



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107614517 B

(45) 授权公告日 2022. 01. 21

(21) 申请号 201680020951.2

(22) 申请日 2016.04.01

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107614517 A

(43) 申请公布日 2018.01.19

(30) 优先权数据
62/141,412 2015.04.01 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2017.10.09

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2016/078238 2016.04.01

(87) PCT国际申请的公布数据
W02016/155652 EN 2016.10.06

(73) 专利权人 台北医学大学
地址 中国台湾台北市

(72) 发明人 吕思洁 杨沂渊 李雨青 苏庆华
刘柯俊 罗秀容 杨昀良

(74) 专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限公司
代理人 王田

(51) Int.Cl.
C07K 14/40 (2006.01)
C07K 7/04 (2006.01)

C07K 16/02 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C12N 9/60 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

G01N 33/573 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 103204929 A, 2013.07.17

JP S58198758 A, 1983.11.18

US 2011182907 A1, 2011.07.28

宋秋荷. 白念珠菌MAB03.2C1-C2特异性验证及临床研究.《实用皮肤病学杂志》.2010,第3卷(第1期),第5-8页.

Hiroshi Arakawa. Effect of Environmental Antigens on the Ig Diversification and the Selection of Productive V-J Joints in the Bursa.《the journal of immunology》.2012,第169卷(第2期),第818-828页.

宋秋荷. 白念珠菌烯醇化酶单克隆抗体的制备及鉴定.《西南国防医药》.2009,第19卷(第5期),第474-477页.

审查员 刘帅

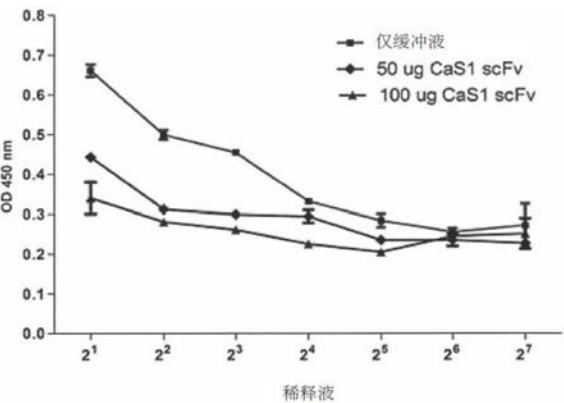
权利要求书1页 说明书21页
序列表8页 附图16页

(54) 发明名称

抗感染疾病的抗体

(57) 摘要

本发明提供抗CaEN01抗体及人类化抗体,作为对念珠菌属(优选为白色念珠菌、热带念珠菌)、耐氟康唑(fluconazole)念珠菌属、链球菌或葡萄球菌引起的感染的有效诊断剂或治疗性治疗。



CN 107614517 B

1. 一种分离的抗CaEN01抗体或其抗原结合部分,其包含:SEQ ID NO:5的轻链互补决定区1(L-CDR1)、SEQ ID NO:6的轻链CDR2(L-CDR2)、SEQ ID NO:7的轻链CDR3(L-CDR3)、SEQ ID NO:8的重链CDR1(H-CDR1)、SEQ ID NO:9的重链CDR2(H-CDR2)、及SEQ ID NO:10的重链CDR3(H-CDR3);使得所述分离的抗体或其抗原结合部分结合至CaEN01。

2. 如权利要求1的抗体,其中所述分离的抗CaEN01抗体为单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体或人类抗体。

3. 一种人源化抗体,其包含(i)SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链及(ii)SEQ ID NO:15的氨基酸序列的重链。

4. 一种人源化抗体,其包含(i)SEQ ID NO:14的氨基酸序列的轻链及(ii)SEQ ID NO:16的氨基酸序列的重链。

5. 一种医药组合物,其包含如权利要求1至4中任一项的抗体及医药学上可接受的载剂或赋形剂。

6. 如权利要求5的医药组合物,其进一步包含一或多种另外抗念珠菌(Candida)、抗链球菌(Streptococcus)或抗葡萄球菌(Staphylococcus)药物。

7. 如权利要求6的医药组合物,其中所述另外抗念珠菌药物为氟康唑(fluconazole)、伊曲康唑(itraconazole)、泊沙康唑(posaconazole)、棘白菌素卡泊芬净(echinocandins caspofungin)、米卡芬净(micafungin)、阿尼芬净(anidulafungin)、伏立康唑(voriconazole)、两性霉素B(amphotericin B)的脂质调配物、酮康唑(Ketoconazole)、克霉唑(clotrimazole)、益康唑(econazole)、环吡酮(ciclopirox)、咪康唑(miconazole)、酮康唑(ketoconazole)或耐丝菌素(nystatin)。

8. 一种如权利要求1至4中任一项的抗体的用途,其用于制备抑制念珠菌、链球菌或葡萄球菌生长及治疗由此引起的感染的药剂。

9. 一种如权利要求1至4中任一项的抗体的用途,其用于制备治疗念珠菌病的药剂。

10. 如权利要求9的用途,其中所述念珠菌病为侵袭性念珠菌病、抗生素性念珠菌病、肠菌群的菌群失调(dysbiosis)、甲霉菌病(onychomycosis)、皮肤念珠菌病或黏膜念珠菌病。

11. 一种如权利要求1至4中任一项的抗体的用途,其用于制备抑制耐氟康唑念珠菌生长或治疗由此引起的感染的药剂。

12. 如权利要求11的用途,其中所述念珠菌为耐氟康唑念珠菌属。

13. 如权利要求12的用途,其中所述耐氟康唑念珠菌属为耐氟康唑白色念珠菌(C.albicans)或热带念珠菌(C.tropicalis)。

14. 一种如权利要求1至4中任一项的抗体的用途,其用于制备抑制由念珠菌引起的生物膜形成的药剂。

15. 一种如权利要求1至4中任一项的抗体的用途,其用于制备诊断个体的生物样品中念珠菌、链球菌或葡萄球菌感染的试剂,其中所述诊断包含使如权利要求1至4中任一项的抗体与所述生物样品接触,及侦测所述抗体与CaEN01的抗原决定基的结合,其中所述结合的存在指示所述个体怀疑患有念珠菌感染。

抗感染疾病的抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及一种抗感染性疾病的抗体。特定言之,本发明提供一种抗 α -烯醇酶的抗体,其用于抗由念珠菌(*Candida*)、耐氟康唑(*fluconazole*)念珠菌、链球菌(*Streptococcus*)或葡萄球菌(*Staphylococcus*)引起的感染的诊断及治疗。

背景技术

[0002] 念珠菌疾病常常为慢性的,难以治疗,且尽管进行抗真菌疗法,仍带来高死亡率及发病率。念珠菌属为全球ICU中导致感染的第三大主要原因,占有真菌感染的高达90%。

[0003] 诊断侵袭性念珠菌病为困难的,是由于缺乏特定临床特征且血液培养物对于尤其在接受氟康唑预防的患者中分离念珠菌物种具有较低敏感性。针对念珠菌属的阳性血液培养物保持对诊断念珠菌血症的最高准则。然而,念珠菌属分离可耗费过多时间,由此延迟有效抗真菌疗法。白色念珠菌(*Candida albicans*)为最重要的人类真菌病原体。特定言之,白色念珠菌(*Candida albicans*; *C. albicans*)为机会性人类病原体,其在数个部位处移生,包括皮肤、口腔组织、肠胃道及阴道。白色念珠菌亦为造成50.4%临床念珠菌血症的主要病原体。当念珠菌酵母进入血流时可出现念珠菌血症,且在健康人类中很少发现。近几十年来,由于患有缺陷性免疫功能的患者群体增加,念珠菌血症已变成重大问题。两性霉素(AmB)为针对真菌的抗真菌治疗的最高准则,但此药物的严重副作用限制其临床应用。广泛且长期使用唑类已导致快速产生多药抗性(MDR),其在抗真菌疗法中造成主要障碍。数个报导展示对氟康唑的抗性发生率在近二十年期间上升。

[0004] 烯醇酶存在于所有能够糖酵解或酸酵的组织及生物体中。EN01首先经识别为糖酵解路径的关键组分。EN01在细胞溶质中经广泛表达,且亦在细胞表面,如纤维蛋白溶酶原结合受体上发现。白色念珠菌EN01剔除式突变体展现变化的药物易感性、菌丝形成及毒性。真菌病原体白色念珠菌中EN01的表达对于细胞生长至关重要。白色念珠菌中EN01上的突变在葡萄糖存在下抑制细胞生长。ScFv为重组抗体蛋白质,其由通过连接符肽组合的重链(VH)及轻链(VL)的可变区组成。在先前研究中,抗CaEN01 scFv抗体(CaS1)通过噬菌体呈现来分离,但CaEN01与CaS1的交互作用(抗原决定基)尚不清楚。需要探索且研发关于CaS1 scFv抑制抗CaEN01与纤维蛋白溶酶原之间交互作用的目标。

发明内容

[0005] 本发明提供抗CaEN01抗体(CaS1)及人源化抗体,其作为抗由念珠菌(优选为念珠菌属、更佳地白色念珠菌、热带念珠菌)、耐氟康唑念珠菌(优选为耐氟康唑念珠菌属)、链球菌或葡萄球菌引起的感染的有效诊断剂或治疗性治疗。

[0006] 在本发明中,重组CaEN01及CaS1 scFv经成功地表达且纯化。CaS1 scFv识别白色念珠菌、肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌的EN01蛋白质;尤其CaS1 scFv自临床结合至耐氟康唑白色念珠菌及热带念珠菌,且对小鼠及人类的彼等耐氟康唑白色念珠菌及热带念珠菌具有较弱交叉反应性。

[0007] 本发明亦提供一种抗原决定基序列,其包含由位于CaEN01中的以下组成的氨基酸序列:₂₈₃LYEQLISEYP₂₉₂(SEQ ID NO:1)、₂₇₈PQLADLYEQL₂₈₇(SEQ ID NO:2)、₂₄₀KGKVGIAMDV₂₄₉(SEQ ID NO:3)或₂₇₈PQLADLYEQLISEYP₂₉₂(SEQ ID NO:4)。

[0008] 本发明亦发现多株IgY抗体对由白色念珠菌表达的重组CaEN01蛋白质以及原生CaEN01展示结合活性,表明在鸡中引发较强体液性反应。用短或长连接符建构的抗体库的复杂性分别为 2.4×10^6 及 1.36×10^7 。在严格筛选之后,显性CaS1 scFv特定地识别白色念珠菌及热带念珠菌的EN01蛋白质。另外,CaS1scFv自临床结合至耐氟康唑白色念珠菌及热带念珠菌。CaS1亦减弱白色念珠菌的生长且抑制其附着至口腔表皮样癌细胞(OECM-1)。另外,CaS1显著抑制白色念珠菌的表面EN01结合至纤维蛋白溶酶原,如通过纤维蛋白基质-凝胶降解分析所展示。显著地,活体内动物测试展示CaS1抗体延长患有念珠菌血症的小鼠的存活时间。因此,本发明识别对CaEN01具有特定结合活性的新颖CaS1scFv单株抗体。所有结果将共同在抗白色念珠菌的感染的治疗性抗体药物用于临床应用上提供巨大帮助。

附图说明

[0009] 图1(A)至(C)展示重组CaEN01蛋白质的表达及纯化。(A)重组CaEN01蛋白质的表达通过0.1(泳道1)、0.5(泳道2)及1.0mM IPTG(泳道3)诱发。库马斯蓝(Coomassie blue)用于染色。(B)小鼠抗His IgG及HRP结合(conjugated)兔子抗小鼠IgG用于西方墨点法(Western blot)。阳性对照:重组SaEN01蛋白质。(C)在表达及音波处理之后,吾等使用Ni²⁺琼脂糖纯化重组CaEN01蛋白质。泳道1:在Ni²⁺琼脂糖结合之后CaEN01纯系的清液层。泳道2:第一次洗涤缓冲液的收集。泳道3:第一溶离缓冲液的收集。泳道4:第二次溶离缓冲液。泳道5:表示溶离之后的Ni²⁺琼脂糖。箭头表示重组CaEN01蛋白质分子量约50kDa。

[0010] 图2A及B展示使用ELISA及西方墨点法对于抗CaEN01 IgY抗体的分析。(A)纯化的重组CaEN01蛋白质及BSA(阴性对照)分别涂布于ELISA盘上。接着,阻断盘与一系列来自预免疫或第7次免疫鸡的稀释多株IgY抗体一起培育。(B)白色念珠菌的总体细胞溶解物在SDS-PAGE(泳道1)上观测。薄膜与来自预免疫(泳道2)或第7次免疫(泳道3)鸡的稀释多株IgY抗体,随后HRP标记的驴抗鸡IgY(1:3,000)一起培育。白色念珠菌的细胞溶解物中表达的所侦测EN01蛋白质通过箭头指示。

[0011] 图3展示scFv抗体的VH及VL域的序列比对。10scFv-S的核苷酸序列经由第4轮淘选随机地选自抗体库。推定氨基酸序列与鸡生殖系基因的氨基酸序列进行比对。引入序列间隙以通过空白空间使比对最大化。

[0012] 图4展示CaS1 scFv的表达及纯化。在表达及音波处理之后,Ni²⁺琼脂糖用于纯化CaS1 scFv。库马斯蓝用于染色。泳道1:在表达之后CaS1 scFv纯系的总体细胞溶解物。泳道2:在Ni²⁺琼脂糖结合之后的清液层。泳道3:第一次洗涤缓冲液的收集。泳道4:溶离缓冲液的收集。泳道5:第二次溶离缓冲液的收集。泳道6:溶离之后的Ni²⁺琼脂糖。箭头表示CaS1 scFv分子量约25kDa。

[0013] 图5(A)至(D)展示通过ELISA及竞争性ELISA的CaS1 scFv的K_D测定。(A)纯化的CaS1 scFv用于识别重组CaEN01蛋白质。CaS1 scFv用作经系列稀释的初级抗体。山羊抗鸡轻链IgG用作二级抗体。HRP结合驴抗山羊IgG用于侦测。(B)OD值计算为百分比。CaS1 scFv的K_D为0.498μg/ml= 1.88×10^{-8} M。(C)CaS1 scFv用于识别与固定形式重组CaEN01蛋白质竞

争的经系列稀释的自由形式重组CaEN01蛋白质。山羊抗鸡轻链IgG用作二级抗体。HRP结合驴抗山羊IgG用于检测。(D) 吾等将OD值计算为百分比。CaS1 scFv的 K_D 为 $4.45\mu\text{g}/\text{ml}=8.9\times 10^{-8}\text{M}$ 。ELISA数据表示为重复孔的平均值 \pm SD。

[0014] 图6 (A) 至 (D) 展示通过西方墨点法CaS1 scFv抗念珠菌属上EN01蛋白质的结合活性。(A) 5种念珠菌属的总体细胞溶解物在SDS-PAGE (左侧) 上观测。在转移至NC薄膜上之后, 其用来自第7次免疫鸡 (1:3,000) 的纯化抗CaEN01 (中间) 或如材料及方法中所描述CaS1 scFv (右侧) 探测。在 (A) 中泳道1-6分别含有白色念珠菌、克柔念珠菌 (*C.krusei*)、热带念珠菌、近平滑念珠菌 (*C.parapsilosis*) 及光滑念珠菌 (*C.glabrate*) 及纯化重组CaEN01的总体细胞溶解物。(B) 来自耐氟康唑 (FLU^R) 及氟康唑敏感 (FLU^S) 白色念珠菌 (泳道1-7分别表示CA6-17、CA7-26、CA7-3、CA10-50、CA7-30、CA10-65、SC5314) 的总体细胞溶解物通过SDS-PAGE (左侧) 且用CaS1 scFv通过西方墨点法 (右侧) 探测。(C) 来自FLU^R及FLU^S及热带念珠菌 (泳道1-5分别表示CT6-29、CT11-52、CT6-50、CT12-54、BCRC20520) 的总体细胞溶解物通过SDS-PAGE (左侧) 且用CaS1 scFv通过西方墨点法 (右侧) 探测。(D) 白色念珠菌、肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌、小鼠及人类的纯化EN01蛋白质在SDS-PAGE (左侧) 上观测。在转移至NC薄膜上之后, 其用如所描述的纯化CaS1 scFv (右侧) 探测。泳道M含有蛋白质标记。

[0015] 图7 (A) 及 (B) 展示用scFv CaS1对白色念珠菌的流动式细胞测量术分析。(A) 白色念珠菌SC 5314经培养隔夜, 且 10^5 个细胞添加至具有2ml YPD培养基的各个管。实验抗体添加至各管 (1) 抗CaEN01 IgY (100 μg) (2) 对照scFv (100 μg) (3) scFv CaS1 (100 μg) (4) PBS, 且在37 $^{\circ}\text{C}$ 下在恒温箱中培养2小时。山羊抗鸡轻链 (1:1500) 抗体用作检测抗体; FITC驴抗山羊抗体 (1:1000) 用作研发出的抗体以检测反应。碘化丙锭 (PI) (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 用于检测细胞死亡。(B) 流动式细胞测量术的定量得到A图 (*, $p<0.05$; **, $p<0.01$)。流动式细胞测量术表示为重复实验的平均值 \pm SD。

[0016] 图8展示通过免疫荧光染色, scFv CaS1对白色念珠菌的分析。抗CaEN01抗体用于检测白色念珠菌细胞表面EN01上的 α -烯醇酶蛋白质。(1) 用抗CaEN01IgY检测, 且通过FITC结合兔子抗鸡抗体研发。(2) 用scFv CaS1检测, 且通过山羊抗鸡轻链抗体及FITC兔子抗山羊抗体研发。(3) 不相关scFv用于阴性对照上。

[0017] 图9展示CaS1 scFv对白色念珠菌生长及菌丝形成的作用。(A) 白色念珠菌在YPD培养基中在37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养隔夜。 $10^8\text{cfu}/\text{ml}$ 白色念珠菌分别与相等体积的0.5mg/ml抗CaEN01 IgY、0.5mg/ml CaS1 scFv或1 \times PBS在室温下混合1h。将1 μl 各混合物于10 \times 稀释液中点样于YPD琼脂盘上, 且在37 $^{\circ}\text{C}$ 下培育隔夜。(B) 将 10^3cfu 白色念珠菌与PBS (对照)、10或100g/ml CaS1 scFv在室温下混合1h。将1 μl 各混合物点样于YPD琼脂盘上, 且在37 $^{\circ}\text{C}$ 下培育5天。菌丝形成在显微镜下观测。

[0018] 图10展示CaS1 ScFv抑制白色念珠菌附着至口腔表皮细胞。将白色念珠菌与1 \times PBS、50 μg 或100 μg CaS1 scFv在37 $^{\circ}\text{C}$ 下混合1h, 且添加至如本文中所描述培养孔中的OECM-1细胞中。在洗涤之后, 附着至白色念珠菌的细胞通过添加HRP结合抗白色念珠菌抗体检测。

