

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 38/00 (2006.01)



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480021518.8

[43] 公开日 2006年9月6日

[11] 公开号 CN 1829525A

[22] 申请日 2004.5.26

[21] 申请号 200480021518.8

[30] 优先权

[32] 2003.6.2 [33] US [31] 10/452,593

[86] 国际申请 PCT/US2004/016557 2004.5.26

[87] 国际公布 WO2004/110362 英 2004.12.23

[85] 进入国家阶段日期 2006.1.25

[71] 申请人 阿莱克申药物公司

地址 美国康涅狄格州

[72] 发明人 K·S·鲍迪什 S·弗雷德里克松

M·A·维尔德 丸山俊昭

M·J·诺兰

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 林柏楠

权利要求书5页 说明书44页 附图28页

[54] 发明名称

用于生物防御的免疫疗法

[57] 摘要

本发明提供了人中和性抗体(全长或功能片段),其可用作传染物如炭疽、肉毒杆菌、天花、委内瑞拉马脑脊髓炎病毒(VEEV)、西尼罗病毒(WNV)等的抗毒素或抗感染物。

1. 治疗感染炭疽芽孢杆菌的动物的方法，其包括施用抗体或抗体片段，所述抗体或抗体片段对炭疽芽孢杆菌的保护性抗原具有至少 1×10^{-8} M 的结合亲和力并且能够阻断保护性抗原与由细胞受体、水肿因子和致死因子构成的组的一个或多个成员的结合。

2. 治疗感染炭疽芽孢杆菌的动物的方法，其包括施用抗体或抗体片段，所述抗体或抗体片段对涉及炭疽感染的分子具有至少 1×10^{-8} M 的结合亲和力并且能够阻断所述涉及炭疽感染的分子与由细胞受体、PA63、PA63 七聚体、PA83、水肿因子和致死因子构成的组的一个或多个成员的结合。

3. 治疗感染炭疽芽孢杆菌的动物的方法，其包括施用能够防止 EF 和/或 LF 与 PA63 七聚体结合的抗体或抗体片段。

4. 权利要求 1 的方法，其中所述抗体或抗体片段防止 PA63 形成七聚体。

5. 权利要求 1 的方法，其中所述抗体或抗体片段防止 PA63 与 EF 或 LF 结合。

6. 权利要求 1 的方法，其中所述抗体或抗体片段防止 EF 和/或 LF 与 PA63 七聚体结合。

7. 权利要求 1 的方法，其中所述抗体或抗体片段包含具有选自 SEQ ID NO.1-18 的序列的重链可变区。

8. 权利要求 1 的方法，其中所述抗体或抗体片段包含具有选自 SEQ ID NO. 19-26 的序列的轻链 κ 区。

9. 权利要求 1 的方法，其中所述抗体或抗体片段包含具有选自 SEQ ID NO. 27-38 的序列的轻链 λ 区。

10. 权利要求 1 的方法，其中所述抗体或抗体片段包含具有选自 SEQ ID NO. 39 -61 的序列的轻链 κ 区。

11. 权利要求 1 的方法，其中所述抗体或抗体片段包含具有选自 SEQ ID NO. 62-77 的序列的轻链 λ 区。

12. 权利要求 1 的方法，其中所述抗体或抗体片段包含具有选自 SEQ ID NO. 78-112 的序列的重链可变区。

13. 确定暴露于炭疽芽孢杆菌的方法，其包括：

从受试者获得体液或组织的试样；和

用抗体或抗体片段测定试样中由细胞受体、PA63、PA63 七聚体、PA83、水肿因子和致死因子构成的组的一种或多种分子的存在，其中所述抗体或抗体片段对所述分子具有结合亲和性，

其中样品中所述抗体或抗体片段升高的水平的存在与炭疽芽孢杆菌相关疾病的存在有关。

14. 权利要求 13 的方法，其中所述抗体或抗体片段包含具有选自 SEQ ID NO.1-18 的序列的重链可变区。

15. 权利要求 13 的方法，其中所述抗体或抗体片段包含具有选自 SEQ ID NO.19-26 的序列的轻链 κ 区。

16. 权利要求 13 的方法，其中所述抗体或抗体片段包含具有选自 SEQ ID NO.27-38 的序列的轻链 λ 区。

17. 权利要求 13 的方法，其中所述抗体或抗体片段包含具有选自 SEQ ID NO. 39-61 的序列的轻链 κ 区。

18. 权利要求 13 的方法，其中所述抗体或抗体片段包含具有选自 SEQ ID NO. 62-77 的序列的轻链 λ 区。

19. 权利要求 13 的方法，其中所述抗体或抗体片段包含具有选自 SEQ ID NO. 78-112 的序列的重链可变区。

20. 确定暴露于委内瑞拉马脑炎的方法，其包括：

从受试者获得体液或组织的试样；和

用抗体或抗体片段测定试样中涉及委内瑞拉马脑炎感染的一种或多种分子的存在，其中所述抗体或抗体片段对所述分子具有结合亲和性，

其中样品中所述抗体或抗体片段的升高的水平的存在与委内瑞拉马脑炎相关疾病的存在有关。

21. 权利要求 20 的方法，其中所述抗体或抗体片段包含选自 SEQ ID

NO. 113-115 的可变轻链区。

22. 权利要求 20 的方法，其中所述抗体或抗体片段包含选自 SEQ ID NO.116-118 的可变重链区。

23. 确定暴露于炭疽芽孢杆菌的方法，其包括：

从受试者获得体液或组织的试样；和

测定针对试样中由细胞受体、PA63、PA63 七聚体、PA83、水肿因子、致死因子构成的组的一种或多种分子的抗体的存在，其中用对所述抗体具有结合亲和性的二级抗体或抗体片段进行所述测定，

其中样品中所述二级抗体或抗体片段升高水平的存在与受试者中炭疽芽孢杆菌的存在有关。

24. 权利要求 23 的方法，其还包括将所述试样中抗体或抗体片的水平与对照抗体或抗体片段相关联，其中所述对照抗体或抗体片段包含具有选自 SEQ ID NO. 1-18 的序列的重链可变区。

25. 权利要求 23 的方法，其还包括将所述试样中抗体或抗体片的水平与对照抗体或抗体片段相关联，其中所述对照抗体或抗体片段包含具有选自 SEQ ID NO. 19-26 的序列的轻链 κ 区。

26. 权利要求 23 的方法，其还包括将所述试样中抗体或抗体片的水平与对照抗体或抗体片段相关联，其中所述对照抗体或抗体片段包含具有选自 SEQ ID NO. 27-38 的序列的轻链 λ 区。

27. 权利要求 23 的方法，其还包括将试样中抗体或抗体片的水平与对照抗体或抗体片段相关联，其中所述对照抗体或抗体片段包含具有选自 SEQ ID NO. 39-61 的序列的轻链 κ 区。

28. 权利要求 23 的方法，其还包括将所述试样中抗体或抗体片的水平与对照抗体或抗体片段相关联，其中所述对照抗体或抗体片段包含具有选自 SEQ ID NO. 62-77 的序列的轻链 λ 区。

29. 权利要求 23 的方法，其还包括将所述试样中抗体或抗体片的水平与对照抗体或抗体片段相关联，其中所述对照抗体或抗体片段包含具有选自 SEQ ID NO. 78-112 的序列的重链可变区。

30. 确定暴露于委内瑞拉马脑炎的方法，其包括：

从受试者获得体液或组织的试样；和

测定试样中抗委内瑞拉马脑脊髓炎病毒抗体的存在，其中用对所述抗体具有结合亲和性的二级抗体或抗体片段进行所述测定，

其中样品中所述二级抗体或抗体片段升高水平的存在与受试者中委内瑞拉马脑炎的存在相关。

31. 权利要求 30 的方法，其中所述抗体或抗体片段包含选自 SEQ ID NO.113-115 的可变轻链区。

32. 权利要求 30 的方法，其中所述抗体或抗体片段包含选自 SEQ ID NO.116-118 的可变重链区。

33. 确定暴露于炭疽芽孢杆菌的诊断试剂盒，所述试剂盒包含与涉及炭疽感染的由细胞受体、PA63、PA63 七聚体、PA83、水肿因子和致死因子构成的组的一种或多种分子特异反应的抗体。

34. 权利要求 33 的诊断试剂盒，其中所述抗体为单克隆抗体。

35. 权利要求 33 的方法，其中所述抗体或抗体片段包含具有选自 SEQ ID NO.1-18 的序列的重链可变区。

36. 权利要求 33 的方法，其中所述抗体或抗体片段包含具有选自 SEQ ID NO. 19-26 的序列的轻链 κ 区。

37. 权利要求 33 的方法，其中所述抗体或抗体片段包含具有选自 SEQ ID NO. 27-38 的序列的轻链 λ 区。

38. 权利要求 33 的方法，其中所述抗体或抗体片段包含具有选自 SEQ ID NO. 39-61 的序列的轻链 κ 区。

39. 权利要求 33 的方法，其中所述抗体或抗体片段包含具有选自 SEQ ID NO. 62-77 的序列的轻链 λ 区。

40. 权利要求 33 的方法，其中所述抗体或抗体片段包含具有选自 SEQ ID NO. 78-112 的序列的重链可变区。

41. 用于检测暴露于委内瑞拉马脑炎的诊断试剂盒，其包含与涉及委内瑞拉马脑炎感染的一种或多种分子特异反应的抗体。

42. 权利要求 41 的诊断试剂盒，其中所述抗体包含选自 SEQ ID NO. 113-115 的可变轻链区。

43. 权利要求 41 的试剂盒，其中所述抗体包含选自 SEQ ID NO. 116-118 的重链可变区。

44. 预防性治疗的方法，其包括对受试者施用包含存在于可药用载体中的 PA63 多聚体的组合物。

45. 权利要求 44 的方法，其中 PA63 多聚体包含多达 7 个 PA63 单位。

46. 权利要求 44 的方法，其中 PA63 多聚体包含 PA63 的七聚体。

47. 疫苗，其包含存在于可药用载体中的 PA63 多聚体。

48. 权利要求 47 的疫苗，其中 PA63 多聚体包含多达 7 个 PA63 单位。

49. 权利要求 47 的疫苗，其中 PA63 多聚体包含 PA63 的七聚体。

用于生物防御的免疫疗法

本申请是 2003 年 2 月 11 日提交的共同待决的美国专利申请序号 10/364,743 的部分继续申请, 美国专利申请序号 10/364,743 又要求分别在 2002 年 2 月 11 日、2002 年 4 月 29 日和 2002 年 11 月 25 日提交的美国临时申请序号 60/356,086、60/376,408 和 60/428,807 的优先权。

背景

技术领域

本公开涉及用作传染物相关的抗毒素或抗感染药的人中和抗体(全长或功能性片段), 其中所述的传染物为如炭疽、肉毒杆菌、天花、委内瑞拉马脑脊髓炎病毒(Venezuelan Equine Encephalomyelitis Virus)(VEEV)、西尼罗病毒(WNV)等等。

相关领域背景

美国最近的恐怖主义活动使我们高度关注预防和治疗炭疽感染的能力。虽然存在炭疽疫苗, 但是其由六次间隔接种组成, 需要每年加强, 并在大多数疫苗接种者中产生不良副作用。这使其不能广泛应用, 并且仍为大众接种的主要障碍。目前使用的炭疽疫苗由 Bioport (Lansing, MI) 通过从炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*)裂解物中纯化保护性抗原的方法生产。虽然缺失 LF 和 EF 的其他株系可用于产生此疫苗以及可使用高产量重组枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)菌株, 但是似乎仍然采用 Sterne 活疫苗株。可能是难于测试和比较此类其它疫苗和狭小的市场妨碍了实际的测试、批准和生产。目前疫苗的副作用、许多海湾战争综合症(Gulf War Syndrome)患者对其的记忆和面对恐怖分子威胁需要大规模接种的可能性表明现在需

要改进目前的疫苗。只要还没有合理的疫苗，对暴露的治疗仍然是对恐怖主义活动的主要反应。

美国最近污染信件的炭疽暴露都包括对抗生素敏感的炭疽菌株，但不幸地是许多人由于诊断延误而死亡。鉴于此，可预防疾病和死亡并允许抗生素治疗和/或适应性免疫发挥效果所需的额外时间的炭疽暴露治疗是有用的。

炭疽的主要死因是身体与细菌所产生的两种相关毒素的反应。它们都含有称为 PA63 的经加工蛋白质，其作为 PA83 与细胞受体结合，于是加工成 PA63。最近鉴定了人细胞上炭疽毒素的受体 ATR (炭疽毒素受体)。见 Bradley 等人, *Nature*, 414 卷, 2001 年 11 月 8 日。然后 PA63 形成能与 EF 蛋白质(水肿因子)或 LF 蛋白质(致死因子)结合的七聚体。七聚化 PA63 和结合的 EF 和/或 LF 的内体内化促进 EF 和 LF 毒素进入细胞。内体小泡的酸化使 PA 七聚体形成一个孔, EF 和/或 LF 可通过这个孔进入胞质溶胶, 在胞质溶胶中它们发挥毒性作用。三种成分(EF、LF 或 PA)都不能单独引起疾病。

多种证据表明可能防止受体结合 PA 或者阻断 EF 和 IF 与 PA 的相互作用。疫苗自身仅使用经纯化的 PA 部分产生保护性抗体。Little 等人(*Infect. Immun.* 65: 5171-5175(1997))对豚鼠被动施用 PA 抗体, 然后表现针对随后炭疽感染的保护-多克隆抗体具有 70% 的保护, 对于单克隆抗体, 豚鼠的死亡延迟两天。单链抗体片段(scFvs)也用于抑制 PA 对受体的结合。Cirino 等人(*Infect. Immun.* 67: 2957-2963 (1999))从幼稚人文库中鉴定了许多结合 PA83 的 scFvs。然后将它们用于基于细胞的测定法中, 其中 PA32(PA63 的截短形式)与 EGFP 融合并以类似 PA63 的方式由细胞摄入。然后 EGFP 的荧光可用于监测细胞摄入中这些 scFvs 对 PA32-EGFP 的作用。已鉴定出一种能防止细胞摄入 PA32-EGFP 的 scFv。Mourez 等人(*Nature Biotech.* 19: 958-961(2001))建立了针对炭疽毒素的多价肽抑制物, 其与 PA63 七聚体在 EF/LF 位点或附近结合。他们使用基于细胞的鉴定法证明此抑制物可保护细胞不受 PA/LF 毒性影响。他们也证明可用 10 倍最小致死量的 PA

和 LF 攻击大鼠并且当在攻击后 3-4 分钟引入抑制物时大鼠仍然受到保护。

这些数据都表明可能生产治疗性人组合抗体用于炭疽感染诊断延迟患者的抗生素联合治疗。

委内瑞拉马脑脊髓炎病毒(VEEV)为蚊传播的可传染给马和人宿主的甲病毒。而马群和驴群的感染可造成高死亡率，天然的人感染通常由发热、寒战、不适和剧烈头痛组成，只有 1-4%的人发展到严重的脑炎。然而由于 VEEV 较低的人感染剂量、生产简便和能气溶胶化的能力，它由 CDC 划分为“B 类”关键生物剂。使用已知具有强传染性并可通过嗅束容易直接进入中枢神经系统的 VEEV 形式，可以将气溶胶化 VEEV 用作有效生物武器。病毒一旦在中枢神经系统中复制，就有患脑炎的严重危险。不幸的是，VEEV 感染的治疗限于支持疗法。

已有针对 VEEV 的研究型疫苗，然而其应用仅限于有风险的实验室人员和军队。减毒活疫苗 TC-83 (FDA Investigational New Drug # 142)(Pittman 等人, *Vaccine* 14, 337-343 页(1996))已用于这两种情况中。此疫苗通过组织培养中毒性特立尼达(Trinidad)驴病毒的连续传代建立。TC-83 病毒在大多数人和马中引起 VEEV 特异中和性抗体。(Kinney 等人, *Virology* 170, 19-30(1989))。在实验动物中，疫苗能产生针对用毒性 VEEV 株皮下或经空气攻击的免疫(Phillpotts, *Vaccine* 17, 2429-2435 页(1999))。然而，高达 18%的人接种者不能从最初接种产生保护。此外，疫苗具有相对较高的反应原性率(25%)。一个最近的报告陈述 TC-83 不再适用于人(Phillpotts 等人, *Vaccine* 20, 1497-1504 页(2002))。对 TC-83 的关注促进开发了灭活疫苗 C-84。然而，C-84 在动物模型中不产生针对毒性病毒株气溶胶攻击的保护(Pittman 等人, *Vaccine*, 14, 337-343 页(1996))。结果，C-84 不用作实验室人员的主要免疫原而用作 TC-83 非应答者的后续疫苗或者用作加强剂量，其中它作为回忆抗原。因此急需抗 VEEV 疗法，如有效中和性抗 VEEV 抗体。

VEEV 为有包膜病毒，其中包膜和壳体结构由脂质双层分开并认为其通过 E2 糖蛋白的跨膜尾部相互作用。与辛德比斯病毒类似，VEEV 具有

以 E1/E2 异二聚体的三聚物组织的病毒体蛋白质刺突(Paredes 等人, *J. Virology*, 75, 9532- 9537 页(2001); Phinney 等人, *J Virology*, 74, 5667-5678 页(2000))。已用单克隆抗体研究 E1(gp50)和 E2(gp56)上可能涉及关键中和位点的表位(Mathews 和 Roehrig, *J. Immunology*, 2763- 2767 页(1982))。位点 E2^c存在于 E2 刺突的顶端并认为是中和性(N)表位。其他表位也表现中和活性并与 E2^c位点具有密切的结构关系。

认为 VEEV 感染的小鼠模型遵循根据与人类中相似的疾病致病机理。在病毒攻击前被动转移中和抗体已经有效地防止这些正常小鼠的死亡(见例如, Roehrig 和 Mathews, *Virology* (1985)142, 347-356 页; Phillpotts 等人, *Vaccine*(2002)20,1497-1504)。非中和抗体也在小鼠的腹膜内或静脉内病毒攻击中表现保护作用(Hunt 和 Roehrig, *Vaccine*(1995)13, 281-288 页; Hunt 等人, *Virology*(1991)185,281-290)。虽然还不知道病毒攻击的非中和抗体保护的机理,但是推测它们可能通过延迟病毒复制并从而允许宿主免疫系统有时间应答和控制病毒感染发挥作用(Hunt 等人, *Virology*(1991)185,281-290)。用于人的针对经空气传播暴露于 VEEV 的有效疗法可能需要更快的作用模式,如在暴露或者接近暴露的时候直接中和病毒。尤其要提到的是中和抗体能够防止 VEEV 扩散到大脑。在这方面,重要的是经空气传播的病毒攻击后最长 24 小时对小鼠施用中和抗体表现出保护作用(Phillpotts 等人, *Vaccine*, 20,1497-1504(2002))。

在这些研究和类似研究中描述的鼠抗体可能在预防和治疗人的感染 VEEV 中 useful。然而,啮齿动物抗体在人中具有高度的免疫原性并因此限制了它们的临床应用,当治疗中需要反复施用时尤其如此。称为抗体人源化的方法可用于通过用人抗体区域替换啮齿动物抗体大部分而努力保持最初抗原特异性来降低啮齿动物抗体的免疫原性。然而,此操作通常耗时又费用高昂并且不排除对人源化抗体的免疫原性反应的可能性。完全为人的并且靶定 VEEV 上中和表位的抗体为最希望的治疗候选抗体,因为它们具有有效阻断病毒感染的最佳机会并提供免疫原性的最小风险。

肉毒杆菌神经毒素为已知的最有效细菌毒素之一,其对人的 LD50 为

1 ng/kg。该毒素由细菌肉毒梭菌(*Clostridium botulinum*)以及几种其他梭菌种产生并已经识别了七种毒素血清型(A 到 G)。在分子水平上,该毒素以 150 kDa 的蛋白质产生,所述蛋白质通过暴露于蛋白酶被切割而产生两条保持结合的链:约 50 kDa 的轻链和约 100 kDa 的重链。重链含有负责与神经元细胞结合的结构域,而轻链含有进入神经元胞质溶胶的锌依赖性内切蛋白酶结构域。一旦进入,此内切蛋白酶通过突触蛋白质(包括小突触泡蛋白、突触融合蛋白和 SNAP-25)的蛋白酶切割执行其毒性作用。这些蛋白质的破坏抑制神经传递并造成渐进性麻痹和死亡。

研究表明针对肉毒杆菌神经毒素的抗体在被动和主动免疫模型中具有保护性。由血清型 A 到 E 组成的 PBT 疫苗目前由防御部和疾病控制中心(Department of Defense and the Centers for Disease Control)给有风险暴露于肉毒杆菌神经毒素的人使用。血清型 D 和 G 在天然人类感染中很少遇到,但是血清型 F 是常见的并且在 PBT 疫苗中不存在。然而不能忽略生物恐怖分子袭击中使用血清型 D 和 G 的可能性。对天然感染来说,多克隆抗体制品已经成功地用作免疫治疗剂,但是它们必需在感染早期使用以使进入神经元细胞的毒素降到最低。一些多克隆免疫球蛋白制品可以用作免疫治疗剂:马三价(A、B 和 E)制品、通过蛋白酶切割除去免疫球蛋白 Fc 部分的马七价制品和从 PBT 疫苗接种的供体获得的人免疫球蛋白制品(hBIG)。这两种马制品在治疗个体中都有超敏反应的困难。人制品具有好的耐受性和有效性,但是供应短缺并只对七种血清型中的五种有用。甚至对天然感染来说,迅速提供针对所有肉毒杆菌神经毒素血清型的完全人中和抗体是有用的。2001 年蓄意炭疽释放之后我们强烈意识到对生物恐怖主义的脆弱性使开发此类免疫治疗剂更加关键。

自从 1980 年 5 月宣布天花根除(Fenner 等人, 1998)和接种疫苗计划停止以来,接种者的免疫性减弱,并且 1980 年后出生的人未接种。全世界免疫性的不足极大地增加了故意释放天花病毒(天花的病原体)作为生物武器的威胁。天花病毒具有使其特别适于生物战的特点。所述病毒可通过呼吸途径或直接接触在人与人之间传播。因为它在气溶胶形式中相当的稳定性

并且感染剂量可非常小(Wherle 等人, 1970), 所以病毒的气溶胶释放可广泛传播。没有对这种疾病的特定治疗。也存在大量传染性病毒流失的威胁。苏联民用生物武器计划前代理主管 Alibek(Alibek, 1999)报告从 1980 年开始苏联政府启动了生物武器计划并发展了年产数吨在炮弹和弹道导弹中运输的天花病毒的方法。随着经济资助的减少和 1992 年苏联民用生物武器计划的中断, 有经验的科学家、设备和材料已经被转入其他国家。亚洲报告的传染病有 30%或更高的死亡率(Fenner 等人, 1998)。现在由于更高易感性和高度流动的人口, 该病毒可非常迅速而广泛地在国家和世界传播。

天花病毒为 DNA 病毒, 为痘病毒科(Poxviridae)家族正痘病毒属(成员 Fenner 等人, 1998), 其包括牛痘、猴痘病毒和具有血清学交叉反应的一些其他动物痘病毒。只有天花病毒可容易地在人与人之间传染(Breman 和 Henderson, 2002 综述)。DNA 序列分析显示天花和痘苗病毒紧密相关(Massung 等人, 1994)。认为天花病毒的感染剂量非常低, 只有几个病毒体(Wherle 等人, 1970)。它完全在感染细胞的胞质中转录和复制其基因组并组装子代病毒体(Moss, 1996 中综述)。产生四种感染形式: 胞内成熟病毒(IMV)、胞内包膜病毒(IEV)、细胞结合的包膜病毒(CEV)和胞外包膜病毒(EEV)(Moss 1996 中综述)。IMV 为保留在胞质中的主要形式。EEV 代表了感染颗粒的小部分但是就病毒在体外和体内远距离传播和扩散来说为生物相关形式(Payne, 1980; Smith 和 Vanderplasschen, 1998; Law 和 Smith, 2001)。已经表明针对 EEV 而非针对 IMV 的免疫反应是防止正痘病毒感染的保护所必需的(Appleyard 等人, 1971; Bouter, 1969; Boulter 和 Appleyard, 1973; Boulter 等人, 1971; Ichihashi 等人, 1971; Morgan, 1976; Payne, 1980; Payne 和 Kristensson, 1985; Turner 和 Squires, 1971)。报告六种基因编码 EEV 外被膜的 10 种蛋白质(Payne, 1978; Payne, 1979)。它们是 A33R(gp22-28)(Roper 等人, 1996)、A34R(gp22-24)(Duncan 和 Smith, 1992)、A36R(p45-50)(Parkinson 和 Smith, 1994)、A56R(gp86, 高度糖基化血凝素)(Payne 和 Norrby, 1976; Shida, 1986)、B5R(gp42)(Isaacs 等人, 1992; Englestad 等人, 1992)和 F12L 或 F13L(p37)(Hirt 等人, 1986; Blasco 和

Moss, 1991)。最近发现 CEV 和 EEV 颗粒不含 A36R 蛋白质(van Eijl 等人, 2000)。IMV 的包膜蛋白质为 A27L(p14)(Rodriguez 和 Esteban, 1985)、D8L(p32)(Maa 等人, 1990; Niles 和 Seto, 1988)、A17L(p21)(Rodriguez 等人, 1995)和 L1R(M25, 十四烷基化毒粒蛋白)(Franke 等人, 1990)。A27L、A17L、和 L1R 涉及 IMV 的融合和侵入(Ichihashi 和 Oie, 1996)。

从痘苗病毒加工的天花疫苗为曾经产生的第一种疫苗。目前的库存由生长于小牛皮肤上的活痘苗病毒组成。在美国, 储备物供应是受限制的; 只够接种 600-700 万人。如果发生爆发, 其他国家都没有覆盖其人口的足够剂量。与任何其他类型接种相比, 天花疫苗接种也与更多的不良反应相关, 这是根除之后结束接种的原因之一(Ober 等人, 2002)。现在世界卫生组织和美国疾病控制和预防中心(Centers for Disease Control and Prevention)推荐只在疑似病例中使用并且不用于大规模接种(Smallwood 等人, 2002)。痘苗病毒接种预防天花至少 5 年有效并可在更长时期内预防或减轻感染, 但是这在人与人之间变化很大。

