



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109843917 B

(45) 授权公告日 2023.10.03

(21) 申请号 201780063662.5

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

(22) 申请日 2017.10.16

72001

(65) 同一申请的已公布的文献号

专利代理人 梁谋 黄希贵

申请公布号 CN 109843917 A

(51) Int.CI.

(43) 申请公布日 2019.06.04

C07K 16/12 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61K 39/395 (2006.01)

62/410005 2016.10.19 US

A61K 39/40 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2019.04.15

CN 102015754 A, 2011.04.13

(86) PCT国际申请的申请数据

WO 2014027697 A1, 2014.02.20

PCT/US2017/056725 2017.10.16

WO 2016131503 A1, 2016.08.25

(87) PCT国际申请的公布数据

THOMAS K. HELD等.Binding to and opsonophagocytic activity of O-antigen-specific monoclonal antibodies against encapsulated and nonencapsulated Klebsiella pneumoniae serotype O1 strains.《INFECTION AND IMMUNITY》.2000, 第68卷(第5期), 第2402-2409页. (续)

W02018/075375 EN 2018.04.26

(73) 专利权人 免疫医疗有限责任公司

审查员 蔡锐钿

地址 美国马里兰州

权利要求书6页 说明书57页

专利权人 胡默波斯生物医学公司

序列表39页 附图17页

(72) 发明人 王群 C.K.斯托弗 M.彭尼尼

曾昭舜 肖晓东 J.希利亚

G.卡普兰 D.科蒂 E.卡梅罗尼

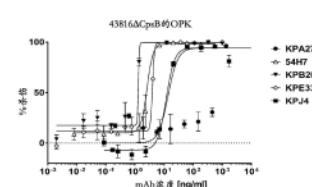
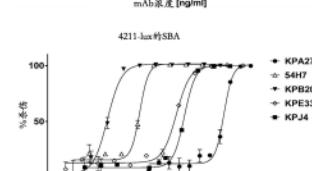
M.贝尔特拉梅洛

(54) 发明名称

抗O1抗体及其用途

(57) 摘要

本披露提供了特异性地结合肺炎克雷伯菌O1并诱导克雷伯菌属(例如,肺炎克雷伯菌)的调理吞噬杀伤的结合蛋白(例如,抗体或其抗原结合片段)。本披露还提供了在受试者中减少克雷伯菌属(例如,肺炎克雷伯菌)或治疗或预防克雷伯菌属(例如,肺炎克雷伯菌)感染的方法,这些方法包括向受试者给予肺炎克雷伯菌O1结合蛋白(例如,抗体或其抗原结合片段)。



[接上页]

(56) 对比文件

TOMISLAV RUKAVINA等.Protective effect
of antilipopolysaccharide monoclonal

antibody in experimental Klebsiella
infection.《INFECTION AND IMMUNITY》.1997,
第65卷(第5期),第1754-1760页.

1. 一种特异性地结合肺炎克雷伯菌(*K. pneumoniae*)01抗原的分离的抗原结合蛋白,该抗原结合蛋白包含一组互补决定区(CDR):HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,其中该HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3分别由以下的氨基酸序列所示:

- (a) SEQ ID NO:1、2、3、4、5和7;
- (b) SEQ ID NO:1、2、3、4、6和7;
- (c) SEQ ID NO:1、2、3、4、5和11;
- (d) SEQ ID NO:1、2、3、4、10和11;
- (e) SEQ ID NO:1、59、60、4、5和11;或
- (f) SEQ ID NO:1、59、60、4、10和11。

2. 权利要求1的抗原结合蛋白,其中该HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3分别由SEQ ID NO:1、2、3、4、5和7的氨基酸序列所示。

3. 权利要求2的抗原结合蛋白,包含含有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的VL。

4. 权利要求1的抗原结合蛋白,其中该HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3分别由SEQ ID NO:1、2、3、4、5和11的氨基酸序列所示。

5. 权利要求4的抗原结合蛋白,包含含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的VL。

6. 权利要求1的抗原结合蛋白,其中该HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3分别由SEQ ID NO:1、59、60、4、5和11的氨基酸序列所示。

7. 权利要求6的抗原结合蛋白,包含含有SEQ ID NO:61的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:63的氨基酸序列的VL。

8. 权利要求6的抗原结合蛋白,包含含有SEQ ID NO:62的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:63的氨基酸序列的VL。

9. 权利要求1的抗原结合蛋白,包含含有SEQ ID NO:8的VH。

10. 权利要求1的抗原结合蛋白,包含含有SEQ ID NO:9的VL。

11. 权利要求1的抗原结合蛋白,包含含有SEQ ID NO:12的VH。

12. 权利要求1的抗原结合蛋白,包含含有SEQ ID NO:13的VL。

13. 权利要求1的抗原结合蛋白,包含含有SEQ ID NO:61的VH。

14. 权利要求1的抗原结合蛋白,包含含有SEQ ID NO:62的VH。

15. 权利要求1的抗原结合蛋白,包含含有SEQ ID NO:63的VL。

16. 如权利要求1-15中任一项所述的抗原结合蛋白,其中所述抗原结合蛋白是非人类的、人源化的、嵌合的或表面重建的。

17. 如权利要求1-15中任一项所述的抗原结合蛋白,其中所述抗原结合蛋白是人源化的、嵌合的、表面重建的或人类的。

18. 如权利要求1-15中任一项所述的抗原结合蛋白,其中所述抗原结合蛋白是抗体。

19. 如权利要求1-15中任一项所述的抗原结合蛋白,其中所述抗原结合蛋白是抗体的抗原结合片段。

20. 如权利要求1-15中任一项所述的抗原结合蛋白,该抗原结合蛋白是单克隆抗体、重组抗体、人类抗体、人源化抗体、嵌合抗体或双特异性抗体。

21. 如权利要求19所述的抗原结合蛋白,其中所述抗原结合蛋白包含Fab、Fab'、F(ab')
2、scFv、二硫化物连接的Fv、胞内抗体、IgG Δ CH2、F(ab')
3、四体抗体、三体抗体、双体抗体、DVD-Ig、mAb2、(scFv)2或scFv-Fc。

22. 如权利要求1-15中任一项所述的抗原结合蛋白,该抗原结合蛋白以4.0E-09至
6.0E-09nM的Kd结合克雷伯菌属01抗原。

23. 如权利要求22所述的抗原结合蛋白,其中结合亲和力是通过流式细胞术、Biacore、
KinExa或放射免疫测定测量的。

24. 如权利要求1-15中任一项所述的抗原结合蛋白,其中所述抗原结合蛋白:a) 诱导肺
炎克雷伯菌(*K. pneumoniae*)的调理吞噬杀伤(OPK),b) 经由补体依赖性杀伤而杀死肺炎克
雷伯菌,其中该补体依赖性杀伤是通过血清杀菌测定测量的,和/或c) 中和脂多糖(LPS)。

25. 如权利要求24所述的抗原结合蛋白,其中该抗原结合蛋白(i) 诱导肺炎克雷伯菌的
OPK,中和LPS,并且经由补体依赖性杀伤而杀死肺炎克雷伯菌,其中该补体依赖性杀伤是通
过血清杀菌测定测量的,或者(ii) 诱导肺炎克雷伯菌的OPK并且经由补体依赖性杀伤而杀
死肺炎克雷伯菌,但是不中和LPS,其中该补体依赖性杀伤是通过血清杀菌测定测量的。

26. 如权利要求24所述的抗原结合蛋白,其中所述肺炎克雷伯菌是多重耐药性的。

27. 如权利要求26所述的抗原结合蛋白,其中所述肺炎克雷伯菌是菌株Kp113115或
Kp8561。

28. 如权利要求26所述的抗原结合蛋白,其中该抗原结合蛋白使得多重耐药性肺炎克
雷伯菌菌株对抗生素敏感。

29. 如权利要求24所述的抗原结合蛋白,其中所述肺炎克雷伯菌对抗生素易感。

30. 如权利要求29所述的抗原结合蛋白,其中所述肺炎克雷伯菌是在下表的第135-184
行之一中列出的菌株:

	IHMA 编 号
135	849171
136	849174
137	850711
138	857365
139	862242
140	890179

141	894287
142	929964
143	937430
144	939344
145	942007
146	942735
147	951252
148	958478
149	961137
150	979902
151	981359
152	984668
153	994032
154	1018958
155	1030847
156	1030963
157	1039316
158	1039317
159	1072283
160	1073359
161	1073794
162	1079921
163	1090548
164	1094431
165	1097501
166	1099046
167	1105282
168	1105532
169	952902
170	952974
171	956266
172	1042419
173	1050137
174	1072281
175	1124198
176	1106405

177	845560
178	845617
179	848048
180	848059
181	848060
182	850152
183	867646
184	869313

。

31. 如权利要求1-15中任一项所述的抗原结合蛋白，其中所述抗原结合蛋白不中和LPS。

32. 如权利要求1-15中任一项所述的抗原结合蛋白，其中所述抗原结合蛋白中和LPS。

33. 如权利要求1-15中任一项所述的抗原结合蛋白，其中所述抗原结合蛋白在暴露于致命性肺炎克雷伯菌激发的小鼠中具有治疗有效性。

34. 如权利要求1-15中任一项所述的抗原结合蛋白，其中该抗原结合蛋白包含选自下组的重链免疫球蛋白恒定结构域，该组由以下组成：

- (a) IgA恒定结构域；
- (b) IgD恒定结构域；
- (c) IgE恒定结构域；
- (d) IgG1恒定结构域；
- (e) IgG2恒定结构域；
- (f) IgG3恒定结构域；
- (g) IgG4恒定结构域；和
- (h) IgM恒定结构域。

35. 如权利要求34所述的抗原结合蛋白，其中该抗原结合蛋白包含IgG1恒定结构域。

36. 如权利要求1-15中任一项所述的抗原结合蛋白，其中该抗原结合蛋白包含选自下组的轻链免疫球蛋白恒定结构域，该组由以下组成：

- (a) Igκ恒定结构域；和
- (b) Igλ恒定结构域。

37. 如权利要求1-15中任一项所述的抗原结合蛋白，其中该抗原结合蛋白包含人类IgG1恒定结构域和人类λ恒定结构域。

38. 一种分离的核酸分子，该分离的核酸分子编码根据权利要求1-28中任一项所述的抗原结合蛋白。

39. 如权利要求38所述的核酸分子，其中该核酸分子可操作地连接至控制序列。

40. 一种载体，该载体包含如权利要求38所述的核酸分子。

41. 一种宿主细胞，该宿主细胞用如权利要求38所述的核酸分子或者如权利要求40所述的载体进行转化。

42. 如权利要求41所述的宿主细胞，其中该宿主细胞是哺乳动物宿主细胞。

43. 如权利要求42所述的宿主细胞，其中该哺乳动物宿主细胞是HEK293细胞、NS0鼠类

骨髓瘤细胞、PER.C6[®]人类细胞、或中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。

44. 一种分离的宿主细胞,该分离的宿主细胞产生如权利要求1-37中任一项所述的抗原结合蛋白。

45. 一种制备如权利要求1-37中任一项所述的抗原结合蛋白的方法,该方法包括(a)培养表达所述抗原结合蛋白的宿主细胞,或培养如权利要求41-43中任一项所述的宿主细胞;和(b)从所述宿主细胞中分离其所述抗原结合蛋白。

46. 一种抗原结合蛋白,该抗原结合蛋白使用如权利要求45所述的方法产生。

47. 一种药物组合物,该药物组合物包含如权利要求1-37中任一项所述的抗原结合蛋白以及药学上可接受的赋形剂。

48. 如权利要求47所述的药物组合物,其中所述药学上可接受的赋形剂是防腐剂、稳定剂或抗氧化剂。

49. 如权利要求48所述的药物组合物,该药物组合物用于用作药剂。

50. 如权利要求15所述的抗原结合蛋白,进一步包含标记基团或效应物基团。

51. 如权利要求50所述的抗原结合蛋白,其中该标记基团选自下组,该组由以下组成:同位素标记,磁标记,氧化还原活性部分,光学染料,生物素化的基团,荧光部分,和通过次级报告物识别的多肽表位。

52. 如权利要求50所述的抗原结合蛋白,其中该效应物基团选自下组,该组由以下组成:放射性同位素、放射性核素、毒素和治疗剂。

53. 如权利要求1-37或50-52中任一项所述的抗原结合蛋白或如权利要求47-49中任一项所述的药物组合物在制造用于治疗与肺炎克雷伯菌感染相关联的病症的药剂中的用途。

54. 如权利要求1-37或50-52中任一项所述的抗原结合蛋白或如权利要求47-49中任一项所述的药物组合物在制造药剂中的用途,所述药剂用于一种用于在对其有需要的受试者中治疗、预防或改善与肺炎克雷伯菌感染相关联的病症的方法。

55. 如权利要求1-37或50-52中任一项所述的抗原结合蛋白或如权利要求47-49中任一项所述的药物组合物在制造药剂中的用途,所述药剂用于一种用于在感染了肺炎克雷伯菌的受试者中抑制肺炎克雷伯菌生长或减少肺炎克雷伯菌数量的方法。

56. 如权利要求1-37或50-52中任一项所述的抗原结合蛋白或如权利要求47-49中任一项所述的药物组合物在制造药剂中的用途,所述药剂用于一种用于在对其有需要的受试者中治疗、预防或改善与肺炎克雷伯菌以及金黄色葡萄球菌共感染相关联的病症的方法。

57. 如权利要求1-37或50-52中任一项所述的抗原结合蛋白或如权利要求47-49中任一项所述的药物组合物在制造药剂中的用途,所述药剂用于一种用于在共感染了肺炎克雷伯菌以及金黄色葡萄球菌的受试者中抑制、减少、或消除肺炎克雷伯菌毒力的方法。

58. 如权利要求1-37或50-52中任一项所述的抗原结合蛋白或如权利要求47-49中任一项所述的药物组合物在制造药剂中的用途,所述药剂用于一种用于增加感染了肺炎克雷伯菌以及金黄色葡萄球菌二者的受试者的存活率的方法。

59. 如权利要求58所述的用途,其中该肺炎克雷伯菌是耐抗生素的。

60. 如权利要求59所述的用途,其中该肺炎克雷伯菌对头孢菌素、喹诺酮、碳青霉烯、美罗培南、氟喹诺酮、四环素、氯霉素、甲氧苄啶、磺胺、和/或粘菌素具有耐药性。

61. 如权利要求58所述的用途,其中该肺炎克雷伯菌对抗生素易感。

62. 如权利要求1-37或50-52中任一项所述的抗原结合蛋白或如权利要求47-49中任一项所述的药物组合物在制造药剂中的用途,所述药剂用于一种用于使耐抗生素肺炎克雷伯菌菌株对抗生素敏感的方法。

63. 如权利要求58所述的用途,进一步包括给予抗生素。

64. 如权利要求63所述的用途,其中该抗原结合蛋白和该抗生素提供协同治疗效果。

65. 如权利要求1-37或50-52中任一项所述的抗原结合蛋白或如权利要求47-49中任一项所述的药物组合物在制造药剂中的用途,所述药剂用于一种在感染了耐抗生素肺炎克雷伯菌菌株的受试者中预防或治疗肺炎克雷伯菌感染的方法,该方法包括向受试者共同给予抗生素和该抗原结合蛋白。

66. 如权利要求65所述的用途,其中该药剂导致存活百分比大于只给予该抗原结合蛋白或该抗生素中之一的受试者的累加存活百分比。

67. 如权利要求64-66中任一项所述的用途,其中该抗生素是美罗培南。

68. 如权利要求58所述的用途,其中该抗原结合蛋白为抗体或其抗原结合片段。

69. 如权利要求53所述的用途,其中该病症选自下组,该组由以下组成:肺炎、尿路感染、新生儿败血症/脓毒病、腹泻、化脓性肝脓肿(PLA)、眼内炎、坏死性脑膜炎和强直性脊柱炎。

70. 如权利要求53所述的用途,其中该病症是医院感染。

71. 如权利要求47所述的药物组合物,进一步包含标记基团或效应物基团。

72. 如权利要求71所述的药物组合物,其中该标记基团选自下组,该组由以下组成:同位素标记,磁标记,氧化还原活性部分,光学染料,生物素化的基团,荧光部分,和通过次级报告物识别的多肽表位。

73. 如权利要求71所述的药物组合物,其中该效应物基团选自下组,该组由以下组成:放射性同位素、放射性核素、毒素和治疗剂。

74. 如权利要求1-15中任一项所述的抗原结合蛋白,其中所述抗原结合蛋白是鼠类的。

75. 如权利要求1-15中任一项所述的抗原结合蛋白,其是多特异性抗体。

76. 如权利要求50所述的抗原结合蛋白,其中该效应物基团是化疗剂。

77. 如权利要求71所述的药物组合物,其中该效应物基团是化疗剂。

78. 如权利要求53所述的用途,其中该病症选自下组,该组由以下组成:败血症/脓毒病、脑膜炎和脊柱关节病。

79. 如权利要求53所述的用途,其中该病症是软组织感染。

80. 如权利要求53所述的用途,其中该病症是手术感染。

81. 如权利要求53所述的用途,其中该病症是伤口感染。

82. 如权利要求53所述的用途,其中该病症是肺部感染。

83. 如权利要求53所述的用途,其中该病症是器官移植后感染。

抗01抗体及其用途

[0001] 对以电子方式提交的序列表的引用

[0002] 与本申请一起提交的ASCII文本文件KLEB-101-W0-PCT_SL.txt(大小:37,313字节;以及创建日期:2017年10月6日)的以电子方式提交的序列表的内容通过引用以其全文并入本文。

背景技术

技术领域

[0003] 本发明的领域总体上涉及特异性地结合肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)01抗原的抗原结合蛋白(例如,抗体及其抗原结合片段)以及那些结合蛋白用于预防或治疗克雷伯菌属感染的用途。

背景技术

[0004] 克雷伯菌属是革兰氏阴性细菌,其作为机会性感染和医院感染(包括肺炎、尿路感染、新生儿败血症和手术伤口感染)的病原体迅速在临幊上变得越来越重要。此外,存在与克雷伯菌属感染相关联的新兴综合征,如化脓性肝脓肿(PLA)、眼内炎、脑膜炎和坏死性脑膜炎。例如,在Podschun R. 和Ullman U.Clin.Microbiol Rev[临床微生物学评论]11:589-603(1998)中讨论了克雷伯菌属感染的临幊影响。

[0005] 抗生素耐药性已经成为抗击细菌感染的主要挑战之一。参见例如,Iredell J.,等人,BMJ[英国医学杂志]351:h6420(2015)。虽然已经针对耐药性金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)取得了一些进展,但是革兰氏阴性机会性感染是最成问题的。在这些中,在多重耐药性菌株广泛流传情况下,肺炎克雷伯菌已经变得尤其具有挑战性。感染如超广谱β-内酰胺酶(ESBL)和碳青霉烯耐药性肠杆菌科(CRE)碳青霉烯酶(包括肺炎克雷伯氏菌碳青霉烯酶(KPC)和新德里金属-β-内酰胺酶1(NDM-1))已经在世界范围内传播,并使得目前的抗生素类别在很大程度上不足。这种现实加上日益缩小的抗生素管道使得具有很少的治疗替代方案。一些最近的高姿态爆发突出了与肺炎克雷伯菌抗生素耐药性相关联的紧迫性。因此,开发用以补充抗生素疗法的策略是至关重要的。

[0006] 肺炎克雷伯菌发病机理中涉及多种毒力因子,包括荚膜多糖(CPS)和脂多糖(LPS)。针对LPS和CPS的多克隆抗体在致命性肺炎克雷伯菌感染的临床前模型中是保护性的。然而,用抗体靶向这两种抗原在菌株覆盖度方面面临重大挑战。存在超过七十七种已知的荚膜血清型和八种O-抗原血清型,并且尚不清楚哪些分布最广或与发病机制相关联。此外,靶向LPS内的保守表位的有限数量的单克隆抗体未被报道具有保护作用(Brade等人2001,J Endotoxin Res[内毒素研究杂志],7(2):119-24)。

[0007] 因此,对鉴定和开发对克雷伯菌属(例如,肺炎克雷伯菌)感染,尤其是耐抗生素克雷伯菌属感染具有保护作用的抗体存在很大的需要。

发明内容

[0008] 本披露提供了肺炎克雷伯菌01结合蛋白,例如,抗体或其抗原结合片段,以及使用肺炎克雷伯菌01结合蛋白治疗克雷伯菌属感染的方法。

[0009] 在一个例子中,本文提供了一种特异性地结合肺炎克雷伯菌01抗原的分离的抗原结合蛋白,其中该抗原结合蛋白:a)诱导克雷伯菌属的调理吞噬杀伤(OPK),b)经由如通过血清杀菌测定所测量的补体依赖性杀伤而杀死克雷伯菌属,或c)诱导克雷伯菌属的OPK并且经由如通过血清杀菌测定所测量的补体依赖性杀伤而杀死克雷伯菌属。

[0010] 在一个例子中,该抗原结合蛋白(i)诱导克雷伯菌属的OPK,经由如通过血清杀菌测定所测量的补体依赖性杀伤而杀死克雷伯菌属,并且中和脂多糖(LPS),或(ii)诱导克雷伯菌属的OPK,并经由如通过血清杀菌测定所测量的补体依赖性杀伤而杀死克雷伯菌属,但不中和LPS。在一些实施例中,该克雷伯菌属是肺炎克雷伯菌、产酸克雷伯菌、肉芽肿克雷伯菌、臭鼻克雷伯菌、鼻硬结克雷伯菌或植生克雷伯菌。在一个例子中,该克雷伯菌属是多重耐药性的,其包括在表8的第1-134行的一个中列出的菌株。

[0011] 在一个例子中,该抗原结合蛋白:a)诱导肺炎克雷伯菌(*K. pneumoniae*)的调理吞噬杀伤(OPK),b)经由如通过血清杀菌测定所测量的补体依赖性杀伤来杀死肺炎克雷伯菌,和/或c)中和脂多糖(LPS)。

[0012] 在一个例子中,该抗原结合蛋白使得多重耐药性肺炎克雷伯菌菌株对至少一种抗生素敏感。

[0013] 在一个例子中,该抗原结合蛋白结合肺炎克雷伯菌01抗原的D-半乳聚糖II结构域。

[0014] 本披露还提供了一种特异性地结合肺炎克雷伯菌01抗原的分离的抗原结合蛋白,该抗原结合蛋白包含一组互补决定区(CDR):HCDR1、HDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、和LCDR3,其中:HCDR1具有SEQ. ID. NO:1的氨基酸序列;HCDR2具有SEQ. ID. NO:2的氨基酸序列;HCDR3具有SEQ. ID. NO:3的氨基酸序列;LCDR1具有SEQ. ID. NO:4的氨基酸序列;LCDR2具有SEQ. ID. NO:5或10的氨基酸序列;并且LCDR3具有SEQ. ID. NO:11的氨基酸序列。

[0015] 在一个例子中,本文提供了一种特异性地结合肺炎克雷伯菌01抗原的分离的抗原结合蛋白,其中该抗原结合蛋白包含与SEQ ID NO:12具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的重链可变区(VH)和/或与SEQ ID NO:13具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的轻链可变区(VL)。在一个例子中,该特异性地结合肺炎克雷伯菌01抗原的抗原结合蛋白包含含有SEQ ID NO:12的VH和/或含有SEQ ID NO:13的VL。

[0016] 本披露还提供了一种分离的抗原结合蛋白,该抗原结合蛋白与包含含有SEQ ID NO:12的VH和含有SEQ ID NO:13的VL的抗体一样特异性地结合肺炎克雷伯菌01抗原中相同的表位。

[0017] 在一个例子中,本文提供了一种分离的抗原结合蛋白,该抗原结合蛋白竞争性地抑制包含含有SEQ ID NO:12的VH和含有SEQ ID NO:13的VL的抗体与肺炎克雷伯菌01抗原的结合。

[0018] 本披露还提供了一种特异性地结合肺炎克雷伯菌01抗原的分离的抗原结合蛋白,该抗原结合蛋白包含一组互补决定区(CDR):HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、以及LCDR3,其中该HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、以及LCDR3包含以下氨基酸序列:分别地

SEQ.ID.NO:41、42、43、44、45、和46;分别地SEQ.ID.NO:32、33、34、35、36、和38;分别地SEQ.ID.NO:32、33、34、35、37、和38;分别地SEQ.ID.NO:1、2、3、4、5、和7;分别地SEQ.ID.NO:1、2、3、4、6、和7;分别地SEQ.ID.NO:14、15、16、17、18、和20;分别地SEQ.ID.NO:14、15、16、17、19、和20;分别地SEQ.ID.NO:23、24、25、26、27、和29;或者分别地SEQ.ID.NO:23、24、25、26、28、和29。

[0019] 在一个例子中,本文提供了一种特异性地结合肺炎克雷伯菌01抗原的分离的抗原结合蛋白,该抗原结合蛋白包含含有以下的VH:SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:21、或SEQ ID NO:30,和/或含有以下的VL:SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:22、或SEQ ID NO:31。

[0020] 在一个例子中,本文提供了一种分离的抗原结合蛋白,该抗原结合蛋白与包含含有以下的VH和VL的抗体一样特异性地结合肺炎克雷伯菌01抗原中相同的表位:分别地SEQ.ID.NO:47和SEQ ID NO:48;分别地SEQ.ID.NO:39和SEQ ID NO:40;分别地SEQ.ID.NO:8和SEQ ID NO:9;分别地SEQ.ID.NO:21和SEQ ID NO:22;或者分别地SEQ.ID.NO:30和SEQ ID NO:31。

[0021] 在一个例子中,本文提供了一种分离的抗原结合蛋白,该抗原结合蛋白竞争性地抑制包含含有以下的VH和VL的抗体与肺炎克雷伯菌01抗原的结合:分别地SEQ.ID.NO:47和SEQ ID NO:48;分别地SEQ.ID.NO:39和SEQ ID NO:40;分别地SEQ.ID.NO:8和SEQ ID NO:9;分别地SEQ.ID.NO:21和SEQ ID NO:22;或者分别地SEQ.ID.NO:30和SEQ ID NO:31。

[0022] 在一个例子中,该抗原结合蛋白是抗体。在一个例子中,该抗原结合蛋白是抗体的抗原结合片段。在一个例子中,该抗原结合蛋白是单克隆抗体、重组抗体、人类抗体、人源化抗体、嵌合抗体、双特异性抗体、多特异性抗体、或其抗原结合片段。在一个例子中,该抗原结合蛋白包括Fab、Fab'、F(ab')2、Fd、单链Fv或scFv、二硫化物连接的Fv、V-NAR结构域、IgNar、胞内抗体、IgG Δ CH2、迷你抗体、F(ab')3、四体抗体、三体抗体、双体抗体、单一结构域抗体、DVD-Ig、Fcab、mAb2、(scFv)2、或scFv-Fc。

[0023] 本披露还提供了一种编码抗原结合蛋白(包括本文披露的抗体或其抗原结合片段)的分离的核酸分子。在一个例子中,该核酸分子可操作地连接至控制序列。在一个例子中,本文提供了包含本文提供的核酸分子的载体。

[0024] 本披露还提供了一种用本文提供的核酸分子或本文提供的载体转化的宿主细胞。在一个例子中,该宿主细胞是哺乳动物宿主细胞,包括例如HEK293细胞、NS0鼠类骨髓瘤细胞、PER.C6[®]人类细胞、或中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。

[0025] 本披露还提供了一种制备本文提供的抗原结合蛋白(包括抗体或其抗原结合片段)的方法,该方法包括(a)培养表达该抗原结合蛋白的宿主细胞或培养本文提供的宿主细胞或本文提供的杂交瘤;和(b)从所培养的宿主细胞中分离其抗原结合蛋白。在一个例子中,本文提供了一种使用本文提供的方法产生的抗原结合蛋白。

[0026] 本披露还提供了一种药物组合物,该药物组合物包含本文提供的抗原结合蛋白(包括抗体或其抗原结合片段)和药学上可接受的赋形剂。在一个例子中,该药学上可接受的赋形剂是防腐剂、稳定剂或抗氧化剂。在一个例子中,该药物组合物用于用作药剂。

[0027] 本披露还提供了本文提供的抗原结合蛋白(包括抗体或其抗原结合片段)或药物组合物用于治疗与克雷伯菌属感染相关联的病症的用途。在一个例子中,本文提供了一种

用于在对其有需要的受试者中治疗、预防、或改善与克雷伯菌属感染相关联的病症的方法，该方法包括向该受试者给予有效量的本文提供的抗原结合蛋白(包括抗体或其抗原结合片段)或本文提供的药物组合物。在一个例子中，该用于在对其有需要的受试者中治疗与克雷伯菌属感染相关联的病症的方法包括给予有效量的、特异性地结合肺炎克雷伯菌01抗原的抗原结合蛋白(包括抗体或其抗原结合片段)。在一个例子中，该特异性地结合肺炎克雷伯菌01抗原的抗原结合蛋白为抗体或其抗原结合片段。在一个例子中，该特异性地结合肺炎克雷伯菌01抗原的抗原结合蛋白为本文提供的抗原结合蛋白或本文提供的药物组合物。在一个例子中，该克雷伯菌属是肺炎克雷伯菌、产酸克雷伯菌、植生克雷伯菌、臭鼻克雷伯菌、鼻硬结克雷伯菌和/或肉芽肿克雷伯菌。

[0028] 在一个例子中，本文提供了一种用于在感染了克雷伯菌属(包括耐抗生素克雷伯菌属)的受试者中抑制克雷伯菌属生长、或减少克雷伯菌属数量的方法，该方法包括向对其有需要的受试者给予本文提供的抗原结合蛋白或本文提供的药物组合物。在一个例子中，该特异性地结合肺炎克雷伯菌01抗原的抗原结合蛋白为抗体或其抗原结合片段。在一个例子中，该特异性地结合肺炎克雷伯菌01抗原的抗原结合蛋白为本文提供的抗原结合蛋白或本文提供的药物组合物。在一个例子中，该克雷伯菌属是肺炎克雷伯菌、产酸克雷伯菌、植生克雷伯菌、臭鼻克雷伯菌、鼻硬结克雷伯菌和/或肉芽肿克雷伯菌。

[0029] 本披露还提供了一种用于在对其有需要的受试者中治疗、预防、或改善与肺炎克雷伯菌以及金黄色葡萄球菌共感染相关联的病症的方法，该方法包括向所述受试者给予有效量的、特异性地结合肺炎克雷伯菌01抗原的抗原结合蛋白(包括本文提供的抗原结合蛋白(包括抗体或其抗原结合片段))、或本文提供的药物组合物。

[0030] 在一个例子中，本文提供了一种在共感染了肺炎克雷伯菌以及金黄色葡萄球菌的受试者中抑制、减少、或消除肺炎克雷伯菌毒力的方法，或一种增加感染了肺炎克雷伯菌以及金黄色葡萄球菌二者的受试者的存活率的方法，所述方法包括向该受试者给予有效量的、特异性地结合肺炎克雷伯菌01抗原的抗原结合蛋白。

[0031] 本披露还提供了一种用于使耐抗生素克雷伯菌属菌株对抗生素敏感的方法，该方法包括使该抗体耐药性克雷伯菌属菌株与特异性地结合肺炎克雷伯菌01抗原的抗原结合蛋白(包括抗体或其抗原结合片段)接触。在一个例子中，该方法进一步包括给予抗生素。在一个例子中，该抗原结合蛋白和该抗生素提供协同治疗效果。

附图说明

[0032] 图1A-1C显示了抗肺炎克雷伯菌01抗原抗体的活性。图1A显示了通过酶联免疫吸附测定(ELISA)而确定的抗体与纯化的01 LPS结合的能力。图1B显示了如使用血清杀菌测定(SBA)显示的抗体介导补体依赖性杀伤的活性。图1C显示了抗体诱导调理吞噬杀伤(OPK)的能力。I类抗体(例如，54H7和KPB202)以及II类抗体(例如，KPA27、KPE33、和KPJ4)都诱导肺炎克雷伯菌的OPK并且如在SBA测定中所测量地杀死肺炎克雷伯菌。然而，I类抗体还中和LPS，而II类抗体不中和LPS。

[0033] 图2显示了抗01-LPS抗体在针对肺炎克雷伯菌菌株Kp8045(01:K1)的鼻内肺部感染模型中降低了细菌性肺负荷。15mg/kg的KPE33显著降低了细菌性肺负荷，并且当在感染后48小时给予时，15mg/kg的其他抗01抗体也降低器官负荷约2-3log。使用不相关的人类

IgG1抗体(IgG对照)作为对照。

[0034] 图3A-3C显示了当在细菌感染后1小时给予时,抗O1抗原抗体KPE33保护小鼠免于致命性细菌激发。图3A显示了与人类IgG1对照抗体(R347)相比,KPE33在具有多重耐药性肺炎克雷伯菌碳青霉烯耐药性(CRE)菌株Kp1131115(01)的致命性细菌性肺炎模型中剂量依赖性地增强了存活率。图3B显示了与人类IgG1对照抗体(R347)相比,KPE33在具有超广谱β-内酰胺酶(ESBL)菌株Kp8561(01)的致命性菌血症模型中显著地增强了存活率。图3C显示了与人类IgG1对照抗体(R347)相比,KPE33-H32+L2016(E1Q)(“KPE33-H32”)和KPE33-H32+L2016(E1Q)(“KPE33-H33”)在具有多重耐药性肺炎克雷伯菌碳青霉烯耐药性(CRE)菌株Kp1131115(01)的致命性细菌性肺炎模型中剂量依赖性地增强了存活率。

[0035] 图4A-4B显示了KPE33在肺炎(图4A)和菌血症(图4B)模型中与抗生素美罗培南协同作用。在用肺炎O1菌株Kp8045(图4A)或Kp8561(图4B)感染后,给予抗生素和抗体。与美罗培南或KPE33的单一疗法,或者人类IgG1对照抗体(R347)与美罗培南的组合相比,美罗培南和KPE33的组合在肺炎以及菌血症模型中均显示出显著更好的保护。

[0036] 图5显示了KPE33的序列优化以产生KPE33v2016。该图显示了如通过Octet平台所测量的KPE33-rIgG1(左)和KPE33v2016(右)与O1 LPS的结合。KPE33和KPE33v2016两者显示出相当的亲和常数(K_D),分别平均为5.83E-09和4.13E-09。下图显示了KPE33可变重链(VH)和可变轻链(VL)的氨基酸序列以及优化的KPE33v2016VH和VL的氨基酸序列。按出现顺序,图分别披露了SEQ ID NO 8、12、9和13。

[0037] 图6显示了序列优化的KPE33(KPE33-V-2016)在致命性肺炎模型中保持保护性活性。在用肺炎克雷伯菌碳青霉烯耐药性(KPC)菌株进行细菌感染后1小时,以6mg/kg给予KPE33或KPE33-V-2016。当与人类IgG1对照抗体相比,这两种抗体均显示出相似的保护水平。在此模型中还比较了KPE33的亚类IgG2,并且它显示出比KPE33-IgG1略低的活性。

[0038] 图7A-7D显示了KPE33在肺炎克雷伯菌以及金黄色葡萄球菌共感染模型中起保护作用。图7A显示被肺炎克雷伯菌和金黄色葡萄球菌的亚致命性接种物共感染导致了致命性肺炎。与仅感染肺炎克雷伯菌的小鼠相比,在共感染肺炎克雷伯菌和金黄色葡萄球菌的小鼠的肺中(图7B)和脾中(图7C)的肺炎克雷伯菌细菌负荷显著增加。图7D显示了在共感染前24小时用KPE33(0.5mL, ip)进行的单一治疗从致命性共感染中挽救了小鼠。

[0039] 图8显示了抗O1抗原抗体54H7在LPS激发之后减少血清细胞因子。在LPS激发前3小时给予小鼠54H7和IgG1对照抗体。然后将动物放血,并且在3小时后测量血清中的细胞因子。54H7在两种O1 LPS激发模型(Kp43816LPS和Kp15380LPS)中减少了血清IL-6、趋化因子CXCL-1、以及TNF-α。将多粘菌素B(PMB)用作阳性对照。

[0040] 图9显示了54H7在内毒素血症LPS诱导的败血症模型中保护小鼠。在用LPS激发前24小时给予小鼠54H7和对照抗体。与对照IgG抗体(R347)相比,54H7在低至1mg/kg的浓度下提供了显著的保护。

[0041] 图10A-10B显示了54H7在小鼠细菌激发模型中的作用。图10A展示了15mg/kg 54H7保护小鼠免于致命性肺炎,并且图10B展示了在此模型中54H7表现出与抗生素美罗培南协同作用。

[0042] 图11显示了如流式细胞术分析所示,编码LPS结构中D-半乳聚糖II结构域的wbbYZ基因的缺失消除了KPE33和54H7抗体与肺炎克雷伯菌菌株Kp113115的结合。