[0019] 图11展示CaS1 scFv对EN01结合至纤维蛋白溶酶原的作用。CaS1 scFv阻断CaEN01与纤维蛋白溶酶原结合的能力通过纤维蛋白基质-凝胶降解分析评价。含有仅白色念珠菌 (1)、白色念珠菌+1 μg 纤维蛋白溶酶原 (2) 或白色念珠菌+10 μg 纤维蛋白溶酶原 (3) 的多种样品点样于盘上。除了白色念珠菌首先与10 μg (4) 或100 μg (5) 的CaS1 scFv混合, 随后添加10 μ

g纤维蛋白溶酶原以外,进行类似实验。将不含纤维蛋白溶酶原的白色念珠菌+CaS1 scFv (6) 作为阴性对照点样。

[0020] 图12(A)及(B)展示hzCaS1 V1及V3 scFv的表达及纯化。在表达及音波处理之后, Ni^{2+} 琼脂糖用于纯化hzCaS1 V1(A)及V3(B) scFv。库马斯蓝用于染色(左图)。西方墨点法中的小鼠抗HA IgG及HRP结合兔子抗小鼠IgG(右图)。箭头表示hzCaS1 scFv分子量约25kDa。泳道1:hzCaS1 scFv纯系细胞溶解物。泳道2:在 Ni^{2+} 琼脂糖结合之后hzCaS1 scFv的清液层。泳道3:第一次洗涤缓冲液的收集。泳道4:第一溶离缓冲液的收集。泳道5:溶离之后的 Ni^{2+} 琼脂糖。阳性对照:CaS1 scFv。

[0021] 图13展示测定CaEN01与hzCaS1 V1、V3的结合亲和力。hzCaS1 V1、V3及CaS1 scFv用于识别重组CaEN01蛋白质。(A)库马斯蓝用于染色。(B)小鼠抗人类 κ 、 λ IgG及HRP结合兔子抗小鼠IgG用于西方墨点法(右图)。(C)使用小鼠抗HA IgG及HRP结合兔子抗小鼠IgG。(D)使用山羊抗鸡轻链IgG及HRP结合驴抗山羊IgG。泳道1:hzCaS1 scFv V1。泳道2:hzCaS1 scFv V3。泳道3:CaS1 scFv。

[0022] 图14(A)至(D)展示通过ELISA的hzCaS1 V1及V3 scFv的 K_D 测定。(A、C)纯化hzCaS1 V1及V3 scFv用于识别重组CaEN01蛋白质。hzCaS1 V1及V3 scFv用作经系列稀释的初级抗体。山羊抗鸡轻链IgG用作二级抗体。HRP结合驴抗山羊IgG用于检测。(B、D) OD值计算为百分比。scFv的 K_D 或50%有效浓度(EC_{50})通过莫耳浓度(M)计算及表示。hzCaS1 V1及V3 scFv的 K_D 分别为 $1.51\mu\text{g}/\text{ml}=4.6\times 10^{-8}\text{M}$ 及 $2.12\mu\text{g}/\text{ml}=8.4\times 10^{-8}\text{M}$ 。ELISA数据表示为重复孔的平均值 \pm SD。

[0023] 图15展示CaS1、hzCaS1 V1及V3 scFv抑制CaEN01结合至纤维蛋白溶酶原。 Ni^{2+} 琼脂糖上的CaEN01用 $100\mu\text{g}$ hzCaS1 V1、V3及CaS1 scFv处理1小时,接着用纤维蛋白溶酶原($20\mu\text{g}$)培育1小时。具有CaS1 scFv的CaEN01的各实验组滴落至凝胶上,且在室温下培育2天以观测凝胶降解结果。(1)仅纤维蛋白溶酶原($1\mu\text{g}/\mu\text{l}$)。(2)在 Ni^{2+} SepharoseTM($10\mu\text{g}$)上的CaEN01。(3)在具有纤维蛋白溶酶原($20\mu\text{g}$)的SepharoseTM($10\mu\text{g}$)上的CaEN01。(4-6)在SepharoseTM($10\mu\text{g}$)上的CaEN01用hzCaS1 V1、V3、CaS1 scFv($100\mu\text{g}$)处理,且与纤维蛋白溶酶原($20\mu\text{g}$)一起培育。

[0024] 图16展示具有CaS1 scFv的CaEN01的抗原决定基接近具有CaEN01的纤维蛋白溶酶原的结合位点。指示具有CaS1 scFv的CaEN01的抗原决定基($_{240}\text{KGKVG IAMDV}_{249}$ 及 $_{278}\text{PQLADLYEQLISEYP}_{292}$)及纤维蛋白溶酶原结合位点(最末阻断区域指示于图的序列中)。

[0025] 图17展示CaS1 scFv对白色念珠菌攻击的小鼠存活的作用。小鼠经分组,且分别用含有 10^6 个白色念珠菌的 $10\mu\text{g}$ 及 $100\mu\text{g}$ CaS1 scFv、 $100\mu\text{g}$ 抗DA scFv(不相关scFv对照)或 $1\times$ PBS的混合物攻击。小鼠存活在1天间隔下监测10天。显而易见,CaS1 scFv抗体在小鼠中提供抗白色念珠菌的致死攻击的显著保护活性。

[0026] 图18展示白色念珠菌生物膜形成抑制分析。

具体实施方式

[0027] 本发明研发一种CaEN01及抗CaEN01抗体(CaS1)的抗原决定基,其作为抗由念珠菌、链球菌或葡萄球菌引起的感染的有效诊断剂或治疗性治疗。

[0028] 定义

[0029] 在以下描述中,大量术语用于以下所提供定义以促进理解所主张的目标物。在本文中未明确定义的术语根据其普通且一般含义使用。

[0030] 除非另外规定,否则“一(a/an)”意谓“一或多个”。

[0031] 如本文所用,术语“抗原决定基”是指抗体结合至抗原的位点。

[0032] 如本文所用,术语“念珠菌病”是指由于任何类型的念珠菌(一种类型的酵母)的真菌感染。

[0033] 如本文所用,术语“抗体”是指属于多株、单株、嵌合及人源化抗体的类别的单链、双链及多链蛋白质及多肽;其亦包括这些抗体的合成及基因工程改造变异体。“抗体片段”包括Fab、Fab'、F(ab')₂及Fv片段以及朝向一或多个所需目标抗原决定基具有特异性的抗体的任何部分。

[0034] 如本文所用,术语“多株抗体”是指在一或多个其他不相同抗体之间或存在下所产生抗体。一般而言,多株抗体由B-淋巴细胞在数个产生不相同抗体的其他B-淋巴细胞存在下产生。通常,多株抗体直接自免疫动物获得。

[0035] 如本文所用,术语“单株抗体”是指获自实质上均匀抗体的群体的抗体。换言之,单株抗体由均匀抗体组成,所述均匀抗体自单一细胞纯系(例如融合瘤、经针对均匀抗体进行编码的DNA分子转染的真核宿主细胞,或经针对均匀抗体进行编码的DNA分子转染的原核宿主细胞)生长产生。这些抗体针对单一抗原决定基,且因此具有高度特异性。

[0036] 如本文所用,术语“单链Fv”或“scFv”是指传统双链抗体的重链及轻链已经接合形成一个链的抗体。通常,连接符肽在两个链之间插入以允许适当折迭且创建主动结合位点。

[0037] 术语“连接符肽”包括提及在用以间接将可变重链结合至可变轻链的抗体结合片段(例如Fv片段)内的胜肽。连接符可为例如一系列单一氨基酸或交替模式的氨基酸。

[0038] 如本文所用,术语“互补决定区”(CDR)是指在重链与轻链多肽的可变区内发现的非连续抗原组合位点。CDR已经由Kabat等人,J.Biol.Chem.252:6609-6616(1977);Kabat等人,U.S.Dept,of Health and Human Services,“Sequences of proteins of immunological interest”(1991);由Chothia等人,J.Mol.Biol.196:901-917(1987);及MacCallum等人,J.Mol.Biol.262:732-745(1996)描述,其中当彼此比较时,定义包括氨基酸残基的重迭或亚群。

[0039] 如本文所用,术语“人源化抗体”是指一种重组蛋白,其中来自一个物种的抗体,例如鼠或鸡抗体的CDR自来自所述物种的抗体的重及轻可变链转移至人类重及轻可变域(构架区)中。抗体分子的恒定域源自人类抗体的彼等恒定域。在某些情况下,人源化抗体的构架区的特定残基,尤其接触或接近CDR序列的彼等特定残基可经修饰,例如用来自最初鼠、啮齿动物、类人猴或其他抗体的对应残基替代。人源化抗体可利用多种方法获得,包括(a)在保留或不保留关键构架残基的情况下仅将非人类CDR移植(graft)至人类构架及恒定区上,或(b)移植(transplant)整个非人类可变域,但用类人部分通过替代表面残基“遮盖”所述整个非人类可变域。适用于实施本发明的这些方法包括Padlan,Mol.Immunol.,31(3):169-217(1994)中所揭示者。

[0040] 如本文所用,术语“嵌合抗体”是指含有重及轻抗体链的可变域的重组蛋白,包括源自一个物种的抗体(优选为啮齿动物抗体或鸡抗体、更优选为鼠抗体)的互补决定区(CDR),同时抗体分子的恒定域源自人类抗体的彼等恒定域。

[0041] 如本文所用,术语“噬菌体呈现库”是指噬菌体的群体,其中的每一者含有以重组方式在框架中融合至表面蛋白质的外来cDNA。噬菌体呈现由cDNA在其表面上编码的外来蛋白质。在细菌宿主,通常大肠杆菌(E.coli)中复制之后,含有所关注的外来cDNA的噬菌体通过在噬菌体表面上的外来蛋白质表达来选择。

[0042] 如本文所用,在两个核酸或多肽序列的情形下,术语“序列一致性”包括参考两个序列中的核苷酸(或残基),这两个序列当在特定比较窗上比对最大对应时为相同的。当序列一致性的百分比在关于蛋白质使用时,认识到,不相同的残基位置常常因保守氨基酸取代而不同,其中氨基酸残基取代其他具有类似化学性质(例如电荷或疏水性)的氨基酸残基,且因此并不改变分子的功能性。在序列于保守取代方面不同的情况下,序列一致性百分比可向上调节以校正取代的保守性质。作出此调节的方式为熟习此项技术者已熟知。通常此涉及将保守取代作为部分而非全部失配来进行评分,由此增加序列一致性百分比。因此,例如,在相同氨基酸给出1分,且非保守取代给出0分时,保守取代给出0与1之间的得分。保守取代的得分例如根据Meyers及Miller,Computer Applic.Biol.Sci.4:11-17(1988)的算法,例如如程序PC/GENE(Intelligenetics,Mountain View,Calif.,USA)中所实施来计算。两个胜肽序列实质上类似的指示为一个胜肽与针对第二个胜肽所产生的抗体具有免疫反应性。因此,胜肽实质上类似于第二胜肽,例如,在两个胜肽仅因保守取代而不同的情况下。

[0043] 如本文所用,“比较窗户”包括参考具有约10-20个残基的片段,其中在两个序列经最佳比对之后,序列可与具有相同数目的连续位置的参考序列进行比较。用于比较的序列比对方法为此项技术中所熟知。用于比较的序列的最佳比对可通过以下方法进行:Smith及Waterman,Adv.Appl.Math.2:482(1981)的局部同源性算法;Needleman及Wunsch,J.Mol.Biol.48:443(1970)的同源性比对算法;Pearson及Lipman,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 85:2444(1988)的搜索类似性方法;通过计算机化实施这些算法(包括但不限于)在PC/Gene程序中的CLUSTAL,其通过Intelligenetics,Mountain View,Calif.,GAP,BESTFIT,BLAST,FASTA,及TFASTA于Wisconsin Genetics Software Package中,Genetics Computer Group(GCG),Madison,Wis.,USA);CLUSTAL程序由Higgins及Sharp,Gene 73:237-244(1988)以及Higgins及Sharp,CABIOS 5:151-153(1989);Corpet等人,Nucl.Acids Res.16:10881-90(1988);Huang等人,Computer Applications in the Biosciences 8:155-65(1992);及Pearson等人,Meth.in Molec.Biol.24:307-31(1994)很好地描述。

[0044] 如本文所用,术语“诊断性”或“诊断”意谓识别病理状况的存在或性质。

[0045] 如本文所用,术语“治疗(treatment/treating)”及其类似术语涵盖对哺乳动物、尤其人类疾病的任何治疗,且包括:(a)阻止疾病在可能易患所述疾病但尚未诊断患有其的个体中发生;(b)抑制疾病,即遏制其发展;及(c)减轻疾病,即促使疾病消退。

[0046] 如本文中可互换地所用,术语“个人”、“个体”、“宿主”及“患者”是指哺乳动物,包括(但不限于)鼠(大鼠、小鼠)、非人类灵长类、人类、犬、猫、有蹄动物(例如马、牛、绵羊、猪、山羊)等。

[0047] 如本文所用,术语“治疗有效量”或“有效量”是指当本发明抗CaEN01抗体投与哺乳动物或其他个体用于治疗疾病时,足以实现对所述疾病治疗的量。

[0048] 如本文所用,术语“生物样品”涵盖多种样品类型,其获自可用于诊断或监测分析的个人、个体或患者。所述定义涵盖血液及生物来源的其他液体样品;固体组织样品,诸如

活组织检查样本或组织培养物或源自其的细胞及其后代。

[0049] 位于白色念珠菌EN01 (CaEN01) 中的抗原决定基及抗念珠菌 α -烯醇酶的抗体

[0050] 在一态样中, 本发明提供一种抗原决定基序列, 其包含由位于CaEN01中的₂₈₃LYEQLISEYP₂₉₂ (SEQ ID NO:1)、₂₇₈PQLADLYEQL₂₈₇ (SEQ ID NO:2)、₂₄₀KGKVGIAMDV₂₄₉ (SEQ ID NO:3) 或₂₇₈PQLADLYEQLISEYP₂₉₂ (SEQ ID NO:4) 组成的氨基酸序列。在一个实施例中, 抗原决定基序列包含由位于CaEN01中的₂₄₀KGKVGIAMDV₂₄₉ (SEQ ID NO:3) 或₂₇₈PQLADLYEQLISEYP₂₉₂ (SEQ ID NO:4) 组成的氨基酸序列。

[0051] 使用纯化的CaS1 scFv以识别重组CaEN01蛋白质。所述抗原决定基区域经定位含有198bp核苷酸, 其推导出以下氨基酸序列(残基235至300): DKAGYKGKVGIAMDVASSEFYKDGK YDLDFKNPESDPSKWLSGP QLADLYEQLISEYPIVSIEDPF (SEQ ID NO:19) (66个氨基酸)。为进一步测定所述抗原决定基位置, 使用定点突变诱发以根据定位抗原片段的198bp核苷酸序列建构9个胜肽表达噬菌体。在一个实施例中, CaS1 scFv抗体跨越氨基酸残基301至437结合至纤维蛋白溶酶原的片段, 所述序列为AEDDWDAVHFFERVGDKIQIVGDDLTVTNPTRIKTAIEKKAANAL LLKVNQIGTLTESIQAANDSYAAGWGMVSHRSGETEDTFIADLSVGLRSGQIKT GAPARSERLAKLNQILRIEE ELGSEAIYAGKDFQKA (SEQ ID NO:20)。

[0052] 在一个态样中, 本发明提供分离的抗-CaEN01抗体或其抗原结合部分, 其包含以下中的至少一者: SEQ ID NO:5的轻链互补决定区1 (L-CDR1) 或具有与L-CDR1中的任一者至少80%一致的氨基酸序列的变异体; SEQ ID NO:6的轻链CDR2 (L-CDR2) 或具有与L-CDR2中的任一者至少80%一致的氨基酸序列的变异体; 及SEQ ID NO:7的轻链CDR3 (L-CDR3) 或具有与L-CDR3中的任一者至少80%一致的氨基酸序列的变异体; 以及

[0053] 以下中的至少一者: SEQ ID NO:8的重链CDR1 (H-CDR1) 或具有与H-CDR1中的任一者至少80%一致的氨基酸序列的变异体; SEQ ID NO:9的重链CDR2 (H-CDR2) 或具有与H-CDR2中的任一者至少80%一致的氨基酸序列的变异体; 及SEQ ID NO:10的重链CDR3 (H-CDR3) 或具有与H-CDR3中的任一者至少80%一致的氨基酸序列的变异体; 使得所述分离抗体或其抗原结合部分结合至CaEN01。优选地, 序列一致性如上所述为至少81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。

[0054] 重链及轻链中互补决定区 (CDR) 的氨基酸序列在下表中列举。

[0055] 轻链的CDR

	L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3
[0056]	SGSYG (SEQ ID NO:5)	SNN (SEQ ID NO:6)	GSRDSSYVGV (SEQ ID NO:7)

[0057] 重链的CDR

	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3
[0058]	GFTFIDYG (SEQ ID NO:8)	IGSSGSST (SEQ ID NO:9)	AKSAGGYCVNGAGCNGGSIDA (SEQ ID NO:10)

[0059] 先前CDR序列通过使用international ImmunoGeneTics informationsystem® (<http://www.imgt.org>) 测定。

[0060] 在一些实施例中, 分离的抗CaEN01抗体为单株抗体、嵌合抗体、人源化抗体或人

类抗体。

[0061] 相应地,本发明提供抗CaEN01 scFv单株抗体(CaS1)的轻链,其包含由以下序列组成的氨基酸序列:ALTQPSSVSANLGGTVKITCSGGSGSYGWYQQKSPGSAPVTVIYSNNQRPSNIPS RFSGS PSGSTGTLTITGVQADDEAVYFCGSRDSSYVG VFGAGTTTLTVL (SEQ ID NO:11)。本发明提供抗CaEN01 scFv单株抗体(CaS1)的重链,其包含由以下序列组成的氨基酸序列:TVTLDESGGGLQTPRGAL SLVCKASGFTFIDYGMQWVRQAPGKGLEWVAGIGSSGSSTNYGAAVKGRATISRDDGQSTVRLQLNNLRAEDTGTY YCAKSAGGYCVNGAGCNGGSIDAWG HGTEVIVSS (SEQ ID NO:12)。本发明亦提供抗CaEN01scFv单株抗体(CaS1),其包含具有由序列SEQ ID NO:11组成的氨基酸序列的轻链及包含由序列SEQ ID NO:12组成的氨基酸序列的重链。

[0062] 抗体分子可为多株或单株抗体或任何其他适合类型的抗体,诸如抗体的片段或衍生物、所述抗体的单链可变片段(ScFv)或合成同系物,其限制条件为所述抗体具有与整个抗体的彼等结合特性相同或类似的结合特性。在一些实施例中,抗体可以重组方式产生,例如通过任何适合的噬菌体呈现方法或组合方法产生。多种用于产生抗体的噬菌体呈现及组合方法为此项技术中已知(如例如以下中所描述:Griffiths等人(1993)EMBO J 12:725-734;Hawkins等人(1992)J Mol Biol 226:889-896;Clackson等人(1991)Nature 352:624-628;Gram等人(1992)PNAS 89:3576-3580;Garrad等人(1991)Bio/Technology 9:1373-1377;Hoogenboom等人(1991)Nuc Acid Res 19:4133-4137;及Barbas等人(1991)PNAS 88:7978-7982)。

[0063] 抗体片段可通过分裂整个抗体或通过表达编码所述片段的DNA产生。抗体的片段可通过出版文献(Lamoyi等人,J.Immunol.Methods,56:235,1983;Parham,J.Immunol.,131:2895,1983)中所描述方法制备。这些片段可含有Fab片段及F(ab')₂片段中的一者或两者。这些片段亦可含有单链可变片段抗体,即scFv、二体(dibody)或其他抗体片段。

[0064] 单链可变片段(scFv)为多肽,其由抗体的重链可变区以短肽连接符连接至轻链可变区组成。因此,scFv包含整个抗体组合位点。这些链可在细菌或真核细胞中产生