通常认为中和抗体在正痘病毒免疫中发挥重要作用, 尤其在预防再感染和感染扩散中发挥重要作用。已经清楚地证明了牛痘免疫球蛋白(VIG)在预防感染或控制牛痘免疫接种的不良反应中的好处(Kempe, 1960, Kempe 等人, 1961, Hobday, 1962)。抗重组 B5R 蛋白质的多克隆抗血清抑制 EEV 感染(Galmiche 等人, 1999)。接种 B5R 蛋白质的小鼠在用痘苗病毒的致死攻击中受保护, 这可能受到中和抗体的介导。蛋白质 A33R 在主动和被动免疫接种中具有保护性而 A34R 和 A36R 没有所述保护性, 但是所述保护与抗体滴度无关并且在体外抗 A33R 抗体不中和 EEV。作者陈述所述保护可能涉及与简单抗体结合不同的机制(Galmiche 等人, 1999, Schmaljohn 等人, 1999)。针对位于 IMV 膜上的痘苗病毒三聚体 14 kDa 蛋白质(A27L,p14)的小鼠中和抗体的预防性和治疗性施用有效地控制小鼠中病毒的复制(Ramirez 等人, 2002)。含 L1R 和 A33R 基因的 DNA 接种用针对 L1R 和 A33R 的中和抗体保护小鼠抵抗致死病毒的攻击(Hooper 等人, 2000)。

如最近的出版物《Emerging Infectious Diseases》(Casadeval, 2002)中所述, 提供针对生物活性剂的直接免疫的仅有的对策为用抗体被动免疫。疫苗需要时间诱导保护性免疫并依赖于宿主进行免疫反应的能力, 而被动免疫接种可理论上给予保护而与宿主的免疫状态无关。低细胞毒性和高比活性为被动免疫接种比暴露后治疗的其他措施的优势之处。

具有良好血清中和活性的免疫供者的鉴定和从这样的供者的骨髓中构建组合抗体文库为分离大量针对病毒感染的高度特异中和抗体的合理途径(Burton 等人, 1991; Barbas 等人, 1992; Williamson 等人, 1993; Burioni 等人, 1994; Maruyama 等人, 1999; Maruyama 等人, 2002)。含中和表位的重组包膜蛋白文库的选择是直接的。与小鼠抗体不同, 人抗体为非免疫原性的并且一旦其功效在易感动物中得到完全表征, 它们就可安全地施用于患者。

希望鉴定中和可能用于生物战中类型传染物的抗体。如果这些生物防御抗体可来源于单个抗体文库也是有利的。

概述

使用噬菌体展示技术和来源于已接种疫苗和恢复期人的淋巴样细胞的信使 RNA, 可能根据本文所述的方法迅速鉴定几组与传染物抗原结合的抗体片段(Fabs)。可通过使用表面等离子体共振通过研究其结合动力学确定这些 Fabs 与抗原相互作用的强度。这些人的 Fabs 可通过亚克隆到含残余恒定区结构域的适当哺乳动物表达载体中容易地转变成全长 IgG。然后体外和在小动物模型体内病毒或毒素抑制研究中检测来源于这些组的 Fabs 或抗体可鉴定一亚组适于持续到临床前和临床检测的中和抗体。然后这些抗体可用作感染或暴露任何一种上面传染物的个体的治疗中的免疫治疗剂, 或者预防性用于预期有风险暴露的个体中。

这样, 在一方面, 描述了这样的抗体文库, 从中可鉴定、分离和大量产生抗体或其功能片段以中和或预防传染物的感染。

另一方面, 描述了在治疗炭疽感染中有效的异二聚体抗体。异二聚体

抗体选自抗体文库。文库优选地由经免疫的人源产生。异二聚体抗体结合并废除参与炭疽感染的分子(如炭疽保护抗原或者 EF 或 LF 蛋白质)的活性并从而通过干扰涉及毒素进入细胞的过程抑制毒素活性。这些过程包括但不限于下列过程: PA83 与受体结合, PA83 加工成 PA63, PA63 相互作用形成前孔(pre-pore)复合体, EF 或 LF 与前孔结合, 前孔构象变化允许 EF 或 LF 的膜易位, 或者 EF 或 LF 通过孔易位。干扰为这样的以致减慢或消除体内与细胞摄入这些蛋白质相关的毒素效果。在尤其优选的实施方案中, 异二聚体抗体对参与炭疽感染的分子具有至少 1×10^{-8} M 的亲合力。在另一个实施方案中, 这些抗体可用作诊断试剂。

另一方面, 描述了中和肉毒杆菌的抗体或抗体的功能片段。

另一方面, 描述了中和天花病毒(天花)/痘苗病毒的抗体或抗体的功能片段。

另一方面, 描述了中和委内瑞拉马脑脊髓炎病毒(VEEV)的抗体或抗体的功能片段。

另一方面, 描述了中和西尼罗病毒(WNV)的抗体或抗体的功能片段。

另一方面, 描述了中和登革病毒的抗体或抗体的功能片段。

另一方面, 描述了预防性施用抗体或抗体的功能片段以预防传染物感染的方法。

另一方面, 描述了施用抗体或抗体的功能片段以治疗传染物感染的方法。

另一方面, 描述了具有以亚化学计量中和传染物的 Fab 成分的抗体。

还在另一方面, 描述了含有 PA63 多聚体的疫苗和使用此种疫苗的方法。

另一方面, 对根据本公开的传染物具有亲合力的抗体或抗体片段用于检测传染物存在(直接检测或通过检测传染物释放的毒素)的测定法中以诊断传染物相关疾病的存在。

另一方面, 对针对根据本公开的传染物的抗体具有亲和力的抗体或抗体片段用作测定法中的对照抗体, 所述测定法用于检测响应暴露于传染物

的抗体的存在。此类测定法可用于检测对传染物的暴露和诊断传染物相关疾病。

另一方面，描述了用于诊断传染物相关疾病的试剂盒。

附图简述

图 1 为概括根据本公开的优选的实施方案，适于用作文库建立的组织来源的个体的暴露史表格。

图 2 显示了骨髓和供血者对炭疽 PA83 抗原的滴度。

图 3 显示了对 PA63 和 PA83 阳性反应的 VH 的序列分析。

图 4 显示了对 PA63 和 PA83 阳性反应的 VK 的序列分析。

图 5 显示了对 PA63 和 PA83 阳性反应的 VL 的序列分析。

图 6 显示了针对炭疽蛋白质 PA83 和 PA63 的抗体的变体人 κ 轻链的序列。

图 7 显示了针对炭疽蛋白质 PA83 和 PA63 的抗体的变体人 λ 轻链的序列。

图 8A-8C 显示了针对炭疽蛋白质 PA83 和 PA63 的抗体的变体人重链的氨基酸序列。

图 9 显示了纯化的 Fabs 对炭疽毒素活性的中和作用。

图 10 显示了七次连续稀释 Fabs 的保护作用百分比(与仅毒素相比)。

图 11 显示了蛋白质印迹，表明根据本文所述方法产生的 Fabs 能够与 PA63 和/或 PA83 上线性表位。看来似乎所有 5 种检测的抗 PA83 Fabs 都与 PA83 上的线性表位结合，而相反地抗 PA63 抗体不结合变性 PA63，并且看起来有点模糊，可能非特异结合 PA83。

图 12 显示了所选 Fabs 对 PA83 和 PA63 的 ELISA(酶联免疫吸附测定)滴定。切割 PA63 显著地改变了 FML8E 和 F9L6R2 的结合，但是 FMK7C 与两种形式都同等结合。F951L631D 仅与 PA63 结合。所观察到的最大结合为 FMK7C 的 1/4，表明只有 PA63 材料的一部分为 F951L631D 可与之相互作用的形式。

图 13 显示了检测的结果，其中 Fab FML8E 的组氨酸标记形式用于与其他未标记的 Fab 竞争以评估表位特异性。

图 14 显示了 1 $\mu\text{g/ml}$ 的所选 Fabs 对 200 纳克/孔的 PA63 和 PA83 的 ELISA 滴定。

图 15 显示了两种 Fabs(63L1D 和 83K7C)与 LF 竞争结合 PA63。

图 16 显示了两种抗 PA83 Fabs(83K7C 和 83L8E)与小鼠单克隆抗体 14B7 竞争。

图 17 显示了确定 PA 与细胞结合后所选 Fabs 是否可中和毒素影响的测定法的结果。

图 18 显示了在体内检测 Fabs 83K7C 和 63L1 D 抗重组毒素攻击的结果。

图 19 显示了 VEEV 的固定化 TC-83 抗原的血清反应性。

图 20A 到 20D 显示了从四个文库(951K、951L、1037K 和 1037L)中筛选与 VEEV 的固定化 TC-83 结合的 Fab 克隆的结果。

图 21 显示了纯化的人 Fabs 对 VEEV 的固定化 TC-83 抗原的直接滴定。

图 22 显示了针对鼠 Fab mHy4 (3B4C-4)的人 Fabs 竞争结合 VEEV 的固定化 TC-83 抗原或 BSA 。

图 23A 和 23B 显示了根据本公开产生的中和 VEEV 的完全人 Fabs 的序列。

优选实施方案详述

根据本公开的人抗体可为完整抗体或抗体片段。抗体可为异二聚体或单链抗体。术语“异二聚体”是指抗体或抗体片段的轻链和重链如天然存在的抗体一样通过二硫键互相结合。单链抗体具有通过接头序列连接的抗体轻链和重链可变区。

目前的人抗体通过筛选抗体文库鉴定。产生和筛选抗体文库的技术为本领域技术人员能力范围内。见 Rader 和 Barbas, 《Phage Display, A

Laboratory Manual》 Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 纽约(2000), Lerner 等人的美国专利号 6,291,161 和共同待决的 WO 03/025202 和美国临时申请号 60/323,400,其公开在此全部引用作为参考。

通常,根据本公开产生抗体文库的第一步包括从个体收集产生针对一种或多种传染物或传染物抗原的抗体的细胞。一般地,此类个体已经暴露于传染物和/或传染物的抗原。在尤其有用的实施方案中,个体暴露于就生物战而言战略上重要的多种传染物或来自传染物的抗原。此类材料包括选自炭疽、炭疽抗原、肉毒杆菌、肉毒杆菌抗原、天花、天花抗原、委内瑞拉马脑脊髓炎病毒(VEEV)、VEEV 抗原、登革病毒、登革病毒抗原、伤寒、伤寒抗原、黄热病、黄热病抗原、肝炎、肝炎抗原、西尼罗病毒(WNV)、WNV 抗原和引起严重急性呼吸器官综合症(SARS)的病毒的媒介物(agent)。图 1 为概括根据本公开优选的实施方案适于用于制备抗体文库的个体的暴露史。感染或免疫接种后 7 天从个体收集产生或含有抗体的组织细胞。合适的组织包括血液和骨髓。

细胞一经收集就用本领域技术人员已知的技术从中分离 RNA 和制备组合抗体文库。通常,制备组合抗体文库的技术包括用经分离的抗体 RNA 扩增编码抗体或其部分(如轻链和/或重链)的靶序列。这样,例如从天然种类不同的抗体 mRNA 样品开始可产生第一链 cDNA 以提供模板。然后可使用常规 PCR 或其他扩增技术产生文库。

筛选抗体文库可用任何已知技术(如对所希望的病毒抗原淘选)完成。见 Rader 和 Barbas,《Phage Display, A Laboratory Manual》, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 纽约(2000)。某些抗原已经得到克隆并可重组产生以用作免疫原。中和能力可在测定抗体阻断病毒与细胞受体结合能力的细胞测定法中评价。一旦鉴定了在体外具有中和能力的抗体,就可在动物模型中体内检测所述抗体。

这种方式鉴定的抗体有利地提供对传染物感染的有效治疗。因为本抗体为完全人抗体,所以它们是安全并易于耐受的。此外,可给予多次剂量

而不迅速增加抗独特型反应。在使用全长抗体的情况中，较高的亲合力和较大的大小(与单链抗体相比)为优选的，因为它们在患者的体系中提供了更长的滞留期。

用于产生根据本公开的抗体文库以及鉴定和表征根据本公开的抗体的尤其有用的方法如下：

文库：

含 λ 或 κ 轻链和 IgG 重链片段(Fd)的三个 Fab 文库来源于免疫接种多种传染物的现役军人供者的两个骨髓样品(951 和 1037, 1 个血液样品(MD3)，见图 1)的每一个。

文库可经历针对多种传染物的选择和筛选，所述传染物为例如炭疽、委内瑞拉马脑炎和肉毒杆菌、西尼罗病毒、痘苗病毒和登革病毒。

文库产生：

用 Tri-reagent BD(Molecular Research Center, Inc.)根据制造商的说明书从骨髓和血液样品中获得总 RNA。用 Oligotex (Qiagen)旋转柱按照制造商的说明书获得信使 RNA。用美国申请号 10/251,085(其公开在此全部引用作为参考)中所述的方法用质粒载体构建表达抗体 Fab 片段(与 IgG 重链片段(Fd)复合的 κ 或 λ 轻链)的噬菌体文库。每一供体产生两种 Fab 文库，一种表达 κ 轻链，一种表达 λ 轻链，并且都使用 γ 重链。

文库选择：

来自所有所用文库的具有 Fabs 的噬菌体通过 1-4 轮的对所选病毒抗原和毒素的富集进行淘选。通过在 4°C 在几个 Immulon 2 HB 微量滴定孔中孵育 50 μ l 溶液 A 中的足量重组抗原(通常为 1-2 μ g)过夜进行淘选。溶液 A 为磷酸缓冲盐溶液(PBS)，pH 7.4，含 0.08%经煮沸的酪蛋白溶液(BC)。BC 为含 0.5%酪蛋白、0.01%硫柳汞和 0.005% 酚红的 PBS。去除抗原溶液之后，孔用 250 μ l 含 1% Tween 20 的 BC 在 37°C 封闭 1 小时。将噬菌体原液稀释到由 BC 与 0.025% Tween 20 组成的溶液 D 中，每孔中加入 50 μ l 并于 37°C 孵育 2 小时。孔用含 0.05% Tween 20 的 PBS 洗 10 次，然后用 pH 5.0、4.0 和 3.0 的逐渐更酸的系列缓冲液(Tris 缓冲盐溶液

(50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl)各洗 1 次, 每次 2 分钟(D'Mello 等人, *J Immunological Meth* 247: 191-203(2001))。最终洗脱是用 0.1 M 甘氨酸-HCl 缓冲液, pH 2.2, 1 mg/ml 牛血清白蛋白(BSA)。洗脱液用 2M Tris 碱中和并加到对数期 ER2738 细胞中。通过向受感染细菌中加入辅助噬菌体(VCSM13 株)产生噬菌体。通过用噬菌体原液感染易感细菌和平皿培养产生单个克隆。

用含 Fab 的上清液进行筛选, 其中所述 Fab 为与噬菌体基因 III 部分的融合蛋白质。筛选之后, 在产生用于检测的 Fab 前, 对阳性候选物测序并亚克隆测序以除去基因 III。备选地, 可亚克隆每一淘选文库的 DNA 以除去基因 III 融合区域, 并可引入组合表位标记, 其由流行性感胃血凝素表位标记(HA)(Chen 等人, *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 6508-12(1993))和 6 个组氨酸(His tag)组成, 用于随后通过抗 HA 和 Ni-NTA 的检测和纯化中。

文库筛选:

为进行筛选, 与所选抗原反应的 Fab 构建体通过在 ELISA 测定中鉴定它们结合的能力来鉴定。在 Immulon 微量滴定板中过夜孵育含 100-250 纳克/孔重组抗原的溶液 A 并如上所述封闭。筛选可用 Q-pix 仪器挑选 1150 个菌落以高通量进行, 并用 Tecan 机器人进行 ELISA。单个菌落在深孔微量滴定板中置于 Hi-Gro 高速培养箱摇床中生长过夜。取出等份试样并用 15% 甘油或 10% DMSO 保存作为原种。深孔板离心之后, 来源于这些原种的含 Fab 的上清液在用特异抗原包被的孔中孵育并单独在用对照抗原(如酪蛋白和卵清蛋白)包被的孔中孵育。用碱性磷酸酶标记的山羊抗人 F(ab')₂ 抗体(Pierce)检测与抗原结合的 Fab。通过自动化染料终止子测序(Retrogen, San Diego)以 96 孔形式跨轻链和重链用这些载体的贮存引物(stock primer)对来源于阳性候选物的小量制备 DNA(Qiagen)测序。用 DNASTAR 软件分析序列以鉴定和分类唯一的候选物。从这些数据中确定一组所用每一种重组抗原的唯一变体结合物(variant binder)并分类成几组紧密相关的序列。

从组中产生和纯化 Fabs

Fab 的纯化

为进行可溶性 Fab 表达和纯化，通过亚克隆从单一阳性候选物除去基因 III 区域。在这点上也可能插入编码组合表位标记的寡核苷酸，其中所述表位标记由流感病毒血凝素(HA)标记(Chen 等人, Proc Natl Acad Sci USA 90: 6508-12(1993))和 6 个组氨酸(His tag)组成，用于用抗 HA 和/或 Ni-NTA 检测和纯化。

使用镍-NTA 柱层析(Qiagen)以纯化足量的 Fab 用于更高通量形式的基于 ELISA 的测定法和体外中和检测。在这种情况下，经亚克隆(筛选之前或之后)包括组氨酸标记的 Fabs 在 1 升 SB 中生长到 OD₆₀₀ 为 0.8 并在 30°C 用 1 mM 异丙基-β-D-硫代半乳糖吡喃糖苷(IPTG)诱导 3-4 小时以产生最适量的 Fab。为从周质空间分离 Fab，细胞沉淀重悬浮于加入 Complete Mini (Roche)蛋白酶抑制剂的冷 1×PBS 中并用 Sonics Vibra-cell VC750 超声处理。然后沉淀细胞碎片，上清液用于 Qiagen Ni-NTA 柱。用 16 个这样的柱子，在初次检测中获得 75μg Fab/候选物。以单个 96 孔形式，每一 Fab 用一排 12 列可纯化 8 种 Fab，提供了用于最初 PRNT 和 ELISA 测定法的足量材料。表位特异性检测也需要未标记的 Fab。这些 Fabs 可如上所述以 96 孔形式在由 G 蛋白或 A 蛋白(Pharmacia)结合的山羊抗人 F(ab')₂(Pierce)的柱子上纯化。可通过快速蛋白质液相层析(FPLC)(Pharmacia)在抗人 F(ab')₂ 柱或镍柱上纯化更大体积的任何所希望的 Fabs。此方法通常产生每升大约 150-1000 μg 的纯化 Fab，但是这在 Fab 与 Fab 之间会不同。

经纯化的 Fabs 的表征

抗原滴定

在 ELISA 测定法中对抗原滴定经纯化的 Fabs 以比较通过测序建立的相关组中 Fabs 的抗原结合特性。

测定表位特异性的测定法

可通过 ELISA 三明治测定法或竞争测定法测定表位特异性。可进行与基因 III 或标记融合的 Fab(融合 Fab, 与噬菌体相连或不相连)和经纯化的缺少基因 III 或标记的 Fab 间的竞争以评价表位特异性。以 4 μ g/ml 溶于 PBS 的 50 μ l 抗原在微量滴定孔中 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。PBS 洗过之后, 孔用含溶于 PBS 的 1% Tween 20 的 BC 室温封闭 30 分钟。加入含一种经纯化的 Fab 的 50 μ l PBS 稀释液后封闭孔并允许在 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。其中加入含融合形式的第二种 Fab 的 50 μ l 上清液并继续于 37 $^{\circ}$ C 再孵育 1 小时。用辣根过氧化物酶缀合的抗 M13 抗体(Pharmacia)检测第二种 Fab。孔用 Sigma 的 HRP 底物缓冲液, 使用溶于柠檬酸缓冲液(pH 5.0)的 2,2'-连氮基-二(3-乙基苯噻唑啉-6-磺酸)片剂显影。为在此测定法中使用带有 HA/His 标记的 Fab, 上面用于检测的抗 M13 抗体由碱性磷酸酶标记的抗 HA 或标记的抗 His 抗体替代, 用 PNPP 测定法检测。

产生和纯化来自鉴定为中和的 Fab 的 IgG

使用本领域技术人员已知的技术检测 Fabs 中和个体疾病的能力。

将 Fabs 转变成全长 IgG 和产生稳定细胞系

Fabs 以两步方法亚克隆到产生全长 IgG 重链的哺乳动物表达载体中。此载体使用谷氨酰胺合成酶基因作为选择标记, 允许转染细胞在无谷氨酰胺的培养基中生长(Bebbington 等人, *Biotechnology* 10: 69-75.1992)。载体用标准方法通过电穿孔转染进入 NSO 小鼠骨髓瘤细胞系。在无谷氨酰胺培养基中选择稳定的细胞系并将其通过有限稀释分离。也可用此载体在 NSO 或 CHO-K1 细胞中进行混合转染以在选择稳定细胞系前检查较小量的 IgG。从每一克隆系制备的 DNA 通过限制酶切消化分析以确定载体化免疫球蛋白的成功插入。用来自每一克隆系的培养基的蛋白质印迹分析评价全长 IgG 的产量, 通过用适当抗体捕获轻链和检测重链进行定量 ELISA 装配(assembly)测定。

为纯化 IgG, 表达 IgG 候选物的瞬时感染细胞或稳定细胞系在 miniPerm 生物反应器(Vivascience)或空心纤维生物反应器中生长。上清

液用 G 蛋白或 A 蛋白柱通过 FPLC 纯化。其他的纯化可用疏水相互作用柱完成。

IgG 的体外和体内检测

从 Fabs 衍生的 IgG 可在下面所述个体疾病特异的测定法中在体外和体内检测。

上面的技术成功地用于炭疽和 VEEV 的病例中。相同的文库和/或从其他人供者建立的文库可对登革病毒、WNV 和痘苗病毒淘选。可使用将 Fabs 转变成完整 IgG 和 IgG 纯化的相同技术。

本抗体或抗体片段可与其他抗体如人的或人源化单克隆抗体(或其部分)联合或附着使用。这些其他抗体可为催化抗体和/或与其他标记(表位)反应,其中所述其他标记(表位)为所述抗体针对的疾病特有的,或者所述其他抗体可以具有不同的特异性。所述抗体(或其部分)可作为单独施用的组合物或者单一组合物施用,在单一组合物中两种活性剂通过常规化学或分子生物学方法连接。此外,可通过用产生可检测信号(体外或体内)的标签或用具有治疗特性的标签标记抗体增强抗体的诊断和治疗价值。

根据此公开的抗体和/或其片段可用于多种体外和体内免疫测定法中,用以检测受试者中传染物的存在或检测受试者对暴露于传染物反应产生的抗体的存在。适当的免疫测定法包括例如固相和液相放射免疫测定法、荧光连接的测定法或酶联免疫吸附测定法或基于荧光共振能量转移(FRET)技术的测定法。

在一个实施方案中,可使用 ELISA 测定法检测针对患者液体中毒素的人抗体的存在。在典型的测定法程序中,将与传染物相关的抗原,如抗原 PA83 (List Laboratories)置于溶液中,结合到 Immolon 2 HB 板 (VWR)上,并允许孵育过夜,优选地在大约 4°C 孵育过夜。然后洗涤孔并通过与适当 PBS 衍生溶液和 Tween 20 的混合物孵育大约 1 小时封闭。洗涤孔并允许与患者样品(例如血液、血清、胸膜灌洗液)直接或作为稀释系列在大约 37°C 孵育约 1-约 2 小时。作为阳性对照和为进行定量,一些

孔用根据本公开产生的针对传染物的抗体孵育。洗涤孔然后在大约 37°C 与二级抗体孵育约 1-约 2 个小时，二级抗体可为碱性磷酸酶标记的山羊抗人 F(ab')₂。再次洗涤孔然后使用商业购买的工具和 ELISA 读出器检测。

此测定法的变通方案包括传染物相关的抗原(如 PA83 抗原)与其他固相支持体(如浸渍片和小珠)结合，使用其他二级抗体(如山羊抗人 IgG)鉴定，使用备选标记(如用 Turbo TMB-ELISA 试剂盒(Pierce)检测的过氧化物酶)检测。

在另一个实施方案中，针对传染物相关抗原(如 PA83)的两种抗体用于检测和定量样品中抗原的量。一级抗体与固体底物(例如微量滴定板、小珠或浸渍片)结合。例如根据本公开产生的抗体可置于溶液中并在微量滴定孔中于 4°C 孵育过夜。然后洗涤孔并通过与适当 PBS 衍生溶液和 Tween 20 的混合物孵育 1 小时封闭。洗涤孔并允许其与患者样品(例如血液、血清、胸膜灌洗液)直接或或作为稀释系列在大约 37°C 孵育约 1-约 2 个小时。也包括使用抗原稀释系列的标准曲线。然后洗涤孔并与结合抗原上非竞争性表位的二级抗炭疽抗体于大约 37°C 孵育约 1-约 2 个小时。二级抗体用碱性磷酸酶标记。洗涤孔然后用商业购买的工具和 ELISA 读出器检测。

此测定法的变通方案包括一级抗体与其他固相支持体的结合，使用商业测定法中所用的不同浓度的抗体和结合条件和稳定支持物/抗体结合的方法，用备选溶液封闭或洗涤，使用二级抗体上的不同标记或备选检测系统，或者使用未标记的二级抗体然后用三级标记抗体检测未标记的二级抗体。也包括这样的变通方案，其中只有一级或二级抗体为人抗体，另一种为另一实体或另一动物来源的抗体。

在另一个实施方案中，免疫测定法使用至少一种抗传染物单克隆抗体和至少一种经标记的分析物，其可为三明治免疫测定法中的标记抗体或标记肽，优选地为抗传染物抗体，最优选地为多克隆抗体，其中所述的三明治免疫测定法包括：

- a) 用抗传染物多克隆抗体包被固相;
- b) 向包被固相中加入检测样品并孵育两者;
- c) 洗涤固相;
- d) 加入标记的抗传染物抗体并孵育所述抗体;
- e) 洗涤固相;
- f) 检测标记活性以确定传染物的存在。

标记的抗体可能具有与固相上抗体或传染物的结合特异性。洗涤溶液通常为缓冲溶液，但是可为水或可含有其他成分。

检测样品为从动物身体获得的体液或组织，优选地为血浆，但也可使用其他体液如血清、全血、尿、脑脊液和滑液。标记可为本领域技术人员已知的酶，如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、萤光素酶和 β -半乳糖苷酶。非酶标记的例子包括荧光标记，如氟代异硫氰酸盐、罗丹明或萤光素、用于放射免疫测定法中的放射性同位素和颗粒。

在另一个实施方案中，用荧光共振能量转移(FRET)技术进行免疫测定法。作为其中一个例子，针对传染物抗原的抗体用一种生色团标记而针对同一抗原上另一表位的另一种抗体用备选生色团标记。这些抗体中的一种或两种可根据本公开产生。选择生色团以便当非常靠近(如与相同的抗原结合)时，它们相互作用以产生荧光信号。这样当存在传染物的适当抗原时，患者样品稀释液中加入这两种抗体就会产生可检测的荧光信号。

