



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103857697 A

(43) 申请公布日 2014. 06. 11

(21) 申请号 201280046452. 2

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2012. 09. 21

C07K 16/12 (2006. 01)

A61P 31/04 (2006. 01)

(30) 优先权数据

11182598. 0 2011. 09. 23 EP

61/545, 763 2011. 10. 11 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 03. 24

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2012/068703 2012. 09. 21

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/041707 EN 2013. 03. 28

(71) 申请人 伍兹堡尤利乌斯-马克西米利安斯
大学

地址 德国伍兹堡

(72) 发明人 克努特·奥尔森 尤多·洛伦茨
罗兰·E·孔特尔曼

(74) 专利代理机构 北京信慧永光知识产权代理
有限责任公司 11290

代理人 洪俊梅 张淑珍

权利要求书2页 说明书7页

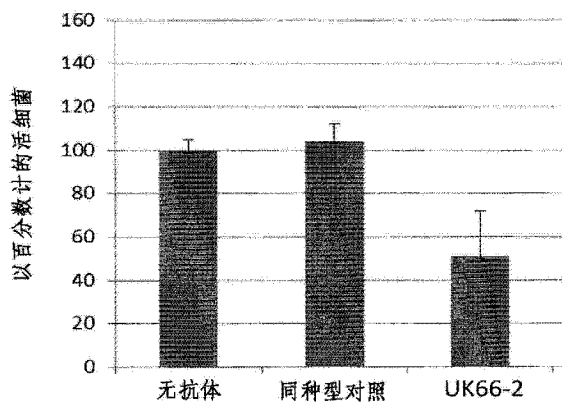
序列表15页 附图3页

(54) 发明名称

形成金黄色葡萄球菌表位结合位点的肽或肽
的组合

(57) 摘要

本发明关注形成金黄色葡萄球菌表位结合位点的肽或肽的组合,所述结合位点包含第一氨基酸序列和第二氨基酸序列,其中,所述第一氨基酸序列与序列 SEQ ID NO:1 至少 88% 一致;并且其中,所述第二氨基酸序列与序列 SEQ ID NO:2 至少 88% 一致。



1. 形成金黄色葡萄球菌表位结合位点的肽或肽的组合,所述结合位点包含第一氨基酸序列和第二氨基酸序列,其中,所述第一氨基酸序列与序列 SEQ ID NO:1 至少 88% 一致;并且其中,所述第二氨基酸序列与序列 SEQ ID NO:2 至少 88% 一致。

2. 如权利要求 1 所述的肽或肽的组合,其中,所述第一氨基酸序列与序列 SEQ ID NO:1 至少 90% 一致,特别是至少 92.5% 一致、特别是至少 95% 一致、特别是至少 97.5% 一致、特别是 100% 一致;和/或其中,所述第二氨基酸序列与序列 SEQ ID NO:2 至少 90% 一致,特别是至少 92.5% 一致、特别是至少 95% 一致、特别是至少 97.5% 一致、特别是 100% 一致。

3. 如前述权利要求中任一项所述的肽或肽的组合,其中,所述第一氨基酸序列为抗体或抗体片段的重链的一部分,和/或所述第二氨基酸序列为抗体或抗体片段的轻链的一部分;或者其中,所述第一氨基酸序列和所述第二氨基酸序列由单链可变片段(scFv)构成,或由含有抗体的 Fc 片段的单链可变片段(scFvFc)构成。

4. 如权利要求 3 所述的肽或肽的组合,其中,所述抗体为单克隆抗体,特别是 IgG 型的抗体,特别是 IgG1 型、IgG2 型或 IgG4 型的抗体。

5. 如权利要求 3 或 4 所述的肽或肽的组合,其中,所述片段为 Fab 片段、Fab/c 片段、Fv 片段、Fab' 片段、或 F(ab')₂ 片段。

6. 如权利要求 3-5 中任一项所述的肽或肽的组合,其中,所述抗体是在细胞系、特别是昆虫细胞系或哺乳动物细胞系、特别是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系或杂交瘤细胞系的细胞中生产的重组抗体。

7. 如权利要求 3-6 中任一项所述的肽或肽的组合,其中,所述抗体中不是由所述第一氨基酸序列和所述第二氨基酸序列形成的部分与人抗体的相应部分至少 85% 一致,特别是至少 90% 一致、特别是至少 92.5% 一致、特别是至少 95% 一致、特别是至少 97.5% 一致、特别是 100% 一致。

8. 如权利要求 3-7 中任一项所述的肽或肽的组合,其中,所述轻链包含序列 SEQ ID NO:6、特别是序列 SEQ ID NO:7;以及所述重链包含序列 SEQ ID NO:4、特别是序列 SEQ ID NO:5,序列 SEQ ID NO:9、特别是序列 SEQ ID NO:10,或序列 SEQ ID NO:11、特别是 SEQ ID NO:12。

9. 如前述权利要求中任一项所述的肽或肽的组合作为药物的用途。

10. 如权利要求 9 所述的肽或肽的组合,其中,所述药物为治疗如下人类或动物的药物:具有金黄色葡萄球菌感染、特别是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌或甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌感染的人类或动物;或处于受到此类感染的风险中的人类或动物。

11. 如权利要求 10 所述的肽或肽的组合,其中,所述人类或动物患有乳腺炎、金黄色葡萄球菌菌血症、血流感染、假体感染、移植物感染、软组织感染、手术相关的感染、婴儿或新生儿感染、透析相关的感染、肺炎、骨感染、或由感染引起的脓毒症。

12. 如权利要求 9-11 中任一项所述的肽或肽的组合,其中,所述肽或肽的组合与针对金黄色葡萄球菌的至少一种另一表位的至少一种其它肽或肽的组合一起存在于混合物中。

13. 如权利要求 9-12 中任一项所述的肽或肽的组合,其中,所述肽或肽的组合与至少一种抗生素一起存在于混合物中。

14. 如权利要求 9-13 中任一项所述的肽或肽的组合,其中,所述肽或肽的组合与哺乳动物、特别是人类的血浆或血液一起存在于混合物中。

15. 如权利要求 9-14 中任一项所述的肽或肽的组合,其中,所述药物为用于全身应用和 / 或局部应用的药物。

16. 含有如权利要求 1-8 中任一项所述的肽或肽的组合的用于金黄色葡萄球菌的检测的试剂盒。

17. 如权利要求 1-8 中任一项所述的肽或肽的组合在金黄色葡萄球菌的检测中的用途。

18. 生产如权利要求 3-8 中任一项所述的抗体、抗体片段、ScFv 或 ScFvFc 的细胞系。

19. 治疗人类或动物的方法,所述人类或动物具有金黄色葡萄球菌感染、特别是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌或甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌感染,或者处于受到此类感染的风险中,其中,将如权利要求 1-8 中任一项所述的肽或肽的组合给予所述人类或动物。