[0065] 诸如产生嵌合或人源化抗体的多种技术可涉及抗体选殖及建构的程序。所关注的抗体的抗原结合可变轻链及可变重链序列可通过多个分子选殖程序,诸如RT-PCR、5'-RACE及cDNA库筛选获得。来自表达鼠抗体的细胞的抗体的可变重链或轻链序列基因可通过PCR扩增及定序来选殖。如由Orlandi等人(Proc.Natl.Acad.Sci.,USA,86:3833(1989))所描述,为确认其真实性,经选殖V_L及V_H基因可在呈嵌合抗体形式的细胞培养物中表达。如由Leung等人(Mol.Immunol.,32:1413(1995))所描述,基于可变重链或轻链基因序列,人源化抗体可接着经设计且建构。

[0066] 嵌合抗体为重组蛋白,其中人类抗体的可变区已经由例如小鼠抗体的可变区(包括所述小鼠抗体的互补决定区(CDR))置换。当向个体投与时,嵌合抗体展现降低的免疫原性及增加的稳定性。用于建构嵌合抗体的方法为此项技术中所熟知(例如,Leung等人,1994,Hybridoma 13:469)。

[0067] 嵌合单株抗体可通过将来自小鼠免疫球蛋白的重及轻可变链的小鼠CDR转移至人类抗体的对应可变域中来加以人源化。嵌合单株抗体中小鼠构架区(FR)亦用人类FR序列置换。为保存人源化单株的稳定性及抗原特异性,一或多个人类FR残基可经小鼠对应物残基置换。人源化单株抗体可用于个体的治疗性治疗。用于产生人源化单株抗体的技术为此项

技术中所熟知。(参看,例如Jones等人,1986,Nature,321:522;Riechmann等人,Nature,1988,332:323;Verhoeyen等人,1988,Science,239:1534;Carter等人,1992,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA,89:4285;Sandhu,Crit.Rev.Biotech.,1992,12:437;Tempest等人,1991,Biotechnology 9:266;Singer等人,J.Immun.,1993,150:2844。)

[0068] 在一实施例中,本发明提供以下人源化抗体的轻链及重链的氨基酸。

[0069] **轻链的氨基酸序列的实施例**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSGSYGVAWYQQKPGKAPKLLIYSNNFLYSGVPSR
FSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCGSRDSSYVGVFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:13)
(hzCaS1-V1 scFv)

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSGSYGLGWYQQKPGKAPKRLIYSNNSLQSGVPSRF
SGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCGSRDSSYVGVFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:14)
(hzCaS1-V3 scFv)

[0070] **重链的氨基酸序列的实施例**

EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCAASGFTFIDYGM DWVRQSPEKGLEWVAEIGSSGSSTH
YAESVKGRFTVSRDDSKSSVYLQMNSLRAEDTGIYYCAKSAGGYCVNGAGCNGGSIDA
WGQGLTVTVSA (SEQ ID NO:15) (hzCaS1-V1 scFv)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFIDYGIHWVRQAPGKGLEWVAGIGSSGSSTYY
ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSAGGYCVNGAGCNGGSIDAW
GQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 16) (hzCaS1-V3 scFv)

[0071] 在一些实施例中,本发明提供包含氨基酸序列的轻链,所述氨基酸序列具有选自由如SEQ ID NO:13至14中所列的彼等序列组成的群的序列。

[0072] 在一些实施例中,本发明提供包含氨基酸序列的重链,所述氨基酸序列具有选自由如SEQ ID NO:15至16中所列的彼等序列组成的群的序列。

[0073] 在其他实施例中,本发明包含人源化抗体,其包含(i)具有如选自由SEQ ID NO:13至14组成的群的序列中所列氨基酸序列的轻链或与SEQ ID NO:13至14中的任一者至少80%一致的变异体,及(ii)具有如选自由SEQ ID NO:15至16组成的群的序列中所列氨基酸序列的重链或与SEQ ID NO:15至16中的任一者至少80%一致的变异体。优选地,序列一致性如上所述为至少90%、91%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。

[0074] 在一优选实施例中,人源化抗体包含(i)具有如SEQ ID NO:13中所列氨基酸序列的轻链及(ii)具有如SEQ ID NO:15(hzCaS1-V1)中所列氨基酸序列的重链。在另一优选实施例中,人源化抗体包含(i)具有如SEQ ID NO:14中所列氨基酸序列的轻链及(ii)具有如SEQ ID NO:16(hzCaS1-V3)中所列氨基酸序列的重链。

[0075] 除了重组方法以外,本文中所揭示抗体及其变异体亦可使用标准胜肽合成整体或部分建构。多肽的固相合成可通过将序列的C端氨基酸附着至不可溶支撑物,接着连续添加序列中的剩余氨基酸来完成。用于固相合成的技术由以下描述:Barany及Merrifield,The Peptides:Analysis,Synthesis,Biology.第2卷:Special Methods in Peptide Synthesis,部分A第3-284页;Merrifield等人,J.Am.Chem.Soc.85:2149-2156,1963,及Stewart等人,Solid Phase Peptide Synthesis,第2版,Pierce Chem.Co.,Rockford,Ill.,1984。具有更大长度的蛋白质可通过缩合更短片段的胺基末端及羧基末端来合成。

[0076] 组合物及投药方法

[0077] 某些实施例涉及一种医药组合物,其包含本发明的抗原决定基或本发明的抗念珠菌 α -烯醇酶抗体及医药学上可接受的载剂或赋形剂。“医药学上可接受的载剂”意欲(但不

限于此)为对熟习此项技术者已知的任何类型的无毒性固体、半固体或液体填充剂、稀释剂、囊封材料或调配佐剂。稀释剂,诸如多元醇、聚乙二醇及聚葡萄糖可用于增加结合物的生物半衰期。

[0078] 本发明的医药组合物可根据习知方法(例如Remington's Pharmaceutical Science,最新版,Mark Publishing Company,Easton,U.S.A.)调配,且亦可含有医药学上可接受的载剂及添加剂。实例包括(但不限于)界面活性剂、赋形剂、着色剂、调味剂、防腐剂、稳定剂、缓冲剂、悬浮剂、等张剂、结合剂、崩解剂、润滑剂、流动性促进剂及矫正剂,且可适当使用其他常用载剂。载剂的特定实例包括轻质无水硅酸、乳糖、结晶纤维素、甘露糖醇、淀粉、羧甲基纤维素钙、羧甲基纤维素钠、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、聚乙烯缩醛二乙基胺基乙酸酯、聚乙烯吡咯啉酮、明胶、中链三酸甘油酯、聚氧乙烯硬化蓖麻油60、蔗糖、羧甲基纤维素、玉米淀粉、无机盐及此类物。

[0079] 本发明亦提供用于抑制念珠菌、链球菌及葡萄球菌生长及治疗由此引起的感染的方法。

[0080] 一个实施例是针对用于抑制个体念珠菌、链球菌或葡萄球菌生长及治疗由此引起的感染的方法,其包含向所述个体投与本发明的抗 α -烯醇酶抗体。相应地,亦提供本发明的抗 α -烯醇酶抗体的用途,其用于制造用以抑制个体念珠菌、链球菌或葡萄球菌生长或治疗由此引起的感染的药剂。

[0081] 另一实施例是针对一种用于防止个体念珠菌、链球菌或葡萄球菌生长或由其引起的感染的方法,其包含向所述个体投与本发明的抗原决定基。相应地,亦提供本发明的抗原决定基的用途,其用于制造用以防止个体念珠菌、链球菌或葡萄球菌生长或由其引起的感染的药剂。

[0082] 在一些实施例中,念珠菌为白色念珠菌、热带念珠菌及光滑念珠菌、白色念珠菌,链球菌为肺炎链球菌,且葡萄球菌为金黄色葡萄球菌。

[0083] 另一实施例是针对一种用于治疗个体念珠菌病的方法,其包含向所述个体投与本发明的抗 α -烯醇酶抗体。相应地,亦提供本发明中抗 α -烯醇酶抗体的用途,其用于制造用以治疗个体念珠菌病的药剂。优选地,念珠菌病为侵袭性念珠菌病、抗生素性念珠菌病、肠菌区的菌群失调(dysbiosis)、甲霉菌病(onychomycosis)、皮肤念珠菌病或黏膜念珠菌病。

[0084] 另一实施例是针对一种用于抑制个体耐氟康唑念珠菌生长或治疗由此引起的感染的方法,其包含向所述个体投与本发明的抗 α -烯醇酶抗体。相应地,亦提供本发明中抗 α -烯醇酶抗体的用途,其用于制造用以抑制个体耐氟康唑念珠菌属生长或治疗由此引起的感染的药剂。优选地,耐氟康唑念珠菌为念珠菌属;更佳地,耐氟康唑念珠菌为耐氟康唑白色念珠菌或热带念珠菌。

[0085] 又一实施例为提供一种用于抑制由念珠菌引起的生物膜形成的方法,其包含向个体投与本发明的抗 α -烯醇酶抗体。相应地,亦提供本发明中抗 α -烯醇酶抗体的用途,其用于制造用以抑制由念珠菌引起的生物膜形成的药剂。优选地,念珠菌为白色念珠菌、热带念珠菌及光滑念珠菌、白色念珠菌。生物膜为念珠菌过度生长如此难以失效的主要原因之一。长期存在的念珠菌过度生长具有大量时间建立生物膜,且这些生物膜对许多治疗具有极大耐受性。生物膜发展时间愈长,其对抗真菌治疗具有愈多耐受性。此为单独使用抗真菌药物常常不足以抑制念珠菌过度生长的原因。出人意料地,本发明发现本发明抗体可有效地抑制

念珠菌生物膜形成。

[0086] 以上方法亦包含伴随其他标准疗法或在其之后投与本发明的抗 α -烯醇酶抗体,这些其他标准疗法如2009年3月由the Infectious Disease Society of America (IDSA)出版的更新准则中所描述(Pappas PG,Kauffman CA,Andes D,Benjamin DK Jr,Calandra TF,Edwards JE Jr等人Clinical practice guidelines for the management of candidiasis:2009年由the Infectious Diseases Society of America更新.Clin Infect Dis.2009 Mar 1;48(5):503-35)。

[0087] 在优选实施例中,个体为哺乳动物。例示性哺乳动物包括人类、猪、绵羊、山羊、马、小鼠、狗、猫、母牛等。可用抗体或其医药组合物治疗的疾病包括念珠菌病。念珠菌病的实例包括(但不限于)侵袭性念珠菌病、抗生素性念珠菌病、肠菌区的菌群失调、甲霉菌病、皮肤念珠菌病及黏膜念珠菌病。

[0088] 如本文所揭示的抗 α -烯醇酶抗体或其医药组合物可静脉内、局部、腹膜内、动脉内、鞘内、膀胱内或瘤内投与。一般技术者将了解抗 α -烯醇酶抗体或其组合物的有效量可凭经验确定。应理解,当向人类患者投与时,抗 α -烯醇酶抗体或其组合物的总体每日用量将由主治医师在合理医疗判断的范围内决定。任何特定患者的特定治疗有效剂量水平将取决于多种因素:待达成的细胞反应类型及程度;所采用特定抗 α -烯醇酶抗体或其组合物的活性;患者的年龄、体重、一般健康状况、性别及膳食;投药时间、投药路径及抗 α -烯醇酶抗体或其组合物的排泄速率;治疗的持续时间;与抗 α -烯醇酶抗体或其组合物组合或同时使用的药物;及医疗技术中所熟知的类似因素。

[0089] 以上经识别组合物及治疗方法中的每一者可另外包括另外抗念珠菌、抗链球菌或抗葡萄球菌药物。在一些实施例中,适用于与本发明一起使用的抗念珠菌药物包括(但不限于)氟康唑、伊曲康唑(itraconazole)、泊沙康唑(posaconazole)、棘白菌素卡泊芬净(echinocandins caspofungin)、米卡芬净(micafungin)、阿尼芬净(anidulafungin)、伏立康唑(voriconazole)、两性霉素B(amphotericin B)的脂质调配物、酮康唑(Ketoconazole)、克霉唑(clotrimazole)、益康唑(econazole)、环吡酮(ciclopirox)、咪康唑(miconazole)、酮康唑(ketoconazole)及耐丝菌素(nystatin)。在治疗方法中,本发明的抗 α -烯醇酶抗体可与另外一或多种抗念珠菌、抗链球菌或抗葡萄球菌药物同时、随后或分别投与。

[0090] 念珠菌、链球菌或葡萄球菌感染的诊断

[0091] 本发明出人意料地发现抗CaEN01抗体(CaS1)为抗念珠菌、链球菌或葡萄球菌感染的有效诊断剂或治疗性治疗。相应地,在另一态样中,本发明提供一种用于在个体的生物样品中诊断念珠菌、链球菌或葡萄球菌感染的方法,其包含使本发明的抗CaEN01抗体与生物样品接触,及侦测抗CaEN01抗体与本发明CaEN01的抗原决定基的结合,其中结合存在指示个体怀疑患有念珠菌、链球菌或葡萄球菌感染。可替代地,本发明提供一种用于在个体的生物样品中诊断念珠菌、链球菌或葡萄球菌感染的方法,其包含使本发明的抗原决定基序列与所述生物样品接触,及侦测本发明的抗原决定基序列与抗CaEN01抗体的结合,其中结合存在指示个体怀疑患有念珠菌感染。

[0092] 本发明中,侦测包括定量及定性侦测。定性侦测的实例包括以下:简单侦测存在或不存在抗CaEN01抗体与本发明CaEN01的抗原决定基的结合;判定结合是否超过一定量存

在;及比较结合量与其他样品的结合量(例如,对照样品)。

[0093] 用于本发明的诊断性方法的生物样品不受特定限制,只要其为可含有CaEN01蛋白质的样品。特定地,自生物(诸如哺乳动物)身体收集的样品为优选的。自人类收集的样品更佳。测试样品的特定实例包括血液、间质液、血浆、脑脊髓液、滑液、胸膜液、血清、淋巴液、唾液、尿液、组织及腹水。

[0094] 在本发明中,“对照”是指充当供比较用的标准物的样品,包括阴性对照及来自健康个体的生物样品。阴性对照可通过收集来自健康个体的生物样品且视需要将其混合来获得。在对照中的抗CaEN01抗体与CaEN01的抗原决定基的结合水平可与个体的生物样品中的结合水平并行地侦测。可替代地,通过事先侦测许多健康个体的生物样品中的结合水平,健康个体中标准物表达水平可以统计方式测定。

[0095] 在本发明中,结合水平可利用任何方法测定。用于侦测测试样品中的结合的方法不受特定限制。提供使用抗CaEN01抗体用于侦测的免疫方法,诸如放射免疫分析(RIA);酵素免疫分析(EIA);荧光免疫分析(FIA);发光免疫分析(LIA);免疫沉淀(IP);浊度免疫分析(TIA);西方墨点法(WB);免疫组织化学(IHC)方法;及单向放射免疫扩散法(SRID)。

[0096] 本发明亦提供用于诊断念珠菌、链球菌或葡萄球菌感染的诊断剂或套组,其包含用于侦测测试样品中抗CaEN01抗体与CaEN01结合的诊断剂。本发明的诊断剂包含至少念珠菌感染。

[0097] 用于诊断癌症的套组可通过将诊断念珠菌感染的试剂与用于侦测抗CaEN01抗体的另一要素组合来产生。更具体言之,本发明涉及用于诊断念珠菌、链球菌或葡萄球菌感染的套组,其包含结合至CaEN01的抗CaEN01抗体及用于侦测所述抗体与CaEN01之间结合的试剂。另外,描述量测操作的说明书可隶属于本发明的套组。

[0098] 实例

[0099] 材料及方法

[0100] His-CaEN01蛋白质的表达及纯化

[0101] 简言之,白色念珠菌 α -烯醇酶基因在pQE30质粒中建构,形成pQE30-CaEN01载体,且接着所得载体转型大肠杆菌BL21细胞。细菌培养物在含有胺苄青霉素(ampicillin)(50 μ g/ml)的10ml LB培养基中在37 $^{\circ}$ C生长隔夜,在相同LB培养基中稀释10倍,且进一步生长至OD₆₀₀达至0.6与1.0之间。为诱发CaEN01蛋白质表达,添加异丙基- β -D-硫代哌喃半乳糖苷(IPTG)至培养物中达0.5mM的最终浓度。细胞集结粒再悬浮于含有1%Triton x-100的2ml 1 \times PBS中,且通过三个循环的冷冻(-70 $^{\circ}$ C)及解冻(37 $^{\circ}$ C)溶解。在离心之后,所得细胞溶解物与带Ni²⁺的树脂管柱一起培育以根据制造商的说明书(GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden)纯化His-CaEN01蛋白质。来自人类、小鼠、肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌的EN01以相同方式表达及纯化。

[0102] 动物免疫接种

[0103] 雌性白色来亨鸡(Gallus domesticus)用50g纯化His-CaEN01于相等体积的弗氏完全佐剂(Freund's complete adjuvant)(Sigma, USA)中由肌肉内注射免疫。用His-CaEN01于弗氏不完全佐剂中的三次另外免疫接种以7天间隔进行。在各免疫接种之后,于蛋黄中的多株IgY抗体经部分纯化,且通过酶联结免疫吸附剂分析法(ELISA)滴定,以测定体液抗his-CaEN01免疫反应的存在。如先前所述,使用10%硫酸葡聚糖自与蛋白分离的卵黄

纯化IgY抗体 (Akita EM, Nakai S. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic E.coli strain. J Immunol Methods 1993;160:207-14; Akita EM, Nakai S. Production and purification of Fab' fragments from chicken egg yolk immunoglobulin Y (IgY). J Immunol Methods 1993;162:155-64)。纯化的IgY抗体溶解于5ml含有0.05%迭氮化钠的TBS中且在-20℃储存。

[0104] 建构scFv抗体库及淘选

[0105] 所述抗体库是基于先前报告 (Andris-Widhopf J, Rader C, Steinberger P等人 Methods for the generation of chicken monoclonal antibody fragments by phage display. J Immunol Methods 2000;242:159-81) 建立。简言之, 最终免疫接种后自鸡采集的脾即刻置放于Trizol (Gibco BRL, USA) 中均质化。10μg的总体RNA使用SuperScript RT套组 (Invitrogen, USA) 反转录成第一股cDNA。在使用鸡特异性引物扩增之后, 重链及轻链可变 (VH及VL) 区的PCR产物经第二轮PCR, 形成具有短或长连接符的全长scFv片段, 其进一步用Sfi I消化且选殖至pComb3X载体中。重组噬菌体DNA通过电穿孔 (来自Bio-Rad的MicroPulser) 转型至大肠杆菌ER2738菌株中。重组噬菌体的产生通过添加野生型VCS-M13辅助噬菌体开始, 随后用4%聚乙二醇8000及3% NaCl (w/v) 沉淀, 且最后再悬浮于含有1%牛血清白蛋白 (BSA) 的1×磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中。接着, 将scFv抗体库中的 10^{11} 个溶菌斑形成单位 (pfu) 的重组噬菌体添加至预涂布有纯化His-CaEN01蛋白质 (0.5微克/孔) 的孔中, 且在37℃下培育2小时。在未结合噬菌体移除之后, 结合噬菌体用0.1M HCl/甘氨酸 (pH 2.2) /0.1% BSA溶离, 用2M Tris碱缓冲剂中和, 且用于感染大肠杆菌ER2738菌株。如上文所描述, 扩增噬菌体经沉淀, 且回收以用于下一轮选择。在第4次生物淘选之后, 来自大肠杆菌ER2738的总体噬菌粒DNA经纯化, 且转型至大肠杆菌TOP10F' 中。一组随机选择的纯系经培养隔夜, 在含有1mM MgCl₂及胺苄青霉素 (50μg/ml) 的超级培养液中稀释100×, 且进一步生长8小时。在用1mM异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG) 诱发隔夜之后, 细菌经由离心采集, 再悬浮于组氨酸 (His) -结合缓冲液 (20mM磷酸钠, 0.5M NaCl, 20mM咪唑, pH7.4) 中, 且通过3次循环的冷冻、解冻/音波处理溶解。scFv抗体使用带Ni²⁺的琼脂糖 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden) 根据制造商的说明书纯化。纯化scFv抗体进一步在1×PBS中使用Amicon Ultra-4离心过滤装置 (Merck Millipore, Germany) 浓缩, 且检测其抗白色念珠菌的结合或中和能力。