体外检测传染物的其他方法包括例如但不限于竞争性抑制测定法、一步测定法和凝集测定法。

样品中水平升高的抗体或抗体片段的存在与受试者中传染物的存在和由此引起的疾病相关。在测定法用于测定针对传染物的抗体的情况中，针对传染物抗体的二级抗体或抗体片段升高的水平与受试者传染物的存在和由此引起的疾病相关。

本公开包括用于测定样品中传染物或其抗体的诊断检测试剂盒，其包含至少一种抗传染物单克隆抗体。此外，诊断试剂盒可含有缓冲液、标记的多克隆或单克隆抗传染物抗体、抗原或肽和试剂盒使用必需的附属品。

另一方面，本公开提供了针对炭疽病毒感染的预防性治疗的疫苗。这些疫苗包括可药用载体中的 PA63 的多聚体。PA63 多聚体可含有多达 12 个 PA63 单位。从而多聚体可为二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体、七聚体、八聚体等。在尤其有用的实施方案中，PA63 的多聚体含有 7 个 PA63 单位，PA63 的七聚体为优选的。可在暴露于炭疽病毒前将疫苗预防性施用于受试者。

本文中本发明抗体或抗体片段一般可以包含药物载体的组合物施用于患者。药物载体可为适于向患者递送单克隆抗体的任意相容的、无毒物质。载体中可包括无菌水、醇、脂肪、蜡和惰性固体。可药用佐剂(缓冲剂、分散剂)可掺入药物组合物中。应理解组合物可含有完整抗体和抗体片段。

抗体和/或片段组合物可以多种方式施用于患者。优选地，药物组合物可肠胃外施用，如皮下、肌内、硬膜外或静脉内施用。这样，肠胃外施用的组合物可包括溶于可接受载体，优选水性载体中的抗体、抗体片段或其混合物。可使用多种水性载体，例如水、缓冲的水、0.4%盐水、0.3%的甘氨酸等等。这些溶液是无菌的并且通常不含颗粒物质。这些组合物可通过常规熟知的灭菌技术灭菌。组合物可含有接近生理条件所需要的可药用辅助物质，如 pH 调节和缓冲剂、毒性调节剂等，例如醋酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、乳酸钠等。这些制剂中抗体或抗体片段的浓度可在很大程度上变化，例如从按重量计低于约 0.5%，通常为或至少约 1%到按重量计 15% 或 20%并根据所选的特定施用方式主要基于液体体积、粘性等选择。

制备可肠胃外施用组合物的实际方法和施用于受试者所必需的调整为本领域技术人员已知或显而易见的并在 Remington's Pharmaceutical Science, 第 17 版, Mack Publishing Company, Easton, Pa(1985)中更详细地描述，其在此引用作为参考。

实施例 1-炭疽

由从针对炭疽接种的现役军人供者的血液和骨髓分离的信使 RNA 产生噬菌体文库。从军医志愿供者中收集血液样品，在收集前一周这些供者

接受其 AVA 炭疽疫苗加强。此外，商业来源提供编号的骨髓与匹配血清和现役军人的一些免疫接种记录。骨髓供者中的几个和全部血液供者都具有炭疽抗原 PA83 滴度(图 2)。具有针对 PA83(951) 的最优滴度的骨髓供者在血液收集前三周免疫接种炭疽。

用 Tri-reagent BD(Molecular Research Center, Inc.)根据制造商的说明书从骨髓样品 951 和 1037 以及血液样品 MD3 获得总 RNA。用 Oligotex(Qiagen)旋转柱按照制造商的说明书获得信使 RNA。表达抗体 Fab 片段(与重链可变区和第一个恒定区复合的 κ 或 λ 轻链)的噬菌体文库通过美国临时申请号 60/287,355 和 60/323,455 中所述的专利方法在质粒 AX243h 载体中构建，所述临时申请的公开在此全部引用作为参考。每一供者产生两个 Fab 文库，一个表达 κ 轻链，一个表达 λ 轻链并且都利用 γ 重链。通过四轮针对 PA83 的富集从 6 个文库中淘选具有 Fab 的噬菌体。951 文库也分别通过四轮对 PA63 的富集淘选分离，其中所述的 PA63 如 Miller 等人(Miller 等人, 1999)所述从 PA83 产生。为除去结合与 PA83 共有的 PA63 位点的噬菌体，首先允许可溶的 PA83 以 20 $\mu\text{g/ml}$ 与噬菌体在 37°C 结合 1 小时，之后混合物与结合于微量滴定板孔中的 PA63 孵育。

重组 PA83 抗原从 Fort Detrick 的 USAMRIID 获得并用于 ELISA 测定中以从军队鉴定具有对 PA83 抗原最高滴度的炭疽疫苗接种个体。从这些个体的骨髓或血液分离 RNA，使用限制酶切消化/嵌套式寡核苷酸延伸反应/单引物扩增(RED/NOER/SPA)从此 RNA 获得组合 Fab 文库。见图 2。

三个最高滴度个体的 RNA 用于使用扩增的 RED/NOER/SPA 方法构建文库。两个文库(951 和 1037)来源于从 Poietics(Menlo Park, CA)接受的骨髓供者。第三个文库 MD3 来源于接种志愿者的血液。下面表 1 显示了文库连接的效率：

表 1

文库	轻链	重链
951 κ	5.7×10^9	2.17×10^9
951 λ	2.6×10^9	1.86×10^9

1037 κ	3.07×10^9	3.29×10^9
1037 λ	4.52×10^9	1.07×10^9
MD3 κ	6.65×10^8	2.6×10^8
MD3λ	8.7×10^8	4.2×10^8

所用文库对 PA83 淘选, 951 文库对 PA63 淘选。对 PA83 来说, 抗原与孔结合并在加入产生具有展示 Fab 片段的噬菌体之前封闭。对 PA63 来说, 在与结合孔的 PA63 抗原反应之前展示噬菌体最初与 PA83 混合, 以减少与 PA83 和 PA63 共有抗原反应的噬菌体的回收。根据 Miller 等人 (1999) 所述的方法从 PA83 产生和纯化 PA63。下表显示了淘选两个文库和对 PA63 淘选的结果。

最初用 951 和 MD3 文库对 PA83, 用 951 文库对 PA63 进行淘选。除了最初文库转化入 XL1-Blue 外, 还使用 ER2738 细胞。下表中显示了两个淘选循环的输入、输出和一些最初 ELISA 的结果。

表 2-针对 PA83 和 PA63 淘选

文库	轮	抗原	输入滴度 (总的)	输出滴度 (总的)	% ELISA 阳性
951 K	1	PA83	5.9×10^{10}	1.2×10^5	
	2	PA83	1.1×10^{10}	3.5×10^5	10%
	3	PA83	9.1×10^{10}	1.2×10^6	96%
	4	PA83	4.5×10^{10}	1.0×10^8	96%
951 K	1	PA63	3.9×10^{10}	1.9×10^5	
	2	PA63	5.0×10^9	9.6×10^5	
	3	PA63	5.0×10^{10}	7.6×10^4	
	4	PA63	2.5×10^{10}	1.5×10^5	15%
951 L	1	PA83	8.8×10^{10}	7.5×10^4	
	2	PA83	2.1×10^{10}	7.3×10^5	4%
	3	PA83	9.1×10^{10}	1.7×10^6	68%

	4	PA83	8.2×10^{10}	1.6×10^8	89%
951 L	1	PA63	5.9×10^{10}	2.3×10^5	
	2	PA63	5.6×10^9	8.6×10^5	
	3	PA63	5.4×10^{10}	4.8×10^4	
	4	PA63	3.3×10^{10}	1.5×10^5	15-30%
MD3 K	1	PA83	1.3×10^{11}	1.9×10^4	
	2	PA83	6.9×10^{10}	$>10^7$	47%
	3	PA83	3.9×10^{10}	3.5×10^7	70%
	4	PA83	9.3×10^{10}	1.1×10^8	75-89%
MD3 L	1	PA83	4.8×10^{10}	8.8×10^4	
	2	PA83	5.7×10^{10}	$>10^7$	21%
	3	PA83	4.5×10^{10}	8.3×10^7	40%
	4	PA83	5.0×10^{10}	1.7×10^8	40%

富集在所有 PA83 淘选的文库中都很明显。对 PA63 淘选的文库显示了一些具有对 PA83 非常弱反应性的候选物。当针对 PA63 检测时这些候选物为阳性。图 3-5 指出了阳性反应者的 VH 和 VK 或 VL 区域的序列分析。虽然特定序列占优势，但是显示了多样性。对用 PA83 预吸收的 PA63 淘选的 Fabs 似乎含有与对 PA83 淘选显著不同的序列组。

淘选之后，通过 ELISA 筛选所有四个 PA83 淘选文库的多次淘选循环的单个候选物的 PA83 反应性。为鉴定结合 Fab 片段的 PA63，首先对已经针对 PA63 淘选的 951 κ 和 λ 文库噬菌体筛选与 PA83 的结合，最初从筛选除去 PA83 结合物。然而，未发现很好地结合 PA83 的候选物，表明通过最初孵育噬菌体与可溶性 PA83 提供的竞争是有效的。两个抗 PA63 文库第四轮淘选中的小部分克隆用底物孵育数小时后表现非常弱的 ELISA 反应性。这些克隆针对 PA63 筛选，导致更强的信号。与 PA83 的弱反应性可能是由于与 PA83 的交叉反应性，或者可能反映了 PA83 制备物中的小量 PA63，其可能由纯化和储存期间 PA83 在弗林蛋白酶敏感位点(Klimpel 等人, 1992)的蛋白酶切割引起。

对选自六个不同淘选文库、具有强的 PA83 或 PA63 结合活性的 144 个以上个体候选物测序并鉴定一组所有变体候选物。这包括 31 个唯一 PA83 结合物和 6 个唯一 PA63 结合物。唯一 PA83 结合物中的 25 个都来源于可变重链(VH)基因座 3-30/3-30.5。在 PA63 结合物的重链中, 主要观察到两个相关序列。这些与 PA83 序列不同。因为单个突变可显著改变抗体的亲和力, 如果候选物与其他候选物相比在重链或轻链中具有一个氨基酸不同, 那么认为所述候选物是唯一的。

针对炭疽蛋白质 PA83 和 PA63 的其他抗体序列在图 6-8C 中提供。对图 6 中显示的人 κ 轻链可变序列而言, 前两个氨基酸 S(丝氨酸)和 R(精氨酸)来自克隆中使用的 Xba I(TCTAGA)位点。图中的氨基酸编号 3 与 Kabat 编号系统(Sequences of Proteins of Immunological Interest, Kabat 等人, 1991)中的人 κ 轻链的氨基酸编号 1 对应。大多数序列中指出的最后 4 个氨基酸(RTVA)与人 κ 轻链恒定区中 Kabat 编号系统编号为 108-111 的前 4 个氨基酸对应。所示的两个序列没有完全延伸到恒定区的起点。因为可变区包括长度多态性, 所以每一序列中的氨基酸实际编号可大于或小于 113(两个起始氨基酸加上 111)。对图 7 中显示的人 λ 轻链可变序列而言, 前两个氨基酸 S(丝氨酸)和 R(精氨酸)来自克隆中使用的 Xba I(TCTAGA)位点。图中氨基酸编号 3 与 Kabat 编号系统中人 λ 轻链的氨基酸编号 1 对应。每一序列中指出的最后一个氨基酸与 Kabat 编号系统中人 λ 轻链恒定区的氨基酸 155 对应。因为可变区包括长度多态性, 所以每个序列中氨基酸的实际编号可大于或小于 157。对图 8A-C 中显示的人 γ 重链可变序列而言, 前两个氨基酸 L(亮氨酸)和 E(谷氨酸)来自克隆中使用的 Xho I(CTCGAG)位点。图中氨基酸编号 3 与 Kabat 编号系统中人 γ 重链的氨基酸编号 1 对应。每一序列中指出的最后一个氨基酸与 Kabat 编号系统中人 γ 重链的恒定区的氨基酸 118 对应。因为可变区包括长度多态性, 所以每一序列中氨基酸的实际编号可大于 120。

用本文库进行针对 EF 和 LF 的淘选, 其中所述的 EF 和 IF 也少量存在于用于免疫军事人员的 AVA 疫苗中。可用其他文库进行针对 PA63 额外

的淘选。进行 Biacore 测定法以评价不同抗体的亲和力。进行竞争实验以鉴定共有相同表位结合特性的抗体组。评价候选物在细胞测定法中阻断 PA 与受体、EF 或 IF 结合的能力。然后用 PA、EF 和 IF 或实际的炭疽感染检测最优的候选物在动物模型中体内阻断毒性的能力。在一个或多个这些检测中，候选物任选地转变成全长人抗体。

为产生经纯化的 Fab 用于其他检测，该组候选物经历亚克隆步骤以从 Fab 片段的重链部分除去基因 III。然后使用山羊抗人 Fab 柱通过快速液相层析(FPLC)从 2-4 升的培养物中纯化 Fab。使用经纯化的 Fab 的中和测定法用小鼠巨噬细胞细胞系 J774A.1 按照 Little 等人(Little 等人, 1990)的方式进行。建立使用 Cytotox96 检测试剂盒(Promega)测定毒素作用反应中细胞死亡释放的乳酸脱氢酶(LDH)的条件。J774A.1 细胞以 14,000 个细胞/孔铺于 96 孔板中。为每一点测定 4-8 个孔。Fabs 以 50 nM 使用。如下产生毒素：以 400 ng/ml(4.6 nM)加入 PA83，以 40 ng/ml 加入 LF。37°C 孵育 4 小时之后，孔用显微镜检测，然后除去培养基并离心沉淀未贴壁细胞。

许多中和测定的结果概括于图 9 中。这些 Fabs 包括 F9L6R2(在此也称为 951 L6R2 和 83L6R)、FML5B(在此也称为 83L5B)、FMK9C(在此也称为 83K9C)、F9K3C(在此也称为 83K3C)、F9K2A(在此也称为 83K2A)、FML8E(在此也称为 83L8E)、FML8F(在此也称为 83L8F)、FML3B(在此也称为 83L3B)、FML2D(在此也称为 83L2D)、FML7D(在此也称为 83L7D)、F9K3H(在此也称为 83K3H)、FML4E(在此也称为 83L4E)、FML2E(在此也称为 83L2E)、F9K2H(在此也称为 83K2H)、F9K7H(在此也称为 83K7H)、FMK7C(在此也称为 83K7C)和 951L631D(在此也称为 63L1D)。正如所见到的，所检测的 17 种抗 PA Fabs(样品 e-u)中的 14 种能以高于 80% 的生活力中和炭疽毒素的影响。在此浓度和此时间段内 5 种 Fabs 完全中和。样品(a)和(b)为未加入毒素的 Fabs 中的两个；这表明细胞死亡不是在此时间内由经纯化的样品中的内毒素引起。样品(c)表明了仅毒素的影响。样品(d)含有无关 Fab，其不能明显保护细胞不受炭疽毒素的影响。

滴定所选 Fabs 以确定其体外 50%保护值(图 10)。连续稀释 Fabs 并在

含毒素的培养基中加入等份试样。在这些实验中，PA 终浓度为 400 ng/ml，LF 为 80 ng/ml。然后这些等分试样一式四份加入细胞中并 37°C 孵育 4 小时。通过视觉评价细胞毒性并如所述用 Cytotox96 测定法定量测量。在此显示的抗 PA83 Fabs 都具有与测定法中所用的等摩尔浓度的 PA83 接近的 50% 中和值。然而抗 PA63 Fab 951L631D 具有抗 PA83 Fabs 的约 1/5-1/7 的 50% 中和值；换言之，1 分子的 951L631D 中和许多分子的 PA83。切割 PA83 并通过本实验中的 J774A.1 细胞转变成七聚体孔。对 951L631D 能够中和亚化学计量的 PA83 的最可能的解释是它在七聚体孔水平作用，并一次有效中和多达 7 个 PA83 分子。

最近在体内检测了 951L631D 和 MK7C。接受溶于总体积 200 μ l PBS 的 40 μ g PA83 和 8 μ g LF 的两只大鼠在 60 和 71 分钟内死亡。接受相同量毒素和 310 μ g 951L631D 的两只大鼠存活 25 小时，其在此时间被处死。在大约 3-5 小时，这些大鼠表现疾病的一些症状，如昏睡和轻微喘气，但是 16 小时时这种现象在一只大鼠中消失而另一只仍然昏睡但具有正常呼吸。到 25 小时为止，与注射 PBS 的对照大鼠相比两只大鼠都表现正常。因此表明 951L631D 能保护大鼠免于体内炭疽中毒。在一只大鼠中以 300 μ g 毒素检测 MK7C，大鼠存活而没有表现任何症状。

检测从 9K2H(在此也称为 83K2H)、9L6R2(在此也称为 951 L6R2 和 83L6R)、MK7C(在此也称为 83K7C)、9K7H(在此也称为 83K7H)、ML8E(在此也称为 83L8E)和 951L631D(在此也称为 63L1 D)产生的 Fabs 与线性表位反应的能力。PA83 和 PA63 在变性(但是非还原)条件下于 SDS-PAGE 凝胶中泳动并通过蛋白质印迹转移到硝酸纤维素滤膜上。从含 PA63 或 PA83 的印迹上切下的条带与这些经纯化的抗体中的每一种以相同浓度杂交过夜。结合的抗体与缀合碱性磷酸酶的山羊抗人 F(ab')₂(Pierce)反应，结果显示于图 11 中。Fab 63L1D 不结合单体 PA63 或 PA83。此数据表明 Fab 63L1D 与构象表位结合。所有使用的抗 PA83 Fabs 在这些条件下与 PA83 结合良好，表明与线性表位的结合或与在蛋白质印迹转移条件中形成的表位结合。如以前观察到的，83K7C 与 PA83 和 PA63 一样良好地结合。

83L8E 和 83L6R 在蛋白质印迹中表现与 PA63 的一定程度的结合。这可能因为所用的 Fab 和抗原的量高, 或者因为 PA63 在蛋白质印迹中为单体, 而图 14 的 ELISA 中条件为这样的以致于 PA63 大部分是七聚体。

表明所有 5 种所检测的抗 PA83 Fabs 与 PA83 上的线性表位结合(图 12)。相反地, 抗 PA63 抗体不与变性的 PA63 结合, 并表现出微弱的可能非特异地结合 PA83。9K2H 和 9K7H 不表现与变性 PA63 的结合, 而 MK7C 和 ML8E 强烈地结合, 9L6R2 表现弱的结合。

这些 Fabs 的一些与 PA83 和 PA63 结合的能力通过以 ELISA 形式进行对抗原的滴定进一步定量分析。PA83 和 PA63 购于 List Laboratories 并按照说明书分别重悬于水中或 50%甘油中。下面的曲线图显示了四种针对 PA83 或 PA63 的 Fab 片段的滴定。实心符号代表对 PA83 的反应性, 空心符号代表对 PA63 的反应性。结果表明 Fab 63L1D 结合 PA63 而不结合 PA83, 这提示它仅与 PA83 转变成 PA63 后出现的表位结合。Fab 83K7C 在 ELISA 中与 PA63 和 PA83 都结合, 而最初在 PA83 上选择的两个其他 Fabs 与 PA83 相比与 PA63 的结合显著降低。应该注意到 Fab 63LD1 对 PA63 达到的饱和值仅为 Fab 83K7C 的四分之一。这些观察表明 Fab 63L1D 与 PA63 七聚化形成的构象表位结合。ELISA 中降低的结合是由于七聚体上用于结合的位点的更有限的数目, 反映了较少的 PA63 正确地七聚化和可用于结合。因为 PA83 同样好地结合, 所以可用的 PA63 的绝对量合理地相等。已知 LF 与七聚体形成的构象表位结合(Cunningham 等人, 2002; Mogridge 等, 2002); 虽然存在于七个位置, 但是 LF 仅能结合在三个上, 这是因为所结合的 LF 的空间位阻。

在图 13 中, 产生了 Fab FML8E 的组氨酸标记形式并用于与其他未标记 Fabs 竞争以评价表位特异性。Fabs F9K2H、F9K7H 和 FML8F 都相似地与 FML8E 的自竞争(self-competition)发生竞争, 表明这些 Fabs 识别相同的表位或识别与 FML8E 见到的非常接近的表位。F951 L6R2 竞争, 但不如前者良好, 提示此表位不同, 虽然其足够靠近以引起竞争。FMK7C 在竞争中非常无效, 提示其可能在较远位点结合。有趣的是, 如上面蛋白

质印迹图中所示,PA63的切割消除了 F9K2H 和 F9K7H 的结合,而 FML8E 和 F951 L6R2 在蛋白质印迹上的结合还是明显的,在上述 ELISA 滴定中也可在高浓度见到一些反应性。这提示结合 F9K2H/F9K7H 的表位与结合 FML8E/FML8F、F951L6R2 或 FMK7C 的不同。指示的 Fabs 1:4 连续稀释并于 37°C 与经 200 ng PA83 包被过夜的微量滴定孔结合 1 小时。然后不洗条件下以 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 加入组氨酸标记的 FML8E 并且允许反应 2 小时,之后洗板并与抗组氨酸缀合的碱性磷酸酶反应用于 PNPP 测定法。注意到 FML8E 和 FML8F 具有相似的重链但是不同的轻链。F9K2H 和 F9K7H 互相联系并使用与 FML8E 相同的重链种系基因座,但是具有与 ML8E 非常不同的 CDR 区域。F951L631D 和 FMK7C 来源于不同的重链种系基因座。

在 ELISA 中以 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度针对 200 纳克/孔的 PA63 或 PA83 评价其他抗 PA83 Fabs 与 PA63 结合的能力。使用 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度是因为这是图 12 中提出浓度,其中 83L8E 和 83L6R 的结合不存在或降低。如图 14 中所见,唯一略微结合 PA63 的抗 PA83 Fab 为 83K7C。

因为好像 Fab 63 L1D 可能以与 IF 类似的方式结合,所以进行实验以确定 Fab 63 L1D 在 ELISA 中是否可与 LF 竞争结合 PA63。为进行此鉴定法,PA63 以 200 纳克/孔与微量滴定孔结合。洗涤孔并封闭,如所示连续稀释 IF 并一式四份地在 37°C 孵育 2 小时。Fab 63L1D 和 83K7C 以 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的终浓度使用,这为稍微高于 ELISA 滴定法鉴定的每种 Fab 对 PA63 的 50%最大结合浓度的浓度。在孔中加入 Fabs 并允许竞争 15 分钟和 2 小时。结合的 Fab 用碱性磷酸酶标记的山羊抗人 Fab 和 PNPP 测定法检测。

此实验的结果显示于图 15 中。观察到 83K7C 在所有 LF 浓度下同样良好地结合,表明它不与 LF 竞争结合 PA63。15 分钟的 63L1D 结合显示出在较高浓度的 IF 下降低,表明它与 LF 竞争结合 PA63。当允许竞争继续进行两个小时时,更多的 63L1D 能结合,甚至在最高浓度的 LF 下结合。此数据表明 Fab 63L1D 可竞争掉 LF。

进行这样的竞争性 ELISA,其中小鼠单克隆抗体(14B7)与不同浓度的 Fab 83K7C 或 83L8E 混合然后允许与固定于微量滴定板上的 PA83 结合。

小鼠单克隆抗体 14B7 从 Stephen Leppla(Little 等人, 1988)获得。已证明此单克隆抗体结合 PA83 并阻断 PA83 与其细胞受体的结合(Little 等人, 1996)。结合的 14B7 用缀合碱性磷酸酶的山羊抗小鼠 IgG Fc 检测。图 16 表明 83K7C 而不是 83L8E 竞争结合 14B7。这样, Fab 83K7C 与相似的或重叠的表位结合并通过阻断受体结合作用。

使用 Biacore(Biosensor Tools, Salt Lake City, Utah)表面等离子体共振 (SPR)进行动力学分析以确定 Fab/毒素相互作用的动力学和结合参数。通过 Biacore 测量结合(k_a)和解离(k_d)速率常数; K_D 以(k_d/k_a)计算。括号中的数字代表最后有效数字的标准误。剩余标准差代表偏离该模型的每个数据点的 RU 的平均数。下面表 3 中给出的结果表明 63L1D 和 83K7C 以亚纳摩尔亲和力与固定化的 PA63 结合。

表 3

相互作用	$K_a(M^{-1}s^{-1})$	$K_d(s^{-1})$	K_D (nM)	剩余标准差
Fab 83K7C/PA83	$1.16(1)\times 10^5$	$4.26(1)\times 10^{-4}$	3.67	0.597
Fab 83K7C/PA63	$9.77(1)\times 10^4$	$8.50(5)\times 10^{-5}$	0.87	0.71
Fab 63L1D/PA83	nd	nd	nd	nd
Fab 63L1D/PA63	$1.50(4)\times 10^6$	$1.90(1)\times 10^{-4}$	0.13	0.519

Fab 63L1D 不结合 PA83, 所以未确定值。这与 ELISA 数据一致, 表明 Fab 与 PA63 七聚体或 PA83 切割之后暴露的表位结合。有意思的是, 83K7C 甚至比对 PA83 更紧密地结合 PA63, 这主要由于降低的脱离速率 (off rate)。

此公开首次证明可从 AVA 免疫接种的供者分离人抗炭疽毒素抗体, 其具有高亲和力并在体外有效中和。Little 等人(1990)鉴定了一组抗炭疽毒素致死因子的鼠单克隆抗体。体外与体内保护的评价提示除了稀有病例外, 体外保护的程度与体内保护相关。从 19 种检测的中和抗体中鉴定出 15 种, 其中一些以低浓度完全中和。因此预计这些抗体中的一些在体内具有保护

性。数据还提示 AVA 疫苗有效保护人抵抗炭疽暴露。

抗 PA83 和抗 PA63 活性联合具有体内治疗目的的可能性。抗 PA83 限制与细胞受体结合的 PA83 分子的数目。未受破坏并且形成七聚体孔的那些 PA83 分子将受到抗 PA63 活性中和，提供针对炭疽感染致死作用的有效保护。两种抗体的联合能在感染开始和感染过程期间提供针对新的功能孔结构形成的迅速保护。

这两种抗体的使用可为接种或未接种的人员提供额外的被动保护，其中所述人员可能暴露于可疑炭疽释放。面临疾病可以保护的治疗的可用性会减轻大众对炭疽的焦虑。此外，此种治疗剂可使故意释放炭疽的生物恐怖行动的成功机会减小，因此降低此类袭击的可能性。