[0043] 图12显示了O1 LPS的结构,其包括脂质A、核心寡糖以及由重复寡糖单元构成的高度可变O-抗原。底部的表格提供了O1、O2a、和O2ac LPS血清型的化学组成。

[0044] 图13显示了KPE33和54H7不竞争结合O1 LPS上的相同表位。通过使用预装有纯化的O1 LPS的捕获探针的ForteBio Octet来测量竞争性结合。在用10 μ g/mL KPE33进行初始结合后,将探针与含有10 μ g/mL KPE33和相同浓度的54H7(黑色线)、KPE33(深灰色线)、或对照抗体R347(浅灰色线)的抗体混合物一起孵育。

[0045] 图14A-14D显示了 γ δT细胞募集和IL-17信号传导与抗O1抗体保护相关。图14A显示了用抗LPS单克隆抗体预防性处理并感染肺炎克雷伯菌(1e4CFU Kp8045)的小鼠肺中的 γ δTCR⁺T细胞的百分比的流式细胞术分析。图14B显示了用抗LPS单克隆抗体处理(感染后1小时)并感染肺炎克雷伯菌(1e4CFU Kp8045)8小时的小鼠肺中的 γ δTCR⁺T细胞百分比的流式细胞术分析。图14C显示了用c-IgG或KPE33进行预防性免疫并在24小时后感染肺炎克雷伯菌(1e4CFU Kp8045)的C57BL/6(野生型)小鼠以及i117a(IL-17敲除)小鼠的存活率(p值指示KPE33野生型(WT)小鼠和KPE33敲除(KO)小鼠之间的显著性;N=5只/组)。图14D显示了用c-IgG或54H7进行预防性免疫并在24小时后感染肺炎克雷伯菌(1e4CFU Kp8045)的C57BL/6(野生型)小鼠以及i117a(IL-17敲除)小鼠的存活(N=5只/组)。通过ANOVA然后通过邓恩氏(Dunn's)检验(图14A)或对数秩检验(图14C)来确定统计学显著性。数据代表至少2个独立实验。

具体实施方式

[0046] 本披露提供了结合肺炎克雷伯菌O1抗原的分离的结合蛋白,包括抗体或其抗原结合片段。还提供了相关的多核苷酸、载体、宿主细胞以及包含肺炎克雷伯菌O1结合蛋白(包括抗体或其抗原结合片段)的药物组合物。还提供了制备和使用本文披露的O1结合蛋白(包括抗体或抗原结合片段)的方法。本披露还提供了通过给予本文披露的O1结合蛋白(包括抗体或抗原结合片段)来预防和/或治疗与克雷伯菌属感染(例如,肺炎克雷伯菌,如O1血清型肺炎克雷伯菌)相关联的病症的方法。

[0047] 为了更容易地理解本披露,首先定义某些术语。附加的定义在整个详细说明中列出。

I. 定义

[0049] 术语“一个/一种(a/an)”以及“该(the)”包括复数指示物,除非上下文另外明确指明。例如,“一种抗原结合蛋白”应理解为表示一种或多种抗原结合蛋白。术语“一个”(或“一种”)、以及术语“一个或多个/一种或多种(one or more)”和“至少一个/至少一种(at least one)”可以在本文中互换使用。此外,在本文中使用“和/或”应当理解为在有或没有另一者的情况下,两个指定的特征或组分中的每一者的特定披露。因此,如在本文在短语如“A和/或B”中使用的术语“和/或”旨在包括“A和B”、“A或B”、“A”(单独)、以及“B”(单独)。同样,如在短语如“A、B和/或C”中使用的术语“和/或”旨在涵盖以下方面中的每一者:A、B和C;A、B或C;A或B;B或C;A和C;A和B;B和C;A(单独);B(单独);和C(单独)。

[0050] 术语“包含”通常在包括的意义上使用,也就是说允许存在一个或多个特征或组分。当用语言“包含”来描述方面时,还提供了关于“由……组成”和/或“主要由……组成”描述的其他类似方面。

[0051] 如在整个说明书和权利要求书中与数值结合使用的术语“约”表示本领域技术人员熟知并可接受的精确度的区间。一般，这种精确度的区间是 $\pm 10\%$ 。

[0052] 除非另外定义，否则本文所使用的所有技术和科学术语具有与本披露涉及的领域的普通技术人员通常所理解的相同的意义。例如，The Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology[生物医学与分子生物学简明词典]，Juo, Pei-Show, 第2版, 2002, CRC出版社；The Dictionary of Cell and Molecular Biology[细胞与分子生物学词典]，第3版, 1999, Academic Press[学术出版社]；以及 the Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology[牛津生物化学与分子生物学词典]，2000, Oxford University Press[牛津大学出版社]为技术人员提供了本披露中使用的许多术语的综合词典。

[0053] 单位、前缀和符号均以它们的国际单位系统(Système International de Unites) (SI) 接受的形式表示。数值范围包括限定该范围的数字。除非另外说明，氨基酸序列以氨基至羧基取向从左向右书写。本文提供的小标题不是本披露的不同方面或各方面的限制，可以通过作为一个整体参考本说明书来获得这些方面。因此，通过以其全文参考说明书，更完全地定义了就在以下定义的术语。

[0054] 术语“抗原结合蛋白”是指由识别并特异性地结合靶标(例如肺炎克雷伯菌01抗原)的一种或多种多肽构成的分子，如抗01抗体或其抗原结合片段。

[0055] 术语“抗体”意指通过位于免疫球蛋白分子的可变区内的至少一个抗原识别位点识别并特异性地结合靶标(如蛋白质、多肽、肽、碳水化合物、多核苷酸、脂质、或上述物质的组合)的免疫球蛋白分子。如本文所用的，术语“抗体”涵盖完整多克隆抗体，完整单克隆抗体，产生自至少两个完整抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人类抗体、包含抗体的融合蛋白、以及任何其他修饰的免疫球蛋白分子的多特异性抗体(如双特异性抗体)，只要这些抗体展现出所希望的生物活性。抗体可以是以下五大类免疫球蛋白中的任一种：IgA、IgD、IgE、IgG、以及 IgM、或其亚类(同种型)(例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2)，基于它们的重链恒定域的特性分别被称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 、以及 μ 。不同类的免疫球蛋白具有不同的且众所周知的亚基结构以及三维构型。抗体可以是裸的或缀合至其他分子如毒素、放射性同位素等等。

[0056] 术语“抗体片段”或“其抗体片段”是指完整抗体的一部分。“抗原结合片段”或“其抗原结合片段”是指与抗原结合的完整抗体的一部分。抗原结合片段可包含完整抗体的抗原决定可变区。抗体片段的实例包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')2、和Fv片段、线性抗体、scFv、和单链抗体。

[0057] 可以采用单克隆和其他抗体或其片段并且使用重组DNA技术的技术来产生保留了原始抗体或片段的特异性的其他抗体或嵌合分子或其片段。此类技术可以涉及将编码抗体的免疫球蛋白可变区或互补决定区(CDR)的DNA引入不同免疫球蛋白的恒定区或恒定区加框架区中。参见例如EP-A-184187、GB 2188638A、或EP-A-239400，以及大量的后续文献。杂交瘤细胞或产生抗体的其他细胞可经受基因突变或其他变化，这些基因突变或其他变化可以或不可以改变所产生的抗体或其片段的结合特异性。

[0058] 可在抗体工程化领域中获得的其他技术已经使得有可能分离人类抗体和人源化抗体或其片段。例如，可以如Kontermann和Sefan在Antibody Engineering[抗体工程化]，Springer Laboratory Manuals[施普林格实验室手册](2001)中所述的制备人类杂交瘤。

噬菌体展示,为另一种用于产生抗原结合蛋白的既定技术,已经在许多公开物中详细描述,如Kontermann和Sefan.Antibody Engineering[抗体工程化],Springer Laboratory Manuals[施普林格实验室手册](2001)和W092/01047。其中小鼠抗体基因经过失活并且在功能上被人类抗体基因替换而保留小鼠免疫系统的其他完整组分的转基因小鼠可用于分离人类抗原的人类抗体。

[0059] 合成抗体或其片段可通过从基因表达来产生,这些基因是借助于在合适表达载体内合成并且组装的寡核苷酸来产生,例如如以下所描述:Knappik等人J.Mol.Biol.[分子生物学杂志](2000)296,57-86或Krebs等人Journal of Immunological Methods[免疫学方法杂志]254200167-84。

[0060] 已经显示完整抗体的片段可以执行结合抗原的功能。结合片段的实例是(i)由VL、VH、CL和CH1结构域组成的Fab片段;(ii)由VH和CH1结构域组成的Fd片段;(iii)由单个抗体的VL和VH结构域组成的Fv片段;(iv)dAb片段(Ward,E.S.等人,Nature[自然]341,544-546(1989),McCafferty等人(1990)Nature[自然],348,552-554),其由VH结构域组成;(v)分离的CDR区;(vi)F(ab')2片段,包含两个连接的Fab片段的二价片段;(vii)单链Fv分子(scFv),其中VH结构域和VL结构域通过肽接头连接,该肽接头允许这两个结构域缔合以形成抗原结合位点(Bird等人,Science[科学],242,423-426,1988;Huston等人,PNAS USA,85,5879-5883,1988);(viii)双特异性单链Fv二聚体(PCT/US 92/09965);和(ix)“双体抗体”,通过基因融合构建的多价或多特异性片段(WO 94/13804;Holliger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]906444-6448,1993)。Fv、scFv或双体抗体分子可以通过并入连接VH和VL结构域的二硫键来稳定(Y.Reiter等人,Nature Biotech[自然生物技术],14,1239-1245,1996)。也可以制造包含连接到CH3结构域的scFv的迷你抗体(S.Hu等人,CancerRes.[癌症研究],56,3055-3061,1996)。

[0061] 当使用双特异性抗体时,这些抗体可以是能以各种方式来制造的常规双特异性抗体(Holliger,P.和Winter G.Current Opinion Biotechnol.[当前生物技术观点]4,446-449(1993)),例如以化学方法来制备或来自杂种杂交瘤,或可以是以上提到的任何双特异性抗体片段。双特异性抗体的实例包括BiTETM技术的那些抗体,其中具有不同特异性的两个抗体的结合结构域可使用并且经由短柔性肽来直接连接。这将两个抗体组合于短单一多肽链上。可以仅使用可变结构域来构建没有Fc区的双体抗体和scFv,从而潜在地减少抗独特型反应的影响。与双特异性完整抗体形成对照,双特异性双体抗体也可以是尤其有用的,因为这些双特异性双体抗体可容易地构建并且表达于大肠杆菌中。可使用噬菌体展示(WO 94/13804)来从文库中容易地选择具有合适结合特异性的双体抗体(和许多其他多肽,例如抗体片段)。如果使双体抗体的一个臂保持恒定,例如具有针对O1的特异性的臂,则可以制备其中另一个臂变化的文库,并选择具有适当特异性的抗体。双特异性完整抗体可以通过旋钮入孔(knobs-into-holes)工程来制备(J.B.B.Ridgeway等人,Protein Eng.[蛋白质工程],9,616-621,1996)。已经产生多特异性和/或多价分子的基于免疫球蛋白样结构域的技术包括dAb、TandAb、纳米抗体、BiTE、SMIP、DNL、亲和体、Fynomeric、Kunitz结构域、Albulab、DART、DVD-IG、Covx体、肽体(peptibody)、scFv-Ig、SVD-Ig、dAb-Ig、旋钮入孔、DuoBodiesTM和triomAb。双特异性二价抗体及其制造方法描述于例如美国专利号5,731,168;5,807,706;5,821,333;和美国专利申请公开号2003/020734和2002/0155537中,将所

有这些的披露通过引用并入本文中。双特异性四价抗体及其制造方法描述于例如WO 02/096948和WO 00/44788中,将两者的披露通过引用并入本文中。通常参见PCT公开WO 93/17715;WO 92/08802;WO 91/00360;WO 92/05793;Tutt等人,J. Immunol.[免疫学杂志]147:60-69(1991);美国专利号4,474,893;4,714,681;4,925,648;5,573,920;5,601,819;Kostelny等人,J. Immunol.[免疫学杂志]148:1547-1553(1992)。

[0062] 短语“效应物功能”是指由其Fc组分与Fc受体或补体组分相互作用而产生的抗体的活性。这些活性包括例如抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、补体依赖性细胞毒性(CDC)和抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)。因此,具有改变的效应物功能的抗原结合蛋白(例如抗体或其抗原结合片段)是指在Fc区中含有变更(例如氨基酸取代、缺失或添加或者寡糖中的改变)的抗原结合蛋白(例如抗体或其抗原结合片段),该变更改变了至少一种效应物功能的活性(例如,ADCC、CDC和/或ADCP)。具有改进的效应物功能的抗原结合蛋白(例如抗体或其抗原结合片段)是指在Fc区中含有变更(例如氨基酸取代、缺失或添加或者寡糖中的改变)的抗原结合蛋白(例如抗体或其抗原结合片段),该变更增加了至少一种效应物功能的活性(例如,ADCC、CDC和/或ADCP)。

[0063] 术语“特异性的”可用于指特定结合对的一个成员不会显示出与其一个或多个特异性结合配偶体以外的分子的任何显著结合的情况。该术语在例如抗原结合结构域对许多抗原携带的特定表位具有特异性的情况下也是适用的,在这种情况下携带抗原结合结构域的抗原结合蛋白将能够结合至携带该表位的各种抗原。

[0064] “特异性结合”一般意为抗原结合蛋白(包括抗体或其抗原结合片段)经由其抗原结合结构域结合至表位,并且该结合需要抗原结合结构域与表位之间有某种互补性。根据此定义,当与抗体将结合至随机、不相关的表位相比,该抗体更容易地经由其抗原结合结构域来结合至表位时,该抗体被认为是“特异性地结合”至该表位。如本文所用的,“特异性地结合”肺炎克雷伯菌01抗原的抗原结合蛋白不特异地结合肺炎克雷伯菌02抗原。

[0065] “亲和力”是配体结合反应的固有结合强度的量度。例如,抗体(Ab)-抗原(Ag)相互作用的强度的量度通过结合亲和力来测量,其可以通过解离常数 k_d 来量化。解离常数是结合亲和常数并且由下式给出:

$$[0066] K_d = \frac{[Ab][Ag]}{[AbAg\text{复合物}]}$$

[0067] 亲和力可以例如使用BIAcore®、KinExA亲和力测定、流式细胞术和/或放射免疫测定来测量。

[0068] “效力”是以产生给定强度的作用所需的量表示的化合物药理学活性的量度。它是指实现确定的生物效应所需的化合物的量;所需剂量越小,药物越有效。结合01的抗原结合蛋白的效力可以例如使用如本文所述的OPK测定来测定。

[0069] “调理吞噬杀伤”或“OPK”是指由于免疫细胞的吞噬而发生的细胞(例如克雷伯菌属)的死亡。OPK活性根据实例4中使用的生物发光OPK活性进行测量。抗原结合蛋白(例如,抗体或其抗原结合片段)可以诱导OPK,其中杀伤百分比为40%或更大。抗原结合蛋白(例如,抗体或其抗原结合片段)可以强烈诱导OPK,其中杀伤百分比为80%或更大。

[0070] 杀伤也可以使用“血清杀菌测定”来测量。经由补体固定对细菌表面的杀伤以及

“膜攻击复合物”的形成可以使用实例4中描述的测定来评估。如通过血清杀菌测定所测量的，抗原结合蛋白(例如，抗体或其抗原结合片段)可以杀死克雷伯菌属，其中杀伤百分比为40%或更大。如通过血清杀菌测定所测量的，抗原结合蛋白(例如，抗体或其抗原结合片段)可以极大地杀死克雷伯菌属，其中杀伤百分比为80%或更大。

[0071] 如果抗原结合蛋白(包括抗体或其抗原结合片段)在一定程度上阻断参考抗体或抗原结合片段与表位的结合，则认为该抗原结合蛋白竞争性地抑制参考抗体或其抗原结合片段与给定表位的结合，或者与参考抗体或抗原结合片段“竞争”。竞争性抑制可以通过本领域已知的任何方法例如竞争ELISA测定来确定。可认为结合分子竞争性地抑制参考抗体或抗原结合片段与给定表位的结合，或者与参考抗体或其抗原结合片段竞争至少90%、至少80%、至少70%、至少60%、或至少50%。

[0072] 当在抗原结合蛋白(例如中和性抗原结合蛋白或中和性抗体)的背景下使用时，术语“竞争”意为在抗原结合蛋白之间的竞争，如通过以下测定所确定的，在该测定中在测试下的抗原结合蛋白(例如抗体或其免疫功能片段)防止或抑制参考抗原结合蛋白(例如配体或参考抗体)与共同抗原(例如，O1多糖或其片段)的特异性结合。可以使用众多类型的竞争性结合测定，例如：固相直接或间接放射免疫测定(RIA)，固相直接或间接酶免疫测定(EIA)，夹心竞争测定(参见例如Stahli等人，1983, Methods in Enzymology[酶学方法]92: 242-253)；固相直接生物素-抗生物素蛋白EIA(参见例如Kirkland等人，1986, J. Immunol. [免疫学杂志]137: 3614-3619)固相直接标记的测定，固相直接标记的夹心测定(参见例如Harlow和Lane，1988, Antibodies[抗体]，A Laboratory Manual[实验室手册]，Cold Spring Harbor Press[冷泉港出版社])；使用¹⁻¹²⁵标记的固相直接标记RIA(参见例如Morel等人，1988, Molec. Immunol. [分子免疫学]25: 7-15)；固相直接生物素-抗生物素蛋白EIA(参见例如Cheung等人，1990, Virology[病毒学]176: 546-552)；以及直接标记的RIA(Moldenhauer等人，1990, Scand. J. Immunol. [斯堪的纳维亚免疫学杂志]32: 77-82)。典型地，这种测定涉及使用与载有以下任一个的固体表面或细胞结合的纯化抗原：未标记的测试抗原结合蛋白以及标记的参考抗原结合蛋白。

[0073] 竞争性抑制可以通过在测试抗原结合蛋白的存在下测定与固体表面或细胞结合的标记的量来测量。通常测试抗原结合蛋白过量存在。通过竞争测定鉴别的抗原结合蛋白(竞争性抗原结合蛋白)包括与参考抗原结合蛋白一样结合至相同的表位的抗原结合蛋白，以及与足够靠近由参考抗原结合蛋白所结合表位以致发生空间位阻的邻近表位结合的抗原结合蛋白。通常，当竞争性抗原结合蛋白过量存在时，它将以至少40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%或75%抑制参考抗原结合蛋白与共同抗原的特异性结合。在一些情况下，结合被抑制至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多。

[0074] 本文披露的抗原结合蛋白、抗体或其抗原结合片段可以根据它们识别或特异性结合的抗原(例如靶多肽)的一个或多个表位或一个或多个部分来描述或指定。例如，与本文披露的抗原结合多肽或其片段的抗原结合结构域特异性地相互作用的O1的部分是“表位”。表位可以由连续氨基酸形成，也可以由通过蛋白质三级折叠而并置的非连续氨基酸形成。由连续氨基酸形成的表位通常在暴露于变性溶剂时保留，而通过三级折叠形成的表位通常在用变性溶剂处理时丢失。构象表位可以由抗原的氨基酸序列的不连续区段构成。线性表

位是由来自该抗原的氨基酸的连续序列形成。表位决定簇可以包括分子的化学活性表面基团,例如氨基酸、糖侧链、磷酰基或碘酰基基团,并且可以具有特定的三维结构特征和/或特定的电荷特征。表位通常包括处于独特空间构象中的至少3、4、5、6、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35个氨基酸。表位可以使用本领域已知的方法来确定。

[0075] 氨基酸在本文中通过其通常已知的三字母符号抑或由IUPAC-IUB生物化学命名委员会推荐的单字母符号来表示。同样地,核苷酸通过它们的普遍公认的单字母代码来提及。

[0076] 如本文所用的,术语“多肽”是指由通过酰胺键(也称为肽键)线性连接的单体(氨基酸)构成的分子。术语“多肽”是指具有两个或更多个氨基酸的任何一条或多条链,并且不是指产物的具体长度。如本文所用的,术语“蛋白质”旨在涵盖包含一个或多个多肽的分子,在一些情况下所述多肽可以通过酰胺键以外的键缔合。在另一方面,蛋白质也可以是单一多肽链。在后一种情况下,单一多肽链在一些情况下可以包含两个或更多个融合在一起以形成蛋白质的多肽亚基。术语“多肽”和“蛋白质”还指代表达后修饰的产物,这些表达后修饰包括而不限于糖基化、乙酰化、磷酸化、酰胺化、通过已知的保护/阻断基团来进行的衍生、蛋白水解裂解或通过非天然存在的氨基酸进行的修饰。多肽或蛋白质可以衍生自天然生物来源或通过重组技术来产生,但不是必然从指定的核酸序列翻译而来。它可以按任何方式(包括通过化学合成)来产生。

[0077] 术语“分离的”是指本披露的抗原结合蛋白或编码此类结合蛋白的核酸通常符合本披露的状态。分离的蛋白质和分离的核酸不含或基本上不含在天然状态下与其相关联的材料,例如在其天然环境下,或在此制备是通过在体外或在体内实施的重组DNA技术时在其制备环境(例如细胞培养物)中与其一起存在的其他多肽或核酸。蛋白质和核酸可以用稀释剂或佐剂配制,并且仍然为了实用目的可以被分离-例如如果该蛋白质用于包被微量滴定板用于免疫测定,则该蛋白质通常与明胶或其他载体混合,或者当用于诊断或治疗时将与药学上可接受的载体或稀释剂混合。抗原结合蛋白可在天然状态下或通过异源真核细胞系统(例如CHO或NS0(ECACC 85110503)细胞来糖基化,或它们可以是(例如如果通过在原核细胞中表达来产生)未糖基化的。

[0078] “分离的”多肽、抗原结合蛋白、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物是呈自然界中未发现形式的多肽、抗原结合蛋白、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物。分离的多肽、抗原结合蛋白、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物包括已经被纯化至它们不再呈自然界中发现形式的程度的那些。在一些实施例中,分离的抗原结合蛋白、抗体、多核苷酸、载体、细胞、或组合物是基本上纯的。

[0079] “重组”多肽、蛋白质或抗体是指经由重组DNA技术产生的多肽或蛋白质或抗体。如同已经通过任何合适的技术分离、分级或部分纯化或基本上纯化的天然或重组多肽一样,出于本披露的目的,在宿主细胞中表达的重组多肽、蛋白质和抗体也被视为分离的。

[0080] 本披露还包括多肽的片段、变体、或衍生物,及其任何组合。当提及本披露的多肽和蛋白质时,术语“片段”包括保留参考多肽或蛋白质的至少一些特性的任何多肽或蛋白质。多肽的片段包括蛋白水解片段、以及缺失片段。

[0081] 如本文所用的术语“变体”是指由于至少一个氨基酸修饰而不同于亲本抗体或多肽序列的抗体或多肽序列。本披露的抗体或多肽的变体包括片段,以及还有由于氨基酸取

代、缺失或插入而具有改变的氨基酸序列的抗体或多肽。变体可以是天然或非天然存在的。非天然存在的变体可以使用本领域已知的诱变技术来产生。变体多肽可以包括保守性或非保守性氨基酸取代、缺失或添加。

[0082] 如应用于抗体或多肽的术语“衍生物”是指已经改变以展现在天然多肽或蛋白质上未发现的附加特征的抗体或多肽。“衍生物”抗体的实例是与第二多肽或另一种分子(例如聚合物如PEG、发色团或荧光团)或原子(例如放射性同位素)的融合物或缀合物。

[0083] 如本文所用的术语“多核苷酸”或“核苷酸”旨在涵盖单个核酸以及多个核酸，并且是指分离的核酸分子或构建体，例如信使RNA(mRNA)、互补DNA(cDNA)或质粒DNA(pDNA)。在某些方面，多核苷酸包含常规的磷酸二酯键或非常规键(例如酰胺键，如在肽核酸(PNA)中所发现的)。

[0084] 术语“核酸”是指存在于多核苷酸中的任何一个或多个核酸区段，例如DNA、cDNA或RNA片段。当应用于核酸或多核苷酸时，术语“分离的”是指已经从其天然环境中去除的核酸分子(DNA或RNA)，例如出于本披露的目的，认为对包含在载体中的抗原结合蛋白进行编码的重组多核苷酸是分离的。分离的多核苷酸的另外实例包括维持在异源宿主细胞中的重组多核苷酸或在溶液中从其他多核苷酸纯化(部分地或基本上)的重组多核苷酸。分离的RNA分子包括本披露的多核苷酸的体内或体外RNA转录物。根据本披露的分离的多核苷酸或核酸进一步包括合成产生的这类分子。此外，多核苷酸或核酸可以包括调节元件，例如启动子、增强子、核糖体结合位点或转录终止信号。

[0085] 如本文所用的，术语“宿主细胞”是指含有或能够含有重组核酸的细胞或细胞群。宿主细胞可以是原核细胞(例如大肠杆菌)，或者可替代地，宿主细胞可以是真核细胞例如真菌细胞(例如酵母细胞，如酿酒酵母、巴斯德毕赤酵母或粟酒裂殖酵母)，以及各种动物细胞如昆虫细胞(例如Sf-9)或哺乳动物细胞(例如HEK293F、CHO、COS-7、NIH-3T3、NS0鼠类骨髓瘤细胞、PER.C6®人类细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或杂交瘤)。

[0086] 术语“氨基酸取代”是指用另一个氨基酸残基替代存在于亲本序列中的氨基酸残基。亲本序列中的氨基酸可以是例如经由化学肽合成或通过本领域已知的重组方法来取代。因此，提及“在位置X处取代(substitution/substitutions at position X)”是指用替代性氨基酸残基取代存在于位置X处的氨基酸。在一些实施例中，取代类型可以根据模式AXY描述，其中A是对应于天然存在于位置X的氨基酸的单个字母代码，并且Y是取代氨基酸残基。在其他方面，取代类型可以根据模式XY描述，其中Y是对应于取代天然存在于位置X的氨基酸的氨基酸残基的单个字母代码。

[0087] “保守性氨基酸取代”是其中用具有类似侧链的氨基酸残基替代该氨基酸残基的取代。具有类似侧链的氨基酸残基的家族已在现有技术中定义，所述侧链包括碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、 β -分支侧链(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)及芳族侧链(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此，如果多肽中的氨基酸被来自相同侧链家族的另一个氨基酸替代，该取代被认为是保守性的。在另一个方面，氨基酸串可以被保守地替代为在侧链家族成员的顺序和/或组成上不同的结构上类似的串。

[0088] 非保守性取代包括如下那些,其中(i)具有阳电性侧链的残基(例如,Arg、His或Lys)被取代为或被阴电性残基(例如,Glu或Asp)取代,(ii)亲水残基(例如,Ser或Thr)被取代为或被疏水的残基(例如,Ala、Leu、Ile、Phe或Val)取代,(iii)半胱氨酸或脯氨酸被取代为或被任何其他残基取代,或(iv)具有大的疏水或芳香族侧链的残基(例如,Val、His、Ile或Trp)被取代为或被具有更小的侧链(例如,Ala、Ser)或无侧链(例如,Gly)的一种残基取代。

[0089] 本领域普通技术人员可以容易地鉴定其他取代。例如,对于氨基酸丙氨酸,取代可以从D-丙氨酸、甘氨酸、 β -丙氨酸、L-半胱氨酸以及D-半胱氨酸中任一项进行。针对赖氨酸,替代可以是D-赖氨酸、精氨酸、D-精氨酸、高精氨酸、甲硫氨酸、D-甲硫氨酸、鸟氨酸、或D-鸟氨酸中任一项。通常,可以预期诱导分离的多肽的特性上的改变的在功能上重要的区域中的取代是如下那些,其中(i)极性残基例如丝氨酸或苏氨酸被取代为疏水残基例如亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、或丙氨酸(或被其取代);(ii)半胱氨酸残基被取代为任何其他残基(或被其取代);(iii)具有阳电性侧链的残基例如赖氨酸、精氨酸或组氨酸被取代为具有阴电性侧链的残基例如谷氨酸或天冬氨酸(或被其取代);或(iv)具有大的侧链的残基例如苯丙氨酸被取代为不具有这样的侧链的残基例如甘氨酸(或被其取代)。前述的非保守性取代之一可改变蛋白质的功能特性的可能性也与关于该蛋白质的在功能上重要的区域的取代位置相关:一些非保守性取代因此可对生物特性具很少或没有影响。

[0090] 术语“氨基酸插入”是指在存在于亲本序列中的两个氨基酸残基之间引入新的氨基酸残基。氨基酸可以例如经由化学肽合成或通过本领域已知的重组方法来插入在亲本序列之中。因此如本文所用,短语“在位置X和Y之间的插入”、“在IMGT位置X和Y之间的插入”或“在卡巴特位置X和Y之间的插入”(其中X和Y对应于氨基酸位置(例如,在位置239与240之间的半胱氨酸氨基酸插入))是指在X与Y位置之间的氨基酸插入,并且还是指在编码位置X和Y的氨基酸的密码子之间的编码氨基酸的密码子的核酸序列中的插入。插入类型可以根据模式AXin描述,其中A是对应于被插入的氨基酸的单个字母代码,并且X是该插入之前的位置。

[0091] 术语两个多核苷酸或多肽序列之间的“序列同一性百分比”或“同一性百分比”是指考虑到为了最佳比对两个序列而必须引入的添加或缺失(即,空隙),在比较窗口上由这些序列共用的相同匹配位置的数目。匹配位置是其中相同核苷酸或氨基酸呈现在靶序列与参考序列两者中的任何位置。呈现在靶序列中的空隙未计数,因为空隙并非核苷酸或氨基酸。同样地,呈现在参考序列中的空隙未计数,因为对靶序列核苷酸或氨基酸进行计数,而不对来自参考序列的核苷酸或氨基酸进行计数。序列同一性百分比的计算是通过确定相同氨基酸残基或核酸碱基出现在两个序列中的位置的数目以便产生匹配位置数目,将匹配位置数目除以比较窗口中的位置总数并且将结果乘以100,从而产生序列同一性百分比。序列比较和两个序列之间序列同一性百分比的测定可以使用容易获得的软件程序完成。合适的软件程序可从不同来源获得,并且用于比对蛋白质与核苷酸序列。用于确定序列同一性百分比的一种合适程序是b12seq,该程序是可从美国政府的国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)BLAST网站(blast.ncbi.nlm.nih.gov)获得的BLAST程序套件的一部分。B12seq使用BLASTN或BLASTP算法在两个序列之间执行比较。BLASTN用于比较核酸序列,而BLASTP用于比较氨基酸序列。其他合适程序是例如Needle、Stretcher、Water或Matcher,它们是EMBOSS生物信息学程序

套件的一部分并且也可在www.ebi.ac.uk/Tools/psa上从欧洲生物信息学研究所(European Bioinformatics Institute;EBI)获得。

[0092] “特异性结合成员”描述了一对彼此具有结合特异性的分子的成员。特异性结合对的成员可天然地衍生或者全部或部分地合成产生。分子对的一个成员在其表面上具有这样一个区域、或腔穴，该区域或腔穴特异地结合至分子对的另一个成员的特定空间和极性组织并且由此与其互补。因此，该对的成员具有特异地相互结合的特性。特异性结合对的类型的实例是抗原-抗体、生物素-抗生物素蛋白、激素-激素受体、受体-配体、酶-底物。本披露涉及抗原-抗体类型反应。

[0093] 如本文所用的，术语“IgG”是指属于基本上由公认的免疫球蛋白 γ 基因编码的抗体类别的多肽。在人类中，此类别包括IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。在小鼠中，此类别包括IgG1、IgG2a、IgG2b和IgG3。

[0094] 术语“抗原结合结构域”描述了抗体的部分，该部分包含与抗原的部分或全部特异性结合并互补的区域。当抗原较大时，抗体可以仅结合至抗原的特定部分，该部分称为表位。抗原结合结构域可以由一个或多个抗体可变结构域(例如由VH结构域组成的所谓的Fd抗体片段)提供。抗原结合结构域可以包含抗体轻链可变区(VL)和抗体重链可变区(VH)。

[0095] 术语“抗原结合蛋白片段”或“抗体片段”是指完整抗原结合蛋白或抗体的一部分，并且是指完整抗原结合蛋白或抗体的抗原决定可变区。本领域已知，抗体的抗原结合功能可以由全长抗体的片段执行。抗体片段的实例包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')₂、以及Fv片段、线性抗体、单链抗体以及由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0096] 术语“单克隆抗体”是指参与单一抗原决定簇或表位的高度特异性识别和结合的同源抗体群。这与典型地包括针对不同抗原决定簇的不同抗体的多克隆抗体相反。术语“单克隆抗体”涵盖完整和全长单克隆抗体以及抗体片段(如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv)、单链(scFv)突变体、包含抗体部分的融合蛋白和包含抗原识别位点的任何其他修饰的免疫球蛋白分子。此外，“单克隆抗体”是指以任何数目的方式(包括但不限于通过杂交瘤、噬菌体选择、重组表达和转基因动物)制备的此类抗体。

[0097] 术语“人类抗体”是指由人类产生的抗体或具有与使用本领域已知的任何技术制备的由人类产生的抗体相对应的氨基酸序列的抗体。人类抗体的这种定义包括完整或全长抗体、其片段、和/或包含至少一个人类重链和/或轻链多肽的抗体，例如像包含鼠类轻链和人类重链多肽的抗体。术语“人源化抗体”是指衍生自非人类(例如鼠类)免疫球蛋白的抗体，其被工程化成包含最小的非人类(例如鼠类)序列。

[0098] 术语“嵌合抗体”是指其中免疫球蛋白分子的氨基酸序列源自两种或更多种物种的抗体。典型地，轻链和重链的可变区对应于源自具有所需特异性、亲和力和能力的一种哺乳动物(例如小鼠、大鼠、兔等)的抗体的可变区，而恒定区同源于衍生自另一种(通常为人)的抗体中的序列，以避免在该物种中引起免疫应答。

[0099] 术语“抗体结合位点”是指互补抗体特异地结合的包括连续或不连续位点(即表位)的抗原(例如，O1)中的区域。因此，抗体结合位点可包含抗原中表位外的另外区域，并且所述另外区域可确定如结合亲和力和/或稳定性的特性或影响如抗原酶活性或二聚作用的特性。因此，即使两种抗体结合至抗原内的相同表位，如果该抗体建立与该表位外的氨基酸的不同分子间接触，此类抗体被认为结合至不同抗体结合位点。

[0100] 当提及可变结构域中的残基(大约轻链的残基1-107和重链的残基1-113)时,通常使用IMGT编号系统(例如,Lefranc,M.-P.等人Dev.Comp.Immunol.[发育与比较免疫学]27:55-77(2003))。

[0101] 短语“如卡巴特中的氨基酸位置编号”、“卡巴特位置”、及其语法变体是指在Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest[免疫学目的的蛋白质的序列],第5版,Public Health Service[公共卫生服务],National Institutes of Health[国立卫生研究院],贝塞斯达(Bethesda),马里兰州(Md.) (1991)中用于抗体的重链可变结构域或轻链可变结构域的编号系统。使用这个编号系统,实际的线性氨基酸序列可以含有更少或另外的氨基酸,其对应于可变结构域的FW或CDR的截短或插入。例如,重链可变结构域可以包括在H2的残基52之后的单个氨基酸插入(根据卡巴特的残基52a)和在重链FW残基82之后的插入残基(例如,根据卡巴特的残基82a、82b和82c等)。抗体54H7根据卡巴特系统进行编号。

[0102] 可以通过在抗体序列与“标准”卡巴特编号序列的同源性区域进行比对来确定给定抗体的残基的卡巴特编号。相反,乔西亚(Chothia)是指结构环的位置(Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]196:901-917(1987))。当使用卡巴特编号惯例编号时,乔西亚CDR-H1环的末端根据环的长度在H32和H34之间变化(这是因为卡巴特编号方案将插入放置于H35A和H35B;如果35A和35B都不存在,则环在32处结束;如果仅存在35A,则环在33处结束;如果35A和35B都存在,则环在34处结束)。AbM高变区表示卡巴特CDR和乔西亚结构环之间的折衷,并且被牛津分子(Oxford Molecular)AbM抗体建模软件使用。还可以使用CDR的IMGT(Lefranc,M.-P.等人[发育和比较免疫学]27:55-77(2003))分类。

[0103] 术语“如在卡巴特中的EU索引”是指在Kabat等人,Sequences of Immunological Interest[免疫学目的的序列],第5版,Public Health Service[公共卫生服务],National Institutes of Health[国立卫生研究院],贝塞斯达(Bethesda),马里兰州(Md.) (1991)中描述的人类IgG1EU抗体的编号系统。例如,“L234”和“EU L234”二者均指在根据如卡巴特提出的EU索引的位置234的氨基酸亮氨酸。