[0106] 白色念珠菌生长及菌丝形成

[0107] 为测定scFv抗体对细胞生长及菌丝形成的作用, 将抗CaEN01 IgY (0.5mg/mL) 或CaS1 scFv (0.5mg/mL) 或PBS与白色念珠菌 (1×10^6 cfu) 在37℃下一起预培育1小时。在培育之后, 将1μl各混合物于10倍稀释液中点样于YPD琼脂盘上, 且在37℃下培育隔夜。将 10^3 cfu白色念珠菌与0 (1×PBS对照)、10或100μg/ml CaS1 scFv在室温下混合1小时。其后, 将1μl各混合物点样于YPD琼脂盘上, 且在37℃下培育5天。

[0108] 念珠菌属菌株

[0109] 白色念珠菌 (SC 5314)、克柔念珠菌 (临床分离株)、热带念珠菌 (BCRC 20520)、近平滑念珠菌 (BCRC 20515) 及光滑念珠菌 (BCRC 20586) 由来自Taipei Medical University, Taipei的博士Ching-Hua Su友善提供。白色念珠菌 (CA6-17、CA7-26、CA7-3、

CA10-50、CA7-30、CA10-65)、热带念珠菌(CT11-52、CT6-29、CT6-50、CT12-54)、光滑念珠菌(CG5-8、CG8-11、CG7-37、CG5-66)及近平滑念珠菌(CP8-20、CP12-37、CP6-20、CP7-17、CP8-48)由Department of Laboratory Medicine, Wan Fang Hospital, Taipei Medical University, Taipei友善提供。念珠菌物种在YPD培养基中培养,且其身分通过CHROMagar念珠菌盘(CHROMagar, Paris, France)确认。使用MIC测试条,且MIC在如制造商所建议的80%抑制下读取。

[0110] 西方墨点法

[0111] 为侦测EN01蛋白质的存在,纯化重组EN01蛋白质或五种念珠菌属的细胞溶解物经受SDS-PAGE分析,转移至硝化纤维素薄膜(Amersham Biosciences, UK)上,且接着用含5%脱脂牛奶的TBST阻断1小时。添加在第7次免疫接种(1:3,000)之后的来自鸡的抗-CaEN01 IgY或纯化CaS1 scFv抗体(1 μ g/ml),且在室温下培育1小时。在剧烈洗涤之后,添加辣根过氧化物酶(HRP)结合多株驴抗鸡IgY抗体(1:3,000)(Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA),且培育另外1小时以侦测结合IgY抗体。然而,山羊抗鸡轻链抗体(1:3,000)(Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA),随后HRP结合驴抗山羊IgG抗体(Jackson ImmunoResearch, USA)用于侦测结合scFv抗体。在如上洗涤之后,薄膜用二胺基联苯胺(DAB)或ECL受质显色。ImageQuant LAS4500用于ECL强度侦测。ELISA及竞争性ELISA

[0112] 为检查其结合反应性,自第7次免疫接种之后的鸡纯化的一系列稀释IgY抗体(500-256,000倍)或重组CaS1 scFv抗体(40-0.078 μ g/ml)与固定于ELISA培养盘孔上的纯化CaEN01(10 μ g/ml)一起培育。在剧烈洗涤之后,结合IgY抗体通过添加HRP结合多株驴抗鸡IgY抗体(1:3,000)(Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA)侦测,同时结合CaS1 scFv抗体通过山羊抗鸡轻链抗体(1:3,000)(Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA),接着HRP结合驴抗山羊IgG抗体(Jackson ImmunoResearch, USA)侦测。在如上洗涤之后,四甲基联苯胺(TMB)受质溶液(Sigma, USA)添加至孔中用于显色。反应用1N HCl停止,且光学密度在450nm下使用ELISA盘读取器(BioTek Synergy HT)量测。分解常数(K_D)根据方程式公克/分子量(Da) \times 体积(L)⁻¹计算。

[0113] 对于竞争性ELISA,进行上述程序,除了一系列稀释CaEN01蛋白质(50-0.097 μ g/ml)首先与相等体积的CaS1 scFv抗体(1 μ g/ml)混合1小时,且添加至盘中以用于侦测结合特异性以外。ELISA测试在用于各样品的重复孔中进行。ELISA数据呈现为重复实验的平均值 \pm SD。

[0114] 纤维蛋白基质-凝胶降解分析

[0115] 制备基质凝胶用于纤维蛋白溶解活性侦测³³。白色念珠菌(10⁶个细胞)经洗涤,且与或不与CaS1 scFv(10及100 μ g)在37 $^{\circ}$ C下一起培育1小时。在培育之后,细胞经洗涤,且与纤维蛋白溶酶原(10 μ g)一起培育30min。混合物用PBS洗涤以移除自由纤维蛋白溶酶原。所得细胞集结粒置放于含有1.25%低融化温度琼脂糖、凝血酶(0.05U/ml, Sigma)及纤维蛋白原(2mg/ml, Sigma)的基质凝胶中。凝胶在潮湿室中在37 $^{\circ}$ C下培育10-14小时,直至出现指示纤维蛋白溶解活性的存在的清楚斑点。

[0116] 附着分析

[0117] 细胞附着分析使用人类口腔表皮细胞(OECM-1)(XXX)进行。白色念珠菌(1 \times 10⁶cfu)与CaS1 scFv抗体(50或100 μ g)在37 $^{\circ}$ C下一起预培育1小时。在培育之后,混合物经

两倍稀释,且添加至96孔盘中培养的 10^4 个OECM-1细胞上。盘进一步在4℃下培育2小时。在用 $1\times$ PBS洗涤3次之后,盘用10%甲醛固定。在如上洗涤之后,孔用脱脂牛奶阻断1小时。其后,添加兔子抗白色念珠菌抗体(1:3,000,Bethyl,USA),且培育另外1小时,接着添加HRP结合抗兔子抗体(1:3,000,Bethyl,USA)。如上洗涤始终在步骤之间进行。TMB用于显色,用1NHC1停止。色彩的强度在450nm下在ELISA盘读取器上量测。

[0118] 白色念珠菌感染的小鼠模型

[0119] 总计20只重约30g的ICR雌性小鼠(购自中国台湾Laboratory Animal Center)随机地分组,每组5只小鼠。白色念珠菌生长隔夜,且在生理盐水中洗涤。四组小鼠经由侧尾静脉用以下制剂处理:(i)仅 $1\times$ PBS;(ii)与50 μ g CaS1一起预培育的 1×10^6 cfu白色念珠菌细胞;(iii)与100 μ g CaS1一起预培育的 1×10^6 cfu白色念珠菌细胞;(iv)与抗CaEN01 IgY一起预培育的 1×10^6 cfu白色念珠菌细胞。小鼠存活在1天间隔下监测10天。所有小鼠的处理及操作根据由台北医学大学(Taipei Medical University)的机构动物护理及使用委员会(Institutional Animal Care and Use Committee)核准的动物实验协议进行。

[0120] 实例1 His白色念珠菌 α -烯醇酶(his-CaEN01)的融合蛋白质的表达及纯化

[0121] 白色念珠菌 α -烯醇酶基因在pQE30质粒中建构,形成pQE30-CaEN01载体,且接着所得载体用大肠杆菌BL21细胞转型。细胞的表达用IPTG在浓度1.0mM、0.5mM及0.1mM下诱发4小时、5小时、8小时及隔夜。发现表达蛋白质通过SDS-PAGE(图1A)及西方墨点分析(图1B)具有约49kDa的分子量。

[0122] 白色念珠菌 α -烯醇酶基因在pQE30质粒中建构,形成pQE30-CaEN01载体,且接着所得载体用大肠杆菌BL21细胞转型。细胞的表达用IPTG在浓度1.0mM、0.5mM及0.1mM下诱发4小时、5小时、8小时及隔夜。发现表达蛋白质通过SDS-PAGE及西方墨点分析具有约49kDa的分子量。为确认上述表达蛋白质为所需CaEN01蛋白质,实例1中获得的蛋白质用Ni SepharoseTMHigh Performance纯化,所述纯化蛋白质通过SDS-PAGE分析,且具有49kDa的蛋白质确认为His-CaEN01(图1C)。

[0123] 实例2 His-CaEN01 IgY多株抗体与抗原His-CaEN01的结合分析

[0124] 50 μ g实例1的纯化His-CaEN01蛋白质向鸡投与,产生抗his-CaEN01 IgY多株抗体。多株抗体通过SDS-PAGE及西方墨点分析自蛋纯化。纯化抗体的结合能力通过西方墨点法及酶联结免疫吸附剂分析法(ELISA)分析。在ELISA分析中,BSA用作阴性对照,小鼠抗his IgG用作第一抗体,且HRP兔子抗小鼠IgG用作第二抗体。在西方墨点分析之后,特异性结合至His-CaEN01的抗his-CaEN01 IgY多株抗体在免疫接种3次之后产生,且结合能力随着各轮免疫接种增加。

[0125] 实例3鸡抗CaEN01 IgY的结合活性、抗CaEN01库建构及淘选

[0126] 鸡抗CaEN01 IgY的体液性免疫反应通过ELISA及西方墨点法识别(图2B)。与预免疫血清及不相关BSA蛋白质相比,第7次免疫接种(500-256000倍稀释)之后的IgY辨识CaEN01。(图2A)

[0127] 两个具有短连接符及长连接符的库如表1中展示建构。短及长连接符库的尺寸分别估计为 2.4×10^6 及 1.36×10^7 。展示在各淘选之后的溶离滴定量(表1)。在四轮淘选之后,CaEN01结合噬菌体变异体经极大地增浓。这些结果表明非特异性结合噬菌体在淘选过程中得以移除,且具有特异性结合亲和力的纯系经增浓。序列经确认属于鸡免疫球蛋白生殖系

基因。对CaEN01具有最高结合活性的短连接符经识别。此抗CaEN01 scFv单株抗体命名为CaS1。

[0128] 表1. 抗CaEN01库大小及在各轮淘选之后的溶离噬菌体滴定量。

	库	连接符长度*	库大小	在各轮淘选之后的溶离噬菌体滴定量			
				第1轮	第2轮	第3轮	第4轮
[0129]	CaEN01-S	7 aa	2.4×10^6	9.6×10^4	9.0×10^5	7.2×10^5	3.0×10^6
	CaEN01-L	18 aa	1.36×10^7	2.75×10^5	1.2×10^6	1.32×10^6	1.2×10^5

[0130] 7aa及18aa的*连接符长度分别为GQSSRSS (SEQ ID NO:17) 及GQSSRSSGGGSSGGGS (SEQ ID NO:18)。

[0131] 实例3 scFv抗体的基因定序

[0132] 自鸡纯化的抗体包括构架区 (FR) 及互补决定区 (CDR)。群落#1S1至#1S12经分离, 且使用ompseq引物 (5'-AAGACAGCTATCGCGATTGCAGTG-3') 定序, 且定序结果通过BioEdit软件分析, 且接着所得序列与鸡生殖系进行比较。发现十种纯系中的抗体在轻链及重链中具有相同序列 (图3)。

[0133] 实例4 CaS1 scFv的表达及纯化。

[0134] 来自最后生物淘选的总体噬菌粒DNA转型至TOP10F'大肠杆菌中以分析个体scFv。含有scFv基因片段的群落经选择, 且在10mL LB (Lauria-Bertani) 培养液 (50μg/mL胺苄青霉素) 中在振荡下在37℃下培养隔夜; 接着培养物转移至另一100mL LB (具有50μg/mL胺苄青霉素) 中, 直至OD₆₀₀达至0.4至0.8之间。其后, 所得培养物与0.5mM IPTG一起培育6-8小时, 以表达His标记的CaS1 scFv蛋白质。接着, 培养物经受离心, 且丢弃清液层, 且集结粒用1mL的His结合缓冲液 (20mM磷酸钠, 0.5M NaCl, 20mM咪唑, pH 7.4) 再悬浮。大肠杆菌细胞经音波处理破坏; 接着, 样品经受3000g离心5分钟。随后, 清液层中CaS1scFv融合蛋白质通过如制造商所建议的Ni Sepharose™ High Performance (GE healthcare Life science, USA) 纯化。简言之, 样品清液层添加至琼脂糖, 混合1小时, 且经受1000g离心5分钟。丢弃清液层。琼脂糖用1mL His结合缓冲液洗涤2次, 获得洗液1及洗液2。500μL的His溶离缓冲液添加至琼脂糖, 且混合1小时。琼脂糖经受1000g离心5分钟, 且收集清液层 (溶离液1)。重复以上步骤, 获得溶离液2。溶离液1及2含有纯化His-CaS1scFv。最后, 琼脂糖再悬浮于50μL的His结合缓冲液中。结合清液层、洗液1、洗液2、溶离液1、溶离液2及琼脂糖的部分通过12% SDS PAGE分析 (图4)。

[0135] 实例5通过ELISA及竞争性ELISA测定CaS1 scFv的K_D。

[0136] 0.25μg的His-CaEN01添加至96半区盘的各孔, 且盘在37℃下培育1小时以使蛋白质吸附至孔的底部。丢弃蛋白质, 且5%脱脂牛奶添加至孔中, 且盘在37℃下培育1小时以用于阻断。同时, 1μg/mL CaS1与来自50μg/mL自由形式His-CaEN01的各2倍及10次连续稀释样品 (亦即50μg/mL、25μg/mL、12.5μg/mL、6.25μg/mL、3.13μg/mL、1.56μg/mL、0.78μg/mL、0.39μg/mL、0.19μg/mL的自由形式His-CaEN01) 在室温下一同培育1小时。接着, 这些样品添加至上述经涂布且阻断孔中, 且在37℃下培育1小时以用于进行竞争反应。其后, 孔用PBST洗涤6次; 接着向其中添加山羊抗鸡轻链 (1:3000稀释), 且在37℃下培育1小时。其后, 孔用PBST洗涤6次; 接着向其中添加驴抗山羊HRP抗体 (1:5000稀释), 且在37℃下培育1小时。其后, 孔用PBST洗涤6次; 接着色彩反应通过添加3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 开始, 且反应通过1N

HC1终止。侦测在450nm波长下的吸光率,获得 OD_{450} 。为测定CaS1与CaEN01的结合活性,进行ELISA(图5A-B)及竞争性ELISA(图5C-D)。如图5A及5B所见,CaS1 scFv抗体与CaEN01的结合活性为浓度依赖性的,且如通过ELISA及竞争性ELISA所量测, K_D 分别为 $1.88 \times 10^{-8} M$ 及 $8.9 \times 10^{-8} M$ 。

[0137] 实例6 CaS1 scFv结合至白色念珠菌及热带念珠菌的细胞溶解物

[0138] 评价此CaS1 scFv与不同物种的念珠菌的结合活性。获得五种念珠菌的常见菌株,五个物种念珠菌的总体溶解物以SDS-PAGE(图6A左侧)及随后西方墨点法分析。如图4中间所见,抗CaEN01多株IgY能够识别正如所期望测试的五个物种的念珠菌。然而,CaS1 scFv可仅与如图6A右侧泳道1中所见白色念珠菌及如泳道3中所见热带念珠菌反应。此CaS1 scFv无法与克柔念珠菌(泳道2)、近平滑念珠菌(泳道4)及光滑念珠菌(泳道5)反应。在白色念珠菌与热带念珠菌之间的EN01蛋白质序列为83%同源性,因此,CaS1可辨识白色念珠菌以及热带念珠菌的原因可表明这两个物种共享可结合至CaS1 scFv的类似抗原决定基。

[0139] 另外,吾等自临床检测CaS1 scFv与耐氟康唑及敏感念珠菌属的结合活性。念珠菌属及其MIC列举于表2中。如图6中展示,CaS1 scFv可结合至耐氟康唑且敏感白色念珠菌(图6B)及热带念珠菌(图6C),但未结合至光滑念珠菌及近平滑念珠菌(资料未示出)。这些数据表明CaS1 scFv可潜在地用于诊断及/或治疗耐氟康唑白色念珠菌及热带念珠菌。

[0140] 另外,如图6D中所见,吾等亦观测到CaS1 scFv可结合至不同物种的EN01。用于白色念珠菌(CaEN01)、肺炎链球菌(SpEN01)、金黄色葡萄球菌(SaEN01)、小鼠(mEN01)及人类(hEN01)的EN01经纯化,且经受SDS-PAGE(图6D左侧)及西方墨点法(图6D右侧)。CaS1 scFv不仅结合CaEN01并且结合SpEN01及SaEN01,但极少结合至mEN01及hEN01(图6D右侧)。这些结果表明来自白色念珠菌、肺炎链球菌及金黄色葡萄球菌的EN01可共享可结合至CaS1 scFv的类似抗原决定基。

[0141] 表2. 临床耐氟康唑及敏感念珠菌属以及其MIC。

	样本	生物体	药物	MIC (g/ml)	解释*
[0142]	CA6-17	白色念珠菌	氟康唑	16	R
	CA7-26	白色念珠菌	氟康唑	8	R
	CA7-3	白色念珠菌	氟康唑	2	S
	CA10-50	白色念珠菌	氟康唑	2	S
	CA7-30	白色念珠菌	氟康唑	1	S
	CA10-65	白色念珠菌	氟康唑	1	S

[0143]	CT6-29	热带念珠菌	氟康唑	32	R
	CT11-52	热带念珠菌	氟康唑	32	R
	CT6-50	热带念珠菌	氟康唑	8	R
	CT12-54	热带念珠菌	氟康唑	8	R
	CG5-8	光滑念珠菌	氟康唑	64	R
	CG8-11	光滑念珠菌	氟康唑	64	R
	CG7-37	光滑念珠菌	氟康唑	32	S
	CG5-66	光滑念珠菌	氟康唑	16	S
	CP8-20	近平滑念珠菌	氟康唑	256	R
	CP12-37	近平滑念珠菌	氟康唑	256	R
	CP6-20	近平滑念珠菌	氟康唑	16	R
	CP7-17	近平滑念珠菌	氟康唑	8	S
	CP8-48	近平滑念珠菌	氟康唑	4	S

[0144] *R用于耐药性;S用于敏感。

[0145] 实例7用于识别白色念珠菌的细胞表面上抗 α -烯醇酶CaS1抗体的流动式细胞测量术分析

[0146] 抗CaEN01 IgY、scFv CaS1及对照scFv与白色念珠菌接触,且接着经受流动式细胞测量术分析。抗CaEN01 IgY、scFv CaS1及对照scFv展示89.7 \pm 2.8%、46.64 \pm 3.1%及23 \pm 2.3%FITC荧光反应(图7A),表示抗体可结合至白色念珠菌表面上的 α -烯醇酶。此外,用于染色的碘化丙锭用于识别白色念珠菌的死亡率,且发现抗CaEN01 IgY、scFv CaS1及对照scFv杀死90 \pm 1.5%、37 \pm 0.8%、21 \pm 1%的白色念珠菌(图7A)。如图7B中展示,与对照svFv及抗CaEN01 IgY相比,scFv CaS1可结合至白色念珠菌表面上的 α -烯醇酶,且因此杀死白色念珠菌。