体外实验

建立使用 Cytotox96 检测试剂盒(Promega)测定对毒素作用反应的细胞死亡释放的乳酸脱氢酶(LDH)的条件。小鼠巨噬细胞细胞系 J774A.1(Little 等人, 1990)以 14,000 个细胞/孔铺于 96 孔板上过夜。为每一点测定 4-8 个孔。如图中指示使用 Fabs。如下产生毒素：以 400 纳克/毫升(4.6 nM)加入 PA83，以 80 纳克/毫升加入 LF。在 37°C 孵育 4 小时后，用显微镜检测孔，然后除去培养基并离心沉淀未贴壁细胞。按照生产商的说明书进行培养基的 Cytotox96(Promega)测定法。

用连续稀释测定所选 Fabs 的体外中和活性，中和曲线在图 10 中给出。图 10 中显示的抗 PA83(包括 83K7C)都具有与测定中所用的 PA83 浓度(4.6 nM)接近等摩尔的 50% 中和值。然而抗 PA63 Fab 63L1D 具有为 PA83 Fabs 所获值的 1/3.5-1/6 的 50% 中和值，其中 PA83 Fabs 所获值为关于 PA83 的亚化学计量。这再次与 Fab 63L1D 与七聚体上发现的构象表位结合一致，因此能一次有效中和一个以上的 PA 分子。63L1D 和 83K7C 在较高浓度完全保护细胞免于细胞死亡，这是可再现的结果。

为进一步表征 Fabs 63L1D 与 83K7C 的结合，进行另外一个实验以确定在 PA 结合细胞后所选 Fabs 是否能中和毒素的效果。预计在 LF 与七聚

体结合前能发挥作用的那些 Fab 不能阻断活性。因此 PA83 以 400 纳克/毫升的浓度加入细胞并允许在 4℃ 孵育 2 小时, 之后洗细胞然后加入 80 纳克/毫升的 LF 和 50 nM 的 Fab。此测定法的结果显示于图 17 中。正如所看到的, Fab 63L1D 防止细胞死亡, 这和它与七聚体在可阻止 LF 结合的位点结合的结论一致。

动物药理学实验

动物操作经 Perry Scientific, Inc. 的动物关怀与应用委员会 (the Institutional Care and Use Committee) 批准, 实验在 Perry Scientific, Inc. 进行。如 Zell 等人 (1984) 所述以每 250 g 大鼠 40 μ g PA 和 8 μ g LF 注射 Fisher 344 大鼠, 只是使用尾部静脉。仅毒素用于阳性对照; 如其他组指示的使用毒素和不同数量的 Fab。对一或两只大鼠的初步试验表明 Fabs 83K7C 和 63L1D 具有保护作用后, 对这两种 Fabs 进行剂量反应研究。每组实验使用四只大鼠。阴性对照注射从用作载体的 Fab 透析得到的 PBS。7 天后处死存活的大鼠。

体内检测 Fabs 83K7C 和 63L1D 抗重组毒素攻击的结果显示于图 18 中。如所见到的, 83K7C 和 63L1D 具有不同方式的保护作用。83K7C 在 2 和 6 纳摩尔 (分别为 \sim 100 或 300 微克/大鼠) 完全保护, 在 0.6 纳摩尔具有最小但统计学上显著的症状和死亡延迟 ($p=0.0005$ 和 $p=0.038$, 双尾斯氏 t 检验)。63L1D 在 6 纳摩尔完全保护。在 2 纳摩尔, 63L1D 保护动物免于死亡但是动物在注射后约两小时十五分钟开始表现炭疽中毒症状 (呼吸模式改变)。症状保持最少一或两个小时, 最后消退并且动物存活。在 0.6 纳摩尔 (每只大鼠 \sim 30 微克), 63L1D 表现症状和死亡的基本延迟。这两种 Fabs 效应的差异与其作用方式有关。83K7C 在 ELISA 中同样良好地结合 PA83 和 PA63 并发挥作用防止毒素与细胞结合。如上所述, 七聚体在细胞表面形成之后 63L1D 与其结合。虽然 2 纳摩尔的 63L1D 似乎足够在炭疽毒素存在条件下保护大鼠 2 小时, 但是 Fab 比 LF 更迅速地从动物中清除。随着剩下 LF 进入细胞以前结合的 PA 上, 症状出现, 但是所产生的未中和

毒素的量不足以引起导致死亡的肺水肿和继发性休克。因为 Fab 的清除在某种情况下造成症状的出现,使用 63L1D 的全长 IgG 形式会在此浓度或更低浓度提供完全保护。在 0.6 纳摩尔, 63L1D 引起的症状和死亡的延迟大于 83K7C。此结果与体外结果平行,其中 63L1D 比抗 PA83 抗体片段更有效并且可在亚化学计量保护。

实施例 2-委内瑞拉马脑炎病毒 人抗 VEEV 抗体

用标准 ELISA 测定法针对 TC-83 抗原检测实施例 1 相关的上述供者血清(图 19)。供者 1037、811 和 951 对 TC-83 具有显著血清反应性。这表明从相应供者骨髓制备的抗体文库中获得抗 VEEV Fabs 具有很大可能性。为上述炭疽实例在前面构建了 1037 和 951 的 IgG- κ 和 IgG- λ 文库(总共 4 个文库)。然后这些噬菌体展示抗体文库通过对 TC-83 抗原的四轮淘选。下面显示了此实验的结果:

最初文库大小:

951K	5.7×10^9
951L	2.6×10^9
1037K	3.1×10^9
1037L	4.5×10^9

第一轮淘选:

	<u>输入</u>	<u>输出</u>
951K	5.6×10^{11}	6.0×10^4
951L	2.6×10^{11}	1.8×10^5
1037K	4.8×10^{11}	4.0×10^4
1037L	3.2×10^{11}	1.0×10^5

第二轮淘选:

	<u>输入</u>	<u>输出</u>
951K	1.2×10^{13}	1.2×10^7
951L	3.0×10^{13}	1.0×10^6

1037K	3.8×10^{13}	4.4×10^7
1037L	2.2×10^{13}	4.8×10^6

第三轮淘选:

	<u>输入</u>	<u>输出</u>
951K	5.0×10^{13}	3.1×10^8
951L	7.8×10^{13}	4.0×10^7
1037K	8.0×10^{13}	6.1×10^8
1037L	8.8×10^{13}	2.1×10^8

第四轮淘选:

	<u>输入</u>	<u>输出</u>
951K	1.0×10^{14}	8.0×10^9
951L	4.4×10^{13}	2.0×10^9
1037K	1.5×10^{14}	1.0×10^{10}
1037L	3.8×10^{13}	4.0×10^9

来自所有四个文库(951K、951L、1037K 和 1037L)的第三和第四轮淘选的一组 Fab 克隆用 Tecan 机器人平台以高通量形式通过 ELISA 筛选与固定化 TC-83 的结合。如图 20A-D 中见到的,在所有四个文库中获得了显著结合 TC-83 的 Fab(如用缓合碱性磷酸酶的抗人 Fab 检测)。筛选 Fab 克隆与阳性对照 Hy4-26A(3B4C-4 的人源化变体)和阴性对照抗破伤风类毒素 Fab 比较,其中所述的阳性对照和阴性对照分别为图 20 中每一图上倒数第二和倒数第一个样品。选择四个文库中每一个的具有最高 ELISA 信号的三种 Fabs 进一步分析。制备每一克隆的 DNA, 然后进行序列分析。测序结果表明所有三个 951K 克隆都相同。此外,12 个克隆中的 10 个具有相同的可变重链区域(VH)但是那些 Fabs 中的大多数具有不同的轻链序列。在 3 个独立的重链(HC)分型中总共有 10 个单一克隆。

选择 4 个人 Fab 克隆进一步分析。所选 Fabs 代表鉴定的全部 3 种不同 HC 类别。

<u>克隆</u>	<u>VH 分类</u> (一般化分组)	<u>LC</u>
P3F2	#1	K
P3F5	#2	K
P3H6	#3	K
P3G1	#1	λ

通过 FPLC 用抗人 F(ab')₂ 柱从细菌周质制备物纯化所有 Fabs。因为 P3H6 Fab 产量非常低,所以未进一步对其研究。

图 21 显示了滴定 ELISA 测定法中三种人抗 VEEV Fabs 对 TC-83 的

结合活性。也在竞争性 ELISA 实验中用 mHy4 Fab 作为竞争物检测了经纯化的抗 VEEV Fabs。此实验的结果显示于图 22 中并且表明三种 VEEV Fabs 不竞争与 mHy4 Fab 相同的表位(E2^c)。

人 Fabs 不竞争 E2^c表位,但是它们可结合 VEEV 上的其他中和表位。为检测这个现象,将每一种纯化的 VEEV Fab 的等份试样送到 CDC 的合作者用于基于细胞的 VEEV 中和测定。两个独立实验的结果显示与用阳性对照 3B4C-4 所见到的类似, P3F5 具有非常好的中和能力。P3G1 也表现显著的中和,而 P3F2 Fab 在中和测试中不具有明显的效果。

表 4

Fab/Ab	样品类型	交联的?	70% PRNT
3B4C-4mAb	阳性对照	无(已经是二价的)	25 ng/ml
TT	阴性对照	是	> 2500ng/ml
P3F2	测试	是	> 10,000ng/ml
P3F5	测试	是	19.5 ng/ml
P3F5	测试	否	<78 ng/ml
P3G1	测试	是	156 ng/ml
P3G1	测试	否	156 ng/ml

表 4 报告了 VEEV 的体外中和测定法的结果。报告了 Vero 细胞中 VEE 病毒斑减小 70% 所需的 Ab 或 Fab 的滴度。鼠 Ab 3B4C-4(作为完整 IgG)用作阳性对照。以前表明二价抗体更有效地中和病毒,因此在一些孔中加入抗 Fab 交联的 Ab(未优化浓度)。未结合的阴性对照 Fab 在任何检测的浓度下都不表现中和作用。样品 P3F5 在鼠 3B4C-4 的浓度附近表现活性。

这些初步结果证明完全人中和抗 VEEV 抗体得到分离。图 23A 和 23B 展示了根据本公开产生的中和 VEEV 的完全人 Fabs 的序列。这些现有的

人抗 VEEV Fabs 可如上所述转变成完整 IgG 并纯化用于进一步表征。

检测抗 VEEV 抗体的表位特异性(Roehrig 等人, *Virology*(1982)118, 269-278 页; Roehrig 和 Mathews, *Virology*(1985)142, 347-356 页)。

进行蛋白质印迹以观察哪一种 TC-83 病毒蛋白质为 Fabs 所识别。对蛋白质印迹不反应的 Fabs 来说, 因为识别构象表位而不是线性表位, 所以可从病毒裂解物中纯化天然 E1 和 E2 包膜糖蛋白用于如前所述的 ELISA 和放射标记的免疫沉淀测定法。

病毒蛋白质上活性表位的鉴定可用表 5 所列的每一结合群的代表性单克隆抗体通过竞争性 ELISA 作图。完整病毒包被的微量滴定孔与一定量典型 Ab 孵育, 所述量给予大约 80% 最大结合。孔中也含有增量的受试 Fab。用抗小鼠 IgG Fc 特异的碱性磷酸酶缀合物监视典型 Ab 与病毒的结合。结合的降低解释为受试人 Fab 的竞争结合, 表明表位特异性或空间排列。

表 5

代表性抗体	表位
5B4D-6	gp56 ^a
2A4B-12	gp56 ^b
3B4C-4	gp56 ^c
1A6C-3	gp56 ^d
1A3A-5	gp56 ^e
1A4D-1	gp56 ^f
1A3A-9	gp56 ^g
1A3B-7	gp56 ^h
3B2D-5	gp50 ^a
3B2A-9	gp50 ^b
5B6A-6	gp50 ^c

3A5B-1**gp50^d**

可对腹水 50%硫酸铵沉淀和 G 蛋白柱层析后获得代表性 Abs(John Roehrig, CDC, Ft. Collins, Colorado)。备选地, Abs 可从生长于无 Ig 培养基的它们的杂交瘤细胞系的条件培养基中纯化。

检测病毒株交叉反应性(Roehrig 等人, J. Clin. Microbiology (1997)35,1887-1890 页; Roehrig 等人, Virology(1982)118, 269-278 页)。

VEEV 由 6 种亚型组成(1-6), 其中亚型 1 具有五种变体(1AB、1C、1D、1E 和 1F)。如前所述通过 ELISA 和间接荧光抗体测定法(IFA)检测每一亚型的病毒株与每一候选 Fab 的反应性。在这些分析中有用的原型病毒列于下面表 6 中。

表 6

株	亚型
TC-83	1AB
Trinidad Donkey(TRD)	1AB
P676	1C
3880	1D
Mena 2	1E
78V-3531	1F
Everglades(Fe3-7c)	2
Mucambo(BeAn 8)	3
Pixuna(BeAr 35645)	4
Cabassou(CaAr 508)	5
Ag80-663	6

西方马脑炎(WEE)

(McMillan)

东方马脑炎(EEE)(82V-2137)

St. Louis 脑炎(SLE) (MSI-7)

在 the Division of Vector Borne Viral Diseases, Centers for Disease Control, Fort Collins, Colorado 保存的原种病毒可在 BHK21 细胞中生长。

用完整 IgG 进行体外中和检测

中和检测用 50-100PFU/检测以 Vero 细胞进行，如前所述记录 70% 终点(Roehrig 等人，1982)。

检测 Abs 保护小鼠不受病毒攻击的能力

通过尾静脉静脉内接种已知量的稀释于 PBS 的经纯化 IgG 到幼鼠，如 3 周龄的 NIH Swiss 小鼠中。24 小时后，小鼠用稀释于细胞培养基中的 VEEV 腹膜内攻击。对照静脉内接受 PBS 和病毒或病毒稀释物。另一对照组包括鼠 Ab 1A4A-1 或 3B4C-4，以前表明它们提供保护作用。观察小鼠 2 周。通过从眼后静脉丛取决从接种的小鼠得到肝素化血浆样品。

其他抗 VEEV Fabs 的分离

产生了针对 TC-83 抗原的扩大组的人 Fabs。进行来自 1037 和 951 文库的 > 1000 个单个 Fab 克隆的额外 ELISA 筛选，已经进行了所述文库对 TC-83 的淘选。这补充了来自那些淘选文库的 190 个 Fab 克隆的最初筛选。此外，从以前表明具有对 TC-83 的滴度的供者(811)的 RNA 构建了新的噬菌体展示抗体文库。新构建的 811 文库对固定的 TC-83 淘选。单一 Fabs 如上所述鉴定它们在体外提供中和作用和保护动物模型不受致死病毒攻击的能力。

实施例 3-肉毒杆菌

通过应用前述文库建立和淘选技术，分离结合许多不同肉毒杆菌毒素血清型的抗体并大量产生。象上述炭疽和 VEEV 的中和抗体一样，这些针对肉毒杆菌神经毒素的完全人抗体适于免疫预防或作为免疫治疗剂。

实施例 4-登革病毒

因为已经证明全长人中和抗体是安全的并且对于其他治疗目的具有很好的耐受性，所以它们尤其可用作合理的和天然的抗毒素或抗传染物。表明中和抗体(通过在动物中接种或对多种动物宿主被动施用产生)在某种情况下提供针对登革热的保护。然而，在人类中有可能通过接种加强登革热感染的迹象，并且报告针对特定登革热抗原的抗体可自己通过与凝血和整联蛋白/粘附素蛋白质的共同表位交叉反应引起出血(Falconar, 1997)。

从来自不同血清型登革病毒感染或接种的 8 个人类供者的血液或骨髓样品产生了 16 个抗体文库。从每一个供者产生两个文库，一个使用 κ 轻链，另一个使用 λ 轻链。8 个供者包括用四种血清型登革热的每一种单独感染或接种的 4 个供者，两个文库来源于感染多种登革热血清型的个体，两个文库来源于接受四价登革热疫苗的个体。16 个抗体文库用于对肝细胞、肝病毒和病毒裂解物以及重组登革热抗原(包括四种登革热血清型的包膜和 NS1 蛋白质)选择。

纯化鉴定的 Fab 抗体用于表征特异性、亲和力和与其他 Fabs 和抗体的竞争。

鉴定为中和的关键登革热抗体片段通过将编码区亚克隆到内部哺乳动物表达载体中转变成完整人 IgG1。将含完整 IgG 编码序列的质粒转染到哺乳动物细胞中允许产生大量 IgG 用于表征和被动免疫治疗。

实施例 5-西尼罗病毒

通过应用前述文库产生和淘选技术，分离并大量产生与许多不同西尼罗病毒株结合的抗体。象上述炭疽和 VEEV 的中和抗体一样，这些针对西

尼罗病毒的完全人抗体适于免疫预防或作为免疫治疗剂。

实施例 6-天花/痘苗病毒

通过针对已知参与牛痘中和作用的抗原筛选前述免疫的人文库得到结合所述抗原的类似组的抗体，并鉴定了在体外和体内能中和病毒进入和扩散的抗体。此外，通过本文所述的技术鉴定了相似重链/轻链对的许多变体，提供了一系列亲和力，从其选择具有最希望的特征的候选物用于检测和研发。也考虑用抗原的更复杂混合物，如受感染的细胞、裂解物或病毒粒进行选择作为备选方法。据此衍生的高亲和力候选物可单独用于免疫预防，不需要其他方法所需的亲和成熟。备选地，如果需要的话可使用针对特定抗原的抗体混合物。例如 Hooper 等人(2000)发现利用牛痘的基因 L1R 和 A33R 的 DNA 疫苗接种比单独一种更有效，表明对这两种抗原来说，对两种抗原产生的抗体比针对一种产生的抗体给予更好的保护。Nowakowski 等人(Nowakowski 等人, 2002)发现噬菌体展示衍生的针对非重叠表位的三种抗体混合物产生肉毒杆菌神经毒素的有效中和，其中单独每一种抗体几乎无效果。

实施例 7-检测针对患者体液中毒素的人抗体存在的 ELISA 测定法

在此测定法中，抗原 PA83(List Laboratories)在溶液 A(PBS + 0.08% BC 溶液)中的 4ng/ml 溶液 50 μ l 与 Immulon 2 HB 平板(VWR)结合并允许在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。BC 溶液为含 0.5% 酪蛋白(Sigma)、0.01% 硫柳汞(Sigma)、0.005% 酚红和 0.01 N NaOH 的 PBS。然后孔用 PBS+0.05% Tween 20 洗 3 次并通过与溶液 C(BC 溶液+1% Tween 20)孵育 1 小时封闭。然后孔用 PBS+0.05% Tween 20 再洗 3 次并允许与 50 μ l 患者样品(例如血液、血清、胸膜灌洗液)直接或作为稀释系列在 37 $^{\circ}$ C 孵育 1-2 小时。稀释在溶液 D(BC+0.025% Tween 20)中进行。作为阳性对照，一些孔用上述实施例 1 中抗炭疽抗体孵育，所述抗体用溶液 D 稀释到此测定法待确定的浓度。孔用 PBS+0.05% Tween 20 洗 3 次，然后与二级抗体(溶于溶液 D 的碱性磷酸

酶标记的山羊抗人 F(ab')₂ 在 37℃ 孵育 1-2 小时。孔用 PBS+0.05% Tween 20 洗 3 次，然后用溶于 10 mM 二乙醇胺, 0.5 mM MgCl₂, pH 9.5 的磷酸酶底物(Sigma)检测。用 ELISA 读出器在 A405 检测阳性样品并定量。

实施例 8-检测和定量患者液体中 PA83 的测定法

在此鉴定法中，使用针对炭疽 PA83 的两种抗体。第一种抗体与固体基质(例如微量滴定板、小珠或浸渍片)结合。例如，来自实施例 1 的抗体在溶液 A(PBS+0.08% BC 溶液)中的 4 纳克/毫升溶液 50 μl 在微量滴定孔中 4℃ 孵育过夜。然后孔用 PBS+0.05% Tween 20 洗 3 次并通过与溶液 C 孵育 1 小时封闭。然后孔用 PBS+0.05% Tween 20 再洗 3 次并允许与 50 μl 患者样品(例如血液、血清、胸膜灌洗液)直接或作为稀释系列在 37℃ 孵育 1-2 小时。也包括使用 PA83 稀释系列制作标准曲线。稀释在溶液 D(BC+0.025% Tween 20)中进行。孔用 PBS+0.05% Tween 20 洗 3 次，然后在 37℃ 与结合 PA83 上非竞争性表位的二级抗炭疽抗体孵育 1-2 小时。此二级抗体用碱性磷酸酶标记。孔用 PBS+0.05% Tween 20 洗 3 次，然后用溶于 10 mM 二乙醇胺, 0.5 mM MgCl₂, pH 9.5 的磷酸酶底物(Sigma)检测。用 ELISA 读出器在 A405 检测阳性样品。

下列参考文献在此全部引用作为参考：

Alibek K. , Biohazard: the True Story of the Largest Covert Biological Weapons Programme in the World-Told From the Inside By the Man Who Ran It. New York, NY: Random House Inc. (1999)

Appleyard 等人, J. Gen. Virol. 13: 9-17 (1971).

Barbas 等人, Proc Natl Acad Sci USA 89: 10164-8 (1992).

Bebbington, 等人, Biotechnology 10, 169-175 (1992).

Blasco 等人, J. Virol. 65: 5910-5920 (1991).

Boulter, Proc. Roy. Soc. Med. 62: 11-13 (1969).

Boulter 等人, Am. J. Epidemiol. 94: 612-620 (1971).

- Boulter 等人, *Prog. Med. Virol.* 16, pages 86-108 (1973).
- Breman 等人, *N Engl J Med* 346: 1300-8 (2002).
- Brinton, *Annu Rev Microbiol* 56: 371-402 (2002).
- Bronze,等人, *Am. J. of the Medical Sciences*, 323,pp316-325 (2002).
- Burioni 等人, *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 355-9 (1994).
- Burton 等人, *ProcNatl Acad Sci USA* 88: 10134-7 (1991).
- Burton 等人, *Science* 266: 1024-7 (1994).
- Campbell 等人, *Lancet Infect Dis* 2: 519-29 (2002)
- Casadevall, *Emerg Infect Dis* 8: 833-41 (2002).
- Chen 等人, *ProcNatl Acad Sci USA* 90: 6508-12 (1993).
- Crowe 等人, *ProcNatl Acad Sci USA* 91: 1386-90 (1994).
- Cunningham 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99,7049-7053 (2002).
- Davis 等人, *J Virol* 75: 4040-4047 (2001)
- D'Mello,等人, *J. Immunological Meth.* 247,191-203 (2001).
- Ditzel 等人, *J Immunol* 154: 893-906 (1995).
- Duncan 等人, *J. Virol.* 66: 1610-1621 (1992).
- Engelstad 等人, *Virology* 188: 801-810 (1992).
- Ezzell 等人, *Infect. Immun.* 45,761-767(1984).
- Falconar, *Arch. Virol.* 142,897-916 (1997).
- Falkenberg,等人, *J. Immunol. Methods* 179,13-29 (1995).
- Fenner 等人, *Smallpox and its Eradication. Geneva, Switzerland :*
World Health Organization 1998: 1460.
- Franke 等人, *JVirol* 64: 5988-96 (1990).
- Galmiche 等人, *Virology* 254: 71-80 (1999).
- Hamdan 等人, *Transpl Infect Dis* 4: 160-162 (2002).
- Hirt 等人, *J. Virol.* 58: 757-764(1986).
- Hobday,*Lancet i.*, 907-908 (1962).
- Hooper 等人, *Virology* 266: 329-39 (2000).
- Hunt,等人, *Virology*, 185, 281-290 页 (1991).

- Hunt,等人, *Vaccine*, 13, 281-288 页 (1995).
- Ichihashi 等人, *Virology* 220: 491-494 (1996).
- Isaacs 等人, *J.Virol.*, 66,7217-7224 (1992)
- Kempe, *Pediatrics*, 26,176-189 (1960).
- Kempe 等人, *Bull. World Health Organ.* , 25,41-48 (1961).
- Kimura-Kuroda 等人, *J Gen Virol* 67: 2663-2672 (1986)
- Kinney,等人, *Virology*, 170, 19-30 页 (1989).
- Klimpel,等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89,10277-10281 (1992).
- Law 等人, *Virology* 280: 132-142 (2001).
- Little 等人, *Infect Immun.* 56: 1807-1813(1988).
- Little 等人, *Infect Immun.* 58, 1606-1613(1990).
- Little,等人, *Microbiology* 142, 707-715 (1996).
- Maa 等人, *J Biol Chem* 265: 1662-7 (1990).
- Maruyama 等人, *J Virol* 73: 6024-30 (1999).
- Massung 等人, *Virology* 201: 215-240 (1994).
- Mathews 等人, *J. Immunology*, 129, 2763-2767 页(1982).
- WO02/059340A1 Miller 等人, *Biochemistry* 38, 10432-10441 (1999).
- Mogridge,等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99,7045-7048 (2002).
- Miller, 等人, *Biochemistry* 38,10432-10441(1999)
- Monath, *Acad Sci* 951: 1-12 (2001).
- Morgan, *Science*, 13; 193 (4253): 591-2 (1976).
- Morgan, *Virology*, 73 (1); 43-58 页 (August 1976).
- Moss, in *Fields Virology*(Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA)2637-2671 页 (1996).
- Niles 等人, *J Virol* 62: 3772-8(1988).
- Nir 等人, *Br J Exp Pathol* 46: 443-9(1965)
- Nowakowski 等人, *Proc Nati Acad Sci USA* 99: 11346-50(2002).
- Ober 等人, *J Virol* 76: 7713-23 (2002).
- Paredes,等人, *J. Virology*, 75, 9532-9537 页(2001).