[0104] 如本文所用的术语“Fc结构域”、“Fc区”和“IgG Fc结构域”是指与通过木瓜蛋白酶消化IgG分子而获得的可结晶片段相关的免疫球蛋白(例如IgG分子)的部分。Fc区包含IgG分子的通过二硫键连接的两条重链的C-末端的那一半。它不具有抗原结合活性,但含有碳水化合物部分和针对补体和Fc受体(包括FcRn受体)的结合位点。例如,Fc结构域包含完整的第二恒定结构域CH2(人类IgG1的EU位置231-340的残基)和第三恒定结构域CH3(人类IgG1的EU位置341-447的残基)。

[0105] Fc可以指分离的这个区域,或在抗体、抗体片段、或Fc融合蛋白的背景下的这个区域。已经在Fc结构域中的许多位置观察到多态性,包括但不限于EU位置270、272、312、315、356和358。因此,“野生型IgG Fc结构域”或“WT IgG Fc结构域”是指任何天然存在的IgG Fc区(即,任何等位基因)。许多Fc突变体、Fc片段、Fc变体、和Fc衍生物描述于例如美国专利号5,624,821;5,885,573;5,677,425;6,165,745;6,277,375;5,869,046;6,121,022;5,624,821;5,648,260;6,528,624;6,194,551;6,737,056;7,122,637;7,183,387;7,332,581;7,335,742;7,371,826;6,821,505;6,180,377;7,317,091;7,355,008;美国专利公开号2004/0002587;以及PCT公开号WO 99/058572、WO 2011/069164和WO 2012/006635。

[0106] 人类IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的重链序列可以在许多序列数据库中找到,例如Uniprot数据库(www.uniprot.org)中分别在登录号P01857(IGHG1_HUMAN)、P01859(IGHG2_HUMAN)、P01860(IGHG3_HUMAN)、和P01861(IGHG1_HUMAN)下。

[0107] 术语“YTE”或“YTE突变体”是指IgG1Fc结构域中的一组突变,这导致与人类FcRn的结合增加,且提高具有突变的抗体的血清半衰期。YTE突变体包括下述三种引入到IgG的重链中的“YTE突变”的组合:M252Y、S254T和T256E,其中根据在卡巴特中的EU索引进行编号。参见美国专利号7,658,921,将其通过引用并入本文。与相同抗体的野生型相比,YTE突变体显示出增加了抗体的血清半衰期。参见例如Dall'Acqua等人,J.Biol.Chem.[生物化学杂志]281:23514-24(2006)以及美国专利号7,083,784,将其通过引用以其全文特此并入。“Y”突变体仅包含M256Y突变;类似地,“YT”突变仅包含M252Y和S254T;并且“YE”突变仅包含M252Y和T256E。特别考虑到其他突变可存在于EU位置252和/或256。在某些方面,在EU位置252的突变可以是M252F、M252S、M252W或M252T和/或在EU位置256的突变可以是T256S、T256R、T256Q或T256D。

[0108] 术语“N3”或“N3突变体”是指IgG1Fc结构域中的一组突变,这导致与FcRn的结合增加,且提高具有突变的抗体的血清半衰期。N3突变体包含被并入野生型IgG1恒定结构域基本结构的位置432-437处(在位置437和438之间没有插入)的序列Cys-Ser-Trp-His-Leu-Cys(SEQ ID NO:68)。参见WO 2015175874,其通过引用特此并入。

[0109] 术语“天然存在的O1”通常是指O1多糖或其片段可存在的状态。天然存在的O1意指在没有先前使用重组技术引入编码核酸的情况下,由细胞天然产生的O1多糖。因此,天然存在的O1可由例如肺炎克雷伯菌天然产生和/或从克雷伯菌属的不同成员分离。

[0110] 术语“重组O1”是指O1多糖或其片段可以存在的状态。重组O1意指例如在异源宿主中由重组DNA产生的O1多糖或其片段。

[0111] 如本文所用的术语“半衰期”或“体内半衰期”是指本披露的具体类型的抗体、抗原结合蛋白、或多肽在给定动物的循环中的生物半衰期,并且表示为动物中的给药量的一半从循环和/或动物中的其他组织中清除所需要的时间。

[0112] 如本文所用的术语“受试者”是指有待成为特定治疗的接受者的任何动物(例如哺乳动物),包括但不限于人类、非人类灵长动物、啮齿类、绵羊、狗、猫、马、牛、熊、鸡、两栖动物、爬行动物等等。如本文所用的术语“受试者”和“患者”是指任何受试者,特别是哺乳动物受试者,对其与克雷伯菌属感染相关联的病症进行诊断、预后或治疗。如本文所用的,如“患有与克雷伯菌属感染相关联的病症的患者”等短语包括将受益于针对与克雷伯菌属感染相关联的该病症的治疗、成像或其他诊断程序的给予和/或预防性治疗的受试者,例如哺乳动物受试者。

[0113] “克雷伯菌属”是指肠杆菌科中革兰氏阴性的兼性厌氧杆状细菌的属。克雷伯菌属包括例如肺炎克雷伯菌、产酸克雷伯菌、植生克雷伯菌、肉芽肿克雷伯菌、臭鼻克雷伯菌、以及鼻硬结克雷伯菌。

[0114] 克雷伯菌属的成员通常在其细胞表面上表达至少2种类型的糖类抗原:O抗原和K抗原。O抗原是脂多糖,而K抗原是荚膜多糖。这些抗原的结构可变性形成了用于将它们分类成克雷伯菌属“血清型”的基础。因此,O1结合蛋白(例如抗体或其抗原结合片段)结合多种克雷伯菌属菌株或血清型的能力是指其与具有不同的O和/或K抗原的克雷伯菌属结合的能

力。在本文提供的一些实施例中，克雷伯菌属属于01血清型。

[0115] 如本文所用的术语“药物组合物”是指如下制剂，该制剂处于允许活性成分的生物活性有效的形式，并且不含有另外的、对其将要给予的受试者具有不可接受的毒性的组分。这样的组合物可以是无菌的。

[0116] 如本文披露的，抗原结合蛋白（包括抗体或其抗原结合片段）的“有效量”是足以实施具体阐述目的的量。关于阐述的目的，“有效量”可以经验为主地并且以常规方式来确定。如本文所用的术语“治疗有效量”是指有效“治疗”受试者或哺乳动物的疾病或病症的多肽（例如，抗原结合蛋白，包括抗体）或其他药物的量，并为患有克雷伯菌属介导的疾病或病症的受试者提供一定的改进或益处。因此，“治疗有效”量是提供克雷伯菌属介导的疾病或病症的至少一种临床症状的一些减轻、缓和、和/或减少的量。与克雷伯菌属介导的疾病或病症相关联的临床症状可以通过本披露的方法和系统进行治疗，这些临床症状对本领域技术人员是熟知的。此外，本领域技术人员将理解治疗效果不需要是完全的或治愈的，只要向受试者提供一些益处。在一些实施例中，术语“治疗有效的”是指治疗剂的能够在有需要的患者中降低克雷伯菌属（例如，肺炎克雷伯菌）或克雷伯菌属（例如，肺炎克雷伯菌）活性的量。给予的实际量以及给予的速率和时程将取决于正治疗的疾病的性质和严重度。治疗处方（例如剂量等的确定）属于全科医生和其他医生的职责。抗体及其抗原结合片段的适当剂量在本领域中是熟知的；参见 Ledermann J.A. 等人（1991）Int.J.Cancer [国际癌症杂志] 47: 659-664；Bagshawe K.D. 等人（1991）Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals [抗体、免疫缀合物和放射性药物] 4:915-922。

[0117] 如本文所用的，“足够的量”或“量足以”在患有克雷伯菌属介导的疾病或病症的患者中实现具体结果，是指治疗剂（例如，如本文披露的抗原结合蛋白，包括抗体）的有效产生所希望的作用的量，该所希望的作用任选地是治疗有效的（即，通过给予治疗有效量）。在一些实施例中，这种具体结果在对其有需要的患者中是克雷伯菌属（例如，肺炎克雷伯菌）或克雷伯菌属（例如，肺炎克雷伯菌）活性的降低。

[0118] 当在本文使用时，术语“标记”是指直接或间接缀合至多肽（例如抗原结合蛋白，包括抗体）以便产生“标记的”多肽或抗体的可检测化合物或组合物。该标记可以是本身可检测的（例如，放射性同位素标记或荧光标记），或在酶标记的情况下可以催化可检测底物化合物或组合物的化学改变。

[0119] 术语如“治疗（treating或treatment或to treat）”或“减轻（alleviating或to alleviate）”或者“改善”或“或改善”是指治愈、减慢已诊断的病理病症或障碍，减轻已诊断的病理病症或障碍的症状，和/或停止已诊断的病理病症或障碍的进展的治疗性措施。术语如“预防”是指预防和/或减缓靶标病理病症或障碍发展的防御性或预防性措施。因此，需要治疗的那些包括已患有疾病或病症的那些。需要预防的那些包括容易患上疾病或病症的那些以及有待预防疾病或病症的那些。例如，短语“治疗患有克雷伯氏菌属介导的疾病或病症的患者”是指降低克雷伯氏菌属介导的疾病或病症的严重程度，优选降低到受试者不再感到因该疾病或病症而不适和/或功能发生改变的程度（例如，与未治疗的患者相比时，哮喘恶化相对减少）。短语“预防克雷伯菌属介导的疾病或病症”是指降低克雷伯菌属介导的疾病或病症的可能性和/或减少克雷伯菌属介导的疾病或病症的发生。

[0120] 如本文所用的，术语“与克雷伯菌属感染相关联的病症”是指在患有该疾病或病症

的受试者中,由克雷伯菌属感染(例如肺炎克雷伯菌、产酸克雷伯菌、植生克雷伯菌、臭鼻克雷伯菌、鼻硬结克雷伯菌和/或肉芽肿克雷伯菌的感染)(单独或与其他介导物相关联)引起的、加重的、与其相关联的、或由其延长的任何病理学。与克雷伯菌属感染相关联的病症的非限制性实例包括肺炎、尿路感染、败血症/脓毒病、新生儿败血症、腹泻、软组织感染、器官移植后感染、手术感染、伤口感染、肺部感染、化脓性肝脓肿、眼内炎、脑膜炎、坏死性脑膜炎、强直性脊柱炎和脊柱关节病。在一些实施例中,克雷伯菌属感染是医院感染。在一些实施例中,克雷伯菌属感染是机会性感染。在一些实施例中,克雷伯菌属感染是在器官移植之后。在一些实施例中,受试者暴露于克雷伯菌属污染的医疗装置,包括例如呼吸机、导管或静脉内导管。

[0121] 携带CDR或一组CDR的结构通常具有抗体重链或轻链序列或其实质部分,其中CDR或CDR组位于与由重排的免疫球蛋白基因编码的天然存在的VH和VL抗体可变结构域的CDR或CDR组对应的位置。免疫球蛋白可变结构域的结构和位置可通过参考以下来确定:Kabat, E.A.等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest[免疫学目的的蛋白质的序列].第4版.US Department of Health and Human Services[美国卫生与公众服务部].1987,及其在因特网上可获得的更新(<http://immuno.bme.nwu.edu>或使用任何搜索引擎查找“卡巴特”),将其通过引用并入本文。CDR还可以由其他支架携带,例如纤连蛋白或细胞色素B。

[0122] 基本上如本文阐明的CDR氨基酸序列可以作为人类可变结构域或其实质部分中的CDR而携带。基本上如本文阐明的HCDR3序列代表本披露的实施例并且这些序列中的每一个可以作为人类重链可变结构域或其实质部分中的HCDR3而携带。

[0123] 本披露中采用的可变结构域可以从任何种系或重排的人类可变结构域获得,或可以是基于已知人类可变结构域的共有序列的合成可变结构域。可以使用重组DNA技术将CDR序列(例如CDR3)引入缺少CDR(例如CDR3)的可变结构域的谱系中。

[0124] 例如,Marks等人(Bio/Technology[生物/技术],1992,10:779-783;将其通过引用并入本文)提供了产生抗体可变结构域的谱系的方法,其中指向或邻近可变结构域区域的5'末端的共有引物与指向人类VH基因的第三框架区的共有引物结合使用,以提供缺少CDR3的VH可变结构域的谱系。Marks等人进一步描述了这个谱系能如何与特定抗体的CDR3组合。使用类似技术,本披露的CDR3衍生序列能与缺少CDR3的VH或VL结构域的谱系进行改组,并且改组的完整VH或VL结构域与同源VL或VH结构域组合以提供抗原结合蛋白。然后,谱系能展示于合适宿主系统中,例如WO 92/01047或任何后续大量文献(包括Kay,B.K.,Winter,J.,和McCafferty,J.(1996) Phage Display of Peptides and Proteins:A Laboratory Manual[肽和蛋白质的噬菌体展示:实验室手册],San Diego:Academic Press[圣地亚哥:学术出版社])的噬菌体展示系统,以使得可选择合适的抗原结合蛋白。谱系可由超过104个单独成员的任何成员组成,例如从106至108或1010个成员。其他合适的宿主系统包括酵母展示、细菌展示、T7展示、核糖体展示等等。关于核糖体展示的综述,参见Lowe D和Jermutus L,2004,Curr.Pharm.Biotech[生物技术],517-27,以及WO 92/01047,将其通过引用并入本文。

[0125] Stemmer(Nature[自然],1994,370:389-391,将其通过引用并入本文)也披露了类似的改组或组合技术,描述了与β-内酰胺酶基因相关的技术但观察到该方法可用于产生抗

体。

[0126] 另外的替代方案是使用一个或多个选定VH和/或VL基因的随机诱变以产生整个可变结构域内的突变,产生携带本披露的CDR衍生序列的新颖VH或VL区域。这种技术由Gram等人(1992, Proc.Natl.Acad.Sci., USA[美国国家科学院院刊], 89:3576-3580)描述,他们使用易错PCR。在一些实施例中,一个或两个氨基酸取代是在一组HCDR和/或LCDR中产生。

[0127] 可使用的另一种方法是将诱变引导至VH或VL基因的CDR区域。此类技术由Barbas等人(1994, Proc.Natl.Acad.Sci., USA[美国国家科学院院刊], 91:3809-3813)和Schier等人(1996, J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]263:551-567)披露。

[0128] 本披露的方法和技术通常是根据本领域中熟知的常规方法和贯穿本说明书中引用且论述的各种通用和更特定的参考文献中所述来进行,除非另外指明。参见,例如, Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual[分子克隆:实验室手册],第3版,Cold Spring Harbor Laboratory Press[冷泉港实验室出版社],Cold Spring Harbor[冷泉港],N.Y.[纽约州](2001);和Ausubel等人,Current Protocols in Molecular Biology[分子生物学实验室指南],Greene Publishing Associates[格林出版联合公司](1992);以及Harlow和Lane Antibodies:A Laboratory Manual[抗体:实验室手册]Cold Spring Harbor Laboratory Press[冷泉港实验室出版社],Cold Spring Harbor[冷泉港],N.Y.[纽约州](1990),所有这些均通过引用并入本文。

[0129] 本领域技术人员将能够使用上述此类技术来使用本领域的常规方法提供本披露的抗原结合蛋白。

[0130] II.01抗原结合分子

[0131] 本披露提供了特异性地结合肺炎克雷伯菌01抗原的01抗原结合分子,例如,抗原结合蛋白、抗体、以及其抗原结合片段。如本文所定义的,“01抗原结合分子”(包括抗体及其抗原结合片段)不与02结合。总体上说,这些药剂在本文被称为“01结合分子”或“01结合剂”。

[0132] 克雷伯菌属脂多糖(LPS)的01抗原含有由重复单元D-半乳聚糖I(D-Gal I)和D-半乳聚糖II(D-Gal II)构成的两种结构不同的结构域。参见图12。低分子量D-Gal I聚合物直接连接至核心寡糖并且由具有结构→3)- β -D-Galf-(1→3)- α -D-Galp-(1→的重复单元构成。O-抗原生物合成部分地由wb(rfb)基因簇的产物进行,该wb(rfb)基因簇由六种基因(wzm,wzt,glf,wbbM,wbbN和wbbO)构成(Whitfield,C.等人1991.Expression of two structurally distinct D-Galactan O antigens in the lipopolysaccharide of Klebsiella pneumoniae serotype 01[两种结构上不同的D-半乳聚糖O抗原在肺炎克雷伯菌血清型01的脂多糖中的表达].J.Bacteriology[细菌学杂志].1420-1431;Clarke,B.R.和Whitfield C.1992.Molecular cloning of the rfb region of Klebsiella pneumoniae serotype 01:K20[肺炎克雷伯菌血清型01:K20的rfb区域的分子克隆].J.Bacteriology[细菌学杂志].174:4614-4621)。D-Gal I结构域也是克雷伯菌属02LPS的主要O-抗原组分。连接至D-Gal I的远端的高分子量D-Gal II聚合物由具有结构→3)- α -D-Galp-(1→3)- β -D-Galp-(1→的重复单元构成。近期鉴定了D-Gal II生物合成所需的基因为wbbY和wbbZ,它们不与wb基因簇连接。(参见,Hsieh,P.等人2014.D-galactan II is an immunodominant antigen in 01 LPS and affects virulence in

Klebsiellapneumoniae: implication in vaccine design[D-半乳聚糖II是O1 LPS中的免疫显性抗原并且影响肺炎克雷伯菌的毒力:疫苗设计的意义].Frontiers in Microbiology[微生物学前沿].5:1-13)。D-Gal II的加入定义了O1血清型并且导致血清抗性以及引起PLA的肺炎克雷伯菌的高患病率。(Hsieh,P.F.2012.Lipopolysaccharide O1antigen contributes to the virulence in Klebsiella pneumoniae causing primarypyogenic liver abscess[脂多糖O1抗原有助于引起原发性化脓性肝脓肿的肺炎克雷伯菌的毒力];Pan Y-J.,等人,PLoS ONE 7(3):e33155 (2013) doi:10.1371/journal.pone.0033155)。

[0133] 在一些实施例中,本披露提供了一种分离的抗原结合蛋白,其为特异性地结合肺炎克雷伯菌O1抗原的抗体或多肽。在一些实施例中,该抗原结合蛋白是抗体的特异性地结合肺炎克雷伯菌O1抗原的抗原结合片段。

[0134] 在某些实施例中,O1结合分子是抗体或多肽。在一些实施例中,本披露提供了一种分离的抗原结合蛋白,其是特异性地结合肺炎克雷伯菌O1抗原的鼠类的、非人类的、人源化的、嵌合的、表面重建的或人类的抗原结合蛋白。在一些实施例中,本披露提供了一种分离的抗原结合蛋白,其是特异性地结合肺炎克雷伯菌O1抗原的人源化的、嵌合的、表面重建的或人类的抗原结合蛋白。在一些实施例中,O1结合分子是人源化抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,O1结合分子是人类抗体或其抗原结合片段。

[0135] 本披露提供了一种特异性地结合肺炎克雷伯菌O1抗原的分离的抗原结合蛋白(包括抗体或其抗原结合片段),其中所述抗原结合蛋白(例如,抗体或其抗原结合片段):a)诱导克雷伯菌属(例如,肺炎克雷伯菌)的调理吞噬杀伤(OPK);b)经由如通过血清杀菌测定所测量的补体依赖性杀伤而杀死克雷伯菌属(例如,肺炎克雷伯菌);或c)诱导克雷伯菌属(例如,肺炎克雷伯菌)的OPK并且经由如通过血清杀菌测定所测量的补体依赖性杀伤而杀死克雷伯菌属(例如,肺炎克雷伯菌)。

[0136] 本披露还提供了一种特异性地结合肺炎克雷伯菌O1抗原的分离的抗原结合蛋白(包括抗体或其抗原结合片段),其中所述抗原结合蛋白(例如,抗体或其抗原结合片段)诱导OPK但是不中和LPS。如本文提供的实例中所证明的,高水平的体内活性与特异性结合肺炎克雷伯菌O1抗原并诱导OPK但不中和LPS的抗原结合蛋白相关。

[0137] 本披露还提供了一种特异性地结合肺炎克雷伯菌O1抗原的分离的抗原结合蛋白(包括抗体或其抗原结合片段),其中所述抗原结合蛋白(例如,抗体或其抗原结合片段)诱导OPK并且中和LPS。

[0138] O1结合剂包括抗O1抗原抗体KPE33、KPE33V2016、KPA27、KPB202、KBJ4、54H7、以及其抗原结合片段。O1结合剂还包括以下一样特异性地结合相同的肺炎克雷伯菌O1表位的O1-结合剂(例如,抗O1抗原抗体或其抗原结合片段):KPE33、KPE33V2016、KPA27、KPB202、KBJ4、或54H7。

[0139] 在一些实施例中,O1结合剂(例如,抗O1抗原抗体或其抗原结合片段)不包括抗体克隆Ru-01。参见Rukavina T.,等人,Infect Immun[感染与免疫]65:1754-60(1997)。在一些实施例中,O1结合剂(例如,抗O1抗原抗体或其抗原结合片段)不是鼠类抗体。

[0140] 在一些实施例中,O1结合蛋白(例如,抗O1抗原抗体或其抗原结合片段)结合肺炎克雷伯菌O1抗原的D-半乳聚糖II结构域。在一些实施例中,O1结合蛋白(例如,抗O1抗原抗

体或其抗原结合片段)结合肺炎克雷伯菌01抗原的D-半乳聚糖II结构域内的表位。

[0141] 01结合剂(例如抗01抗原抗体或其抗原结合片段)还包括竞争性地抑制KPE33、KPE33V2016、KPA27、KPB202、KPJ4、或54H7与肺炎克雷伯菌01抗原的结合的01结合剂。在一些实施例中,在竞争性ELISA测定中,抗01抗体或其抗原结合片段竞争性地抑制KPE33、KPE33V2016、KPA27、KPB202、KPJ4、或54H7与肺炎克雷伯菌01抗原的结合。在一些实施例中,在竞争性ELISA测定中,抗01抗体或其抗原结合片段竞争性地抑制KPE33、KPE33V2016、KPA27、KPB202、KPJ4、或54H7与肺炎克雷伯菌的结合。

[0142] 在一些实施例中,01结合剂(例如抗01抗原抗体或其抗原结合片段)还包括竞争性地抑制54H7与肺炎克雷伯菌01抗原的结合但是不竞争性地抑制KPE33与肺炎克雷伯菌01抗原的结合(例如,如通过Octet平台所测量的)的01结合剂。在一些实施例中,01结合剂(例如抗01抗原抗体或其抗原结合片段)还包括竞争性地抑制KPE33与肺炎克雷伯菌01抗原的结合但是不竞争性地抑制54H7与肺炎克雷伯菌01抗原的结合(例如,如通过Octet平台所测量的)的01结合剂。

[0143] 在一些实施例中,抗01抗体或其抗原结合片段结合01克雷伯菌属菌株(包括,例如,肺炎克雷伯菌01菌株),但是不结合对应的wbbYZ敲除菌株(例如,如通过FACS测定所测量的)。在一些实施例中,抗01抗体或其抗原结合片段结合克雷伯菌属菌株Kp1131115但是不结合Kp1131115 Δ wbbYZ敲除菌株(例如,如通过FACS测定所测量的)。

[0144] 01结合剂(例如抗01抗原抗体或其抗原结合片段)还包括包含KPE33、KPE33V2016、KPA27、KPB202、KBJ4、或54H7的重链和轻链互补决定区(CDR)序列的01结合剂。KPE33、KPE33V2016、KPA27、KPB202、KBJ4、和54H7的CDR序列描述于以下表1和表2中。对于除54H7以外的所有抗体,使用IMGT系统确定表1和表2中列出的CDR。对于54H7,使用卡巴特系统确定CDR。

[0145] 表1.可变重链CDR氨基酸序列

抗体	VH-CDR1	VH-CDR2	VH-CDR3
KPE33	GFIFDDYA (SEQ ID NO: 1)	IAWKSGAT (SEQ ID NO: 2)	TRRRASGDDTFYYFDY (SEQ ID NO: 3)
[0146]	KPE33V2016	GFIFDDYA (SEQ ID NO: 1)	IAWKSGAT (SEQ ID NO: 2)
	KPA27	ENTFNDFY (SEQ ID NO: 14)	IHPDGVVVT (SEQ ID NO: 15)
	KBPJ4	GDSVSSNTAA (SEQ ID NO: 23)	TYYRSEWYN (SEQ ID NO: 24)
			ARISWNDLPA (SEQ ID NO: 25)

	KPB202	GFTFSNFW (SEQ ID NO: 32)	INPDGSEK (SEQ ID NO: 33)	ARLGPFHPDC (SEQ ID NO: 34)
[0147]	54H7	NYWMQ (SEQ ID NO: 41)	NIYPGSGNTNYD EKFRS (SEQ ID NO: 42)	NWNFDY (SEQ ID NO: 43)
	KPE33-H32 +L2016 (E1Q)	GFIFDDYA (SEQ ID NO: 1)	IAYKSGAT (SEQ ID NO: 59)	RRRASGDDTFYYFDY TRRRASGDNTFYYFDY (SEQ ID NO: 60)
	KPE33-H33 +L2016 (E1Q)	GFIFDDYA (SEQ ID NO: 1)	IAYKSGAT (SEQ ID NO: 59)	RRRASGDDTFYYFDY TRRRASGDNTFYYFDY (SEQ ID NO: 60)

[0148] 表2. 可变轻链CDR氨基酸序列

抗体	VL-CDR1	VL-CDR2	VL-CDR3
KPE33	QNVNTN (SEQ ID NO: 4)	DAS (SEQ ID NO: 5) 或 LIYDASTRA (SEQ ID NO: 6)	QQCTNWRYT (SEQ ID NO: 7)
KPE33V201 6	QNVNTN (SEQ ID NO: 4)	DAS (SEQ ID NO: 5) 或 LIYDASNRA (SEQ ID NO: 10)	QQTTNWRYT (SEQ ID NO: 11)
KPA27	QPVSNR (SEQ ID NO: 17)	KAS (SEQ ID NO: 18) 或 LIYKASTLQ (SEQ ID NO: 19)	QQSQT (SEQ ID NO: 20)
KPJ4	QSILYSSHNK NY (SEQ ID NO: 26)	WAS (SEQ ID NO: 27) 或 LIYWASTRE (SEQ ID NO: 28)	QQYCNIPYT (SEQ ID NO: 29)
KPB202	QSLVHSDGNT Y (SEQ ID NO: 35)	EVS (SEQ ID NO: 36) 或 LIYEVSNRD (SEQ ID NO: 37)	MQGTHWPWT (SEQ ID NO: 38)
54H7	RASQDIGSSL N (SEQ ID NO: 44)	ATSSLDS (SEQ ID NO: 45)	LQHTDSPYT (SEQ ID NO: 46)
KPE33-H32 +L2016 (E1Q)	QNVNTN (SEQ ID NO: 4)	DAS (SEQ ID NO: 5) 或 LIYDASNRA (SEQ ID NO: 10)	QQTTNWRYT (SEQ ID NO: 11)
KPE33-H33 +L2016 (E1Q)	QNVNTN (SEQ ID NO: 4)	DAS (SEQ ID NO: 5) 或 LIYDASNRA (SEQ ID NO: 10)	QQTTNWRYT (SEQ ID NO: 11)

[0150] 本文描述的抗原结合蛋白(包括抗01抗原抗体或其抗原结合片段)可包含本文所述的各个可变轻链或可变重链之一。本文描述的抗原结合蛋白(包括抗01抗原抗体或其抗原结合片段)还可以包含可变轻链和可变重链两者。抗01抗原KPE33、KPE33V2016、KPA27、KPB202、KBJ4、和54H7抗体的可变轻链和可变重链序列提供于下表3和表4中。

[0151] 表3: 可变重链氨基酸序列

抗体	VH 氨基酸序列 (SEQ ID NO)
[0152]	EVQLVESGGALVQPGGSLRLSCAVSGFIFDDYAIHWVRRAPGKG LEWVSGIAWKSGATNYADSVKGRFAISRDNSKKSMYLQMNSL GTEDTALYYCTRRRASGDDTFYYFDYWGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 8)
	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFIFDDYAMHWVRQAPGK GLEWVSGIAWKSGATNYADSVKGRFAISRDNSKKSMYLQMNS LGTEDTALYYCTRRRASGDDTFYYFDYWGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 12)
	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASENTFNDFYMHWVRQAPG QGLEWMGWIHPDGVVNTYAQKFQGRVTMTRDTSINTVYMELN GLISDDTAVYYCMRDGPSEGWSFDYWGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 21)
	QVQLQQSGPGLVRPSQTLSLTCAISGDSVSSNTAAWNWIRQSPS RGLEWLGRTRYRSEWYNDYAVSVKSRTINPDTSKNQFSLQLNS VTPEDTAVYYCARISWNDLPAWGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 30)
	EVQLVESGGGLVQPGGSLSLSCAASGFTFSNFWVGWGRQAPGK GLEWVANINPDGSEKYYVDSVKGRVTISRDNAKNSLSLQMNSL RVEDAAVYYCARLGPFHPDCWGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 39)
	QVHLQQPGSELVRPGASVTLSCAKASGYTFTNYWMQWVKQRPG QGLEWIGNIYPGSGNTNYDEKFRSKATLTVDTSSSTAYMHTSL TSEDSA VYYCTRWNWF DYWGQGTTLVSS (SEQ ID NO: 47)
	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFIFDDYAIHWVRQAPGK GLEWVSGIAYKSGATNYAESVKGRFTISRDQSKNSLYLQMNSLR AEDTALYYCTRRRASGDNTFYYFDYWGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 61)
	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFIFDDYAIHWVRQAPGK GLEWVSGIAYKSGATNYAESVKGRFTISRDQSKNSLYLQMNSLR AEDTALYYCTRRRASGDNTFYYFDYWGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 62)

[0153] 表4: 可变轻链氨基酸序列

抗体	VL 氨基酸序列 (SEQ ID NO)
KPE33	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQNVNTNLAWYQQRPGQSPRL LIYDASTRAAGLPARFSGSGSGTDFTLTISSEPEDFAVYYCQQC

		TNWRYTGFQGTKLEIK (SEQ ID NO: 9)
[0155]	KPE33V 2016	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQNVNTNLAWYQQKPGQAPR LLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQTT NWRYTGFQGTKLEIK (SEQ ID NO: 13)
	KPA27	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITCRASQPVSNRLAWYQQKPGRA PT LLIYKASTLQSGVPLRFSGSGSGTEFTLTISSLQSDDFATYYCQQSQ TFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 22)
	KPJ4	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSILYSSHKNYLA WYQQK PGQPPKVLIYWASTRESGV PDRFSGSGSGTDFTLTISNLQAEDV AV YYCQQYCNIPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 31)
	KPB202	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQLVHSDGNTYLNWFQQRP GQSPRRLIYEVSNRD SGPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDIGV Y YCMQGTHWPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 40)
	54H7	DIQMTQSPSSLSASLG ERSVSLTCRASQD DIGSSLNWLQQEPDG TIKR LIYATSSLD SGP KRFSGSRSGSEYSLT ISSLEAEDFVDYYCLQHTD SPYTFGGGTKE LK (SEQ ID NO: 48)
	KPE33-H 32+L201 6 (E1Q)	QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQNVNTNLAWYQQKPGQAPR LLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQTT NWRYTGFQGTKLEIK (SEQ ID NO: 63)
	KPE33-H 33+L201 6 (E1Q)	QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQNVNTNLAWYQQKPGQAPR LLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQTT NWRYTGFQGTKLEIK (SEQ ID NO: 63)

[0156] 在一些实施例中,本披露提供了一种特异性地结合肺炎克雷伯菌01抗原的分离的抗原结合蛋白(包括,例如,抗01抗原抗体或其抗原结合片段),其中所述抗原结合蛋白包含与SEQ ID NO:8、12、21、或30具有至少95%、96%、97%、98%、或99%同一性的重链可变区(VH)以及与SEQ ID NO:9、13、22、31具有至少95%、96%、97%、98%、或99%同一性的轻链可变区(VL)。在一些实施例中,该特异性地结合肺炎克雷伯菌01抗原的分离的抗原结合蛋白(包括,例如,抗01抗原抗体或其抗原结合片段)包含含有SEQ ID NO:8、12、21、或30的序列的重链可变区以及含有SEQ ID NO:9、13、22、31的序列的轻链可变区。在一些实施例中,与SEQ ID NO:8、9、12、13、21、22、30、或31具有至少95%、96%、97%、98%、或99%序列同一性的分离的抗原结合蛋白(包括,例如,抗01抗原抗体或其抗原结合片段)与SEQ ID NO:8、9、12、13、21、22、30、或31仅相差保守氨基酸取代。在一些实施例中,特异性地结合肺炎克雷伯菌01抗原的分离的抗原结合蛋白(包括,例如,抗01抗原抗体或其抗原结合片段)包含与SEQ ID NO:8、12、21、或30具有至少95%、96%、97%、98%、或99%同一性的重链可变区(VH)以及与SEQ ID NO:9、13、22、31具有至少95%、96%、97%、98%、或99%同一性的轻链可变区(VL),其中该分离的抗原结合蛋白(包括,例如,抗01抗原抗体或其抗原结合片段)不是抗体克隆Ru-01(参见Rukavina T.,等人, Infect Immun [感染与免疫] 65:1754-60 (1997))。

[0157] 在一些实施例中,本披露提供了一种特异性地结合肺炎克雷伯菌01抗原的分离的抗原结合蛋白(包括,例如,抗01抗原抗体或其抗原结合片段),其中所述抗原结合蛋白包含与SEQ ID NO:8和9、SEQ ID NO:12和13、SEQ ID NO:31和22、或SEQ ID NO:30和31分别具有至少95%同一性的VH和VL,并且其中该抗原结合蛋白诱导克雷伯菌属(例如,肺炎克雷伯菌)的OPK,任选地其中该抗原结合蛋白不中和LPS或中和LPS。

[0158] 在一些实施例中,本披露提供了一种特异性地结合肺炎克雷伯菌01抗原的分离的抗原结合蛋白(包括,例如,抗01抗原抗体或其抗原结合片段),其中所述抗原结合蛋白包含与SEQ ID NO:8和9、SEQ ID NO:12和13、SEQ ID NO:31和22、或SEQ ID NO:30和31分别具有至少95%同一性的VH和VL,并且其中该抗原结合蛋白如通过血清杀菌测定所测量地杀死克雷伯菌属(例如,肺炎克雷伯菌)。

[0159] 在一些实施例中,本披露提供了一种特异性地结合肺炎克雷伯菌01抗原的分离的抗原结合蛋白(包括,例如,抗01抗原抗体或其抗原结合片段),其中所述抗原结合蛋白包含与SEQ ID NO:8和9、SEQ ID NO:12和13、SEQ ID NO:31和22、或SEQ ID NO:30和31分别具有至少95%同一性的VH和VL,并且其中该抗原结合蛋白诱导克雷伯菌属(例如,肺炎克雷伯菌)的OPK,并且如通过血清杀菌测定所测量地杀死克雷伯菌属(例如,肺炎克雷伯菌)。

[0160] 在一些实施例中,本披露提供了一种特异性地结合肺炎克雷伯菌01抗原的分离的抗原结合蛋白(包括,例如,抗01抗原抗体或其抗原结合片段),其中所述抗原结合蛋白包含与SEQ ID NO:8和9、SEQ ID NO:12和13、SEQ ID NO:31和22、或SEQ ID NO:30和31分别具有至少95%同一性的VH和VL,并且其中该抗原结合蛋白与抗生素(例如,美罗培南、碳青霉烯、或粘菌素)协同作用。

[0161] 在一些实施例中,本披露提供了一种特异性地结合肺炎克雷伯菌01抗原的分离的抗原结合蛋白(包括,例如,抗01抗原抗体或其抗原结合片段),其中所述抗原结合蛋白包含与SEQ ID NO:8和9、SEQ ID NO:12和13、SEQ ID NO:31和22、或SEQ ID NO:30和31分别具有至少96%同一性的VH和VL,并且其中该抗原结合蛋白诱导克雷伯菌属(例如,肺炎克雷伯菌)的OPK,任选地其中该抗原结合蛋白不中和LPS或中和LPS。

[0162] 在一些实施例中,本披露提供了一种特异性地结合肺炎克雷伯菌01抗原的分离的抗原结合蛋白(包括,例如,抗01抗原抗体或其抗原结合片段),其中所述抗原结合蛋白包含与SEQ ID NO:8和9、SEQ ID NO:12和13、SEQ ID NO:31和22、或SEQ ID NO:30和31分别具有至少96%同一性的VH和VL,并且其中该抗原结合蛋白如通过血清杀菌测定所测量地杀死克雷伯菌属(例如,肺炎克雷伯菌)。