[0147] 实例8用于识别白色念珠菌的细胞表面上抗 α -烯醇酶CaS1抗体的免疫荧光法分析

[0148] 抗CaEN01 IgY、scFv CaS1及对照scFv用于免疫荧光法分析以用于识别白色念珠菌细胞表面上的抗 α -烯醇酶CaS1抗体。如图8中展示,抗CaEN01 IgY (1) 及scFv CaS1 (2) 结合至白色念珠菌表面上的 α -烯醇酶,然而对照scFv (3) 未展示结合。

[0149] 实例9通过CaS1 scFv的白色念珠菌生长及菌丝形成的衰减

[0150] 吾等评价CaS1对白色念珠菌生长的影响,吾等将CaS1 scFv与白色念珠菌一起预培育,且涂覆于琼脂上。如图9A所见,如在YPD琼脂盘上所观测,当稀释至 10^{-4} 时,与对照相比,CaS1 scFv减少白色念珠菌生长。抗CaEN01 IgY的抑制性效应与scFv CaS1 scFv一样好。

[0151] 菌丝形成亦展示在白色念珠菌的毒性中发挥了关键作用。因此吾等进一步研究CaS1 scFv是否影响菌丝形成。吾等将CaS1 scFv与白色念珠菌一起预培育,且检测群落形态。如图9B中所见,沿着对照群落的边缘,菌丝清楚地可见,然而对于经CaS1 scFv处理的群落,极少或几乎没有观测到菌丝。当CaS1 scFv与白色念珠菌一起预培育时,菌丝形成的衰减效应为显而易见的。

[0152] 实例10抑制白色念珠菌结合至人类口腔角质细胞OECM-1细胞

[0153] 白色念珠菌细胞(1×10^6) 分别用50 μ g及100 μ g的scFv CaS1处理,且所得混合物添加至人类口腔角质细胞OECM-1细胞以测试白色念珠菌细胞与OECM-1细胞的结合能力。与

PBS对照相比, 50 μ g及100 μ g的scFv CaS1显著减少白色念珠菌细胞与OECM-1细胞的结合(图10)。

[0154] 实例11 CaS1 scFv对EN01与纤维蛋白溶酶原的结合的作用

[0155] 熟知表面EN01充当纤维蛋白溶酶原受体³², 结合至纤维蛋白溶酶原将使其活化成为纤维蛋白溶酶, 且导致凝胶中所含纤维蛋白原(细胞外基质)降解。吾等进行基质凝胶研究以测试CaEN01-纤维蛋白溶酶原缔合(association)的可能生物学意义, 且观测CaS1 scFv对此结合(binding)的作用。

[0156] 代表性盘可见于图11中。在不存在纤维蛋白溶酶原的情况下, 仅念珠菌(图11-1)或仅CaS1 scFv(图9-6)并未展示纤维蛋白溶解活性。白色念珠菌与1及10 μ g的纤维蛋白溶酶原一起培育, 导致纤维蛋白溶解活性显著增加(图11-2及11-3)。此结果表明CaEN01结合纤维蛋白溶酶原可通过存在于基质凝胶中的凝血酶活化, 以消化周围纤维蛋白原。然而, 与仅存在纤维蛋白溶酶原相比, 如图11-4及11-5中展示, 纤维蛋白溶解活性可通过将白色念珠菌与CaS1(10及100 μ g)一起预培育而受到显著抑制。抑制凝胶中纤维蛋白原的降解为显而易见的。吾等的结果表明CaEN01与纤维蛋白溶酶原的结合通过CaS1 scFv抗体以剂量依赖性方式显著减少。

[0157] 实例12白色念珠菌毒性通过ScFv CaS1中和以延长感染小鼠的存活率

[0158] 1×10^6 个细胞的白色念珠菌溶液与100 μ g抗CaEN01 IgY、scFv CaS1及对照scFv中的每一者混合, 且接着注射至ICR小鼠中(每组5只小鼠)。在10天之后, 抗CaEN01 IgY、scFv CaS1及对照scFv组的存活率分别为100%、80%及0%。发现抗CaEN01 IgY及scFv CaS1可中和白色念珠菌的毒性, 且因此可延长小鼠的寿命或保护小鼠免于死亡。

[0159] 实例13通过CDR移植的CaS1 scFv的人源化

[0160] 设计两种人源化CaS1 scFv(V1及V3)。人源化CaS1 scFv V1移植至人类构架(蛋白质数据库: 2JIX-L、2ZKH-H)上, 此最适合的长度序列通过Discovery Studio软件分析。人源化CaS1 scFv V3移植至人类构架Avastin[®](蛋白质数据库: 2FJG)的序列上。这些人源化CaS1 scFv(V1及V3)通过Gemonics BioSci&Tech(New Taipei City)合成, 选殖至pComb3X载体中, 且转移至Top 10大肠杆菌中用于蛋白质表达。表达的V1及V3蛋白质通过Ni⁺琼脂糖纯化且通过SDS-PAGE及西方墨点法分析。

[0161] 如图12中所展示结果, 人源化CaS1 scFv V1(图13A)及V3(图13B)抗体经设计以合成具有靶基因的质粒DNA, 且DNA接着转移至Top 10大肠杆菌中以用于表达。接着, 表达的蛋白质用Ni⁺琼脂糖纯化, 且通过SDS-PAGE分析。之后, 表达的蛋白质通过西方墨点法(抗HA标签)确认。

[0162] 实例14测定CaEN01与hzCaS1 V1及V3的结合能力

[0163] hzCaS1 V1、V3及CaS1 scFv用于识别重组CaEN01蛋白质。如图13中展示, (A) 库马斯蓝用于染色; (B) 小鼠抗人类 κ 、 λ IgG及HRP结合兔子抗小鼠IgG用于西方墨点法(右图); (C) 使用小鼠抗HA IgG及HRP结合兔子抗小鼠IgG; 及(D) 使用山羊抗鸡轻链IgG及HRP结合驴抗山羊IgG。泳道1: hzCaS1 scFv V1。泳道2: hzCaS1 scFv V3。泳道3: CaS1 scFv。

[0164] 实例15通过ELISA测定hzCaS1 V1及V3 scFv的K_D

[0165] 纯化hzCaS1 V1及V3 scFv用于识别重组CaEN01蛋白质。hzCaS1 V1及V3 scFv用作经系列稀释的初级抗体。山羊抗鸡轻链IgG用作二级抗体。HRP结合驴抗山羊IgG用于侦测

(参看图14(A)及(C))。OD值计算为百分比。计算scFv的 K_D 或50%有效浓度(EC_{50})且通过莫耳浓度(M)表示。hzCaS1 V1及V3 scFv的 K_D 分别为 $1.51\mu\text{g}/\text{ml}=4.6\times 10^{-8}\text{M}$ 及 $2.12\mu\text{g}/\text{ml}=8.4\times 10^{-8}\text{M}$ 。ELISA数据表示为重复孔的平均值 \pm SD(参看图14(B)及(D))。

[0166] 实例16 CaS1、hzCaS1 V1及V3 scFv抑制CaEN01结合至纤维蛋白溶酶原

[0167] Ni^{2+} 琼脂糖上的CaEN01用 $100\mu\text{g}$ hzCaS1 V1、V3及CaS1 scFv处理1小时,接着用纤维蛋白溶酶原($20\mu\text{g}$)培育1小时。具有CaS1 scFv的各实验组CaEN01滴落至凝胶上,且在室温下培育2天,观测凝胶降解结果,结果展示于图15中。图15-1如凝胶中所见,在仅存在纤维蛋白溶酶原($1\mu\text{g}/\mu\text{l}$) (阳性对照)下展示显著纤维蛋白溶解活性。图15-2在无纤维蛋白溶酶原的仅Ni SepharoseTM ($10\mu\text{g}$) (阴性对照)上的CaEN01在凝胶中不展示纤维蛋白溶解活性。图15-3在具有纤维蛋白溶酶原($20\mu\text{g}$)的SepharoseTM ($10\mu\text{g}$)上的CaEN01展示纤维蛋白溶解活性。与15-3相比,图15-4、15-5、15-6在用hzCaS1 V1(图15-4)、V3(图15-5)、CaS1 scFv(图15-6) ($100\mu\text{g}$)处理且与纤维蛋白溶酶原($20\mu\text{g}$)一起培育的SepharoseTM ($10\mu\text{g}$)上的CaEN01不展示纤维蛋白溶解活性。因此,结果表明CaEN01结合纤维蛋白溶酶原可通过存在于基质凝胶中的凝血酶活化,以消化周围血纤维蛋白原。然而,与如图15-3中展示在纤维蛋白溶酶原存在下相比,纤维蛋白溶解活性可通过将CaEN01与hzCaS1 V1、V3、CaS1 scFv一起预培育而受到显著抑制。抑制凝胶中纤维蛋白原的降解为显而易见的(图15-4、15-5、15-6)。吾等的结果表明CaEN01与纤维蛋白溶酶原的结合通过hzCaS1 V1、V3、CaS1 scFv抗体显著减少。

[0168] 实例17使用CaS1 scFv进行CaEN01的抗原决定基定位

[0169] 九个PCR扩增片段使用全长CaEN01 (1323bp)作为模板获得,接合至PET-21a载体且转型至BL-21大肠杆菌中。插入片段的身分通过定序确认(Genomics BioSci&Tech, New Taipei City)。蛋白质表达通过IPTG诱发进行。SDS-PAGE及西方墨点法用于表征经表达的重组蛋白质。

[0170] 对于CaEN01的抗原决定基定位,纯化CaS1 scFv用于识别西方墨点法及ELISA上的重组CaEN01蛋白质。抗原决定基区域经定位含有198bp核苷酸,其所推导氨基酸序列(残基235至300)为DKAGYKGKVGIAMDVASSEFYKDGKYDLDFKNPESDPKWLSGPQLADLYEQL ISEYPIVS IEDPF (SEQ ID NO:19) (66个氨基酸)。

[0171] 为进一步测定抗原决定基位置,定点突变诱发(孔克尔方法(Kunkel method))用于根据上文所提及具有少量修饰的198bp经定位抗原片段的核苷酸序列建构9个胜肽表达噬菌体(基于Phage Display-A Practical Approach的“Chapter 2, Constructing phage display libraries by oligonucleotide-directed mutagenesis”,由Tim Clackson及Henry B.Lowman编辑,OXFORD University Press 2004)。携有编码抗原抗原决定基的核苷酸序列的经修饰pCANTAB 5E DNA转型至ER2738大肠杆菌中。噬菌粒DNA自大肠杆菌提取,且针对用EcoRI酶限制插入进行分析。检测病毒粒子表面上表达10种氨基酸的各所得噬菌体在ELISA上抗CaS1 scFv抗体的反应性。组合结果展示CaS1 scFv辨识位于₂₄₀KGKVGIAMDV₂₄₉ (SEQ ID NO:3)及₂₇₈PQLADLYEQLISEYP₂₉₂ (SEQ ID NO:4)中的抗原抗原决定基上的氨基酸残基。

[0172] 九种如上重组CaEN01蛋白质用于辨识点渍墨法(dot blot)上的纯化纤维蛋白溶酶原。结果展示CaS1 scFv抗体结合至跨越氨基酸残基301至437的纤维蛋白溶酶原片段,这些氨基酸残基301至437序列为AEDDWDAAWHFFERVGDKIQIVGDDLTVTNPTRIKTAIEKKAANALLKLV

NQIGTLTESIQ AAND S YA AG W G VMV SHRS GETEDTFIADL S V GLRS GQIKT GAP ARSERLAKLNQILRIIEEL GSEAIYAGKDFQKA (SEQ ID NO:20)。以上结果展示于图16中。

[0173] 实例18 CaS1 scFv延长感染白色念珠菌的ICR小鼠的存活率

[0174] 吾等评价动物模型上CaS1的存活率。起初ICR小鼠经尾部静脉注射仅具有PBS的 1×10^6 个细胞的白色念珠菌或与CaS1 (10及100 μ g) 在37 $^{\circ}$ C下一起预培育一小时的细胞。如图17中所见,与PBS对照相比,与CaS1 (10及100 μ g) 一起预培育将小鼠存活率分别延长至40%及80%。抗百步蛇 (Deinagkistrodon acutus) scFv (抗DA) 为针对蛇毒的抗体,其用作不相关scFv对照。这些数据表明CaS1 scFv在ICR小鼠上提供抗念珠菌血症的致死攻击的部分保护活性。

[0175] 实例19白色念珠菌生物膜形成抑制分析

[0176] 白色念珠菌细胞在YPD培养基中培养,且接着收集。细胞用PBS洗涤,且再悬浮于含有100mM葡萄糖细胞密度为 10^7 个细胞/毫升的YPD培养基中。96孔盘用CaS1 scFv或氟康唑处理,且接着用1ml细胞悬浮液接种。在两个小时附着时段之后,接种液通过用PBS洗涤来移除,且含有100mM葡萄糖的YPD培养基涂覆至盘。盘用CaS1 scFv或氟康唑处理,且生物膜在37 $^{\circ}$ C下生长72小时。盘用PBS洗涤,且接着生物膜形成通过显微法观测 (图18)。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 吕思洁
- [0003] 杨沂渊
- [0004] <120> 抗感染疾病的抗体
- [0005] <130> T54267/US3387
- [0006] <160> 20
- [0007] <170> PatentIn 版本 3.5
- [0008] <210> 1
- [0009] <211> 10
- [0010] <212> PRT
- [0011] <213> 白色念珠菌属
- [0012] <400> 1
- [0013] Leu Tyr Glu Gln Leu Ile Ser Glu Tyr Pro
- [0014] 1 5 10
- [0015] <210> 2
- [0016] <211> 10
- [0017] <212> PRT
- [0018] <213> 白色念珠菌属
- [0019] <400> 2
- [0020] Pro Gln Leu Ala Asp Leu Tyr Glu Gln Leu
- [0021] 1 5 10
- [0022] <210> 3
- [0023] <211> 10
- [0024] <212> PRT
- [0025] <213> 白色念珠菌属
- [0026] <400> 3
- [0027] Lys Gly Lys Val Gly Ile Ala Met Asp Val
- [0028] 1 5 10
- [0029] <210> 4
- [0030] <211> 15
- [0031] <212> PRT
- [0032] <213> 白色念珠菌属
- [0033] <400> 4
- [0034] Pro Gln Leu Ala Asp Leu Tyr Glu Gln Leu Ile Ser Glu Tyr Pro
- [0035] 1 5 10 15
- [0036] <210> 5
- [0037] <211> 5
- [0038] <212> PRT

[0039] <213> 人工序列
[0040] <220>
[0041] <223> L-CDR1
[0042] <400> 5
[0043] Ser Gly Ser Tyr Gly
[0044] 1 5
[0045] <210> 6
[0046] <211> 3
[0047] <212> PRT
[0048] <213> 人工序列
[0049] <220>
[0050] <223> L-CDR2
[0051] <400> 6
[0052] Ser Asn Asn
[0053] 1
[0054] <210> 7
[0055] <211> 10
[0056] <212> PRT
[0057] <213> 人工序列
[0058] <220>
[0059] <223> L-CDR3
[0060] <400> 7
[0061] Gly Ser Arg Asp Ser Ser Tyr Val Gly Val
[0062] 1 5 10
[0063] <210> 8
[0064] <211> 8
[0065] <212> PRT
[0066] <213> 人工序列
[0067] <220>
[0068] <223> H-CDR1
[0069] <400> 8
[0070] Gly Phe Thr Phe Ile Asp Tyr Gly
[0071] 1 5
[0072] <210> 9
[0073] <211> 8
[0074] <212> PRT
[0075] <213> 人工序列
[0076] <220>
[0077] <223> H-CDR2

[0078]	<400> 9
[0079]	Ile Gly Ser Ser Gly Ser Ser Thr
[0080]	1 5
[0081]	<210> 10
[0082]	<211> 21
[0083]	<212> PRT
[0084]	<213> 人工序列
[0085]	<220>
[0086]	<223> H-CDR3
[0087]	<400> 10
[0088]	Ala Lys Ser Ala Gly Gly Tyr Cys Val Asn Gly Ala Gly Cys Asn Gly
[0089]	1 5 10 15
[0090]	Gly Ser Ile Asp Ala
[0091]	20
[0092]	<210> 11
[0093]	<211> 103
[0094]	<212> PRT
[0095]	<213> 人工序列
[0096]	<220>
[0097]	<223> 包含于抗-CaEN01 scFv单株抗体 (CaS1) 的轻链的氨基酸列
[0098]	<400> 11
[0099]	Ala Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Ala Asn Leu Gly Gly Thr Val
[0100]	1 5 10 15
[0101]	Lys Ile Thr Cys Ser Gly Gly Ser Gly Ser Tyr Gly Trp Tyr Gln Gln
[0102]	20 25 30
[0103]	Lys Ser Pro Gly Ser Ala Pro Val Thr Val Ile Tyr Ser Asn Asn Gln
[0104]	35 40 45
[0105]	Arg Pro Ser Asn Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Pro Ser Gly Ser
[0106]	50 55 60
[0107]	Thr Gly Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Gln Ala Asp Asp Glu Ala Val
[0108]	65 70 75 80
[0109]	Tyr Phe Cys Gly Ser Arg Asp Ser Ser Tyr Val Gly Val Phe Gly Ala
[0110]	85 90 95
[0111]	Gly Thr Thr Leu Thr Val Leu
[0112]	100
[0113]	<210> 12
[0114]	<211> 128
[0115]	<212> PRT
[0116]	<213> 人工序列

[0117]	<220>
[0118]	<223> 包含于抗-CaEN01 scFv单株抗体(CaS1)的重链的氨基酸列
[0119]	<400> 12
[0120]	Thr Val Thr Leu Asp Glu Ser Gly Gly Gly Leu Gln Thr Pro Arg Gly
[0121]	1 5 10 15
[0122]	Ala Leu Ser Leu Val Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ile Asp Tyr
[0123]	20 25 30
[0124]	Gly Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0125]	35 40 45
[0126]	Ala Gly Ile Gly Ser Ser Gly Ser Ser Thr Asn Tyr Gly Ala Ala Val
[0127]	50 55 60
[0128]	Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asp Gly Gln Ser Thr Val Arg
[0129]	65 70 75 80
[0130]	Leu Gln Leu Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Thr Tyr Tyr Cys
[0131]	85 90 95
[0132]	Ala Lys Ser Ala Gly Gly Tyr Cys Val Asn Gly Ala Gly Cys Asn Gly
[0133]	100 105 110
[0134]	Gly Ser Ile Asp Ala Trp Gly His Gly Thr Glu Val Ile Val Ser Ser
[0135]	115 120 125
[0136]	<210> 13
[0137]	<211> 107
[0138]	<212> PRT
[0139]	<213> 人工序列
[0140]	<220>
[0141]	<223> hzCaS1-V1 scFv
[0142]	<400> 13
[0143]	Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[0144]	1 5 10 15
[0145]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Gly Ser Tyr Gly Leu
[0146]	20 25 30
[0147]	Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr
[0148]	35 40 45
[0149]	Ser Asn Asn Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
[0150]	50 55 60
[0151]	Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
[0152]	65 70 75 80
[0153]	Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Ser Arg Asp Ser Ser Tyr Val Gly
[0154]	85 90 95
[0155]	Val Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