20. 根据权利要求 19 的方法,其中,所述人类或动物患有乳腺炎、金黄色葡萄球菌菌血症、血流感染、假体感染、移植物感染、软组织感染、手术相关的感染、婴儿或新生儿感染、透析相关的感染、肺炎、骨感染、或由感染引起的脓毒症。

21. 如权利要求 19 或 20 所述的方法,其中,所述肽或肽的组合与针对金黄色葡萄球菌的至少一种另一表位的至少一种其它肽或肽的组合一起存在于混合物中。

22. 如权利要求 19-21 中任一项所述的方法,其中,在给予之前,将所述肽或肽的组合与哺乳动物、特别是人类的血浆或血液混合。

23. 如权利要求 19-22 中任一项所述的方法,其中,所述肽或肽的组合局部给予或全身给予,特别是静脉内给予、肺内给予、腹膜内给予、经鼻给予或舌下给予。

24. 如权利要求 19-23 中任一项所述的方法,其中,所述肽或肽的组合与至少一种抗生素一起给予。

形成金黄色葡萄球菌表位结合位点的肽或肽的组合

技术领域

[0001] 本发明关注形成金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*=*S. aureus*)表位结合位点的肽或肽的组合(arrangement of peptides)、含有该肽或肽的組合的试剂盒、该肽或肽的組合的用途、生产包含该肽或肽的組合的抗体的细胞系、以及治疗方法。

背景技术

[0002] 从 W02010/133600A1 中知晓了针对金黄色葡萄球菌 IsaA 表位的抗体或其片段。这些抗体具有由具有第一可变区的重链和具有第二可变区的轻链所形成的结合位点,其中,所述第一可变区的序列可为 SEQ ID NO:13,所述第二可变区的序列可为 SEQ ID NO:14。在哺乳动物中针对(vis-à-vis)金黄色葡萄球菌的抗体的效力取决于由吞噬血细胞(phagocytizing blood cells)通过吞噬对金黄色葡萄球菌的杀灭。由 W02010/133600A1 中已知的抗体促进了吞噬过程。相比非特异性的对照抗体,在有 IsaA 表位特异性抗体存在的情况下孵育 30 分钟后,由人中性粒细胞造成的金黄色葡萄球菌的杀灭增强了约 25%-30%。

发明内容

[0003] 本发明的目的是提供金黄色葡萄球菌表位结合位点,所述金黄色葡萄球菌表位结合位点在关于由吞噬血细胞杀灭金黄色葡萄球菌的抗体或抗体片段中非常有效,因此非常适于由金黄色葡萄球菌所引起的感染的治疗。此外,所述结合位点应该非常适于金黄色葡萄球菌的检测。本发明的另一目的为提供含有所述结合位点的试剂盒,所述结合位点的用途,分泌包含所述结合位点的抗体、抗体片段、ScFv 或 ScFvFc 的细胞系,以及治疗方法。

[0004] 该目的由权利要求 1、9、16、17、18 和 19 的主题解决。本发明的实施方式公开于权利要求 2-8、10-15 和 20-24 中。

[0005] 根据本发明,提供了形成金黄色葡萄球菌表位结合位点的肽或肽的組合,所述结合位点包含第一氨基酸序列和第二氨基酸序列。所述第一氨基酸序列与序列 SEQ ID NO:1 至少 88% 一致;所述第二氨基酸序列与序列 SEQ ID NO:2 至少 88% 一致。

[0006] 在实施方式中,所述第一氨基酸序列与序列 SEQ ID NO:1 至少 90% 一致,特别是至少 92.5% 一致、特别是至少 95% 一致、特别是至少 97.5% 一致、特别是 100% 一致。所述第二氨基酸序列与序列 SEQ ID NO:2 至少 90% 一致,特别是至少 92.5% 一致、特别是至少 95% 一致、特别是至少 97.5% 一致、特别是 100% 一致。

[0007] 所述第一氨基酸序列可为抗体或抗体片段的重链的一部分;和/或所述第二氨基酸序列可为抗体或抗体片段的轻链的一部分。在这种情况下,所述第一氨基酸序列和所述第二氨基酸序列形成所述抗体或抗体片段的可变区。所述结合位点也可由单链可变片段(single chain variable fragment)形成。在这种情况下,所述第一氨基酸序列和所述第二氨基酸序列由单链可变片段(scFv)构成,或由含有抗体的 Fc 片段的单链可变片段(scFvFc)构成。Fc 片段增强了 scFvFc 所结合的金黄色葡萄球菌的吞噬。

[0008] 本发明人改进了出自 W02010/133600A1 的抗体之一的结合区域,由此开发出了相

比该已知抗体而言在肝素化人全血中更有效支持由吞噬血细胞通过吞噬来杀灭金黄色葡萄球菌的结合位点。从下述比对可以看出,序列 SEQ ID NO:1 与出自 W02010/133600A1 的相应序列 SEQ ID NO:13 在 118 个氨基酸中有 17 个氨基酸不同;序列 SEQ ID NO:2 与出自 W02010/133600A1 的相应序列 SEQ ID NO:14 在 113 个氨基酸中有 8 个氨基酸不同:

[0009] SEQ ID NO:1 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWVRQAPGKGLNVS DINGNGGSTYY 60
[0010] V L ESGGGLV GGS L SC ASGFTFSNYYMSWVRQ P K LE V DINGNGGSTYY
[0011] SEQ ID NO:13 MADVKLVESGGGLVKLGSLKLSASGFTFSNYYMSWVRQTPEKRLELVADINGNGGSTYY 62
[0012] SEQ ID NO:1 PDTVKG RFTISRDN SKNTLYLQ MNSLR AEDTAVYYCVR RGGYYALDYWGQGTTVTVSS 118
[0013] PDTVKG RFTISRDN KNTLYLQ M SL EDTA YYCVR RGGYYALDYWGQGTTVTVSS
[0014] SEQ ID NO:13 PDTVKG RFTISRDN AKNTLYLQ MSSLK SEDTALYYCVR RGGYYALDYWGQGTTVTVSS 120
[0015] SEQ ID NO:2 DVVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLVHINGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYRVSNRF 60
[0016] DVVMTQTPLSL V G ASISCRSSQSLVHINGNTYLHWYLQKPGQSP LLIYRVSNRF
[0017] SEQ ID NO:14 DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHINGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYRVSNRF
[0018] iEQ ID NO:2 SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPWTFGGGTKLELKR 113
[0019] SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISFVEAED G VY CSQSTHVPWTFGGGTKLELKR
[0020] SEQ ID NO:14 SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLG VYFCSQSTHVPWTFGGGTKLELKR 113
[0021] 一致的氨基酸在序列间的空隙中显示出。