- Parkinson 等人, *Virology* 204: 376-390 (1994).
- Parren 等人, *AIDS* 9: F1-6 (1995).
- Parren 等人, *J Virol* 76: 6408-12 (2002).
- Paviinkova 等人, *Cancer Immunol Immunother* 49: 267-75 (2000).
- Payne 等人, *J. Gen. Virol.* 32: 63-72 (1976).
- Payne, *J. Virol.* 27: 28-37 (1978).
- Payne, *J. Virol.* 31: 147-155 (1979).
- Payne, *J. Gen. Virol.* 50: 89-100 (1980).
- Payne 等人, *J. Gen. Virol.*, 66 (Pt3)643-6 页 (March 1985).
- Phillpotts, 等人, *Vaccine*, 17, 2429-2435 页 (1999).
- Phillpotts, 等人, *Vaccine*, 20, 1497-1504 页 (2002).
- Phinney, 等人, *J. Virology*, 74, 5667-5678 页 (2000).
- Pimm 等人, *Nucl Med Commun* 10: 585-93 (1989).
- Pittman, 等人, *Vaccine*, 14, 337-343 页 (1996).
- Ramirez 等人, *J Gen Virol* 83: 1059-67 (2002).
- Rodriguez 等人, *J Virol* 56: 482-8 (1985).
- Rodriguez 等人, *J Virol* 69: 4640-8 (1995).
- Roehrig, 等人, *Virology*, 118, 269-278 页 (1982).
- Roehrig, 等人, *Virology*, 142, 347-356 页 (1985).
- Roehrig, 等人, *Virology*, 165, 66-73 页 (1988).
- Roehrig, 等人, *J. Clin. Microbiology*, 35, 1887-1890 页 (1997).
- Roper 等人, *J. Virol.* 70: 3753-3762 (1996).
- Sanna 等人, *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 6439-43 (1995).
- Sanna 等人, *Virology* 215 : 101-6 (1996).
- Schmaljohn 等人, *Virology* 258 : 189-200 (1999).
- Schutt, 等人, *J. Immunol. Methods* 204, 99-102 (1997).
- Shida, *Virology* 150 : 451-462 (1986).
- Smallwood 等人, *M'ed J Aust* 176: 251-3 (2002).
- Smith 等人, *Adv. Exp. Med. Biol.* 440, 395-414 (1998).

Turner 等人, J. Gen. Virol. 13: 19-25 (1971).

Van Eijl 等人, Virology 271: 26-36 (2000).

Wang 等人, 167: 5273-5277 (2001)

Wang 等人, Ann N Y Acad Sci 2001 b 951: 325-7 (2001)

Wherle 等人, Bull World Health Organ 43: 669-79 (1970).

Williamson 等人, Proc Natl Acad Sci USA 90: 4141-5 (1993).

Zeitlin 等人, Virology 225: 213-5 (1996).

应该理解到可对本文公开的实施方案进行多种修改。例如，如本领域技术人员将明白可以稍微改变本文公开的特定序列而不一定不利地影响抗体或抗体片段的功能性。例如，可频繁进行抗体中单个或多个氨基酸的替代而不破坏抗体或片段的功能性。从而，应该理解到与本文所述的特定抗体具有高于 70% 同源性的抗体为本发明的范围之内。在尤其有用的实施方案中，设想与本文所述的特定抗体具有高于大约 80% 同源性的抗体。在其他有用的实施方案中，设想与本文所述的特定抗体具有高于大约 90% 同源性的抗体。因此以上描述不应解释为限制，而是仅作为优选实施方案的例证。本领域技术人员可想象本公开范围和精神之内的其他修改。

供者	血液骨髓	BOT	炭疽	VEE	WNV	天花	登革热	其他的	产生的文库	鉴定 AB'S TO?
951	骨髓	未知	接种的阳性滴度	接种的阳性滴度	未知的	接种的阳性滴度	未知的	淋巴 Hep B Hep A	是	炭疽 VEE
1037	骨髓	接种的	接种的阳性滴度	接种的阳性滴度	未知的	接种的阳性滴度	未知的	黄热病	是	炭疽 VEE
MD1	血液	未知	接种的阳性滴度	未知的	未知的	阳性滴度	未知的			
MD2	血液	未知	接种的阳性滴度	未知的	未知的	阳性滴度	未知的			
MD3	血液	未知	接种的阳性滴度	未知的	未知的	未知的	未知的		是	炭疽
MD4	血液	未知	接种的阳性滴度	未知的	未知的	阳性滴度	未知的			
1026	骨髓	阳性滴度	未知的	未知的	未知的	未知的	未知的			
811C	骨髓	未知	接种的阳性滴度	阳性滴度	未知的	接种的阳性滴度	未知的	黄热病 Hep B	进行中	
1033	骨髓	阳性滴度	接种的	未知的	未知的	没有滴度	未知的			
Den1	骨髓	未知	未知的	未知的	未知的	未知的	感染		进行中	
Den2	骨髓	未知	未知的	未知的	未知的	未知的	感染		进行中	
Den3	骨髓	未知	未知的	未知的	未知的	未知的	感染		进行中	
Den4	骨髓	未知	未知的	未知的	未知的	未知的	感染		进行中	
Den5	骨髓	未知	未知的	未知的	未知的	未知的	感染		进行中	
Den6	骨髓	未知	未知的	未知的	未知的	未知的	感染		进行中	
Den7	骨髓	未知	未知的	未知的	未知的	未知的	感染		进行中	
Den8	骨髓	未知	未知的	未知的	未知的	未知的	感染		进行中	
B1	血液	接种的阳性滴度	未知的	未知的	未知的	未知的	未知的			
1134	骨髓	阳性滴度	未知的	未知的	未知的	阳性滴度	未知的			

图1

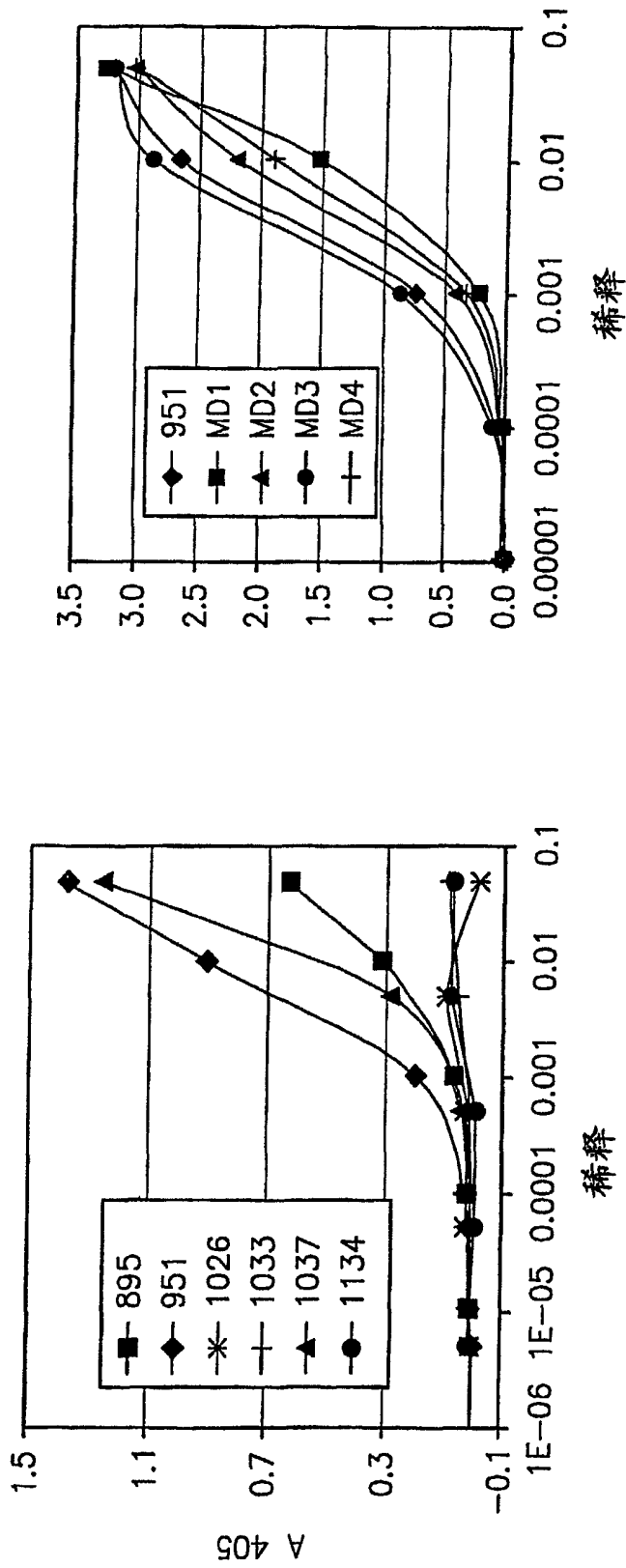


图 2B

图 2A

重链序列

(Seq ID No. 1)	1	LEQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTYAMHWVRQAPGQRPENWINGDGTKIYAKFKQGRLAITRDTSART	80	M	K7cGpro
(Seq ID No. 2)	1	LEEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFFTRSGMHWVRQAPGKGLIEWSAISASGGSTYYADSVRGRFTISRDN	70	M	L4gGpro
(Seq ID No. 3)	1	LEQVQLVLESGGGEVQPGSRSLRLSCAASGFFRSGMHWVRQAPGKGLIEWAATSYDGTNKDYGDSVKGRFTISR	60	M	K3aGpro
(Seq ID No. 4)	1	LEQVQLVLESGGGEVQPGSRSLRLSCAASGFFRSGMHWVRQAPGKGLIEWAATSYDGTNKDYGDSVKGRFTISR	50	M	L7dGpro
(Seq ID No. 5)	1	LEQVQLVLESGGGEVQPGSRSLRLSCAASGFFRSGMHWVRQAPGKGLIEWAATSYDGTNKDYGDSVKGRFTISR	40	M	K9cGpro
(Seq ID No. 6)	1	LEQVQLVLESGGGEVQPGSRSLRLSCAASGFFRSGMHWVRQAPGKGLIEWAATSYDGTNKDYGDSVKGRFTISR	30	M	L9aGpro
(Seq ID No. 7)	1	LEQVQLVLESGGGEVQPGSRSLRLSCAASGFFRSGMHWVRQAPGKGLIEWAATSYDGTNKDYGDSVKGRFTISR	20	M	K8aGpro
(Seq ID No. 8)	1	LEQVQLVLESGGGEVQPGSRSLRLSCAASGFFRSGMHWVRQAPGKGLIEWAATSYDGTNKDYGDSVKGRFTISR	10	M	L8eGpro
(Seq ID No. 9)	1	LEQVQLVLESGGGEVQPGSRSLRLSCAASGFFRSGMHWVRQAPGKGLIEWAATSYDGTNKDYGDSVKGRFTISR	0	M	L8bGpro
(Seq ID No. 10)	1	LEQVQLVLESGGGEVQPGSRSLRLSCAASGFFRSGMHWVRQAPGKGLIEWAATSYDGTNKDYGDSVKGRFTISR	0	M	L8eGpro
(Seq ID No. 11)	1	LEQVQLVLESGGGEVQPGSRSLRLSCAASGFFRSGMHWVRQAPGKGLIEWAATSYDGTNKDYGDSVKGRFTISR	0	M	L4dGpro
(Seq ID No. 12)	1	LEQVQLVLESGGGEVQPGSRSLRLSCAASGFFRSGMHWVRQAPGKGLIEWAATSYDGTNKDYGDSVKGRFTISR	0	M	9K7hpro
(Seq ID No. 13)	1	LEQVQLVLESGGGEVQPGSRSLRLSCAASGFFRSGMHWVRQAPGKGLIEWAATSYDGTNKDYGDSVKGRFTISR	0	M	9 K 1f G pro
(Seq ID No. 14)	1	LEQVQLVLESGGGEVQPGSRSLRLSCAASGFFRSGMHWVRQAPGKGLIEWAATSYDGTNKDYGDSVKGRFTISR	0	M	9 K 2h G pro
(Seq ID No. 15)	1	LEQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTYAMHWVRQAPGQRPENWINGDGTKIYAKFKQGRLAITRDTSART	0	M	9 K 2e G pro
(Seq ID No. 16)	1	LEQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTYAMHWVRQAPGQRPENWINGDGTKIYAKFKQGRLAITRDTSART	0	M	95L163-4aPro
(Seq ID No. 17)	1	LEQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTYAMHWVRQAPGQRPENWINGDGTKIYAKFKQGRLAITRDTSART	0	M	95L163 G11fpro
(Seq ID No. 18)	1	LEQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTYAMHWVRQAPGQRPENWINGDGTKIYAKFKQGRLAITRDTSART	0	M	95L163-63g pro

81	AYMELISLTSEDVAVYCAKGEIVTGS	90	100	110	120	130	M	K7cGpro
81	LYLQNSLRRAEDTAVYCAKGEIVTGS	90	100	110	120	130	M	L4gGpro
81	VYLQNSLRRAEDTAVYCAKGEIVTGS	90	100	110	120	130	M	K3aGpro
81	VYLQNSLRRAEDTAVYCAKGEIVTGS	90	100	110	120	130	M	L7dGpro
81	VYLQNSLRRAEDTAVYCAKGEIVTGS	90	100	110	120	130	M	K9cGpro
81	VYLQNSLRRAEDTAVYCAKGEIVTGS	90	100	110	120	130	M	L9aGpro
81	VYLQNSLRRAEDTAVYCAKGEIVTGS	90	100	110	120	130	M	K8aGpro
81	VYLQNSLRRAEDTAVYCAKGEIVTGS	90	100	110	120	130	M	L8eGpro
81	VYLQNSLRRAEDTAVYCAKGEIVTGS	90	100	110	120	130	M	L8bGpro
81	VYLQNSLRRAEDTAVYCAKGEIVTGS	90	100	110	120	130	M	L4eGpro
81	VYLQNSLRRAEDTAVYCAKGEIVTGS	90	100	110	120	130	M	L4dGpro
81	VYLQNSLRRAEDTAVYCAKGEIVTGS	90	100	110	120	130	M	9K7hpro
81	VYLQNSLRRAEDTAVYCAKGEIVTGS	90	100	110	120	130	M	9 K 1f G pro
81	VYLQNSLRRAEDTAVYCAKGEIVTGS	90	100	110	120	130	M	9 K 2h G pro
81	VYLQNSLRRAEDTAVYCAKGEIVTGS	90	100	110	120	130	M	9 K 2e G pro
81	VYLQNSLRRAEDTAVYCAKGEIVTGS	90	100	110	120	130	M	95L163-4aPro
81	VYLQNSLRRAEDTAVYCAKGEIVTGS	90	100	110	120	130	M	95L163 G11fpro
81	VYLQNSLRRAEDTAVYCAKGEIVTGS	90	100	110	120	130	M	95L163-63g pro

图 3

轻链κ序列

(SEQ ID NO. 19)	10	20	30	40	50	60	70	80	90																																																												
(SEQ ID NO. 20)	1	SRAIQLTQSP	TLASVGD	RVTITCR	ASQSIG	---	GWLAWYQQK	PKKAPN	LLIYKAS	LES	GVPSR	FSGSGG	TEFTL	TSSLQ	PDD	MK9c	pro																																																				
(SEQ ID NO. 21)	1	SRDIQMTQ	SPSSLAS	VGD	RVTITCR	ASQGV	---	NALVWYQQK	PKKAPER	LIYAAS	ILQSGV	PSRFR	SFGSGG	TEFTL	TIGLQ	PED	MK7c	pro																																																			
(SEQ ID NO. 22)	1	SRDIQMTQ	SPSSLAS	VGD	RVTITCR	ASQDIS	---	NYLWYQQK	PKKAPK	LLIYDAS	NLE	TGVP	SRFR	SFGSGG	TDFT	FTSSL	QPED	9K7h	pro																																																		
(SEQ ID NO. 23)	1	SRVIWMTQ	SPSSLAS	VGD	RVTITCR	ASQDIT	---	NYLNWYQQK	PKKAPN	LVIYD	TSNL	ATG	VPSR	FSGAGS	GTDF	FTSSL	QPED	9K1f	pro																																																		
(SEQ ID NO. 24)	1	SRDIQLTQ	SPSSLAS	VGD	RVTITCR	ASQIS	---	SYLNWYQQK	KEGKAP	KLLIYA	ASN	LQSG	VPSR	FSGSGG	TDFT	FTSSL	QPED	9K3h	pro																																																		
(SEQ ID NO. 25)	1	SRDIQLAQ	SPSSLAS	VGD	RVTITCR	ASQGIS	---	NELNWYQQR	PKKAPK	LLIYD	ASS	LE	TGVP	SRFR	SFGSGG	TDFT	FTSSL	QPED	9K2h	pro																																																	
(SEQ ID NO. 26)	1	SREIVMTQ	SPDTL	SV	PPER	ATLSCR	ASQSV	---	SNLAWFO	OR	PGO	APR	LLIY	GAS	T	RAT	GV	PAR	F	S	G	S	G	S	G	T	E	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	S	E	D	9K2a	pro																												
	1	SRDIVMTQ	SPDSL	AV	SL	GER	ATINCK	SR	S	I	L	F	S	S	N	K	N	F	L	A	W	Q	Q	R	P	G	Q	P	P	K	L	L	V	S	W	A	S	T	R	E	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	D	S	L	Q	A	E	D	9K2e	pro		
	85	FATYHCQY	SG-N--	WTF	QG	TK	VEIKR	TV	A	P	S	V	F	I	P	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S	MK9c	pro										
	85	FATYICLQ	HNSYP--	WTF	QG	TK	VEIKR	TV	A	P	S	V	F	I	P	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S	MK7c	pro										
	85	LATYICQY	DNLG--	VTF	PG	TK	VDIKR	TV	A	P	S	V	F	I	P	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S	9K7h	pro										
	85	IGTYCQSY	DKFPP	V	N	E	G	P	G	T	V	D	I	K	R	T	V	A	P	S	V	F	I	P	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S	9K1f	pro	
	85	FATYICQL	SYSALG-	F	T	E	G	P	G	T	V	D	I	K	R	T	V	A	P	S	V	F	I	P	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S	9K3h	pro	
	85	FATYICQY	DDLP--	L	T	F	G	G	T	K	V	E	I	R	G	T	V	A	P	S	V	F	I	P	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S	9K2h	pro	
	85	FAVYICQY	DNWPP-	WTF	QG	TK	VEIKR	TV	A	P	S	V	F	I	P	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S	9K2a	pro										
	91	VAVYICQY	YISTP--	H	T	E	G	Q	G	T	K	L	E	I	K	G	T	V	A	P	S	V	F	I	P	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S	9K2e	pro

图 4

轻链入序列

	10	20	30	40	50	60	70	80	90
(Seq ID No. 27)	1	SRSVLTQPPSASCTPGQRTVISCSTSSNIGR-NRNVWYQQLPGTAPKLLIYNN	---	QRP	SVLDRFSGSK	---	SGTSASLAIISGLQ	ML4g	pro
(Seq ID No. 28)	1	SRQSVLTQPPSASCTPGQRTVISCSSSSNIGS-NTVNWYQQLPGTAPKLLIYNNI	---	ERP	SGVDFRSGSK	---	SGTSASLAIISGLQ	ML6b	pro
(Seq ID No. 29)	1	SRQSVLTQPPSTSGTPGQSVTISCSSSSNIGS-NTVNWYRHLPTAPKLLIYGDN	---	LRP	SGVDFRSGSK	---	SGTSASLAIISGLQ	ML3b	pro
(Seq ID No. 30)	1	SRQSVLTQPPSVSGAFQGRVTISCSSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGN	---	NRPS	GVDFRSGSK	---	SGTSASLAIISGLQ	ML2d	pro
(Seq ID No. 31)	1	SRQSVLTQPPSVSGAFQGRVTISCSSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGN	---	NRPS	GVDFRSGSK	---	SGTSASLAIISGLQ	ML7d	pro
(Seq ID No. 32)	1	SRQSVLTQPPSXSGAPGQRTVISCSSSSNIGAGYDVHWYQHLPGKPKLLIANND	---	NRPS	GVDFRSGSK	---	SEFSAFIAITGLHP	ML8b	pro
(Seq ID No. 33)	1	SRQSVLTQPPASVSGSPGQRTVISCSSSSNIGAGYDVHWYQHLPGKPKLLIANND	---	NRPS	GVDFRSGSK	---	SEFSAFIAITGLHP	ML8b	pro
(Seq ID No. 34)	1	SRQSVLTQPPASVSGSPGQRTVISCSSSSNIGAGYDVHWYQHLPGKPKLLIANND	---	NRPS	GVDFRSGSK	---	SEFSAFIAITGLHP	ML8b	pro
(Seq ID No. 35)	1	SRQSVLTQPPASVSGSPGQRTVISCSSSSNIGAGYDVHWYQHLPGKPKLLIANND	---	NRPS	GVDFRSGSK	---	SEFSAFIAITGLHP	ML8b	pro
(Seq ID No. 36)	1	SRQSVLTQPPASVSGSPGQRTVISCSSSSNIGAGYDVHWYQHLPGKPKLLIANND	---	NRPS	GVDFRSGSK	---	SEFSAFIAITGLHP	ML8b	pro
(Seq ID No. 37)	1	SRQSVLTQPPASVSGSPGQRTVISCSSSSNIGAGYDVHWYQHLPGKPKLLIANND	---	NRPS	GVDFRSGSK	---	SEFSAFIAITGLHP	ML8b	pro
(Seq ID No. 38)	1	SRQSVLTQPPASVSGSPGQRTVISCSSSSNIGAGYDVHWYQHLPGKPKLLIANND	---	NRPS	GVDFRSGSK	---	SEFSAFIAITGLHP	ML8b	pro

	100	110	120	130	140	150	160	170	
84	EDEGDIYCAAWDDSLHGGVFGGTQTLVLG	.SKAAPS	VTLEFP	PSSEELQ	ANKATLV	CLVSDFY	PGALT	VAWKADSSPVKAGVE	
84	EDEADYCATWDDSLNGVFGGTQTLVLG	QPKAAP	SVTLF	PPSSEELQ	ANKATLV	CLVSDFY	PGALT	VAWKADSSPVKAGVE	
84	DDEADYCATWDET	LVGQPK	AAPSVT	LEFP	PSSEELQ	ANKATLV	CLVSDFY	PGALT	VAWKADSSPVKAGVE
85	EDEADYCCSYDSSLGSLVFGGTQTLVLG	QPKAAP	SVTLF	PPSSEELQ	ANKATLV	CLVSDFY	PGALT	VAWKADSSPVKAGVE	
85	EDEADYCCSYDSSLGSLVFGGTQTLVLG	QPKAAP	SVTLF	PPSSEELQ	ANKATLV	CLVSDFY	PGALT	VAWKADSSPVKAGVE	
85	EDEADYCCSYDSSLGSLVFGGTQTLVLG	QPKAAP	SVTLF	PPSSEELQ	ANKATLV	CLVSDFY	PGALT	VAWKADSSPVKAGVE	
85	EDEADYCCSYDSSLGSLVFGGTQTLVLG	QPKAAP	SVTLF	PPSSEELQ	ANKATLV	CLVSDFY	PGALT	VAWKADSSPVKAGVE	
85	EDEADYCCSYDSSLGSLVFGGTQTLVLG	QPKAAP	SVTLF	PPSSEELQ	ANKATLV	CLVSDFY	PGALT	VAWKADSSPVKAGVE	
85	EDEADYCCSYDSSLGSLVFGGTQTLVLG	QPKAAP	SVTLF	PPSSEELQ	ANKATLV	CLVSDFY	PGALT	VAWKADSSPVKAGVE	
85	EDEADYCCSYDSSLGSLVFGGTQTLVLG	QPKAAP	SVTLF	PPSSEELQ	ANKATLV	CLVSDFY	PGALT	VAWKADSSPVKAGVE	
85	EDEADYCCSYDSSLGSLVFGGTQTLVLG	QPKAAP	SVTLF	PPSSEELQ	ANKATLV	CLVSDFY	PGALT	VAWKADSSPVKAGVE	
86	EDEADYCCSYDSSSYQ--VFGGT	KLTVL	GQPKAA	PSVT	LEFP	PSSEELQ	ANKATLV	CLVSDFY	
91	EDEADYCCMIWHIDT--VFFGG	GSKLTV	LQSKAA	PSVT	LEFP	PSSEELQ	ANKATLV	CLVSDFY	