[0156]	100	105
[0157]	<210> 14	
[0158]	<211> 107	
[0159]	<212> PRT	
[0160]	<213> 人工序列	
[0161]	<220>	
[0162]	<223> hzCaS1-V3 scFv	
[0163]	<400> 14	
[0164]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
[0165]	1 5 10 15	
[0166]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Gly Ser Tyr Gly Val	
[0167]	20 25 30	
[0168]	Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr	
[0169]	35 40 45	
[0170]	Ser Asn Asn Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser	
[0171]	50 55 60	
[0172]	Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu	
[0173]	65 70 75 80	
[0174]	Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Ser Arg Asp Ser Ser Tyr Val Gly	
[0175]	85 90 95	
[0176]	Val Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
[0177]	100 105	
[0178]	<210> 15	
[0179]	<211> 128	
[0180]	<212> PRT	
[0181]	<213> 人工序列	
[0182]	<220>	
[0183]	<223> hzCaS1-V1 scFv	
[0184]	<400> 15	
[0185]	Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
[0186]	1 5 10 15	
[0187]	Ser Met Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ile Asp Tyr	
[0188]	20 25 30	
[0189]	Gly Met Asp Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val	
[0190]	35 40 45	
[0191]	Ala Glu Ile Gly Ser Ser Gly Ser Ser Thr His Tyr Ala Glu Ser Val	
[0192]	50 55 60	
[0193]	Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser Val Tyr	
[0194]	65 70 75 80	

[0195]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr Tyr Cys
[0196]	85 90 95
[0197]	Ala Lys Ser Ala Gly Gly Tyr Cys Val Asn Gly Ala Gly Cys Asn Gly
[0198]	100 105 110
[0199]	Gly Ser Ile Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
[0200]	115 120 125
[0201]	<210> 16
[0202]	<211> 128
[0203]	<212> PRT
[0204]	<213> 人工序列
[0205]	<220>
[0206]	<223> hzCaS1-V3 scFv
[0207]	<400> 16
[0208]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0209]	1 5 10 15
[0210]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ile Asp Tyr
[0211]	20 25 30
[0212]	Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0213]	35 40 45
[0214]	Ala Gly Ile Gly Ser Ser Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[0215]	50 55 60
[0216]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
[0217]	65 70 75 80
[0218]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0219]	85 90 95
[0220]	Ala Lys Ser Ala Gly Gly Tyr Cys Val Asn Gly Ala Gly Cys Asn Gly
[0221]	100 105 110
[0222]	Gly Ser Ile Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0223]	115 120 125
[0224]	<210> 17
[0225]	<211> 7
[0226]	<212> PRT
[0227]	<213> 人工序列
[0228]	<220>
[0229]	<223> 抗-CaEN01-S的连接符库
[0230]	<400> 17
[0231]	Gly Gln Ser Ser Arg Ser Ser
[0232]	1 5
[0233]	<210> 18

[0234]	<211> 18
[0235]	<212> PRT
[0236]	<213> 人工序列
[0237]	<220>
[0238]	<223> 抗-CaEN01-L的连接符库
[0239]	<400> 18
[0240]	Gly Gln Ser Ser Arg Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly
[0241]	1 5 10 15
[0242]	Gly Ser
[0243]	<210> 19
[0244]	<211> 66
[0245]	<212> PRT
[0246]	<213> 人工序列
[0247]	<220>
[0248]	<223> CaEN01的抗原决定基区域
[0249]	<400> 19
[0250]	Asp Lys Ala Gly Tyr Lys Gly Lys Val Gly Ile Ala Met Asp Val Ala
[0251]	1 5 10 15
[0252]	Ser Ser Glu Phe Tyr Lys Asp Gly Lys Tyr Asp Leu Asp Phe Lys Asn
[0253]	20 25 30
[0254]	Pro Glu Ser Asp Pro Ser Lys Trp Leu Ser Gly Pro Gln Leu Ala Asp
[0255]	35 40 45
[0256]	Leu Tyr Glu Gln Leu Ile Ser Glu Tyr Pro Ile Val Ser Ile Glu Asp
[0257]	50 55 60
[0258]	Pro Phe
[0259]	65
[0260]	<210> 20
[0261]	<211> 137
[0262]	<212> PRT
[0263]	<213> 人工序列
[0264]	<220>
[0265]	<223> 跨越氨基酸残基301至437的纤维蛋白溶酶原片段
[0266]	<400> 20
[0267]	Ala Glu Asp Asp Trp Asp Ala Trp Val His Phe Phe Glu Arg Val Gly
[0268]	1 5 10 15
[0269]	Asp Lys Ile Gln Ile Val Gly Asp Asp Leu Thr Val Thr Asn Pro Thr
[0270]	20 25 30
[0271]	Arg Ile Lys Thr Ala Ile Glu Lys Lys Ala Ala Asn Ala Leu Leu Leu
[0272]	35 40 45

[0273]	Lys	Val	Asn	Gln	Ile	Gly	Thr	Leu	Thr	Glu	Ser	Ile	Gln	Ala	Ala	Asn
[0274]	50						55					60				
[0275]	Asp	Ser	Tyr	Ala	Ala	Gly	Trp	Gly	Val	Met	Val	Ser	His	Arg	Ser	Gly
[0276]	65					70					75				80	
[0277]	Glu	Thr	Glu	Asp	Thr	Phe	Ile	Ala	Asp	Leu	Ser	Val	Gly	Leu	Arg	Ser
[0278]					85					90					95	
[0279]	Gly	Gln	Ile	Lys	Thr	Gly	Ala	Pro	Ala	Arg	Ser	Glu	Arg	Leu	Ala	Lys
[0280]				100					105					110		
[0281]	Leu	Asn	Gln	Ile	Leu	Arg	Ile	Glu	Glu	Glu	Leu	Gly	Ser	Glu	Ala	Ile
[0282]			115					120					125			
[0283]	Tyr	Ala	Gly	Lys	Asp	Phe	Gln	Lys	Ala							
[0284]	130							135								

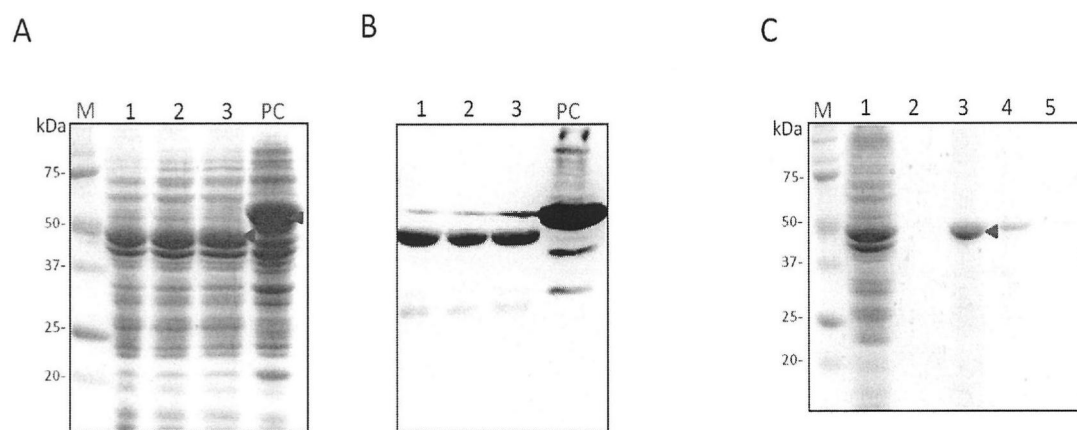


图1

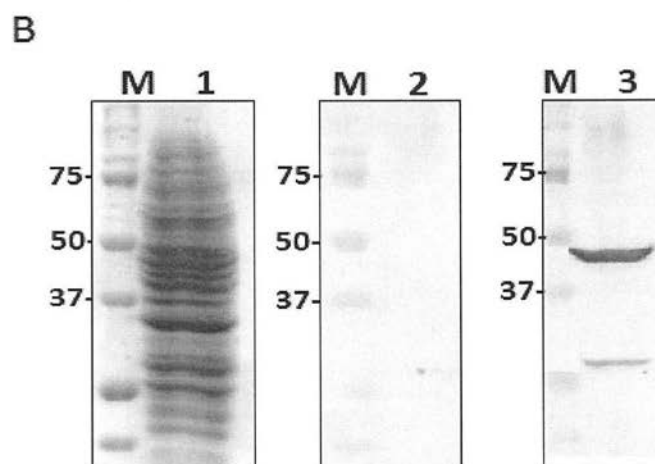
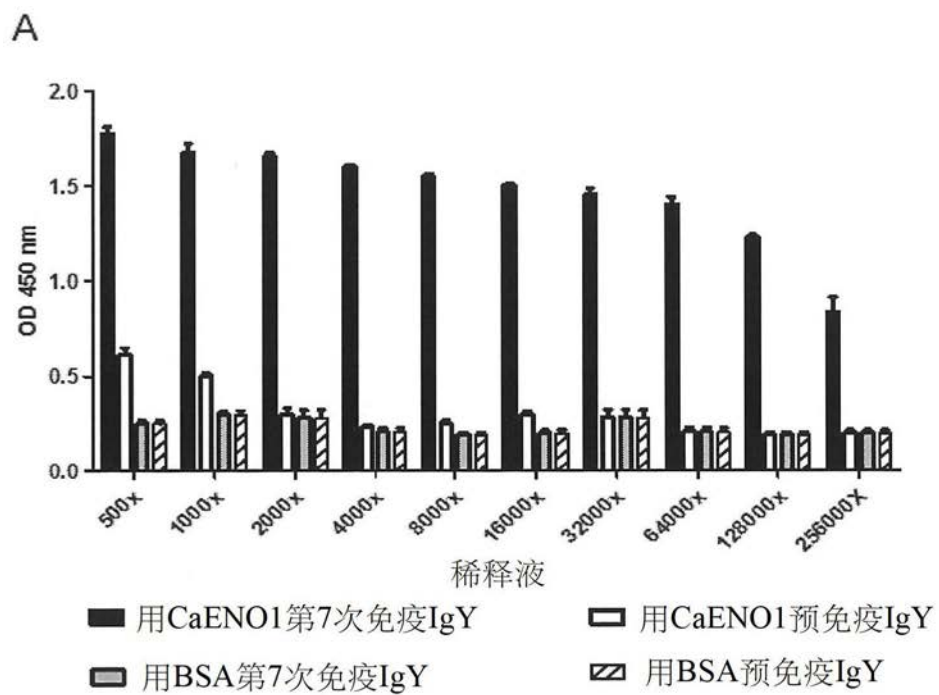