[0022] 含有包含所述第一氨基酸序列和所述第二氨基酸序列的可变区的抗体对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌和甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌中的免疫显性(immunodominant)结构 IsaA 表现出高亲和力,并对于与这一结构的结合显示出高特异性。

[0023] 所述抗体可为单克隆抗体,特别是 IgG 型的抗体,特别是 IgG1 型、IgG2 型或 IgG4 型的抗体。所述片段可为 Fab 片段、Fab/c 片段、Fv 片段、Fab' 片段、或 F(ab')₂ 片段。这些片段对金黄色葡萄球菌的检测尤其有用,因为金黄色葡萄球菌的细胞壁含有蛋白 A,该蛋白 A 经由免疫球蛋白的 Fc 部分非特异性地结合免疫球蛋白。

[0024] 在本发明的实施方式中,所述抗体是在细胞系、特别是昆虫细胞系或哺乳动物细胞系、特别是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系或杂交瘤细胞系的细胞中生产的重组抗体。所述抗体中不是由所述第一氨基酸序列和所述第二氨基酸序列形成的部分与人抗体的相应部分至少 85% 一致,特别是至少 90% 一致、特别是至少 92.5% 一致、特别是至少 95% 一致、特别是至少 97.5% 一致、特别是 100% 一致。所述抗体的轻链可包含序列 SEQ ID NO:6、特别是序列 SEQ ID NO:7;重链可包含序列 SEQ ID NO:4、特别是序列 SEQ ID NO:5,序列 SEQ ID NO:9、特别是序列 SEQ ID NO:10,或序列 SEQ ID NO:11、特别是序列 SEQ ID NO:12。序列 SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:10 和 SEQ ID NO:12 包含前导序列(leader sequence)SEQ ID NO:8,所述前导序列来自 MOPC63 (KV3A9_小鼠的 Igκ 链 V-III)。这一前导序列使得能够在哺乳动物细胞中得以良好表达。序列 SEQ ID NO:4 包含序列 SEQ ID NO:1 和 IgG1 重链(人 γ1 同种异型 Gm1,17)。序列 SEQ ID NO:6 包含序列 SEQ ID NO:2 和 IgG 轻链 K。序列 SEQ ID NO:9 包含序列 SEQ ID NO:1 和 IgG2 重链(同种异型 G2m(23))。序列 SEQ ID NO:11 包含序列 SEQ ID NO:1 和 IgG4 重链。

[0025] 根据本发明的肽或肽的组合可用作药物。特别是,它们可用于治疗如下人类或动物的药物:具有金黄色葡萄球菌感染、特别是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌或甲氧西林

敏感金黄色葡萄球菌感染的人类或动物 ;或处于受到此类感染的风险中的人类或动物。就本发明而言,所述治疗包括预防(prophylaxis)。所述动物可为哺乳动物。所述人类或动物可具有乳腺炎(mastitis);金黄色葡萄球菌菌血症(bacteremia)、特别是原发性菌血症或继发性菌血症;血流感染(blood stream infection)、特别是原发性血流感染或继发性血流感染;假体感染(prosthetic infection);移植物感染(graft infection);软组织感染;手术相关的感染;婴儿或新生儿感染;透析相关的感染;肺炎;骨感染;或由感染引起的脓毒症(sepsis)。所述乳腺炎可为牛乳腺炎。如果奶牛具有牛乳腺炎,该奶牛生产不出可用的牛奶;而如果根据通常情况用抗生素对该奶牛进行治疗,该奶牛所生产的牛奶必须被丢弃,直至在该奶牛的牛奶中不含有抗生素。常规治疗的这一缺点可通过将根据本发明的肽或肽的组合作为用于治疗牛乳腺炎的药物得以避免。

[0026] 所述肽或肽的组合可以与针对金黄色葡萄球菌的至少一种另一表位的至少一种其它肽或肽的组合一起存在于混合物中。该另一表位可位于表位(即 IsaA)所处的抗原上,或位于另一抗原上。相比使用仅含有根据本发明的肽或肽的组的药物,使用此类混合物作为药物可能更高效。这可归因于金黄色葡萄球菌的高变异性引起不同菌株上抗原不同程度的表达,因此,相比仅由抗体或片段识别的细菌,更多细菌被抗体或片段的混合物识别出。

[0027] 所述肽或肽的组合可以与至少一种抗生素一起存在于混合物中。在待用所述药物治疗的人类或动物中,除普通的金黄色葡萄球菌外,可能还存在突变的金黄色葡萄球菌。所述突变的金黄色葡萄球菌可能具有不能被根据本发明的肽或肽的组合识别的突变 IsaA。在这种情况下,所述抗生素可有效地对抗该突变的金黄色葡萄球菌。

[0028] 根据本发明的肽或肽的组合可以与哺乳动物、特别是人类的血浆或血液一起存在于混合物中。本发明人发现,相比包含于盐溶液中的根据本发明的肽或肽的组合,与血浆混合的根据本发明的肽或肽的组合可有效得多。

[0029] 所述药物可以是制备用于全身应用和 / 或局部应用的药物。本发明人认识到,用根据本发明的肽或肽的组合治疗严重金黄色葡萄球菌感染使得死亡率和被治疗的人类或动物器官中的金黄色葡萄球菌数显著减少。

[0030] 本发明还关注含有根据本发明的肽或肽的组的用于金黄色葡萄球菌的检测、特别是高特异性检测的试剂盒。

[0031] 本发明进一步关注根据本发明的肽或肽的组合在金黄色葡萄球菌的检测、特别是高特异性检测中的用途。

[0032] 另外,本发明关注生产上面详述的抗体、抗体片段、ScFv 或 ScFvFc 的细胞系,特别是昆虫细胞系或哺乳动物细胞系、特别是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系或杂交瘤细胞系。