图 5

变体人κ轻链

(SEQ ID No. 38)	9K2a_K	SREIVMTQSPDTLSVSPGERATLSCRASQSVSS-----NLAWFQQRPQGAPRLLIYGAST 55
(SEQ ID No. 40)	9K1CR2_K	SREIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVRT-----NVAWYQKPKGQAPRLLIYAAS 54
(SEQ ID No. 41)	9K5a_K	SRDXMTQSPSTLSXSGERATLSCXASQSVSX-----XLAWYQKPKGQAPRLLIYGAST 55
(SEQ ID No. 42)	MK9c_K	SRAIQLTQSPSTLSASVGDVRTITCRASQSIGG-----WLAWYQKPKGKAPNLLIYKASS 54
(SEQ ID No. 43)	9K3C_K	-----TQSPSSLSASVGDVRTITCRASQSIGG-----WLAWYQKPKGKAPNLLIYKASS 49
(SEQ ID No. 44)	1037K5c_K	SRDIQMTQSPSTLSASVGDVRTITCRASQDITR-----YLAWYQKPKGKAPKLLIYRASI 55
(SEQ ID No. 44)	1037K3a_K	SRDIQMTQSPSTLSASVGDVRTITCRASQDITR-----YLAHQKPKGKAPKLLIYRASI 55
(SEQ ID No. 45)	1037K5d_K	SRDIQMTQSPSTLSASVGDVRTITCRASQDITR-----YLAWYQKPKGKAPKLLIYRASI 55
(SEQ ID No. 46)	MK7c_K	SRDIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQGVNR-----ALVWYQKPKGKAPRLLIYAASI 54
(SEQ ID No. 47)	1037K6e_K	SRDIQMTQSPSSVLSASVGDVRTITCRASQDITR-----WLAWYQKPKGKAPRLLIYAAS 55
(SEQ ID No. 48)	9K7h_K	SRDIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQDISN-----YLNWYQKPKGKAPKLLIYDASN 55
(SEQ ID No. 49)	9K1f_K	SRVIWMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQDITN-----YLNWYQKPKGKAPNLTVDTSN 55
(SEQ ID No. 50)	9K5AR2_K	SRDIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQDIAN-----YLNWYQKPKGKAPKLLIYDASN 54
(SEQ ID No. 51)	1037K6f_K	SRAIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQDINN-----HLNWIYQKPKGKAPKLLIYDASN 55
(SEQ ID No. 52)	9K2h_K	SRDIQLAQSPSSLSASVGDVRTITCRASQGISN-----FLNWIYQKPKGKAPKLLIYDASN 55
(SEQ ID No. 54)	9K3h_K	SRDIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQDISN-----YLNWYQKPKGKAPKLLIYAASN 54
(SEQ ID No. 55)	1037K4h_K	SRAIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQDISN-----YLNWYQKPKGKAPKLLIYAASN 54
(SEQ ID No. 56)	951K633g_K	SRDIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQDISN-----YLNWYQKPKGKAPKLLIYDASN 55
(SEQ ID No. 57)	1037K4f_K	SRDIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQDISN-----YLNWYQKPKGKAPNLLIYDASN 55
(SEQ ID No. 58)	1037K4d_K	SRDIVMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQDIRN-----YLNWYQYRPGKAPNLLIYDASN 55
(SEQ ID No. 59)	1037K1h_K	SRDIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQDITK-----NLNWIYQKPKGKAPNLLIYDASN 55
(SEQ ID No. 60)	951K639a_K	-----MTQSPILSLPVTPEGPASISCRSSQSLHNSNGYNYLDWYLQKPKGQSPQLLIYMGSS 55
(SEQ ID No. 61)	951K634a_K	-----MTQSPILSLPVTPEGPASISCRSSQSLHNSNGYNYLDWYLQKPKGQSPQLLIYMGSS 55
	9K2a_K	RATGVPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVIYCCQYDNWPP--WTFGQGTKEVVKRTVA 114
	9K1CR2_K	RATDIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFALYFCQHYDSWF--VTFGQGTTRLEIKRTVA 112
	9K5a_K	RATGIPSRFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAXIYCCQYKXKP--XTFGQGTKLEI----- 109
	MK9c_K	LESQVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYHCQYSGN---WTFGQGTKEVVKRTVA 111
	9K3C_K	LESQVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYHCQYSGN---WTFGQGTKEVVKRTVA 106
	1037K5c_K	LESQVSSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYHCQYFNDYP--ATFGQGTKEVVKRTVA 113
	1037K3a_K	LESQVSSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYHCQYFNDYP--ATFGQGTKEVVKRTVA 113
	1037K5d_K	LESQVSSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYHCQYFNDYP--ATFGQGTKEVVKRTVA 113
	MK7c_K	LQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTIGGLQPEDFATYICLQNSYP--WTFGQGTKEVVKRTVA 112
	1037K6e_K	LQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTITNLQPEDFATYICQANAVP--PFFGQGTKEVVKRTVA 113
	9K7h_K	LETGVPSRFSGSGSGTDFTTTISLQPEDFATYICQYDNLG--VTFGQGTKEVVKRTVA 113
	9K1f_K	LETGVPSRFSGSGSGTDFTTTISLQPEDIGTYICQYDKFPVFNFGPTTVDIKRTVA 115
	9K5AR2_K	LEPGVPSRFSGSGSGTDFTTTISLQPEDVATYICQYHNL---ITFGQGTTRLEIKRTVA 111
	1037K6f_K	LETGVPSRFSGSGSGTDFTTTISLQPEDVATYFCHQYVSVR--PTFGQGTKEVVKRTVA 113
	9K2h_K	LETGVPSRFSGSGSGTDFTTTISLQPEDFATYICQYDNLG--LTFGGGTKEVVKRTVA 113
	9K3h_K	LQSGVPSRFSGSGSGTDFTTTISLQPEDFATYICQYDNLG--LTFGGGTKEVVKRTVA 113
	1037K4h_K	LQSGVPSRFSGSGSGTDFTTTISLQPEDFATYICQYDNLG--LTFGGGTKEVVKRTVA 112
	951K633g_K	LYSGVPSRFSGSGSGTDFTTTISLQPEDFATYICQYDNLG--LTFGGGTKEVVKRTVA 113
	1037K4f_K	LLRGVPARFSGSGSGTDFTLNINLQPEDFATYICQYDNLG--LTFGGGTKEVVKRTVA 113
	1037K4d_K	LYRGVPARFSGSGSGTDFTLNINLQPEDFATYICQYDNLG--LTFGGGTKEVVKRTVA 113
	1037K1h_K	LLRGVPARFSGSGSGTDFTLNINLQPEDFATYICQYDNLG--LTFGGGTKEVVKRTVA 113
	951K639a_K	RASGVDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYICMQLQTP--YTFGQGTKEVVKRTVA 113
	951K634a_K	RASGVDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYICMQLQTP--YTFGQGTKEVVKRTVA 104

图 6

变体人λ轻链序列

(SEQ D No. 62)	951L6R2_L	SRQSALIQPSSVSGSPGQSIITISCTGTSSDVGYNVSWYQQHPGKAPKLMY-YEVS---	56
(SEQ D No. 63)	ML4e_L	SRQSALIQPASVSGSPGQSIITISCTGTSSDVGAYNYSWYHHHPGKAPKLMY-YDVY---	55
(SEQ D No. 64)	ML5b_L	SRQSVLTQPASVSGSPGQSIITISCTGTSSDVGSYKLVSWYQQHPDKAPKLIY-YBIN---	55
(SEQ D No. 65)	ML2e_L	SRQSVLTQPAASVSGSPGQSIITISCTGTTRNDVGSYNLVSWYQQFPKAPKLIY-YADN---	55
(SEQ D No. 66)	ML7d_L	SRQSVLTQPPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLI-YGNS---	56
(SEQ D No. 67)	ML2d_L	SRQSVLTQPPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLI-YGNS---	55
(SEQ D No. 68)	ML8b_L	SRQSVLTQPPPSXSGAPGQRVTISCTGSDSNIGSGYHVHWYQHLEPKGPKLLI-AMND---	56
(SEQ D No. 69)	ML3a_L	SRQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGS-NTVNWYQQLPGTAPKLLI-YNNI---	55
(SEQ D No. 70)	951L6311f_L	SRQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGS-NTVNWYQQLPGTAPKLLI-YNNI---	55
(SEQ D No. 71)	ML4D_L	-----SASGTPGQRVTISCSGSSSNIGS-NTVNWYQQLPGTAPKLLI-YNNI---	45
(SEQ D No. 72)	ML4g_L	SRSYVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGR-NRVNWYQQLPGTAPKLLI-YSNM---	55
(SEQ D No. 73)	951L6312E_L	SRQYVLTQPPSVSGTPGQRVTISCSGSSSNIGT-NSVTWYQRLPGTAPKLLI-YGSH---	55
(SEQ D No. 74)	ML3b_L	SRQSVLTQPPSTSGTPGQSVTISCSGSSSNIGS-NTVNWYRHLPGTAPKLLI-YGDN---	54
(SEQ D No. 75)	951L631d_L	SRSYVLTQPPSESVAPGQTARISCSG--SNIGS-YGVHWYQKAGQAPVLVW-HDDS---	53
(SEQ D No. 76)	ML8f_L	SRNFMLTQPPHSVSGSPGKTVIISCTRSSGSIIVGNY-VQWYQQRPGSSPTLLI-YRGN---	54
(SEQ D No. 77)	ML8e_L	SRQAVLTQPPSSLASPGASALTCTLRSGFYVGSYMINWYQKPGSPQQLLRYRSDSDI	59
	951L6R2_L	NRPSGVPNRFSGSK--SGNTASLTIISGLQAEDEADYYCYSYTSSTN-WVFGGGTKLTVL	113
	ML4e_L	RRPSWVSRFSGSK--SGNTASLTIISGLQPEDEGDYICISYTRDT--LFGGGTKVTVL	111
	ML5b_L	QRPSGVSDRFSASK--SGNTASLTIISGLQAEDEADYYCCSYTDIPS--LIFGGGTRLTVL	111
	ML2e_L	QRPSGGEYRFSGSK--SGNTASLTIISGLRAEADYFCCSYSLTND--VIFGGGTRLTVL	111
	ML7d_L	NRPSGVPDRFSGSK--SGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLG-LVFGGGTRLTAL	113
	ML2d_L	NRPSGVPDRFSGSK--SGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLG-STFGGGTKLTVL	112
	ML8b_L	NRPSGVPDRFSGSK--SEFSAFLAITGLHPEDEGDYICQSYDNLTPG-SLFGGGTRLTVL	113
	ML3a_L	ERPSGVPDRFSGSK--SGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSLNG-VVFGGGTQLTVL	111
	951L6311f_L	ERPSGVPDRFSGSK--SGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSLNG-VVFGGGTQLTVL	111
	ML4D_L	ERPSGVPDRFSGSK--SGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSLNG-VVFGGGTQLTVL	101
	ML4g_L	QRPSGVLDRFSGSK--SGTSASLAISGLQSEDEGDYICAWDDSLHG-GVFGGGTQLTVL	112
	951L6312E_L	QRPSGVPDRFSGSK--SGTSASLAITGLQSGDEADYFCVWVDDNLNGAVLFGGGTKLTVL	113
	ML3b_L	LRPSGVSDRFSGSK--SGTSASLAISGLQSDDEADYYCATWDETNG-VIYGGGTKLTAL	111
	951L631d_L	DRPSGIPERFSGSN--SGNTATLTISSVAGDEADYYCQVWDSAV---IFGGGTKLTVL	108
	ML8f_L	QRPSGVPDRFSGSIDSSNSASLTIISGLETEDEADYYCQSYDSSYQ---VFGGGTKLTVL	111
	ML8e_L	QRSGVPSRFSGSKDTSANAGILLIISGLQPEDEADYYCMIWHIDTV---FFGGGSKLTVL	116
	951L6R2_L	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGALTVAWKADSSPV	162
	ML4e_L	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGALTVAWKADSSPV	160
	ML5b_L	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGALTVAWKADSSPV	160
	ML2e_L	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGALTVAWKADSSPV	160
	ML7d_L	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGALTVAWKADSSPV	162
	ML2d_L	GQPKTAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGALTVAWKADSSPV	161
	ML8b_L	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGALTVAWKADSSPV	162
	ML3a_L	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGALTVAWKADSSPV	160
	951L6311f_L	GQPK-----	115
	ML4D_L	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGALTVAWKADSSPV	150
	ML4g_L	GQSKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGALTVAWKADSSPV	160
	951L6312E_L	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGALTVAWKADSSPV	162
	ML3b_L	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGALTVAWKADSSPV	160
	951L631d_L	SQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGALTVAWKADSSPV	157
	ML8f_L	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGALTVAWKADSSPV	160
	ML8e_L	GQSKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGALTVAWKADSSPV	165

图 7

变体人重链序列

(SEQ ID N o.78)	1037K1h_G	LEQVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFSRFWMNWRQAPGKGL	EWVANIK--QDGS	58
(SEQ ID N o.79)	1037K5d_G	LEQVQLVESGGGLVQPGGSPRLS	CAASGFTFSTDWNNWRQAPGKGL	ECVANIN--QDGS	58
(SEQ ID N o.80)	951K633g_G	LEEVLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFRSYNMNWRQAPGKGL	EWASAIT--STGS	58
(SEQ ID N o.81)	1037K5c_G	LEQVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFSDYSMTWIRQAPGKGL	EWISYIT--GSGS	58
(SEQ ID N o.82)	2.MKA11_G	LEEVLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFSSYGMNWRQTPGKGL	EWVASIT--DRGT	58
(SEQ ID N o.83)	1037K3a_G	LEEVLVESGGGLVQPGESLRLS	CAASGFTFPDYAMHWVRQAPGKGL	EWVSVIN--WNGI	58
(SEQ ID N o.84)	ML9a_G	LEQVQLVESGEGEVQPGRS	LRLS CAASGFI FR SF GM HW VR QAPGKGL	EWVAIS--YDGT	58
(SEQ ID N o.85)	MK10c_G	LEQVQLVESGEGEVQPGRS	LRLS CAASGFI FR SF GM HW VR QAPGKGL	EWVAIS--YDGT	58
(SEQ ID N o.86)	ML7d_G	LEQVQLVESGEGEVQPGRS	LRLS CAASGFI FR SF GM HW VR QAPGKGL	EWVAIS--YDGT	58
(SEQ ID N o.87)	951K3h_G	LEQVQLVESGEGEVQPGRS	LRLS CAASGFI FR SF GM HW VR QAPGKGL	EWVAIS--YDGT	58
(SEQ ID N o.88)	ML8f_G	LEEVLVESGEGEVQPGRS	LRLS CAASGFI FR SF GM HW VR QAPGKGL	EWVAIS--YDGT	58
(SEQ ID N o.89)	ML8e_G	LEEVLVESGEGEVQPGRS	LRLS CAASGFI FR SF GM HW VR QAPGKGL	EWVAIS--YDGT	58
(SEQ ID N o.90)	ML2d_G	LEQVQLVESGEGEVQPGRS	LRLS CAASGFI FR SF GM HW VR QAPGKGL	EWVAIS--YDGT	58
(SEQ ID N o.91)	ML4e_G	LEQVQLVESGGGVQPGMSLRLS	CAASGFI FSSYGMHWVRQAPGKGL	EWVAVIP--YDGT	58
(SEQ ID N o.92)	2.MKB12_G	LEEVLLESGGGVQPGTSLRLS	CAASGFI FSSYGMHWVXQAPGKGL	EWVAVIP--YDGT	58
(SEQ ID N o.93)	ML2e_G	LEQVQLVESGGGVQPGRS	LRLS CAASGFI FSSYGIHWVRQAPGKGL	EWVALIS--YDGS	58
(SEQ ID N o.94)	951K5a_G	LEQVQLVESGGGVQPGRS	LRLS CAASGFI FSSYGIHWVRQAPGKGL	EWVALIS--YDGS	58
(SEQ ID N o.95)	951K7h_G	LEEVLVESGGGVQPGRS	LRLS CAASRFIFSSYGMHWVRQAPGKGL	EWVAVIS--YDGS	58
(SEQ ID N o.96)	951K1f_G	LEEVLVESGGGVQPGRS	LRLS CAASRFIFSSYGMHWVRQAPGKGL	EWVAVIS--YDGS	58
(SEQ ID N o.97)	951K5AR2_G	LEEVLVESGGGVQPGRS	LRLS CVGSLIFSSYGMHWVRQAPGKGL	EWVALIS--YDGS	58
(SEQ ID N o.98)	951K2h_G	LEEVLVESGGGVQPGRS	LRLS CAXSGFI FSSYGLHWVRQAPGKGL	EWVAFIS--YDGS	58
(SEQ ID N o.99)	ML3a_G	LEQVQLVESGGGVQPGRS	LRVSCAASGFI FR SF GM HW VR QAPGKGL	EWVAVIS--YDGS	58
(SEQ ID N o.100)	2.MKA2_G	LEQVQLVQSGGGVQPGRS	LRLS CAASGFI FGSYAMYVVRQAPGKGL	EWVALIS--YDGS	58
(SEQ ID N o.101)	1037K4f_G	LEQVQLVESGGGVQPGGSLRLS	CTASAFTRDFGMHWVRQAPGKGL	EWVALIS--HDGA	58
(SEQ ID N o.102)	951L6R2_G	LEQVQLVESGGGVQPGGSLRLS	CAASGFNFDDYAMHWVRQAPGKGL	RENVSLIS--EDGY	58
(SEQ ID N o.103)	ML4g_G	LEEVLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTYRSWGMSWVRQAPGKGL	EWVAIS--ASGG	58
(SEQ ID N o.104)	1037K4h_G	LEEVLVESGGGLVQPGGSLRLS	CSASGFTFSNYALTWVRQVPGKGL	EWVSGIS--ARSG	58
(SEQ ID N o.105)	951L6312e_G	LEEVLVESGGGLAQPGGSLRLP	CVVSGYTLRNYAVSWVRQAPGKGL	EWVSVS--GSGS	58
(SEQ ID N o.106)	1037K4d_G	LEQMQLVQSGGGVQPGGSLRLS	CAASGFTLSDHYMDWVRQAPGKGL	DVWVRTKNKANSY	60
(SEQ ID N o.107)	MK7c_G	LEQVQLVQSGAEVKKPGASV	KVSCKASGYTFTYYAMHWVRQAPGQ	RPEWNGWIN--GGDG	58
(SEQ ID N o.108)	1037K6f_G	LEQVQLVQSGAEVKKPGASV	KVSCKASGYTFTGYMHWVRQAPGQ	GLEWNGWIN--PNTG	58
(SEQ ID No.109)	951K639a_G	LEQVQLVQSGAEVKKPGSSV	KVSCKASGGNFNTFAISWVRQAPGQ	GLEWNGRII--PIVG	58
(SEQ ID N o.110)	951K634a_G	LEQVQLVQSGAEVKKPGSSV	KVSCKASGGNFNTFAISWVRQAPGQ	GLEWNGRII--PIVG	58
(SEQ ID N o.111)	951L631d_G	LEQMQLVQSGAEVKKPGSSV	KVSCKASGGTFSNYATSWVRQAPGQ	GLEWNGGII--PVFG	58
(SEQ ID N o.112)	1037K6e_G	LEQVQLVQSGAEVKKPGESL	KISCKASGYSTTHTWIGWVRQMPGKGL	EWNGIY--PDDS	58

图 8A

变体人重链序列 (续)

1037K1h_G	GKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMSLRAEDTAVYYCAR-ARTNGGYDIY-----YY	112
1037K5d_G	ERYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMSLRAEDTAVYYCVRNARGD-----	105
951K633g_G	DIYYADSVKGRFTISRDNQNSLLQLQMSLRAEDTAVYYCARDPGRGYGPNALG---PYF	115
1037K5c_G	AISYADSVKGRFTISRDNANNSLFLQMSLGAEGTALYYCARD--REYGDSLL-----YF	111
2.MKA11_G	YKDYAESLRGRFTISRDNQNSMSLQMSLTAEDTAVYFCARER---FGD-----	105
1037K3a_G	TRRYAASVKGRFTIDRDSAKNSLYLQMSLRAEDTAVYYCARDRDGGGNGG-----	109
ML9a_G	NKDYGDSVKGRFTISRDNARNMVYLLQMSLRAEDTAVYYCAKEGVIIPAAT----KDRSN	114
MK10c_G	NKDYGDSVKGRFTISRDNARNMVYLLQMSLRAEDTAVYYCAKEGVIIPAAT----KDRSN	114
ML7d_G	NKDYGDSVKGRFTISRDNFRNMVYLLQMSLRAEDTAVYYCAKEGVIIPAAT----KDRSN	114
951K3h_G	NKDYGDSVKGRFTISRDNARNMVYLLQMSLRAEDTAVYYCAKEGVIIPAAT----KDRSN	114
ML8f_G	NKDYGDSVKGRFTISRDNARNMVYLLQMSLRAEDTAVYYCAKEGVIIPAAT----KDRSN	114
ML8e_G	NKDYGDSVKGRFTISRDNARNMVYLLQMSLRAEDTAVYYCAKEGVIIPAAT----KDRSN	114
ML2d_G	NKDYGDSVKGRFTISRDNARNMVYLLQMSLRAEDTAVYYCAKEGVIIPAAT----KDRSN	114
ML4e_G	NKYYADSVKGRFTISRDNARKNTVYLLQMSLRAEDTAVYYCAKEGVIIPAAT----NDRSN	114
2.MKB12_G	NKYYADSVKGRFTISRDNARKNTVYLLQMSLRAEDTAVYYXAKEGVIIPXST----NDRSN	114
ML2e_G	NKYYADSVKGRFTISRDNARKNTVYLLQMSLRAEDTAVYYCAKEGVIIPAAT----NDRSN	114
951K5a_G	NKYYADSVKGRFTISRDNARKNTXVYLLQMSLRAEDTAVYYCAKEGVIIPAAT----XDRSN	114
951K7h_G	NKHYADSVKGRFTISRDNARKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCAKRVIVPARN----VDYIY	114
951K1f_G	NKHYADSVKGRFTISRDNARKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCAKRVIVPARN----VDYIY	114
951K5AR2_G	KKYYADSVKGRFTISRDNARKNTLYLQMSLRATDTAVYFCAKDRVIVPAAN----DYFFY	114
951K2h_G	KKNYADSVKGRFTISRDNARKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCAKDRVIVPAAN----KYFFY	114
ML3a_G	KKYYGDSVKGRFTISRDNARKNVYLLQMSLRAEDTAVYYCTKDRIVPAQNHP--TGFY	116
2.MKA2_G	IKYYADSVKGRFTISRDKSNKTLFLQMSLRAEDTAVYYCARXGVIVPAST-----RTRY	113
1037K4f_G	QTSYVDSVKGRFTISRDNARKNTVYLLQMSGLRPEDTAVYYCASKS-----TAKT-----YYY	108
951L6R2_G	NTYYADSVKGRFTISRDNARKNSLYLQMSLRAEDTAVYYCAKGTIVAPDGS-----	109
ML4g_G	STYYADSVKGRFTISRDNARKNTMYVQMSLRAEDTAVYYCARYKLAYCTGDC-----YPY	113
1037K4h_G	DAYYADSVKGRFTISRDISKDTLFLQMSLRAEDTAVYYCAR--LYSSGWDF-----YHY	111
951L6312e_G	TIEYAASVKGRFTISRDKSNKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCARWTSACN-----	109
1037K4d_G	KTYYAQKFQGRFLAITRDTSTAYMELISLTSSEDTAVYYCAKG--AEMT-----	105
MK7c_G	DTNYAQNFQGRVMTMTRDTSIRTAYTELSRLSDDTAVYYCARDFYSDSSGYYY---GYYS	115
1037K6f_G	IADYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARD--ESGYTNRG---TYYY	113
951K639a_G	IADYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARD--ESGYTNRG---TYYY	113
951K634a_G	IADYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARD--ESGYTNRG---TYYY	113
951L631d_G	TANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSLTFDDTAVYYCARG--GGWGGRN---YYYY	113
1037K6e_G	DTKYGPSFQGEVPTISCDKSNKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCARY-----RR---QLNP	107

图 8B

变体人重链序列 (续)

1037K1h_G	YDMDVWGQGTTVTVSSASTKG-----	133
1037K5d_G	-----WGQGTLLVTVSSASTKG-----	121
951K633g_G	YGMDVWGPGETTVTVSSASTKG-----	136
1037K5c_G	YGMDVWGQGTTVTVSSASTKG-----	132
2.MKA11_G	DGMDVWGQGTTVTVSSASTKG-----	126
1037K3a_G	SGMDVWGQGTTVTVSSASTKG-----	130
ML9a_G	Y-FDYWGQGTLLVTVSSASTKG-----	134
MK10c_G	Y-FDYWGQGTLLVTVSSASTKG-----	150
ML7d_G	Y-FDYWGQGTLLVTVSSASTKG-----	134
951K3h_G	Y-FDYWGQGTLLVTVSSASTKG-----	134
ML8f_G	Y-FDYWGQGTLLVTVSSASTKG-----	134
ML8e_G	Y-FDYWGQGTLLVTVSSASTKG-----	134
ML2d_G	Y-FDYWGQGTLLVTVSSASTKG-----	134
ML4e_G	Y-FDYWGQGTLLVTVSSASTKG-----	134
2.MKB12_G	Y-FDYWGQGTLLVTVSSASTKG-----	134
ML2e_G	Y-FDYWGQGTLLVTVSSASTKG-----	134
951K5a_G	Y-FDYWGQGTLLVTVSSASTKG-----	150
951K7h_G	YGMDVWGQGTTVTVSSASTKG-----	151
951K1f_G	YGMDVWGQGTTVTVSSASTKG-----	135
951K5AR2_G	YGMDVWGQGTTVTVSSASTKG-----	135
951K2h_G	YGMDVWGQGTTVTVSSASTKG-----	135
ML3a_G	YGMDVWGQGTAVTVSSASTKG-----	137
2.MKA2_G	YRMDVWGQGTAVSVSSASTKG-----	134
1037K4f_G	YGMDVWGPGETAVTASSASTKG-----	129
951L6R2_G	YYFDSWGQGTLLVSVSSASTKG-----	138
ML4g_G	---DSWGQGTLLVTVSSASTKG-----	127
1037K4h_G	A-FDIWGQGTMTVTVSSASTKG-----	133
951L6312e_G	YGMDVWGQGTTVTVSSASTKG-----	132
1037K4d_G	----YWGQGTLLVTVSSASTKG-----	126
MK7c_G	--VGSWGPGETLLVTVSSASTKG-----	124
1037K6f_G	YGMDVWGQGTTVTVSSASTKG-----	136
951K639a_G	YGTDVWGQGTTVTVSSASTKG-----	134
951K634a_G	YGTDVWGQGTTVTVSSASTKG-----	134
951L631d_G	XYMDVWGKGTTVTVSSASTKG-----	134
1037K6e_G	YAFDMWGQGTMTVTVSSASTKG-----	128

