

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) 031447

(13) B1

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45) Дата публикации и выдачи патента**

**2019.01.31**

**(21) Номер заявки**

**201390967**

**(22) Дата подачи заявки**

**2010.07.15**

**(51) Int. Cl. C07K 16/12 (2006.01)**

**C12N 15/13 (2006.01)**

**A61K 39/395 (2006.01)**

**A61P 31/04 (2006.01)**

**(54) АНТИЛЕЛА, КОТОРЫЕ СВЯЗЫВАЮТСЯ С SDR БЕЛКАМИ, И СПОСОБЫ ИХ  
ИСПОЛЬЗОВАНИЯ**

**(31) 09165558.9; 61/225,878**

**(32) 2009.07.15**

**(33) EP; US**

**(43) 2014.01.30**

**(86) PCT/NL2010/050456**

**(87) WO 2011/008092 2011.01.20**

**(71)(73) Заявитель и патентовладелец:**

**АИММ ТЕРАПЬЮТИКС Б.В. (NL);  
ДЖЕНЕНТЕК, ИНК. (US)**

**(72) Изобретатель:**

**Бомон Тим, Кваккенбос Марк Ерун  
(NL), Браун Эрик Дж., Морисаки  
Джон Хироши, Хазенbos Баутер Л.В.,  
Мариатхасан Санджив, Кадзихара  
Кимберли, Ся И (US)**

**(74) Представитель:**

**Медведев В.Н. (RU)**

**(56) WO-A-2007141274**

MCCREA K.W. ET AL.: "The serine-aspartate repeat (Sdr) protein family in staphylococcus epidermidis", MICROBIOLOGY, SOCIETY FOR GENERAL MICROBIOLOGY, READING, GB, vol. 146, no. 7, 1 July 2000 (2000-07-01), pages 1535-1546, XP002955253, ISSN: 1350-0872, the whole document

YIN RONG-LAN ET AL.: "Construction and immunogenicity of a DNA vaccine containing clumping factor A of Staphylococcus aureus and bovine IL18", VETERINARY IMMUNOLOGY AND IMMUNOPATHOLOGY, 15 DEC 2009, LNKD-PUBMED:19540000, vol. 132, no. 2-4, December 2009 (2009-12), pages 270-274, XP002601812, ISSN: 1873-2534, Available online 22-05-2009, the whole document

TUCHSCHERR LORENA P.N. ET AL.: "Antibodies to capsular polysaccharide and clumping factor A prevent mastitis and the emergence of unencapsulated and small-colony variants of Staphylococcus aureus in mice", INFECTION AND IMMUNITY, DEC 2008, LNKD-PUBMED:18809660, vol. 76, no. 12, December 2008 (2008-12), pages 5738-5744, XP002601813, ISSN: 1098-5522, Published online 22-09-2008, the whole document

GAUDREAU ET AL.: "Protective immune responses to a multi-gene DNA vaccine against Staphylococcus aureus", VACCINE, ELSEVIER LTD.,

GB, LNKD- DOI:10.1016/J.VACCINE.2006.09.043, vol. 25, no. 5, 8 December 2006 (2006-12-08), pages 814-824, XP005798871, ISSN: 0264-410X, Available online 22-09-2006, the whole document

JOHN JOSEPH F.JR.: "Drug evaluation: tefibazumab - a monoclonal antibody against staphylococcal infection", CURRENT OPINION IN MOLECULAR THERAPEUTICS, CURRENT DRUGS, LONDON, GB, vol. 8, no. 5, 1 October 2006 (2006-10-01), pages 455-460, XP009138964, ISSN: 1464-8431, the whole document

HETHERINGTON SETH ET AL.: "Phase I dose escalation study to evaluate the safety and pharmacokinetic profile of tefibazumab in subjects with end-stage renal disease requiring hemodialysis", ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, OCT 2006, LNKD- PUBMED:17005843, vol. 50, no. 10, October 2006 (2006-10), pages 3499-3500, XP002601814, ISSN: 0066-4804, the whole document

REILLEY SANDRA ET AL.: "Open-label, dose escalation study of the safety and pharmacokinetic profile of tefibazumab in healthy volunteers", ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, MAR 2005, LNKD-PUBMED:15728889, vol. 49, no. 3, March 2005 (2005-03), pages 959-962, XP002601815, ISSN: 0066-4804, the whole document

SCHAFFER ADAM C. ET AL.: "Immunization with Staphylococcus aureus clumping factor B, a major determinant in nasal carriage, reduces nasal colonization in a murine model", INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, US, LNKD-DOI 10.1128/IAI.74.4.2145-2153.2006, vol. 74, no. 4, 1 April 2006 (2006-04-01), pages 2145-2153, XP002462561, ISSN: 0019-9567, the whole document

WO-A-9623896

WO-A2-2008121616

WO-A2-2006034488

HOLT L.J. ET AL.: "Domain antibodies: proteins for therapy", TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 21, no. 11, 1 November 2003 (2003-11-01), pages 484-490, XP004467495, ISSN: 0167-7799, the whole document

DAVIES J. ET AL.: "Affinity improvement of single antibody VH domains: residues in all three hypervariable regions affect antigen binding", IMMUNOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV, NL, vol. 2, no. 3, 1 September 1996 (1996-09-01), pages 169-179, XP004070292, ISSN: 1380-2933, the whole document

ELLIOTT T. ET AL.: "Antibody response to Staphylococcal slime and lipoteichoic acid", LANCET THE, LANCET LIMITED, LONDON, GB, vol. 360, no. 9349,

B1

031447

031447 B1

14 December 2002 (2002-12-14), page 1977, XP004795241,  
ISSN: 0140-6736, the whole document

HAMMONDS S.J. ET AL.: "Differentiation of enterococci from other group D streptococci by means of a specific monoclonal antibody", FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, BLACKWELL PUBLISHING, AMSTERDAM, NL, vol. 82, no. 1, 15 July 1991 (1991-07-15), pages 91-94, XP023971357, ISSN: 0378-1097, [retrieved on 1991-07-15], the whole document

WERGELAND H.I. ET AL.: "Antibodies to Staphylococcal Peptidoglycan and its Peptide Epitopes, Teichoic Acid, and Lipoteichoic Acid in Sera from Blood Donors and Patients with Staphylococcal Infections", JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, WASHINGTON, DC, US, vol. 27, no. 6, 1 June 1989 (1989-06-01), pages 1286-1291, XP002120750, ISSN: 0095-1137, the whole document

- 
- (57) Изобретение касается антител с улучшенными характеристиками, которые способны специфически связываться с SDR белками различных бактерий. Указанные антитела являются полностью антителами человека и могут быть использованы при терапии пациентов.

031447  
B1

B1  
—

031447  
—

Изобретение относится к областям биологии, иммунологии и медицины.

Грамположительные микроорганизмы вызывают большинство системных инфекций. Одним из важных членов этих грамположительных патогенов является *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*). Приблизительно 20% популяции являются долговременными носителями *S.aureus*. *S.aureus* может вызывать ряд заболеваний от незначительных инфекций кожи, таких как угри, импетиго (может также быть вызванным *Streptococcus pyogenes*), нарывы, фолликулярный целлюлит, фурункулы, карбункулы, экссудативный дерматоз и абсцессы, до опасных для жизни заболеваний, таких как пневмония, менингит, остеомиелит, эндокардит, синдром токсического шока (TSS) и септицемия. *S.aureus* является способным инфицировать все виды органов и тканей. Инфекции *S.aureus* возникают у иммунокомpetентных людей, так же как у людей с ослабленным иммунитетом. Приблизительно 50% инфекций в отделениях реанимации США вызваны этим патогеном. В США зарегистрировано триста тысяч случаев инфекций *S.aureus* в год, приводящих к 12000 случаям смерти (см. также Moran et al. NEMJ 355, 666-674 (2006)).

Главной проблемой является увеличивающаяся устойчивость *S.aureus* к антибиотикам. Устойчивый к метициллину *S.aureus* (MRSA) появился в 1960. Он был первоначально идентифицирован в учреждениях здравоохранения. Однако MRSA, по-видимому, присутствует в обществе среди лиц, которые не были госпитализированы. Лечение MRSA является сложным и дорогим из-за ограниченной чувствительности MRSA к антибиотикам. Однако доступно очень немного альтернатив среди антибиотиков. Банкомицин часто используют для лечения устойчивых к пенициллину MRSA. В патенте США 6939543 описано мышью антитело против липотеиховой кислоты (LTA), способное связывать *S.aureus*. На основе этого мышьего антитела получено рекомбинантное химерное мышью/человеческое антитело, содержащее константные домены человеческой тяжелой и легкой цепей. Однако такое химерное мышью/человеческое антитело обладает тем недостатком, что присутствуют мышьи последовательности, что включает в себя риск тяжелых побочных эффектов при введении человеку.

Целью изобретения является предоставление средств и способов противодействия связанным с грамположительными бактериями заболеваниями и/или их предотвращения. Следующей целью изобретения является предоставление альтернативных и/или улучшенных связывающих соединений против различных грамположительных бактерий, предпочтительно видов *Staphylococcus*, более предпочтительно MRSA. Следующей целью изобретения является предоставление человеческих связывающих соединений против различных грамположительных бактерий, предпочтительно видов *Staphylococcus*, более предпочтительно MRSA.

Настоящее изобретение относится к антителам, их антигенсвязывающим частям или иммуноглобулиновым цепям или их функциональным эквивалентам, способным специфически связывать виды *Staphylococcus* в их природной среде. Таким образом, они являются пригодными для противодействия нарушениям и/или для предотвращения и/или диагностики нарушений, связанных с присутствием видов *Staphylococcus*. Предпочтительно, противодействуют *S.aureus*. В особенно предпочтительном варианте осуществления противодействуют MRSA. Другим предпочтительным видом *Staphylococcus*, которому противодействуют, является *Staphylococcus epidermidis*.

*Staphylococcus epidermidis* обычно является непатогенным, но пациенты с ослабленной иммунной системой часто подвержены риску развития инфекции. Инфекции могут являться приобретенными, как в лечебном учреждении, так и в обществе, но они представляют более сильную угрозу пациентам лечебных учреждений. Наиболее чувствительными к инфекции *S.epidermidis* являются потребители внутрисинтетических лекарственных средств, новорожденные, пожилые люди и лица, использующие катетеры или другие искусственные приспособления. Инфекции ассоциированы с внутрисосудистыми устройствами (искусственные клапаны сердца, шунты и т.д.), но также часто возникают в протезированных суставах, катетерах и обширных ранах. Симптомы включают в себя лихорадку, головную боль, утомляемость, анорексию и диспноэ.

В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к выделенным или рекомбинантным человеческим антителам, их антигенсвязывающим частям или иммуноглобулиновым цепям или их функциональным эквивалентам, способным специфически связывать виды *Staphylococcus*. Человеческие антитела и их антигенсвязывающие части по изобретению являются способными связывать виды *Staphylococcus* в их природной среде, так что различным видам *Staphylococcus* противодействуют при введении указанных антител, их антигенсвязывающих частей или иммуноглобулиновых цепей или их функциональных эквивалентов. Указанные человеческие антитела, их антигенсвязывающие части или иммуноглобулиновые цепи или их функциональные эквиваленты по изобретению являются более пригодными для терапевтического и/или профилактического использования для человеческих индивидуумов, по сравнению с химерными антителами, из-за отсутствия не относящегося к человеку последовательностей. Это значительно снижает риск неблагоприятных побочных эффектов.

Одним из особенно предпочтительных антител в соответствии с настоящим изобретением является антитело, обозначенное "F1", которое обладает последовательностями вариабельного домена тяжелой

цепи и легкой цепи, как изображено на фиг. 1. Термин "F1", как применяют в настоящем документе, охватывает все F1 антитела, например выделенные или рекомбинантно полученные F1. Рекомбинантно полученные F1 в настоящем документе называют также "гF1". Последовательности CDR F1, которые, в частности, вносят вклад в свойства связывания антигена F1, также изображены на фиг. 1. Антитело F1 является полностью человеческим, является способным специфически связывать виды *Staphylococcus*, такие как *S.aureus* и *S.epidermidis*, и является, таким образом, предпочтительным для терапевтического использования у человеческих индивидуумов.

Важно, что антитело F1 является способным связывать цельные бактерии *in vivo*, так же как *in vitro*. Дополнительно представлено, таким образом, выделенное или рекомбинантное человеческое антитело или его функциональная часть, способные специфически связывать *S.aureus* и/или *S.epidermidis*. Более того, антитело F1 является способным связывать бактерии, выросшие в инфицированной ткани, например, животного. Таким образом, представлено выделенное антитело, связывающее выросший *in vivo* *S.aureus*, где "выросший *in vivo*" определяют как выросший на инфицированной ткани животного в ходе инфекции *S.aureus*. Представлена также выделенная, рекомбинантная или синтетическая иммуноглобулиновая цепь или ее функциональный эквивалент, содержащие по меньшей мере одну последовательность CDR вариабельной области человеческого иммуноглобулина, которая является специфической для *S.aureus* и/или *S.epidermidis*.

Функциональную часть антитела определяют как часть, обладающую по меньшей мере одним общим свойством, как указанное антитело, по виду, не обязательно по количеству. Указанная функциональная часть является способной связывать такой же антиген, как указанное антитело, хотя не обязательно до такой же степени. Функциональная часть антитела предпочтительно содержит однодоменное антитело, одноцепочечное антитело, наноантитело, юнитело, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), Fab фрагмент или F(ab')<sub>2</sub> фрагмент.

Функциональную часть антитела получают также изменением антитела, так что по меньшей мере одно свойство, предпочтительно свойство связывания антигена, результирующего соединения, является по существу, таким же по виду, но, не обязательно, по количеству. Это осуществляют многими способами, например, посредством консервативной аминокислотной замены, при которой аминокислотный остаток замещают другим остатком, в основном, со сходными свойствами (размер, гидрофобность и т.д.), так что общие функции, вероятно, не затронуты серьезно.

Как хорошо известно специалисту в данной области, тяжелая цепь антитела является большей из двух типов цепей, составляющих молекулу иммуноглобулина. Тяжелая цепь содержит константные домены и вариабельный домен, где вариабельный домен вовлечен в связывание антигена. Легкая цепь антитела является меньшей из двух типов цепей, составляющих молекулу иммуноглобулина. Легкая цепь содержит константный домен и вариабельный домен. Вариабельный домен является, вместе с вариабельным доменом тяжелой цепи, вовлеченным в связывание антигена.

Определяющие комплементарность области (CDR) представляют собой гипервариабельные области, присутствующие в вариабельных доменах тяжелой цепи и вариабельных доменах легкой цепи. CDR тяжелой цепи и связанной легкой цепи антитела вместе формируют антигенсвязывающий участок.

Функциональный эквивалент иммуноглобулиновой цепи определяют в настоящем документе как искусственное связывающее соединение, содержащее по меньшей мере одну последовательность CDR иммуноглобулиновой цепи.

Теперь, когда настоящее изобретение относится к открытию, что последовательности CDR, изображенные на фиг. 1, обеспечивают желательные характеристики связывания, специалист в данной области способен успешно получать варианты, содержащие по меньшей мере одну измененную последовательность CDR. Например, применяют консервативную аминокислотную замену. Возможно также изменять по меньшей мере одну последовательность CDR, изображенную на фиг. 1, чтобы получать вариант антитела или его функциональную часть, по меньшей мере с одним измененным свойством по сравнению с F1. Предпочтительно, предоставляют антитело или функциональную часть, содержащие последовательность CDR, по меньшей мере на 70% идентичные последовательности CDR, как изображено на фиг. 1, так что благоприятные характеристики связывания F1, по меньшей мере, частично сохранены или даже улучшены. Последовательность CDR, как изображено на фиг. 1, предпочтительно изменяют, так что полученное антитело или его функциональная часть обладает по меньшей мере одним улучшенным свойством, например, таким как улучшенная аффинность связывания, избирательность и/или стабильность, по сравнению с F1. Вариант антитела или его функциональные части, содержащие аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70% идентичной последовательности CDR, как изображено на фиг. 1, таким образом, также входят в объем настоящего изобретения. В данной области доступны различные способы для изменения аминокислотной последовательности. Например, последовательность тяжелой цепи или легкой цепи с желательной последовательностью CDR искусственно синтезируют. Предпочтительно, в последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность CDR, вносят мутации, например, с использованием случайного или сайт-специфического мутагенеза.

В одном варианте осуществления изобретение таким образом относится к антителу или его функ-

циональной части или к иммуноглобулиновой цепи или ее функциональному эквиваленту, содержащим последовательность CDR1 тяжелой цепи, содержащую последовательность, обладающую по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с последовательностью RFAMS (SEQ ID NO:1), и/или последовательность CDR2 тяжелой цепи, содержащую последовательность, обладающую по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с последовательностью SINNGNNPYYARSVQY (SEQ ID NO:2), и/или

последовательность CDR3 тяжелой цепи, содержащую последовательность, обладающую по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с последовательностью DHPSSGWPTFDS (SEQ ID NO:3).

Кроме того, представлено антитело или его функциональная часть, или иммуноглобулиновая цепь или его функциональные эквиваленты, содержащие

последовательность CDR1 легкой цепи, содержащую последовательность, обладающую по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с последовательностью RASENVGDWLA (SEQ ID NO:4), и/или

последовательность CDR2 легкой цепи, содержащую последовательность, обладающую по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с последовательностью KTSILES (SEQ ID NO:5), и/или

последовательность CDR3 легкой цепи, содержащую последовательность, обладающую по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с последовательностью QHYXRFPYT, где X представляет собой I или M (SEQ ID NO:6).