[0163] 在一些实施例中,本披露提供了一种特异性地结合肺炎克雷伯菌01抗原的分离的抗原结合蛋白(包括,例如,抗01抗原抗体或其抗原结合片段),其中所述抗原结合蛋白包含与SEQ ID NO:8和9、SEQ ID NO:12和13、SEQ ID NO:31和22、或SEQ ID NO:30和31分别具有至少96%同一性的VH和VL,并且其中该抗原结合蛋白诱导克雷伯菌属(例如,肺炎克雷伯菌)的OPK,并且如通过血清杀菌测定所测量地杀死克雷伯菌属(例如,肺炎克雷伯菌)。

[0164] 在一些实施例中,本披露提供了一种特异性地结合肺炎克雷伯菌01抗原的分离的抗原结合蛋白(包括,例如,抗01抗原抗体或其抗原结合片段),其中所述抗原结合蛋白包含与SEQ ID NO:8和9、SEQ ID NO:12和13、SEQ ID NO:31和22、或SEQ ID NO:30和31分别具有至少96%同一性的VH和VL,并且其中该抗原结合蛋白与抗生素(例如,美罗培南、碳青霉烯、或粘菌素)协同作用。

[0165] 在一些实施例中,本披露提供了一种特异性地结合肺炎克雷伯菌01抗原的分离的抗原结合蛋白(包括,例如,抗01抗原抗体或其抗原结合片段),其中所述抗原结合蛋白包含与SEQ ID NO:8和9、SEQ ID NO:12和13、SEQ ID NO:31和22、或SEQ ID NO:30和31分别具有至少97%同一性的VH和VL,并且其中该抗原结合蛋白诱导克雷伯菌属(例如,肺炎克雷伯

菌)的OPK,任选地其中该抗原结合蛋白不中和LPS或中和LPS。

[0166] 在一些实施例中,本披露提供了一种特异性地结合肺炎克雷伯菌01抗原的分离的抗原结合蛋白(包括,例如,抗01抗原抗体或其抗原结合片段),其中所述抗原结合蛋白包含与SEQ ID NO:8和9、SEQ ID NO:12和13、SEQ ID NO:31和22、或SEQ ID NO:30和31分别具有至少97%同一性的VH和VL,并且其中该抗原结合蛋白如通过血清杀菌测定所测量地杀死克雷伯菌属(例如,肺炎克雷伯菌)。

[0167] 在一些实施例中,本披露提供了一种特异性地结合肺炎克雷伯菌01抗原的分离的抗原结合蛋白(包括,例如,抗01抗原抗体或其抗原结合片段),其中所述抗原结合蛋白包含与SEQ ID NO:8和9、SEQ ID NO:12和13、SEQ ID NO:31和22、或SEQ ID NO:30和31分别具有至少97%同一性的VH和VL,并且其中该抗原结合蛋白诱导克雷伯菌属(例如,肺炎克雷伯菌)的OPK,并且如通过血清杀菌测定所测量地杀死克雷伯菌属(例如,肺炎克雷伯菌)。

[0168] 在一些实施例中,本披露提供了一种特异性地结合肺炎克雷伯菌01抗原的分离的抗原结合蛋白(包括,例如,抗01抗原抗体或其抗原结合片段),其中所述抗原结合蛋白包含与SEQ ID NO:8和9、SEQ ID NO:12和13、SEQ ID NO:31和22、或SEQ ID NO:30和31分别具有至少97%同一性的VH和VL,并且其中该抗原结合蛋白与抗生素(例如,美罗培南、碳青霉烯、或粘菌素)协同作用。

[0169] 在一些实施例中,本披露提供了一种特异性地结合肺炎克雷伯菌01抗原的分离的抗原结合蛋白(包括,例如,抗01抗原抗体或其抗原结合片段),其中所述抗原结合蛋白包含与SEQ ID NO:8和9、SEQ ID NO:12和13、SEQ ID NO:31和22、或SEQ ID NO:30和31分别具有至少98%同一性的VH和VL,并且其中该抗原结合蛋白诱导克雷伯菌属(例如,肺炎克雷伯菌)的OPK,任选地其中该抗原结合蛋白不中和LPS或中和LPS。

[0170] 在一些实施例中,本披露提供了一种特异性地结合肺炎克雷伯菌01抗原的分离的抗原结合蛋白(包括,例如,抗01抗原抗体或其抗原结合片段),其中所述抗原结合蛋白包含与SEQ ID NO:8和9、SEQ ID NO:12和13、SEQ ID NO:31和22、或SEQ ID NO:30和31分别具有至少98%同一性的VH和VL,并且其中该抗原结合蛋白如通过血清杀菌测定所测量地杀死克雷伯菌属(例如,肺炎克雷伯菌)。

[0171] 在一些实施例中,本披露提供了一种特异性地结合肺炎克雷伯菌01抗原的分离的抗原结合蛋白(包括,例如,抗01抗原抗体或其抗原结合片段),其中所述抗原结合蛋白包含与SEQ ID NO:8和9、SEQ ID NO:12和13、SEQ ID NO:31和22、或SEQ ID NO:30和31分别具有至少98%同一性的VH和VL,并且其中该抗原结合蛋白诱导克雷伯菌属(例如,肺炎克雷伯菌)的OPK,并且如通过血清杀菌测定所测量地杀死克雷伯菌属(例如,肺炎克雷伯菌)。

[0172] 在一些实施例中,本披露提供了一种特异性地结合肺炎克雷伯菌01抗原的分离的抗原结合蛋白(包括,例如,抗01抗原抗体或其抗原结合片段),其中所述抗原结合蛋白包含与SEQ ID NO:8和9、SEQ ID NO:12和13、SEQ ID NO:31和22、或SEQ ID NO:30和31分别具有至少98%同一性的VH和VL,并且其中该抗原结合蛋白与抗生素(例如,美罗培南、碳青霉烯、或粘菌素)协同作用。

[0173] 在一些实施例中,本披露提供了一种特异性地结合肺炎克雷伯菌01抗原的分离的抗原结合蛋白(包括,例如,抗01抗原抗体或其抗原结合片段),其中所述抗原结合蛋白包含与SEQ ID NO:8和9、SEQ ID NO:12和13、SEQ ID NO:31和22、或SEQ ID NO:30和31分别具有

至少99%同一性的VH和VL，并且其中该抗原结合蛋白诱导克雷伯菌属(例如，肺炎克雷伯菌)的OPK，任选地其中该抗原结合蛋白不中和LPS或中和LPS。

[0174] 在一些实施例中，本披露提供了一种特异性地结合肺炎克雷伯菌O1抗原的分离的抗原结合蛋白(包括，例如，抗O1抗原抗体或其抗原结合片段)，其中所述抗原结合蛋白包含与SEQ ID NO:8和9、SEQ ID NO:12和13、SEQ ID NO:31和22、或SEQ ID NO:30和31分别具有至少99%同一性的VH和VL，并且其中该抗原结合蛋白如通过血清杀菌测定所测量地杀死克雷伯菌属(例如，肺炎克雷伯菌)。

[0175] 在一些实施例中，本披露提供了一种特异性地结合肺炎克雷伯菌O1抗原的分离的抗原结合蛋白(包括，例如，抗O1抗原抗体或其抗原结合片段)，其中所述抗原结合蛋白包含与SEQ ID NO:8和9、SEQ ID NO:12和13、SEQ ID NO:31和22、或SEQ ID NO:30和31分别具有至少99%同一性的VH和VL，并且其中该抗原结合蛋白诱导克雷伯菌属(例如，肺炎克雷伯菌)的OPK，并且如通过血清杀菌测定所测量地杀死克雷伯菌属(例如，肺炎克雷伯菌)。

[0176] 在一些实施例中，本披露提供了一种特异性地结合肺炎克雷伯菌O1抗原的分离的抗原结合蛋白(包括，例如，抗O1抗原抗体或其抗原结合片段)，其中所述抗原结合蛋白包含与SEQ ID NO:8和9、SEQ ID NO:12和13、SEQ ID NO:31和22、或SEQ ID NO:30和31分别具有至少99%同一性的VH和VL，并且其中该抗原结合蛋白与抗生素(例如，美罗培南、碳青霉烯、或粘菌素)协同作用。

[0177] 在一些实施例中，本披露提供了一种分离的抗原结合蛋白(例如，抗O1抗原抗体或其抗原结合片段)，除肺炎克雷伯菌O1抗原外，其还结合肺炎克雷伯菌、产酸克雷伯菌、植生克雷伯菌、臭鼻克雷伯菌、鼻硬结克雷伯菌和/或肉芽肿克雷伯菌O1抗原。在一些实施例中，本披露提供了一种分离的抗原结合蛋白(例如，抗O1抗原抗体或其抗原结合片段)，除肺炎克雷伯菌O1抗原外，其还结合肺炎克雷伯菌、产酸克雷伯菌、植生克雷伯菌、臭鼻克雷伯菌、鼻硬结克雷伯菌和/或肉芽肿克雷伯菌O1抗原，其中该分离的抗原结合蛋白(包括，例如，抗O1抗原抗体或其抗原结合片段)不是抗体克隆Ru-01(参见Rukavina T., 等人, Infect Immun [感染与免疫] 65:1754-60 (1997))。可使用如Trautmann M., 等人, J. Med. Microbiol [医学微生物学杂志] 44:44-51 (1996) 所提供的方法检验分离的抗原结合蛋白结合O1抗原的能力。

[0178] 单克隆抗体可使用杂交瘤方法制备，如由Kohler和Milstein (1975) Nature [自然] 256:495所描述的那些。使用杂交瘤方法、小鼠、仓鼠、或其他合适的宿主动物进行免疫，以引发淋巴细胞产生将特异性地结合至免疫抗原的抗体。淋巴细胞也可以在体外免疫。免疫后，分离淋巴细胞，并利用例如聚乙二醇与合适骨髓瘤细胞系融合，以形成可随后从未融合的淋巴细胞和骨髓瘤细胞选择出的杂交瘤细胞。产生特异性地针对所选抗原的单克隆抗体的杂交瘤(如通过免疫沉淀法、免疫印迹法或通过体外结合测定(例如放射免疫测定(RIA)；酶联免疫吸附测定(ELISA))确定的)然后可在体外培养物中利用标准方法(Goding, Monoclonal Antibodies:Principles and Practice[单克隆抗体：原理和实践], Academic Press[学术出版社], 1986)或在体内在动物中增殖。然后单克隆抗体可从培养基或腹水，如上文针对多克隆抗体所述进行纯化。

[0179] 可替代地，单克隆抗体还可以使用如在美国专利4,816,567中所述的重组DNA方法制备。编码单克隆抗体的多核苷酸是如通过使用特异性扩增编码抗体的重链和轻链的基因

的寡核苷酸引物的RT-PCR,从成熟B细胞或杂交瘤细胞分离,并且使用常规程序测定它们的序列。然后将编码重链和轻链的分离的多核苷酸克隆到适合的表达载体中,这些载体在转染进入不产生免疫球蛋白的宿主细胞,如大肠杆菌细胞、类人猿COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、或骨髓瘤细胞中时,通过这些宿主细胞产生单克隆抗体。还有,所期望物种的重组单克隆抗体或其片段可从表达如所述的期望物种的CDR的噬菌体展示文库分离(McCafferty等人,1990,Nature[自然],348:552-554;Clackson等人,1991,[自然],352:624-628;以及Marks等人,1991,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志],222:581-597)。

[0180] 编码单克隆抗体的一种或多种多核苷酸可进一步以多种不同的方式使用重组DNA技术修饰以产生可替代的抗体。在一些实施例中,例如,小鼠单克隆抗体的轻链和重链的恒定结构域可以被1)例如人类抗体的那些区域取代以产生嵌合抗体,或被2)非免疫球蛋白多肽取代以产生融合抗体。在一些实施例中,截短或去除这些恒定区以产生所希望的单克隆抗体的抗体片段。定点诱变或高密度诱变可变区可以用于优化单克隆抗体的特异性、亲和力等。

[0181] 在一些实施例中,针对肺炎克雷伯菌01抗原的单克隆抗体是人源化抗体。在某些实施例中,当给予至人类受试者时,此类抗体在治疗上用于降低抗原性和HAMA(人类抗小鼠抗体)应答。人源化抗体可以使用本领域已知的各种技术来产生。在某些可替代的实施例中,针对肺炎克雷伯菌01抗原的抗体是人类抗体。

[0182] 可以使用本领域已知的不同技术来直接制备人类抗体。可以产生在体外免疫的或从产生针对靶抗原的抗体的免疫个体分离的永生化人B淋巴细胞(参见例如,Cole等人,Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy[单克隆抗体和癌症疗法],Alan R.Liss,第77页(1985);Boemer等人,1991,J.Immunol.[免疫学杂志],147(1):86-95;以及美国专利5,750,373)。还有,人类抗体可以选自噬菌体文库,其中该噬菌体文库表达人类抗体,如例如在Vaughan等人,1996,Nat.Biotech.[自然生物技术],14:309-314;Sheets等人,1998,Proc.Nat'l.Acad.Sci.[美国国家科学院院刊],95:6157-6162;Hoogenboom和Winter,1991,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志],227:381;以及Marks等人,1991,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志],222:581中所述的。用于产生和使用抗体噬菌体文库的技术还描述在美国专利号5,969,108;6,172,197;5,885,793;6,521,404;6,544,731;6,555,313;6,582,915;6,593,081;6,300,064;6,653,068;6,706,484;和7,264,963;以及Rothe等人,2008,J.Mol.Bio.[分子生物学杂志],376:1182-200中(将其中每一个通过引用以其全文并入)。亲和力成熟策略和链改组策略(Marks等人,1992,Bio/Technology[生物/技术]10:779-783,通过引用以其全文并入)在本领域是已知的,并且可用于产生高亲和力人类抗体。

[0183] 人源化抗体也可以在含有人类免疫球蛋白基因座的转基因小鼠中制造,这些基因座在免疫时在不存在内源性免疫球蛋白产生时能够产生全套人类抗体。这种途径描述于美国专利5,545,807;5,545,806;5,569,825;5,625,126;5,633,425;和5,661,016中。

[0184] 根据本披露,技术可经改编以产生对肺炎克雷伯菌01抗原具有特异性的单链抗体(参见美国专利号4,946,778)。此外,方法可经改编以构建Fab表达文库(Huse等人,Science[科学]246:1275-1281(1989)),以允许快速且有效地鉴定具有针对01抗原或其片段的期望特异性的单克隆Fab片段。抗体片段可以通过本领域技术产生,这些抗体片段包括但不限于:(a)由抗体的胃蛋白酶消化而产生的F(ab')2片段;(b)通过还原F(ab')2片段的二硫键

而产生的Fab片段；(c)通过用木瓜蛋白酶和还原剂处理抗体而产生的Fab片段；以及(d)Fv片段。

[0185] 尤其是在抗体片段的情况下，可以进一步期望修饰抗体以增加其血清半衰期。这可以例如通过将补救受体结合表位并入抗体片段，通过使抗体片段中的适当的区域突变，或通过将表位并入随后融合在抗体片段的末端或中部的肽标签（例如，通过DNA或肽合成）来实现。

[0186] 本披露的抗原结合蛋白（包括，例如，抗01抗原抗体或其抗原结合片段）还可包含抗体恒定区或其部分。例如，VL结构域可在其C-末端连接至抗体轻链恒定结构域，包括人类C κ 或C γ 链。类似地，基于VH结构域的抗原结合蛋白可在其C-末端附接至衍生自任何抗体同种型（例如IgG、IgA、IgE和IgM）和任何同种型亚类（尤其是IgG1和IgG4）的免疫球蛋白重链的全部或一部分（例如CH1结构域）。例如，免疫球蛋白重链可以衍生自抗体同种型亚类IgG1。具有这些特性并且使可变区稳定的任何合成或其他恒定区变体也被考虑用于在本披露的实施例中使用。抗体恒定区可以是具有YTE突变的Fc区，使得Fc区包含以下氨基酸取代：M252Y/S254T/T256E。此残基编号基于卡巴特编号。Fc区中的YTE突变增加抗原结合蛋白的血清持久性（参见Dall' Acqua, W.F.等人（2006）The Journal of Biological Chemistry [生物化学杂志]，281, 23514-23524）。抗体恒定区可以是具有N3突变的Fc区，使得Fc区包含基于卡巴特编号的在位置432-437（在位置437和438之间没有插入）处的序列Cys-Ser-Trp-His-Leu-Cys（SEQ ID N0:68）。Fc区中的N3突变还增加了抗原结合蛋白的血清持久性。在某些实施例中，抗体恒定区可包括YTE突变、N3突变、或YTE和N3突变两者。

[0187] 在本文的一些实施例中，修饰抗原结合蛋白（例如抗体或其抗原结合片段）以改进效应物功能，例如以增强抗原依赖性细胞介导的细胞毒性（ADCC）和/或补体依赖性细胞毒性（CDC）。这可以通过进行一个或多个氨基酸取代或通过在Fc区中引入半胱氨酸来实现。可以增强或减弱抗体的效应物功能和/或改变抗体的药代动力学特性（例如半衰期）的Fc区的变体（例如，氨基酸取代和/或添加和/或缺失）例如披露于美国专利号6,737,056B1、美国专利申请公开号2004/0132101A1、美国专利号6,194,551以及美国专利号5,624,821和5,648,260中。一个特定取代组，三重突变L234F/L235E/P331S（“TM”；卡巴特编号）使人类IgG1分子与人类C1q、CD64、CD32A和CD16的结合活性大幅降低。参见例如，Oganesyan等人，Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. [晶体学报D卷生物晶体学]64:700-704 (2008)。在其他情况下，恒定区修饰增加了血清半衰期。可通过增加Fc区对FcRn的结合亲和力来增加包含Fc区的蛋白质的血清半衰期。

[0188] 当抗原结合蛋白是抗体或其抗原结合片段时，其还可以包含选自下组的重链免疫球蛋白恒定结构域，该组由以下组成：(a) IgA恒定结构域；(b) IgD恒定结构域；(c) IgE恒定结构域；(d) IgG1恒定结构域；(e) IgG2恒定结构域；(f) IgG3恒定结构域；(g) IgG4恒定结构域；和(h) IgM恒定结构域。在一些实施例中，抗原结合蛋白是包含IgG1重链免疫球蛋白恒定结构域的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中，抗原结合蛋白是包含IgG1/IgG3嵌合重链免疫球蛋白恒定结构域的抗体或其抗原结合片段。

[0189] 本披露的抗原结合蛋白（包括，例如，抗01抗原抗体或其抗原结合片段）还可以包含选自下组的轻链免疫球蛋白恒定结构域，该组由以下组成：(a) Ig κ 恒定结构域；和(b) Ig λ 恒定结构域。

[0190] 本披露的抗原结合蛋白(包括,例如,抗O1抗原抗体或其抗原结合片段)还可以包含人类IgG1恒定结构域和人类λ恒定结构域。本披露的抗原结合蛋白(包括,例如,抗O1抗原抗体或其抗原结合片段)还可以包含人类IgG2恒定结构域和人类λ恒定结构域。

[0191] 本披露的抗原结合蛋白可以包含IgG1Fc结构域,该IgG Fc结构域在位置252、254和256包含突变,其中位置编号是根据如卡巴特中的EU索引。例如,IgG1Fc结构域可以包含M252Y、S254T、和T256E的突变,其中位置编号是根据如卡巴特中的EU索引。

[0192] 本披露还涉及本披露的抗原结合蛋白的分离的VH结构域和/或本披露的抗原结合蛋白的分离的VL结构域。

[0193] 本披露的抗原结合蛋白(包括抗体或其抗原结合片段)可以用可检测标记或功能标记来标记。可检测标记包括放射性标记,如¹³¹I或⁹⁹Tc,可使用在抗体成像领域中已知的常规化学来将它们附接至本发明的抗体。标记还包括酶标记,如辣根过氧化物酶。标记进一步包括化学部分,如生物素,其可经由结合至特定同源可检测部分(例如标记的抗生物素蛋白)来检测。可以附接至本披露的抗原结合蛋白(包括抗体或其抗原结合片段)的其他可检测标记或功能标记的非限制性实例包括:同位素标记,磁标记,氧化还原活性部分,光学染料,生物素化的基团,荧光部分如生物素信号传导肽、绿色荧光蛋白(GFP)、蓝色荧光蛋白(BFP)、青色荧光蛋白(CFP)和黄色荧光蛋白(YFP),以及通过次级报告物识别的多肽表位如组氨酸肽(his)、血球凝集素(HA)、金结合肽、Flag;放射性同位素、放射性核素、毒素、治疗剂和化疗剂。

[0194] III. 药物组合物

[0195] 本披露还提供了一种药物组合物,该药物组合物包含本文所述的O1结合剂(包括,例如,抗O1抗原抗体或抗原结合片段)中的一种或多种。在某些实施例中,药物组合物还包含药学上可接受的运载体或药学上可接受的赋形剂。在某些实施例中,这些药物组合物可用于治疗、预防或改善人类患者中与克雷伯菌属(例如,肺炎克雷伯菌)感染相关联的病症。在某些实施例中,这些药物组合物可用于抑制克雷伯菌属(例如,肺炎克雷伯菌)的生长。在一些实施例中,该克雷伯菌属(例如,肺炎克雷伯菌)属于O1血清型。在一些实施例中,包含一种或多种O1结合剂(包括,例如,抗O1抗原抗体或抗原结合片段)的药物组合物不包括抗体克隆Ru-01(参见Rukavina T.,等人,Infect Immun[感染与免疫]65:1754-60(1997))。

[0196] 在某些实施例中,通过将本文所述的抗体或O1结合剂与药学上可接受的运载体(例如,载体、赋形剂)组合来制备配制品以便储存和使用(参见,例如,Remington,The Science and Practice of Pharmacy[药学科学与实践]第20版,Mack Publishing[麦克出版社],2000,其通过引用并入本文)。在一些实施例中,该配制品包含防腐剂。

[0197] 本披露的药物组合物可以按任何数目的用于局部或全身治疗的方式给予。

[0198] 在一些实施例中,包含本文所述的O1结合剂(包括,抗O1抗原抗体或抗原结合片段)中的一种或多种的药物组合物用于治疗肺炎、尿路感染、败血症/脓毒病、新生儿败血症/脓毒病、腹泻、软组织感染、器官移植后感染、手术感染、伤口感染、肺部感染、化脓性肝脓肿(PLA)、眼内炎、脑膜炎、坏死性脑膜炎、强直性脊柱炎或脊柱关节病。在一些实施例中,包含本文所述的O1结合剂(包括,抗O1抗原抗体或抗原结合片段)中的一种或多种的药物组合物可用于医院感染、机会性感染、器官移植后感染以及与克雷伯菌属感染(例如,肺炎克雷伯菌、产酸克雷伯菌、植生克雷伯菌、臭鼻克雷伯菌、鼻硬结克雷伯菌、和/或肉芽肿克雷

伯菌感染)相关联的其他病症。在一些实施例中,包含本文所述的O1结合剂(包括,例如,抗O1抗原抗体或抗原结合片段)中的一种或多种的药物组合物在暴露于克雷伯菌属污染的装置(包括例如呼吸机、导管或静脉内导管)的受试者中是有用的。

[0199] 在一些实施例中,该药物组合物包含有效抑制受试者中克雷伯菌属生长的量的O1结合剂(例如,抗O1抗原抗体或其抗原结合片段)。在一些实施例中,该克雷伯菌属是肺炎克雷伯菌、产酸克雷伯菌、植生克雷伯菌、臭鼻克雷伯菌、鼻硬结克雷伯菌、和/或肉芽肿克雷伯菌。在一些实施例中,该克雷伯菌属是肺炎克雷伯菌、产酸克雷伯菌和/或肉芽肿克雷伯菌。在一些实施例中,该克雷伯菌属是肺炎克雷伯菌。在一些实施例中,该克雷伯菌属(例如,肺炎克雷伯菌)属于O1血清型。

[0200] 在一些实施例中,治疗、预防和/或改善与克雷伯菌属感染相关联的病症的方法包括使感染克雷伯菌属的受试者在体内接触包含O1结合剂(例如,抗O1抗原抗体或其抗原结合片段)的药物组合物。在一些实施例中,包含O1结合剂的药物组合物是在受试者已经暴露于细菌的同时或不久之后给予以预防感染。在一些实施例中,包含O1结合剂的药物组合物是在感染后作为治疗剂给予。

[0201] 在某些实施例中,治疗、预防和/或改善克雷伯菌属感染的方法包括向受试者给予包含O1结合剂(例如,抗O1抗原抗体或其抗原结合片段)的药物组合物。在某些实施例中,该受试者是人。在一些实施例中,包含O1结合剂(例如,抗O1抗原抗体或其抗原结合片段)的药物组合物是在受试者感染克雷伯菌属之前给予的。在一些实施例中,包含O1结合剂(例如,抗O1抗原抗体或其抗原结合片段)的药物组合物是在受试者感染克雷伯菌属之后给予的。

[0202] 在某些实施例中,包含O1结合剂(例如,抗O1抗原抗体或其抗原结合片段)的药物组合物是在呼吸机上给予受试者的。在某些实施例中,受试者具有导管(例如,导尿管或静脉内导管)。在某些实施例中,受试者正在接受抗生素(例如,美罗培南、碳青霉烯、氟喹诺酮、四环素、氯霉素、甲氧苄啶、磺胺、和/或粘菌素)。

[0203] 在某些实施例中,包含O1结合剂(例如,抗O1抗原抗体或其抗原结合片段)的药物组合物用于医院克雷伯菌属感染的治疗或预防。在某些实施例中,包含O1结合剂(例如,抗O1抗原抗体或其抗原结合片段)的药物组合物用于机会性克雷伯菌属感染的治疗或预防。在某些实施例中,包含O1结合剂(例如,抗O1抗原抗体或其抗原结合片段)的药物组合物用于器官移植后的克雷伯菌属感染的治疗或预防。

[0204] 在某些实施例中,包含O1结合剂(例如,抗O1抗原抗体或其抗原结合片段)的药物组合物用于克雷伯菌属感染的治疗或预防,其中该克雷伯菌属是产生超广谱β-内酰胺酶(ESBL)的克雷伯菌属。在某些实施例中,包含O1结合剂(例如,抗O1抗原抗体或其抗原结合片段)的药物组合物用于克雷伯菌属感染的治疗或预防,其中该克雷伯菌属是产生非超广谱β-内酰胺酶(ESBL)的克雷伯菌属。在某些实施例中,包含O1结合剂(例如,抗O1抗原抗体或其抗原结合片段)的药物组合物用于克雷伯菌属感染的治疗或预防,其中该克雷伯菌属是肺炎克雷伯菌碳青霉烯耐药性肠杆菌科(CRE)克雷伯菌属。在某些实施例中,包含O1结合剂(例如,抗O1抗原抗体或其抗原结合片段)的药物组合物用于克雷伯菌属感染的治疗或预防,其中该克雷伯菌属是产生肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶(KPC)的克雷伯菌属。

[0205] 在某些实施例中,包含O1结合剂(例如,抗O1抗原抗体或其抗原结合片段)的药物组合物用于头孢菌素耐药性克雷伯菌属感染的治疗或预防。在某些实施例中,包含O1结合

剂(例如,抗01抗体或其抗原结合片段)的药物组合物用于氨基糖昔耐药性克雷伯菌属感染的治疗或预防。在某些实施例中,包含01结合剂(例如,抗01抗原抗体或其抗原结合片段)的药物组合物用于喹诺酮耐药性克雷伯菌属感染的治疗或预防。在某些实施例中,包含01结合剂(例如,抗01抗原抗体或其抗原结合片段)的药物组合物用于碳青霉烯耐药性克雷伯菌属感染的治疗或预防。在某些实施例中,包含01结合剂(例如,抗01抗原抗体或其抗原结合片段)的药物组合物用于粘菌素耐药性克雷伯菌属感染的治疗或预防。在某些实施例中,包含01结合剂(例如,抗01抗原抗体或其抗原结合片段)的药物组合物用于头孢菌素、氨基糖昔、喹诺酮、氟喹诺酮、四环素、氯霉素、甲氧苄啶、磺胺、碳青霉烯、和粘菌素耐药性克雷伯菌属感染的治疗或预防。在某些实施例中,包含01结合剂(例如,抗01抗原抗体或其抗原结合片段)的药物组合物用于对抗生素易感的克雷伯菌属的感染的治疗或预防。

[0206] 为了治疗、预防和/或改善与克雷伯菌属感染相关联的病症,本文所述的药物组合物、抗体、或抗01结合剂的适当剂量取决于病症的类型,病症的严重程度和历程,病症的反应性,给予药物组合物、抗体、或抗01结合剂是出于治疗目的还是预防目的,之前的治疗,患者的临床病史等等,所有这些都由治疗医师决定。可以将药物组合物、抗体、或抗01结合剂给予一次或进行一系列持续数天至数月的治疗,或直到实现治愈或实现病症的降低。最佳给药方案可以从患者体内药物积累的测量来计算,并且将根据单独抗体或药剂的相对效价而变化。给药医师可以很容易地确定最佳剂量、给药方法和重复率。

[0207] IV. 使用方法

[0208] 本文所述的01结合剂(包括抗01抗原抗体及其抗原结合片段)可用于各种应用,这些应用包括但不限于肺炎、尿路感染、败血症/脓毒病、新生儿败血症/脓毒病、腹泻、软组织感染、器官移植后感染、手术感染、伤口感染、肺部感染、化脓性肝脓肿(PLA)、眼内炎、脑膜炎、坏死性脑膜炎、强直性脊柱炎和脊柱关节病。在一些实施例中,本文所述的01结合剂(包括抗01抗原抗体及其抗原结合片段)可用于医院感染、机会性感染、器官移植后感染以及与克雷伯菌属感染(例如,肺炎克雷伯菌、产酸克雷伯菌、植生克雷伯菌、臭鼻克雷伯菌、鼻硬结克雷伯菌、和/或肉芽肿克雷伯菌感染)相关联的其他病症。在一些实施例中,本文所述的01结合剂(包括抗01抗原抗体及其抗原结合片段)在暴露于克雷伯菌属污染的装置(包括,例如,呼吸机、导管或静脉内导管)的受试者中是有用的。

[0209] 在一些实施例中,本披露提供了治疗、预防和/或改善与克雷伯菌属感染相关联的病症的方法,这些方法包括向受试者给予有效量的01结合剂(例如,抗01抗原抗体或其抗原结合片段)。在一些实施例中,该量有效地抑制受试者中克雷伯菌属的生长。在一些实施例中,该克雷伯菌属是肺炎克雷伯菌、产酸克雷伯菌、植生克雷伯菌、臭鼻克雷伯菌、鼻硬结克雷伯菌、和/或肉芽肿克雷伯菌。在一些实施例中,该克雷伯菌属是肺炎克雷伯菌、产酸克雷伯菌和/或肉芽肿克雷伯菌。在一些实施例中,该克雷伯菌属是肺炎克雷伯菌。在一些实施例中,该克雷伯菌属(例如,肺炎克雷伯菌)属于01血清型。在一些实施例中,受试者已经暴露于克雷伯菌属。在一些实施例中,已经在受试者中检测到克雷伯菌属。在一些实施例中,例如基于症状,受试者疑似感染克雷伯菌属。

[0210] 在一些实施例中,本披露还提供了抑制克雷伯菌属的生长的方法,这些方法包括向受试者给予01结合剂(例如,抗01抗原抗体或其抗原结合片段)。在一些实施例中,该克雷伯菌属是肺炎克雷伯菌、产酸克雷伯菌、植生克雷伯菌、臭鼻克雷伯菌、鼻硬结克雷伯菌、

和/或肉芽肿克雷伯菌。在一些实施例中，该克雷伯菌属是肺炎克雷伯菌、产酸克雷伯菌和/或肉芽肿克雷伯菌。在一些实施例中，该克雷伯菌属是肺炎克雷伯菌。在一些实施例中，该克雷伯菌属(例如，肺炎克雷伯菌)属于O1血清型。在一些实施例中，受试者已经暴露于克雷伯菌属。在一些实施例中，已经在受试者中检测到克雷伯菌属。在一些实施例中，例如基于症状，受试者疑似感染克雷伯菌属。

[0211] 在一些实施例中，治疗、预防和/或改善与克雷伯菌属感染相关联的病症的方法包括使感染了克雷伯菌属的受试者在体内接触O1结合剂(例如，抗O1抗原抗体或其抗原结合片段)。在某些实施例中，使细胞与O1结合剂接触在动物模型中进行。例如，O1结合剂可以给予鼠类克雷伯菌属感染模型以减少细菌负荷。在一些实施例中，O1结合剂(例如，抗O1抗原抗体或其抗原结合片段)在将细菌引入动物之前给予以预防感染。在一些实施例中，O1结合剂(例如，抗O1抗原抗体或其抗原结合片段)在动物已经暴露于细菌的同时或不久之后给予以预防感染。在一些实施例中，O1结合剂(例如，抗O1抗原抗体或其抗原结合片段)在感染之后作为治疗剂给予。在一些实施例中，治疗、预防和/或改善与克雷伯菌属感染相关联的病症的方法包括使感染了克雷伯菌属的受试者在体内接触O1结合剂(例如，抗O1抗原抗体或其抗原结合片段)，其中该分离的抗原结合蛋白(包括，例如，抗O1抗原抗体或其抗原结合片段)不是抗体克隆Ru-01(参见Rukavina T., 等人, Infect Immun[感染与免疫]65:1754-60(1997))。

[0212] 在某些实施例中，治疗、预防和/或改善克雷伯菌属感染的方法包括向受试者给予有效量的O1结合剂(例如，抗O1抗原抗体或其抗原结合片段)。在某些实施例中，该受试者是人。在一些实施例中，有效量的O1结合剂(例如，抗O1抗原抗体或其抗原结合片段)是在受试者感染克雷伯菌属之前给予的。在一些实施例中，有效量的O1结合剂(例如，抗O1抗原抗体或其抗原结合片段)是在受试者感染克雷伯菌属之后给予的。

[0213] 在某些实施例中，受试者正带有呼吸机。在某些实施例中，受试者具有导管(例如，导尿管或静脉内导管)。在某些实施例中，受试者正在接受抗生素(例如，美罗培南、碳青霉烯、或粘菌素)。

[0214] 在某些实施例中，克雷伯菌属感染是医院感染。在某些实施例中，克雷伯菌属感染是机会性感染。在某些实施例中，克雷伯菌属感染是在器官移植之后。

[0215] 在某些实施例中，克雷伯菌属是产生超广谱β-内酰胺酶(ESBL)的克雷伯菌属。在某些实施例中，克雷伯菌属是产生非-ESBL的克雷伯菌属。在某些实施例中，克雷伯菌属是产生肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶(KPC)的克雷伯菌属。在某些实施例中，克雷伯菌属是肺炎克雷伯菌碳青霉烯耐药性肠杆菌科(CRE)克雷伯菌属。

[0216] 在某些实施例中，克雷伯菌属对头孢菌素具有耐药性。在某些实施例中，克雷伯菌属对氨基糖苷具有耐药性。在某些实施例中，克雷伯菌属对喹诺酮具有耐药性。在某些实施例中，克雷伯菌属对碳青霉烯具有耐药性。在某些实施例中，克雷伯菌属对头孢菌素、氨基糖苷、喹诺酮和碳青霉烯具有耐药性。在某些实施例中，克雷伯菌属对头孢菌素、氨基糖苷、和喹诺酮具有耐药性。在某些实施例中，克雷伯菌属是对抗生素易感的。

[0217] 在某些实施例中，治疗、预防和/或改善克雷伯菌属感染的方法包括向受试者给予有效量的O1结合剂(例如，抗O1抗原抗体或其抗原结合片段)以及抗生素。O1结合剂(例如，抗O1抗原抗体或其抗原结合片段)和抗生素可以同时或顺序给予。O1结合剂(例如，抗O1抗

原抗体或其抗原结合片段)和抗生素可以在同一药物组合物中给予。01结合剂(例如,抗01抗原抗体或其抗原结合片段)和抗生素可以在分开的药物组合物中同时或顺序给予。在某些实施例中,抗生素是适于治疗克雷伯菌属感染的抗生素。在某些实施例中,抗生素是美罗培南。在某些实施例中,抗生素是碳青霉烯或粘菌素。在某些实施例中,抗生素是头孢菌素、氨基糖苷、喹诺酮、氟喹诺酮、四环素、氯霉素、甲氧苄啶、磺胺、碳青霉烯、和/或粘菌素。