图 8C

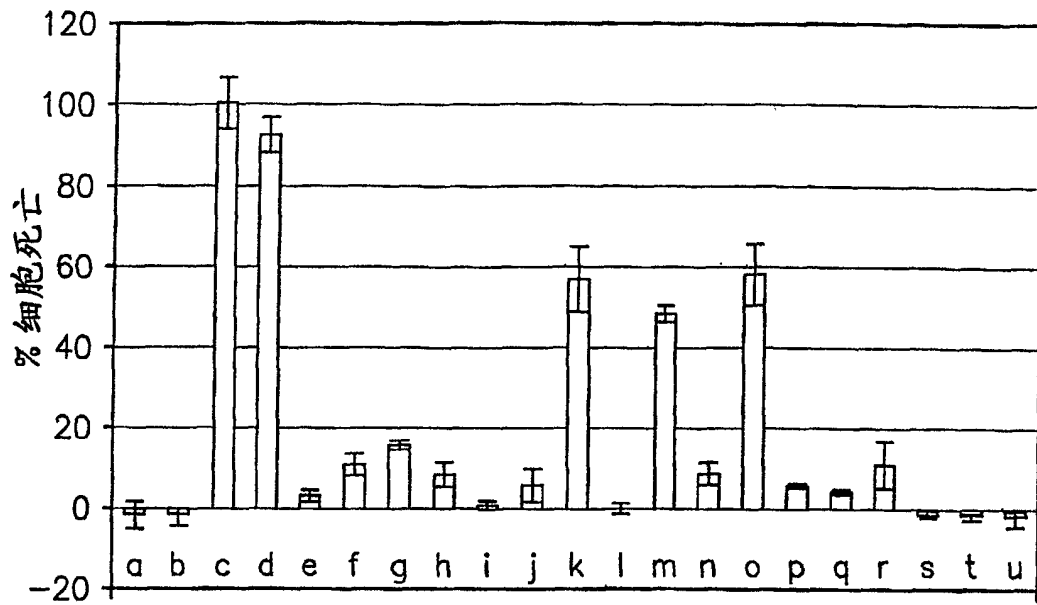


图 9

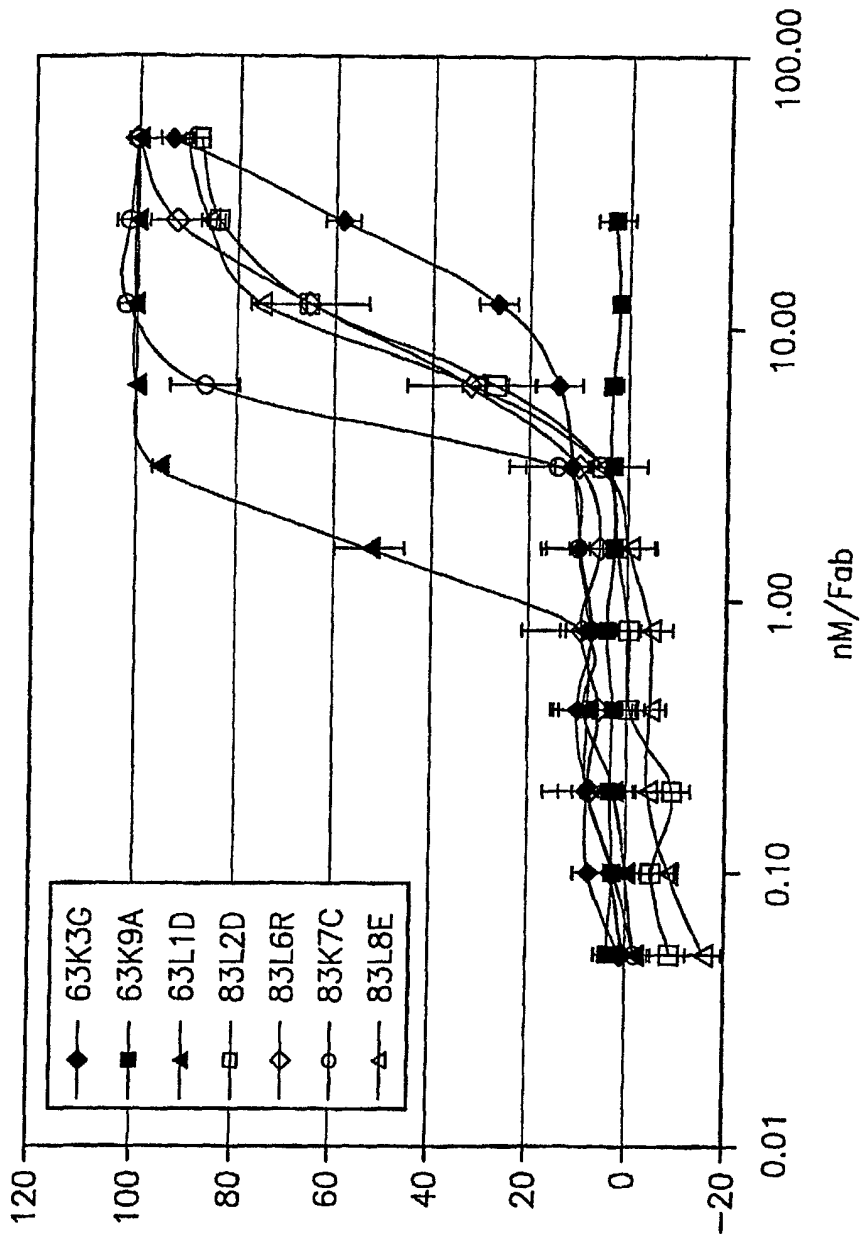


图 10

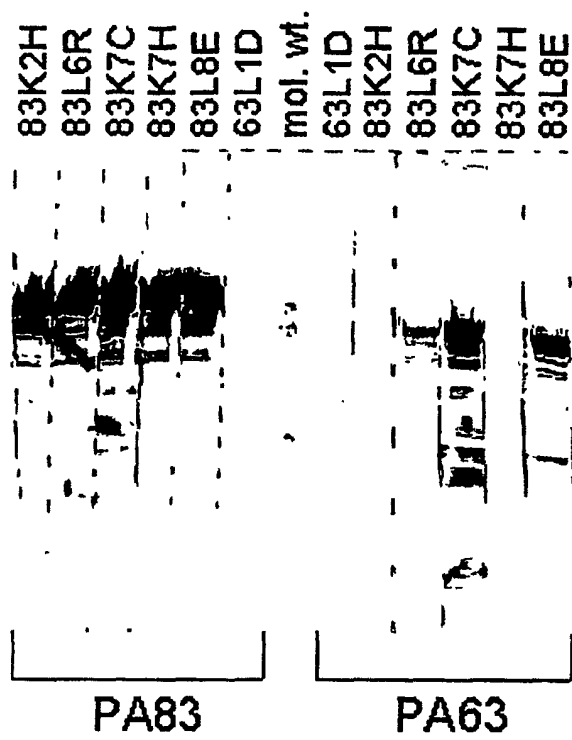


图 11

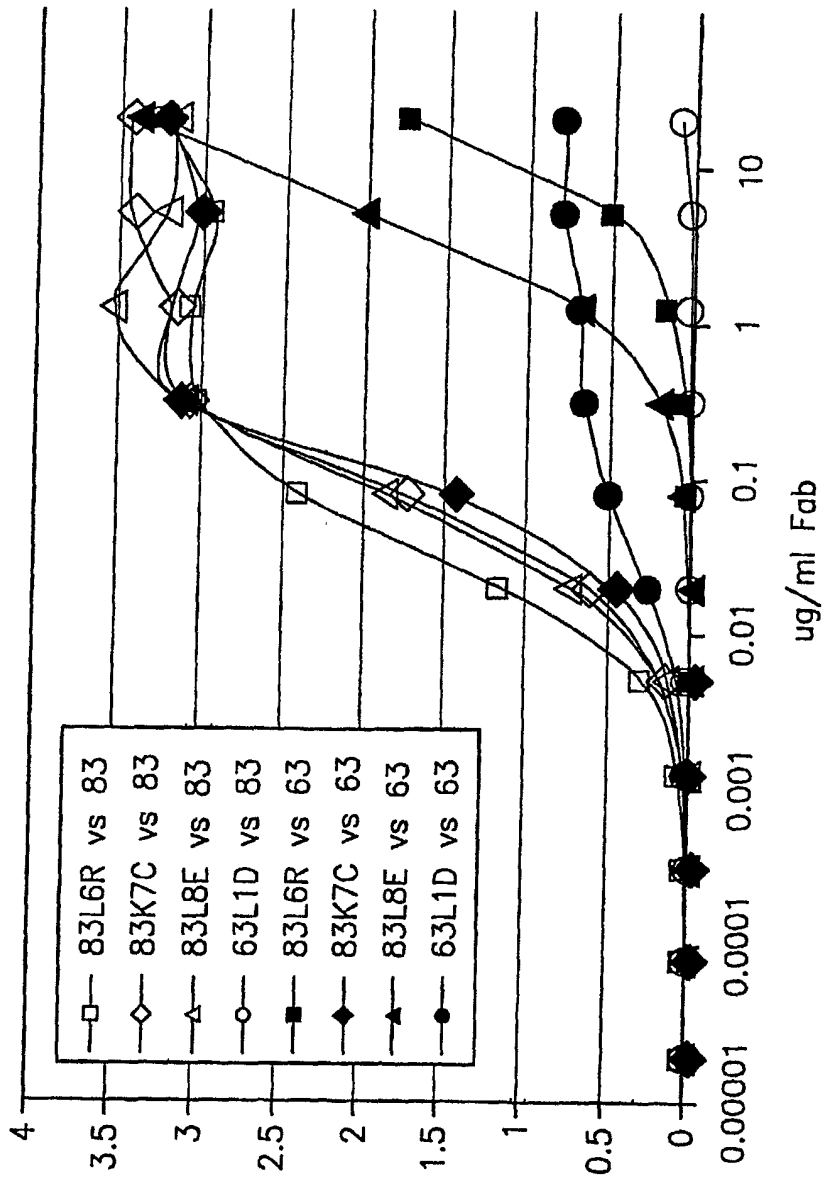


图 12

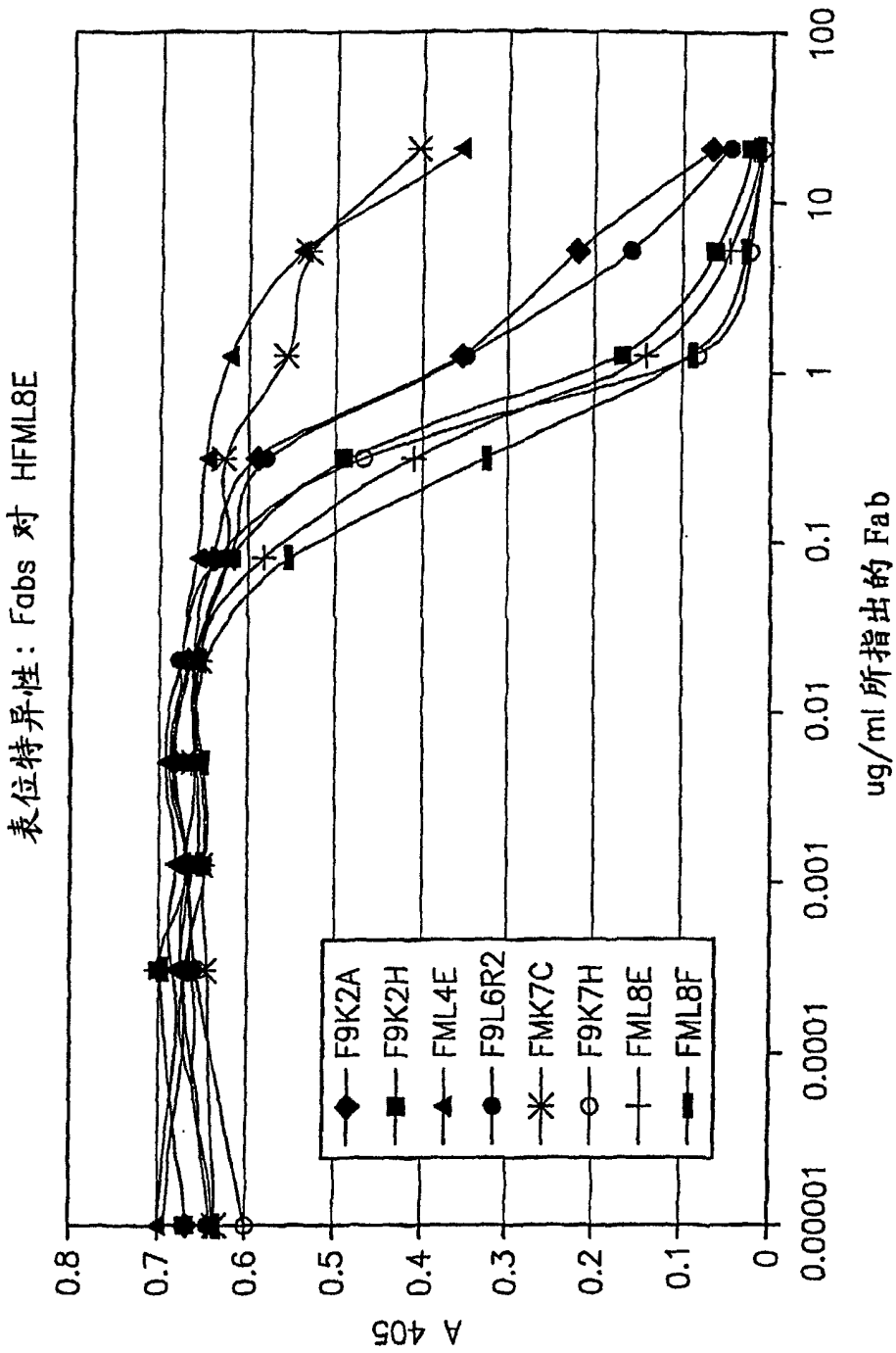
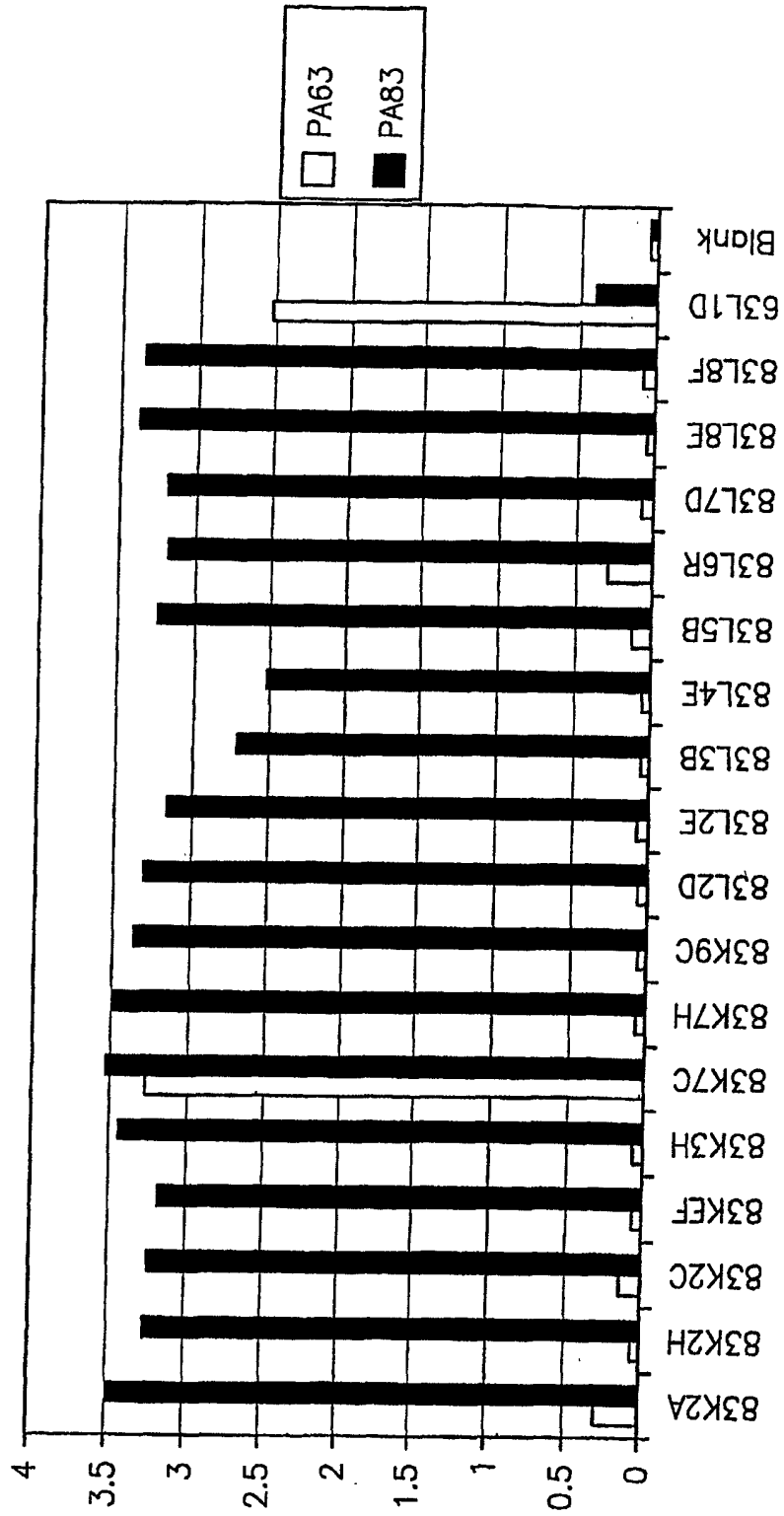
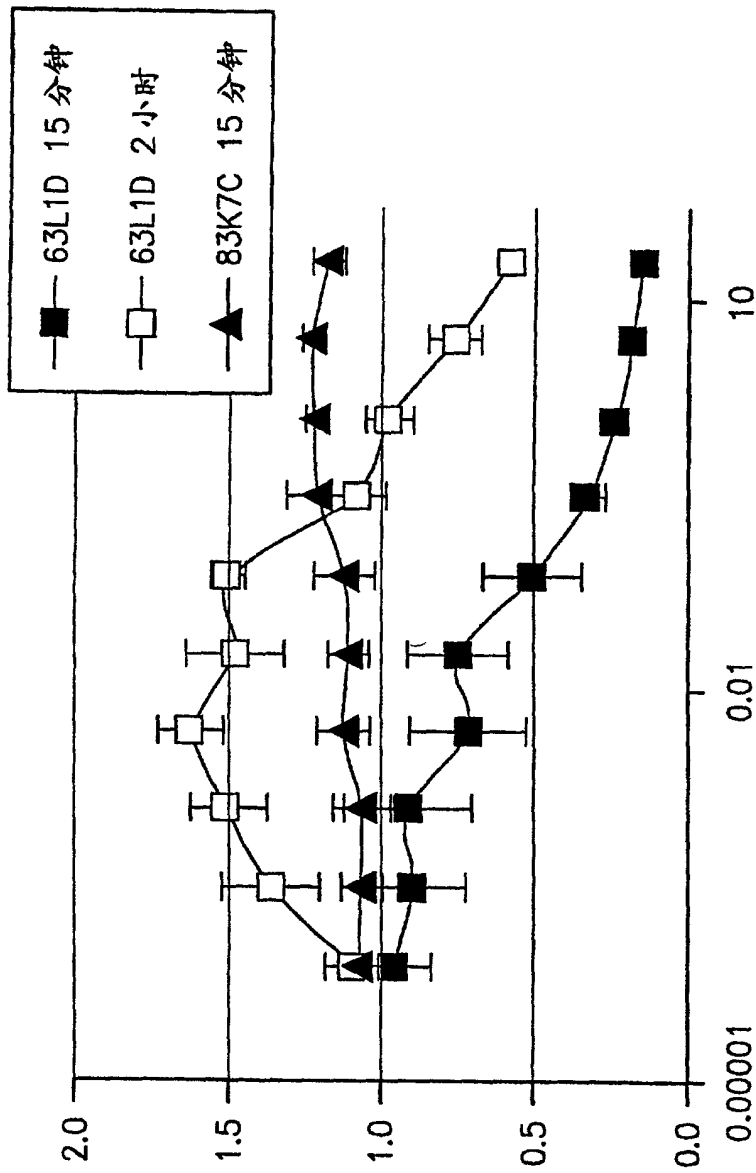


