta caa 192
Ala Ser Ile Asn Asn Gly Asn Asn Pro Tyr Tyr Ala Arg Ser Val Gln
50 55 60

tac cgc ttc acc gtc tcc cgg gac gtc tcc cag aac act gtg tct ctg 240
Tyr Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Val Ser Gln Asn Thr Val Ser Leu
65 70 75 80

cag atg aac aac ctg aga gcc gaa gac tgc gcc aca tat ttc tgt gct 288
Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
85 90 95

aaa gat cac cct agt agt ggc tgg ccc acc ttt gac tcc tgg ggc ccg 336
Lys Asp His Pro Ser Ser Gly Trp Pro Thr Phe Asp Ser Trp Gly Pro
100 105 110

gga acc ctg gtc acc gtc tcc tcg 360

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 36
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 36
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Arg Phe
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Ser Ile Asn Asn Gly Asn Asn Pro Tyr Tyr Ala Arg Ser Val Gln
50 55 60
Tyr Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Val Ser Gln Asn Thr Val Ser Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
85 90 95
Lys Asp His Pro Ser Ser Gly Trp Pro Thr Phe Asp Ser Trp Gly Pro
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 37
<211> 90
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic construct

<220>
<223> F1 Heavy Chain FW1

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(90)

<400> 37
gag gtg caa ctg ttg gag tcg ggg ggg ggc ttg gtg cag ccg ggg ggg 48
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ctt agc 90
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser
20 25 30

<210> 38
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 38
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser
20 25 30

<210> 39
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic construct

<220>
<223> F1 Heavy Chain FW2

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(42)

<400> 39
tgg gtc cgc cag gct cca gga agg gga ctg gaa tgg gtc gca 42
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val Ala
1 5 10

<210> 40
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 40
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val Ala
1 5 10

<210> 41
<211> 96
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic construct

<220>
<223> F1 Heavy Chain FW3

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(96)

<400> 41
cgc ttc acc gtc tcc cgg gac gtc tcc cag aac act gtg tct ctg cag 48
Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Val Ser Gln Asn Thr Val Ser Leu Gln
1 5 10 15

atg aac aac ctg aga gcc gaa gac tcg gcc aca tat ttc tgt gct aaa 96
Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Lys
20 25 30

<210> 42
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 42
Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Val Ser Gln Asn Thr Val Ser Leu Gln
1 5 10 15
Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Lys
20 25 30

<210> 43
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic construct

<220>
<223> F1 Heavy Chain FW4

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(33)

<400> 43
tgg ggc ccg gga acc ctg gtc acc gtc tcc tcg 33
Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 44
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 44

Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 45

<211> 330

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<220>

<223> F1 Light Chain

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(330)

<400> 45

gac atc cag ttg acc cag tct cct tcc gcc ctg cct gca tct gtg gga 48
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Leu Pro Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

gac aga gtc agc atc act tgt cgg gcc agt gaa aac gtt ggt gac tgg 96
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Val Gly Asp Trp
 20 25 30

ttg gcc tgg tat cgg cag aaa ccg ggg aaa gcc cct aat ctt ctc atc 144
Leu Ala Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile
 35 40 45

tat aag aca tct att cta gaa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc 192
Tyr Lys Thr Ser Ile Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

agt ggg tct ggg aca gaa ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

gat gat ttt gca act tat tac tgt caa cac tat ata cgt ttc ccg tac 288
Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Ile Arg Phe Pro Tyr
85 90 95

act ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc aaa cga act gtg 330
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val
100 105 110

<210> 46
<211> 110
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 46
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Leu Pro Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Val Gly Asp Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Lys Thr Ser Ile Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Ile Arg Phe Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val
100 105 110

<210> 47
<211> 69
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic construct

<220>
<223> F1 Light Chain FW1

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(69)

<400> 47
gac atc cag ttg acc cag tct cct tcc gcc ctg cct gca tct gtg gga 48
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Leu Pro Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

gac aga gtc agc atc act tgt 69
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys
20

<210> 48
<211> 23
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 48
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Leu Pro Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys
20

<210> 49
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic construct

<220>
<223> F1 Light Chain FW2

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(45)

<400> 49
tgg tat cgg cag aaa ccg ggg aaa gcc cct aat ctt ctc atc tat 45
Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 50
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 50
Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 51
<211> 96
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic construct

<220>
<223> F1 Light Chain FW3

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(96)

<400> 51
ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc agt ggg tct ggg aca gaa ttc act 48
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
1 5 10 15

ctc acc atc agc agc ctg cag cct gat gat ttt gca act tat tac tgt 96
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 52
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 52
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
1 5 10 15
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 53
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic construct