[0033] 本发明进一步关注治疗人类或动物的方法,所述人类或动物具有金黄色葡萄球菌感染、特别是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌或甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌感染;或者处于受到此类感染的风险中,其中,将根据本发明的肽或肽的组合给予所述人类或动物。将所述肽或肽的组合以如下剂量给予:足以减少所述人类或动物中的金黄色葡萄球菌的量;或者足以清除所述人类或动物中的金黄色葡萄球菌。可将所述肽或肽的组合与合适的载体进行混合。

[0034] 所述人类或动物可患有乳腺炎;金黄色葡萄球菌菌血症、特别是原发性菌血症或

继发性菌血症；血流感染、特别是原发性血流感染或继发性血流感染；假体感染；移植物感染；软组织感染；手术相关的感染；婴儿或新生儿感染；透析相关的感染；肺炎；骨感染；或由感染引起的脓毒症。

[0035] 所述肽或肽的组合可以与针对金黄色葡萄球菌的至少一种另一表位的至少一种其它肽或肽的组合一起存在于混合物中。在给予之前，所述肽或肽的组合可以与哺乳动物、特别是人类的血浆或血液混合。所述肽或肽的组合可局部给予或全身给予，特别是静脉内给予、肺内给予、腹膜内给予、经鼻给予或舌下给予。它们也可与至少一种抗生素一起给予。

附图说明

[0036] 图 1 示出测定不同抗 IsaA 抗体与 IsaA 抗原结合的竞争 ELISA 结果。

[0037] 图 2 示出测定不同抗 IsaA 抗体与不同金黄色葡萄球菌菌株结合的细菌细胞 ELISA。

[0038] 图 3 示出对在肝素化人全血中由吞噬血细胞通过吞噬所杀灭的金黄色葡萄球菌菌株 Newman 的定量。

[0039] 图 4 示出对来自健康血液供体(n=15)的肝素化人全血中由吞噬血细胞通过吞噬所杀灭的金黄色葡萄球菌菌株 Newman 的定量。

[0040] 图 5 示出对来自透析患者的肝素化人全血中由吞噬血细胞通过吞噬所杀灭的金黄色葡萄球菌菌株 Newman 的定量。

[0041] 图 6 示出在 HL-60 细胞中，在有两种浓度的抗 IsaA 抗体 UK66-2 以及同种型对照存在的情况下，对生物发光的金黄色葡萄球菌菌株 Newman (Newlux) 的调理吞噬杀灭。

具体实施方式

[0042] 在大肠杆菌(E. coli)中表达含有序列 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:3 以及其它序列的 ScFv 分子，并在 ELISA 和竞争 ELISA 中测试其结合和亲和力。结果显示，含有序列 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2 的 ScFv 分子的亲和力比含有序列 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:3 的 ScFv 分子的亲和力高约 10 倍。

[0043] 将用于表达完整抗体的载体构建体转染进 CHO 细胞。表达带有 Igk 前导序列 SEQ ID NO:8 的根据序列 SEQ ID NO:4 (包含序列 SEQ ID NO:1)的 IgG1 重链(人 γ 1 同种异型 Gm1, 17) (产生序列 SEQ ID NO:5)以及带有 Igk 前导序列 SEQ ID NO:8 的根据序列 SEQ ID NO:6 (包含序列 SEQ ID NO:2)的 IgG 轻链 K (产生序列 SEQ ID NO:7)来形成抗体 UK66-2。为了研究同种型对功能活性的影响，合成 IgG2 和 IgG4 同种型。为此，将 IgG1 重链用带有 Igk 前导序列 SEQ ID NO:8 的根据序列 SEQ ID NO:9 的 IgG2 重链(同种异型 G2m(23)) (产生 SEQ ID NO:10)替代；或者用带有 Igk 前导序列 SEQ ID NO:8 的根据序列 SEQ ID NO:11 的 IgG4 重链(产生 SEQ ID NO:12)替代。

[0044] 在表达后，通过蛋白 A 柱将 IgG1 抗体从 CHO 细胞的上清液中纯化出。在 ELISA、竞争 ELISA、蛋白印迹以及免疫荧光中测试纯化抗体的结合动力学以及结合，并在吞噬分析中用人吞噬血细胞测试纯化抗体的功能。在功能分析中，含有序列 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2 的抗体(UK66-2)增强了氧化猝发(oxidative burst)；并且，相比已知抗体 UK66，其对金黄色葡萄球菌的杀灭显著更强。

[0045] 使用 **BIACORE®2000** 系统(GE Healthcare Europe GmbH, Munzinger Strasse5, 79111Freiburg, Germany),借助于无标记的表面等离子体共振对 IsaA 与固定化抗体 UK66-2 的结合动力学进行测定。使用抗 Fab 抗体实施抗体 UK66-2 的可逆固定。相互作用分析使用 HBS-EP 缓冲液(10mM HEPES pH7.4, 150mM NaCl, 3.4mM EDTA, 0.005%Tween20)进行。记录 25℃流速为 30 μ l/min 时的传感图(sensorgrams)。

[0046] 使用 BIAevaluation 软件 4.0.1 将获得的传感图拟合为 1:1Langmuir 结合模型,计算缔合(k_{on})和解离(k_{off})的速率常数以及亲和力。以这样的方式,在两个独立测量中测定出解离常数 K_D 为 4.8nM。测定出 UK66-2 和 IsaA 间相互作用的缔合和解离速率常数分别为 $3.7 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ (k_{on})和 $1.8 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$ (k_{off})。

[0047] 图 1 显示测定不同抗 IsaA 抗体与可溶性重组 IsaA 抗原结合的竞争 ELISA 结果。450nm 处的光密度表示所述抗体与 IsaA 的结合。加入不同浓度的可溶性 IsaA。三条线表示用下列抗 IsaA 抗体获得的结果:

[0048] -0.01 μ M 可溶性 IsaA 处上面的线:UK66 (出自 W02010/133600A1 的参比抗体);

[0049] -0.01 μ M 可溶性 IsaA 处中间的线:UK66-2(具有包含序列 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2 的结合位点的抗体);

[0050] -0.01 μ M 可溶性 IsaA 处下面的线:UK66-3(具有包含序列 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:3 的结合位点的抗体)。

[0051] 方法说明:

[0052] 将 Nunc-Maxisorp96 孔板用 50 μ l/孔的 IsaA (处于 1×PBS 中,0.5 μ g/孔)进行涂覆,并在 4℃孵育过夜。第二天,将板用含有 0.05%Tween20 的 PBS pH7.4 (PBST)洗涤 3 次。洗涤后,通过添加 200 μ l 15% 脱脂奶粉/PBS 进行封闭,并在室温孵育 1h。将孔用 PBST (0.05%)洗涤 2 次,以 0.4 μ M-0.01 μ M 的系列浓度添加抗 IsaA 一抗。将抗 IsaA-IgG1 一抗稀释于 2.5% 脱脂奶粉/PBS 中,并在 37℃孵育 1h。然后将孔用 PBST (0.05%)洗涤 3 次,加入 50 μ l 以 1:5000 稀释于 2.5% 脱脂奶粉/PBS 中的连接辣根过氧化物酶的二抗,并在 37℃孵育 1h。将孔用 PBST (0.05%)洗涤 4 次,加入 50 μ l TMB (Thermo Scientific Pierce ELISA 底物),并在 37℃孵育 15min。用 100 μ l 的 1N H_2SO_4 终止反应,用 ELISA 读板器对 OD450nm 处的底物反应的光密度进行分析。

[0053] 图 2 示出测定不同抗 IsaA 抗体与金黄色葡萄球菌菌株 USA300、SH1000、RN4220、E、MA12 以及 MA12isaA- 的结合的细菌细胞 ELISA。在 MA12isaA- 中,免疫显性结构 IsaA 被删除。在 450nm 处的光密度表明抗体与细菌细胞的结合。3 个柱表示用下列抗 IsaA 抗体得到的结果:

[0054] -左柱:抗体 UK66 (参比抗体);

[0055] -中柱:抗体 UK66-2;

[0056] -右柱:抗体 UK66-3。

[0057] 方法说明:

[0058] 在 LB 培养基中将金黄色葡萄球菌菌株在 37℃培养过夜。通过在 13000rpm 离心 1min 使细菌沉淀,并用 PBS (磷酸盐缓冲盐水)进行洗涤。在离心步骤后,将沉淀重悬于 1ml PBS 中。制备含有 5×10^7 细菌/50 μ l 的细菌悬浮液。用 50 μ l/孔的细菌悬浮液涂覆 Nunc-Maxisorp96 孔板,并在 4℃孵育过夜。第二天,用含有 0.05%Tween20 的 PBS pH7.4

(PBST) 将板洗涤 3 次。洗涤后,通过添加 200 μ l 15% 脱脂奶粉 /PBS 进行封闭,并在室温孵育 1h。将孔用 PBST (0.05%) 洗涤 2 次,添加抗 IsaA 一抗。将抗 IsaA-IgG1 一抗以 1:2000 稀释于 2.5% 脱脂奶粉 /PBS 中,以 50 μ l /孔添加,并在 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h。然后将孔用 PBST (0.05%) 洗涤 3 次,加入 50 μ l 以 1:5000 稀释于 2.5% 脱脂奶粉 /PBS 中的连接辣根过氧化物酶的二抗,并在 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h。将孔用 PBST (0.05%) 洗涤 4 次,加入 50 μ l TMB (Thermo Scientific Pierce ELISA 底物),并在 37 $^{\circ}$ C 孵育 15min。用 100 μ l 的 1N H_2SO_4 终止反应,用 ELISA 读板器对 OD450nm 处的底物反应的光密度进行分析。

[0059] 图 3 显示对肝素化人全血中由吞噬血细胞通过吞噬所杀灭的金黄色葡萄球菌菌株 Newman 的定量。将细菌与肝素化人全血孵育 30min。将在无抗体溶液的情况下孵育后所得的活细菌数设置为 100% (左柱)。相比同种型对照抗体(中柱),在有 UK66-2 存在(右柱)的情况下,杀灭显著增强。

[0060] 方法说明:

[0061] 在 LB 培养基中将金黄色葡萄球菌菌株 Newman 在 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。通过在 13000rpm 离心 1min 使细菌沉淀,并用 PBS 进行洗涤。重复离心步骤,并将沉淀重悬于 1ml PBS 中。制备 5×10^7 细菌 /20 μ l 的细菌溶液。将 100 μ l 肝素化血液加入 1.5ml 管中,在冰上保存。除含有细菌但不含有抗体的阴性对照样品外,加入 20 μ l 细菌悬浮液和抗体溶液。将样品在杂交炉中于 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min,伴随持续的旋转混合。通过将样品放置于冰上使吞噬停止。用 0.1% 新制备的 Saponin 裂解血细胞(在冰上 20min)。制备两系列的样品稀释液。分别将 20 μ l 10^{-2} 、 10^{-3} 和 10^{-4} 稀释液铺于 LB 板上,每种 2 份,并在 37 $^{\circ}$ C 孵育 24h。对克隆进行计数并计算杀灭,将无抗体溶液的血液中的活细菌数设置为 100%。

[0062] 图 4 示出对来自健康血液供体(n=15)的肝素化人全血中由吞噬血细胞通过吞噬所杀灭的金黄色葡萄球菌菌株 Newman 的定量。图 5 示出对来自透析患者(n=7)的肝素化人全血中由吞噬血细胞通过吞噬所杀灭的金黄色葡萄球菌菌株 Newman 的定量。在两种情况下,将细菌与肝素化血液孵育 60min。将在无抗体溶液的情况下孵育后所得到的活细菌数设置为 100% (左散点“空白对照(placebo)”)。相比同种型对照抗体(第二散点“同种型对照 [900 μ g/ml]”),在有 UK66-2 存在的情况下,杀灭显著增强(第三散点和第四散点“UK66-2 [75 μ g/ml]”和“UK66-2 [900 μ g/ml]”)。

[0063] 方法说明:

[0064] 在 LB 培养基中将金黄色葡萄球菌菌株 Newman 在 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。通过在 13000rpm 离心 1min 使细菌沉淀,并用 PBS 进行洗涤。重复离心步骤,并将沉淀重悬于 1ml PBS 中。制备 5×10^7 细菌 /20 μ l 的细菌溶液。将 100 μ l 肝素化血液加入 1.5ml 管中,在冰上保存。除含有细菌但不含有抗体的阴性对照样品外,加入 20 μ l 细菌悬浮液和抗体溶液。将样品在杂交炉中于 37 $^{\circ}$ C 孵育 60min,伴随持续的旋转混合。通过将样品放置于冰上使吞噬停止。用 0.1% 新制备的 Saponin 裂解血细胞(在冰上 20min)。制备两系列的样品稀释液。分别将 20 μ l 10^{-2} 、 10^{-3} 和 10^{-4} 稀释液铺于 LB 板上,每种 2 份,并在 37 $^{\circ}$ C 孵育 24h。对克隆进行计数并计算杀灭。将无抗体溶液的血液中的活细菌数设置为 100%。