[0218] 本披露还提供了检测01脂多糖或含有01抗原的克雷伯菌属的方法。在一些实施例中,检测01或含有01抗原的克雷伯菌属的方法包括使样品与本文提供的01结合剂(例如,抗01抗原抗体或其抗原结合片段)接触,并测定结合剂(例如,抗体或其抗原结合片段)与样品的结合。评估结合的方法在本领域是熟知的。在一些实施例中,该方法包括检测01脂多糖或含有01抗原的克雷伯菌属。在一些实施例中,检测01或含有01的克雷伯菌属的方法包括使样品与本文提供的01结合剂(例如,抗01抗原抗体或其抗原结合片段)接触,并测定结合剂(例如,抗体或其抗原结合片段)与样品的结合。

[0219] V. 试剂盒

[0220] 还提供了一种包含根据本披露的任何方面或实施例的分离的抗原结合蛋白(例如抗01抗原抗体或其抗原结合片段)的试剂盒,作为本披露的方面。在试剂盒中,抗原结合蛋白、抗体、或其抗原结合片段可加标记以便允许确定其在样品中的反应性,例如,如以下进一步描述。试剂盒的组分通常为无菌的并且处于密封小瓶或其他容器中。试剂盒可用于诊断分析或抗体适用的其他方法中。试剂盒可含有在方法(例如根据本披露的方法)中使用组分的说明书。帮助或实现执行这种方法的辅助材料可包括于本披露的试剂盒中。

[0221] 样品中抗体或其抗原结合片段的反应性可以通过任何适当的手段来测定。放射免疫测定(RIA)为一个可能。将放射性标记的抗原与未标记的抗原(测试样品)混合并且允许结合至抗体。将结合的抗原与未结合的抗原在物理上分离并且确定结合至抗体的放射性抗原的量。测试样品中的抗原越多,结合至抗体的放射性抗原越少。竞争性结合测定还可用于非放射性的抗原,使用连接至报道分子的抗原或类似物。报道分子可为具有光谱分离吸收或发射特性的荧光色素、磷光体或激光染料。合适的荧光色素包括荧光素、罗丹明、藻红蛋白和德克萨斯红。合适的发色染料包括二氨基联苯胺。

[0222] 其他报道物包括大分子胶状颗粒或颗粒材料,例如有色、磁性或顺磁性的乳胶珠粒,以及可直接或间接地导致在视觉上观察、以电子方式检测或以其他方式记录可检测信号的生物学或化学活性剂。这些分子可以是催化反应的酶,这些反应使颜色显现或改变或引起例如电性质变化。其可为分子可激发的,这样使得能量状态之间的电子跃迁产生特有光谱吸收或发射。其可包括结合生物传感器使用的化学实体。可使用生物素/抗生物素蛋白或生物素/链霉亲和素以及碱性磷酸酶检测系统。

[0223] 单独抗体-报道物缀合物所产生的信号可用于得出样品(正常和测试)中的相关抗体结合的可定量的绝对或相对数据。

[0224] 本披露还提供了在竞争测定中如上所述的抗原结合蛋白用于测量抗原水平的用途,该用途包括在竞争测定中通过使用由本披露提供的抗原结合蛋白测量样品中01抗原或含有01抗原的克雷伯菌属的水平的方法。在一些实施例中,不需要结合的与未结合的抗原的物理分离。在一些实施例中,将报道分子与抗原结合蛋白连接以使得在结合时发生物理或光学变化。报道分子可以直接或间接产生可检测的,且优选可测量的信号。在一些实施例

中,报道分子的连接是直接或间接的、或共价的,例如通过肽键或非共价相互作用。经由肽键的连接可以作为编码抗体和报道分子的基因融合物的重组表达的结果。

[0225] 本披露还提供了采用根据本披露的抗原结合蛋白(例如,抗O1抗原抗体或其抗原结合片段)直接测量O1抗原水平的方法。在一些实施例中,这些方法利用生物传感器系统。在一些实施例中,这些方法包括采用根据本披露的抗原结合蛋白(例如,抗O1抗原抗体或其抗原结合片段)检测O1抗原。

[0226] VI. 多核苷酸和宿主细胞

[0227] 在另外的方面,本披露提供了一种分离的核酸,该分离的核酸包含编码根据本披露的抗原结合蛋白(例如抗O1抗原抗体或其抗原结合片段)、VH结构域和/或VL结构域的核酸序列。在一些方面,本披露提供了制造或制备本文所述的抗原结合蛋白(例如抗O1抗原抗体或其抗原结合片段)、VH结构域和/或VL结构域的方法,这些方法包括在导致产生所述抗原结合蛋白、VH结构域和/或VL结构域的条件下表达所述核酸,并且任选地回收该抗原结合蛋白、VH结构域和/或VL结构域。

[0228] 由本披露提供的核酸包括DNA和/或RNA。在一个方面,该核酸是cDNA。在一个方面,本披露提供了一种编码如上所述的CDR或CDR组或VH结构域或VL结构域或抗体抗原结合位点或抗体(例如,scFv、IgG1、或IgG2)的核酸(参见,例如,表1-4)。

[0229] 本披露的一个方面提供了编码本文所述的VH CDR或VL CDR序列的核酸,该核酸通常为分离的,任选地为cDNA。在一些实施例中,VH CDR选自SEQ ID NO:1-3、14-16、和23-25。在一些实施例中,VL CDR选自SEQ ID NO:4-7、10、11、17-20、和26-29。还提供了编码KPE33、KPE33V2016、KPA27、KPB202、KBJ4、或54H7的HCDR组的核酸,和编码KPE33、KPE33V2016、KPA27、KPB202、KBJ4、或54H7的LCDR组的核酸,正如如表1和表2所述的编码单独的CDR、HCDR、LCDR以及CDR组、HCDR组、LCDR组的核酸一样。在一些实施例中,本披露的核酸编码如表3和表4中所述的KPE33、KPE33V2016、KPA27、KPB202、KBJ4、或54H7的VH和/或VL结构域。

[0230] 本发明还提供了包含选自下表5和表6中所示的那些的序列的多核苷酸。

[0231] 表5:可变重链多核苷酸序列。

抗体	VH多核苷酸序列 (SEQ ID NO)
KPA27	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAACC TGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGAAAACAC CTTCAACGACTTCTATATGCACTGGGTGCCACAGGCCCCCTGG ACAAGGGCTTGAGTGGATGGATGGATCCACCCCTGACGGTG TTGTCACAAACTATGCACAGAAATTCAAGGGCAGGGTCACTA TGACCAGGGACACGTCCATCAACACAGTCTACATGGAATTGA

[0233]

	ACGGCCTGATCTCTGACGACACGGCCGTATTACTGTATGA GAGACGGGCCAGGATCAGAAGGTTCTGGTTGACTATTGGG GCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCAG (SEQ ID NO: 49)
KPB202	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTCCAGCC TGGGGGGTCCCTGAGCCTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTAC CTTAGTAACCTTGTTGGCTGGGCTGGGCCAGGCTCCAGG GAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCCAATATAAACCCAGATGGAA GTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCAGTCACC ATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTCTGCAAATG AACAGCCTGAGAGTCGAGGACGCGGCTGTGACTACTGTGC GAGACTAGGGCCCTCATCCTGACTGCTGGGGCCAGGGAA CCCTGGTCACCGTCTCCTCAG (SEQ ID NO: 51)
KPJ4	CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAGGCC CTCGCAGACCCCTCTCACTCACCTGTGCCATCTCCGGGGACAG TGTCTCTAGCAACACTGCTGCTTGGAACTGGATCAGGCAGTC CCCATCGAGAGGCCCTGAGTGGCTGGGAAGGACATATTACA GGTCCGAGTGGTATAATGATTATGCAGTATCTGTGAAAAGTC GAATAACCACATCAACCCAGACACATCCAAGAACCAAGCTCTCC TGCAGTTGAACCTGTGACTCCCAGGGACACGGCTGTGTATT ACTGTGCAAGAATTCTGGAACGACCTCCCAGCTGGGGCC AGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCAG (SEQ ID NO: 53)
KPE33	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGGCCTGGTACAGCC TGGCGGGTCCCTGAGACTCTCGTGTGCAGTTCTGGATTAT CTTGATGATTATGCCATCCACTGGTCCCGCGAGCTCCAGG GAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGCATTGCTTGGAAAGAGTG GTGCCACAAACTATCGGACTCTGTGAAGGGCCCTCGCCA TCTCTAGAGACAACTCCAAGAAATCTATGTATCTACAAATGA ACAGTCTGGAACTGAAGACACGGCCTGTATTACTGTACAA GACGACGGCGTCTGGGATGATACTTTTATTACTTGACT ATTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 55)
KPE33V2016	GAGGTGCAGCTGGTCGAATCCGGCGGGGACTGGTGAGCC TGGCCGCTCACTGAGACTGAGCTGCGCCGCTCCGGTTCAT CTTGACGATTACGCTATGCACTGGTGCAGGCACCTGG CAAGGGACTGGAGTGGGTCTCTGGATCGCCTGGAAAAGTG GAGCAACCAACTACGCCACTCAGTGAAGGGAGATTGCC ATTAGCCGGATAACTCTAAGAAAAGTATGTATCTGCAGATG AATTCCCTGGGAACCGAAGACACAGCCCTGACTATTGTACA CGGAGAAGGGCTCTGGCGACGATACTTCTACTATTTGAT TATTGGGGACAGGGCACTCTGGTACCGTCAGCTCC (SEQ ID NO: 57)
KPE33-H32+ L2016 (E1Q)	CAGGTGCAGCTCGTGGAGTCCGGCGGTGGCCTGGTTAGC GGCCGCTCTCTTAGACTGAGTTGCAGCCACTGGTTAGACA AGCAGACTATGCGATCCACTGGTTAGACAAGCACCAGGA AAGGGACTTGAATGGGTTCTGGGATTGCGTATAAATCAGGG GCCACGAACTACGCTGAGAGCGTTAAGGGCGATTACTATA AGCAGGGATCAGTCCAAAAACTCACTGTACTTGCAAGATGAA

[0234]

	CTCACTCAGAGCCGAGGCACCGCGTTGTACTACTGCACACG AAGGAGGGCATCAGGAGATAATACTTATTACTTCGACTA CTGGGGCCAAGGCACGTTGGTAACGGTGAGTTCT (SEQ ID NO: 64)
KPE33-H33+ L2016 (E1Q)	CAGGTGCAGCTCGTGGAGTCCGGCGGTGGCCTGGTTCAGCCT GGCCGCTCTCTTAGACTGAGTTGCGCCGCTAGCGTTTATTT TCGACGACTATGCGATCCACTGGGTTAGACAAGCACCAGGA AAGGGACTTGAATGGGTTCTGGGATTGCGTATAAAATCAGGG GCCACGAACTACGCTGAGAGCGTTAAGGGCGATTACTATA AGCAGGGATCAGTCCAAAAGTCACTGTACTTGCAGATGAA CTCACTCAGAGCCGAGGCACCGCGTTGTACTACTGCACACG AAGGAGGGCATCAGGAGATAATACTTATTACTTCGACTA CTGGGGCCAAGGCACGTTGGTAACGGTGAGTTCT (SEQ ID NO: 65)

[0235] 表6:可变轻链多核苷酸序列。

[0236]

抗体	VL多核苷酸序列 (SEQ ID NO)
KPA27	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTCCACCTGTCTGCATCT GTAGGAGACAGAGTCACCACACTTGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAG AGCCCCCTACACTCCTGATCTACAAGGCGTCTACTTACAAAG TGGGGTCCCATTAAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAG AGTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGATGATTTG CAAATTAACTGCCAACAGTCTCAGACCTCGGCCAAGGGAA CCAAGGTGGAAATCAAAC (SEQ ID NO: 50)
KPB202	GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCGTACCC TTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAAAGCC TCGTACACAGTGATGGAAACACCTACTTGAATTGGTTTCAGC AGAGGCCAGGCCAATCTCAAGGCGCTAATTATGAGGTT CTAACCGGGACTCTGGGTCCCAGACAGATTCAAGCGGCAGT GGGTCAAGGCAGTATTCAACTGAAAATCAGCAGGGTGG GGCTGAGGATATTGGGTTTATTACTGCATGCAAGGAACACA CTGGCCGTGGACGTTGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCA AAC (SEQ ID NO: 52)
KPJ4	GACATCGTGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTCT CTGGCGAGAGGGCCACTATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAG TATTTATACAGCTCCCACAATAAGAACTACTTAGCTTGGTA CCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGGTGCTCATTACTG GGCGTCTACCCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATTCAAGTGG CAGCGGGTCTGGGACAGATTCACTCTCACCATCAGCAACCT GCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTATTACTGTCAGCAGTATTG TAATATCCGTACACTTTGCCAGGGACCAAGCTGGAGAT CAAAC (SEQ ID NO: 54)
KPE33	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCCTGTCTTGTCTC CAGGAGAAAGAGCCACCCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAAT GTTAACCAACTAGCCTGGTACCAGCAGCGACCTGGACAG

	TCTCCCAGACTCCTCATTTATGATGCATCCACCAGGGCCGCT GGCCTCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGA CTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTC AGTCTACTATTGTCAGCAGTGTACCAACTGGCGGTACACTT TGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAA (SEQ ID NO: 56)	
KPE33V2016	GAGATCGTGCTGACACAGTCCCCAGCCACTCTGTCTTGAGT CCCGGGAAACGGGCAACTCTGTCTGCAGAGCCAGTCAGAA CGTCAATACCAACCTGGCTTGCTTACAGCAGAAGGCCGGAC AGGCACCTCGACTGCTGATCTATGACGCCAGCAATAGGGCTA CAGGCATTCCAGCACGCTCTCAGGATCTGGATCTGGAACCG ACTTACTCTGACCATCAGCTCCCTGGAGGCCGAAGATTTCG CCGTGTACTATTGTCAGCAGACCAAAACTGGAGATACACCT TTGGCCAGGGACAAAGCTGGAGATCAA (SEQ ID NO: 58)	
[0237]	KPE33-H32+ L2016 (E1Q)	CAGATTGTGTTGACGCAGAGTCCCGCGACACTTAGCCTCT CCCGGAGAGAGAGCGACGCTTAGTTGCCGAGCATCCCAGAA CGTCAACACTAATCTCGCGTGGTATCAGCAGAAGGCCGGCCA AGCCCCCAGGCTGTTGATTACGACGCTAGTAACCGCGCCAC AGGAATCCCGGCAAGATTAGTGGGTCAAGGATCAGGAACCTG ACTTACCTTGACGATAAGTAGTCTGGAACCAAGAAGATTTCG CCGTATATTACTGTCAACAGACAACAAACTGGCGCTACACCT TCGGCCAAGGAACAAACTTGAGATCAA (SEQ ID NO: 66)
	KPE33-H33+ L2016 (E1Q)	CAGATTGTGTTGACGCAGAGTCCCGCGACACTTAGCCTCT CCCGGAGAGAGAGCGACGCTTAGTTGCCGAGCATCCCAGAA CGTCAACACTAATCTCGCGTGGTATCAGCAGAAGGCCGGCCA AGCCCCCAGGCTGTTGATTACGACGCTAGTAACCGCGCCAC AGGAATCCCGGCAAGATTAGTGGGTCAAGGATCAGGAACCTG ACTTACCTTGACGATAAGTAGTCTGGAACCAAGAAGATTTCG CCGTATATTACTGTCAACAGACAACAAACTGGCGCTACACCT TCGGCCAAGGAACAAACTTGAGATCAA (SEQ ID NO: 67)

[0238] 还提供了一种多核苷酸，该多核苷酸与表5或表6中提供的SEQ ID NO中的任一个具有至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、或至少约99%的序列同一性。因此，在某些实施例中，该多核苷酸包括(a)与表5中提供的SEQ ID NO中的任一个具有至少约95%的序列同一性的多核苷酸，和/或(b)与表6中提供的SEQ ID NO中的任一个具有至少约95%的序列同一性的多核苷酸。在某些实施例中，该多核苷酸包括：(a)具有表5中提供的SEQ ID NO的序列的多核苷酸；和/或(b)具有表6中提供的SEQ ID NO的序列的多核苷酸。

[0239] 本披露提供了足以用作杂交探针、PCR引物或测序引物的分离的多核苷酸或cDNA分子，其是本文披露的核酸分子的片段或其互补物。该核酸分子可以例如可操作地连接至控制序列。

[0240] 本披露还提供了呈包含如上所述的至少一种多核苷酸的质粒、载体、转录盒或表达盒形式的构建体(参见，例如，表5和表6)。

[0241] 本披露还提供了包含一种或多种核酸、质粒、载体或如上所述物的重组宿主细胞(参见，例如，表5和表6)。编码任何CDR或CDR组或VH结构域或VL结构域或抗体抗原结合位点、抗体(例如，如所提供的scFv、IgG1、或IgG2)(参见，例如，表1-4)的核酸自身形成了本披露的方面，产生所编码产物的方法也是一方面，该方法包括从编码该产物(例如本文披露的抗原结合蛋白，包括例如抗O1抗原抗体或其抗原结合片段)的核酸进行表达。表达可以便利地通过在适当的条件下培养包含本文所述的核酸的重组宿主细胞来实现。在通过表达产生

之后,可以使用任何适合的技术分离和/或纯化CDR、CDR组、VH或VL结构域、抗原结合蛋白。

[0242] 在一些情况下,宿主细胞是哺乳动物宿主细胞,如HEK293细胞、HeLa细胞、NS0鼠类骨髓瘤细胞、PER.C6®人类细胞或中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。

[0243] 抗原结合蛋白、VH和/或VL结构域和编码核酸分子和载体可以例如从它们的天然环境中分离和/或纯化,以大致上纯的或均质的形式,或在核酸的情况下,不含或大致上不含除编码具有所需功能的多肽的序列以外的核酸或基因来源。根据本披露的核酸可以包含DNA或RNA并且可以是全部或部分合成的。提及如本文阐明的核苷酸序列涵盖具有指定序列的DNA分子,并且涵盖具有指定序列的RNA分子(其中U取代T),除非上下文另外要求。

[0244] 在各种不同的宿主细胞中克隆并且表达多肽的系统是众所周知的。合适的宿主细胞包括细菌、哺乳动物细胞、植物细胞、酵母和杆状病毒系统以及转基因植物和动物。可在本领域中用于表达异源多肽的哺乳动物细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、HeLa细胞、幼仓鼠肾细胞、NS0小鼠黑素瘤细胞、YB2/0大鼠骨髓瘤细胞、人胚胎肾细胞、人胚胎视网膜细胞和许多其他细胞。常见的细菌宿主为大肠杆菌。

[0245] 在原核细胞例如大肠杆菌中表达抗体和抗体片段在本领域为沿用已久的。关于综述,参见例如Plückthun, A. Bio/Technology [生物/技术] 9: 545-551 (1991)。在培养物中的真核细胞中的表达也可由本领域技术人员用作产生抗原结合蛋白的选择方案,例如Chadd HE和Chamow SM (2001) 110 Current Opinion in Biotechnology [生物技术新见] 12: 188-194, Andersen DC和Krummen L (2002) Current Opinion in Biotechnology [生物技术新见] 13: 117, Lerrick JW和Thomas DW (2001) Current opinion in Biotechnology [生物技术新见] 12: 411-418。

[0246] 可以选择或构建含有适当调节序列的合适载体,这些调节序列包括启动子序列、终止子序列、多聚腺苷酸化序列、增强子序列、标记基因以及视情况而定的其他序列。载体可以是质粒、病毒,例如噬菌体或噬菌粒,视情况而定。关于进一步的细节,参见,例如, Molecular Cloning:a Laboratory Manual [分子克隆:实验室手册]:第3版, Sambrook 和 Russell, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press [冷泉港实验室出版社]。许多已知的用于操作核酸的技术和方案(例如在制备核酸构建体、诱变、测序、将DNA引入到细胞中和基因表达以及蛋白质分析中的)详细描述于Current Protocols in Molecular Biology [分子生物学实验指南], 第二版, Ausubel等人编, John Wiley&Sons [约翰威利父子出版公司], 1988; Short Protocols in Molecular Biology:A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology [精编分子生物学实验指南:分子生物学实验指南的方法概要], Ausubel等人编, John Wiley&Sons [约翰威利父子出版公司], 第4版 1999 中。 Sambrook等人和Ausubel等人(二者)的披露均通过引用并入本文。

[0247] 因此本披露的另一个方面提供了含有如本文披露的核酸的宿主细胞。例如,本披露提供了一种用核酸转化的宿主细胞,该核酸包含核苷酸序列(参见,例如,表5和6),该核苷酸序列编码本披露的抗原结合蛋白,或本披露的抗原结合蛋白的抗体CDR、CDR组、或VH和/或VL结构域(参见,例如,表1-4)。在一些实施例中,宿主细胞包含本披露的所表达的抗原结合蛋白,或本披露的抗原结合蛋白的抗体CDR、CDR组、或VH和/或VL结构域(参见,例如,表1-4)。

[0248] 这种宿主细胞可以是在体外并且可在培养物中。这种宿主细胞可以是分离的宿主

细胞。这种宿主细胞可以是在体内。

[0249] 本文提供的又另一个方面是包括将这种核酸引入宿主细胞中的方法。引入可使用任何可获得的技术。对于真核细胞,合适的技术可包括磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖、电穿孔、使用逆转录病毒或其他病毒例如牛痘或(对于昆虫细胞)杆状病毒的脂质体介导的转染和转导。将核酸引入宿主细胞(尤其是真核细胞)中可使用病毒或基于质粒的系统。质粒系统可保持游离或可并入宿主细胞或人工染色体中。并入可通过将一个或多个副本随机或靶向整合至单一或多个基因座来完成。对于细菌细胞,合适的技术可包括氯化钙转化、电穿孔和使用噬菌体来转染。

[0250] 在引入之后可例如通过在表达基因的条件下培养宿主细胞来导致或允许从核酸表达。

[0251] 在一个实施例中,将本披露的核酸整合至宿主细胞的基因组(例如染色体组)中。整合可根据标准技术通过将促进与基因组重组的序列包含在内来促成。

[0252] 本披露还提供了一种方法,该方法包括在表达系统中使用构建体(例如如上所述的质粒、载体等)以表达如上所述的抗原结合蛋白或多肽。

[0253] 在另一方面,本披露提供了一种产生本披露的抗原结合蛋白(例如抗O1抗原抗体或其抗原结合片段)的杂交瘤。

[0254] 本披露的又另一个方面提供了一种产生本披露的抗体结合蛋白(例如抗O1抗原抗体或其抗原结合片段)的方法,该方法包括从编码核酸引起表达。这种方法可以包括在适于产生所述抗原结合蛋白的条件下培养宿主细胞。

[0255] 在一些实施例中,该产生方法还包括分离和/或纯化由宿主细胞或杂交瘤产生的抗原结合蛋白(包括抗O1抗原抗体或其抗原结合片段)。

[0256] 实例

[0257] 材料与方法

[0258] 除非另行指出,所有肺炎克雷伯菌分离株购自美国典型培养物保藏中心(America Type Culture Collection)、国际健康管理协会(IHMA)、或Eurofin保藏中心,并且将培养物在37°C下维持在2xYT培养基中,适当时补充抗生素。

[0259] 所有统计学分析均是在GraphPadPrism 6版中进行。为了比较细菌负荷,通过非配对t检验将抗O1抗原抗体处理的动物与人类同种型对照抗体处理的动物进行比较。存活结果绘制为卡普兰-迈耶(Kaplan-Meier)曲线,并以对数秩(Mental-Cox)检验进行分析。

[0260] 实例1:选择具有对抗肺炎克雷伯菌LPS-01的高抗体滴度的PBMC和扁桃体供体

[0261] 从来自健康血液供体(N=567)的血沉棕黄层中分离外周血单核细胞(PBMC)和血清。PMBC储存于液氮中,而血浆储存于4°C。为了鉴定肺炎克雷伯菌免疫供体,测试所有可用的血清与Kp43816和Kp4211(LPS-01血清型)的结合,以及与未包封的突变菌株Kp43816 Δ cpsB和双突变体Kp43816 Δ cpsB Δ waaL的结合。双突变体Kp43816 Δ cpsB Δ waaL在其表面不表达LPS 0抗原。此外,使用高通量血清杀菌测定(SBA测定)来测试所有可用的血清在补体存在下的杀菌活性。将发光的肺炎克雷伯菌菌株4211(lux)的过夜培养物在Mueller Hinton II培养基中稀释,使OD600为0.003。将等体积的血清、4211lux和幼兔血清(Cedarlane公司)在384孔板中混合,并在37°C下在振荡(250rpm)下孵育两小时。然后使用Envision多标记酶标仪(珀金埃尔默公司(Perkin Elmer))测量相对光单位(RLU)。通过比

较来自无抗体的测定的RLU与获得自人血清的RLU,确定杀伤百分比。

[0262] PBMC供体根据其结合滴度以及他们的SBA和OPK活性进行分级。OPK测定如以下所描述、加以修改来执行 (Wang,Q. 等人, Target-Agnostic Identification of Functional Monoclonal Antibodies Against Klebsiella pneumoniae Multimeric MrkA Fimbrial Subunit [对抗肺炎克雷伯氏菌多聚体MrkA菌毛亚基的功能性单克隆抗体的靶标不可知性鉴定] J Infect Dis [感染性疾病杂志]. 2016年6月1日; 213(11) :1800-8)。简而言之, 将发光的肺炎克雷伯菌荚膜突变株43816 Δ cpsB(43816 Δ cpsB Lux) 的对数期培养物稀释至约 2×10^6 个细胞/ml。将细菌、提供补体的稀释的幼兔血清(Cedarlane公司, 预吸收Kp43816 Δ cpsB, 1:10)、二甲基甲酰胺(DMF)、分化的HL-60细胞和血清在384孔板中混合, 并在37°C在振荡下(250 rpm) 孵育两小时。然后使用Envision多标记酶标仪(珀金埃尔默公司(PerkinElmer)) 测量相对光单位(RLU)。通过比较来自无抗体的测定的RLU与获得自人血清的RLU, 确定杀伤百分比。

[0263] 对于扁桃体和腺样体供体选择, 如Pinna,D. 等人, European Journal of Immunology [欧洲免疫学杂志] 39:1260-1270 (2009) 中所述对扁桃体单核细胞进行多克隆刺激。含有多克隆抗体混合物的上清液用于通过酶联免疫吸附测定(ELISA) 确定结合至不同的细菌菌株库或结合至纯化的细菌抗原(例如LPS或其他多糖、细菌蛋白)的抗体的存在。如实例2所描述, 选择具有针对肺炎克雷伯菌的强多克隆抗体滴度的扁桃体用于抗体产生。

[0264] 实例2: 鉴定单克隆KPA27、KPB202、KPE33、和KPJ4

[0265] 使用CD19微珠从冷冻保存的PMBC中分离记忆B细胞, 然后通过细胞分选消除携带 IgM、IgD 和 IgA 的细胞。将记忆B细胞永生化, 如Traggiai,E. 等人, Nature Medicine [自然医学] 10:871-875 (2004) 中所描述的。

[0266] 从两种不同免疫供体#487和#262的外周血中分离出KPA27和KPE33。它们在初步筛选中显示与LPS-01血清型的肺炎克雷伯菌结合并介导菌株Kp4211 (LPS-01) 的补体依赖性杀伤(SBA)。从免疫供体中分离出KPA27和KPE33作为IgG2抗体。

[0267] 从两个不同供体T6 (KPB202) 和T8 (KPJ4) 的扁桃体B细胞中分离出KPB202和KPJ4。它们在初步筛选中显示与LPS-01血清型的肺炎克雷伯菌结合并介导菌株Kp4211 (LPS-01) 的补体依赖性杀伤(SBA)。分别从供体中分离出KPB202和KPJ4作为IgG1和IgG2抗体。

[0268] 实例3: 肺炎克雷伯菌01抗原特异性杂交瘤的分离

[0269] 肺炎克雷伯菌分离株购自美国典型培养物保藏中心或Eurofin保藏中心。用肺炎克雷伯菌43816DM经由腹膜内(ip) 途径, 每周对Balb/c小鼠进行免疫, 持续四周, 随后用野生型肺炎克雷伯菌临床分离株的混合物进行最终加强。在免疫结束时, 收获淋巴结和脾B细胞并与P3X骨髓瘤融合。然后通过全细菌ELISA, 将来自所得杂交瘤的上清液针对与43816DM的结合进行筛选。将阳性杂交瘤在不含抗生素的培养基中进行传代培养, 并且使上清液进行SBA和OPK测定, 以针对对抗肺炎克雷伯菌的潜在保护性杂交瘤进行选择。一种阳性杂交瘤产生54H7抗体。

[0270] 实例4: 抗01抗原抗体表征

[0271] 测试分离的抗体与整个细菌的结合、调理吞噬杀伤(OPK)、补体依赖性杀伤(SBA)、LPS中和以及与纯化的01 LPS的结合。分离的抗01抗原抗体的特征总结在表7中。

[0272] OPK测定如以下所描述、加以修改来执行 (Wang,Q. 等人, J. Infect. Dis [感染性疾病杂志]. 2016年6月1日; 213(11) :1800-8)。简而言之, 将发光的肺炎克雷伯菌荚膜突变株43816 Δ cpsB(43816 Δ cpsB Lux) 的对数期培养物稀释至约 2×10^6 个细胞/ml。将细菌、提供补体的稀释的幼兔血清(Cedarlane公司, 预吸收Kp43816 Δ cpsB, 1:10)、二甲基甲酰胺(DMF)、分化的HL-60细胞和血清在384孔板中混合, 并在37°C在振荡下(250 rpm) 孵育两小时。然后使用Envision多标记酶标仪(珀金埃尔默公司(PerkinElmer)) 测量相对光单位(RLU)。通过比较来自无抗体的测定的RLU与获得自人血清的RLU, 确定杀伤百分比。

病杂志].213:1800-8(2016)).简而言之,将发光的肺炎克雷伯菌荚膜突变株43816 Δ cpsB (43816 Δ cpsB Lux)的对数期培养物稀释至约 2×10^6 个细胞/ml。将细菌、提供补体的稀释的幼兔血清(Cedarlane公司,预吸收Kp43816 Δ cpsB,1:10)、二甲基甲酰胺(DMF)、分化的HL-60细胞和抗体在384孔板中混合,并在37℃在振荡下(250rpm)孵育两小时。然后使用Envision多标记酶标仪(珀金埃尔默公司(Perkin Elmer))测量相对光单位(RLU)。通过比较来自无抗体的测定的RLU与从抗肺炎克雷伯菌mAb和阴性对照mAb获得的RLU,确定杀伤百分比。结果显示于图1C中。54H7、KPB202、KPA27、KPE33、和KPJ4抗体诱导OPK杀伤。

[0273] 通过高通量血清杀菌测定(SBA)测量肺炎克雷伯菌菌株Kp4211lux对血清和抗体依赖性杀伤的敏感性。将发光的肺炎克雷伯菌菌株4211(lux)的过夜培养物在Mueller Hinton II培养基中稀释,使OD600为0.003。将等体积的抗体、4211lux和幼兔血清(Cedarlane)在384孔板中混合,并在37℃下在振荡(250rpm)下孵育两小时。然后使用Envision多标记酶标仪(珀金埃尔默公司(Perkin Elmer))测量相对光单位(RLU)。通过比较来自无抗体的测定的RLU与从抗肺炎克雷伯菌mAb和阴性对照mAb获得的RLU,确定杀伤百分比。结果显示于图1B中。如通过血清杀菌测定(SBA)所示,54H7、KPB202、KPA27、KPE33和KPJ4抗体均经由补体依赖性杀伤而杀死肺炎克雷伯菌。

[0274] 通过利用携带受NF-κB响应性启动子控制的萤火虫荧光素酶报道基因的鼠类RAW264.7巨噬细胞细胞系(RAW264.7-lux)来测定LPS中和。以1:1比率将连续稀释的抗体储液与LPS混合并且在4℃下孵育1小时。然后将抗体/LPS混合物以1:10稀释到含有预先接种的RAW264.7-lux细胞(5e3个细胞/孔)的测定板中,然后将这些板在37℃/5%CO₂下放置2.5小时。孵育后,向每个孔中添加Steady Glo(普洛麦格公司(Promega))并且再避光孵育20分钟。然后使用Envision多标记酶标仪(珀金埃尔默公司(Perkin Elmer))测量相对光单位(RLU)。通过比较来自无抗体的测定的RLU与从抗肺炎克雷伯菌mAb和阴性对照mAb获得的RLU,确定抑制百分比。通过细菌LPS激活TLR4受体导致NF-κB转录调节子的下游活化。NF-κB响应性荧光素酶活性的诱导的减少用于定量LPS mAb的LPS中和活性。结果总结于表7中。54H7和KPB202抗体中和LPS,但KPA27、KPE33、和KPJ4抗体不中和LPS。

[0275] 通过标准ELISA方法测定与纯化的O1 LPS的结合。简而言之,将ELISA板(Nunc MaxiSorp公司)用在PBS(pH 7.2)中的纯化的O1 LPS进行涂布,在4℃过夜,然后用补充有1%BSA的PBS(PBS-B)封闭这些板。将经过涂布的板与单克隆抗体的连续稀释物一起在室温下孵育1小时。然后将这些板用含有0.1%Tween-20的PBS(PBS-T)进行洗涤,之后添加HRP缀合的抗人二级抗体持续1小时,随后添加TMB TMB(3,3',5,5'-四甲基联苯胺)底物。通过酶标仪(Molecular Devices(分子装置公司))测量450nm的吸光度,并且用Prism软件绘制数据。结果显示于图1A中。54H7、KPB202、KPA27、KPE33、和KPJ4抗体与纯化的O1 LPS结合。

[0276] 表7:抗O1抗原抗体的汇总

类别	mAb	原始同种型	LPS 中和 (O1) IC ₅₀ (ng/mL)	SBA Kp4211lux IC ₅₀ (ng/mL)	D 莫膜 OPK IC ₅₀ (ng/mL)
[0277]	I 类	54H7	Ms IgG3	< 0.1	5.2
		KPB202	Hu rIgG1	38	0.6
[0277]	II 类	KPE33	Hu rIgG2	-	64
		KPJ4	Hu rIgG2	-	110
		KPA27	Hu rIgG2	-	1625
					670

[0278] 实例5:抗01抗原抗体减少克雷伯菌属器官负荷

[0279] 在细菌感染模型中测试了抗01抗原抗体减少器官负荷的能力。在这些实验中,接收来自杰克逊(Jackson)实验室的C57BL/6小鼠并保存在无特殊病原体的设施中。所有动物实验均按照IACUC方案和指南进行。使肺炎克雷伯氏菌菌株在琼脂板上生长过夜,并在适当浓度下稀释于盐水中。在激发之前和之后,通过将细菌的连续稀释物铺板于琼脂板上来测定接种物滴度。

[0280] 在细菌感染前24小时给予15mg/kg的抗体和对照。用在40μl盐水中的1e4CFU Kp8045(01:K1)细菌鼻内接种C57BL/6小鼠以诱导肺炎。通过将肺匀浆铺板于琼脂板上以测定感染后48小时的CFU来测量肺细菌负荷。结果显示于图2中。KPE33显著减少了器官负荷,并且其他抗01抗原抗体也在肺炎克雷伯菌感染后48小时减少器官负荷约2-3log。

[0281] 实例6:抗01抗原抗体保护免于致命性细菌激发

[0282] 还评估了抗01抗原抗体保护免于致命性细菌激发的能力。

[0283] 在急性肺炎模型中,用1e4至1e8CFU的多重耐药性肺炎克雷伯菌碳青霉烯耐药性(CRE)临床分离株KP1131115(01)鼻内接种C57BL/6小鼠。在细菌激发后一小时给予0.2、1、和5mg/kg的抗肺炎克雷伯菌单克隆抗体KPE33以及5mg/kg的人类IgG1对照抗体(治疗性给药)。每天监测小鼠的存活率,直到第8天。结果显示于图3A中。

[0284] 另外,在急性肺炎模型中,用1e4至1e8CFU的多重耐药性肺炎克雷伯菌碳青霉烯耐药性(CRE)临床分离株KP1131115(01)鼻内接种C57BL/6小鼠。在细菌激发后一小时给予0.2和1mg/kg的抗肺炎克雷伯菌单克隆抗体KPE33-H32+L2016(EQ1)和KPE33-H32+L2016(EQ1)以及5mg/kg的人类IgG1对照抗体(治疗性给药)。每天监测小鼠的存活率,直到第8天。结果显示于图3C中。

[0285] 这些结果表明,在细菌激发后治疗性给予的KPE33、KPE33-H32+L2016(EQ1)和KPE33-H32+L2016(EQ1)保护小鼠免受致命性细菌激发与耐药性肺炎克雷伯菌菌株KPC KP1131115的感染。

[0286] 在菌血症模型中,用1e8CFU超广谱β内酰胺酶(ESBL)临床分离株Kp8561(01)腹膜内接种C57BL/6小鼠。在细菌激发后一小时给予1.5、5、和15mg/kg的抗肺炎克雷伯菌单克隆抗体KPE33以及45mg/kg的人类IgG1对照抗体(治疗性给药)。每天监测小鼠的存活率,直到第8天。结果显示于图3B中。