Вышеупомянутые последовательности CDR представляют собой последовательности CDR антитела F1; V<sub>H</sub> IgHV3-23 и V<sub>L</sub> IgKV1-5 и их варианты. Связывающие соединения, содержащие последовательности CDR по меньшей мере с 70% идентичностью последовательности с CDR F1, являются особенно подходящими для противодействия (эффектам) инфекциям и/или предотвращения (эффектов) инфекций *S.aureus* и/или *S.epidermidis*. Обнаружено, что вариант F1, содержащий V<sub>H</sub> IgHV3-23 и V<sub>L</sub> IgKV1-5, в котором изолейцин в CDR3 легкой цепи изменяли на метионин, еще являлся способным специфически связывать виды *Staphylococcus*, такие как *S.aureus* и *S.epidermidis*.

Предпочтительно, связывающее соединение по изобретению содержит последовательность CDR, которая является по меньшей мере на 75%, более предпочтительно по меньшей мере на 80%, более предпочтительно по меньшей мере на 85%, более предпочтительно по меньшей мере на 86%, более предпочтительно по меньшей мере на 87%, более предпочтительно по меньшей мере на 88%, более предпочтительно по меньшей мере на 89%, более предпочтительно по меньшей мере на 90% идентичной по меньшей мере одной из последовательностей CDR, изображенных на фиг. 1. Наиболее предпочтительно, связывающее соединение по изобретению содержит последовательность CDR, которая является по меньшей мере на 91%, более предпочтительно по меньшей мере на 92%, более предпочтительно по меньшей мере на 93%, более предпочтительно по меньшей мере на 94%, более предпочтительно по меньшей мере на 95% идентичной по меньшей мере одной из последовательностей CDR, изображенных на фиг. 1. Особенno предпочтительное антитело F1, описанное выше, содержит последовательности CDR, состоящие из последовательностей CDR, изображенных на фиг. 1. Особенno предпочтительный вариант осуществления по изобретению таким образом относится к выделенному, синтетическому или рекомбинантному антителу или его функциональному эквиваленту, способному специфически связывать *S.aureus* и/или *S.epidermidis* и содержащему

последовательность CDR1 тяжелой цепи, содержащую последовательность RFAMS (SEQ ID NO:1), и/или

последовательность CDR2 тяжелой цепи, содержащую последовательность SINNGNNPYYARSVQY (SEQ ID NO:2), и/или

последовательность CDR3 тяжелой цепи, содержащую последовательность DHPSSGWPTFDS (SEQ ID NO:3), и/или

последовательность CDR1 легкой цепи, содержащую последовательность RASENVGDWLA (SEQ ID NO:4), и/или

последовательность CDR2 легкой цепи, содержащую последовательность KTSILES (SEQ ID NO:5), и/или

последовательность CDR3 легкой цепи, содержащую последовательность QHYXRFPYT, где X представляет собой I или M (SEQ ID NO:6).

Один из вариантов осуществления относится к связывающему соединению, содержащему последовательности CDR1 и CDR2 тяжелой цепи и последовательности CDR1 и CDR2 легкой цепи, как изображено на фиг. 1, или последовательности, которые являются по меньшей мере на 70%, предпочтительно по меньшей мере на 75%, более предпочтительно по меньшей мере на 80%, более предпочтительно по меньшей мере на 81%, более предпочтительно по меньшей мере на 82%, более предпочтительно по меньшей мере на 83%, более предпочтительно по меньшей мере на 84%, более предпочтительно по меньшей мере на 85% идентичными им. Кроме того, таким образом, представлено выделенное, синтетическое или рекомбинантное антитело или его функциональная часть, или иммуноглобулиновая цепь или

ее функциональный эквивалент, содержащие последовательность CDR1 тяжелой цепи, содержащую последовательность, по меньшей мере на 70% идентичную последовательности RFAMS (SEQ ID NO:1), и последовательность CDR2 тяжелой цепи, содержащую последовательность, по меньшей мере на 70% идентичную последовательности SINNGNNPYYARSVQY (SEQ ID NO:2), и последовательность CDR1 легкой цепи, содержащую последовательность, по меньшей мере на 70% идентичную последовательности RASENVGDWLA (SEQ ID NO:4), и последовательность CDR2 легкой цепи, содержащую последовательность, по меньшей мере на 70% идентичную последовательности KTSILES (SEQ ID NO:5). Указанное связывающее соединение предпочтительно содержит последовательности CDR, которые являются по меньшей мере на 75%, более предпочтительно по меньшей мере на 80%, более предпочтительно по меньшей мере на 85%, более предпочтительно по меньшей мере на 86%, более предпочтительно по меньшей мере на 87%, более предпочтительно по меньшей мере на 88%, более предпочтительно по меньшей мере на 89%, более предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 91%, более предпочтительно по меньшей мере на 92%, более предпочтительно по меньшей мере на 93%, более предпочтительно по меньшей мере на 94%, наиболее предпочтительно по меньшей мере на 95% идентичными вышеупомянутым последовательностям CDR тяжелой цепи и последовательностям CDR легкой цепи. Предпочтительно, указанное связывающее соединение содержит также последовательность CDR3 тяжелой цепи, содержащую последовательность, которая является по меньшей мере на 70% идентичной последовательности DHPSSGWPTFDS (SEQ ID NO:3), и/или последовательность CDR3 легкой цепи, содержащую последовательность, которая является по меньшей мере на 70% идентичной последовательности QHYXRFPYT, где X представляет собой I или M (SEQ ID NO:6). Представлено также связывающее соединение, содержащее вышеупомянутые последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, так же как вышеупомянутые последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи.

Теперь, когда человеческое антитело, способное специфически связывать виды *Staphylococcus*, представлено по настоящему изобретению, стало возможным получение иммуноглобулиновой цепи или ее функционального эквивалента, содержащих по меньшей мере одну последовательность CDR вариабельного домена человеческого иммуноглобулина, которая является специфической для видов *Staphylococcus*. Кроме того, таким образом, представлена выделенная, рекомбинантная или синтетическая иммуноглобулиновая цепь или ее функциональный эквивалент, содержащий по меньшей мере одну последовательность CDR вариабельной области человеческого иммуноглобулина, которая является специфической для видов *Staphylococcus*. В предпочтительном варианте осуществления представлено человеческое антитело. Необходимо, указанную по меньшей мере одну человеческую последовательность CDR или по меньшей мере одну последовательность по меньшей мере в одной из каркасных областей оптимизируют, предпочтительно, для улучшения эффективности связывания или стабильности. Это выполняют, например, посредством экспериментов мутагенеза, где затем предпочтительно тестируют стабильность и/или эффективность связывания полученных соединений и отбирают улучшенное связывающее соединение.

Помимо оптимизации последовательностей CDR для улучшения эффективности связывания или стабильности, часто является преимущественным оптимизировать по меньшей мере одну последовательность по меньшей мере в одной из каркасных областей. Это предпочтительно выполняют для улучшения эффективности связывания или стабильности. Каркасные последовательности, например, оптимизируют посредством мутагенеза молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей такую каркасную последовательность, где затем предпочтительно тестируют характеристики полученного антитела или функциональной части. Таким образом, является возможным получать улучшенные антитела или функциональные части. В предпочтительном варианте осуществления человеческие зародышевые последовательности используют для каркасных областей в антителах или их функциональных частях или в иммуноглобулиновых цепях или функциональных эквивалентах по изобретению. Использование зародышевых последовательностей предпочтительно минимизирует риск иммуногенности указанных антител, иммуноглобулиновых цепей или функциональных эквивалентов или частей, поскольку эти последовательности менее вероятно содержат соматические изменения, которые являются уникальными для индивидуумов, от которых получены каркасные области, и могут вызывать иммуногенный ответ при введении другому человеческому индивидууму.

Представлены также антитела или их функциональные части или иммуноглобулиновые цепи, или их функциональные эквиваленты, содержащие аминокислотную последовательность тяжелой цепи, обладающую по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с последовательностью тяжелой цепи, как изображено на фиг. 1. Такая последовательность тяжелой цепи обеспечивает желательные связывающие свойства, как доказано посредством антитела F1. Более того, аминокислотные последовательности легкой цепи, обладающие по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с последовательностью легкой цепи, как изображено на фиг. 1, и последовательность легкой цепи, в которой изолейцин в CDR3 заменен на метионин, также обеспечивают желательные связывающие свойства, как доказано посредством антитела F1, и варианта антитела F1, содержащего указанное изменение. Кроме того, таким образом, представлено антитело или функциональная часть, или иммуноглобулиновая цепь, или функциональный эквивалент по изобретению, обладающие последовательностью тяжелой цепи, содер-

жающей последовательность, обладающую по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с последовательностью

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNNNPYYARSV

QYRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHSSGWPTFDSWGPGLTVSS (SEQ

ID NO:7),

и/или обладающие последовательностью легкой цепи, обладающей по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с последовательностью

DIQLTQSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILESGVPSRFS

GSGSGTEFTLTISLQPDDATYYCQHYXRFPYTFGQGTKEIKRTV,

где X представляет собой I или M (SEQ ID NO:8).

Разработано несколько вариантов антитела F1, помимо варианта, указанного в настоящем документе выше, в которых изолейцин в CDR3 легкой цепи заменен на метионин. Эти варианты являются способными связывать виды *Staphylococcus*. Примеры таких вариантов антител включают в себя антитела или функциональные части или иммуноглобулиновые цепи или функциональные эквиваленты по изобретению, обладающие последовательностью тяжелой цепи, содержащей последовательность

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNNNPYYARSV

QYRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHSSGWPTFDSWGPGLTVSS (SEQ

ID NO:9),

и/или последовательность

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNNNPYYARSV

QYRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHSSGWPTFDSWGPGLTVSS (SEQ

ID NO:7),

и последовательностью легкой цепи, содержащей последовательность

DIQLTQSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILESGVPSRFS

GSGSGTEFTLTISLQPDDATYYCQHYXRFPYTFGQGTKEIKRA,

где X представляет собой I или M (SEQ ID NO:10), и/или последовательность

DIQLTQSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILESGVPSRFS

GSGSGTEFTLTISLQPDDATYYCQHYXRFPYTFGQGTKEIKRTV,

где X представляет собой I или M (SEQ ID NO:11), и/или последовательность

DIQLTQSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILESGVPSRFS

GSGSGTEFTLTISLQPDDATYYCQHYXRFPYTFGQGTKEIKRTV,

где X представляет собой I или M (SEQ ID NO:8).

Антитело или функциональная часть или иммуноглобулиновая цепь или ее функциональный эквивалент по изобретению специфически связывает белки, содержащие серин-аспартатный (SD) повтор. Белки с повтором SD (Sdr) представляют собой ассоциированные с клеточной поверхностью белки, которые присутствуют в нескольких бактериях, таких как виды *Staphylococcus*. Белки Sdr, как правило, содержат аминоконцевую сигнальную последовательность, функциональный домен, называемый A областью, область повтора SD, проходящую через клеточную стенку область, мотив LPXTG, гидрофобный трансмембранный домен и серии положительно заряженных остатков. Мотив LFXTG является мишенью для транспептидазы, которая расщепляет мотив между остатками треонина и глицина и заакоривает белок на пептидогликане клеточной стенки грамположительных бактерий. Считают, что белки Sdr взаимодействуют с молекулами хозяина. Известные белки Sdr включают в себя ClfA (SdrA), ClfB (SdrB), SdrC, SdrD и SdrE *S.aureus*, SdrF, SdrG и SdrH *S.epidermidis*, SdrI *S.saprophyticus*, SdrX *S.capitis* и SdrY и SdrZ *S.caprae*.

Таким образом, предпочтительное антитело или его функциональная часть, или иммуноглобулиновая цепь, или функциональный эквивалент по изобретению специфически связывает *S.aureus*, *S.epidermidis*, *S.saprophyticus*, *S.capitis* и *S.caprae*. Является предпочтительным, чтобы указанное антитело, иммуноглобулиновая цепь или их функциональный эквивалент или часть связывали ClfA (SdrA), ClfB (SdrB), SdrC, SdrD и SdrE *S.aureus*, SdrF, SdrG и SdrH *S.epidermidis*, SdrI *S.saprophyticus*, SdrX *S.capitis*, и SdrY и SdrZ *S.caprae*. Эпитоп антитела, иммуноглобулиновой цепи или их функционального эквивалента или части по изобретению содержит зависимый от SD повтора эпипот в белках Sdr, например зависимые от SD повтора эпипоты, какие присутствуют в ClfA, ClfB, SdrC, SdrD и SdrE *S.aureus*. Зависимый от SD повтора эпипот определяют в настоящем документе как эпипот, узнаваемый антителом F1, где эпипот требует присутствия по меньшей мере части области повтора SD, какой присутствует, но без ограничения, в ClfA, ClfB, SdrC, SdrD и SdrE *S.aureus* и SdrF, SdrG и SdrH *S.epidermidis*. В одном варианте осуществления указанный эпипот может содержать по меньшей мере часть молекулы, которая связывает белок Sdr или является ассоциированной с белком Sdr. Такие молекулы включают в себя в качестве неограничивающих примеров аминокислоты, пептиды, белки, сахара и остатки сахаров. В другом варианте осуществления указанный эпипот содержит модификации области повтора SD. Указанные модификации включают в себя, в качестве неограничивающих примеров, гликозилирование, амидирование

и/или фосфорилирование. Специалисту в данной области понятно, что комбинация этих двух вариантов осуществления также возможна.

Таким образом, изобретение относится к антителу или функциональной части, или иммуноглобулиновой цепи, или функциональному эквиваленту по изобретению, способным связывать зависимый от повтора SD эпипот. Представлено также антитело или функциональная часть, или иммуноглобулиновая цепь, или функциональный эквивалент, способные связывать ClfA, ClfB, SdrC, SdrD и SdrE *S.aureus*. Кроме того, представлено антитело или функциональная часть, или иммуноглобулиновая цепь, или функциональный эквивалент, способные конкурировать с антителом или функциональной частью, или иммуноглобулиновой цепью, или функциональным эквивалентом в соответствии с настоящим изобретением за связывание с видами *Staphylococcus*, предпочтительно *S.aureus* и/или *S.epidermidis* и/или *S.saprophyticus* и/или *S.capitis* и/или *S.caprae*, более предпочтительно MRSA.

Недостатком антител является то, что их стабильность может снижаться, например, в жестких условиях. Например, может происходить дезамидирование, удаление функциональной амидной группы. Дезамидирование представляет собой путь деградации белка, который может влиять на биологические функции белков и который возникает в основном на остатках аспарагина, и до меньшей степени на остатках глутамина. В одном варианте осуществления, таким образом, дезамидирование антитела или его функциональной части или иммуноглобулиновой цепи или ее функционального эквивалента по изобретению предотвращают посредством замены аспарагина или глутамина на другую аминокислоту. Аспарагин предпочтительно заменяют на аминокислоту, отличную от глутамина, поскольку дезамидирование может также возникать на остатке глутамина. Замена аспарагина предпочтительно, по существу, не влияет на аффинность связывания антитела по изобретению с антигеном. В одном варианте осуществления дезамидирование аспарагина в положении 53 тяжелой цепи (нумерация в соответствии с Kabat, 1991) предотвращают посредством замены указанного аспарагина на другую аминокислоту. Посредством предотвращения дезамидирования аспарагина в положении 53 стабильность антитела или его функциональной части или иммуноглобулиновой цепи или ее функционального эквивалента по изобретению предпочтительно увеличивают. Как показано в примерах, несмотря на тот факт, что указанный аспарагин локализован в CDR, замена аспарагина в указанном положении, по существу, не влияет на аффинность связывания антигена антителом или его функциональной частью, или иммуноглобулиновой цепью или ее функциональным эквивалентом по изобретению. Аспарагин в положении 53 тяжелой цепи предпочтительно заменяют аминокислотой, отличной от глутамина, более предпочтительно аспарагин в указанном положении заменяют на серин. Таким образом, изобретение относится к антителу или функциональной части, или иммуноглобулиновой цепи, или функциональному эквиваленту по изобретению, где аспарагин, предпочтительно аспарагин в положении 53 тяжелой цепи, заменен на другую аминокислоту, предпочтительно, серин.