[0065] 图 6 显示在 HL-60 细胞中,在有两种浓度的抗 IsaA 抗体 UK66-2 (20 μ g/ml 和 200 μ g/ml) 以及同种型对照 (200 μ g/ml) 存在的情况下,对生物发光的金黄色葡萄球菌 (S. a.) 菌株 Newman (Newlux) 的杀灭。通过测量生物发光来对存活细菌的相对数量进行测

定。存活细菌表示为发光(RLU= 相对光单位)。细菌杀灭与 UK66-2 是浓度依赖的,并且在同种型匹配的人 IgG1 对照抗体中并未观察到细菌杀灭。

[0066] 方法说明:

[0067] 使用怀有 luxABCEd 操纵子的金黄色葡萄球菌菌株 Newman 的单个菌落,将其接种至 5ml 的 LB 培养基中。因为 luxABCEd 操纵子在活细菌中引起发光,但在死细菌中不引起发光,因此发光与活细菌数相关。将细菌培养过夜,并将 50 μ l 该培养物用于接种至 5ml 补充有 30 μ g/ml 卡那霉素的 LB 培养基中。将所述培养物在旋转摇荡器上以 200rpm 在 37°C 培养 4-6h。使用 Lumat LB9501 光度计(Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany)测定细菌的生物发光。当 100 μ l 的培养物所生成的生物发光信号在 16000-24000 相对光单位(RLU)之间时,所述培养物适于进行分析。培养后,将细菌在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中洗涤 2 次,并将其以 1×10^9 /ml 的终浓度重悬于 **Opti-MEM[®]** 培养基(Life Technologies, Darmstadt, Germany)中。用 0.8%DMF 使吞噬性 HL-60 细胞分化 5 天,并在 **Opti-MEM[®]** 中重悬至 1×10^8 细胞 /ml,并在 96 孔组织培养板(Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany)中以 50 μ l 每孔进行接种。加入抗体溶液(50 μ l),随后加入 100 μ l 金黄色葡萄球菌(1×10^9 /ml)。将 HL-60 细胞、抗体和细菌在 37°C 进行孵育,并以 15min 的间隔对生物发光持续测量 240min,以测定最佳的信噪比(signal-noise ratio)。所有分析一式三份进行,并重复至少 3 次。使用多模式读板器 Infinite200Pro (TECAN, **Männedorf**, Switzerland)测定生物发光。

[0001]

序列表

<110> 伍兹堡 尤利乌斯-马克西米利安斯大学
 <120> 形成金黄色葡萄球菌表位结合位点的肽或肽的组合
 <130> 527938EH
 <160> 14
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 来自小家鼠的序列的改进序列
 <400> 1
 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 Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Asp Ile Asn Gly Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 2
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 来自小家鼠的序列的改进序列
 <400> 2
 Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ile
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

[0002]

50	55	60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile		
65	70	75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser		
	85	90 95
Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys		
	100	105 110
Arg		
<210> 3		
<211> 113		
<212> PRT		
<213> 人工的		
<220>		
<223> 来自小家鼠的序列的改进序列		
<400> 3		
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
1	5	10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ile		
	20	25 30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala		
	35	40 45
Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ile Pro		
	50	55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile		
65	70	75 80
Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser		
	85	90 95
Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys		
	100	105 110
Arg		
<210> 4		
<211> 448		
<212> PRT		
<213> 人工的		
<220>		
<223> 含有SEQ ID NO:1和IgG1重链(人gamma1 同种异型Gm1,17)的序列		
<400> 4		
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 Phe Ser Asn Tyr		

[0003]

	20	25	30
Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	35	40	45
Ser Asp Ile Asn Gly Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val	50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	85	90	95
Val Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr	100	105	110
Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro	115	120	125
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly	130	135	140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn	145	150	155
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln	165	170	175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser	180	185	190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser	195	200	205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr	210	215	220
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser	225	230	235
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg	245	250	255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro	260	265	270
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala	275	280	285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val	290	295	300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr	305	310	315
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr			

[0004]

	325		330		335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu					
	340		345		350
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys					
	355		360		365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser					
	370		375		380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp					
	385		390		395
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser					
	405		410		415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala					
	420		425		430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys					
	435		440		445
<210> 5					
<211> 468					
<212> PRT					
<213> 人工的					
<220>					
<223> 带有前导序列SEQ ID NO:8的SEQ ID NO:4					
<400> 5					
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro					
1	5		10		15
Gly Ser Thr Gly Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val					
	20		25		30
Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr					
	35		40		45
Phe Ser Asn Tyr Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly					
	50		55		60
Leu Glu Trp Val Ser Asp Ile Asn Gly Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr					
	65		70		75
Pro Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys					
	85		90		95
Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala					
	100		105		110
Val Tyr Tyr Cys Val Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp					
	115		120		125
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro					
	130		135		140

[0005]

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 145 150 155 160
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 165 170 175
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 180 185 190
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 195 200 205
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 210 215 220
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
 225 230 235 240
 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 245 250 255
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 260 265 270
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 275 280 285
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 290 295 300
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 305 310 315 320
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 325 330 335
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 340 345 350
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 355 360 365
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 370 375 380
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 385 390 395 400
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 405 410 415
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 420 425 430
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 435 440 445

[0006]

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 450 455 460

Ser Pro Gly Lys
 465

<210> 6
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 带有人IgG轻链K的SEQ ID NO:2

<400> 6

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ile
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
 85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 7

[0007]

<211> 239
 <212> PRT
 <213> 人工的

 <220>
 <223> 带有前导序列SEQ ID NO:8的SEQ ID NO:6

 <400> 7

 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15

 Gly Ser Thr Gly Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser
 20 25 30