<220>
<223> F1 Light Chain FW4

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(39)

<400> 53
ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc aaa cga act gtg 39
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val
1 5 10

<210> 54
<211> 13
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 54

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val
1 5 10

<210> 55

<211> 230

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<220>

<223> rF1 Heavy Chain

<400> 55

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Arg Phe
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Ser Ile Asn Asn Gly Asn Asn Pro Tyr Tyr Ala Arg Ser Val Gln
50 55 60
Tyr Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Val Ser Gln Asn Thr Val Ser Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
85 90 95
Lys Asp His Pro Ser Ser Gly Trp Pro Thr Phe Asp Ser Trp Gly Pro
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220
Lys Thr His Thr Cys Pro
225 230

<210> 56
<211> 230
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic construct

<220>
<223> rF1 A114C

<400> 56
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Arg Phe
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Ser Ile Asn Ser Gly Asn Asn Pro Tyr Tyr Ala Arg Ser Val Gln
50 55 60
Tyr Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Val Ser Gln Asn Thr Val Ser Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
85 90 95
Lys Asp His Pro Ser Ser Gly Trp Pro Thr Phe Asp Ser Trp Gly Pro
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Cys Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

145 150 155 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
Lys Thr His Thr Cys Pro
225 230

<210> 57
<211> 213
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic construct

<220>
<223> rF1 Light Chain

<400> 57
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Leu Pro Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Val Gly Asp Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Lys Thr Ser Ile Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Met Arg Phe Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala Pro
100 105 110
Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125
Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190
 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205
 Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 58
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic construct

<220>
 <223> rF1 V205C

<400> 58
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Leu Pro Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Val Gly Asp Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Lys Thr Ser Ile Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Met Arg Phe Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Cys Thr Lys Ser
 195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 59
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 59

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
1 5 10

<210> 60
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic construct

<220>
<223> rF1 A114C

<400> 60

Ser Ile Asn Ser Gly Asn Asn Pro Tyr Tyr Ala Arg Ser Val Gln Tyr
1 5 10 15

<210> 61
<211> 30

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic construct

<220>
<223> rF1 Heavy Chain

<400> 61
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser
20 25 30

<210> 62
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic construct

<220>
<223> rF1 A114C

<400> 62
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Arg Phe
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Ser Ile Asn Ser Gly Asn Asn Pro Tyr Tyr Ala Arg Ser Val Gln
50 55 60
Tyr Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Val Ser Gln Asn Thr Val Ser Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
85 90 95
Lys Asp His Pro Ser Ser Gly Trp Pro Thr Phe Asp Ser Trp Gly Pro
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 63
<211> 110
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic construct

<220>
<223> rF1 Heavy Chain

<400> 63
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
100 105 110

<210> 64
<211> 104
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic construct

<220>
<223> rF1 Light Chain

<400> 64

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
 1 5 10 15
 Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
 20 25 30
 Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
 35 40 45
 Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 65 70 75 80
 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 85 90 95
 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100

<210> 65
 <211> 104
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic construct

<220>
 <223> rF1 Light Chain

<400> 65
 Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
 1 5 10 15
 Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
 20 25 30
 Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
 35 40 45
 Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 65 70 75 80
 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Cys Thr
 85 90 95
 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100

<210> 66
<211> 110
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic construct

<220>
<223> rF1 Heavy Chain

<400> 66
Cys Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
100 105 110



申請日: 99.7.15

201610153 【發明摘要】

IPC分類:

C12N 15/13 (2006.01)

C07K 14/46 (2006.01)

A61K 39/695 (2006.01)

【中文發明名稱】革蘭氏陽性菌特異性結合的化合物

【英文發明名稱】GRAM-POSITIVE BACTERIA SPECIFIC BINDING

A61P 31/04 (2006.01)

COMPOUNDS

【中文】

本發明提供具有結合約束力的改進化合物，其能夠特異性結合革蘭氏陽性菌。

結合約束力化合物完整的人源化，能應用於人類個體之治療。

【英文】

The present invention provides improved binding compounds capable of specifically binding Gram-positive bacteria. Binding compounds are provided that are fully human, enabling therapeutic applications in human individuals.