В одном варианте осуществления антитело или его функциональную часть или иммуноглобулиновую цепь или ее функциональный эквивалент по изобретению присоединяют к другой группе для формирования конъюгатов антитело-лекарственное средство. Антитело или его функциональную часть или иммуноглобулиновую цепь или ее функциональный эквивалент по изобретению, например, присоединяют к цитотоксическому средству, такому как антибиотик. Термин "цитотокическое средство", как применяют в настоящем документе, относится к веществу, которое уменьшает или блокирует функцию или рост бактерий и/или вызывает разрушение бактерий. Такую другую группу, например, цитотокическое средство, предпочтительно присоединяют к указанному антителу или его функциональной части через тиоловую группу. Таким образом, предпочтительно один или несколько остатков цистеина включают в указанное антитело или его функциональную часть или иммуноглобулиновую цепь или ее функциональный эквивалент. Остатки цистеина содержат тиоловую группу, и, таким образом, включение одного или нескольких остатков цистеина в антитело или его функциональную часть, или замена одной или нескольких аминокислот на один или несколько остатков цистеина антитела или его функциональной части по изобретению позволяет его присоединение к другой группе. Указанные один или несколько остатков цистеина предпочтительно вводят в антитело или его функциональный эквивалент по изобретению в положении, которое не влияет на сворачивание указанного антитела или его функционального эквивалента и не влияет на связывание антигена или эффекторную функцию. Изобретение, таким образом, относится к антителу или его функциональной части, или иммуноглобулиновой цепи или ее функциональному эквиваленту по изобретению, где по меньшей мере одну аминокислоту, отличную от цистеина, заменяют на цистein. Предпочтительно, по меньшей мере две аминокислоты, отличные от цистеина, заменяют на цистеин. В предпочтительном варианте осуществления указанная по меньшей мере одна аминокислота, отличная от цистеина, представляет собой валин в положении 15 легкой цепи, и/или аланин в положении 144 легкой цепи, и/или серин в положении 168 легкой цепи, и/или валин в положении 205 легкой цепи, и/или валин в положении 110 легкой цепи, и/или аланин в положении 84 тяжелой цепи, и/или аланин в положении 114 тяжелой цепи, и/или аланин в положении 168 тяжелой цепи, и/или серин в положении 172 тяжелой цепи, более предпочтительно валин в положении 205 легкой цепи и/или валин в положении 110 легкой цепи, и/или аланин в положении 114 тяжелой цепи (нумерация согласно Kabat, 1991). Специалисту в данной области хорошо понятно, что в качестве альтернативы или дополнени-

тельно одну или несколько других аминокислот тяжелой и/или легкой цепи можно заменять на цистеин, если замена не влияет на сворачивание указанного антитела или функционального эквивалента, и не влияет на связывание антигена или эффекторную функцию.

В международных патентных заявках WO 2006/034488, WO 2008/141044, WO 2009/052249, WO 2009/012256, WO 2009/012268 и WO 2009/099728 описаны способы конструирования антител с реакционноспособными остатками цистеина, также как положения аминокислот, пригодные для модификации с помощью цистеина.

Антитело или функциональная часть, или иммуноглобулиновая цепь, или функциональный эквивалент по изобретению предпочтительно содержит вариабельную последовательность тяжелой цепи и/или вариабельную последовательность легкой цепи, которая является по меньшей мере на 75%, более предпочтительно по меньшей мере на 80%, более предпочтительно по меньшей мере на 85%, более предпочтительно по меньшей мере на 90%, наиболее предпочтительно по меньшей мере на 95% идентичной последовательности тяжелой цепи и/или последовательности легкой цепи, как изображено на фиг. 1, или последовательности легкой цепи, как изображено на фиг. 1, в которой изолейцин в CDR3 заменен на метионин. Чем выше идентичность, тем более близко указанное связывающее соединение напоминает антитело F1. Антитело или функциональная часть, или иммуноглобулиновая цепь или функциональный эквивалент по изобретению предпочтительно содержит тяжелую цепь, так же как легкую цепь, которые напоминают тяжелую и легкую цепь F1. Кроме того, таким образом, представлено антитело или его функциональная часть, или иммуноглобулиновая цепь или ее функциональный эквивалент, содержащие последовательность тяжелой цепи и последовательность легкой цепи, которые являются по меньшей мере на 70%, более предпочтительно по меньшей мере на 80%, более предпочтительно по меньшей мере на 85%, более предпочтительно по меньшей мере на 90%, наиболее предпочтительно по меньшей мере на 95% идентичными последовательности тяжелой цепи и последовательности легкой цепи, как изображено на фиг. 1, или последовательности легкой цепи, как изображено на фиг. 1, в которой изолейцин в CDR3 заменен на метионин. В одном варианте осуществления представлено антитело или функциональная часть, обладающие последовательностью тяжелой цепи, как изображено на фиг. 1, и последовательностью легкой цепи, как изображено на фиг. 1, или последовательностью легкой цепи, как изображено на фиг. 1, в которых изолейцин в CDR3 заменен на метионин.

Один из вариантов осуществления относится к антителу или его функциональной части или иммуноглобулиновой цепи или ее функциональному эквиваленту, содержащему последовательность тяжелой цепи, состоящую из последовательности тяжелой цепи, как изображено на фиг. 1, и/или содержащему последовательность легкой цепи, состоящую из последовательности легкой цепи, как изображено на фиг. 1, или последовательности легкой цепи, как изображено на фиг. 1, в которой изолейцин в CDR3 заменен на метионин. Альтернативно, как хорошо известно специалисту в данной области, является возможным получать укороченную последовательность тяжелой цепи или легкой цепи при сохранении интересующего свойства связывания. Предпочтительно, получают такую укороченную тяжелую цепь или легкую цепь, которая обладает более короткой константной областью, по сравнению с исходной тяжелой или легкой целью. Вариабельный домен предпочтительно сохраняют. Например, получают Fab фрагмент или F(ab')<sub>2</sub> фрагмент или однодоменное антитело, или одноцепочечное антитело, или нанотело, или юнитело, или scFv фрагмент на основании последовательности тяжелой цепи или последовательности легкой цепи, изображенной на фиг. 1. Таким образом, представлена также функциональная часть антитела, содержащая по меньшей мере функциональную часть последовательности, как изображено на фиг. 1, или последовательность легкой цепи, как изображено на фиг. 1, в которой изолейцин в CDR3 изменен на метионин. Указанная функциональная часть обладает длиной по меньшей мере 20 аминокислот и содержит по меньшей мере одну последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательности, которая является по меньшей мере на 70% идентичной последовательности CDR1 тяжелой цепи, изображенной на фиг. 1, и последовательности, которая является по меньшей мере на 70% идентичной последовательности CDR2 тяжелой цепи, изображенной на фиг. 1, и последовательности, которая является по меньшей мере на 70% идентичной последовательности CDR3 тяжелой цепи, изображенной на фиг. 1, и последовательности, которая является по меньшей мере на 70% идентичной последовательности CDR1 легкой цепи, изображенной на фиг. 1, и последовательности, которая является по меньшей мере на 70% идентичной последовательности CDR2 легкой цепи, изображенной на фиг. 1, и последовательности, которая является по меньшей мере на 70% идентичной последовательности CDR3 легкой цепи, изображенной на фиг. 1, или последовательности CDR3 легкой цепи, как изображено на фиг. 1, в которой изолейцин заменен на метионин.

Изобретение, кроме того, относится к выделенной, синтетической или рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты или ее функциональному эквиваленту длиной по меньшей мере 15 нуклеотидов, предпочтительно по меньшей мере 30 нуклеотидов, более предпочтительно по меньшей мере 50 нуклеотидов, более предпочтительно по меньшей мере 75 нуклеотидов, кодирующему связывающее соединение по изобретению. Такую нуклеиновую кислоту, например, выделяют из В-клетки, способной продуцировать антитело по изобретению. Предпочтительный вариант осуществления относится к последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, обладающую по меньшей мере

70% идентичностью последовательности по меньшей мере с 15 нуклеотидами из последовательности нукleinовой кислоты, как изображено на фиг. 1. Последовательность нукleinовой кислоты по изобретению предпочтительно содержит последовательность, обладающую по меньшей мере 75%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, наиболее предпочтительно по меньшей мере 95% идентичностью последовательности по меньшей мере с 15 нуклеотидами из последовательности нукleinовой кислоты, как изображено на фиг. 1. Предпочтительно, указанная последовательность нукleinовой кислоты, как изображено на фиг. 1, содержит по меньшей мере одну кодирующую последовательность CDR.

Один из предпочтительных вариантов осуществления относится к выделенной, синтетической или рекомбинантной последовательности нукleinовой кислоты длиной по меньшей мере 15 нуклеотидов, или ее функциональному эквиваленту, кодирующему по меньшей мере одну последовательность CDR антитела или иммуноглобулиновой цепи по изобретению. Указанная последовательность нукleinовой кислоты предпочтительно кодирует по меньшей мере одну последовательность CDR, обладающую по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с областью CDR антитела F1. Последовательности нукleinовой кислоты, кодирующие области CDR F1, изображены на фиг. 1. Кроме того, таким образом, представлена выделенная, синтетическая или рекомбинантная последовательность нукleinовой кислоты, или ее функциональный эквивалент, содержащий последовательность, обладающую по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из

```

cgcttgccatgagc          (SEQ      ID      NO:12),
tcgatcaataatggaaataaccatactacgcacggtcgtacaatac  (SEQ      ID
NO:13), gatcacccttagttagtggctggcccaccttgactcc (SEQ ID NO: 14),
cggggcagtggaaaacgttggactggttggcc (SEQ      ID      NO: 15),
aagacatctattctagaaagt (SEQ      ID      NO: 16)   и
caacactatatacgttccgtacact (SEQ ID NO: 17).

```

Указанная последовательность нукleinовой кислоты или функциональный эквивалент предпочтительно содержит последовательность, обладающую по меньшей мере 75%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с любой из вышеупомянутых последовательностей. Кроме того, представлена последовательность нукleinовой кислоты или ее функциональный эквивалент, содержащие последовательность, обладающую по меньшей мере 70% идентичностью последовательности по меньшей мере с частью нуклеотидной последовательности, как изображено на фиг. 1, где указанная часть содержит по меньшей мере 15 нуклеотидов и кодирует по меньшей мере одну область CDR.

Последовательность нукleinовой кислоты или ее функциональный эквивалент в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно кодирует область, обладающую по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с областью CDR F1, тяжелой цепью F1 и/или легкой цепью F1. Один из вариантов осуществления, таким образом, относится к выделенной, синтетической или рекомбинантной последовательности нукleinовой кислоты, или ее функциональному эквиваленту, содержащему последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с последовательностью RFAMS (SEQ ID NO:1), и/или по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с последовательностью SINNNNPYYARSVQY (SEQ ID NO:2), и/или по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с последовательностью DHPSSGWPTFDS (SEQ ID NO:3), и/или по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с последовательностью RASENVGDWLA (SEQ ID NO:4), и/или по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с последовательностью KTSILES (SEQ ID NO:5), и/или по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с последовательностью QHYXRFPYT, где X представляет собой I или M (SEQ ID NO:6), и/или по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с последовательностью EVQLLESGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNNNPYYARSV

```

QYRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSGWPTFD SWGPGLTVSS (SEQ
ID NO:7),

```

и/или по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с последовательностью  
DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILES GVP SRFS  
GSGSGTEFTLTISLQPDDATYYCQHYXRFPYTFGQGTKEIKRTV,

где X представляет собой I или M (SEQ ID NO:8). Представлены также последовательности нукleinовой кислоты или их функциональные эквиваленты, кодирующие варианты антитела F1 по изобретению. По изобретению представлены, например, последовательности нукleinовой кислоты, кодирующие последовательность тяжелой цепи, содержащую последовательность

```

EVQLVEGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNNNPYYARSV

```

```

QYRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSGWPTFD SWGPGLTVSS (SEQ
ID NO:9),

```

и/или последовательность

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNNNPYYARSV

QYRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSGWPTFDSWGPGTLTVSS (SEQ

ID NO:7),

и кодирующие последовательность легкой цепи, содержащую последовательность

DIQLTQSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILESGVPSRFS

GSGSGTEFTLTISLQPDDATYYCQHYXRFPYTFGQGTKLEIKRA,

где X представляет собой I или M (SEQ ID NO: 10), и/или последовательность

DIQLTQSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILESGVPSRFS

GSGSGTEFTLTISLQPDDATYYCQHYXRFPYTFGQGTKVEIKRTV,

где X представляет собой I или M (SEQ ID NO:8).

В одном варианте осуществления аспарагин в положении 53 тяжелой цепи (нумерация согласно Kabat, 1991) заменяют на другую аминокислоту, отличную от глутамина, для предотвращения дезамидирования аспарагина в указанном положении. Предпочтительно, указанный аспарагин заменяют на серин.

Термин "% идентичности последовательности" определяют в настоящем документе как процент остатков в последовательности аминокислот или нуклеиновой кислоты - кандидате, являющихся идентичными остаткам в контрольной последовательности после выравнивания двух последовательностей и введения пропусков, если необходимо, для достижения максимального процента идентичности. Способы и компьютерные программы для выравнивания хорошо известны в данной области.

Как применяют в настоящем документе, молекула нуклеиновой кислоты или последовательность нуклеиновой кислоты по изобретению предпочтительно содержит цепь из нуклеотидов, более предпочтительно ДНК и/или РНК. В других вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты или последовательность нуклеиновой кислоты по изобретению содержит другие виды структур нуклеиновой кислоты, например спираль ДНК/РНК, пептидную нуклеиновую кислоту (PNA), запертую нуклеиновую кислоту (LNA) и/или рибозим. Такие другие структуры нуклеиновой кислоты обозначают как функциональные эквиваленты последовательности нуклеиновой кислоты. Термин "функциональный эквивалент последовательности нуклеиновой кислоты" включает в себя также цепь, содержащую неприродные нуклеотиды, модифицированные нуклеотиды и/или ненуклеотидные строительные блоки, обладающие такой же функцией, как природные нуклеотиды.

Последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением является особенно пригодной для получения связывающих соединений, являющихся специфическими для *S.aureus* и/или *S.epidermidis*. Это, например, осуществляют введением такой последовательности нуклеиновой кислоты в клетку, так что аппарат клетки для трансляции нуклеиновых кислот может получать кодированное связывающее соединение. В одном варианте осуществления гены, кодирующие тяжелую и/или легкую цепь по изобретению, экспрессируют в так называемых клетках-продуцентах, например, таких как клетки яичников китайского хомяка (CHO), NSO (миелома мыши) или линия клеток 293(T), некоторые из которых адаптированы для коммерческого получения антител. Пролиферация указанных клеток-продуцентов приводит к линии клеток-продуцентов, способной производить антитела или их функциональные части в соответствии с настоящим изобретением. Предпочтительно, указанная линия клеток-продуцентов является пригодной для продукции соединений для использования для человека. Таким образом, указанная линия клеток-продуцентов является предпочтительно свободной от патогенных агентов, таких как патогенные микроорганизмы. Наиболее предпочтительно, связывающие соединения, состоящие из человеческих последовательностей, получают с использованием последовательности нуклеиновой кислоты по изобретению.

Таким образом, представлена также клетка, производящая выделенное или рекомбинантное антитело, способная производить антитело или функциональную часть, или иммуноглобулиновую цепь, или функциональный эквивалент по изобретению, также как способ получения антитела или функциональной части или иммуноглобулиновой цепи или функционального эквивалента по изобретению, включающий в себя предоставление клетки с последовательностью нуклеиновой кислоты или функционального эквивалента по изобретению и обеспечение возможности указанной клетке транслировать указанную последовательность нуклеиновой кислоты или функциональный эквивалент по изобретению, таким образом, производя указанное антитело или функциональную часть, или иммуноглобулиновую цепь или функциональный эквивалент по изобретению.

Производящую антитело клетку определяют в настоящем документе как клетку, способную производить и/или секретировать антитело или его функциональную часть, и/или способную развиваться в клетку, способную производить и/или секретировать антитело или его функциональную часть. Производящая антитело клетка по изобретению предпочтительно представляет собой клетку-продуцент, адаптированную для коммерческой продукции антител. Предпочтительно, указанная клетка-продуцент

является пригодной для продукции соединений для использования для человека.

Способ по изобретению предпочтительно дополнительно включает стадию сбора, очистки и/или выделения указанного антитела или функциональной части, или иммуноглобулиновой цепи или функционального эквивалента по изобретению. Полученные таким образом связывающие соединения по изобретению предпочтительно используют для диагностики инфекции *Staphylococcus*, выделения или детекции бактерий *Staphylococcus*, установления различий между видами *Staphylococcus* и другими грам-положительными бактериями, и терапии человека, необязательно, после дополнительной очистки, выделения и/или других стадий переработки.

Антитело или его функциональная часть или иммуноглобулиновая цепь или ее функциональный эквивалент в соответствии с настоящим изобретением являются особенно пригодными для диагностических применений. Например, образец, такой как образец ткани или крови, можно получать от индивидуума или из любого другого источника с подозрением на инфекцию бактериями *Staphylococcus*, предпочтительно *S.aureus* и/или *S.epidermidis*, более предпочтительно MRSA. Затем указанный образец можно смешивать с антителом или иммуноглобулиновой цепью или их функциональным эквивалентом или частью по изобретению. Указанное антитело, иммуноглобулиновая цепь или функциональный эквивалент или часть могут специфически связываться с бактериями *Staphylococcus*, предпочтительно *S.aureus* и/или *S.epidermidis*. Бактерии, связанные с антителом, иммуноглобулиновой цепью, или функциональным эквивалентом или частью, можно выделять из образца с использованием любого способа, известного в данной области, например, но без ограничения, выделения с использованием магнитных бусин, покрытых стрептавидином бусин, или выделения посредством использования вторичных антител, иммобилизованных на колонке. После промывки связанных бактерий и антитела, иммуноглобулиновой цепи или их функционального эквивалента или части, бактерии можно элюировать с указанного антитела, иммуноглобулиновой цепи или функционального эквивалента или части любым способом, известным в данной области. Например, связывание между бактериями и антителом, иммуноглобулиновой цепью или функциональным эквивалентом или частью можно разрушать посредством увеличения концентрации солей и/или уменьшения или увеличения pH, и/или посредством добавления избытка эпитопа.

Выделение бактерий *Staphylococcus*, предпочтительно *S.aureus* и/или *S.epidermidis*, можно использовать для различных применений. Например, инфекция несколькими различными грамположительными бактериями может приводить к перекрывающимся симптомам у индивидуума. В таких случаях трудно различить *S.aureus* и/или *S.epidermidis* и другие грамположительные бактерии. Антитело, иммуноглобулиновую цепь или их функциональный эквивалент или часть в соответствии с настоящим изобретением можно затем использовать для детекции присутствия *S.aureus* и/или *S.epidermidis*, или для установления различий между *S.aureus* и/или *S.epidermidis* и другими бактериями. Выделение бактерий из образца от индивидуума, как подозревают, страдающего инфекцией *S.aureus* и/или *S.epidermidis*, или из любого другого источника, такого как бактериальная культура, может облегчать детекцию указанных бактерий *Staphylococcus*, поскольку выделение приводит к увеличенной концентрации и/или более высокой чистоте указанных бактерий *Staphylococcus*.