图 13



Fcbs
图 14



µg/ml LF
图 15

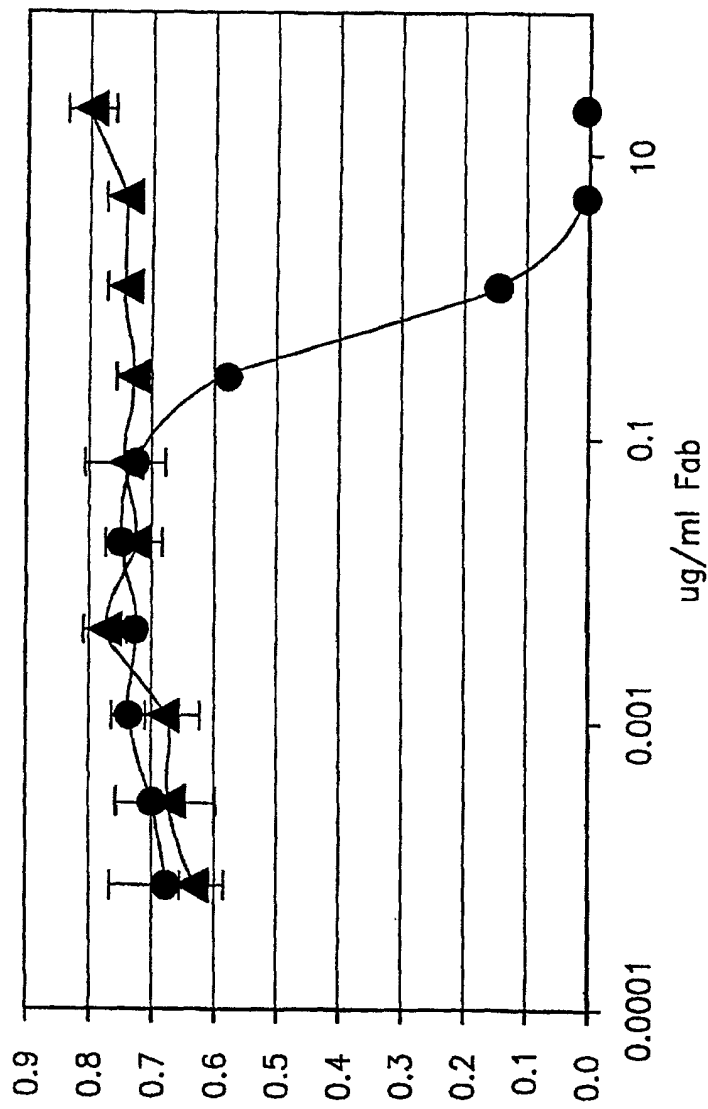


图 16

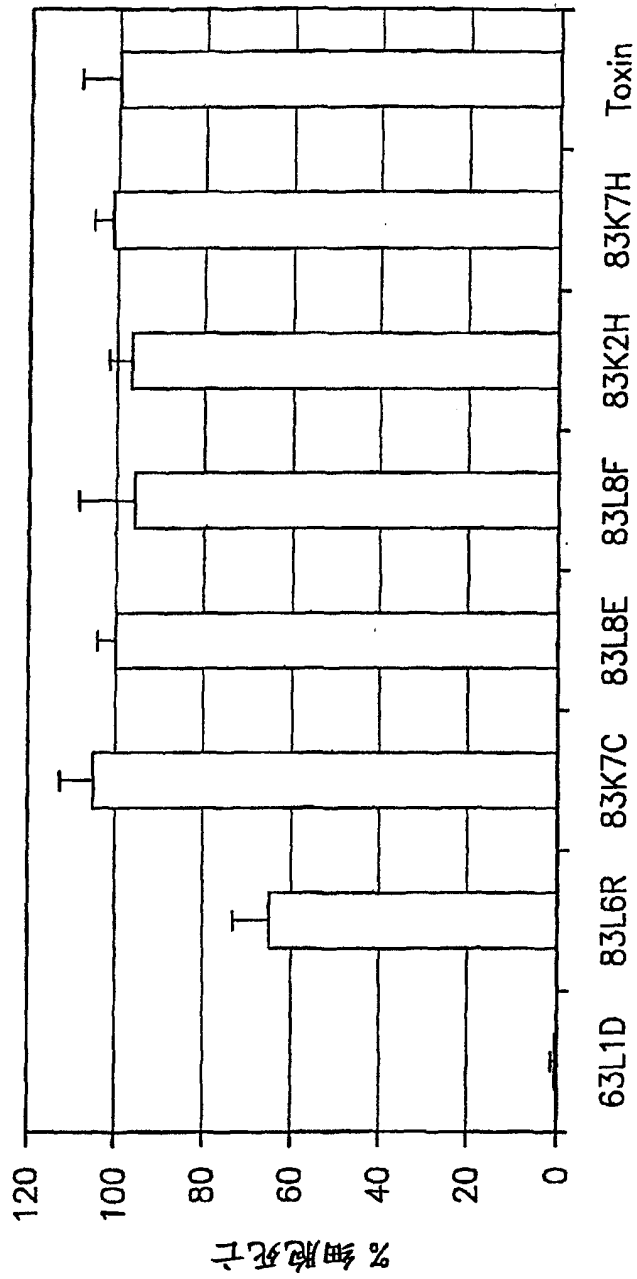


图 17

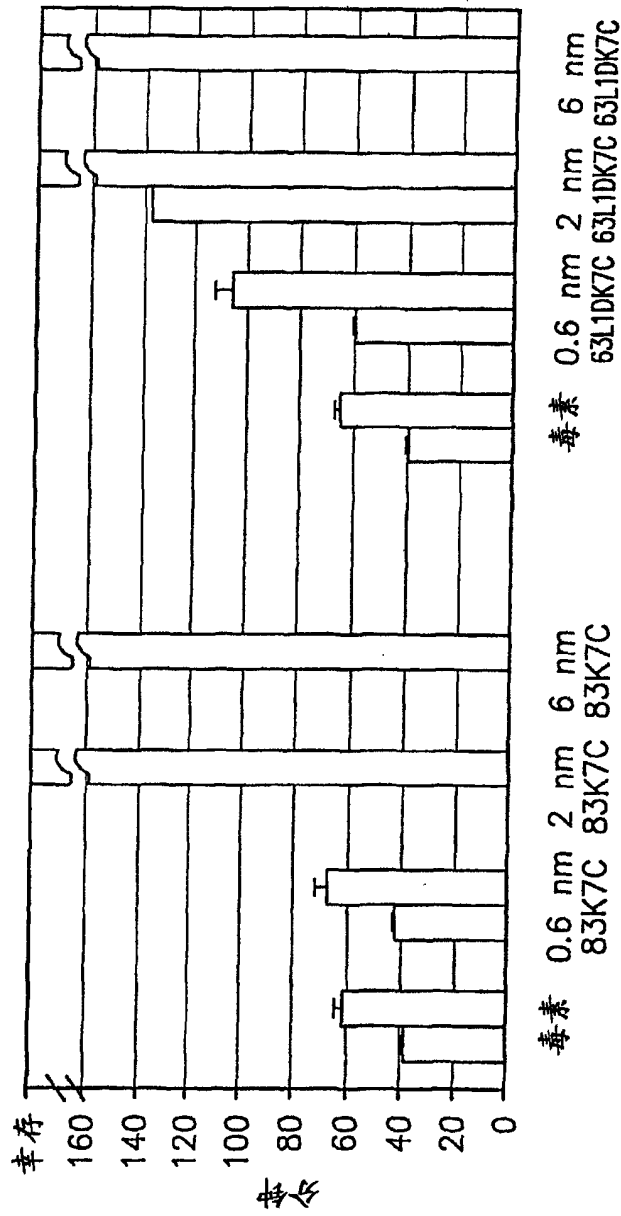


图 18

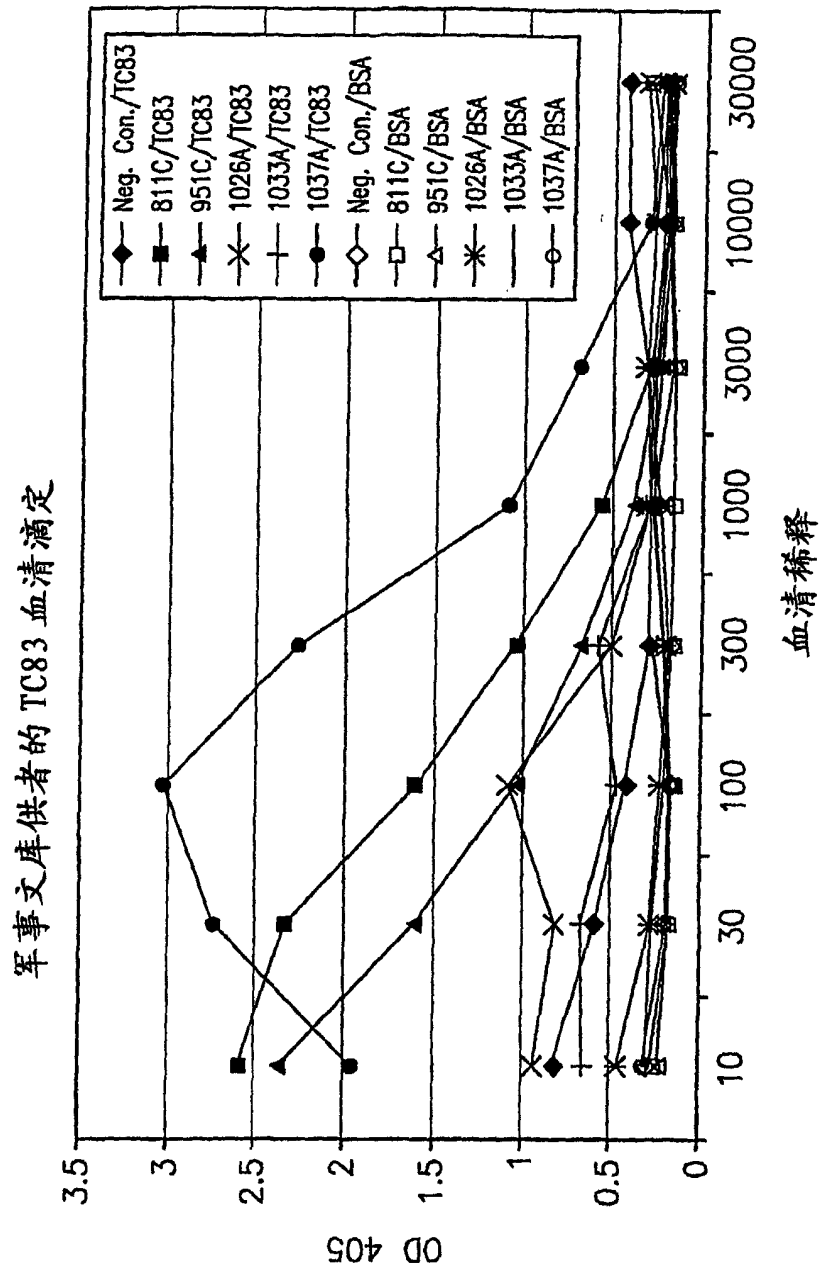


图 19

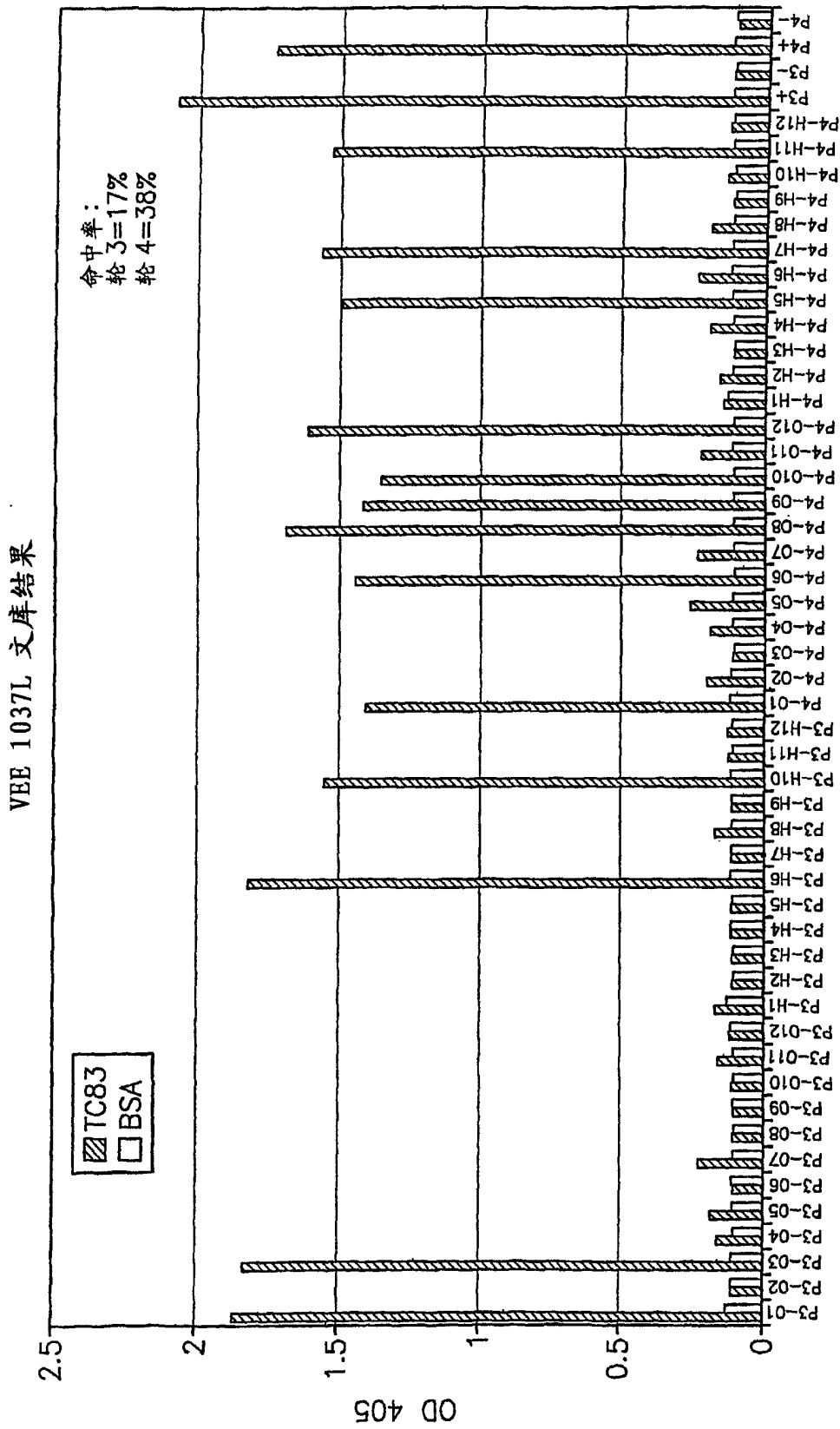


图 20A

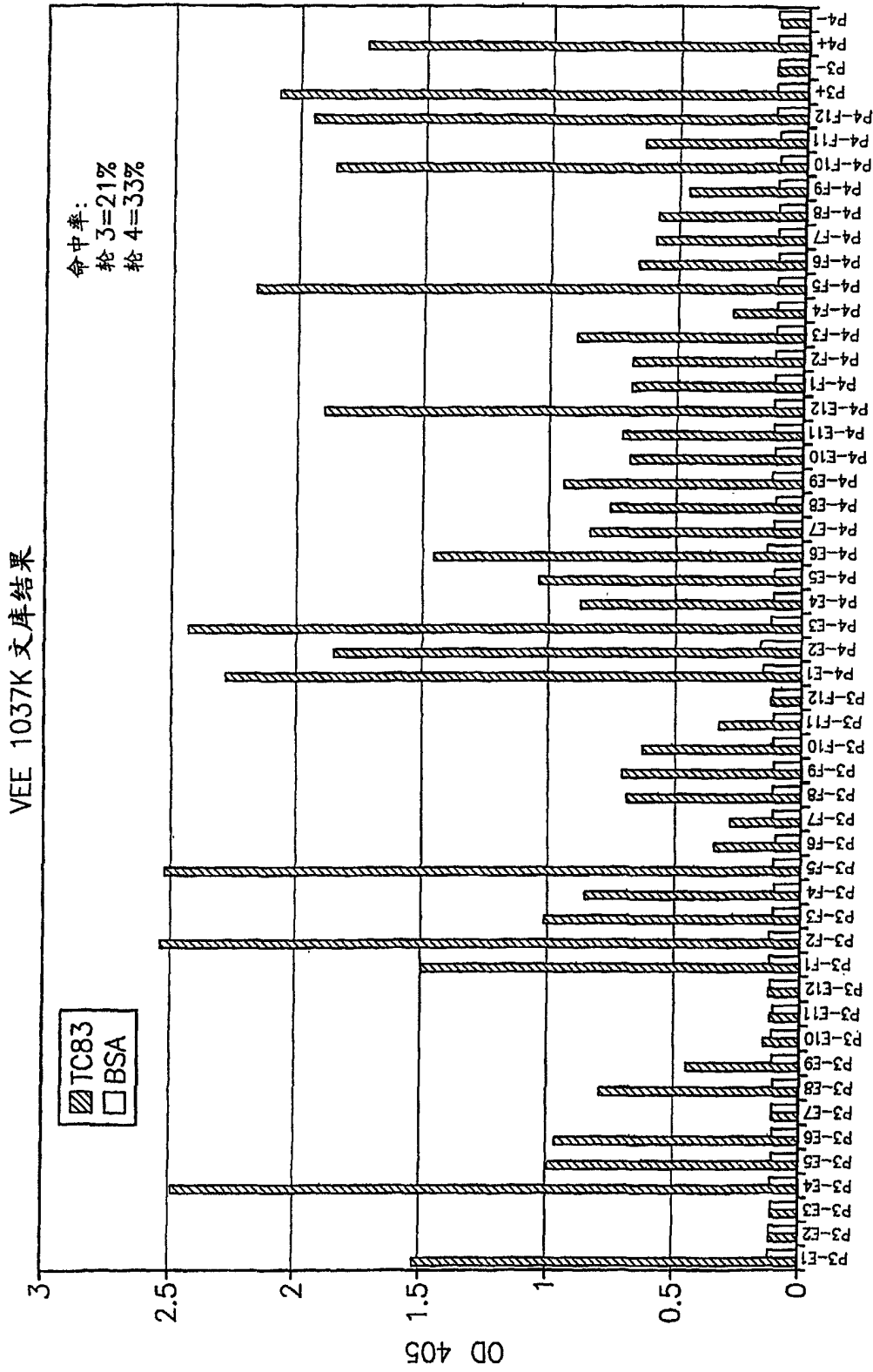


图 20B

VEE 951L 文库结果

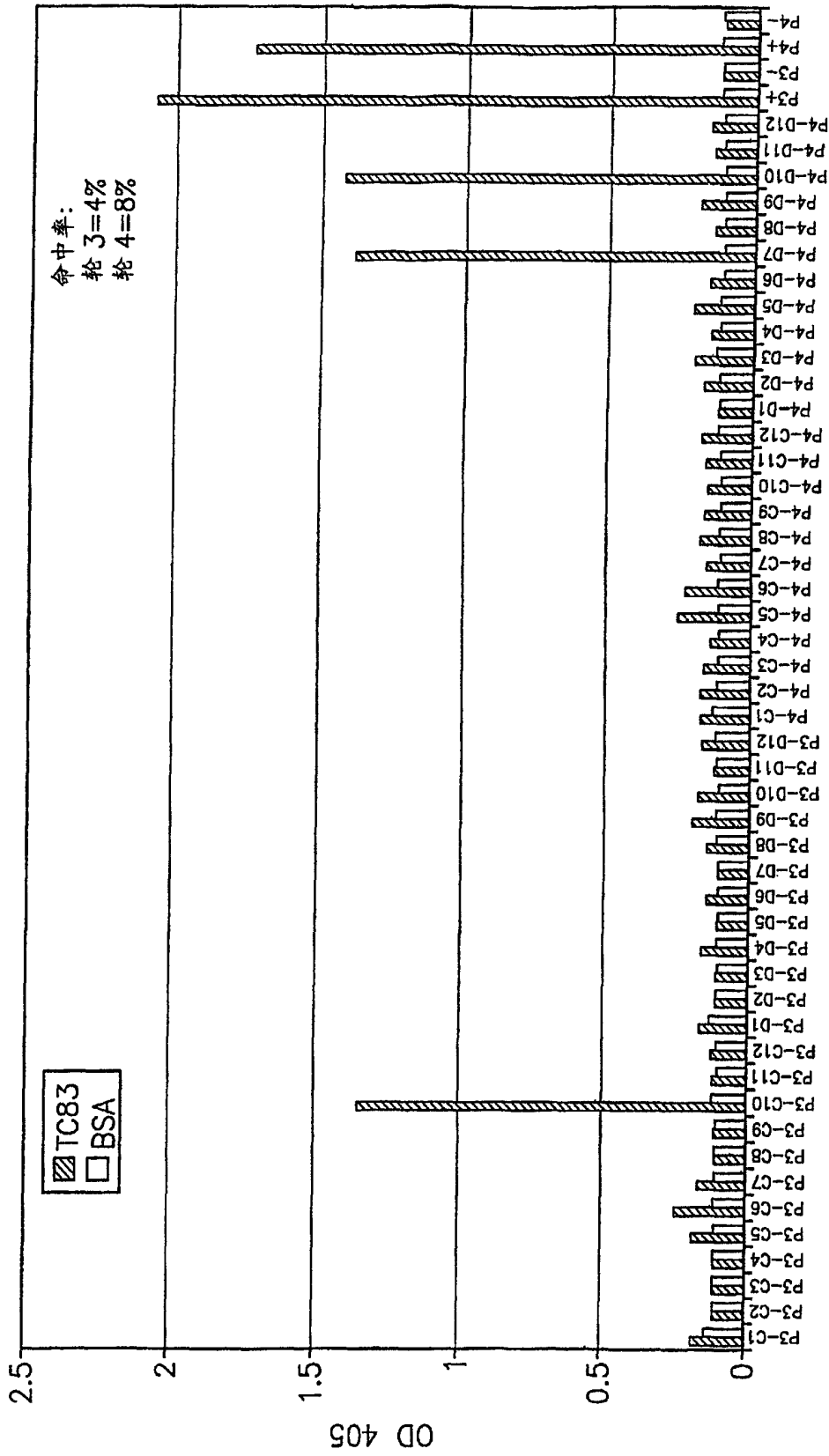


图 20C

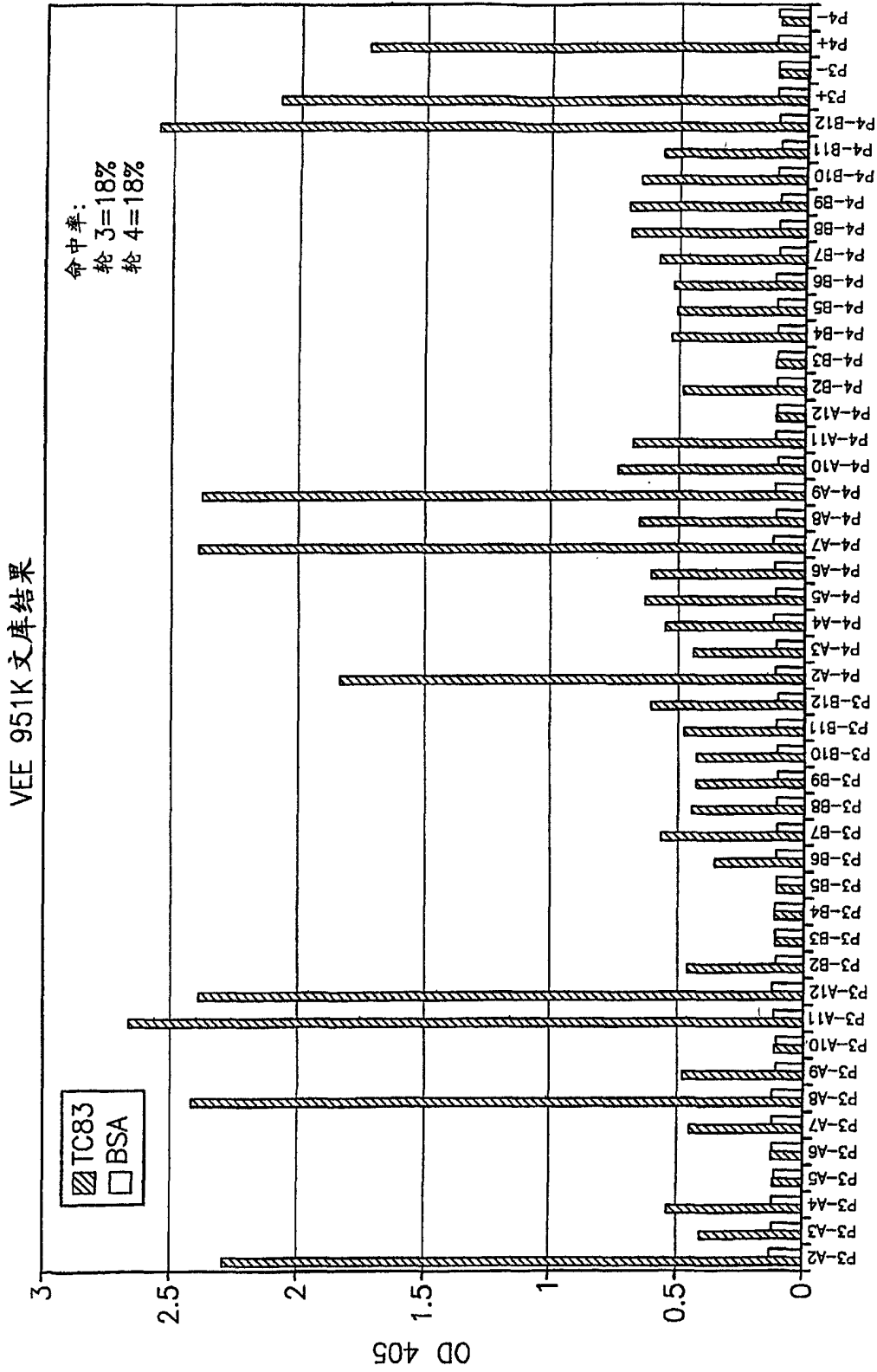


图 20D

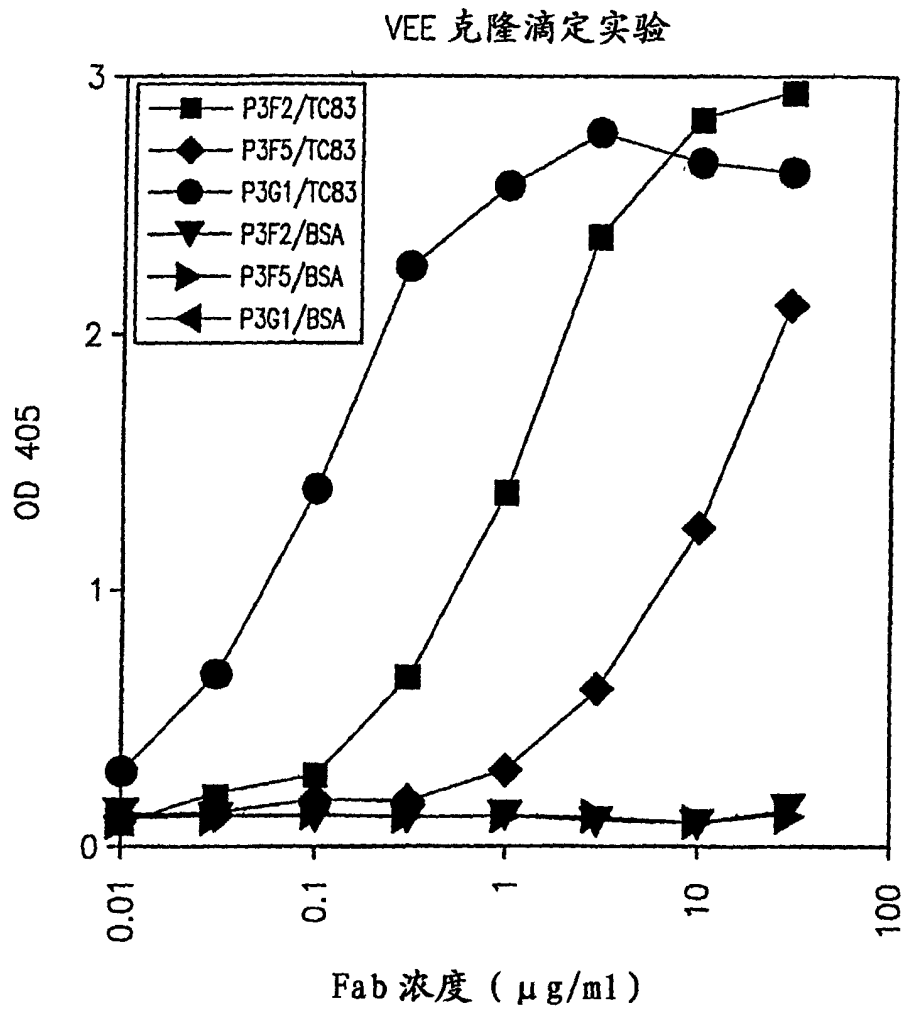


图 21

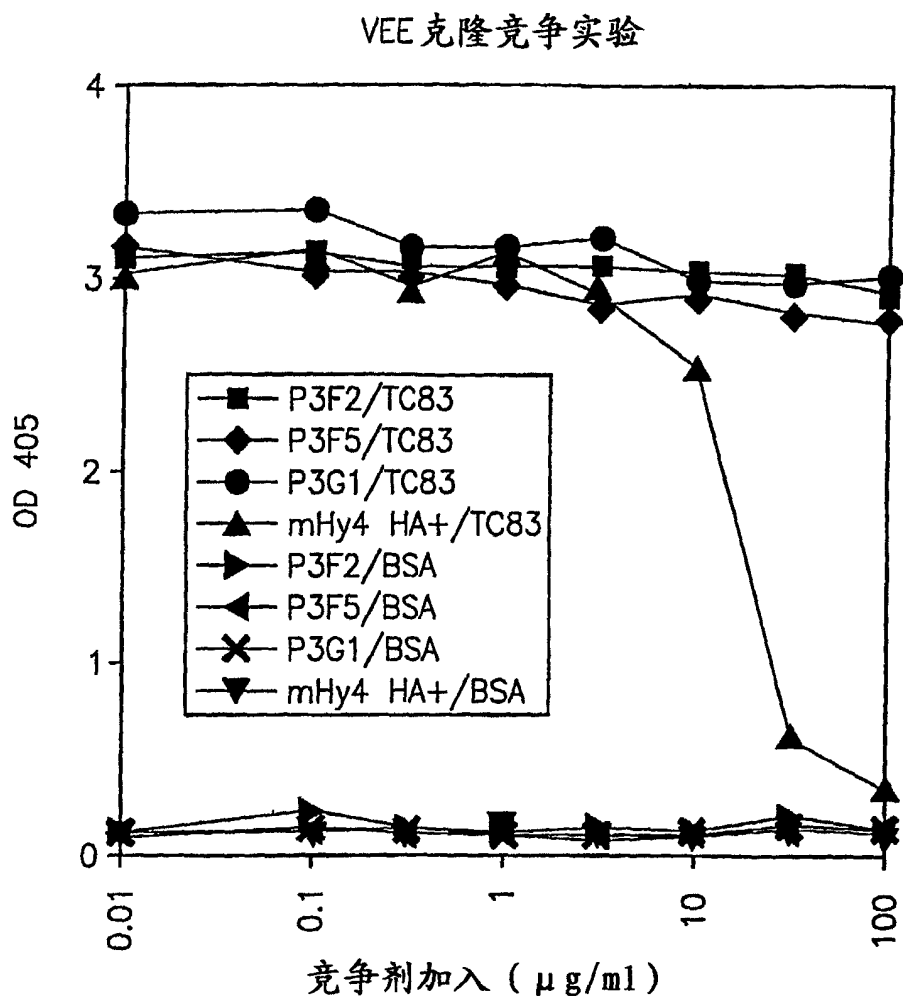


图 22

VEE 病毒完全人 Fabs VL 蛋白质序列

```

-----+-----+-----+-----+
              10              20              30              40
              +-----+-----+-----+
                                CDR1
S R E I V M T Q S P A T L S V S P G D T A T L S C R A S - Q S V G S N - L A W Y P3F2LCpro
S R Q S A L T Q - P H S A S G P P D Q T V T I S C S G S S S N I E G N T V N W Y P3F5LCpro
S R S Y V L T Q - P P S V S V A P G Q T A R I T C G G N - - N I G S K S V H W Y P3G1LCpro

              50              60              70              80
              +-----+-----+-----+
                                CDR2
Q Q K P G Q A P R L L I H G A S T R A T G I P G R F S G A G S G T E F T L T I S P3F2LCpro
Q Q F P G K A P Q L L I Y G K D Q R P S G V P D R F S A S K S G T S A S L T I S P3F5LCpro
Q Q R P G Q A P V L V V Y D D S D R P S G I P D R F S G S N S G N T A T L T I S P3G1LCpro

              90              100              110
              +-----+-----+-----+
                                CDR3
S L Q S D D F A V Y Y C Q Q Y H N - W P P L T F G G G T K V E I K P3F2LCpro (Seq. ID No: 113)
G L Q A E D E A D Y Y C A A W D D S L N G W V F G G G T K L T V L P3F5LCpro (Seq. ID No: 114)
R V E A G D E A D Y H C Q V W D S S S D H V V F G G G T K L T V L P3G1LCpro (Seq. ID No: 115)
    
```

图 23A

VEE 病毒完全人 Fabs VH 蛋白质序列

```

-----+-----+-----+-----+
              10              20              30              40
              +-----+-----+-----+
                                CDR1
E V Q L L E S G G G L I Q P G G S L R L S C A A S G F S V G T N S M T W V R Q A P3F2HCpro
E V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S C A A S G F T F D R Y G M H W V R Q A P3F5HCpro
E V Q L L E S G G G L I Q P G G S L R L S C A A S G F S V G T N S M T W V R Q A P3G1HCpro

              50              60              70              80
              +-----+-----+-----+
                                CDR2
P G K G L E W V S F I S I G G T T Y E - A D S V K G R F T I S R D S S K N T L Y P3F2HCpro
P G K G P E W V A V I S H D G S H E E Y A D S G K X R F T I S R D N S K N T L Y P3F5HCpro
P G K G L E W V S F I S I G G T T Y E - A D S V K G R F T I S R D S S K N T L Y P3G1HCpro

              90              100              110              120
              +-----+-----+-----+
                                CDR3
L Q M N T L R A E D T A V Y Y C A S Q - - - - L W F G E L F G H D V F D I W G P3F2HCpro
L Q M N S L R A E D T X V Y Y C A K D G A Y Y Y D Y S G Y P Y D Y N G I D V W G P3F5HCpro
L Q M N T L R A E D T A V Y Y C A S Q - - - - L W F G E L F G H D V F D I W G P3G1HCpro

              130
              +-----+
Q G T V V T V S S P3F2HCpro (Seq. ID No: 113)
Q G T V V V S S P3F5HCpro (Seq. ID No: 114)
Q G T V V T V S S P3G1HCpro (Seq. ID No: 115)
    
```

图 23B