【指定代表圖】

圖5

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

【發明申請專利範圍】

【第1項】一種分離的抗體或其功能部件，其能結合絲氨酸-天冬氨酸（SD）依賴性的抗原決定基於葡萄球菌種表達的絲氨酸-天冬氨酸（SDR）的重複蛋白，其中抗體或其功能部件偶聯於細胞毒性劑，以形成抗體-藥物偶聯物。

【第2項】如請求項1所述之抗體或其功能部件，其中SDR蛋白位於的葡萄球菌種的細胞表面。

【第3項】如請求項1所述之抗體或其功能部件，其中SDR蛋白錨定到金黃色葡萄球菌種的肽聚醣細胞壁。

【第4項】如請求項1至3中任一項所述之抗體或其功能部件，其中抗原決定基進一步包括糖或糖殘基。

【第5項】如請求項1至4中任一項所述之抗體或其功能部件，其中細胞毒性劑是一種抗生素。

【第6項】如請求項1至5中任一項所述之抗體或其功能部件，其中抗體或其功能部件和下列抗體競爭與SD重複依賴性抗原決定基結合：

- (a) 重鏈CDR1序列RFAMS（SEQ ID NO：1），和
- (b) 重鏈CDR2序列SINNGNNPYYARSVQY（SEQ ID NO：2）或SINSGNNPYYARSVQY（SEQ ID NO：60），和
- (c) 重鏈CDR3序列DHPSSGWPTFDS（SEQ ID NO：3），和
- (d) 輕鏈CDR1序列RASENVGDWLA（SEQ ID NO：4），和
- (e) 輕鏈CDR2序列KTSILES（SEQ ID NO：5），和
- (f) 重鏈CDR3序列QHXYRFPYT（SEQ ID NO：6），其中X為I或M

【第7項】如請求項1至5中任一項所述之抗體或其功能部件，其中葡萄球菌屬係金黃色葡萄球菌。

【第8項】如請求項7所述之抗體或其功能部件，其中SDR蛋白係選自由ClfA (SdrA), ClfB (SdrB), SdrC, SdrD和SdrE所組成之群組。

【第9項】如請求項1至5中任一項所述之抗體或其功能部件，其中葡萄球菌種係表皮葡萄球菌。

【第10項】如請求項10所述之抗體或其功能部件，其中SDR蛋白係選自由SdrF、SdrG和SdrH所組成之群組。

【第11項】如請求項1至5中任一項所述之抗體或其功能部件，其中葡萄球菌種係腐生葡萄球菌。

【第12項】如請求項12所述之抗體或其功能部件，其中SDR蛋白係SdrI。

【第13項】如請求項1至5中任一項所述之抗體或其功能部件，其中葡萄球菌種係頭狀葡萄球菌。

【第14項】如請求項13所述之抗體或其功能部件，其中SDR蛋白係SdrX。

【第15項】如請求項1至5中任一項所述之抗體或其功能部件，其中葡萄球菌種係山羊葡萄球菌。

【第16項】如請求項1至5所述之抗體或其功能部件，其中SDR蛋白係選自由SdrY和SdrZ所組成之群組。

【第17項】如請求項1至5中任一項所述之抗體或其功能部件，其中該抗體或功能性部件結合至由金黃色葡萄球菌和/或表皮葡萄球菌之細胞壁裂解物。

【第18項】如請求項1至5中任一項所述之抗體或其功能部件，其中該抗體或功能性部分結合至選自由由金黃色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、山羊葡萄球菌、

腐生葡萄球菌、頭狀葡萄球菌、或耐甲氧西林金黃色葡萄球菌（MRSA）所組成之葡萄球菌屬。

【第19項】一種分離的抗體或其功能部件，其包含

（a）包含以下序列的重鏈可變域

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWV
ASINNGNNPYYARSVQYRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAK
DHPSSGWPTFDSWGPGLTVTVSS (SEQ ID NO:9), wherein the asparagine at
position 53 (numbering according to Kabat) is replaced by serine, and

其中在位置53的天冬醯胺（根據Kabat編號）被替換為絲氨酸，和

（b）包含以下序列的輕鏈可變域

DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYK
TSILESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQHYXRFPYTFGQGT
KVEIKRTV, 其中X 係I 或M (SEQ ID NO:11)。

【第20項】如請求項19所述之抗體或其功能部件，其中抗體還包含具有SEQ ID NO：66或SEQ ID NO：63序列的重鏈恆定域。

【第21項】如請求項19或 20所述之抗體或其功能部件，其中抗體還包含具有SEQ ID NO：65或SEQ ID NO：64序列的輕鏈恆定域。

【第22項】如請求項19至21中任一項所述之抗體或其功能部件，其中抗體或其功能部件共軛綴合至細胞毒性劑。

【第23項】如請求項22所述之抗體或其功能部件，其中細胞毒性劑係抗生素。

【第24項】一種如請求項19至23中任一項所述之抗體或其功能部件編碼之分離的、合成的或重組的核酸。

【第25項】一種分離的細胞，其包含如請求項24所述之核酸。

【第26項】一種用於體外生產抗體或其功能部件的方法，包括提供具有請求項24中所述之核酸的細胞，和使所述細胞轉錄核酸，從而產生如請求項19至23中任一項所述之抗體或其功能部件。