[0287] 结果表明,在细菌激发后治疗性给予的KPE33保护小鼠免受超广谱β-内酰胺酶(ESBL)菌株Kp8561的感染。

[0288] 实例7:抗01抗原抗体KPE33和抗生素的协同作用

[0289] 还在肺炎和菌血症小鼠模型中评估了抗O1抗原抗体和抗生素的协同作用。

[0290] 在肺炎实验中,用 $1e4$ 至 $1e8$ CFU的Kp8045克雷伯菌鼻内接种C57BL/6小鼠。(参见图4A。)在菌血症实验中,用Kp8561克雷伯菌接种小鼠。(参见图4B。)在细菌激发后给予亚治疗剂量的抗体(Kp8045为 1mpk ,Kp8561为 2.5mpk)和美罗培南抗生素(Kp8045为 2.5mpk ,Kp8561为 5mpk)。每天监测小鼠的存活率,直到第8天。

[0291] 结果显示在图4中,并且表明美罗培南和KPE33的组合显示出显著的协同作用,并且比美罗培南或KPE33的单一疗法、或人类IgG1对照抗体(R347)和美罗培南的组合显示出更好的保护作用。

[0292] 实例8:KPE33序列优化

[0293] 为了减少对于抗体开发的潜在序列倾向性(liability)(包括由于抗药物抗体引起的潜在免疫原性),KPE33的轻链CDR3中的未配对半胱氨酸被苏氨酸(T)替换,并且KPE33的框架1、2和4中的体细胞突变被种系残基替换(如图5所概括的)。除了上述C107T取代外,CDR保持为野生型。将优化的KPE33命名为KPE33v2016。为了确认序列优化没有改变与LPS O1的相互作用,通过Octet平台在溶液相中对KPE33和KPE33v2016与O1 LPS的结合进行测试。此平台提供以生物学上更有意义的设定测量生物分子复合体形成速率和复合体稳定性的有力工具。简而言之,在浸入含有在Kinetics缓冲液(ForteBio,用PBS稀释10X至1X)中的 $0.2\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗O1 LPS mAb的溶液中之前,用 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ O1 LPS涂布蛋白A涂布的传感器10分钟。与生物传感器结合的分子数量的变化导致实时记录的干涉图案的偏移。如图5所示,mAb与O1 LPS结合。KPE33和KPE33v2016与O1LPS的亲和常数(K_d)基于来自Octet传感图的结合速率(on-rate)和解离速率(off-rate)来计算。KPE33和KPE33v2016两者显示出相当的亲和常数,分别平均为 $5.83E-09$ 和 $4.13E-09$ (图5)。

[0294] 进一步优化KPE33v2016,从而产生两种新变体KPE33H32+L2016(1EQ)和KPE33H33+L2016(1EQ)。这两种变体都含有邻近CDRH1的甲硫氨酸至异亮氨酸突变、CDRH2中的色氨酸至酪氨酸突变、邻近CDRH2的天冬氨酸至谷氨酸突变、FRH3中的天冬酰胺至谷氨酰胺突变和甲硫氨酸至亮氨酸突变、以及CDRH3中的天冬氨酸至天冬酰胺突变。此外,KPE33H32+L2016(1EQ)具有四个FRH3残基变为种系残基,而KPE33H33+L2016(1EQ)仅有相同FRH3残基中的三个变为种系残基。这两种变体都含有与KPE33v2016相同的轻链,但在残基1中具有单个谷氨酸至谷氨酰胺突变。通过Octet测量KPE33H32+L2016(1EQ)和KPE33H33+L2016(1EQ)的亲和力,并分别给出 $4.46E-09$ 和 $5.01E-09$ 的值。

[0295] 为了确认序列优化不抑制KPE33抗体的功效,在实例6中描述的相同致命性肺炎模型中测定优化的KPE33V2016抗体。在肺炎克雷伯菌碳青霉烯耐药性菌株进行细菌感染后1小时,以 $6\text{mg}/\text{kg}$ 的剂量给予KPE33或KPE33-V-2016。图6所示的结果表明与人类IgG1对照抗体相比,KPE33和KPE33V2016均显示出类似的保护水平。IgG2形式的KPE33显示出比KPE33-IgG1略低的活性(参见图6)。

[0296] 实例9:抗O1抗原抗体保护共感染模型

[0297] 为了评估抗O1抗原抗体在共感染中的功效,将雌性7-8周龄的C57BL/6小鼠在3%异氟烷中简单麻醉,并将 $50\mu\text{l}$ 的细菌悬浮液置于鼻孔上。用单独的 $5e7$ CFU金黄色葡萄球菌SF8300(USA300)或与 $1.5e2$ CFU肺炎克雷伯菌的组合接种动物,并且监测长达7天进行存活研究。对于器官负荷研究,如上文实例5中所述,在激发后24或48小时收集肺和脾脏。对于保

护研究,在致命性细菌激发之前,用KPE33或对照mAb对小鼠进行被动免疫(0.5mL, ip)。在Prism中绘制所有数据。

[0298] 结果显示在图7A-7D中。金黄色葡萄球菌和肺炎克雷伯菌的亚致命性接种物的共感染引起致命性肺炎(图7A),并且与仅感染肺炎克雷伯菌的小鼠相比,共感染肺炎克雷伯菌和金黄色葡萄球菌的小鼠的肺(图7B)和脾(图7C)中的肺炎克雷伯菌细菌负荷显著增加。在共感染前24小时用KPE33单次预防性治疗挽救了小鼠(图7D)。

[0299] 实例10:抗O1抗原抗体在LPS激发之后减少血清细胞因子

[0300] 为了确定LPS激发后抗O1抗原抗体对血清细胞因子的影响,在给予抗O1后24小时,将C57BL/6小鼠用0.3mg/kg LPS进行腹膜内激发。3小时后,处死动物,并根据制造商的说明使用Meso Scale Discovery (MSD) 促炎细胞因子试剂盒测量血清细胞因子。将多粘菌素B (PMB) 用作阳性对照。在Prism中绘制血清IL-6、TNF- α 、和CXCL1浓度。

[0301] 结果显示在图8中,并表明在用Kp43816LPS和Kp15380LPS进行LPS激发后,54H7降低血清IL-6、KC和TNF- α 水平。

[0302] 实例11:抗O1抗原抗体保护内毒素血症模型中的小鼠

[0303] 为了确定抗O1抗原抗体的保护作用,将6-8周龄的雌性小鼠(Balb/c)用D-半乳糖(D-Gal, 12mg/kg)致敏,然后在给予抗O1抗原抗体后24小时,用10-50ng的LPS进行腹膜内(ip)激发。以0.2mg/kg、1mg/kg、或5mg/kg的剂量给予抗体。在LPS激发后监测小鼠存活率长达6天。

[0304] 结果显示在图9中,并表明与对照IgG抗体(R347)相比,当以1mg/kg或5mg/kg的剂量给予时,54H7保护内毒素血症LPS诱导的败血症模型中的小鼠。

[0305] 实例12:抗O1抗原抗体5H47减少克雷伯菌属器官负荷并且与抗生素具有协同作用

[0306] 在细菌感染模型中测试了抗O1抗原抗体5H47减少器官负荷的能力。

[0307] 为了确定抗O1抗原抗体与抗生素组合的功效,在急性肺炎模型中测试了54H7。用1e4CFU的高毒力菌株Kp43816(01)鼻内接种C57BL/6小鼠。在细菌激发前24小时给予15mg/kg的抗肺炎克雷伯菌单克隆抗体54H7以及15mg/kg的人类IgG1对照抗体(预防性给药)。每天监测小鼠的存活率,直到第14天。结果显示于图10A中。

[0308] 还在肺炎小鼠模型中评估了抗O1抗原抗体和抗生素的协同作用。用1e4至1e8CFU的Kp8045克雷伯菌鼻内接种C57BL/6小鼠。分别在细菌激发后1小时或4小时,给予亚治疗剂量的抗体(1mpk)和美罗培南抗生素(1.5mpk)。每天监测小鼠的存活率,直到第8天。结果显示于图10B中。

[0309] 在针对Kp43816肺炎模型的单一疗法中,15mpk的54H7显示出显著的保护作用。当使用亚治疗剂量的54H7和美罗培南时,该组合显示出显著的协同作用,并且比单独的美罗培南或54H7的单一疗法、或人类IgG1对照抗体(R347)和美罗培南的组合显示出更好的保护作用。

[0310] 实例13:表位研究

[0311] 肺炎克雷伯菌wbbYZ基因座编码LPS结构中的D-半乳聚糖II结构域,该结构域定义O1血清型而不定义O2血清型(Hsieh, PF. 等人, Front Microbiol [微生物学前沿]. 5:608 (2014))。为了研究本文披露的抗O1抗原抗体是否结合D-半乳聚糖II结构域,通过遗传敲除wbbYZ基因座来将O1菌株Kp1131115转化为O2血清型。通过FACS分析来测试肺炎克雷伯菌O1

LPS抗体与Kp1131115野生型(WT菌株)和Kp1131115 Δ wbbYZ菌株的结合。将人类IgG1和抗MrkA抗体分别用作阴性对照和阳性对照。WbbYZ基因敲除完全废止了54H7和KPE33的结合。然而,敲除该基因并未改变与MrkA抗体的结合。图11所示的这些数据表明KPE33和54H7都与肺炎克雷伯菌O1 LPS抗原的D-半乳聚糖II结构域结合。(图12显示了O1 LPS的结构)

[0312] 尽管KPE33和54H7都与O1 LPS的D-半乳聚糖II结构域结合,但是它们不与如使用在KPE33和54H7的竞争性结合研究中预装有纯化的O1 LPS的捕获探针的ForteBio Octet所测量的相同表位结合。简而言之,在用10 μ g/mL KPE33进行初始结合后,将探针与含有10 μ g/mL KPE33和相同浓度的54H7、KPE33、或对照抗体R347的抗体混合物一起孵育。结果显示于图13中。只有54H7能够显示出另外的结合,这表明KPE33和54H7占据O1 LPS上的不同表位。

[0313] 实例14:抗O1抗原抗体结合临幊上相关的克雷伯菌属

[0314] 为了确定抗O1抗原抗体是否结合临幊上相关的克雷伯菌属菌株,通过蛋白质印迹测定来确定KPE33与临幊分离株的结合。KPE33所结合的临幊上相关的克雷伯菌属菌株的汇总显示于表8中。KPE33与所有这些菌株结合的能力以及其在体内对抗四种不同菌株的能力表明KPE33能够杀死许多临幊相关的克雷伯菌属菌株。

[0315] 表8:KPE33所结合的临床克雷伯菌属菌株的汇总。

	区域	国家	IHMA 编号	体内 位置	设施 名称	分子 汇总
1	欧洲	葡萄牙	845904	呼吸道: 痰	医学ICU	SHV-71(b); TEM-1(b); KPC-3;
2	欧洲	葡萄牙	845927	INT: 伤口	急诊室	SHV-1(b); TEM-1(b); KPC-2;
3	欧洲	希腊	848845	呼吸道: 气管 内抽吸物	普通非特指 ICU	SHV-36(u); TEM-1(b); KPC-3;
4	中东	以色列	849626	INT: 伤口	普通内科	SHV-11(b); TEM-1(b); KPC-3;
5	欧洲	罗马尼 亚	850438	INT: 伤口	普通外科	SHV-12(e); KPC-2;
6	南太 平洋	菲律宾	850705	呼吸道: 气管 内抽吸物	儿科ICU	SHV-11(b); TEM-1(b); CTX-M-2; KPC-2; OXA-163(e)

[0316]

[0317]	7	南太平洋	菲律宾	850793	SSI: 脓肿腔	其他	SHV-1(b); CTX-M-15; IMP-4;
	8	欧洲	罗马尼 亚	869921	呼吸道: 气管 内抽吸物	普通非特指 ICU	SHV-11(b); TEM-1(b); KPC-2;
	9	欧洲	葡萄牙	909704	呼吸道: 痰	其他	SHV-11(b); TEM-1(b); KPC-2;
	10	欧洲	比利时	918171	INT: 伤口	普通外科	SHV-12(e); TEM-1(b); KPC-2;
	11	欧洲	土耳其	926874	呼吸道: 气管 内抽吸物	普通非特指 ICU	SHV-11(b); KPC-2;
	12	欧洲	葡萄牙	938176	呼吸道: 痰	普通内科	SHV-11(b); KPC-2;
	13	欧洲	葡萄牙	938188	呼吸道: 痰	普通内科	SHV-OSBL(u); TEM-OSBL(u); KPC-3;
	14	南太平 洋	菲律宾	966515	INT: 烧伤	外科ICU	SHV-1(b); CMY-4; KPC-2;
	15	拉丁 美洲	智利	969741	INT: 伤口	普通内科	SHV-12(e); TEM-OSBL(u); CTX-M-2;
	16	欧洲	俄罗斯	976029	呼吸道: 支气 管肺泡灌洗	外科ICU	SHV-1(b); ACT- 新变体; KPC-2;
	17	欧洲	俄罗斯	1049366	呼吸道: 其他	外科ICU	
	18	拉丁 美洲	委内瑞 拉	1073570	呼吸道: 气管 内抽吸物	未给出	SHV-1(b); TEM-1(b); KPC-3;
	19	欧洲	西班牙	1073967	CVS: 血液	普通内科	SHV-1(b); TEM-1(b); CTX-M-2; KPC-3;
	20	亚洲	泰国	1082632	INT: 伤口	普通外科	KPC-2;
	21	北美	美国	1103979	INT: 皮肤溃 疡	普通内科	
	22	欧洲	希腊	1104762	INT: 痛	普通内科	
	23	欧洲	比利时	1130776	呼吸道: 气管 内抽吸物	外科ICU	SHV-1(b); CTX-M-15;
	24	拉丁 美洲	智利	1131115	CVS: 血液	普通内科	SHV-1(b); CTX-M-15;

						IMP-4;
25	中东	科威特	1143489	INT: 伤口	医学ICU	
26	拉丁美洲	智利	1145452	呼吸道: 气管内抽吸物	医学ICU	SHV-11(b); TEM-1(b); KPC-3;
27	亚洲	中国	974761	呼吸道: 痰	普通外科	SHV-OSBL(u); TEM-OSBL(u); CTX-M-3; KPC-2;
28	欧洲	俄罗斯	976050	呼吸道: 气管内抽吸物	外科ICU	SHV-OSBL(u); CTX-M-15; OXA-48(c)
29	欧洲	俄罗斯	1049364	呼吸道: 其他	外科ICU	
30	欧洲	葡萄牙	909699	GU: 尿	普通外科	SHV-1(b); CTX-M-15; KPC-3;
31	拉丁美洲	委内瑞拉	955418	GU: 尿	普通内科	SHV-5(e); TEM-OSBL(u); KPC-2;
32	欧洲	葡萄牙	955770	GU: 尿	急诊室	SHV-OSBL(u); TEM-OSBL(u); CTX-M-15; KPC-3;
33	欧洲	葡萄牙	955859	GU: 尿	普通内科	SHV-OSBL(u); TEM-OSBL(u); CTX-M-15; KPC-3;
34	欧洲	葡萄牙	955932	GU: 尿	普通内科	SHV-OSBL(u); TEM-OSBL(u); CTX-M-15; KPC-3;
35	欧洲	波兰	971428	GU: 尿	普通儿科	SHV-OSBL(u); TEM-OSBL(u); CTX-M-15;
36	非洲	尼日利亚	1043234	GU: 尿	普通内科	CTX-M-15; NDM-1;
37	拉丁美洲	墨西哥	846238	呼吸道: 支气管肺泡灌洗	医学ICU	SHV-12(e); CTX-M-15;
38	拉丁美洲	墨西哥	846241	呼吸道: 气管内抽吸物	医学ICU	SHV-12(e); TEM-1(b); CTX-M-2;
39	拉丁	墨西哥	846246	呼吸道: 支气	外科ICU	SHV-12(e);

[0318]

	美洲			管肺泡灌洗		TEM-1(b); CTX-M-2;
40	拉丁美洲	智利	847196	呼吸道：气管内抽吸物	医学ICU	SHV-1(b); TEM-1(b); CTX-M-15;
41	拉丁美洲	智利	847201	呼吸道：气管内抽吸物	医学ICU	SHV-11(b); TEM-1(b); CTX-M-15;
42	拉丁美洲	智利	847208	呼吸道：气管内抽吸物	医学ICU	SHV-12(e); TEM-1(b); CTX-M-15;
43	非洲	南非	849824	呼吸道：痰	普通非特指ICU	SHV-11(b); CTX-M-15;
44	非洲	南非	862530	呼吸道：痰	普通内科	CTX-M-14; DHA-1;
45	欧洲	土耳其	868768	INT：伤口	普通外科	SHV-133(u); VEB-1;
46	欧洲	俄罗斯	870306	呼吸道：支气管肺泡灌洗	普通非特指ICU	SHV-1(b); CTX-M-15; OXA-48(c)
47	亚洲	中国	871359	呼吸道：痰	普通内科	SHV-11(b); TEM-1(b); CTX-M-15;
48	亚洲	泰国	872556	呼吸道：痰	普通内科	SHV-11(b); TEM-1(b); CTX-M-15;
49	欧洲	俄罗斯	874875	呼吸道：痰	普通内科	SHV-1(b); TEM-1(b); CTX-M-28;
50	欧洲	俄罗斯	874880	呼吸道：支气管肺泡灌洗	普通外科	SHV-1(b); TEM-1(b); CTX-M-15;
51	欧洲	俄罗斯	874898	呼吸道：支气管肺泡灌洗	普通外科	SHV-11(b); TEM-1(b); CTX-M-15;
52	欧洲	俄罗斯	874904	呼吸道：痰	普通内科	SHV-1(b); TEM-1(b); CTX-M-15; GES-1(e);
53	欧洲	俄罗斯	874909	呼吸道：支气管肺泡灌洗	普通内科	SHV-5(e);
54	欧洲	俄罗斯	874926	呼吸道：痰	医学ICU	SHV-1(b);

[0319]

[0320]

						TEM-1(b); CTX-M-15;
55	欧洲	比利时	875638	呼吸道：气管 内抽吸物	普通非特指 ICU	SHV-11(b); TEM-1(b); CTX-M-15;
56	亚洲	台湾	883550	GU：尿	普通内科	SHV-1(b); TEM-1(b); CTX-M-15;
57	欧洲	法国	887009	呼吸道：气管 内抽吸物	外科ICU	SHV-136(u); TEM-1(b); CTX-M-15;
58	亚洲	泰国	894614	呼吸道：痰	普通内科	SHV-OSBL(u); TEM-OSBL(u); CTX-M-15;
59	拉丁 美洲	巴西	900684	体液：胸腔穿 刺术	普通内科	SHV-12(e); TEM-OSBL(u); CTX-M-15;
60	亚洲	中国	908116	呼吸道：痰	医学ICU	SHV-5(e); TEM-OSBL(u); CTX-M-15;
61	拉丁 美洲	智利	924298	呼吸道：气管 内抽吸物	外科ICU	SHV-OSBL(u); CTX-M-15;
62	亚洲	泰国	926437	呼吸道：痰	医学ICU	SHV-OSBL(u); CTX-M-15;
63	欧洲	罗马尼 亚	938765	呼吸道：其他	未给出	SHV-12(e);
64	欧洲	罗马尼 亚	938936	INT：伤口	医学ICU	SHV-OSBL(u); CTX-M-55;
65	中东	以色列	948159	呼吸道：气管 内抽吸物	普通内科	SHV-OSBL(u); TEM-OSBL(u); CTX-M-15;
66	亚洲	台湾	949403	呼吸道：其他	医学ICU	SHV-12(e);
67	欧洲	罗马尼 亚	949893	INT：伤口	普通外科	SHV-OSBL(u); TEM-OSBL(u); CTX-M-15; DHA-1;
68	欧洲	土耳其	954350	呼吸道：痰	普通儿科	SHV-OSBL(u); TEM-OSBL(u); CTX-M-15;
69	拉丁 美洲	哥伦比亚	960340	INT：伤口	普通外科	SHV-OSBL(u); TEM-OSBL(u); CTX-M-15;

[0321]

70	南太平洋	菲律宾	966520	体液：腹膜	普通儿科	SHV-OSBL(u); TEM-OSBL(u); CTX-M-15;
71	拉丁美洲	智利	969674	GI: 脓肿	普通内科	SHV-OSBL(u); CTX-M-15;
72	拉丁美洲	智利	969680	INT: 伤口	普通内科	SHV-12(e); TEM-OSBL(u);
73	欧洲	俄罗斯	975239	呼吸道：支气管肺泡灌洗	儿科ICU	SHV-OSBL(u); TEM-OSBL(u); CTX-M-15;
74	欧洲	俄罗斯	976668	呼吸道：气管内抽吸物	普通内科	SHV-12(e); TEM-OSBL(u); CTX-M-15;
75	北美	美国	978961	呼吸道：痰	普通内科	SHV-OSBL(u); TEM-OSBL(u); CTX-M-15;
76	中东	科威特	984033	INT: 伤口	普通内科	SHV-12(e); TEM-OSBL(u); CTX-M-15;
77	拉丁美洲	委内瑞拉	984345	呼吸道：支气管刷检	医学ICU	SHV-12(e); TEM-OSBL(u);
78	拉丁美洲	委内瑞拉	984346	呼吸道：气管内抽吸物	外科ICU	SHV-12(e);
79	拉丁美洲	委内瑞拉	984347	呼吸道：气管内抽吸物	外科ICU	SHV-12(e); TEM-OSBL(u); CTX-M-15;
80	亚洲	韩国	984707	呼吸道：痰	普通内科	SHV-OSBL(u); TEM-OSBL(u); CTX-M-15;
81	亚洲	韩国	990767	呼吸道：痰	普通内科	SHV-OSBL(u); TEM-OSBL(u); CTX-M-15; CTX-M-2;
82	亚洲	马来西亚	993434	体液：胸腔穿刺术	医学ICU	SHV-OSBL(u); TEM-OSBL(u); CTX-M-15;
83	亚洲	马来西亚	993460	体液：胸腔穿刺术	其他	SHV-OSBL(u); TEM-OSBL(u); CTX-M-15;
84	中东	以色列	1007652	INT: 伤口	普通内科	SHV-OSBL(u); TEM-OSBL(u); CTX-M-15;

	85	欧洲	匈牙利	1031145	体液：腹膜	普通外科	SHV-OSBL(u); TEM-OSBL(u); CTX-M-15;
[0322]	86	欧洲	俄罗斯	1049624	呼吸道：痰	普通内科	SHV-OSBL(u); TEM-OSBL(u); CTX-M-15;
	87	欧洲	俄罗斯	1049665	呼吸道：痰	医学ICU	
	88	欧洲	俄罗斯	1049679	呼吸道：支气管肺泡灌洗	医学ICU	
	89	欧洲	俄罗斯	1049688	体液：腹膜	普通外科	
	90	拉丁美洲	墨西哥	1079939	呼吸道：气管内抽吸物	医学ICU	
	91	亚洲	泰国	1082628	呼吸道：痰	普通内科	
	92	亚洲	韩国	1085607	呼吸道：痰	外科ICU	
	93	非洲	南非	1088174	呼吸道：痰	普通内科	
	94	北美	美国	1095761	呼吸道：痰	外科ICU	
	95	中东	以色列	1096595	呼吸道：痰	普通内科	
	96	中东	以色列	1096648	CVS：血液	普通非特指ICU	
	97	拉丁美洲	墨西哥	1113727	呼吸道：气管内抽吸物	外科ICU	
	98	拉丁美洲	墨西哥	1113731	呼吸道：气管内抽吸物	外科ICU	
	99	拉丁美洲	墨西哥	1113737	呼吸道：气管内抽吸物	外科ICU	
	100	拉丁美洲	墨西哥	1113750	呼吸道：气管内抽吸物	外科ICU	SHV-40(e); TEM-1(b); CMY-新变体;
	101	南太平洋	菲律宾	1114048	呼吸道：气管内抽吸物	医学ICU	
	102	中东	科威特	1143577	CVS：血液	普通内科	SHV-36(u);
	103	北美	美国	872009	呼吸道：气管内抽吸物	普通儿科	SHV-12(e);
	104	亚洲	泰国	872220	INT：伤口	急诊室	
	105	北美	美国	873434	呼吸道：支气管肺泡灌洗	外科ICU	
	106	北美	美国	873455	呼吸道：气管内抽吸物	普通内科	SHV-1(b); TEM-1(b); CTX-M-15;
	107	欧洲	法国	887005	GI：脓肿	外科ICU	SHV-OSBL(u); TEM-OSBL(u); CTX-M-15;

	108	北美	美国	890537	呼吸道：气管内抽吸物	外科ICU	SHV-OSBL(u); CTX-M-2; CTX-M-14;
[0323]	109	欧洲	葡萄牙	908689	INT: 伤口	外科ICU	SHV-OSBL(u); CTX-M-15;
	110	拉丁美洲	阿根廷	919794	呼吸道：支气管肺泡灌洗	医学ICU	SHV-OSBL(u); TEM-OSBL(u); CTX-M-15;
	111	拉丁美洲	智利	924355	呼吸道：支气管肺泡灌洗	普通内科	SHV-OSBL(u); TEM-OSBL(u); CTX-M-15;
	112	亚洲	泰国	926453	呼吸道：气管内抽吸物	儿科ICU	SHV-OSBL(u); TEM-OSBL(u); CTX-M-15;
	113	拉丁美洲	墨西哥	927462	呼吸道：支气管肺泡灌洗	儿科ICU	
	114	欧洲	比利时	937121	呼吸道：痰	普通内科	SHV-OSBL(u); TEM-OSBL(u); CTX-M-15;
	115	拉丁美洲	阿根廷	939906	呼吸道：支气管肺泡灌洗	普通非特指ICU	SHV-OSBL(u); TEM-OSBL(u); CTX-M-15;
	116	欧洲	葡萄牙	942859	GI: 腹肿	普通外科	SHV-OSBL(u); TEM-OSBL(u); CTX-M-15;
	117	中东	以色列	948291	呼吸道：痰	医学ICU	SHV-OSBL(u); TEM-OSBL(u); CTX-M-15;
	118	拉丁美洲	墨西哥	950081	INT: 伤口	普通外科	SHV-12(e);
	119	拉丁美洲	墨西哥	950101	呼吸道：支气管肺泡灌洗	医学ICU	SHV-OSBL(u); TEM-OSBL(u); CTX-M-15;
	120	拉丁美洲	墨西哥	950105	呼吸道：支气管肺泡灌洗	医学ICU	SHV-OSBL(u); TEM-OSBL(u); CTX-M-15;
	121	南太平洋	菲律宾	957908	呼吸道：气管内抽吸物	普通内科	SHV-OSBL(u); TEM-OSBL(u); CTX-M-15;
	122	欧洲	俄罗斯	975836	呼吸道：气管内抽吸物	外科ICU	SHV-OSBL(u); CTX-M-15;
	123	亚洲	马来西	993590	呼吸道：其他	其他	SHV-OSBL(u);

		亚				TEM-OSBL(u); CTX-M-15;
124	中东	以色列	1007672	呼吸道：气管 内抽吸物	普通内科	
125	中东	以色列	1007676	INT：伤口	普通外科	
126	欧洲	俄罗斯	1049686	呼吸道：支气 管肺泡灌洗	医学ICU	
127	拉丁 美洲	墨西哥	1079940	呼吸道：支气 管肺泡灌洗	普通内科	
128	非洲	南非	1088168	呼吸道：气管 内抽吸物	普通内科	
129	欧洲	匈牙利	1090209	呼吸道：气管 内抽吸物	医学ICU	
130	非洲	南非	1093651	呼吸道：气管 内抽吸物	医学ICU	
131	欧洲	丹麦	1095278	呼吸道：气管 内抽吸物	医学ICU	
132	欧洲	匈牙利	1132571	CVS：血液	医学ICU	TEM-1(b); CTX-M-15;
133	中东	科威特	1143575	CVS：血液	普通内科	SHV-28(e); TEM-1(b); CTX-M-15;
134	非洲	肯尼亚	1147336	CVS：血液	普通内科	SHV-11(b); TEM-1(b); DHA-1;
135	中东	以色列	849171	GU：尿	普通内科	
136	中东	以色列	849174	GU：尿	普通内科	
137	南太 平洋	菲律宾	850711	呼吸道：痰	普通内科	
138	亚洲	韩国	857365	体液：腹膜	普通外科	
139	亚洲	台湾	862242	呼吸道：支气 管刷检	普通内科	
140	北美	美国	890179	INT：伤口	普通外科	
141	亚洲	台湾	894287	体液：腹膜	急诊室	
142	拉丁 美洲	委内瑞 拉	929964	GU：尿	普通儿科	
143	中东	以色列	937430	呼吸道：支气 管肺泡灌洗	普通内科	
144	欧洲	捷克共 和国	939344	GU：尿	普通外科	
145	北美	美国	942007	GU：肾	普通内科	
146	欧洲	葡萄牙	942735	GU：尿	普通内科	

[0324]

[0325]

147	拉丁美洲	墨西哥	951252	INT: 伤口	普通外科	
148	欧洲	英国	958478	INT: 伤口	普通外科	
149	拉丁美洲	哥伦比亚	961137	呼吸道: 气管内抽吸物	医学ICU	
150	拉丁美洲	墨西哥	979902	INT: 皮肤溃疡	普通内科	
151	北美	美国	981359	GU: 尿	急诊室	
152	亚洲	韩国	984668	GU: 膀胱	普通内科	
153	中东	以色列	994032	呼吸道: 支气管肺泡灌洗	普通内科	
154	中东	科威特	1018958	INT: 伤口	其他	
155	欧洲	德国	1030847	呼吸道: 气管内抽吸物	普通外科	
156	欧洲	匈牙利	1030963	呼吸道: 支气管刷检	普通内科	
157	亚洲	日本	1039316	呼吸道: 痰	急诊室	
158	亚洲	日本	1039317	呼吸道: 气管内抽吸物	普通非特指ICU	
159	北美	美国	1072283	GI: 胆囊	外科ICU	
160	北美	美国	1073359	呼吸道: 支气管刷检	普通内科	
161	拉丁美洲	委内瑞拉	1073794	CVS: 血液	急诊室	
162	拉丁美洲	墨西哥	1079921	呼吸道: 痰	医学ICU	
163	拉丁美洲	委内瑞拉	1090548	呼吸道: 痰	普通内科	
164	北美	美国	1094431	INT: 烧伤	普通非特指ICU	
165	欧洲	捷克共和国	1097501	呼吸道: 气管内抽吸物	医学ICU	
166	欧洲	法国	1099046	CVS: 血液	外科ICU	
167	非洲	南非	1105282	呼吸道: 气管内抽吸物	外科ICU	
168	北美	美国	1105532	呼吸道: 气管内抽吸物	普通内科	
169	北美	美国	952902	呼吸道: 支气管肺泡灌洗	儿科ICU	
170	北美	美国	952974	呼吸道: 痰	普通非特指ICU	
171	北美	美国	956266	呼吸道: 痰	医学ICU	

[0326]	172	欧洲	法国	1042419	GU: 尿	普通内科	
	173	南太平洋	澳大利亚	1050137	呼吸道: 痰	医学ICU	
	174	北美	美国	1072281	GI: 胆囊	普通外科	
	175	亚洲	台湾	1124198	呼吸道: 痰	普通内科	
	176	非洲	肯尼亚	1106405	GU: 尿	普通内科	
	177	南太平洋	菲律宾	845560	INT: 伤口	急诊室	
	178	南太平洋	菲律宾	845617	GI: 腹肿	普通内科	
	179	欧洲	葡萄牙	848048	INT: 伤口	普通内科	
	180	欧洲	葡萄牙	848059	呼吸道: 支气管刷检	儿科ICU	SHV-OSBL(u); CTX-M-14;
	181	欧洲	葡萄牙	848060	呼吸道: 支气管刷检	外科ICU	
	182	欧洲	西班牙	850152	INT: 伤口	急诊室	
	183	欧洲	英国	867646	呼吸道: 气管内抽吸物	医学ICU	
	184	中东	以色列	869313	GI: 腹肿	医学ICU	SHV-OSBL(u);

[0327] 表8的第1-36行中的分离株为肺炎克雷伯菌碳青霉烯耐药性(CRE)菌株。表8的第37-134行中的分离株为超广谱β内酰胺酶(ESBL)菌株，并且表8的第135-184行中的分离株为抗生素易感性菌株。

[0328] 这些结果证明，KPE33，一种抗O1抗原抗体，不仅结合大的且多样的临床菌株组，而且还结合耐抗生素的临幊上相关的菌株。这些结果表明，KPE33可用作针对表8中披露的克雷伯菌属菌株中的一种或多种的、如本文所述的治疗剂和/或诊断剂。

[0329] 实例15：γδT细胞募集和IL-17信号传导与抗O1抗体保护相关

[0330] TLR4信号传导涉及γδT细胞的募集和活化，这些细胞是粘膜的先天免疫防御中的关键细胞群。为了检查LPS中和性以及LPS非中和性抗O1抗体对γδT细胞募集的影响，在用抗O1抗体处理并用肺炎克雷伯菌(1e4CFU Kp8045)感染的小鼠的肺中测量γδTCR⁺T细胞的百分比。流式细胞术分析显示，通过用54H7进行预防(而不用KPE33进行预防)来抑制早期γδT细胞募集(图14A)。感染后1小时用54H7或KPE33处理小鼠不抑制γδT细胞的募集，这表明早期LPS信号传导的中和阻止了这些有益细胞的募集(图14B)。

[0331] γδT细胞是IL-17的主要产生者，IL-17激活关键的抗微生物途径和嗜中性粒细胞的吞噬功能。利用IL-17A^{-/-}小鼠来证明该途径对由KPE33提供的保护作用的贡献。将野生型和IL-17A^{-/-}小鼠用c-IgG、54H7、或KPE33进行预防性处理，并用致命数量的肺炎克雷伯菌感染。在用c-IgG或54H7进行预防性免疫的野生型和IL-17A^{-/-}小鼠之间没有观察到存活率的差异(图14C)。相反，与接受KPE33的野生型小鼠相比，在用KPE33被动免疫的IL-17A^{-/-}小鼠中观察到存活率的显著降低(图14D)。这些结果表明，IL-17信号传导(γδT细胞的主要特征)是KPE33提供的最佳保护所必需的。

[0332] ***

[0333] 具体实施例的以上描述将充分地揭示本披露的总体性质，使得在不脱离本披露的

一般概念的情况下,其他人可以无需过多的实验通过应用本领域的技术内的知识,容易地针对此类具体实施例的各种应用进行修改和/或改编。因此,基于本文提出的传授内容和指导,此类改编和修改旨在处于所披露的实施例的含义和等效范围内。应当理解本文的短语或术语是出于描述而非限制的目的,这样使得本说明书的术语或短语可根据这些传授内容和指导为技术人员所理解。

[0334] 本披露的宽度和范围应当不限于以上描述的示例性实施例中的任一个,而应当仅根据以下权利要求书和它们的等效物来限定。

[0335] 在本申请中引用的所有出版物、专利、专利申请、和/或其他文献出于所有目的通过引用以其全部内容而并入,在程度上就像每个单独的出版物、专利、专利申请、和/其他文献被单独地指出以出于所有目的通过引用而并入一般。

<110> 米迪缪尼有限公司 (MEDIMMUNE, LLC)
HUMABS BIOMED SA公司

<120> 抗O1抗体及其用途

<130> KLEB-101-WO-PCT

<140>

<141>

<150> 62/410,005

<151> 2016-10-19

<160> 68

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 8

[0001] <212> PRT
<213>人工序列

<220>

<223>人工序列的描述：合成肽

<220>

<223> KPE33 KPE33V2016 VH-CDR1

<400> 1

Gly Phe Ile Phe Asp Asp Tyr Ala

1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213>人工序列

<220>

<223>人工序列的描述：合成肽

<220>

<223> KPE33 KPE33V2016 VH-CDR2

<400> 2

Ile Ala Trp Lys Ser Gly Ala Thr

1 5

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<220>

<223> KPE33 KPE33V2016 VH-CDR3

<400> 3

[0002] Thr Arg Arg Arg Ala Ser Gly Asp Asp Thr Phe Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10 15

<210> 4

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<220>

<223> KPE33 KPE33V2016 VL-CDR1

<400> 4

Gln Asn Val Asn Thr Asn

1 5

<210> 5

<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223>人工序列的描述：合成肽

<220>
<223> KPE33 KPE33V2016 VL-CDR2

<400> 5
Asp Ala Ser
1

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

[0003] <220>
<223>人工序列的描述：合成肽

<220>
<223> KPE33 VL-CDR2

<400> 6
Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Thr Arg Ala
1 5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223>人工序列的描述：合成肽