 Val Thr Pro Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
 35 40 45

 Leu Val His Ile Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys
 50 55 60

 Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe
 65 70 75 80

 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95

 Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
 100 105 110

 Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 115 120 125

 Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 130 135 140

 Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 145 150 155 160

 Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 165 170 175

 Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 180 185 190

 Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 195 200 205

 Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
 210 215 220

 Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

 <210> 8
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

 <400> 8

[0008]

```

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1           5           10          15

Gly Ser Thr Gly
20

<210> 9
<211> 444
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 带有IgG2重链（同种异型G2m（23））的SEQ ID NO:1
<400> 9

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 Phe Ser Asn Tyr
20          25          30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35          40          45

Ser Asp Ile Asn Gly Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
50          55          60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85          90          95

Val Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100         105         110

Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115         120         125

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
130         135         140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145         150         155         160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165         170         175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180         185         190

Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
195         200         205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys
210         215         220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225         230         235         240

```

[0009]

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 245 250 255
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
 260 265 270
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 275 280 285
 Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 290 295 300
 Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 305 310 315 320
 Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
 325 330 335
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 340 345 350
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 355 360 365
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ser Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 370 375 380
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 385 390 395 400
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 405 410 415
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 420 425 430
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440
 <210> 10
 <211> 464
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 带有前导序列SEQ ID NO:8的SEQ ID NO:9
 <400> 10
 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15
 Gly Ser Thr Gly Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
 20 25 30
 Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
 35 40 45
 Phe Ser Asn Tyr Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly

[0010]

50	55	60
Leu Glu Trp Val Ser Asp Ile Asn Gly Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr 65 70 75 80		
Pro Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys 85 90 95		
Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala 100 105 110		
Val Tyr Tyr Cys Val Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp 115 120 125		
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro 130 135 140		
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr 145 150 155 160		
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr 165 170 175		
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro 180 185 190		
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr 195 200 205		
Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp 210 215 220		
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys 225 230 235 240		
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser 245 250 255		
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg 260 265 270		
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro 275 280 285		
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala 290 295 300		
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val 305 310 315 320		
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr 325 330 335		
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr 340 345 350		
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		

[0011]

355	360	365
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		
370	375	380
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ser Val Glu Trp Glu Ser		
385	390	395
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp		
405	410	415
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser		
420	425	430
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
435	440	445
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
450	455	460
<210> 11		
<211> 445		
<212> PRT		
<213> 人工的		
<220>		
<223> 带有IgG4重链的SEQ ID NO:1		
<400> 11		
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
1	5	10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr		
20	25	30
Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
35	40	45
Ser Asp Ile Asn Gly Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val		
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Val Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
100	105	110
Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro		
115	120	125
Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly		
130	135	140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn		
145	150	155
		160

[0012]

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys
 210 215 220
 Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
 260 265 270
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285
 Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320
 Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350
 Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415
 Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445
 <210> 12
 <211> 465
 <212> PRT

[0013]

<213> 人工的

<220>

<223> 带有前导序列SEQ ID NO:8的SEQ ID NO:11

<400> 12

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
20 25 30

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
35 40 45

Phe Ser Asn Tyr Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
50 55 60

Leu Glu Trp Val Ser Asp Ile Asn Gly Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr
65 70 75 80

Pro Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
85 90 95

Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Val Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp
115 120 125

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
130 135 140

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
145 150 155 160

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
165 170 175

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
180 185 190

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
195 200 205

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
210 215 220

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
225 230 235 240

Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
245 250 255

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
260 265 270

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp

[0014]

275	280	285
Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn 290	295	300
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val 305	310	315
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu 325	330	335
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys 340	345	350
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr 355	360	365
Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr 370	375	380
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu 385	390	395
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu 405	410	415
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys 420	425	430
Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu 435	440	445
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly 450	455	460
Lys 465		
<210> 13		
<211> 120		
<212> PRT		
<213> 小家鼠		
<400> 13		
Met Ala Asp Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Leu 1	5	10
Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser 20	25	30
Asn Tyr Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu 35	40	45
Leu Val Ala Asp Ile Asn Gly Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp 50	55	60
Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr 65	70	75
		80

[0015]

Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Val Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 14
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 14

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ile
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