图2

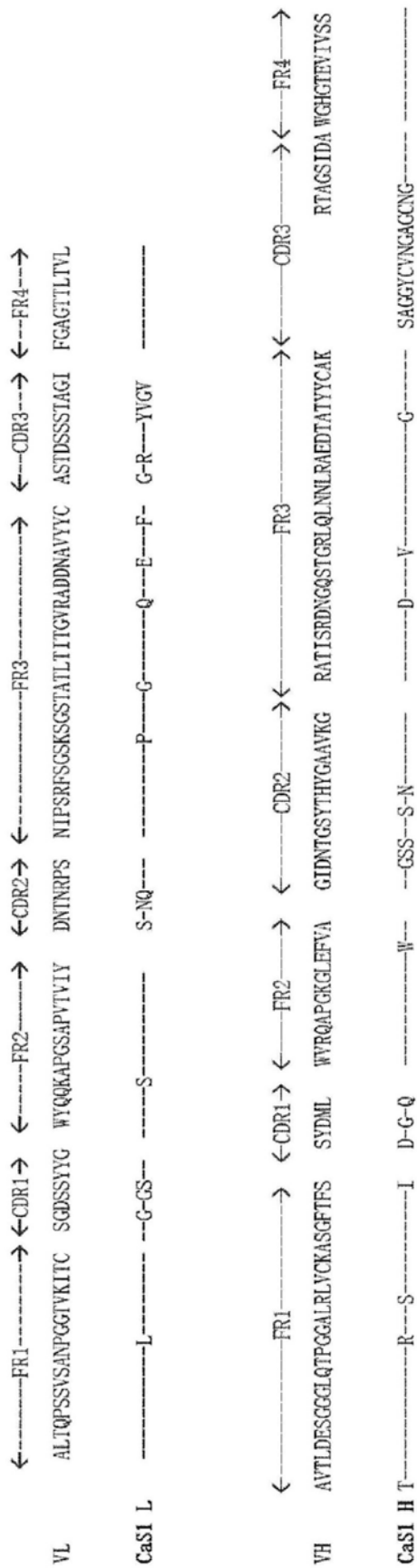


图3

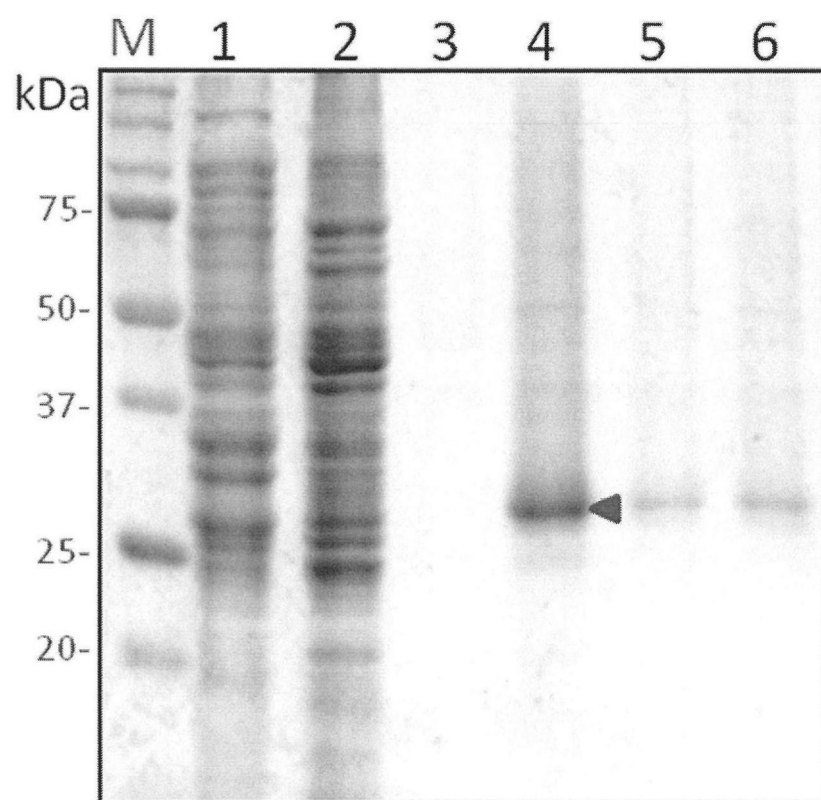


图4

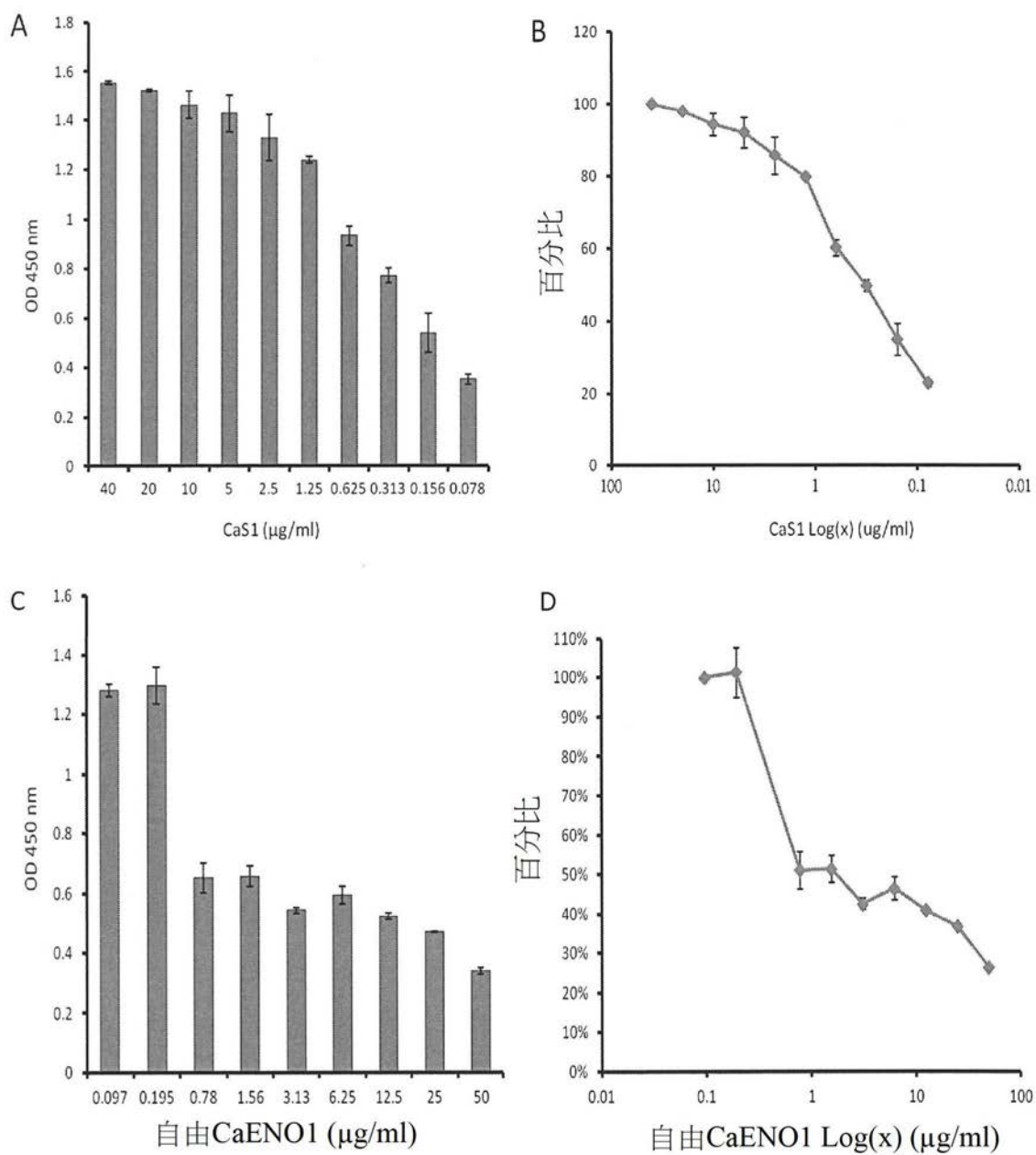


图5

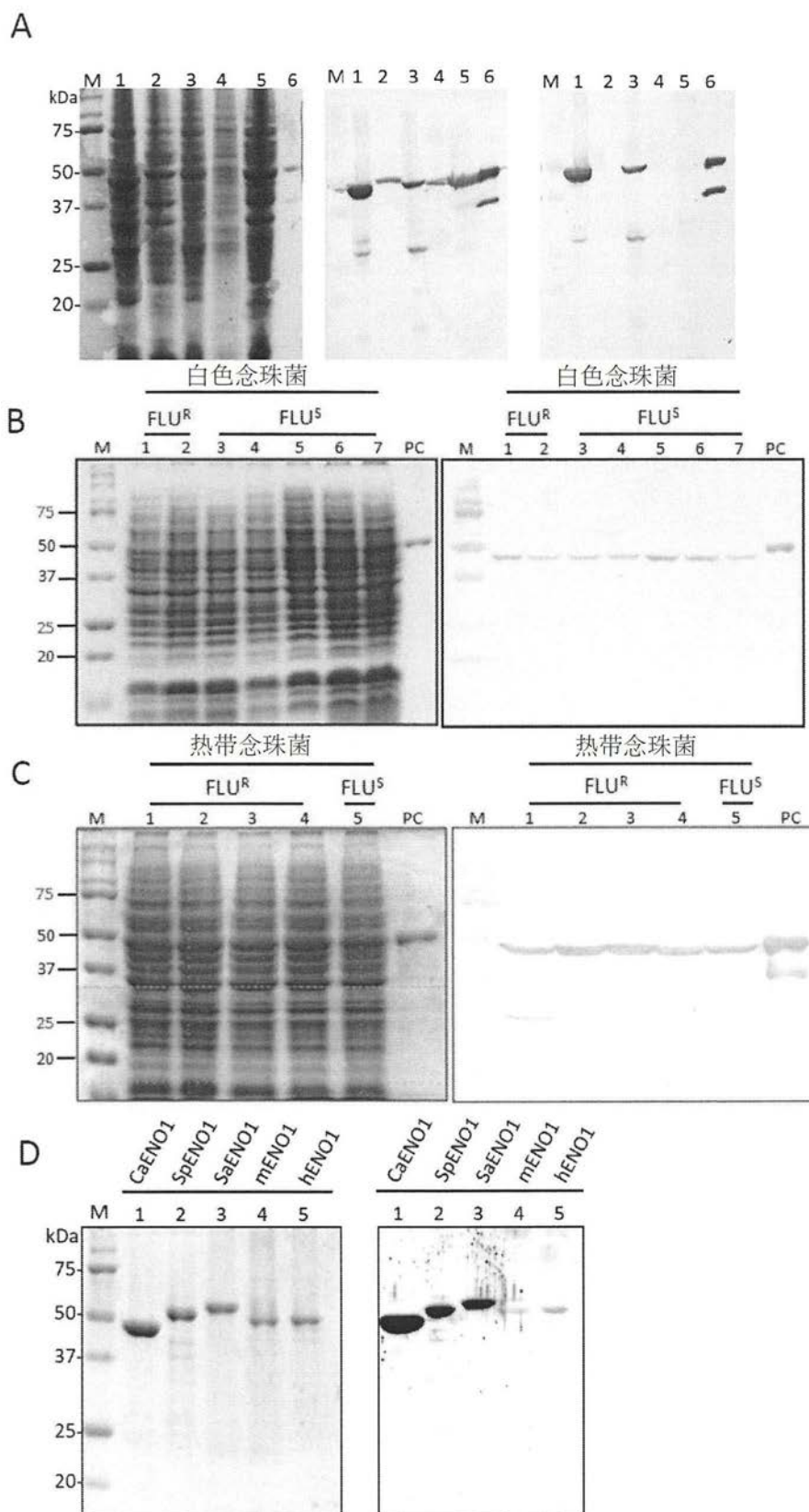
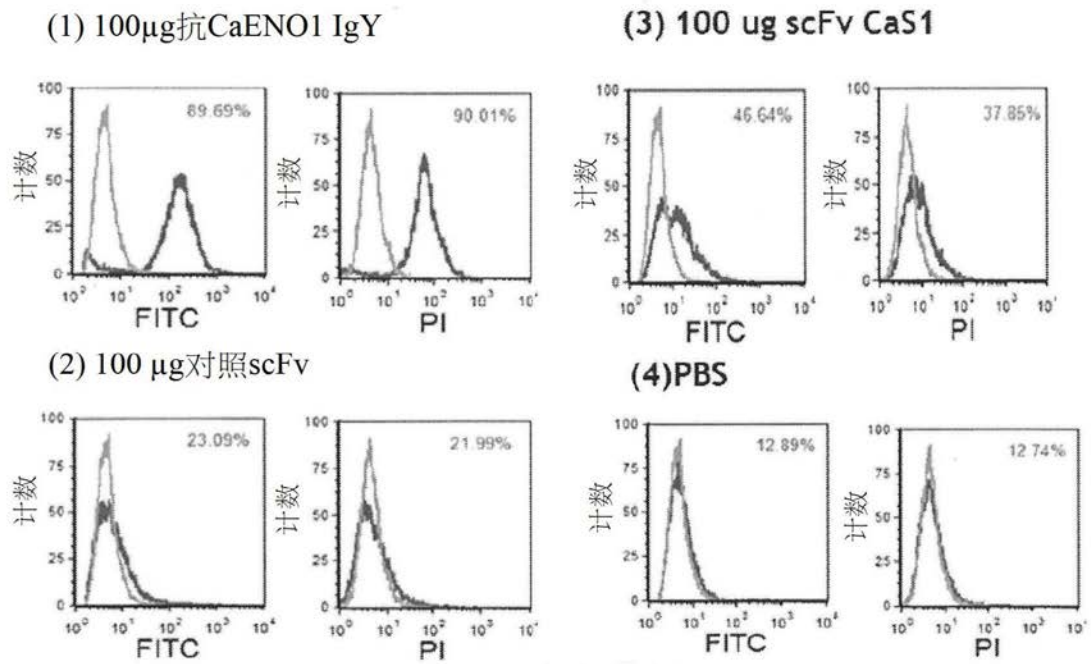


图6

(A)



(B)

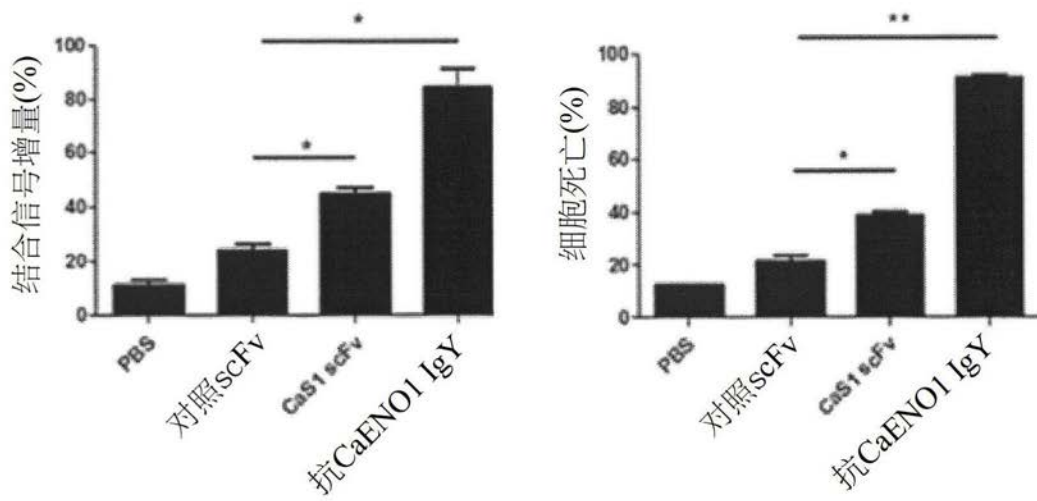


图7

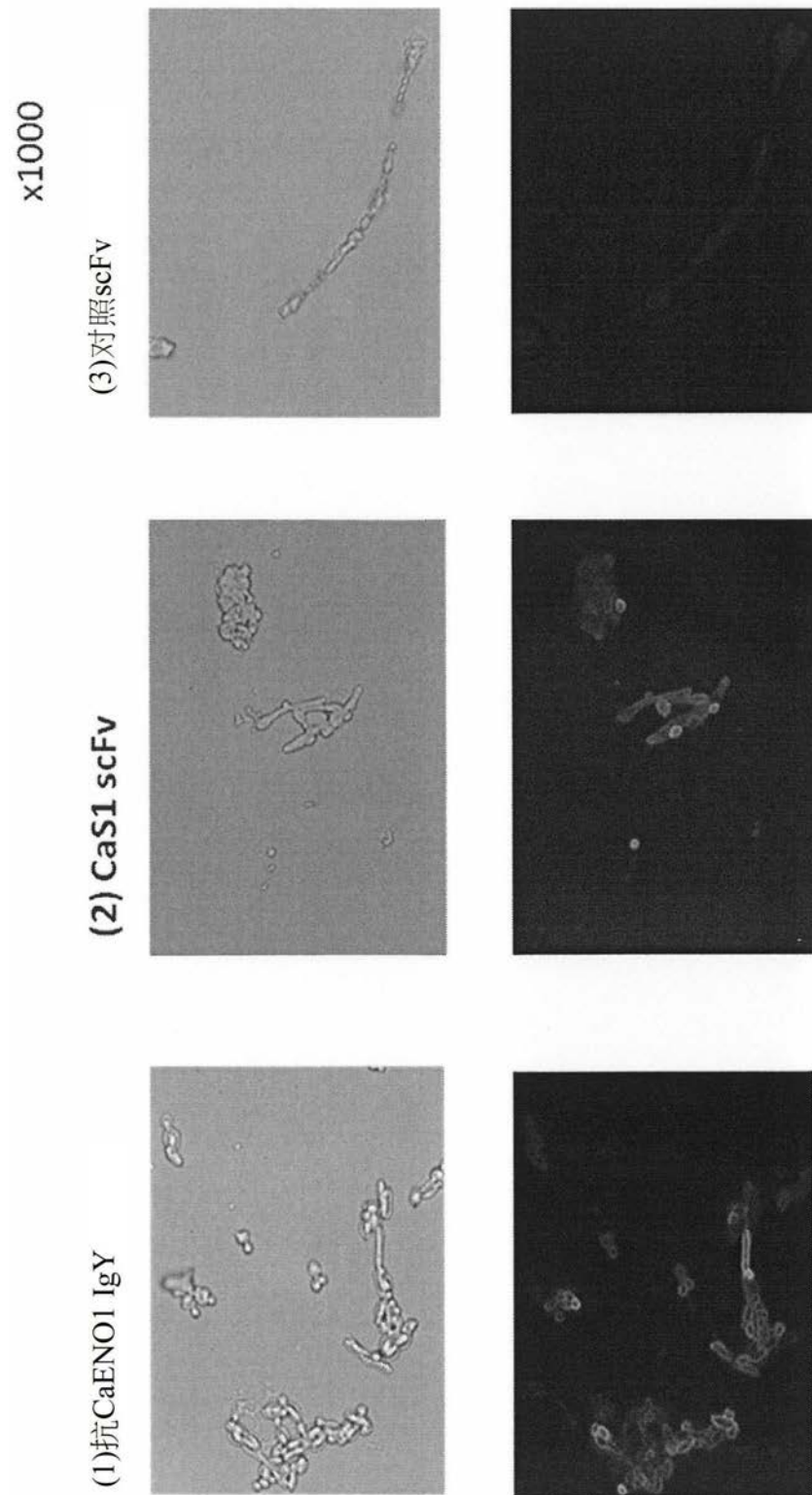
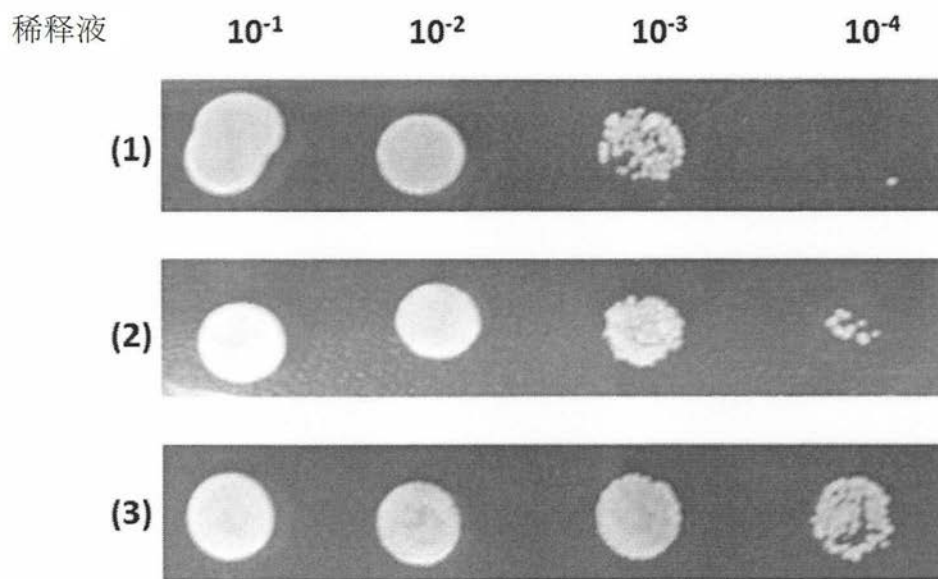


图8

(A)



(B)