Выделение видов *Staphylococcus*, предпочтительно *S.aureus* и/или *S.epidermidis*, более предпочтительно MRSA, можно, например, далее использовать для идентификации специфического штамма *S.aureus* и/или *S.epidermidis*, предпочтительно штамма MRSA, в образце. Идентификацию указанного штамма можно, например, проводить посредством определения последовательности бактериальной ДНК. В таком случае является предпочтительным сначала получить выделенный *S.aureus* и/или *S.epidermidis*.

В одном варианте осуществления изобретения антитело, иммуноглобулиновую цепь или их функциональный эквивалент или часть в соответствии с настоящим изобретением метят, чтобы получить возможность детекции указанного антитела, иммуноглобулиновой цепи, или функционального эквивалента или части, например, но без ограничения, флуоресцентно метят или радиоактивно метят. Альтернативно, антитело или его функциональную часть или иммуноглобулиновую цепь или ее функциональный эквивалент по изобретению детектируют с использованием меченого вторичного антитела, направленного против указанного антитела, иммуноглобулиновой цепи, или их функционального эквивалента или части по изобретению. Если связывание указанного антитела, иммуноглобулиновой цепи, или их функционального эквивалента или части детектируют, *S.aureus* и/или *S.epidermidis* присутствует.

Изобретение, таким образом, относится к использованию антитела или его функциональной части, или иммуноглобулиновой цепи или ее функционального эквивалента по изобретению для диагностики инфекции *Staphylococcus*, предпочтительно инфекции *S.aureus*, более предпочтительно инфекции MRSA, для детекции *S.aureus* и/или *S.epidermidis*, предпочтительно MRSA, и для установления различий между *S.aureus* и/или *S.epidermidis*, предпочтительно MRSA, и другими грамположительными бактериями. Представлено также антитело или его функциональная часть, или иммуноглобулиновая цепь или ее функциональный эквивалент по изобретению для использования для диагностики инфекции *Staphylococcus*, предпочтительно инфекции *S.aureus*, более предпочтительно инфекции MRSA.

Кроме того, представлен способ выделения бактерий *S.aureus* и/или *S.epidermidis* из раствора с использованием антитела или функциональной части, или иммуноглобулиновой цепи или ее функциональ-

ного эквивалента по изобретению. Указанный способ предпочтительно включает предоставление образца от индивидуума, как подозревают, страдающего инфекцией *S.aureus* и/или *S.epidermidis*, предпочтительно MRSA, или из любого другого источника, такого как бактериальная культура, добавление антитела или функциональной части, или иммуноглобулиновой цепи или ее функционального эквивалента по изобретению к указанному образцу, обеспечение возможности связывания указанного антитела или функциональной части или иммуноглобулиновой цепи или ее функционального эквивалента по изобретению с бактериями *S.aureus* и/или *S.epidermidis*, если они присутствуют, и выделение бактерий *S.aureus* и/или *S.epidermidis*, связанных с антителом или функциональной частью, или иммуноглобулиновой цепью или ее функциональным эквивалентом по изобретению, из указанного образца.

Теперь, когда представлены специфические для грамположительных бактерий связывающие соединения по изобретению и кодирующие их последовательности нуклеиновой кислоты, включая человеческие связывающие соединения, стали возможными улучшенные терапевтические применения. Грамположительным бактериям, таким как *S.aureus* и/или *S.epidermidis*, противодействуют посредством связывающих соединений по изобретению. Связывающее соединение по изобретению, таким образом, является особенно пригодным для использования в качестве лекарственного или профилактического средства. Предпочтительно, используют связывающие соединения, состоящие из человеческих последовательностей, или обладающие не более 5% не относящихся к человеку последовательностей, чтобы уменьшить шанс неблагоприятных побочных эффектов при лечении человеческих индивидуумов. Таким образом, посредством этого, также предоставляют антитело или функциональную часть или иммуноглобулиновую цепь или ее функциональный эквивалент, или последовательность нуклеиновой кислоты или ее функциональный эквивалент по изобретению для использования в качестве лекарственного и/или профилактического средства. Когда вводят нуклеиновую кислоту или функциональный эквивалент по изобретению, они могут быть транслированы *in situ* в связывающее соединение по изобретению. В особенно предпочтительном варианте осуществления указанное антитело содержит антитело F1, или его функциональную часть. Указанное лекарственное или профилактическое средство предпочтительно используют для противодействия или по меньшей мере частичного предотвращения инфекции *S.aureus* и/или *S.epidermidis* или для противодействия неблагоприятным эффектам или, по меньшей мере, частичного предотвращения неблагоприятных эффектов инфекции *S.aureus* и/или *S.epidermidis*. Кроме того, таким образом, представлено антитело или функциональная часть, или иммуноглобулиновая цепь или ее функциональный эквивалент, или последовательность нуклеиновой кислоты или ее функциональный эквивалент по изобретению для использования в качестве лекарственного и/или профилактического средства для по меньшей мере частичного лечения и/или предотвращения состояния, связанного с *S.aureus* и/или *S.epidermidis*. Неограничивающие примеры таких состояний представляют собой инфекции кожи, угри, импетиго, нарыва, фолликулярный целлюлит, фурункулы, карбункулы, экссудативный дерматоз, абсцессы, пневмонию, менингит, остеомиелит, эндокардит, синдром токсического шока и септициемию. Предпочтительно, противодействуют инфекции или по меньшей мере частично предотвращают инфекцию *S.aureus*. Наиболее предпочтительно, противодействуют связанному с MRSA состоянию, уменьшают и/или по меньшей мере частично предотвращают связанное с MRSA состояние. Таким образом, представлено также использование антитела или функциональной части или иммуноглобулиновой цепи или ее функционального эквивалента, или последовательности нуклеиновой кислоты или ее функционального эквивалента по изобретению для получения лекарственного и/или профилактического средства для по меньшей мере частичного лечения и/или предотвращения инфекции *S.aureus* и/или *S.epidermidis*, также как способ, по меньшей мере, частичного лечения или предотвращения состояния, связанного с *S.aureus* и/или *S.epidermidis*, где способ включает введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества антитела или функциональной части, или иммуноглобулиновой цепи или функционального эквивалента по изобретению, предпочтительно после диагностики указанного индивидуума как инфицированного *S.aureus* и/или *S.epidermidis*. Указанное состояние предпочтительно включает в себя по меньшей мере одно из связанных с *S.aureus* состояний, перечисленных выше, наиболее предпочтительно, связанных с MRSA состояние.

Указанное антитело предпочтительно содержит антитело F1, или его функциональную часть.

Чтобы противодействовать грамположительным бактериям, связывающее соединение по изобретению предпочтительно вводят индивидууму до того, как инфекция имеет место. Альтернативно, связывающее соединение по изобретению вводят, когда индивидуум уже инфицирован. Указанное связывающее соединение предпочтительно вводят индивидуумам с увеличенным риском осложнений, например, таким как госпитализированные индивидуумы и/или индивидуумы с ослабленным иммунитетом. Пожилые люди также обладают увеличенным риском связанных с бактериями состояний. Связывающие соединения по изобретению предпочтительно вводят посредством одной или нескольких инъекций. Диапазоны доз связывающих соединений по изобретению, подлежащих использованию для терапевтических применений, как описано в настоящем документе ранее, разрабатываются на основании исследований повышенющейся дозы в клинике в клинических исследованиях, для которых существуют строгие требования к протоколу. Типичные дозы лежат в диапазоне между 0,1 и 10 мг на кг массы тела. Для терапевтического использования связывающие соединения по изобретению, как правило, комбинируют с фарма-

цевитически приемлемым носителем, разбавителем и/или наполнителем. Примеры пригодных носителей, например, включают в себя гемоцианин морского блюдечка (KLH), сывороточный альбумин (например, BSA или RSA) и овальбумин. В одном предпочтительном варианте осуществления указанного пригодный носитель содержит раствор, подобный, например, солевому раствору.

В другом варианте осуществления используют нуклеиновую кислоту, кодирующую связывающее соединение по изобретению. Как уже описано, при введении такой нуклеиновой кислоты связывающие соединения продуцирует аппарат хозяина.

Продуцированные связывающие соединения являются способными предотвращать инфекцию грамположительными бактериями и/или неблагоприятные эффекты такой инфекции и/или противодействовать им. Таким образом, посредством этого представлена также последовательность нуклеиновой кислоты или функциональный эквивалент по изобретению для использования в качестве лекарственного и/или профилактического средства. Такую нуклеиновую кислоту предпочтительно используют для противодействия *S.aureus* и/или *S.epidermidis*, более предпочтительно *S.aureus*, наиболее предпочтительно MRSA. Кроме того, таким образом, представлено использование последовательности нуклеиновой кислоты или функционального эквивалента по изобретению для получения лекарственного и/или профилактического средства для по меньшей мере частичного лечения и/или предотвращения связанного с грамположительными бактериями состояния. Указанное связанное с грамположительными бактериями состояние предпочтительно включает в себя инфекцию *S.aureus* или *S.epidermidis*, более предпочтительно инфекцию *S.aureus*, наиболее предпочтительно инфекцию MRSA.

Кроме того, представлена фармацевтическая композиция, содержащая антитело или функциональную часть или иммуноглобулиновую цепь или ее функциональный эквивалент, или последовательность нуклеиновой кислоты или ее функциональный эквивалент по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или наполнитель. Указанная фармацевтическая композиция предпочтительно является пригодной для использования для человека.

Изобретение дополнительно объясняено в следующих примерах. Эти примеры не ограничивают объем изобретения, но просто служат для разъяснения изобретения.

Содержание всех патентных документов и других публикаций, на которые ссылаются в подробном описании, приведено в настоящем документе в качестве ссылок для всех целей.

### **Примеры**

Пример 1.

Методы.

Выделение В-клеток.

В-клетки получали из свежей крови взрослых посредством разделения на фиколле и отрицательного отбора по CD4/CD8 с помощью микробусин MACS, как описано производителем (Miltenyi Biotech). Для получения В-клеток памяти клетки сортировали по CD19<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> CD27<sup>+</sup>IgD IgA на FACSaria (Becton Dickinson). Использование этих тканей было одобрено медицинским этическим комитетом института и было в соответствии с информированным согласием. Доноров отбирали на основании носительства приобретенных в медицинском учреждении штаммов MRSA с кластерами генотипов 109 и 16.

Культура клеток.

В-клетки, поддерживаемые в стандартной культуральной среде, содержащей IMDM (Gibco), 8% FBS (HyClone) и пенициллин/стрептомицин (Roche), совместно культивировали на  $\gamma$ -облученных (50 Гр) L-клетках фибробластах мыши, стабильно экспрессирующих CD40L (CD40L-L-клетки,  $10^5$  клеток/мл), и с рекомбинантным мышьенным IL-21 (25 нг/мл, R&D systems). rhIL-4 (R&D) использовали при 50 нг/мл. Клетки общепринятым образом тестировали посредством ПЦР, и обнаружили, что они являются отрицательными по присутствию микоплазмы и EBV (данные не представлены).

Тотальные трансдуцированные человеческие В-клетки памяти, двойные положительные по NGFR и GFP, очищали сортировкой клеток на FACS и культивировали в 96-луночных планшетах при плотности клеток 500 клеток на лунку. Культуральные супернатанты тестировали в ELISA с использованием бактериальных лизатов штаммов Newman и SH1000. Положительные культуры субклонировали при плотности клеток 10 клеток/лунку в 96-луночных планшетах и снова тестировали посредством ELISA. Затем положительные культуры рассеивали при 1 клетке на лунку и снова тестировали посредством ELISA по реакционной способности против штаммов Newman и SH1000 *S.aureus*.

Ретровирусная трансдукция.

Ретровирусная конструкция BCL6 описана ранее (Shvarts A. et al. Genes Dev 16, 681-686 (2002)). кДНК, кодирующая Bcl-xL человека, любезно предоставлена Dr. Stanley Korsmeyer. BCL6 и Bcl-xL по отдельности клонировали в конструкцию BCL6-NGFR и BclxL-GFP. Эти конструкции трансфицировали в упаковывающие ретровирусы клетки LZRS, phoenix, как описано ранее (Jaleco A.C. et al. Blood 94, 2637-2646 (1999); Scheeren F.A. et al. Nat. Immunol., 6, 303-313 (2005)). Проводили двойную трансдукцию В-клеток памяти содержащими BCL6 и Bcl-xL ретровирусами после активации на клетках CD40L-L в присутствии rmIL-21 в течение 36 ч, как описано ранее (Diehl S.A. et al. J. Immunol., 180, 4805-4815 (2008); Kwakkenbos M. et al. Nat. Med. in press (2009)). Трансдуцированные клетки поддерживали на клетках CD40L-L с rmIL-21.

### ELISA.

Для определения содержания антител планшеты для ELISA покрывали антителами против IgG человека (Jackson ImmunoResearch Laboratories) при 5 мкг/мл в PBS в течение 1 ч при 37°C или о/н при 4°C и промывали буфером для промывки ELISA (PBS, 0,5% Твин-20). 4% молоко в PBS использовали в качестве блокирующего агента, до добавления серийных разведений супернатантов культур клеток и коньюгированного с ферментом антитела для детекции (разведение 1:2500 для HRP-коньюгированного анти-IgG (Jackson)). TMB субстрат/останавливающий раствор (Biosource) использовали для проявления ELISA.

Для целей скрининга авторы настоящего изобретения использовали лизаты из штаммов Newman и SH1000. Оба были выполнены в PBS и непосредственно нанесены в качестве покрытия при 5-10 мкг мл<sup>-1</sup> перед тестированием супернатантов культур В-клеток без разведения или в разведении 1:2.

Для исследования антигенной специфичности клона F1 человеческого IgG1 разработан ELISA для детекции LTA. Очищенные препараты LTA из *S.aureus*, *B.subtilis*, *S.faecalis* и *S.ruogenes* (Sigma) добавляли в планшеты для ELISA, покрытые очищенными поликлональными IgG мыши против LTA (1/200 исходного раствора 1 мг мл<sup>-1</sup>, QED Bioscience), перед добавлением вторичных антител.

Кроме того, авторы настоящего изобретения тестировали несколько препаратов LTA, полученных из библиотеки, разработанной W. Fischer (Institut für Biochemie, Univ of Erlangen, Germany) и любезно предоставленной B. Appelmelk (VU, Amsterdam, Netherlands) (см. более подробно (Keller R. et al. Infect Immun 60, 3664-3672 (1992), Polotsky V.Y. et al. Infection and Immunity, 64, 380-383 (1996) и Greenberg J. W. et al. Infection and Immunity, 64, 3318-3325 (1996)) и обзор в (Weidenmaier C. et al. Nat. Rev. Microbiol., 6, 276-287 (2008)) в прямых ELISA. Проводили покрытие препаратами LTA при 1 мкг мл<sup>-1</sup> перед добавлением rF1 (10 мкг мл<sup>-1</sup>) или контрольных антител (супернатант гибридомы в разведении 1:5) и дальнейшей детекцией с помощью коньюгированных антител против антител человека или мыши. Панель очищенных препаратов LTA включала в себя: *B.subtilis*, *S.aureus*, *L.lactis*, *L.garvieae*, *B.bifidum*, *M.luteus*, *L.casei*, *L.mesenteroides*, *B.licheniformis*, *L.welshimeri*, *E.hirae*, *L.raffinolactis*, *S.mutans*, *S.pneumoniae*. Некоторые варианты содержали или не содержали остатков аланина и/или липидных якорей (не показано в настоящем документе).

### Связывание антитела F1 с культурами бактерий.

Использовали штамм Newman *S.aureus* и штамм *S.pneumoniae* (серотип 3). Newman культивировали в TSH 50 мл О/Н, затем 1 мл ресусцидировали в 100 мл в течение 2-2,5 ч до OD:1 и собирали бактерии. *S.pneumoniae* культивировали в среде Todd-Hьюита, смешанной со средой для дрожжей. Перед тем как бактерии инкубировали с антителом F1, контрольным IgG (D25, антитело человека против RSV) или только с вторичным антителом (только IgG-PE), клетки предварительно обрабатывали 100% тотальной сывороткой мыши для предотвращения фонового окрашивания. После промывки добавляли вторичное антитело (IgG-PE). Инкубации с антителами проводили в течение 20 мин на льду.

### Определение последовательности F1 и клонирование для экспрессии.

Авторы настоящего изобретения выделяли тотальную РНК с использованием Trizol (Invitrogen), получали кДНК с использованием superscript RT, проводили ПЦР и клонировали вариабельные области тяжелой и легкой цепи в клонирующий вектор pCR2.1 TA (Invitrogen). Чтобы исключить индуцированные обратной транскриптазой или ДНК-полимеразой мутации, авторы настоящего изобретения проводили несколько независимых экспериментов клонирования. Для получения рекомбинантного mAb F1 авторы настоящего изобретения клонировали вариабельные области тяжелой и легкой цепи F1 в рамке с константными областями человеческих IgG1 и каппа в векторе на основе pcDNA3.1 (Invitrogen) и временно трансфицировали клетки 293T. Авторы настоящего изобретения очищали рекомбинантный F1 из культурального супернатанта с помощью белка A.