Arg

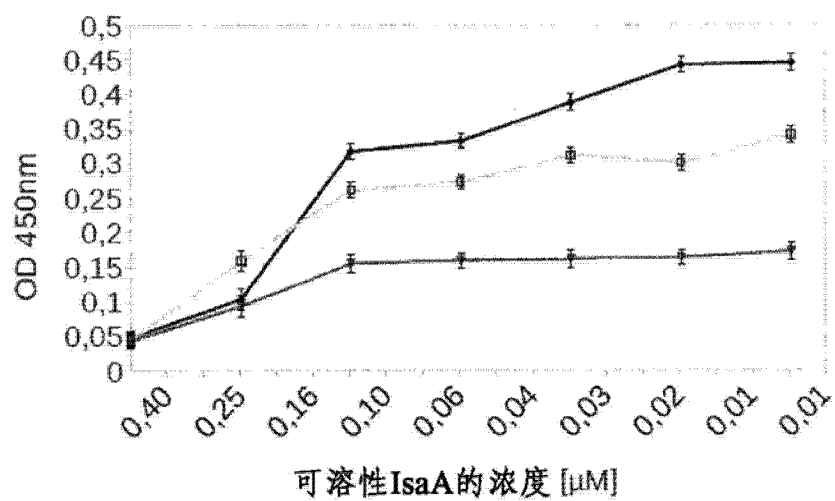


图 1

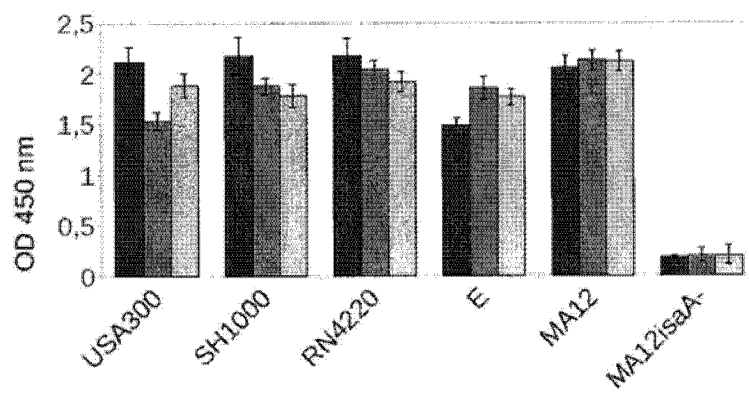


图 2

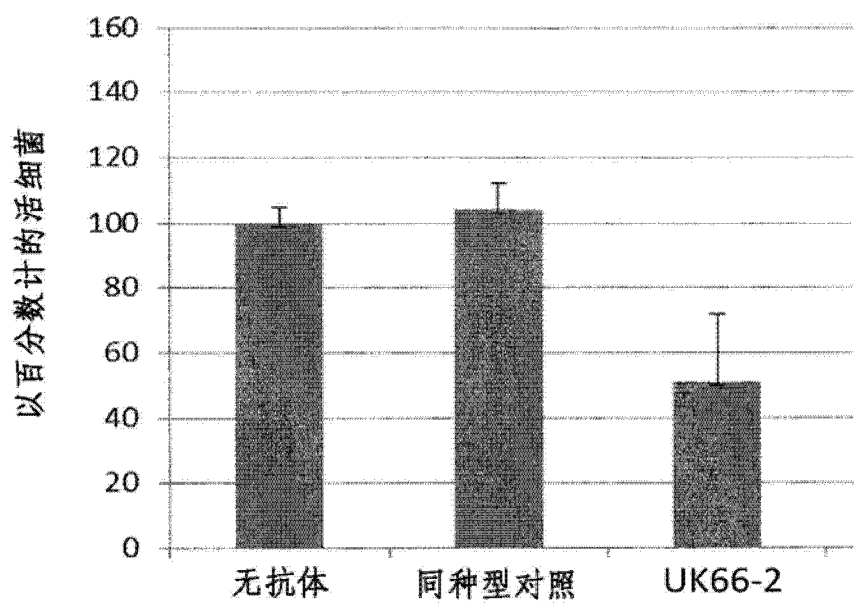


图 3

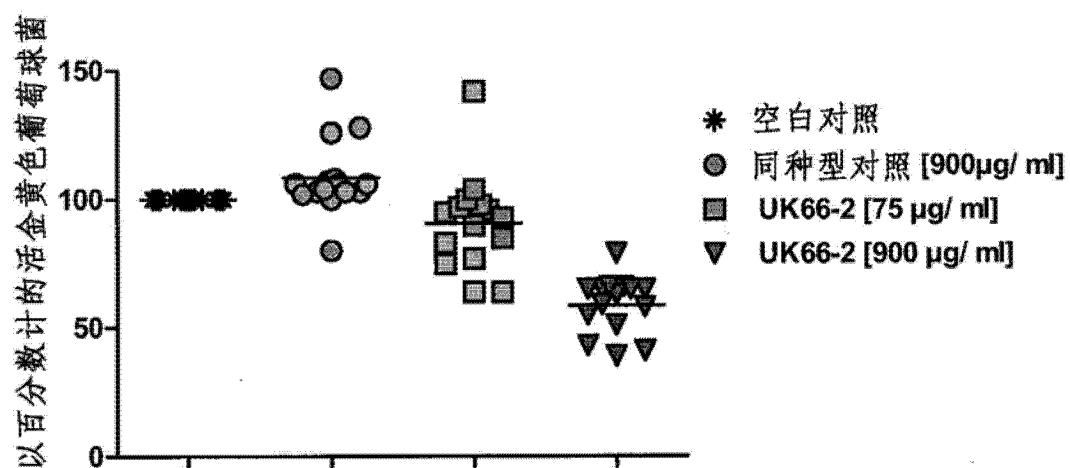


图 4

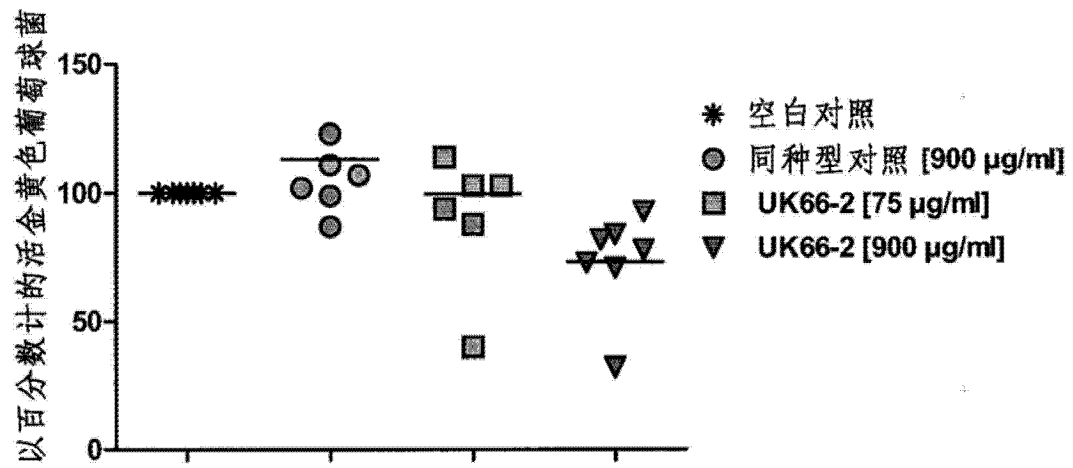


图 5

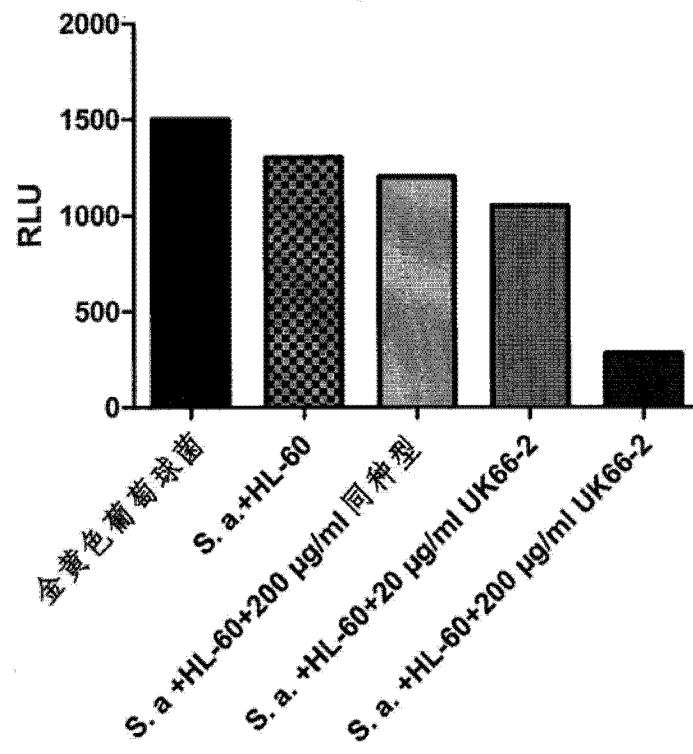


图 6