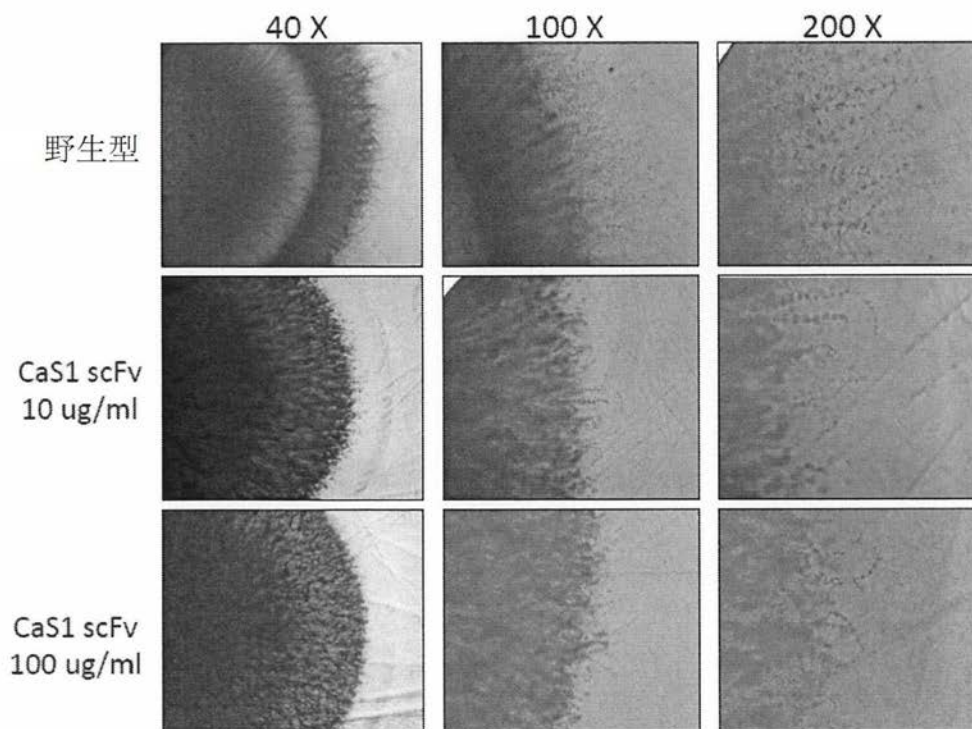


图9

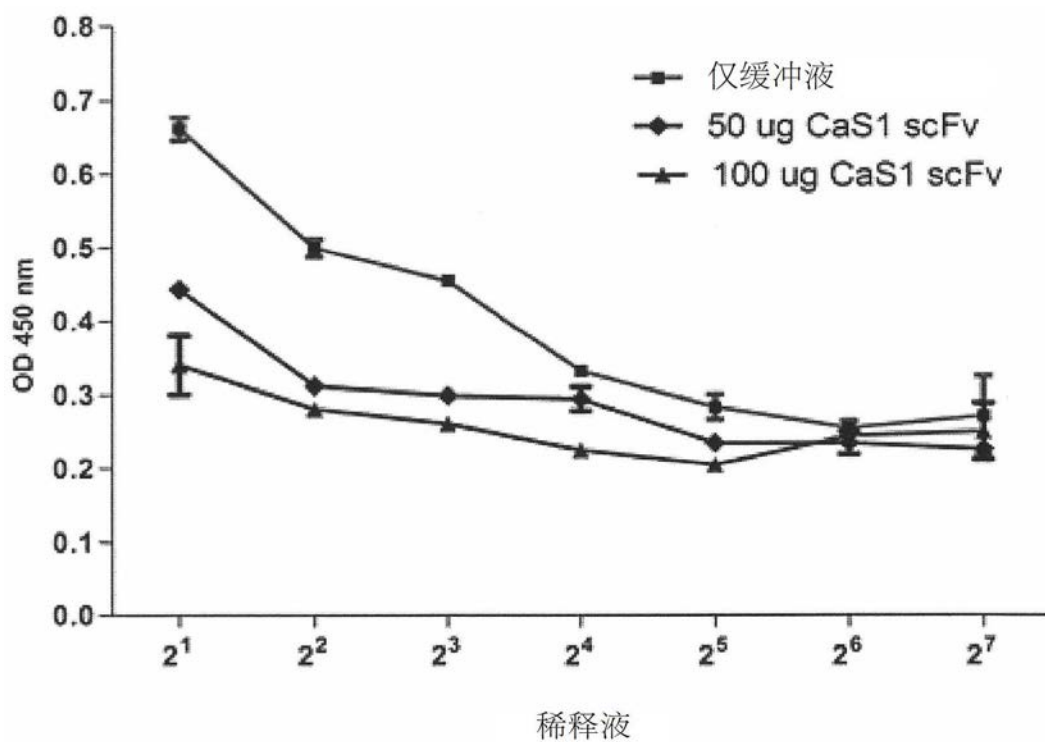


图10

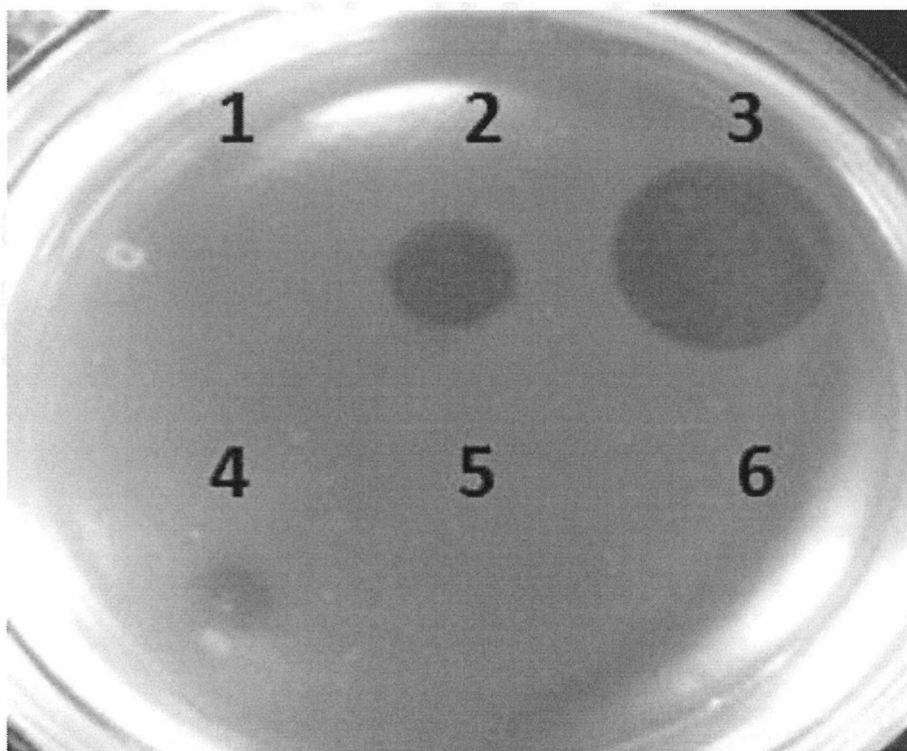


图11

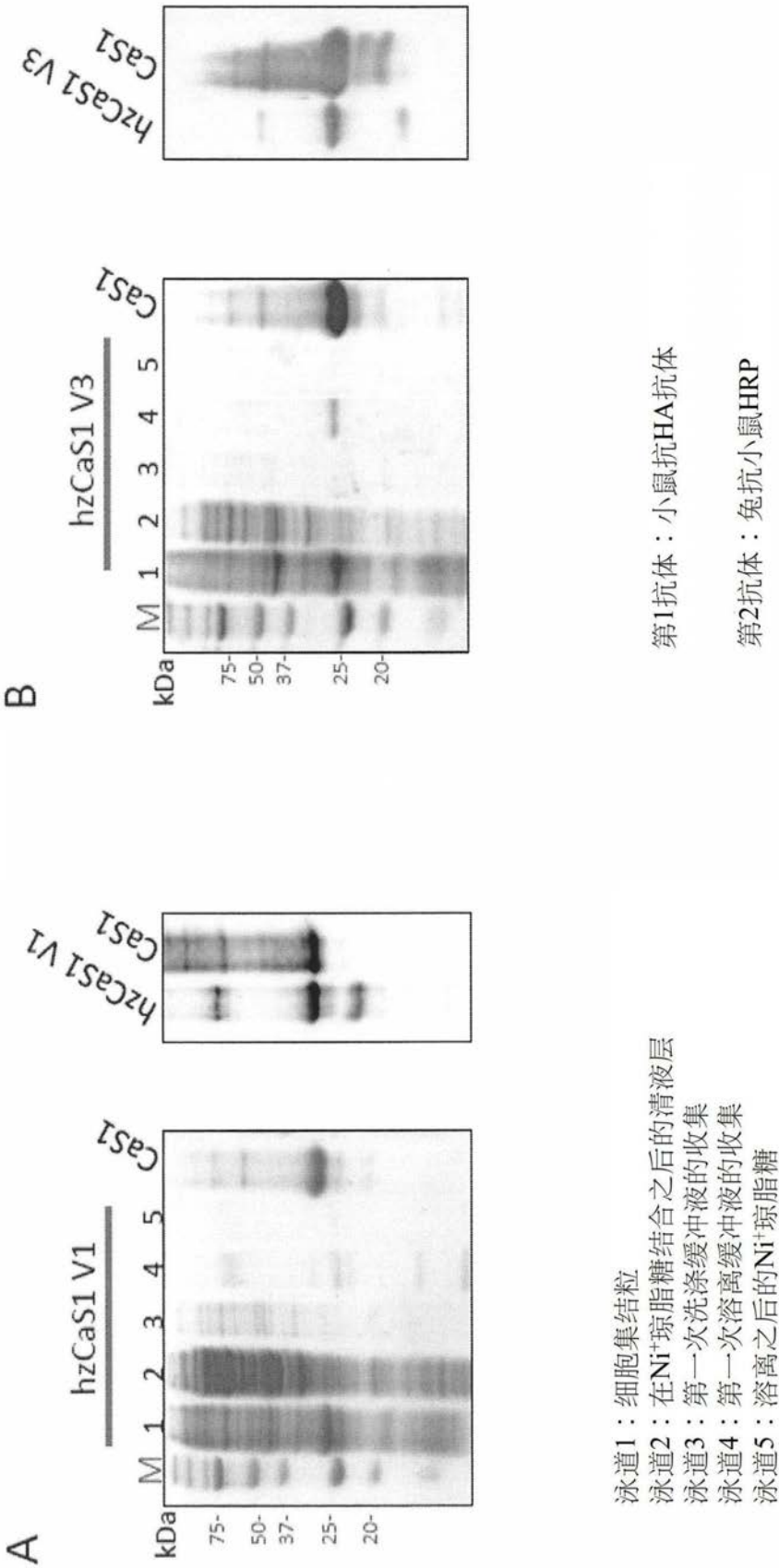


图12

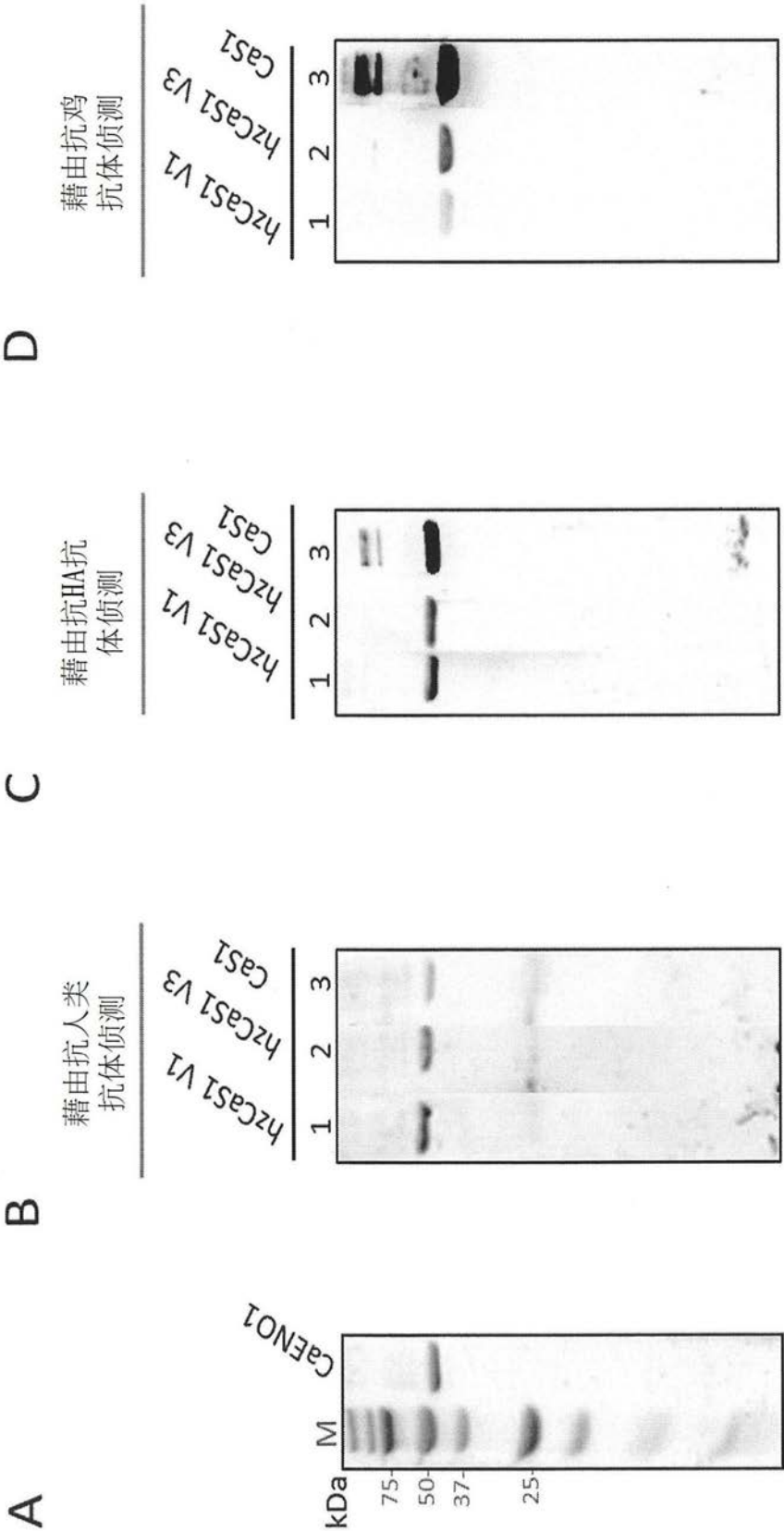


图13

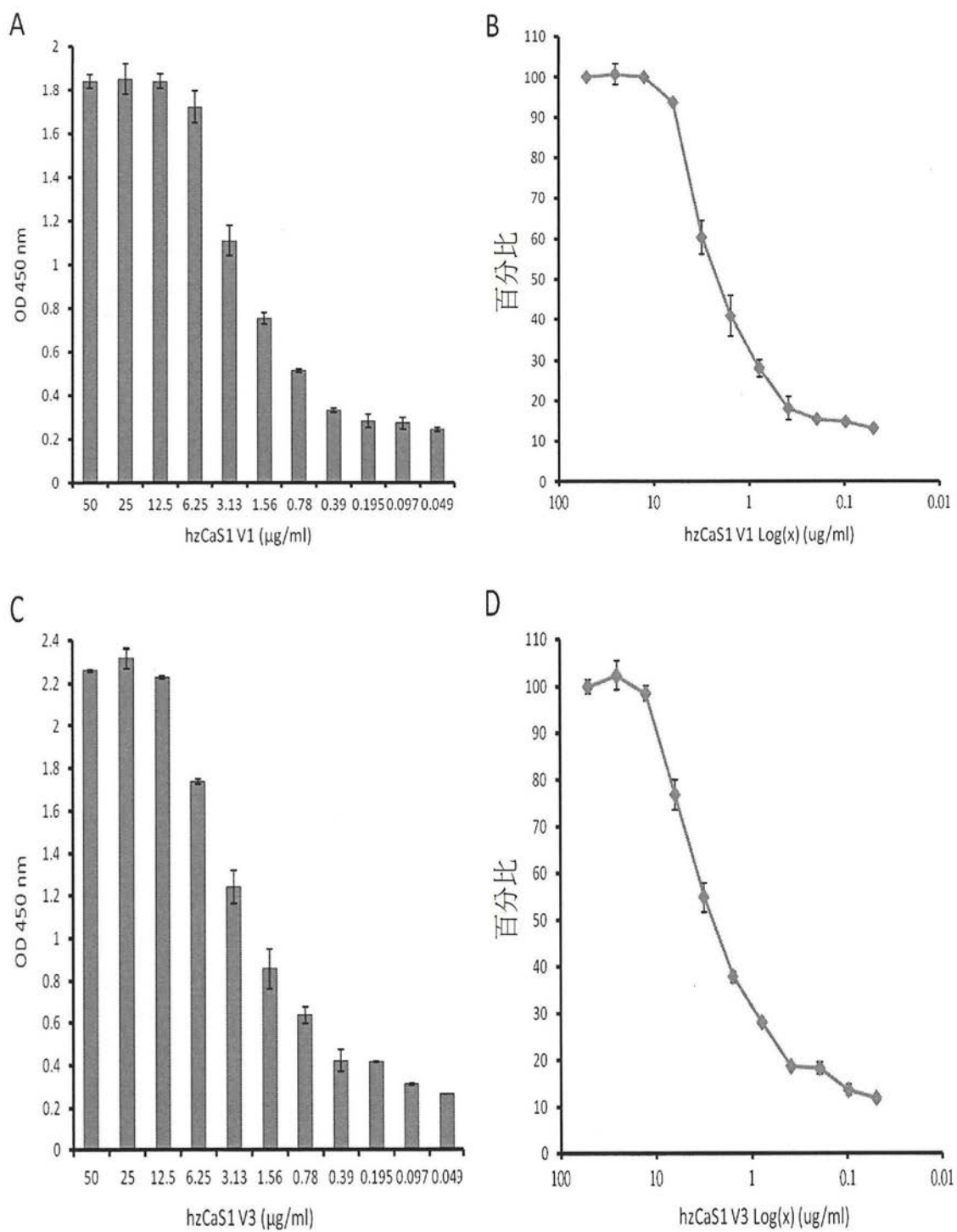


图14

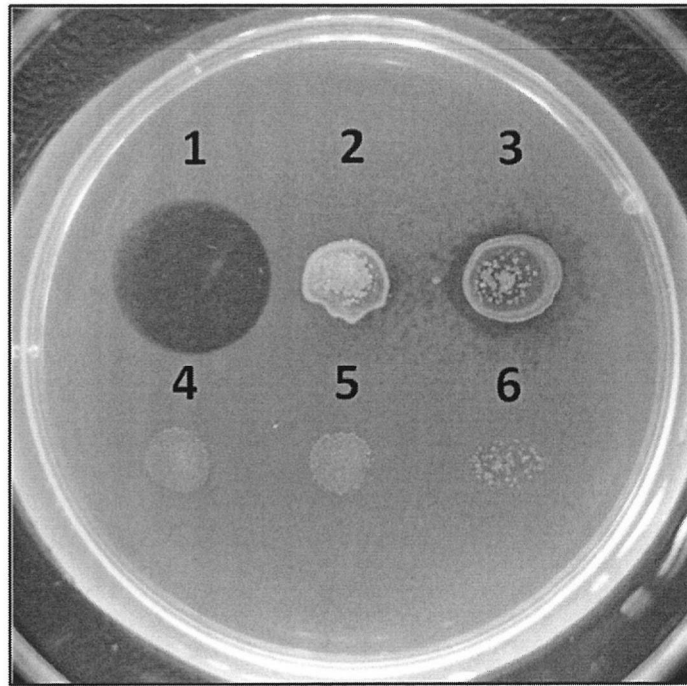


图15

CaENO1氨基酸：

MSYATKIHARYVYDSRGNPTVEVDFTTDKGLFRSIVPSGASTGVHEALELRDGDKSKWLKGKVLKAVAN
VNDIIPALIKAKIDVVDQAKIDEFLSLDGT PNKSKLGANAILGVSLAAANAAAAAQGIPLYKHIANISNA
KKGKFVLPVPFQNVNLGGSHAGGALAFQEFMIAPTGVSTFSEALRIGSEVYHNLKSLTKKKYGQSAGNV
GDEGGVAPDIKTPKEALDLIMDAIDKAGYKGKVGIAMDVASSEFYKD GKYDLDFKNPESDPSKWLSGPQ
LADLYEQLISEYPIVSIEDPFAEDDWD AWWHFFERVGDKIQIVGDDLTVTNPTRIKTAIEKKAANALLKV
NQIGTLTESIQAAANDSYAAGWGVMVSHRSGETEDTFIADLSVGLRSGQIKTGAPARSERLAKLNQILRIE
EELGSEAIYAGKDFQKASQL⁴

图16

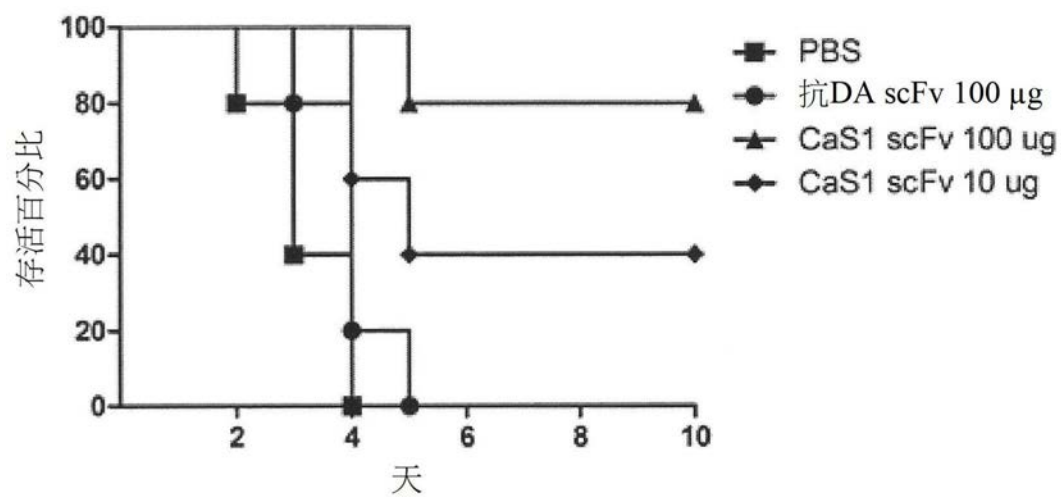


图17

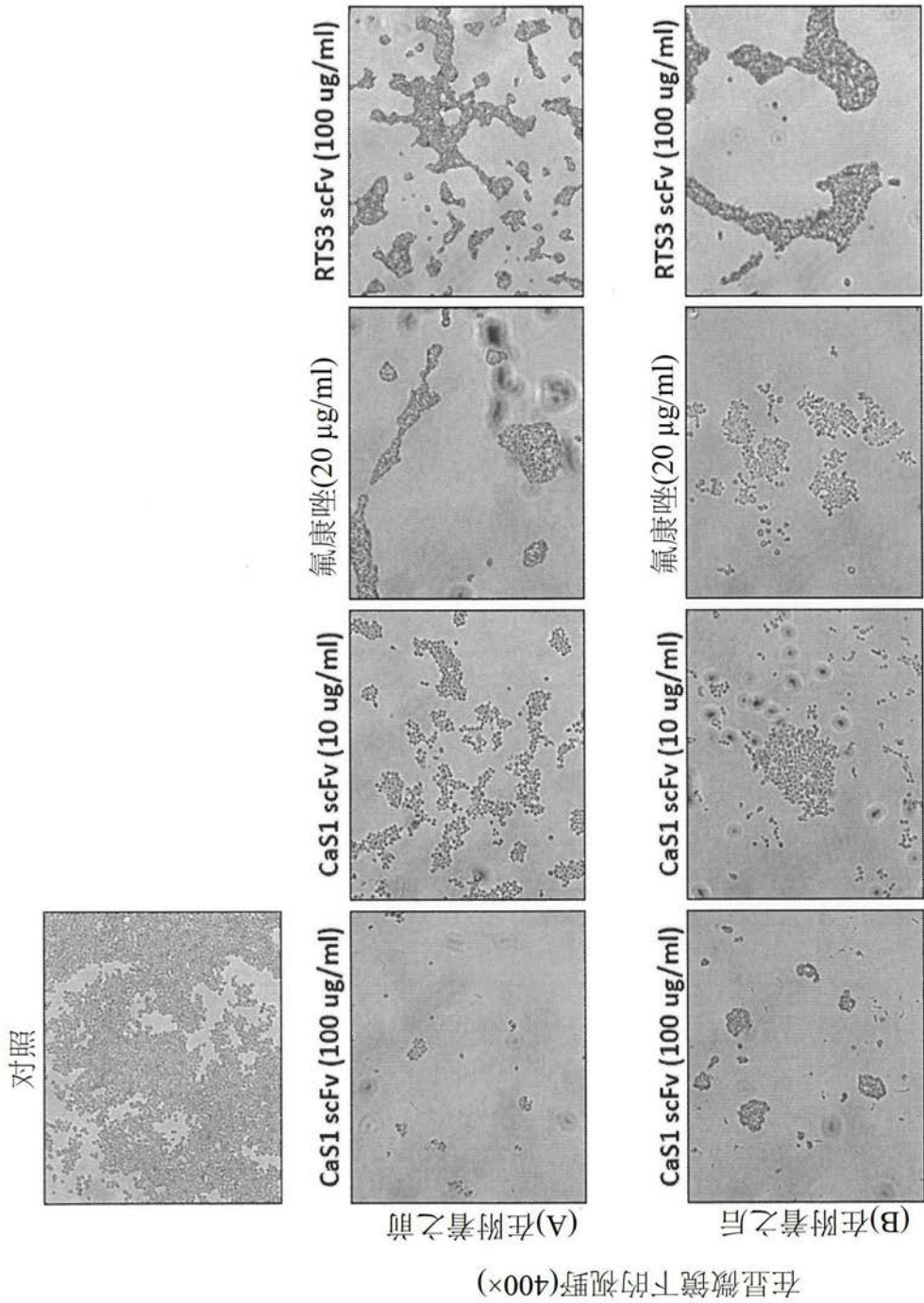


图18