### Результаты.

#### Получение клона F1.

От трех субъектов, которые были тестированы как положительные по MRSA, но не были больны, отбирали 50-60 мл крови с гепарином, и периферические В-клетки выделяли после стадии очистки на фиколле. Проводили двойную трансдукцию В-клеток из нескольких популяций В-клеток ретровирусами, содержащими BCL6-NGFR и Bcl-xL-GFP (Diehl et al. и Kwakkenbos et al.). Из положительной по IgG, CD27 популяции, поликлональные мини-культуры из культур В-клеток начинали в 96-луночном планшете при плотности клеток 500 клеток/лунку. Супернатант этих мини-культур собирали и использовали в ELISA для скрининга по присутствию специфических для *S.aureus* антител IgG (в этих ELISA покрытие представляло собой лизаты клеток двух штаммов *S.aureus*, SH1000 и Newman). Мини-культуры, положительные в скрининге по SH1000, так же как по Newman *S.aureus*, рассевали в новых мини-культурах при плотности 10 клеток/лунку. Снова, супернатант этих мини-культур собирали и проводили скрининг в ELISA на SH1000 и Newman. Клоны, положительные в скрининге в обоих ELISA, рассевали в моноклональные культуры (т.е. 1 клетка/лунку). После тестирования супернатанта этих моноклональных культур, обнаружили, что один клон (названный F1) продуцирует специфические для *S.aureus* моноклональные антитела IgG.

Антитела в супернатанте клона F1 связывают препараты LTA из *S.aureus*.

Получая клон F1, авторы настоящего изобретения уже обнаружили, что супернатант F1 связывал лизаты бактериальных клеток двух штаммов *S.aureus*, SH1000 и Newman. Основным соединением клеточной стенки грамположительных бактерий является LTA, и таким образом, авторы настоящего изобретения решили протестировать связывание супернатанта F1 с препаратами LTA *S.aureus* в ELISA. Как показано в таблице, супернатант клона F1 связывается с лизатами бактериальных клеток штамма SH1000 и Newman *S.aureus*, а также с коммерчески закупленными очищенными препаратами LTA *S.aureus*. Авторы настоящего изобретения отметили, однако, что связывание с препаратами LTA было значимо ниже, чем наблюдаемое для цельных бактерий.

Супернатант клона F1 связывается с препаратами LTA *S.aureus*. В качестве отрицательного контроля использовали конъюгированное с HRP вторичное антитело против антител мыши. Другой контроль представлял собой антитело против вируса гриппа, детектирующее только белок H3 вируса гриппа.

	клон F1 против LTA	антитело мыши против LTA вируса гриппа	
		контрольн. антитела против	
SH1000	1,004	-0,010	-0,007
Newman	0,753	-0,007	0,007
SA LTA (siam)	0,176	-0,005	-0,009
Flu H3	0,003	-0,002	1,523
Без покрытия	-0,013	-0,014	-0,015

Рекомбинантно полученное антитело F1 связывается с препаратами LTA из множества источников.

После клонирования генов антитела в экспрессирующие векторы и продукции рекомбинантного антитела F1 (rF1) в экспрессирующей системе антитело rF1 тестировали на очищенных препаратах LTA из нескольких бактерий. Как показано на фиг. 2А, антитело rF1 хорошо связывается с коммерческими образцами LTA, полученными из *S.aureus* и *B.subtilis*, и немного менее сильно - с образцами LTA из *S.faecalis* и *S.pyogenes*. Антитело rF1 не связывалось с образцом LTA из *S.pneumoniae* (данные не представлены). Кроме того, rF1 узнавало высоко очищенные образцы LTA из *B.subtilis*, *B.licheniformis* и двух изолятов *S.aureus* (фиг. 2б). rF1 не связывался с препаратами LTA из *S.mutans* (фиг. 2б) или из *L.lactis*, *L.garvieae*, *B.bifidum*, *M.luteus*, *L.casei*, *L.mesenteroides*, *L.welshimeri*, *E.hirae*, *L.raffinolactis*, *S.mutans* и *S.pneumoniae* (результаты не показаны).

Рекомбинантное антитело F1 связывается с живыми бактериями *S.aureus*.

Чтобы исследовать, может ли антитело rF1 узнавать также живые грамположительные бактерии, связывание антитела rF1 с *S.aureus* и *S.pneumoniae* тестировали с использованием проточной цитометрии. Как показано на фиг. 3А, антитело rF1 связывается с живыми бактериями *S.aureus* (штамм Newman), но не с *S.pneumoniae*. Кроме того, авторы настоящего изобретения показали, что rF1 узнавало 6 клинических изолятов *S.aureus*; один представляет собой патогенный штамм, который является положительными по PVL, 3 нормальных штамма и 2 штамма MRSA (фиг. 3б).

Пример 2.

Методы.

Штаммы и культура бактерий.

Устойчивые к метициллину штаммы *S.aureus* (MRSA) USA300 (1114), USA400, N315, USA100, USA1000, COL, MRSA252, также как чувствительные к метициллину штаммы *S.aureus* (MSSA) Reynolds, Becker, Smith Diffuse, MN8 и штамм с промежуточной чувствительностью к ванкомицину (VISA) Mu50, все получены из Network on Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus* (NARSA); штаммы MSSA Newman и Rosenbach были из ATCC. *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* и *Streptococcus pyogenes* получены из Ward's Natural Science; *Listeria monocytogenes* был из ATCC. Бактерии выращивали на чашках с триптическим соевым агаром (TSA), дополненным 5% кровью овцы, в течение 18 ч при 37°C. Для жидких культур отдельные колонии с чашек TSA инокулировали в триптический соевый бульон (TSB) и инкубировали при 37°C при встряхивании при 200 об/мин в течение 18 ч. Свежие 100-кратные разведения этих культур в свежем TSB далее субкультивировали в течение различных периодов времени.

Анализ FACS связывания rF1 с цельными бактериями, выращенными *in vitro*.

Для окрашивания цельных клеток с помощью антитела бактерии собирали с чашек с TSA или из культур в TSB и промывали забуференным солевым раствором Хэнкса (HBSS) без фенола красного, дополненным 0,1% BSA (свободный от IgG; Sigma) и 10 мМ Непес, pH 7,4 (буфер HB), посредством центрифугирования при 1700×g в течение 20 мин. Концентрации бактерий оценивали посредством считывания оптической плотности при 630 нм. Суспензии бактерий 20×10<sup>8</sup> КОЕ/мл в буфере HB смешивали с равными объемами 300 мкг/мл IgG кролика (Sigma) и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре (RT) для блокирования неспецифического связывания IgG. Первичные антитела, включая rF1 и антитело для контроля изотипа IgG1 человека, добавляли в конечной концентрации 2 мкг/мл и эти смеси инкубировали в течение 15 мин при RT. После двух промывок с помощью HB осадки бактерий ресуспенсировали в растворе флуоресцентных вторичных антител против IgG человека (Jackson Immunoresearch) и инкубировали в течение 15 мин при RT. Бактерии дважды промывали PBS, ресуспенсировали в PBS с 1% параформальдегидом и анализировали проточной цитометрией.

Анализ FACS связывания rF1 с цельными бактериями из инфицированных тканей.

Для анализа связывания антитела с бактериями из инфицированной ткани, 4 ч субкультуры USA300 в TSB промывали PBS. Мышам инъектировали внутривенно 100 мкл супензии USA300 в PBS с оцененной концентрацией  $10 \times 10^8$  КОЕ/мл. Через трое суток почки, печень и легкие собирали и гомогенизировали с использованием конических пробирок для гомогенизации тканей (VWR). Где указано, органы собирали в различных временных точках инфекции. Для лизиса клеток мыши гомогенаты инкубировали в течение 10 мин при RT в PBS, содержащем 0,1% Тритон-X100 (Thermo), 10 мкг/мл ДНКазы I (Roche) и полный коктейль ингибиторов протеаз в мини-формате (Roche), и пропускали через фильтр 40 мкм (Falcon). Супензии клеток дважды промывали PBS и ресуспендировали в буфере HB, смешивали с равными объемами 600 мкг/мл IgG человека (Sigma) и инкубировали в течение 1 ч при RT. Первичные Ab, включая rF1 и антитело для контроля изотипа IgG1 человека, добавляли в конечной концентрации 2 мкг/мл. Для отделения бактерий от дебриса органов мыши, добавляли IgG кролика против *S.aureus* (Abcam) в концентрации 20 мкг/мл. После инкубации в течение 15 мин при RT, клетки дважды промывали буфером HB и ресуспендировали в смеси вторичных антител против IgG человека и против IgG кролика, меченых каждое различным флуорохромом (Jackson ImmunoResearch). После двух промывок PBS клетки ресуспендировали в PBS с 2% параформальдегидом и анализировали проточной цитометрией. После отбора бактерий из графиков двойной флуоресценции посредством отбора по положительному окрашиванию с помощью IgG кролика против *S.aureus*, получали перекрывающиеся графики гистограмм интенсивности флуоресценции rF1 и контроля изотипа.

#### Результаты.

rF1 сильно связывается с 14 штаммами *S.aureus* и *S.epidermidis*.

Семь устойчивых к метициллину штаммов *S.aureus* (MRSA), шесть чувствительных к метициллину штаммов *S.aureus* (MSSA), один штамм с промежуточной чувствительностью к ванкомицину *S.aureus* (VISA), *S.epidermidis* и несколько других грамположительных видов тестировали по связыванию с антителом rF1. Как показано на фиг. 4, rF1 сильно связывалось со всеми 14 штаммами *S.aureus* (фиг. 4A) и с *S.epidermidis* (фиг. 4B), но не с другими тестированными грамположительными видами (фиг. 4B).

rF1 связывается с MRSA с различных стадий роста и из инфекции *in vivo*.

Авторы настоящего изобретения тестировали способность mAb rF1 связываться с бактериями как из различных тканей, так и с течением инфекции. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что rF1 связывался с бактериями, выделенными из ткани почки, печени и легкого мыши через двое суток после инфекции, и что связывание с бактериями, выделенными из инфицированных почек, являлось стабильным, связывая бактерии через 2, 3 и 8 суток после инфекции.

Тестировали связывание антитела rF1 с MRSA на различных стадиях роста (штамм USA300), а именно при раннем логарифмическом росте (2 ч) и постэкспоненциальному росте (8 ч) в культурах TSB, и при росте твердых колоний на плашках TSA. rF1 сильно связывается на всех тестированных стадиях роста (фиг. 5A).

Связывание антитела rF1 с MRSA (штамм USA300) для цельных бактерий из инфицированной ткани тестировали в гомогенизованных почках от мышей через трое суток после системной инфекции мышей MRSA. Как показано на фиг. 5B, rF1 связывается с MRSA, полученным из инфицированной ткани.

#### Пример 3.

Проводили дополнительные эксперименты для идентификации эпитопа, связываемого антителом rF1. Несмотря на то что наблюдали связывание с препаратами LTA (см., например, пример 1), это связывание являлось не настолько сильным, как связывание с цельными бактериями, что позволяет предполагать, что другой эпитоп может быть вовлечен в связывание rF1.

#### Методы.

Иммунопреципитация, Вестерн-блоттинг и масс-спектрометрия лизатов клеточной стенки *S.aureus* и *S.epidermidis* и коммерческого препарата WTA.

40 мкг коммерческого препарата тейховой кислоты клеточной стенки (WTA) из штамма Wood46 *S.aureus* (Biodesign/ Meridian Life Sciences, Maine) разделяли на две части и иммунопреципитировали с помощью 1 мкг/мл rF1 или антитела человека для контроля изотипа. Антитела захватывали с помощью смолы Белок A/G Ultralink (Pierce). Затем образцы обрабатывали 50 мМ дитиотреитолом, 10 мМ 2-йодацетамидом и разделяли в 8% трис-глициновом геле и затем подвергали Вестерн-блоттингу с помощью rF1.

Препарат клеточной стенки из 20 мл ночной культуры штамма USA300 *S.aureus* получали посредством обработки культуры (40 мг осадка клеток/мл) 100 мг/мл лизостафина в 30% рафинозном буфере при 37°C в течение 30 мин. Весь препарат клеточной стенки фильтровали, разводили вплоть до 10 мл лизирующим буфером с NP40 и инкубировали дважды с анти-Flag M2 агарозой (Sigma) для истощения настолько большого количества белка A из препарата клеточной стенки, насколько возможно. Конечный препарат клеточной стенки разделяли на две части и иммунопреципитировали с помощью 1 мкг/мл rF1 или антитела человека для контроля изотипа. Антитела захватывали с помощью смолы Белок A/G Ultralink (Pierce). Затем образцы обрабатывали 50 мМ дитиотреитолом, 10 мМ 2-йодацетамидом и разделя-

ли в 8% трис-глициновом геле, и затем окрашивали серебром или подвергали Вестерн-блоттингу с rF1.

Лизаты из 20 мл ночной культуры *Staphylococcus epidermidis* получали посредством разбивания бусинами в лизирующим буфере с NP40. Полученный препарат лизата разводили до 10 мл лизирующим буфером с NP40, разделяли на две части и иммунопреципитировали с помощью 1 мкг/мл rF1 или контрольного антитела. Антитела захватывали с помощью смолы Белок A/G (Pierce). Затем образцы обрабатывали 50 мМ дитиотреитолом, 10 мМ 2-йодацетамидом и разделяли в 8% Трис-глициновом геле, и затем окрашивали серебром или подвергали Вестерн-блоттингу с rF1.

Для протеомного анализа образцы наносили на предварительно залитый мини-гель для SDS PAGE, и разделенные белки окрашивали с помощью Кумасси синего. Срезы геля из области геля, соответствующей полосам, визуализированным по Вестерн-блоту с rF1, вырезали и восстанавливали, алкилировали с йодацетамидом и расщепляли *in situ* трипсином. Полученные трипсиновые пептиды анализировали посредством микрокапиллярной обращенно-фазовой жидкостной хроматографии - тандемной масс-спектрометрии в наноэлектроспире на масс-спектрометре ионного циклотронного резонанса с Фурье-преобразованием с гибридной линейной ионной ловушкой (LTQ-FT; Thermo Fisher) в зависимости от данных эксперимента. Результаты тандемной масс-спектрометрии принимали для поиска в базе данных с использованием программного обеспечения Mascot (Matrix Science).

Экспрессия экзогенного ClfA, экспрессированного в *S.aureus* и *E.coli*.

Экспрессия в *S.aureus* меченного His ClfA. Ген фактора слипания А (ClfA) амплифицировали с помощью ПЦР от последовательности, кодирующей сигнальную последовательность, до последовательности, кодирующей глицин в мотиве LPXTG, с геномной ДНК USA300. С-концевую His-метку конструировали на конце мотива LPXTG и лигировали в экспрессирующую вектор pTet *S.aureus* (pSAS10 из Genentech). Затем проводили электропорацию полученной конструкцией *S.aureus* WT RN4220. 20 мл культуры RN4220 после электропорации или пустой RN4220 (не несущий экспрессирующий вектор pTet) инокулировали из ночной культуры (начальная OD<sub>600</sub> 0,15), выращивали в течение 1 ч в триптиказном соевом бульоне (TSB) и затем индуцировали экспрессию белка в течение 2 ч с помощью ангидротетраклина (200 нг/мл). В конце периода индукции проводили предварительный лизис культуры *S.aureus* с помощью лизостафина (50 мкг/мл) и затем дополнительно лигировали посредством разбивания бусинами в лизирующем буфере (150 мМ NaCl, 20 мМ Трис pH 7,5, 1% тритон-Х и свободные от ЭДТА таблетки ингибитора протеаз Roche). Затем осветленные лизаты инкубировали со смолой NiNta (Qiagen) в присутствии 10 мМ имидазола в течение 1 ч при 4°C для осаждения рекомбинантного белка ClfA.

Экспрессия меченного His Clfα в *E.coli*: ген фактора слипания-А (ClfA) амплифицировали с помощью ПЦР от последовательности, кодирующей N-концевую сигнальную последовательность (со стартовым метионином), до последовательности, кодирующей глицин в С-концевом мотиве LPXTG, с геномной ДНК USA300. Затем амплифицированный продукт ПЦР лигировали в рамке с С-концевой His-меткой в экспрессирующую вектор для *E.coli* pET 21b(+)(Novagen). Полученной конструкцией трансформировали компетентные клетки *E.coli* BL21-gold (DE3) (Stratagene) и индуцировали экспрессию белка в течение 3,5 ч с помощью IPTG согласно инструкциям производителя. Культтуру *E.coli* после индукции лигировали посредством разбивания бусинами в лизирующем буфере (150 мМ NaCl, 20 мМ Трис pH 7,5, 1% тритон-Х и свободные от ЭДТА таблетки ингибитора протеаз Roche). Затем осветленные лизаты инкубировали со смолой NiNta (Qiagen) в присутствии 10 мМ имидазола в течение 1 ч при 4°C для осаждения рекомбинантного белка ClfA.

Экспрессия экзогенного ClfA, экспрессированного в *E.coli*, и инкубация с лизатом *S.aureus*.

Экспрессия в *E.coli* и очистка белков SDR поверхности клеток *S.aureus* ClfA, ClfB, SdrC, SdrD, SdrE: гены ClfA, ClfB, SdrC, SdrD и SdrE амплифицировали с помощью ПЦР от последовательности, кодирующей старт зрелого белка, до последовательности, кодирующей глицин в мотиве LPXTG, с геномной ДНК USA300, и лигировали в рамке с N-концевой меткой Unizyme в вектор ST239 (Genentech). Конструкциями трансформировали *E.coli* 58F3 (Genentech), индуцировали экспрессию белка и затем очищали.