【第27項】一種藥物組成物，其包含如請求項1至23中任一項所述之抗體或其功能部件，和藥學上可接受的載體、稀釋劑或賦形劑。

【第28項】一種如請求項27所述之藥物組成物，其用於在治療或預防革蘭氏陽性菌相關疾病。

【第29項】一種如請求項27所述之藥物組成物在製備治療或預防革蘭氏陽性菌有關的病症之應用。

【第30項】一種如請求項1至23中任一項所述之抗體或其功能部件，或請求項24所述之核酸在葡萄球菌感染的診斷之應用。

【第31項】一種如請求項1至23中任一項所述之抗體或其功能部件在檢測樣品中的金黃色葡萄球菌和/或表皮葡萄球菌之應用，該樣品得自疑似金黃色葡萄球菌感染的個體或任何其他來源。

【第32項】一種藉由請求項1至23中任一項所述之抗體或其功能部件從溶液中分離金黃色葡萄球菌和/或表皮葡萄球菌的方法。

修正日期：104 年 12 月 14 日

115

120

<210> 63
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic construct

<220>
 <223> rF1 Heavy Chain

<400> 63
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 100 105 110

<210> 64
 <211> 104
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic construct

<220>
 <223> rF1 Light Chain

<400> 64

修正日期：104 年 12 月 14 日

【發明申請專利範圍】

【第1項】一種分離的抗體或其功能部件，其能結合絲氨酸-天冬氨酸（SD）依賴性的抗原決定基於葡萄球菌種表達的絲氨酸-天冬氨酸（SDR）的重複蛋白，其中抗體或其功能部件偶聯於細胞毒性劑，以形成抗體-藥物偶聯物。

【第2項】如請求項 1 所述之抗體或其功能部件，其中 SDR 蛋白位於的葡萄球菌種的細胞表面。

【第3項】如請求項 1 所述之抗體或其功能部件，其中 SDR 蛋白錨定到金黃色葡萄球菌種的肽聚醣細胞壁。

【第4項】如請求項 1 所述之抗體或其功能部件，其中抗原決定基進一步包括糖或糖殘基。

【第5項】如請求項 1 所述之抗體或其功能部件，其中細胞毒性劑是一種抗生素。

【第6項】如請求項 1 至 5 中任一項所述之抗體或其功能部件，其中抗體或其功能部件和下列抗體競爭與 SD 重複依賴性抗原決定基結合：

- (a) 重鏈 CDR1 序列 RFAMS (SEQ ID NO：1)，和
- (b) 重鏈 CDR2 序列 SINNGNNPYYARSVQY (SEQ ID NO：2) 或 SINSGNNPYYARSVQY (SEQ ID NO：60)，和
- (c) 重鏈 CDR3 序列 DHPSSGWPTFDS (SEQ ID NO：3)，和
- (d) 輕鏈 CDR1 序列 RASENVGDWLA (SEQ ID NO：4)，和
- (e) 輕鏈 CDR2 序列 KTSILES (SEQ ID NO：5)，和
- (f) 重鏈 CDR3 序列 QHYXRFPYT (SEQ ID NO：6)，其中 X 為 I 或 M

修正日期：104 年 12 月 14 日

【第7項】如請求項 1 至 5 中任一項所述之抗體或其功能部件，其中葡萄球菌屬係金黃色葡萄球菌。

【第8項】如請求項 7 所述之抗體或其功能部件，其中 SDR 蛋白係選自由 ClfA (SdrA), ClfB (SdrB), SdrC, SdrD 和 SdrE 所組成之群組。