<220>
<223> KPE33 VL-CDR3

<400> 7
Gln Gln Cys Thr Asn Trp Arg Tyr Thr
1 5

<210> 8
<211> 123
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<220>
<223> KPE33 VH氨基酸序列

<400> 8
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ala Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

[0004] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Ile Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

Ala Ile His Trp Val Arg Arg Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Ala Trp Lys Ser Gly Ala Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Lys Ser Met Tyr
65 70 75 80

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

Thr Arg Arg Arg Ala Ser Gly Asp Asp Thr Phe Tyr Tyr Phe Asp Tyr

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 9
<211> 107
<212> PRT
<213>人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<220>
<223> KPE33 VL氨基酸序列

<400> 9
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

[0005]

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asn Val Asn Thr Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Thr Arg Ala Ala Gly Leu Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Cys Thr Asn Trp Arg Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213>人工序列

<220>
<223>人工序列的描述：合成肽

<220>
<223> KPE33V2016 VL-CDR2

<400> 10
Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala
1 5

[0006] <210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213>人工序列

<220>
<223>人工序列的描述：合成肽

<220>
<223> KPE33V2016 VL-CDR3

<400> 11
Gln Gln Thr Thr Asn Trp Arg Tyr Thr
1 5

<210> 12
<211> 123
<212> PRT
<213>人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<220>

<223> KPE33V2016 VH氨基酸序列

<400> 12

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

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

Ser Gly Ile Ala Trp Lys Ser Gly Ala Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

[0007]

Lys Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Lys Ser Met Tyr
65 70 75 80

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

Thr Arg Arg Arg Ala Ser Gly Asp Asp Thr Phe Tyr Tyr Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 13

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<220>

<223> KPE33V2016 VL氨基酸序列

<400> 13

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asn Val Asn Thr Asn

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

[0008]

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Thr Asn Trp Arg Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 14

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<220>

<223> KPA27 VH-CDR1

<400> 14

Glu Asn Thr Phe Asn Asp Phe Tyr

1 5

<210> 15

<211> 8

<212> PRT

<213>人工序列

<220>

<223>人工序列的描述：合成肽

<220>

<223> KPA27 VH-CDR2

<400> 15

[0009] Ile His Pro Asp Gly Val Val Thr

1 5

<210> 16

<211> 14

<212> PRT

<213>人工序列

<220>

<223>人工序列的描述：合成肽

<220>

<223> KPA27 VH-CDR3

<400> 16

Met Arg Asp Gly Pro Gly Ser Glu Gly Ser Trp Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 17

<211> 6
<212> PRT
<213>人工序列

<220>
<223>人工序列的描述：合成肽

<220>
<223> KPA27 VL-CDR1

<400> 17
Gln Pro Val Ser Asn Arg
1 5

<210> 18
<211> 3
<212> PRT
<213>人工序列

[0010] <220>
<223>人工序列的描述：合成肽

<220>
<223> KPA27 VL-CDR2

<400> 18
Lys Ala Ser
1

<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213>人工序列

<220>
<223>人工序列的描述：合成肽

<220>
<223> KPA27 VL-CDR2

<400> 19
Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Gln
1 5

<210> 20
<211> 5
<212> PRT
<213>人工序列

<220>
<223>人工序列的描述：合成肽

<220>
<223> KPA27 VL-CDR3

<400> 20
Gln Gln Ser Gln Thr
1 5

[0011] <210> 21
<211> 121
<212> PRT
<213>人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<220>
<223> KPA27 VH氨基酸序列

<400> 21
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Glu Asn Thr Phe Asn Asp Phe
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile His Pro Asp Gly Val Val Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Asn Gly Leu Ile Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Met Arg Asp Gly Pro Gly Ser Glu Gly Ser Trp Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0012] 115 120

<210> 22
<211> 103
<212> PRT
<213>人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<220>
<223> KPA27 VL氨基酸序列

<400> 22
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Pro Val Ser Asn Arg
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Arg Ala Pro Thr Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Leu Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Gln Thr Phe Gly Gln
 85 90 95

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100

[0013]

<210> 23
<211> 10
<212> PRT
<213>人工序列

<220>
<223>人工序列的描述：合成肽

<220>
<223> KBPJ4 VH-CDR1

<400> 23
Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn Thr Ala Ala
1 5 10

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213>人工序列

<220>

<223>人工序列的描述：合成肽

<220>

<223> KBPJ4 VH-CDR2

<400> 24

Thr Tyr Tyr Arg Ser Glu Trp Tyr Asn

1 5

<210> 25

<211> 10

<212> PRT

<213>人工序列

<220>

<223>人工序列的描述：合成肽

<220>

[0014] <223> KBPJ4 VH-CDR3

<400> 25

Ala Arg Ile Ser Trp Asn Asp Leu Pro Ala

1 5 10

<210> 26

<211> 12

<212> PRT

<213>人工序列

<220>

<223>人工序列的描述：合成肽

<220>

<223> KPJ4 VL-CDR1

<400> 26

Gln Ser Ile Leu Tyr Ser Ser His Asn Lys Asn Tyr

1 5 10

<210> 27
<211> 3
<212> PRT
<213>人工序列

<220>
<223>人工序列的描述：合成肽

<220>
<223> KPJ4 VL-CDR2

<400> 27
Trp Ala Ser
1

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213>人工序列

[0015]

<220>
<223>人工序列的描述：合成肽

<220>
<223> KPJ4 VL-CDR2

<400> 28
Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu
1 5

<210> 29
<211> 9
<212> PRT
<213>人工序列
<220>
<223>人工序列的描述：合成肽
<220>
<223> KPJ4 VL-CDR3

<400> 29
Gln Gln Tyr Cys Asn Ile Pro Tyr Thr
1 5

<210> 30
<211> 120
<212> PRT
<213>人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<220>
<223> KBJ4 VH氨基酸序列

<400> 30
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln
1 5 10 15

[0016] Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

Thr Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Glu Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
50 55 60

Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
65 70 75 80

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ile Ser Trp Asn Asp Leu Pro Ala Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 31

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<220>

<223> KPJ4 VL 氨基酸序列

<400> 31

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
[0017] 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Ser
20 25 30

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

Pro Pro Lys Val Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Asn Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Cys Asn Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 32
<211> 8
<212> PRT
<213>人工序列

<220>
<223>人工序列的描述：合成肽
<220>
<223> KPB202 VH-CDR1

[0018] <400> 32
Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe Trp
1 5

<210> 33
<211> 8
<212> PRT
<213>人工序列

<220>
<223>人工序列的描述：合成肽
<220>
<223> KPB202 VH-CDR2

<400> 33
Ile Asn Pro Asp Gly Ser Glu Lys
1 5

<210> 34
<211> 10
<212> PRT

<213>人工序列

<220>

<223>人工序列的描述：合成肽

<220>

<223> KPB202 VH-CDR3

<400> 34

Ala Arg Leu Gly Pro Phe His Pro Asp Cys

1 5 10

<210> 35

<211> 11

<212> PRT

<213>人工序列

<220>

<223>人工序列的描述：合成肽

[0019]

<220>

<223> KPB202 VL-CDR1

<400> 35

Gln Ser Leu Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr

1 5 10

<210> 36

<211> 3

<212> PRT

<213>人工序列

<220>

<223>人工序列的描述：合成肽

<220>

<223> KPB202 VL-CDR2

<400> 36

Glu Val Ser

<210> 37
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<220>
<223> KPB202 VL-CDR2

<400> 37
Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Asp
1 5

[0020] <210> 38
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<220>
<223> KPB202 VL-CDR3

<400> 38
Met Gln Gly Thr His Trp Pro Trp Thr
1 5

<210> 39
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<220>

<223> KPB202 VH氨基酸序列

<400> 39

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

Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe
20 25 30

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

Ala Asn Ile Asn Pro Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

[0021]

Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Ser
65 70 75 80

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

Ala Arg Leu Gly Pro Phe His Pro Asp Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 40

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<220>

<223> KPB202 VL氨基酸序列

<400> 40

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

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

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

[0022]

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 Ile Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
85 90 95

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

<210> 41

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<220>

<223> 54H7 VH-CDR1

<400> 41

Asn Tyr Trp Met Gln

1 5

<210> 42

<211> 17

<212> PRT

<213>人工序列

<220>

<223>人工序列的描述：合成肽

<220>

<223> 54H7 VH-CDR2

<400> 42

[0023] Asn Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asp Glu Lys Phe Arg

1 5 10 15

Ser

<210> 43

<211> 6

<212> PRT

<213>人工序列

<220>

<223>人工序列的描述：合成肽

<220>

<223> 54H7 VH-CDR3

<400> 43

Asn Trp Asn Phe Asp Tyr

1 5

<210> 44
<211> 11
<212> PRT
<213>人工序列

<220>
<223>人工序列的描述：合成肽

<220>
<223> 54H7 VL-CDR1

<400> 44
Arg Ala Ser Gln Asp Ile Gly Ser Ser Leu Asn
1 5 10

[0024] <210> 45
<211> 7
<212> PRT
<213>人工序列

<220>
<223>人工序列的描述：合成肽

<220>
<223> 54H7 VL-CDR2

<400> 45
Ala Thr Ser Ser Leu Asp Ser
1 5

<210> 46
<211> 9
<212> PRT
<213>人工序列

<220>
<223>人工序列的描述：合成肽

<220>

<223> 54H7 VL-CDR3

<400> 46

Leu Gln His Thr Asp Ser Pro Tyr Thr

1 5

<210> 47

<211> 115

<212> PRT

<213>人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<220>

<223> 54H7 VH

[0025]

<400> 47

Gln Val His Leu Gln Gln Pro Gly Ser Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asp Glu Lys Phe

50 55 60

Arg Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met His Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Thr Arg Asn Trp Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 48
 <211> 107
 <212> PRT
 <213>人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述：合成多肽

[0026]

<220>
 <223> 54H7 VL氨基酸序列

<400> 48
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Gly Ser Ser
 20 25 30

Leu Asn Trp Leu Gln Gln Glu Pro Asp Gly Thr Ile Lys Arg Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Thr Ser Ser Leu Asp Ser Gly Val Pro Lys Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Arg Ser Gly Ser Glu Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala

65 70 75 80

Glu Asp Phe Val Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln His Thr Asp Ser Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 49
<211> 364
<212> DNA
<213>人工序列

<220>
<223>人工序列的描述：合成多核苷酸

[0027] <220>
<223> KPA27 VH多核苷酸序列

<400> 49
caggtgcagc tggcagtc tgccctgatgttggaaac ctggggcctc agtgcaggc 60
tcctgcaagg cttctgaaaa cacattcaac gacttctata tgcaactgggt gcgcacaggcc 120
cctggacaag ggcttgatgtt gatggatgg atccaccctg acggtgttgc cacaactat 180
gcacagaaat ttcatggcag ggtcaactatg accaggaca cgtccatcaa cacagtctac 240
atggaaattga acggcctgat ctctgacgac acggccgtgtt attactgtat gagagacggg 300
ccaggatcg aaggttccctg gtttgactat tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360
tcag

<210> 50
<211> 310
<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸

<220>

<223> KPA27 VL多核苷酸序列

<400> 50

gacatccaga tgacccagtc tccttccacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggccagtca gcctgttagt aatagattgg cctggtatca gcagaaacca 120

gggagagccc ctacactcct gatctacaag gcgtctactt tacaaagtgg ggtcccattta 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct 240

gatgattttg caacttatta ctgccaacag tctcagacct tcggccaagg gaccaagggtg 300

gaaatcaaac 310

[0028]

<210> 51

<211> 352

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸

<220>

<223> KPD202 VH多核苷酸序列

<400> 51

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggagggc ttgggtccagc ctggggggtc cctgagcctc 60

tcctgtgcag cctctggatt caccttagt aactttggg tgggctgggg ccgccaggct 120

ccagggaaagg gcctggagtg ggtggccaat ataaacccag atggaagtga gaaatactat 180

gtggactctg tgaaggggccg agtcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcactgtct 240

ctgcaa atga acagcctgag agtcgaggac gcggctgtgt actactgtgc gagactaggg 300

ccgttccatc ctgactgctg gggccaggga accctggtca ccgtctcctc ag 352

<210> 52

<211> 337

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸

<220>

<223> KPD202 VL多核苷酸序列

<400> 52

gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttgacca gccggcctcc 60

atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta cacagtatg gaaacaccta cttgaattgg 120

[0029]

tttcagcaga ggccaggcca atctccaagg cgccataattt atgagggttc taaccggac 180

tctgggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgattcac actgaaaatc 240

agcagggtgg aggctgagga tattgggtt tattactgca tgcaaggaac acactggccg 300

tggacgttcg gccaaggac caaggtggaa atcaaac 337

<210> 53

<211> 361

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸

<220>

<223> KPJ4 VH多核苷酸序列

<400> 53

caggtacagc tgcagcagtc aggtccagga ctggtgaggc cctcgagac cctctactc 60
 acctgtgcca tctccgggaa cagtgtctt agcaacactg ctgcttggaa ctggatcagg 120
 cagtccccat cgagaggcct tgagtggctg ggaaggacat attacaggc tcgatggat 180
 aatgattatg cagtatctgt gaaaagtcga ataaccatca acccagacac atccaagaac 240
 cagttctccc tgcagttgaa ctctgtact cccgaggaca cggctgtgtt ttactgtgca 300
 agaatttcct ggaacgacct cccagcttgg ggccaggaa ccctggtcac cgtctcctca 360
 g 361

<210> 54
 <211> 340
 <212> DNA
 <213> 人工序列

[0030] <220>
 <223> 人工序列的描述：合成多核苷酸
 <220>
 <223> KPJ4 VL多核苷酸序列
 <400> 54
 gacatgtga tgaccaggc tccagactcc ctggctgtgt ctctggcga gagggccact 60
 atcaactgca agtccagcca gagtattttta tacagctccc acaataagaa ctacttagct 120
 tggtaccaggc agaaaccagg acagcctcctt aaggtgctca ttactgggc gtctacccgg 180
 gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcaacc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcagta ttgtaatatc 300
 ccgtacactt ttggccaggg gaccaagctg gagatcaaac 340

<210> 55
 <211> 369

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸

<220>

<223> KPE33 VH多核苷酸序列

<400> 55

gaagtgcagc tgggtggagtc tgggggggccc ttggtagacgc ctggcggttc cctgagactc 60

tctgtgcag tttctggatt catcttgat gattatgccat tccactgggt ccggcgagct 120

ccagggaaagg gcctggagtg ggtctcaggc attgcttggaa agagtgggtc cacaactat 180

gcggactctg tgaaggcccg cttcgccatc tctagagaca actccaagaa atctatgtat 240

ctacaaatga acagtctggg aactgaagac acggccttgtt attactgtac aagacgacgg 300

[0031] gcgtctgggg atgatacttt ttattacttt gactattggg gtcaggaaac cctggtcacc 360

gtctcctca

369

<210> 56

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸

<220>

<223> KPE33 VL多核苷酸序列

<400> 56

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgttttgtt ctccaggaga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gaatgttaat accaacttag cctggtagcca gcagcgacct 120

ggacagtctc ccagactcct catttatgtat gcatccacca gggccgctgg cctcccagcc 180

	aggttcagtgcagttggacacatccactctaccatcagcagccatagac	240
	gaagattttcagtttactatgttcagcagtgtaccaactggcggtacac	300
	gggaccaagctggagatcaa a	321
	<210> 57	
	<211> 369	
	<212> DNA	
	<213>人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸	
	<220>	
	<223> KPE33V2016 VH多核苷酸序列	
	<400> 57	
[0032]	gagggtgcagctggtcgaatccggcgaaaaatctgggtgcagctggccgctactgagactg	60
	agctgcgcccgttccgggttcatcttgacgattacgcta tgcactgggtgcggcaggca	120
	cctggcaagg gactggagtg ggtctctggg atcgccctgaa aagtggagcaccaactac	180
	gccgactcag tgaaggggag attcgccatt agccggata actctaagaa aagtatgtat	240
	ctgcagatgatccctggg aaccgaagac acagccctgt actattgtac acggagaagg	300
	gcttctggcg acgatacttt ctactatTTT gattattggg gacagggcac tctggtgacc	360
	gtcagctcc	369
	<210> 58	
	<211> 321	
	<212> DNA	
	<213>人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸	

<220>

<223> KPE33V2016 VL多核苷酸序列

<400> 58

gagatcggtgc tgacacagtc cccagccact ctgtctctga gtcccgggga acgggcaact 60
 ctgtcttgca gagccagtca gaacgtcaat accaacctgg cttggtagcca gcagaagccc 120
 ggacaggcac ctcgactgct gatctatgac gccagaata gggctacagg cattccagca 180
 cgcttctcag gatctggatc tggaaaccgac ttactctga ccatcagctc cctggagccc 240
 gaagatttcg ccgtgtacta ttgtcagcag accacaaact ggagatacac ctttggccag 300
 gggacaaaagc tggagatcaa g 321

<210> 59

<211> 8

<212> PRT

[0033] <213>人工序列

<220>

<223>人工序列的描述：合成肽

<400> 59

Ile	Ala	Tyr	Lys	Ser	Gly	Ala	Thr
1							5

<210> 60

<211> 16

<212> PRT

<213>人工序列

<220>

<223>人工序列的描述：合成肽

<400> 60

Thr	Arg	Arg	Arg	Ala	Ser	Gly	Asp	Asn	Thr	Phe	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Tyr
1				5					10			15			

<210> 61

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 61

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

[0034]

Ser Gly Ile Ala Tyr Lys Ser Gly Ala Thr Asn Tyr Ala Glu Ser Val
50 55 60

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

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

Thr Arg Arg Arg Ala Ser Gly Asp Asn Thr Phe Tyr Tyr Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 62

<211> 123

<212> PRT

<213>人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 62

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

[0035]

Ser Gly Ile Ala Tyr Lys Ser Gly Ala Thr Asn Tyr Ala Glu Ser Val
50 55 60

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

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

Thr Arg Arg Arg Ala Ser Gly Asp Asn Thr Phe Tyr Tyr Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 63
<211> 107
<212> PRT
<213>人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 63
Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asn Val Asn Thr Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

[0036]

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Thr Asn Trp Arg Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 64
<211> 369
<212> DNA
<213>人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸

<400> 64

caggtgcagc tcgtggagtc cggcggtggc ctggttcagc ctggccgctc tcttagactg 60
 agttgcgccg ctagcggtt tatttcgac gactatgcga tccactgggt tagacaagca 120
 ccagggaaagg gacttgaatg ggtttctggg attgcgtata aatcaggggc cacgaactac 180
 gctgagagcgc ttaaggggcg atttactata agcagggatc agtccaaaaa ctcactgtac 240
 ttgcagatga actcactcag agccgaggac acggcggtgt actactgcac acgaaggagg 300
 gcatcaggag ataatacctt ttattacttc gactactggg gccaaaggcac gttggtaacg 360
 gtgagttct 369

<210> 65

[0037]

<211> 369

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸

<400> 65

caggtgcagc tcgtggagtc cggcggtggc ctggttcagc ctggccgctc tcttagactg 60
 agttgcgccg ctagcggtt tatttcgac gactatgcga tccactgggt tagacaagca 120
 ccagggaaagg gacttgaatg ggtttctggg attgcgtata aatcaggggc cacgaactac 180
 gctgagagcgc ttaaggggcg atttactata agcagggatc agtccaaaaa gtcactgtac 240
 ttgcagatga actcactcag agccgaggac acggcggtgt actactgcac acgaaggagg 300
 gcatcaggag ataatacctt ttattacttc gactactggg gccaaaggcac gttggtaacg 360
 gtgagttct 369

<210> 66
<211> 321
<212> DNA
<213>人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸

<400> 66
cagattgtgt tgacgcagag tcccgcgaca cttagcctct ctccggaga gagagcgacg 60
cttagttgcc gagcatccca gaacgtcaac actaatctcg cgtggtatca gcagaagccg 120
ggccaagccc ccaggctgtt gatttacgac gctagtaacc gcgccacagg aatccggca 180
agatttagtg ggtcaggatc aggaactgac tttaccttga cgataagtag tctggaacca 240
gaagatttcg ccgtatatta ctgtcaacag acaacaaact ggctgctacac cttcggccaa 300
ggaacacaaac ttgagatcaa g 321
[0038]

<210> 67
<211> 321
<212> DNA
<213>人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸

<400> 67
cagattgtgt tgacgcagag tcccgcgaca cttagcctct ctccggaga gagagcgacg 60
cttagttgcc gagcatccca gaacgtcaac actaatctcg cgtggtatca gcagaagccg 120
ggccaagccc ccaggctgtt gatttacgac gctagtaacc gcgccacagg aatccggca 180
agatttagtg ggtcaggatc aggaactgac tttaccttga cgataagtag tctggaacca 240
gaagatttcg ccgtatatta ctgtcaacag acaacaaact ggctgctacac cttcggccaa 300

ggaacaaaac ttgagatcaa g

321

<210> 68

<211> 6

<212> PRT

<213>人工序列

[0039]

<220>

<223>人工序列的描述：合成肽

<400> 68

Cys Ser Trp His Leu Cys

1 5

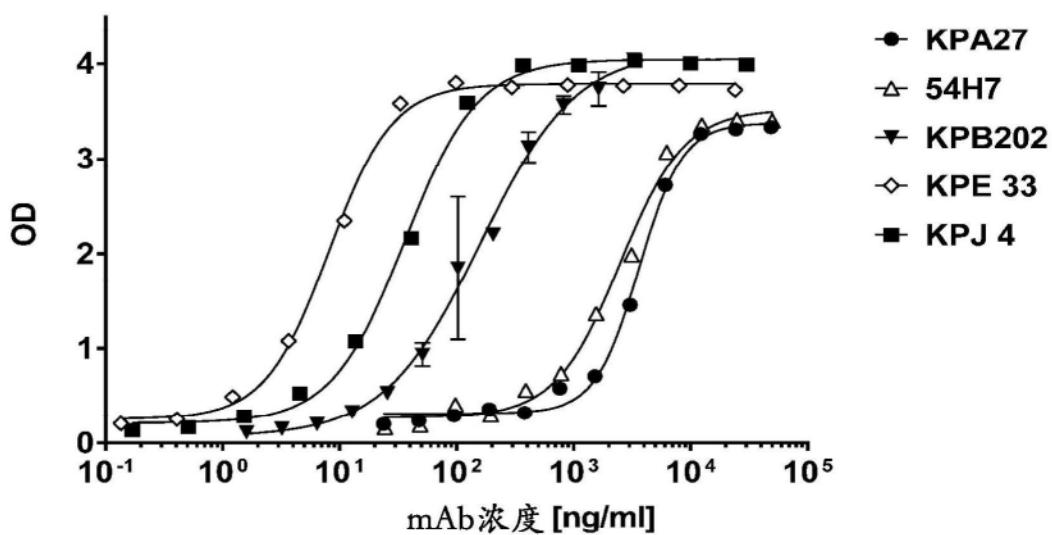
LPS-O1 ELISA

图1A

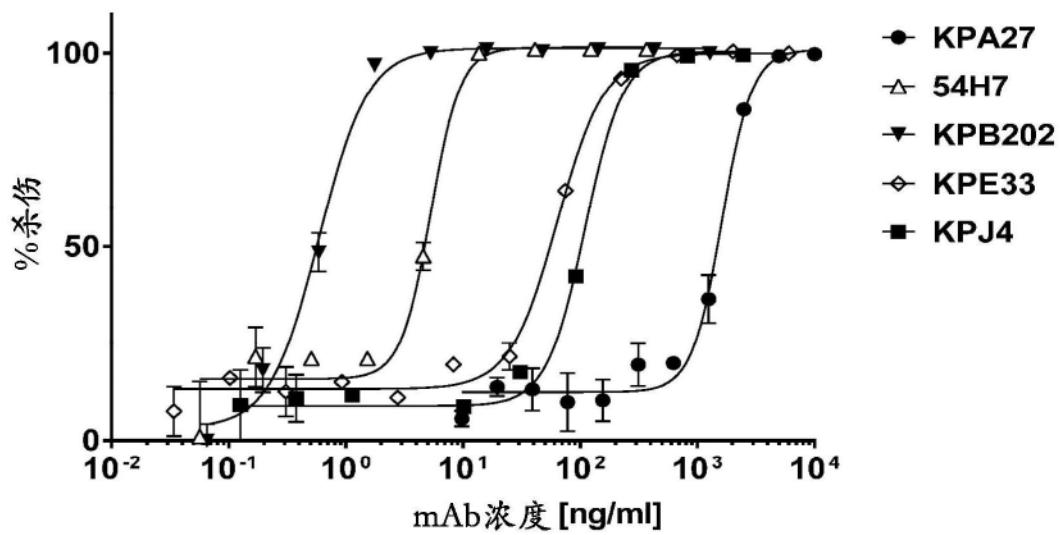
4211-lux的SBA

图1B

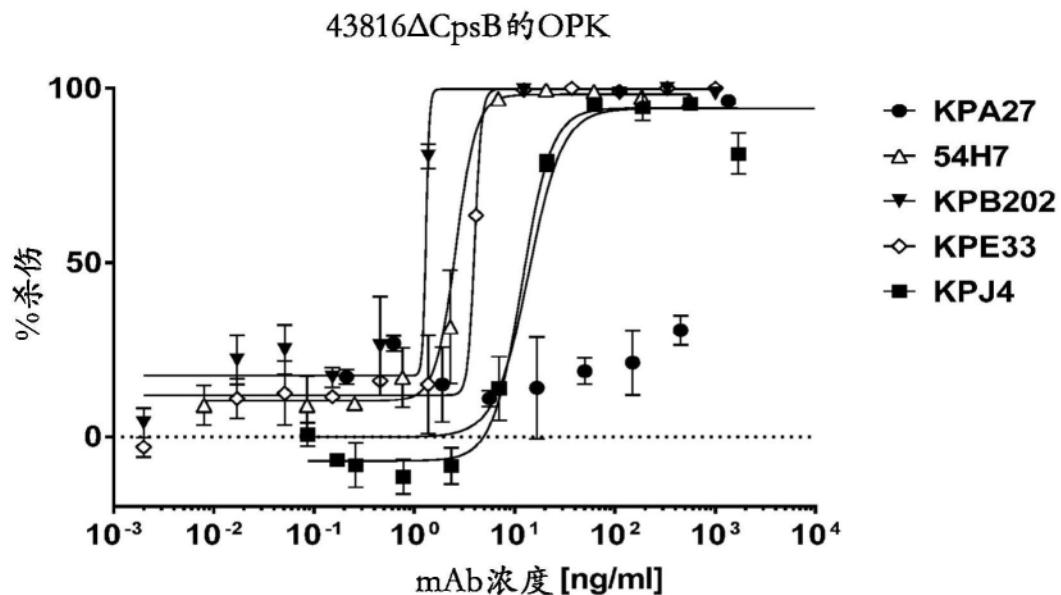


图1C

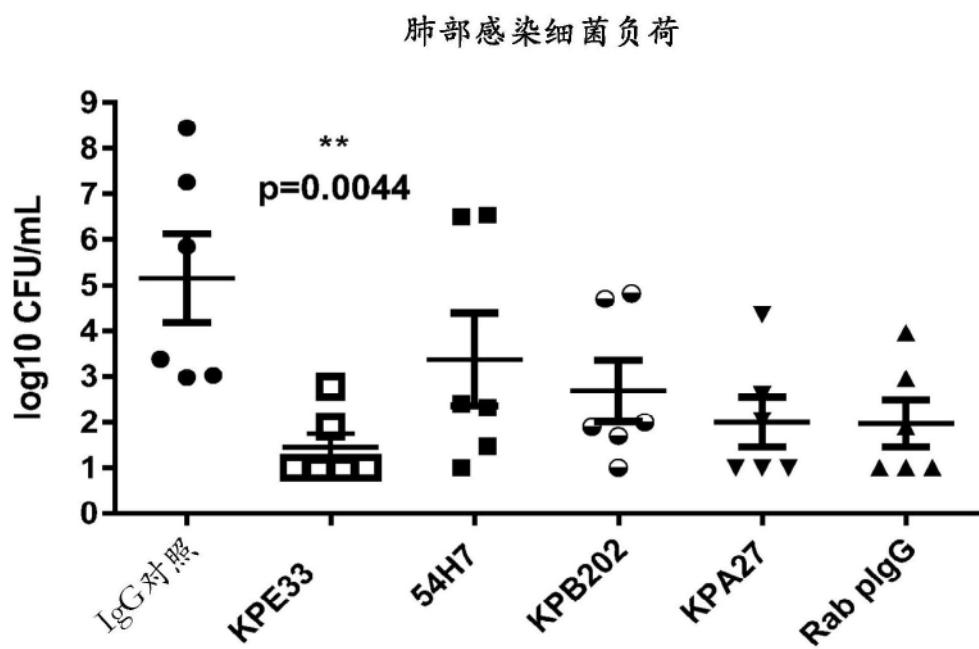


图2

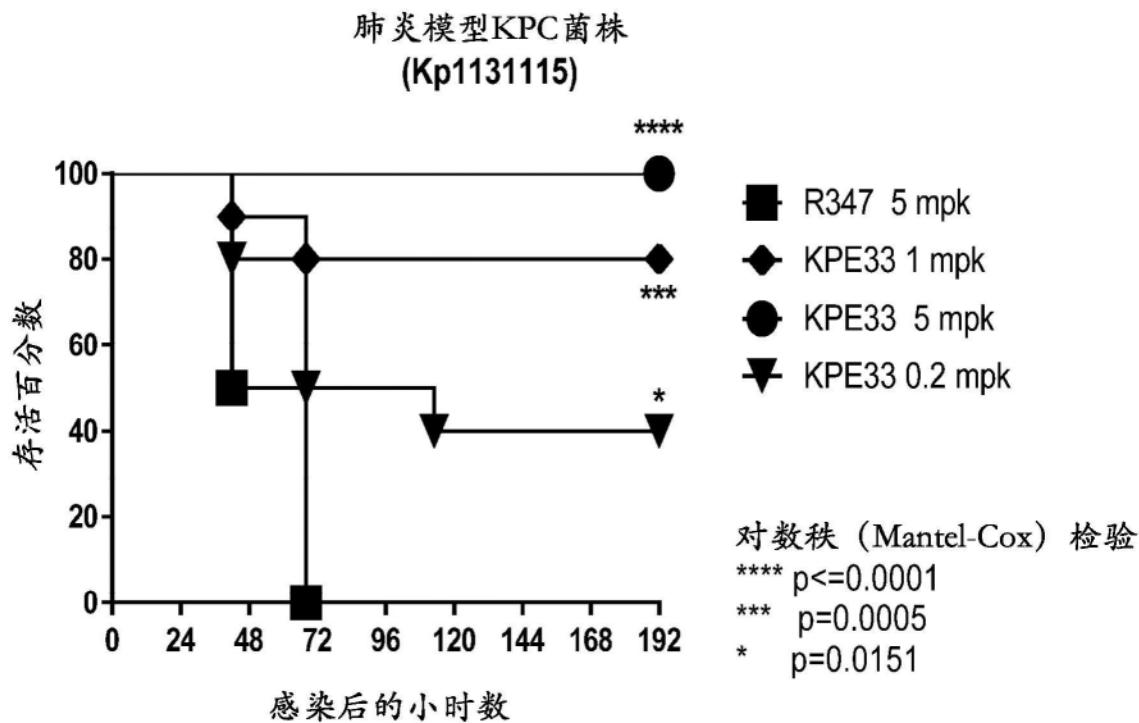


图3A

**菌血症疗法对比ESBL菌株
(Kp8561)**

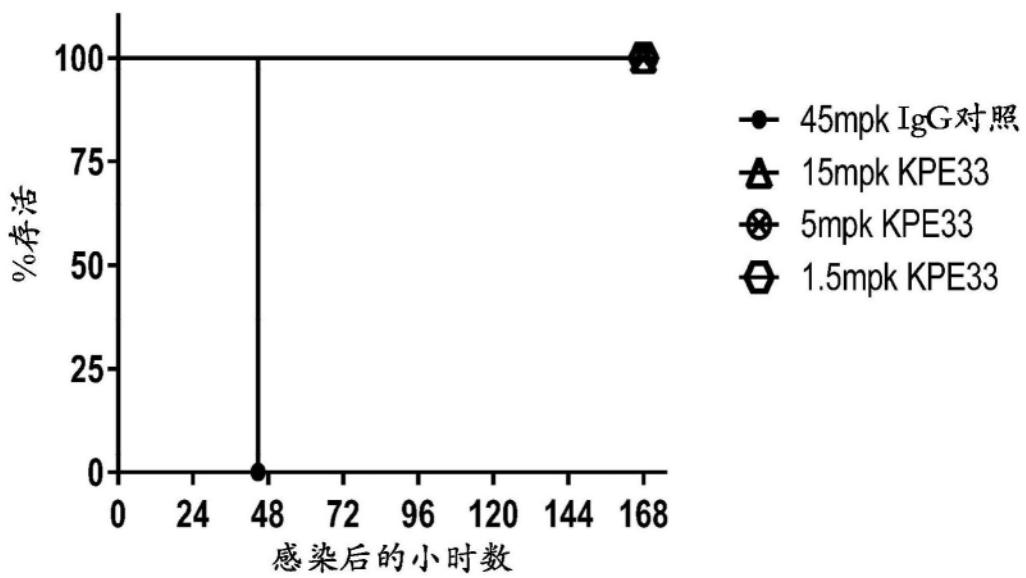


图3B

O1_1131115 肺炎

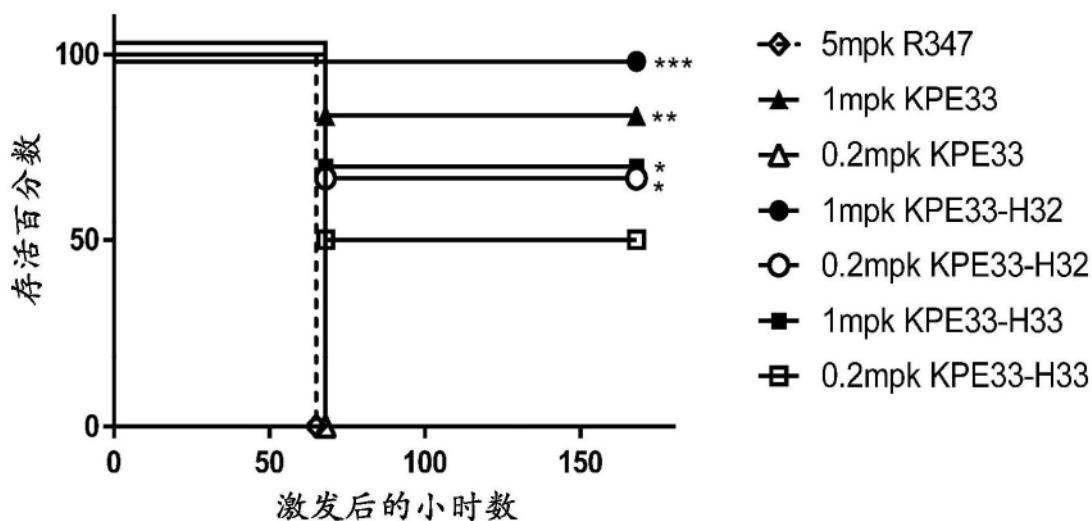
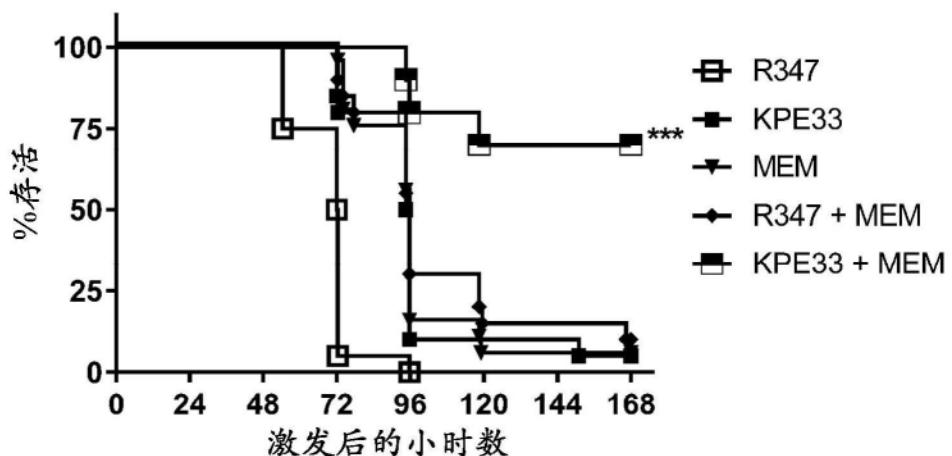