Захват на NiNta меченных NT Unizyme белков SDR: 500 мкг очищенных меченых по N-концу Unizyme белков SDR (ClfA, ClfB, SdrC, SdrD, SdrE) разводили в PBS, содержащем ингибиторы протеаз (свободные от ЭДТА), и инкубировали со смолой NiNta (Qiagen) в течение 1,5 ч при 4°C. Затем смолу NiNta с иммобилизованным меченым Unizyme белком SDR промывали одни раз буфером для промывки (50 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 мМ NaCl; pH 8,0).

Модификация продуцированных в *E.coli* белков SDR лизатом *S.aureus*: 25 мл культуры начинали с ночной культуры мутанта ΔPan Sdr (ClfA-ClfB-SdrCDE-нуль; дар Tim Foster, Trinity College Dublin) Newman *S.aureus* (начальная OD<sub>600</sub> 0,15) и выращивали в TSB в течение 3 ч (экспоненциальная фаза), 37°C, 200 об/мин. Затем культуру в экспоненциальной фазе ресуспендировали в 1 мл PBS и лигировали с помощью 200 мкг/мл лизостафина в присутствии 250 единиц нуклеазы бензоназы (Novagen) при 37°C в течение 30 минут. Лизаты осветляли от дебриса посредством осаждения центрифугированием при максимальной скорости в микроСентрифуге в течение 10 мин при 4°C. Модификацию иммобилизованного на NiNta белка SDR *E.coli* проводили посредством инкубации с осветленными лизатами мутанта ΔPan

Sdr *S.aureus* в течение 1 ч при 37°C.

Вестерн-блоттинг модифицированного белка SDR *E.coli*: затем образцы немодифицированного или модифицированного иммобилизованного на NiNta белка SDR *E. coli* промывали 3× буфером для промывки (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM имидазол; pH 8,0), подготавливали для Вестерн-блоттинга и разделяли в 8% Трис-глициновом геле (Invitrogen). Вестерн-блоты анализировали с помощью антитела rF1 или антитела против Unizyme (Genentech).

Идентификация домена SDR как антигена для rF1.

Экспрессия конструкций MBP-SD в *S.aureus*. Ген связывающего мальтозу белка (MBP) амплифицировали с помощью ПЦР с вектора pMAL-c5x (New England BioLabs [NEB], Ipswich, MA, USA) от последовательности, кодирующей старт зрелого белка, до последовательности, кодирующей конец участка расщепления фактора Xa. SD с C-концевой меткой His различной длины (SD, SDS, DSD, SDSD, SDSDS, SDSDSD) синтезировали в форме одноцепочечных олигонуклеотидов и гибридизовали вместе для получения двухцепочечной ДНК. Область Sdr гена ClfA амплифицировали с помощью ПЦР от последовательности, кодирующей начало (560D) области Sdr и включительно вплоть до любой из последовательностей, кодирующих 618A или 709S области SD, с последующей последовательностью ДНК, кодирующей метку His из соответствующих плазмид pTet.ClfA.SD618A или pTet.ClfA.SD709S (Genentech). В качестве контроля последовательность, кодирующую домен A гена ClfA от начала зрелого белка до последовательности, кодирующей конец домена A (538G), с последующей последовательностью, кодирующей метку His, амплифицировали с помощью ПЦР с плазмида pTet.ClfA.Adom.538G (Genentech). Вставку MBP вместе с одной из различных вставок SD или домена A ClfA лигировали в экспрессирующую вектор pTet *S.aureus* (pSAS10 из Genentech). Затем проводили электропорацию полученных конструкций в *S.aureus* RN4220 Δ sortase (мутантный штамм с делецией сортазы на фоне RN4220).

20 мл культуры либо RN4220 Δ sortase после электропорации, либо пустого RN4220 Δ sortase (не несущего экспрессирующего вектора pTet) инокулировали из ночной культуры (начиная от OD<sub>600</sub> 0,15), выращивали в течение 1 ч в триптиказном соевом бульоне (TSB), дополненном глюкозой (2 г/л) и затем индуцировали экспрессию белка в течение 2 ч с помощью ангидротетрациклина (200 нг/мл). В конце периода индукции культуру *S.aureus* ресусцинировали в буфере для колонки (150 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7,5 и свободные от ЭДТА таблетки ингибитора протеаз Roche) и лизировали с помощью 200 мкг/мл лизостафина в присутствии 250 единиц нуклеазы бензоназы (Novagen) при 37°C в течение 30 мин. Лизаты осветляли от дебриса осаждением центрифугированием при максимальной скорости в микроцентрифуге в течение 10 мин при 4°C. Затем осветленные лизаты инкубировали со смолой с амилозой (NEB) вместе с конечной концентрацией ЭДТА 1 mM в течение 1,5 ч при 4°C для захвата экспрессированных белков MBP-SD.

Вестерн-блоттинг конструкций MBP-SD, экспрессированных в *S.aureus*. Смолу с амилозой с иммобилизованными белками MBP-SD промывали три раза буфером для колонки, затем подготавливали для анализа Вестерн-блоттингом и разделяли в 8% Трис-глициновом геле. Вестерн-блоты обрабатывали антителом rF1, антителом против пента-His (Qiagen) или антителом против MBP (NEB).

Результаты.

rF1 вступает в реакцию с уникальным семейством белков SDR (Ser-Asp-повтор) в *S.aureus* и *S.epidermidis*

Коммерческий препарат тейхоевой кислоты и лизат клеточной стенки (WTA) *S.aureus* (штамм USA300) тестировали по связыванию с rF1 после иммунопреципитации. rF1 связывается с несколькими компонентами коммерческого препарата тейхоевой кислоты (фиг. 6A, левая панель) и лизата клеточной стенки *S.aureus* (фиг. 6B, левая панель). С использованием масс-спектрометрии эти компоненты препарата WTA и лизата клеточной стенки идентифицировали как ClfA (SdrA), ClfB (SdrB), SdrC, SdrD и SdrE (фиг. 6A, правая панель и фигура 6B, правая панель).

Лизат клеточной стенки *S.epidermidis* тестировали на связывание с rF1 после иммунопреципитации. На фиг. 6C (левая панель) показано связывание rF1 с несколькими компонентами лизата клеточной стенки *S.epidermidis*. Эти компоненты не были идентифицированы с помощью контрольного антитела. С использованием масс-спектрометрии эти компоненты клеточной стенки идентифицировали как SdrF, SdrG и SdrH (фиг. 6C, правая панель).

Экзогенная экспрессия ClfA в *S.aureus* и *E.coli*.

Экзогенный ClfA, экспрессированный в *S.aureus*, является реакционноспособным с rF1, в то время как ClfA, экспрессированный в *E.coli*, не являлся (фиг. 7A). Однако инкубация экспрессированных в *E.coli* белков Sdr ClfA (SdrA), ClfB (SdrB), SdrC, SdrD и SdrE с лизатом *S.aureus* возвращала реакционную способность rF1 (фиг. 7B).

rF1 связывается с доменами SDR, экспрессированными в *S.aureus*.

Антитело rF1 связывается с областями Sdr ClfA, состоящими из ClfA 560D-618S и ClfA 560D-709S (фиг. 8), экспрессированными в *S.aureus*. rF1 не связывается с A-доменом ClfA или с малыми пептидными последовательностями, состоящими из не более трех повторов SD.

Пример 4.

### Методы.

Клонирование вариабельных областей rF1 в векторе pRK.

DНК полимеразу Phusion, рестрикционные ферменты EcoRV, KpnI, PvuII, ApaI, AgeI и AhdI, T4 ДНК-лигазу закупали из New England BioLabs, Ipswich, MA, USA. Pfu ДНК-полимеразу, набор для сайт-специфического мутагенеза Quik change II закупали из Stratagene/Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA. 2% агарозный гель закупали из Invitrogen, Carlsbad, California, USA. pRK векторы pRK.LPG3.HuKappa и pRK.LPG4.HumanHC получали из Genentech/Roche, South San Francisco, California, USA.

Вариабельные домены тяжелой и легкой цепей Mab rF1 из векторов pCPEO помещали в экспрессирующие векторы для млекопитающих pRK. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в общем объеме 50 мкл с использованием Pfu ДНК-полимеразы согласно общепринятым способам ПЦР. V<sub>H</sub> амплифицировали с праймерами YiHCF

5'-ATG GCT GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT G-3'  
(SEQ ID NO:18) и YiHCR2

5'-GAA CAC GCT GGG GCC CTT GGT GCT GGC

ACT CGA GAC TGT GAC CAG GGT GCC AGG T\*CC CCA G-3'

(SEQ ID NO:19) (участки рестрикции PvuII и ApaI подчеркнуты, и \* обозначает замену одного нуклеотида G на T для уничтожения внутреннего участка ApaI), и V<sub>L</sub> амплифицировали с праймерами YiLCF

5'-CGG CTC GAC CGA TAT CCA GCT GAC CCA GAG-3'  
(SEQ ID NO:20) и YiLCR

5'-GAT TTC CAG CTT GGT ACC CTG GCC G-3'

(SEQ ID NO:21) (EcoRV и KpnI подчеркнуты). Уникальные продукты ПЦР 393 (V<sub>H</sub>) и 328 (V<sub>L</sub>) п.о., соответственно, непосредственно расщепляли PvuII и ApaI для V<sub>H</sub>, ECORV и KpnI для V<sub>L</sub>, с последующей очисткой в геле (Invitrogen, каталогный # K2100-12). V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> по отдельности лигировали во фрагменты вектора pRK pRK/PvuII, ApaI для тяжелой цепи и pRK/EcoRV, KpnI для легкой цепи с использованием T4 ДНК-лигазы. ДНК плазмид подтверждали по картинам расщепления рестрикционными ферментами, т.е. для rF1V<sub>H</sub> AgeI высвобождала полосы ~300 п.о. и 5,8 т.п.о., в то время как для rF1V<sub>L</sub> показаны полосы 2,3 и 3,1 т.п.о. посредством AhdI в 2% агарозном геле.

Тестирование химического стресса.

Посредством сравнения данных первичной последовательности антитела с экспериментально наблюдаемыми событиями деградации стало ясным, что конкретные мотивы последовательности могут быть подвержены деградации (т.е. изомеризации аспартата в последовательностях DD, DG, и DS и дезамидирования аспарагина в последовательностях NG). Если такая "горячая точка" деградации появляется в CDR антитела, может присутствовать отрицательное влияние на связывание и активность. Для молекул, содержащих горячие точки, тестирование химического стресса предоставляет способ оценки чувствительности этих мотивов к деградации посредством помещения антитела в буфер для составления системы и сравнения контрольного образца с образцом, подвергнутым стрессу при 40°C в течение двух недель. Если наблюдают деградацию, первичную последовательность можно подвергать повторной модификации для удаления горячей точки.

После подвергания образца стрессу в течение двух недель при 40°C проводили ряд аналитических исследований для оценки того, где и насколько произошла деградация. Анализ визуализации капиллярной изоэлектрической фокусировкой (icIEF) проводили для исследования вариантов заряда, и массу интактного и укороченного антитела верифицировали с использованием масс-спектрометрии, и LC-MS/MS пептидное картирование проводили для получения информации по сайт-специфической деградации.

Мутагенез.

Плазмиды rF1 pRK подвергали сериям сайт-специфического мутагенеза для стабилизации Mab rF1 посредством N (AAC) 53S (AGC) в тяжелой цепи CDR2 с использованием FHV

5'-GGT GGC CAG CAT CAA CAG CGG CAA CAA CCC CTA CTA CG-3'  
(SEQ ID NO:22) и RHV

5'-CGT AGT AGG GGT TGT TGC CGC TGT TGA TGC TGG CCA CC-3'

(SEQ ID NO:23) (участок мутагенеза подчеркнут) посредством набора для сайт-специфического мутагенеза Quik change II. Варианты после мутагенеза секвенировали.

Результаты.

Первичная последовательность антитела rF1 содержала один потенциальный участок дезамидирования аспарагина в CDR2 легкой цепи:

NNGNN

(SEQ ID NO:24). Тестирование стресса выявило увеличение дезамидирования в подвергнутых стрессу образцах на N53 (нумерация согласно Kabat, 1991). Сайт-специфический мутагенез проводили для стабилизации Mab rF1 посредством замены N (AAC, (SEQ ID NO:25)) на 53S (AGC, (SEQ ID NO:26)) в CDR2 тяжелой цепи. Секвенирование варианта мутагенеза подтвердило мутацию N53S.

Пример 5.

Разработка Cys-вариантов для применений конгьюгата антитело-лекарственное средство (ADC).

Плазмиды rF1 pRK подвергали сериям сайт-специфического мутагенеза с олигонуклеотидами rF1pRK.LC(205/210)VCF (468075)

5'-GGG CCT GAG CTC GCC CTG CAC AAA GAG CTT CAA CAG-3'  
(SEQ ID NO:27) и rF1pRK.LC(205/210)VCR (468076)

5'-CTG TTG AAG CTC TTT GTC CAG GGC GAG CTC AGG CCC-3'

(SEQ ID NO:28) (мутант Cys подчеркнут) для получения линкеров легкой цепи rF1 тиоМаб, и rF1pRK.HCN53S.A121CF (468464)

5'-CTG GTC ACA GTC TCG AGT TGC AGC ACC AAG GGC CCA TC-3'  
(SEQ ID NO:29) и rF1pRK.HCN53S.A121CR (468465)

5'-GAT GGG CCC TTG GTG CTG CAA CTC GAG ACT GTG ACC AG-3'

(SEQ ID NO:30) (мутант Cys подчеркнут) для получения линкеров тяжелой цепи тиоМаб rF1 сайт-специфическим способом Stratagene. Легкую цепь V205C и тяжелую цепь A114C подтверждали посредством секвенирования вариантов (фиг. 9).

#### **Краткое описание чертежей**

Фиг. 1 - последовательности тяжелой цепи и легкой цепи антитела F1;

фиг. 2 - антитело F1 связывается с препаратами LTA из нескольких грамположительных бактерий.

(а) Препараты LTA получали от Sigma и тестировали в ELISA с захватом с помощью мышиного поликлонального анти-LTA или (б) высоко очищенного набора препаратов LTA, полученного от W. Fischer. D25, человеческое антитело против RSV, использовали в качестве неспецифического отрицательного контроля и мышью моноклональное антитело против LTA - в качестве положительного контроля;

фиг. 3 - рекомбинантное антитело F1 связывается с S.aureus, но не с S.Pneumoniae. (а) Бактерии инкубировали с антителом F1 или с контрольным IgG (D25, человеческое антитело против RSV), или без первичного антитела (только IgG-PE). После промывки добавляли вторичное антитело (IgG-PE). (б) 6 клинических изолятов тестировали в двух отдельных экспериментах по связыванию с F1. Протестированы штамм PVL+ (SA-1), 3 нормальных штамма (SA-2, SA-3 и SA-4) и 2 MRSA штамма (SA-5 и SA-6);

фиг. 4 - (а) связывание антитела rF1 с 14 штаммами S.aureus, (б) антитело rF1 связывается с S.epidermidis, но не с Bacillus subtilis, Enterococcus faecalis, Listeria monocytogenes и Streptococcus pyogenes;

фиг. 5 - (а) антитело rF1 связывается с MRSA на различных стадиях роста, Iso C: контроль изотипа, Med: контроль - среда; (б) антитело rF1 связывается с MRSA, выделенным из инфицированной ткани;

фиг. 6 - антитело rF1 связывается с белками SDR, (а) иммуноопреципитация (IP) коммерческого препарата тейхоевой кислоты S.aureus (штамм Wood 46) с помощью rF1 или антитела для контроля изотипа, с последующим Вестерн-блоттингом с антителом rF1 (слева) и масс-спектрометрический анализ фрагментов из препарата WTA, связанных антителом rF1 (справа). (б) Иммуноопреципитация (IP) лизата клеточной стенки S.aureus (штамм USA300) с помощью rF1 или контрольного антитела, с последующим Вестерн-блоттингом (WB) с антителом rF1 (слева) и анализ масс-спектрометрии фрагментов клеточной стенки (штамм USA300), связанных антителом rF1 (справа). (с) Иммуноопреципитация лизата клеточной стенки S.epidermidis с помощью rF1 или антитела для контроля изотипа, с последующим Вестерн-блоттингом с антителом rF1 (слева), анализ масс-спектрометрии фрагментов клеточной стенки, связанных антителом rF1 (справа);

фиг. 7 - связывание rF1 с белками SDR, экспрессированными в S.aureus и E.coli. (а) Вестерн-блоттинг лизатов S.aureus и E.coli, содержащих сверхэкспрессированный меченный His ClfA с использованием антитела против His (слева) и антитела rF1 (справа). (б) Вестерн-блоттинг лизатов клеток E.coli, содержащих меченные his ClfA, ClfB, SdrC, SdrD и SdrE после инкубации с лизатом S.aureus, с антителом rF1 (вверху) или антителом против His (внизу);

фиг. 8 - rF1 связывается с доменами SDR, экспрессированными в S.aureus. Конструкции экспрессировали в S.aureus и тестировали по связыванию с rF1 (слева), Вестерн-блоты лизатов S.aureus, содержащих экспрессированные конструкции, с антителом против MBP (связывающего мальтозу белка), антителом против His и антителом rF1 (справа);

фиг. 9 - последовательности вариантов тяжелой цепи A114C (а) и легкой цепи V205C (б) антитела rF1. Нумерация согласно Kabat (1991), прямоугольники: CDR.