【第9項】如請求項 1 至 5 中任一項所述之抗體或其功能部件，其中葡萄球菌種係表皮葡萄球菌。

【第10項】如請求項 9 所述之抗體或其功能部件，其中 SDR 蛋白係選自由 SdrF、SdrG 和 SdrH 所組成之群組。

【第11項】如請求項 1 至 5 中任一項所述之抗體或其功能部件，其中葡萄球菌種係腐生葡萄球菌。

【第12項】如請求項 11 所述之抗體或其功能部件，其中 SDR 蛋白係 SdrI。

【第13項】如請求項 1 至 5 中任一項所述之抗體或其功能部件，其中葡萄球菌種係頭狀葡萄球菌。

【第14項】如請求項 13 所述之抗體或其功能部件，其中 SDR 蛋白係 SdrX。

【第15項】如請求項 1 至 5 中任一項所述之抗體或其功能部件，其中葡萄球菌種係山羊葡萄球菌。

【第16項】如請求項 15 所述之抗體或其功能部件，其中 SDR 蛋白係選自由 SdrY 和 SdrZ 所組成之群組。

【第17項】如請求項 1 至 5 中任一項所述之抗體或其功能部件，其中該抗體或功能性部件結合至由金黃色葡萄球菌和/或表皮葡萄球菌之細胞壁裂解物。

修正日期：104 年 12 月 14 日

【第18項】 如請求項 1 至 5 中任一項所述之抗體或其功能部件，其中該抗體或功能性部分結合至選自由由金黃色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、山羊葡萄球菌、腐生葡萄球菌、頭狀葡萄球菌、或耐甲氧西林金黃色葡萄球菌（MRSA）所組成之葡萄球菌屬。

【第19項】 一種分離的抗體或其功能部件，其包含

(a) 包含以下序列的重鏈可變域

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWV
ASINNGNNPYYARSVQYRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAK
DHPSSGWPTFDSWGPGTLVTVSS (SEQ ID NO:9), wherein the asparagine at
position 53 (numbering according to Kabat) is replaced by serine, and

其中在位置 53 的天冬醯胺（根據 Kabat 編號）被替換為絲氨酸，和

(b) 包含以下序列的輕鏈可變域

DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYK
TSILESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQHYXRFPTYTFGQGT
KVEIKRTV, 其中 X 係 I 或 M (SEQ ID NO:11)。

【第20項】 一種分離的抗體或其功能部件，其包含

(a) 包含以下序列的重鏈可變域

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASI
NNGNNPYYARSVQYRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSS
GWPTFDSWGPGTLVTVSS (SEQ ID NO:9)，和

(b) 包含以下序列的輕鏈可變域

DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYK
TSILESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQHYXRFPTYTFGQGT
KVEIKRTV, 其中 X 係 I 或 M (SEQ ID NO:11)。

第 3 頁，共 5 頁(發明申請專利範圍)

修正日期：104 年 12 月 14 日

【第21項】如請求項 19 所述之抗體或其功能部件，其中抗體還包含具有 SEQ ID NO：66 序列的重鏈恆定域。

【第22項】如請求項 19 所述之抗體或其功能部件，其中抗體還包含具有 SEQ ID NO：65 序列的輕鏈恆定域。

【第23項】如請求項 19 至 22 中任一項所述之抗體或其功能部件，其中抗體或其功能部件共軛綴合至細胞毒性劑。

【第24項】如請求項 23 所述之抗體或其功能部件，其中細胞毒性劑係抗生素。

【第25項】一種如請求項 19 至 22 中任一項所述之抗體或其功能部件編碼之分離的、合成的或重組的核酸。

【第26項】一種分離的細胞，其包含如請求項 25 所述之核酸。

【第27項】一種用於體外生產抗體或其功能部件的方法，包括提供具有請求項 25 中所述之核酸的細胞，和使所述細胞轉錄核酸，從而產生如請求項 19 至 22 中任一項所述之抗體或其功能部件。

【第28項】一種藥物組成物，其包含如請求項 1 至 22 中任一項所述之抗體或其功能部件，和藥學上可接受的載體、稀釋劑或賦形劑。

【第29項】一種如請求項 28 所述之藥物組成物，其用於在治療或預防革蘭氏陽性菌相關疾病。

【第30項】一種如請求項 28 所述之藥物組成物在製備治療或預防革蘭氏陽性菌有關的病症之應用。

修正日期：104 年 12 月 14 日

【第31項】一種如請求項 1 至 22 中任一項所述之抗體或其功能部件，或請求項 25 所述之核酸在葡萄球菌感染的診斷之應用。

【第32項】一種如請求項 1 至 22 中任一項所述之抗體或其功能部件在檢測樣品中的金黃色葡萄球菌和/或表皮葡萄球菌之應用，該樣品得自疑似金黃色葡萄球菌感染的個體或任何其他來源。

【第33項】一種藉由請求項1至22中任一項所述之抗體或其功能部件從溶液中分離金黃色葡萄球菌和/或表皮葡萄球菌的方法。