图3C

mAb/Abx 疗法
肺炎模型

激发 = 1e4 CFU IN (T0)
mAb = 1mpk IV (T+1)
Abx = 1.5mpk SC (T+4)

对数秩 (Mantel-Cox) 检验：
R347 + MEM 对比
*** KPE33 + MEM p < 0.0001

图4A

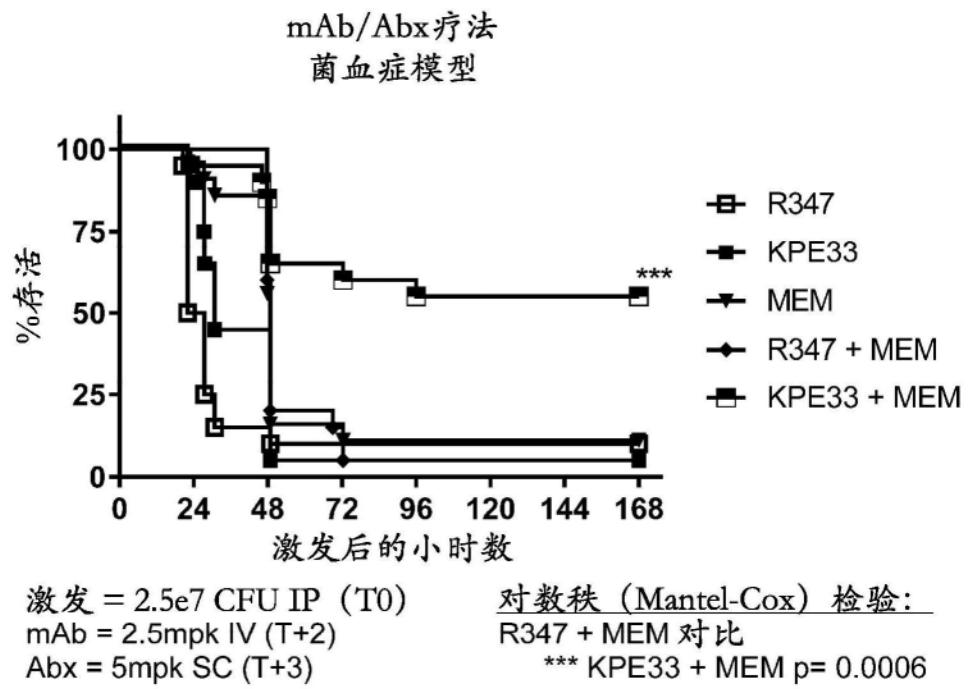


图4B

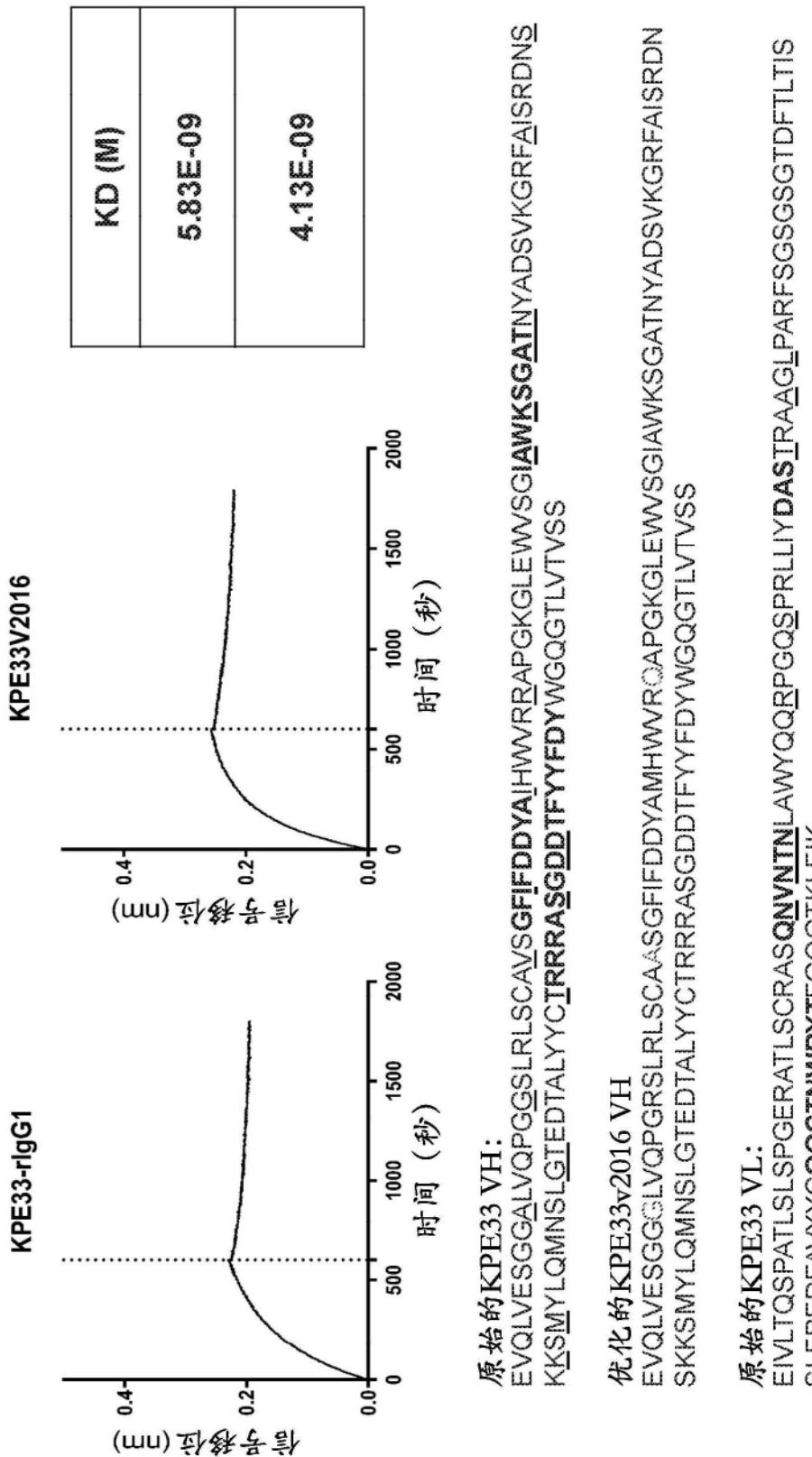


图5

致命性肺炎模型疗法
对比KPC菌株

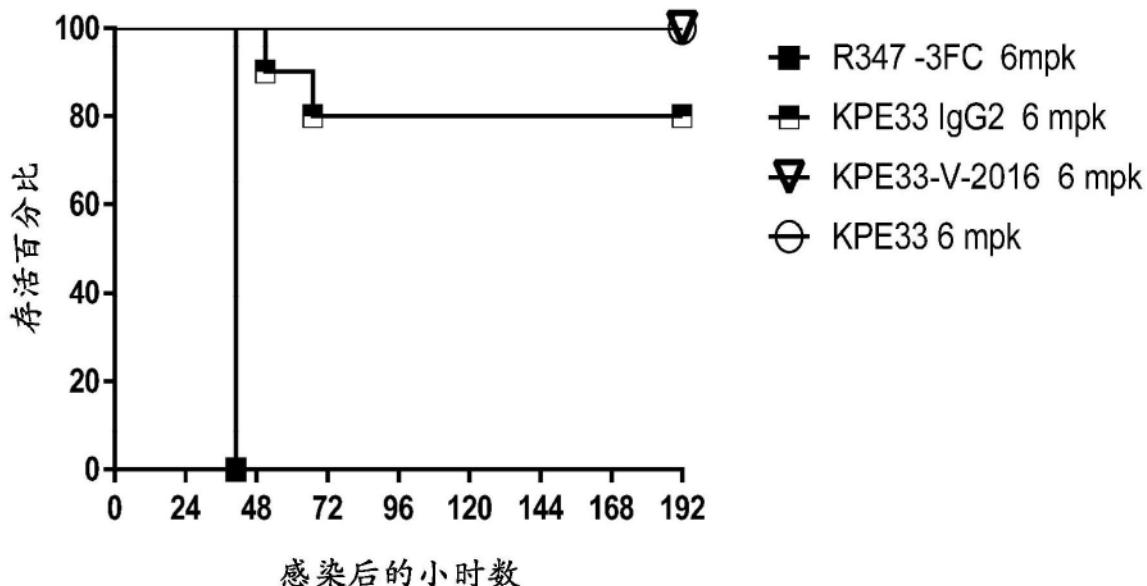
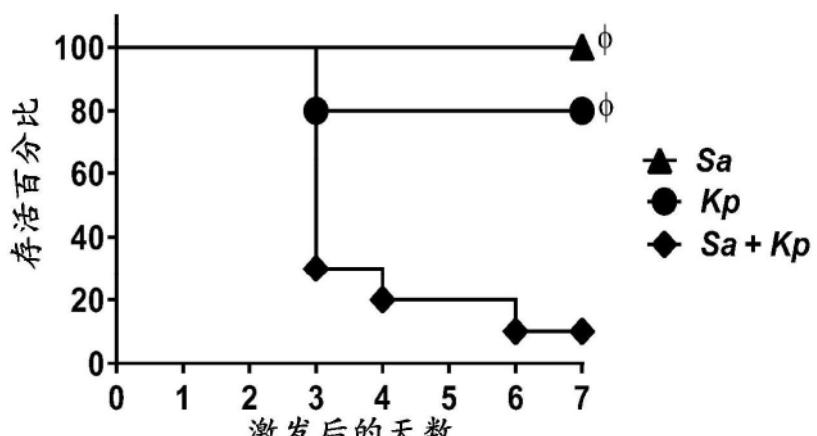


图6

肺炎模型



Sa: 金黄色葡萄球菌
Kp: 肺炎克雷伯菌

图7A

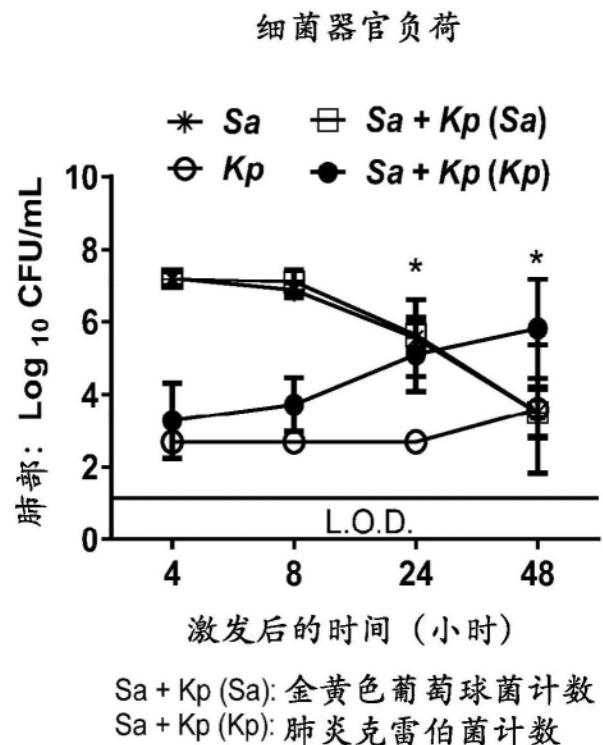


图7B

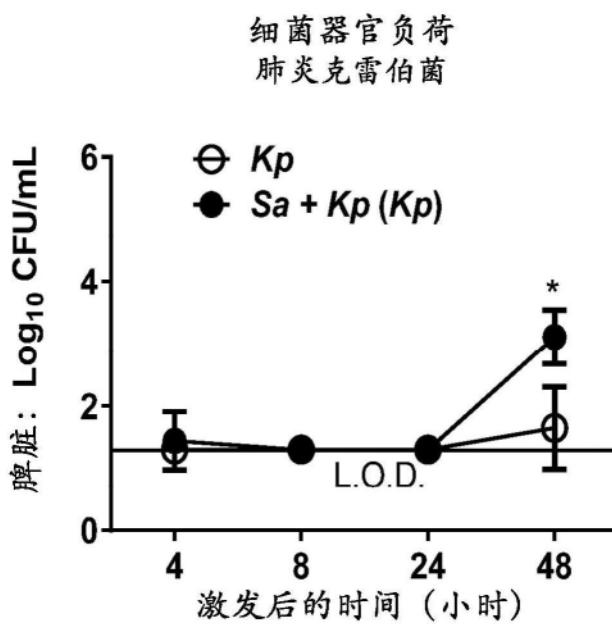
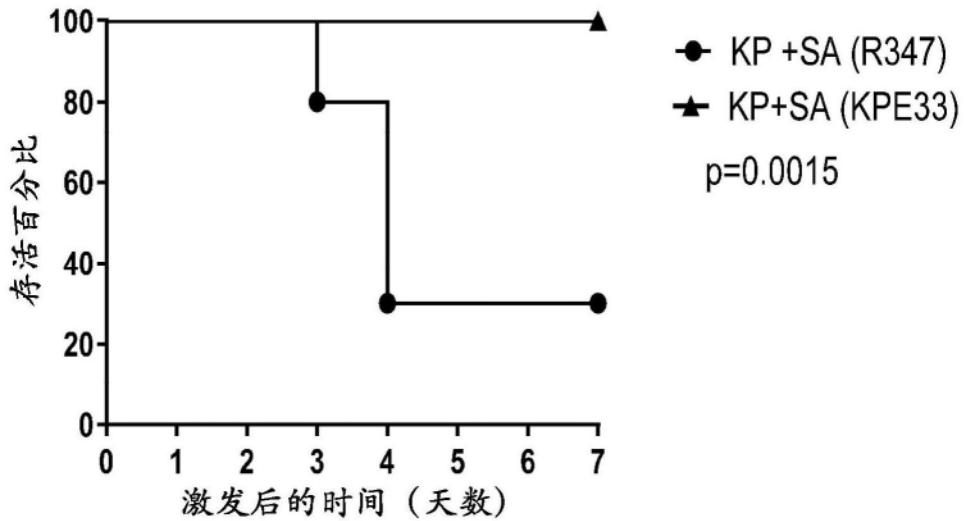


图7C

肺炎克雷伯菌与金黄色葡萄球菌
共感染模型



*表示与混合感染相比 $P<0.02$ ，
* 表示混合感染 (KP) 对比单一感染 (KP) 的 $P < 0.03$

图7D

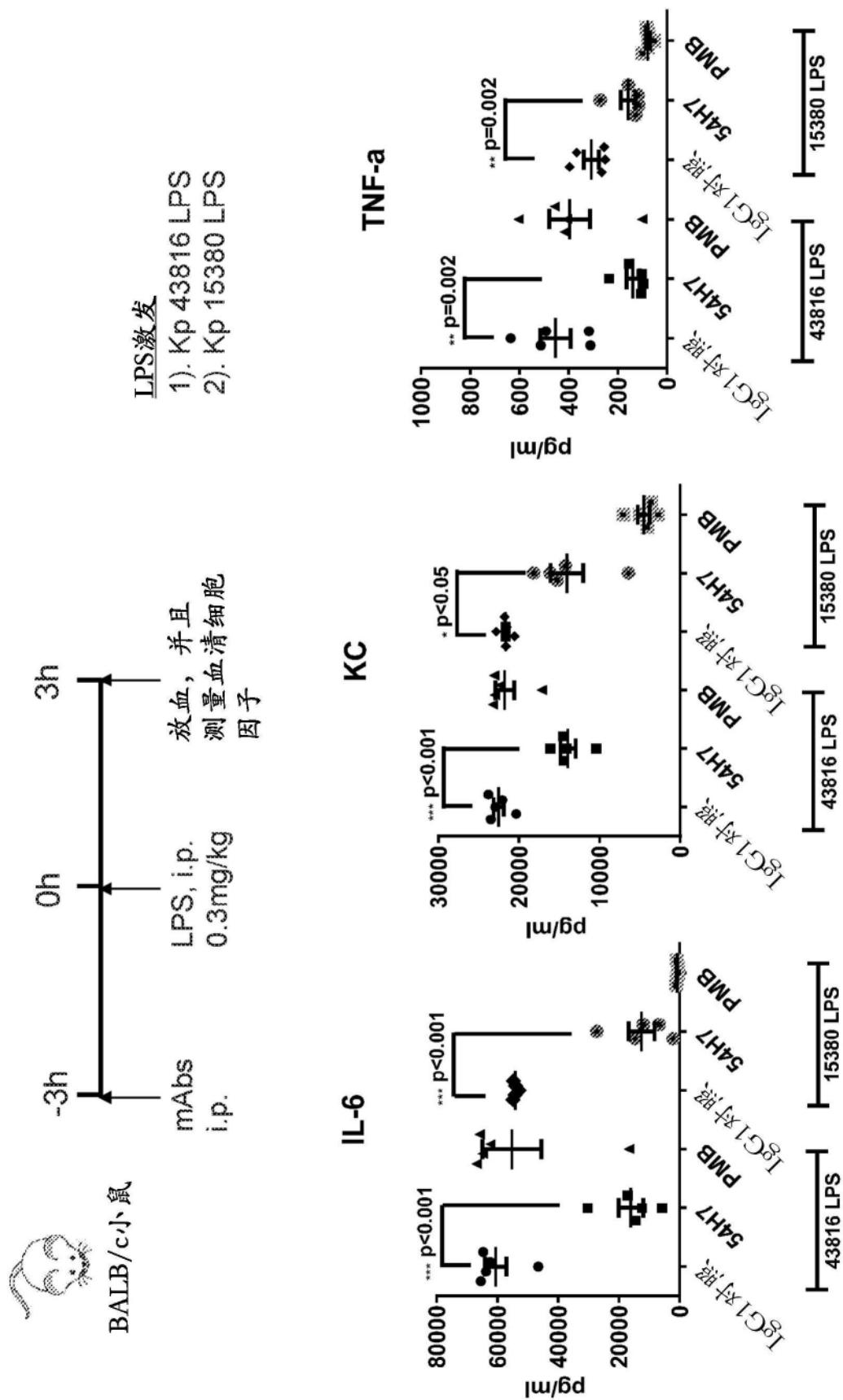


图8

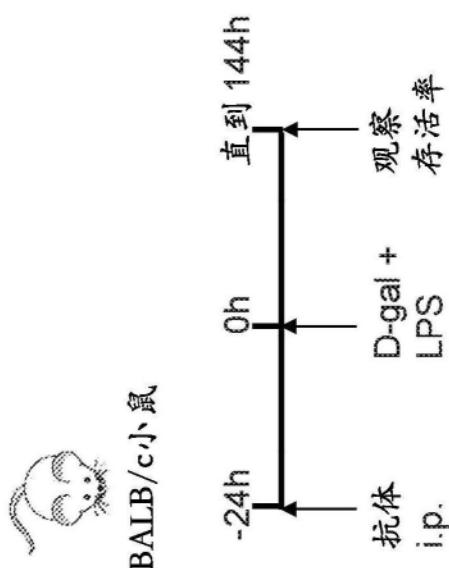
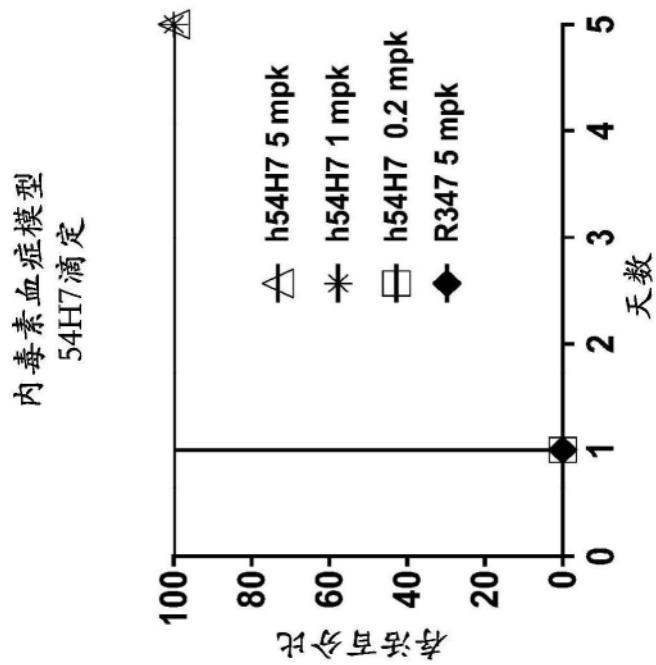
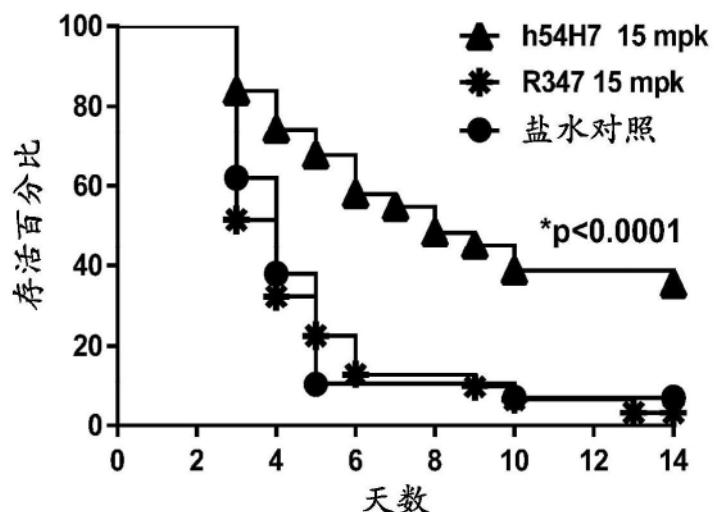


图9

具有O1 LPS mAb的肺炎模型
(Kp 43816)

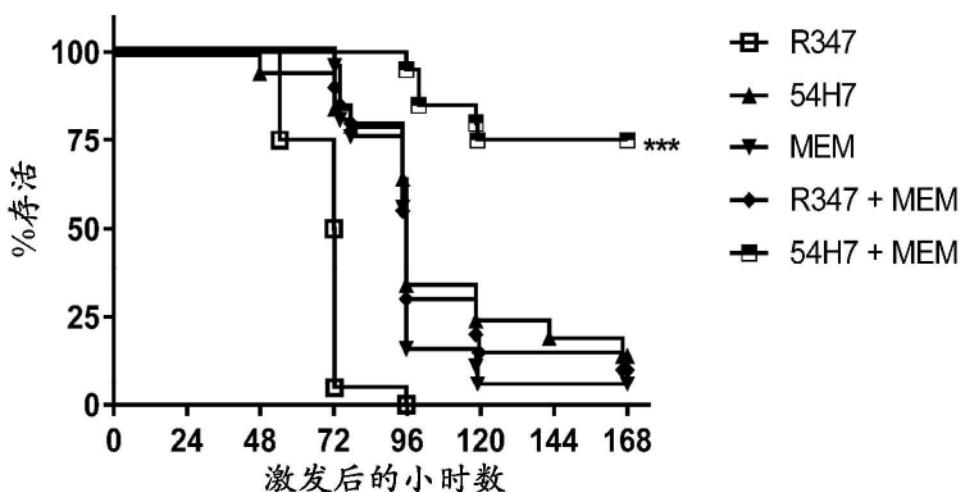


三个实验的组合

n=31

图10A

mAb/Abx疗法肺炎模型
(Kp8045)



激发 = 1e4 CFU IN (T0) 对数秩 (Mantel-Cox) 检验:
mAb = 1mpk IV (T+1) R347 + MEM 对比
Abx = 1.5mpk SC (T+4) *** 54H7 + MEM p < 0.0001

图10B

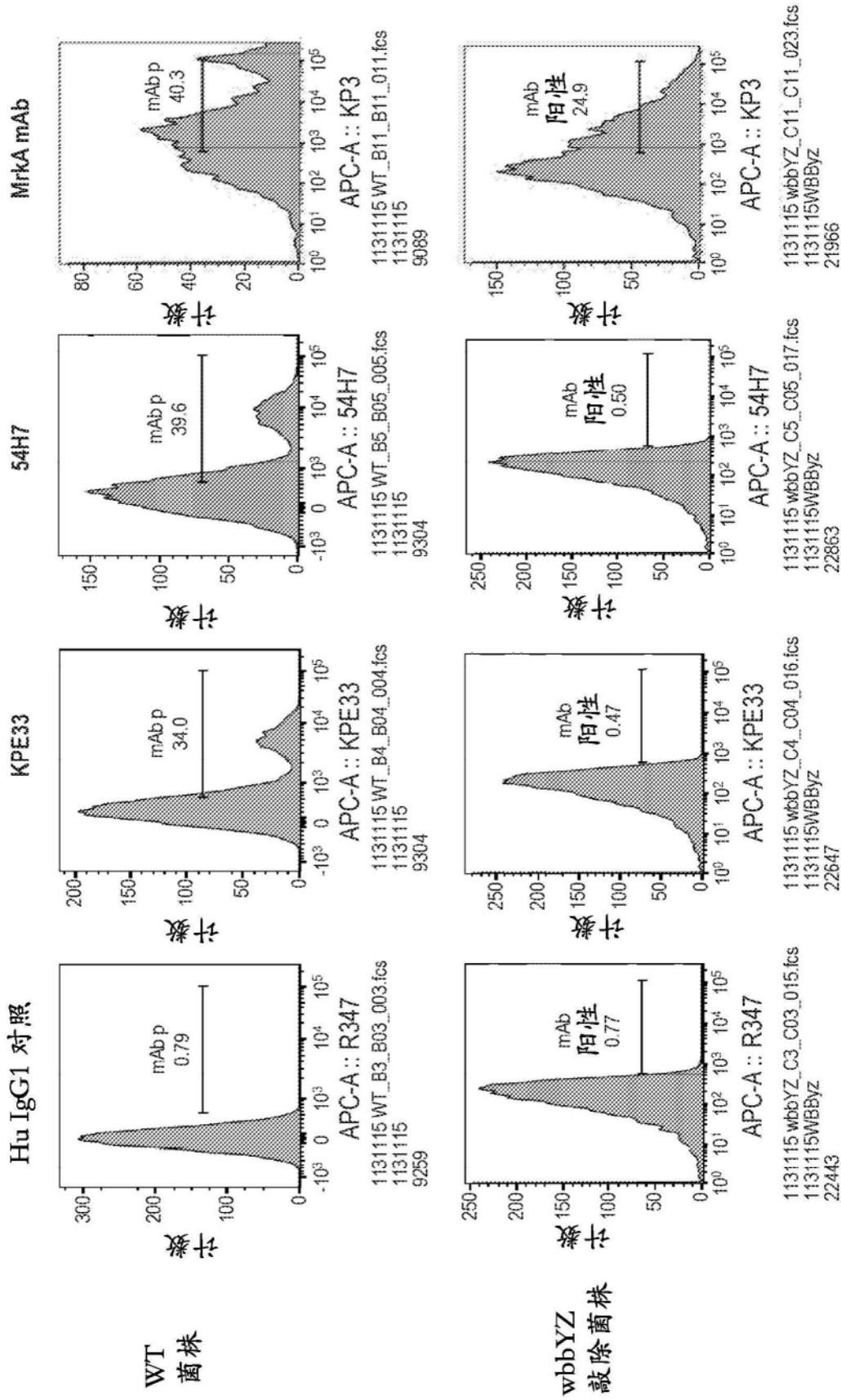
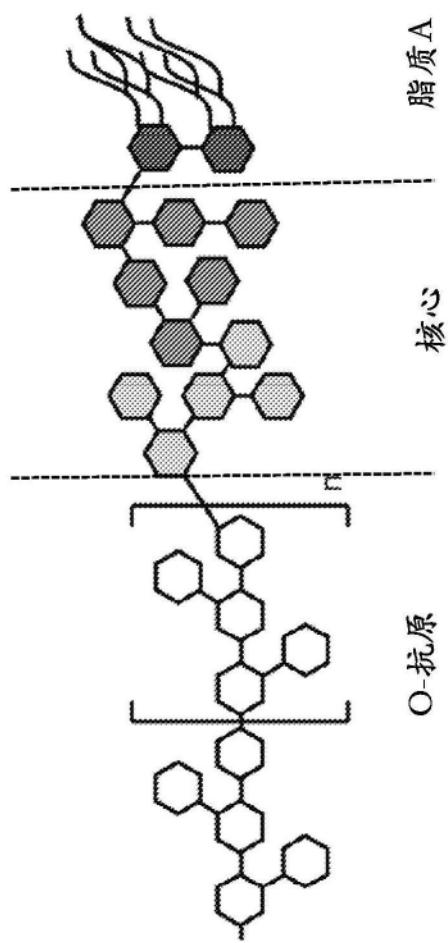


图 11



血清型	结构
O1	$[-3)-\beta\text{-Gal}p\text{-(1-3)-}\alpha\text{-Gal}p\text{-(1-}]_m\text{-}[\beta\text{-Gal}f\text{-(1-3)-}\alpha\text{-Gal}p\text{-(1-}]_n\text{-Core}$ D - Gal II D - Gal I
O1, O2a, O2ac	$-\text{[}\beta\text{-Gal}f\text{-(1-3)-}\alpha\text{-Gal}p\text{-(1-}]_m\text{-Core}$ D - Gal I

图12

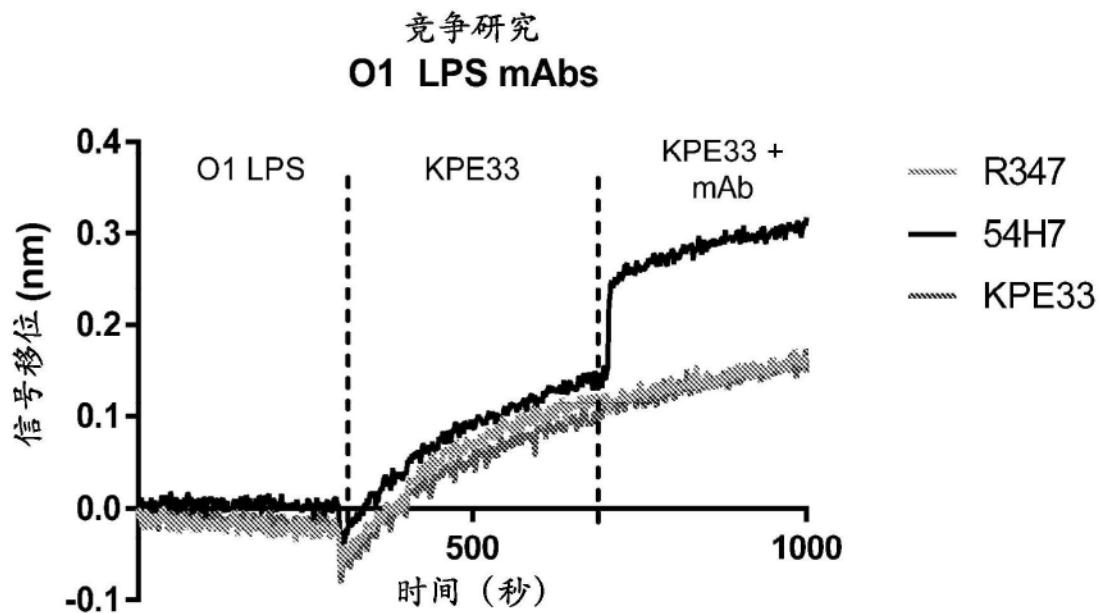


图13

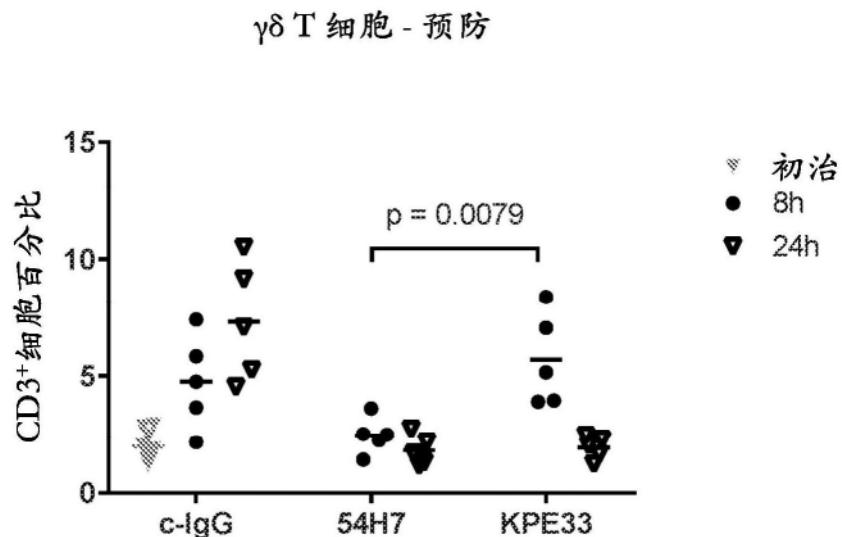


图14A

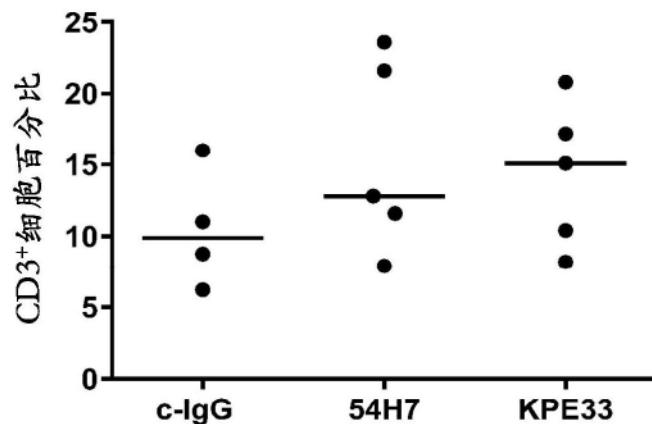
$\gamma\delta$ T 细胞 - 治疗

图14B

WT对比IL-17 KO中的KPE33

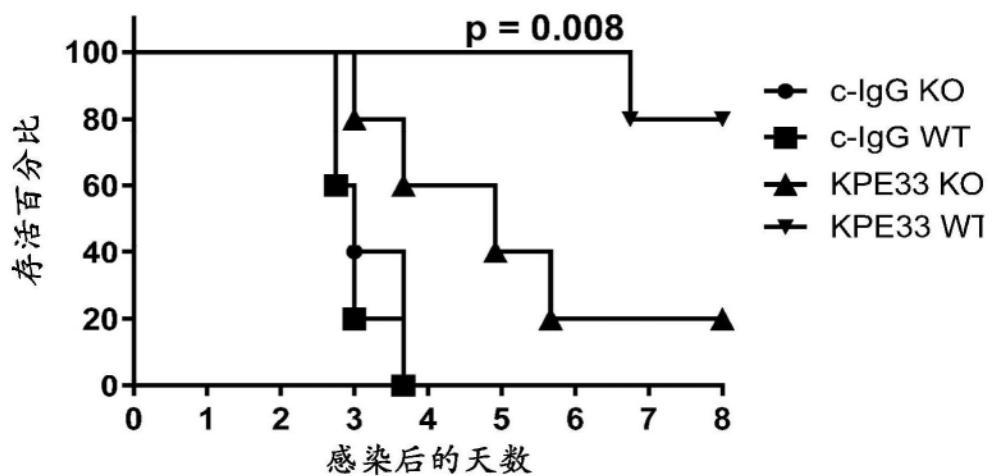


图14C

WT对比IL-17 KO中的54H7

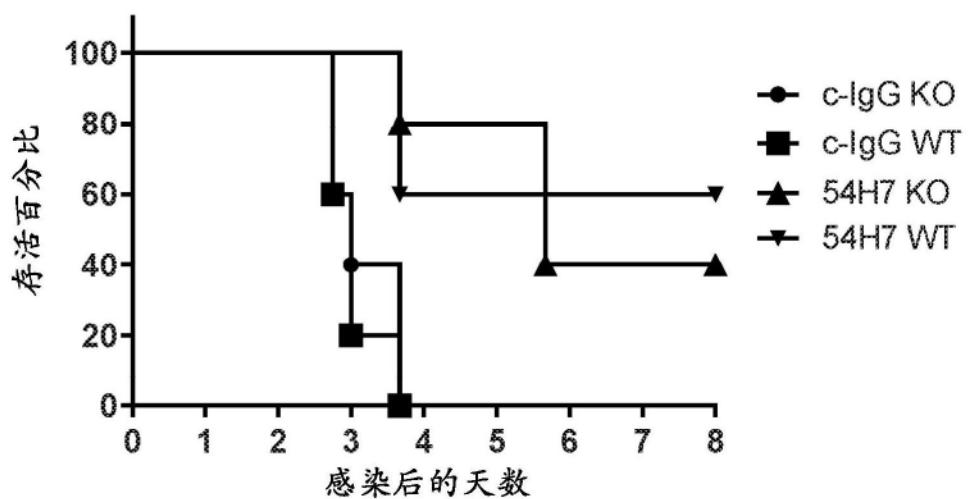


图14D