**Список литературы**

- Diehl S.A. et al. J Immunol 180, 4805-4815 (2008)  
 Greenberg J.W. et al. Infection and Immunity 64, 3318-3325 (1996)  
 Jaleco A.C. et al. Blood 94, 2637-2646 (1999)  
 Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological interest, 5<sup>th</sup> Ed. Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)  
 Keller R. et al. Infect Immun 60, 3664-3672 (1992)  
 Kwakkenbos M et al. Nat Med accepted for publication (2009)  
 Moran et al. NEMJ 355, 666-674 (2006)  
 Polotsky V.Y. et al. Infection and Immunity 64, 380-383 (1996)  
 Scheeren F.A. et al. Nat Immunol 6, 303-313 (2005)  
 Shvarts A. et al. Genes Dev 16, 681-686 (2002)  
 Weidenmaier C. et al. Nat Rev Microbiol 6, 276-287 (2008)

## СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> BEAUMONT, Tim  
 KWAKKENBOS, Mark Jeroen  
 BROWN, Eric J.  
 МИЛИСАКИ, John Hiroshi  
 HAZENBOS, Wouter L.W.  
 MARIATHASAN, Sanjeev  
 KAJIHARA, Kimberly  
 XIA, Yi

<120> АНТИТЕЛА, КОТОРЫЕ СВЯЗЫВАЮТСЯ С SDR БЕЛКАМИ, И СПОСОБЫ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

<130> 146392008240

<150> РСТ/NL2010/050456  
 <151> 2010-07-15

<150> US 61/225,878  
 <151> 2009-07-15

<150> ЕР 091655589  
 <151> 2009-07-15

<160> 66

<170> FastSEQ для Windows версии 4.0

<210> 1  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Синтетическая конструкция

<220>  
 <223> CDR1 тяжелой цепи

<400> 1  
 Arg Phe Ala Met Ser  
 1 5

<210> 2  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

<220>  
<223> CDR2 тяжелой цепи

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

<210> 3  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

<220>  
<223> CDR3 тяжелой цепи

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

<210> 4  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

<220>  
<223> CDR1 легкой цепи

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

<210> 5  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

<220>  
<223> CDR2 легкой цепи

<400> 5  
Lys Thr Ser Ile Leu Glu Ser

1

5

<210> 6  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

<220>  
<223> CDR3 легкой цепи

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> 4  
<223> Xaa = M или I

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

<210> 7  
<211> 120  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

<220>  
<223> Тяжелая цепь варианта антитела F1

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

<210> 8  
<211> 110  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

<220>

<223> Легкая цепь варианта антитела F1

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> 92  
<223> Xaa = M

```

<400> 8
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Leu Pro Ala Ser Val Gly
   1           5           10          15
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Val Gly Asp Trp
   20          25          30
Leu Ala Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile
   35          40          45
Tyr Lys Thr Ser Ile Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
   50          55          60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
   65          70          75          80
Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Xaa Arg Phe Pro Tyr
   85          90          95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val
   100         105         110

```

<210> 9  
<211> 120  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

<220>  
<223> Тяжелая цепь варианта антитела F1

```

<400> 9
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
   1           5           10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Arg Phe
   20          25          30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val
   35          40          45
Ala Ser Ile Asn Asn Gly Asn Asn Pro Tyr Tyr Ala Arg Ser Val Gln
   50          55          60
Tyr Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Val Ser Gln Asn Thr Val Ser Leu
   65          70          75          80
Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
   85          90          95
Lys Asp His Pro Ser Ser Gly Trp Pro Thr Phe Asp Ser Trp Gly Pro
  100         105         110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
  115         120

```

<210> 10  
<211> 109  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

<220>

<223> Легкая цепь варианта антитела F1

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 92

<223> Xaa = M или I

<400> 10

Asp	Ile	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ala	Leu	Pro	Ala	Ser	Val	Gly	
1																
														15		
Asp	Arg	Val	Ser	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Asn	Val	Gly	Asp	Trp	
														30		
Leu	Ala	Trp	Tyr	Arg	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Asn	Leu	Leu	Ile	
														45		
Tyr	Lys	Thr	Ser	Ile	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	
														60		
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	
														80		
Asp	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Tyr	Xaa	Arg	Phe	Pro	Tyr	
														95		
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Ala				
														100		
															105	

<210> 11

<211> 110

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<220>

<223> Легкая цепь варианта антитела F1

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 92

<223> Xaa = M или I

<400> 11

Asp	Ile	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ala	Leu	Pro	Ala	Ser	Val	Gly		
1																	
														15			
Asp	Arg	Val	Ser	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Asn	Val	Gly	Asp	Trp		
														30			
Leu	Ala	Trp	Tyr	Arg	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Asn	Leu	Leu	Ile		
														45			
Tyr	Lys	Thr	Ser	Ile	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly		
														60			
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro		
														80			
Asp	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Tyr	Xaa	Arg	Phe	Pro	Tyr		
														95			
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val				
														100			
															105		
																110	

<210> 12

<211> 15

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция		
<220>		
<223> CDR1 тяжелой цепи F1		
<400> 12		
cgctttgccca tgagc	15	
<210> 13		
<211> 48		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> Синтетическая конструкция		
<220>		
<223> CDR2 тяжелой цепи F1		
<400> 13		
tgcgtcaata atggaaataa cccatactac gcacggtcgg tacaatac	48	
<210> 14		
<211> 36		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> Синтетическая конструкция		
<220>		
<223> CDR3 тяжелой цепи F1		
<400> 14		
gatcacccta gtagtggtcg gcccacctt gactcc	36	
<210> 15		
<211> 33		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> Синтетическая конструкция		
<220>		
<223> CDR1 легкой цепи F1		
<400> 15		
cggcccgatg aaaacgttgg tgactggttg gcc	33	
<210> 16		
<211> 21		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> Синтетическая конструкция		
<220>		
<223> CDR2 легкой цепи F1		
<400> 16		
aagacatcta ttctagaaag t	21	

<210> 17		
<211> 27		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> Синтетическая конструкция		
<220>		
<223> CDR3 легкой цепи F1		
<400> 17		
caacactata tacgttccc gtacact		27
<210> 18		
<211> 28		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> Синтетическая конструкция		
<220>		
<223> Праймер		
<400> 18		
atggctgagg tgcaagctgg ggagtcgt		28
<210> 19		
<211> 61		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> Синтетическая конструкция		
<220>		
<223> Праймер		
<400> 19		
gaacacgctg gggcccttgg tgctggcact cgagactgtg accagggtgc caggtccccca	60	
g	61	
<210> 20		
<211> 30		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> Синтетическая конструкция		
<220>		
<223> Праймер		
<400> 20		
cggctcgacc gatatccagc tgacccagag		30
<210> 21		
<211> 25		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

<220>  
<223> Праймер

<400> 21  
gatttccagc ttggtaaccct ggccg 25

<210> 22  
<211> 38  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

<220>  
<223> Праймер

<400> 22  
ggtaggcacatcaacagcg gcaacaaccc ctactacg 38

<210> 23  
<211> 38  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

<220>  
<223> Праймер

<400> 23  
cgttagtaggg gttgttgcccg ctgttgatgc tggccacc 38

<210> 24  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

<220>  
<223> Часть тяжелой цепи CDR2 для демонстрации амидирования

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> 2  
<223> Амидирование

<400> 24  
Asn Asn Gly Asn Asn  
1 5

<210> 25  
<211> 3  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>		
<223>	Синтетическая конструкция	
<220>		
<223>	Кодон для N	
<400>	25	
	aac	3
<210>	26	
<211>	3	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Синтетическая конструкция	
<220>		
<223>	Кодон для S	
<400>	26	
	agc	3
<210>	27	
<211>	36	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Синтетическая конструкция	
<220>		
<223>	Олигонуклеотид	
<400>	27	
	gggcctgagc tcgccctgca caaagagctt caacag	36
<210>	28	
<211>	36	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Синтетическая конструкция	
<220>		
<223>	Олигонуклеотид	
<400>	28	
	ctgttgaagc tctttgtgca gggcgagctc aggccc	36
<210>	29	
<211>	38	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Синтетическая конструкция	
<220>		
<223>	Олигонуклеотид	
<400>	29	

ctggtcacag tctcgagttg cagcaccaag ggcccatc

38

<210> 30

<211> 38

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<220>

<223> Олигонуклеотид

<400> 30

gatgggcctt tggtgctgca actcgagact gtgaccag

38

<210> 31

<211> 5

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<220>

<223> Мотив

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 3

<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 31

Leu Pro Xaa Thr Gly

1

5

<210> 32

<211> 4

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<220>

<223> His-меченная SD вставка

<400> 32

Ser Asp Ser Asp

1

<210> 33

<211> 5

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<220>

<223> His-меченная SD вставка

<400> 33  
 Ser Asp Ser Asp Ser  
 1 5

<210> 34  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Синтетическая конструкция

<220>  
 <223> His-меченая SD вставка

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

<210> 35  
 <211> 360  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Синтетическая конструкция

<220>  
 <223> тяжелой цепи F1

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(360)

<400> 35

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

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

96

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

144

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

192

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

240

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

288

aaa gat cac cct agt agt ggc tgg ccc acc ttt gac tcc tgg ggc ccg

336

Lys Asp His Pro Ser Ser Gly Trp Pro Thr Phe Asp Ser Trp Gly Pro  
 100 105 110

gga acc ctg gtc acc gtc tcc tcg 360  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 36  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Синтетическая конструкция

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

<210> 37  
 <211> 90  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Синтетическая конструкция

<220>  
 <223> FW1 тяжелой цепи F1

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

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

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

<210> 38  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

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

<210> 39  
<211> 42  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

<220>  
<223> FW2 тяжелой цепи F1

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

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

<210> 40  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

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

<210> 41  
<211> 96  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

<220>  
<223> FW3 тяжелой цепи F1

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

<400> 41  
cgc ttc acc gtc tcc cgg gac gtc tcc cag aac act gtg tct ctg cag

48

Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Val Ser Gln Asn Thr Val Ser Leu Gln  
 1 5 10 15

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

96

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Синтетическая конструкция

&lt;400&gt; 42

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

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Синтетическая конструкция

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; FW4 тяжелой цепи F1

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)...(33)

&lt;400&gt; 43

tgg ggc ccg gga acc ctg gtc acc gtc tcc tcg  
 Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10

33

&lt;210&gt; 44

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Синтетическая конструкция

&lt;400&gt; 44

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

&lt;210&gt; 45

&lt;211&gt; 330

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Синтетическая конструкция

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; F1 легкой цепи

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)...(330)

&lt;400&gt; 45

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

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

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

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

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

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

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

&lt;210&gt; 46

&lt;211&gt; 110

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Синтетическая конструкция

&lt;400&gt; 46

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

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Val Gly Asp Trp	
20                     25                       30	

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

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

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

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Ile Arg Phe Pro Tyr	
85                     90                       95	

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val	
100                     105                       110	

<210> 47  
<211> 69  
<212> ДНКF1  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

<220>  
<223> FW1 легкой цепи F1

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

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

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

<210> 48  
<211> 23  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

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

<210> 49  
<211> 45  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

<220>  
<223> FW2 легкой цепи F1

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

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

<210> 50  
<211> 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Синтетическая конструкция

&lt;400&gt; 50

Trp	Tyr	Arg	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Asn	Leu	Leu	Ile	Tyr
1				5					10				15	

&lt;210&gt; 51

&lt;211&gt; 96

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Синтетическая конструкция

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; FW3 легкой цепи F1

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(96)

&lt;400&gt; 51

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

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

&lt;210&gt; 52

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Синтетическая конструкция

&lt;400&gt; 52

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

&lt;210&gt; 53

&lt;211&gt; 39

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Синтетическая конструкция

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; FW4 легкой цепи F1

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)...(39)

&lt;400&gt; 53

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

39

&lt;210&gt; 54

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Синтетическая конструкция

&lt;400&gt; 54

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

&lt;210&gt; 55

&lt;211&gt; 230

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Синтетическая конструкция

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; тяжелая цепь rF1

&lt;400&gt; 55

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Arg Phe  
 20 25 30  
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Ser Ile Asn Asn Gly Asn Asn Pro Tyr Tyr Ala Arg Ser Val Gln  
 50 55 60  
 Tyr Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Val Ser Gln Asn Thr Val Ser Leu  
 65 70 75 80  
 Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Phe Cys Ala  
 85 90 95  
 Lys Asp His Pro Ser Ser Gly Trp Pro Thr Phe Asp Ser Trp Gly Pro  
 100 105 110  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 115 120 125  
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
 130 135 140  
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
 145 150 155 160  
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
 165 170 175  
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
 180 185 190  
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
 195 200 205  
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
 210 215 220  
 Lys Thr His Thr Cys Pro  
 225 230

<210> 56  
<211> 230  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

<220>  
<223> rF1 A114C

<400> 56  
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Arg Phe  
20 25 30  
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45  
Ala Ser Ile Asn Ser Gly Asn Asn Pro Tyr Tyr Ala Arg Ser Val Gln  
50 55 60  
Tyr Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Val Ser Gln Asn Thr Val Ser Leu  
65 70 75 80  
Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Phe Cys Ala  
85 90 95  
Lys Asp His Pro Ser Ser Gly Trp Pro Thr Phe Asp Ser Trp Gly Pro  
100 105 110  
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Cys Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
115 120 125  
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
130 135 140  
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
145 150 155 160  
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
165 170 175  
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
180 185 190  
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
195 200 205  
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
210 215 220  
Lys Thr His Thr Cys Pro  
225 230

<210> 57  
<211> 213  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

<220>  
<223> легкая цепь rF1

<400> 57  
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Leu Pro Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15  
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Val Gly Asp Trp  
20 25 30  
Leu Ala Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile

35	40	45
Tyr Lys Thr Ser Ile Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65	70	75
Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Met Arg Phe Pro Tyr		
85	90	95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala Pro		
100	105	110
Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr		
115	120	125
Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys		
130	135	140
Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu		
145	150	155
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser		
165	170	175
Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala		
180	185	190
Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe		
195	200	205
Asn Arg Gly Glu Cys		
210		

<210> 58

<211> 214

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<220>

<223> rF1 V205C

<400> 58

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Leu Pro Ala Ser Val Gly		
1	5	10
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Val Gly Asp Trp		
20	25	30
Leu Ala Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile		
35	40	45
Tyr Lys Thr Ser Ile Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65	70	75
Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Met Arg Phe Pro Tyr		
85	90	95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala		
100	105	110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly		
115	120	125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala		
130	135	140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln		
145	150	155
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser		
165	170	175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr		
180	185	190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Cys Thr Lys Ser		
195	200	205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 59  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

<400> 59

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

<210> 60  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

<220>  
<223> rF1 A114C

<400> 60

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

<210> 61  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

<220>  
<223> тяжелая цепая rF1

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

<210> 62  
<211> 120  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

<220>  
<223> rF1 A114C

<400> 62

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

&lt;210&gt; 63

&lt;211&gt; 110

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Синтетическая конструкция

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; тяжелая цепь rF1

&lt;400&gt; 63

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

&lt;210&gt; 64

&lt;211&gt; 104

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Синтетическая конструкция

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; легкая цепь rF1

&lt;400&gt; 64

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

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser  
   50               55               60  
 Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys  
   65               70               75               80  
 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr  
   85               90               95  
 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
   100

&lt;210&gt; 65

&lt;211&gt; 104

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Синтетическая конструкция

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; легкая цепь rF1

&lt;400&gt; 65

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

&lt;210&gt; 66

&lt;211&gt; 110

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Синтетическая конструкция

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; тяжелая цепь rF1

&lt;400&gt; 66

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

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть, которое связывается с представителями вида *Staphylococcus*, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий:

(а) последовательность CDR1 тяжелой цепи  
RFAMS (SEQ ID NO:1), и

(б) последовательность CDR2 тяжелой цепи  
SINNGNNPYYARSVQY (SEQ ID NO:2) или SINSGNNPYYARSVQY (SEQ ID NO:60), и

(с) последовательность CDR3 тяжелой цепи  
DHPSSGWPTFDS (SEQ ID NO:3), и

вариабельный домен легкой цепи, содержащий:

(а) последовательность CDR1 легкой цепи  
RASEENVGDWLA (SEQ ID NO:4), и

(б) последовательность CDR2 легкой цепи  
KTSILES (SEQ ID NO:5), и

(с) последовательность CDR3 легкой цепи  
QHYXRFPYT (SEQ ID NO:6),

где Х представляет собой I или M.

2. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.1, где последовательность CDR3 легкой цепи представляет собой

QHYIRFPYT (SEQ ID NO:6).

3. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.1, где последовательность CDR3 легкой цепи представляет собой

QHYMRFPYT (SEQ ID NO:6).

4. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.1, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий:

(а) каркас 1 (FW1), обладающий по меньшей мере 90% идентичностью с  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLS (SEQ ID NO: 38);

(б) каркас 2 (FW2), обладающий по меньшей мере 90% идентичностью с  
WVRQAPGRGLEWVA (SEQ ID NO: 40);

(с) каркас 3 (FW3), обладающий по меньшей мере 90% идентичностью с  
RFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAK (SEQ ID NO:42); и

(д) каркас 4 (FW4), обладающий по меньшей мере 90% идентичностью с  
WGPGLTVSS (SEQ ID NO: 44).

5. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.4, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий:

(а) каркас 1 (FW1), обладающий последовательностью  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLS (SEQ ID NO: 38) или  
EVOLVESGGGLVOPGGSLRLSCAASGFTLS (SEP ID NO: 61);

(б) каркас 2 (FW2), обладающий последовательностью  
WVRQAPGRGLEWVA (SEQ ID NO: 40);

(с) каркас 3 (FW3), обладающий последовательностью  
RFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAK (SEQ ID NO: 42); и

(д) каркас 4 (FW4), обладающий последовательностью  
WGPGLTVSS (SEQ ID NO: 44).

6. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.1, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с последовательностью

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNGNNPYYARSVQ

YRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSGWPTFDSWGPGTLTVSS (SEQ ID NO:7)

7. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.6, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельный домен тяжелой цепи, обладающий последовательностью

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNGNNPYYARSVQ

YRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSGWPTFDSWGPGTLTVSS (SEQ ID NO:7)

8. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.6, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность

EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSVRQAPGRGLEWVASINSGNNPYYARSVQ  
 YRFTVSVDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSGVPTFDSWGPGTLVTVSS (SEQ ID  
 NO: 62)

9. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.1, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельный домен легкой цепи, содержащий:

- (a) каркас 1 (FW1), обладающий по меньшей мере 90% идентичностью с  
`DIQLTQSPSALPASVGDRVSITC` (SEQ ID NO: 48);
- (b) каркас 2 (FW2), обладающий по меньшей мере 90% идентичностью с  
`WYRQKPGKAPNLLIY` (SEQ ID NO: 50);
- (c) каркас 3 (FW3), обладающий по меньшей мере 90% идентичностью с  
`GVPSRFSGSMSGTEFTLTISLQPDDFATYYC` (SEQ ID NO: 52); и
- (d) каркас 4 (FW4), обладающий по меньшей мере 90% идентичностью с  
`FGQGTKLEIKRTV` (SEQ ID NO: 54).

10. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.9, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельный домен легкой цепи, содержащий:

- (a) каркас 1 (FW1), имеющий последовательность  
`DIQLTQSPSALPASVGDRVSITC` (SEQ ID NO: 48);
- (b) каркас 2 (FW2), имеющий последовательность  
`WYRQKPGKAPNLLIY` (SEQ ID NO: 50);
- (c) каркас 3 (FW3), имеющий последовательность  
`GVPSRFSGSMSGTEFTLTISLQPDDFATYYC` (SEQ ID NO: 52); и
- (d) каркас 4 (FW4), имеющий последовательность  
`FGQGTKVEIKRTV` (SEQ ID NO: 54) или `FGQGTKVEIKRTV` (SEQ ID NO: 59).

11. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.1, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий:

- (a) каркас 1 (FW1), имеющий последовательность  
`EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLS` (SEQ ID NO: 38) или  
`EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLS` (SEQ ID NO: 61) ;
- (b) каркас 2 (FW2), имеющий последовательность  
`WVRQAPGRGLEWVA` (SEQ ID NO: 40);
- (c) каркас 3 (FW3), имеющий последовательность  
`RFTVSVDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAK` (SEQ ID NO: 42); и
- (d) каркас 4 (FW4), имеющий последовательность  
`WGPGLTVTSS` (SEQ ID NO: 44); и

антитело или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельный домен легкой цепи, содержащий:

- (e) каркас 1 (FW1), имеющий последовательность  
`DIQLTQSPSALPASVGDRVSITC` (SEQ ID NO: 48);
- (f) каркас 2 (FW2), имеющий последовательность  
`WYRQKPGKAPNLLIY` (SEQ ID NO: 50);
- (g) каркас 3 (FW3), имеющий последовательность  
`GVPSRFSGSMSGTEFTLTISLQPDDFATYYC` (SEQ ID NO: 52); и
- (h) каркас 4 (FW4), имеющий последовательность  
`FGQGTKLEIKRTV` (SEQ ID NO: 54) или `FGQGTKVEIKRTV` (SEQ ID NO: 59).

12. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.1, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельный домен легкой цепи, содержащий последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с последовательностью

`DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILESGVPSRFSG`

`SGSGTEFTLTISLQPDDFATYYCQHYXRFPYTFGQGTKVEIKRTV`,

где X представляет собой I или M (SEQ ID NO:11).

13. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.12, где антитело или его функциональная часть содержит вариабельный домен легкой цепи, содержащий последовательность

`DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILESGVPSRFSG`

`SGSGTEFTLTISLQPDDFATYYCQHYXRFPYTFGQGTKVEIKRTV`,

где X представляет собой I или M (SEQ ID NO:11).

14. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.1, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержит:

- (a) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNGNNPYYARSVQ  
 YRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSGWPTFDSWGPGLTVSS (SEQ ID  
 NO: 7) , и

(b) вариабельный домен легкой цепи, содержащий последовательность  
 DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILESGVPSRFSG  
 SGSGTEFTLTISLQPDDFATYYCQHYXRFPYTFGQGTKVEIKRTV ,  
 где X представляет собой I или M (SEQ ID NO:11).

15. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.1, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержит:

(a) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность  
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNGNNPYYARSVQ  
 YRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSGWPTFDSWGPGLTVSS (SEQ ID  
 NO: 9) , и  
 (b) вариабельный домен легкой цепи, содержащий последовательность  
 DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILESGVP  
 SRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDFATYYCQHYXRFPYTFGQGTKLEIKRTV ,  
 где X представляет собой I или M (SEQ ID NO:8).

16. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.1, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержит:

(a) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность  
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNGNNPYYARSVQ  
 YRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSGWPTFDSWGPGLTVSS (SEQ ID  
 NO: 9) , и  
 (b) вариабельный домен легкой цепи, содержащий последовательность  
 DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILESGVPSRFSG  
 SGSGTEFTLTISLQPDDFATYYCQHYXRFPYTFGQGTKLEIKRA ,  
 где X представляет собой I или M (SEQ ID NO:10).

17. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.1, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержит:

(a) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность  
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNGNNPYYARSVQ  
 YRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSGWPTFDSWGPGLTVSS (SEQ ID  
 NO: 9) , и  
 (b) вариабельный домен легкой цепи, содержащий последовательность  
 DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILESGVP  
 SRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDFATYYCQHYXRFPYTFGQGTKVEIKRTV ,  
 где X представляет собой I или M (SEQ ID NO:11).

18. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.17, дополнительно содержащее константный домен легкой цепи, содержащий последовательность  
 AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS  
 LSSTLTLKADYEKHKVYACEVTQHQLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 64)

19. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.1, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержит:

(a) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность  
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNGNNPYYARSVQ  
 YRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSGWPTFDSWGPGLTVSS (SEQ ID  
 NO: 7) , и  
 (b) вариабельный домен легкой цепи, содержащий последовательность  
 DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILESGVPSRFSG

SGSGTEFTLTISLQPDDFATYYCQHYXRFPYTFGQGTKLEIKRTV ,  
 где X представляет собой I или M (SEQ ID NO:8).

20. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.1, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержит:

(a) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNNNPYYARSVQ  
YRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSGWPTFDSWGPGLTVSS (SEQ ID  
NO: 7) , и

(b) вариабельный домен легкой цепи, содержащий последовательность  
DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILESGVPSRFSG

SGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQHYXRFPYTFGQGTKLEIKRA ,

где X представляет собой I или M (SEQ ID NO:10).

21. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.1, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержит:

(a) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность  
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNNNPYY

ARSVQYRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSGWPTFDSWGPGLTVSS

(SEP ID NO: 62) , и

(b) вариабельный домен легкой цепи, содержащий последовательность:  
DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILESGVPSRFSG

SGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQHYXRFPYTFGQGTKVEIKRTV (SEQ ID NO:11)

22. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.21, дополнительно содержащее константный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWNNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS

LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP (SEQ ID NO: 63)

23. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.21, дополнительно содержащее константный домен легкой цепи, содержащий последовательность

AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS

LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEP ID NO: 64)

24. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.21, дополнительно содержащее:

(a) константный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWNNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS

LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP (SEQ ID NO: 63), и

(b) константный домен легкой цепи, содержащий последовательность

AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS

LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEP ID NO: 64)

25. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.21, дополнительно содержащее:

(a) константный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWNNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS

LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP (SEQ ID NO: 63) , и

(b) константный домен легкой цепи, содержащий последовательность

AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS

LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPCTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 65)

26. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.21, дополнительно содержащее:

(a) константный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность

CSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWNNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS

LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP (SEQ ID NO: 66) и;

(b) константный домен легкой цепи, содержащий последовательность

AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS

LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPCTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 65)

27. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.21, дополнительно содержащее:

(a) константный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность

CSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWNNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS

LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP (SEQ ID NO: 66) и;

(b) константный домен легкой цепи, содержащий последовательность

AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS

LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 64)

28. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп.1-27, где антитело или его анти-

генсвязывающая часть присоединено к цитотоксическому средству.

29. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.28, где цитотокическое средство представляет собой антибиотик.

30. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп.1-29, где виды *Staphylococcus* представляют собой *S.aureus*, *S.epidermidis*, *S.caprae*, *S.saprophyticus*, *S.capitis* или устойчивый к метициллину *S.aureus* (MRSA).

31. Выделенное антитело, которое связывается с представителями вида *Staphylococcus*, где антитело содержит:

(а) тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:55, и

(б) легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:57.

32. Выделенное антитело, которое связывается с представителями вида *Staphylococcus*, где антитело содержит:

(а) тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:56, и

(б) легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:58.

33. Выделенное антитело, которое связывается с представителями вида *Staphylococcus*, содержащее тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:55, где аспарагин в положении 53 заменен на серин, причем нумерация аминокислот согласно нумерации Kabat, и легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:57.

34. Выделенное антитело, которое связывается с представителями вида *Staphylococcus*, содержащее тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:55, где аспарагин в положении 53 заменен на серин, где аланин в положении 114 заменен на цистеин и где аргинин в положении 222 заменен на лизин, причем нумерация аминокислот согласно нумерации Kabat, и легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:57.

35. Выделенное антитело, которое связывается с представителями вида *Staphylococcus*, содержащее легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:57, где валин в положении 205 вариабельного домена легкой цепи заменен на цистеин, аланин в положении 110 вариабельного домена легкой цепи заменен на валин, и лейцин в положении 104 вариабельного домена легкой цепи заменен на валин, причем нумерация аминокислот согласно нумерации Kabat, и тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:55.

36. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.1, где одна CDR оптимизированы для улучшения эффективности связывания или стабильности.

37. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.1, дополнительно содержащее по меньшей мере одну каркасную область, где по меньшей мере одна последовательность по меньшей мере в одной каркасной области оптимизирована для улучшения эффективности связывания или стабильности.

38. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п.1, дополнительно содержащее по меньшей мере одну каркасную область, где по меньшей мере одна последовательность по меньшей мере в одной каркасной области оптимизирована для минимизации иммуногенности.

39. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающую часть по любому из пп.1-38.

40. Фармацевтическая композиция по п.39, где антитело представляет собой однодоменное антитело, одноцепочечное антитело,nanoантитело или монотело.

41. Фармацевтическая композиция по п.39, где антигенсвязывающая часть представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), Fab фрагмент или F(ab')<sub>2</sub> фрагмент.

42. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп.1-38, где указанное антитело или его антигенсвязывающая часть является человеческим.

43. Выделенная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело или его антигенсвязывающую часть по любому из пп.1-38 и 42.

44. Выделенная клетка, продуцирующая выделенное антитело, содержащая нуклеиновую кислоту по п.43.

45. Применение антитела или его антигенсвязывающей части по любому из пп.1-38 и 42 в качестве лекарственного и/или профилактического средства для лечения и/или предотвращения связанного с грамположительной бактерией нарушения.

46. Применение последовательности нуклеиновой кислоты по п.43 в качестве лекарственного и/или профилактического средства для лечения и/или предотвращения связанного с грамположительной бактерией нарушения.

47. Применение антитела или его антигенсвязывающей части по любому из пп.1-38 и 42 для получения лекарственного и/или профилактического средства для лечения и/или предотвращения связанного с грамположительной бактерией нарушения.

48. Применение последовательности нуклеиновой кислоты по п.43 для получения лекарственного и/или профилактического средства для лечения и/или предотвращения связанного с грамположительной бактерией нарушения.

49. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающую часть по

любому из пп.1-38 и 42 или последовательность нуклеиновой кислоты по п.42 и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или наполнитель.

50. Способ получения антитела или его антигенсвязывающей части по любому из пп.1-38 и 42, включающий в себя предоставление клетки, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело или его антигенсвязывающую часть, и обеспечение возможности указанной клетке транслировать указанную последовательность нуклеиновой кислоты, таким образом, продуцируя указанное антитело или его антигенсвязывающую часть.

51. Способ по п.50, где способ дополнительно включает выделение указанного антитела или его антигенсвязывающей части из клетки или клеточной культуральной среды.

52. Применение антитела или его антигенсвязывающей части по любому из пп.1-38 и 42 для диагностики инфекции *Staphylococcus*.

53. Применение последовательности нуклеиновой кислоты по п.43 для диагностики инфекции *Staphylococcus*.

54. Применение антитела или его антигенсвязывающей части по любому из пп.1-38 и 42 для детекции *S.aureus* и/или *S.epidermidis*.

55. Применение последовательности нуклеиновой кислоты по п.43 для детекции *S.aureus* и/или *S.epidermidis*.

56. Применение антитела или его антигенсвязывающей части по любому из пп.1-38 и 42 для выделения бактерий *S.aureus* и/или *S.epidermidis* из раствора.

Клон F1 aMRSA

NB: нумерация CDR согласно Kabat et al (1991)

Тяжелая цепь

Получена рекомбинацией из фрагментов генов:

IGHV3-23\*01

IGHD6-19\*01

IGHJ4\*02

АМИНОКИСЛОТЫ:

Fw1 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLS

CDR1 RFAMS

Fw2 WVRQAPGRGLEWVA

CDR2 SINNGNNPYYARSVQY

Fw3 RFTVSRDVSQLNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAK

CDR3 DHPSSGWPTFDS

Fw4 WGPGTLVTVSS

НУКЛЕОТИДЫ:

Fw1 gag gtg caa ctg ttg gag tcg ggg ggg ggc ttg gtg cag ccg ggg ggg tcc ctg aga ctc tcc  
tgt gca gcc tct gga ttc acc ctt agc

CDR1 cgc ttt gcc atg agc

Fw2 tgg gtc cgc cag gct cca gga agg gga ctg gaa tgg gtc gca

CDR2 tcg atc aat aat ggg aat aac cca tac tac gca cgg tcg gta caa tac

Fw3 cgc ttc acc gtc tcc egg gac gtc tcc cag aac act gtg tct ctg cag atg aac aac ctg aga gcc  
gaa gac tgc gcc aca tat ttc tgt get aaa

CDR3 gat cac cct agt agt ggc tgg ccc acc ttt gac tcc

Fw4 tgg ggc ccc gga acc ctg gtc acc gtc tec tcg

#### Легкая цепь

Получена рекомбинацией из фрагментов генов:

IGKV1-5\*03

IGKJ2\*01

АМИНОКИСЛОТЫ:

Fw1 DIQLTQSPSALPASVGDRVSITC

CDR1 RASENVGDWLA

Fw2 WYRQKPGKAPNLLIY

CDR2 KTSILES

Fw3 GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDFATYYC

CDR3 QHYIRFPYT

Fw4 FGQQGKLEIKRTV

НУКЛЕОТИДЫ:

Fw1 gac atc cag ttg acc cag tct ect tcc gcc ctg cct gca tct gtg gga gac aga gtc agc atc act  
tgt

CDR1 cgg gcc agt gaa aac gtt ggt gac tgg ttg gcc

Fw2 tgg tat cgg cag aaa cgg ggg aaa gcc cct aat ctt ctc atc tat

CDR2 aag aca tct att cta gaa agt

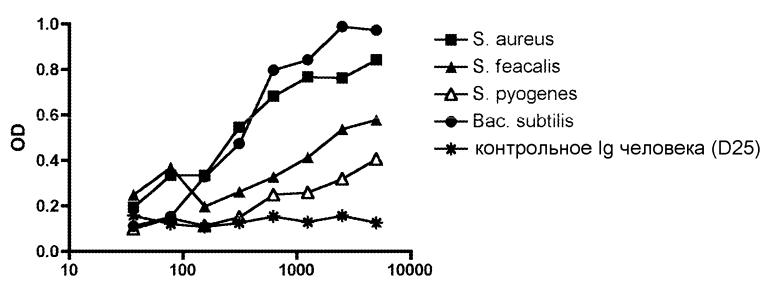
Fw3 ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc agt ggg tct ggg aca gaa ttc act ctc acc atc agc agc  
ctg cag cct gat gat ttt gca act tat tac tgt

CDR3 caa cac tat ata cgt ttc ccg tac act

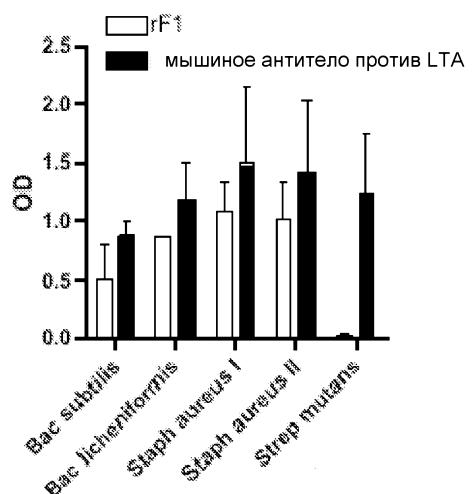
Fw4 ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc aaa cga act gtg

Фиг. 1

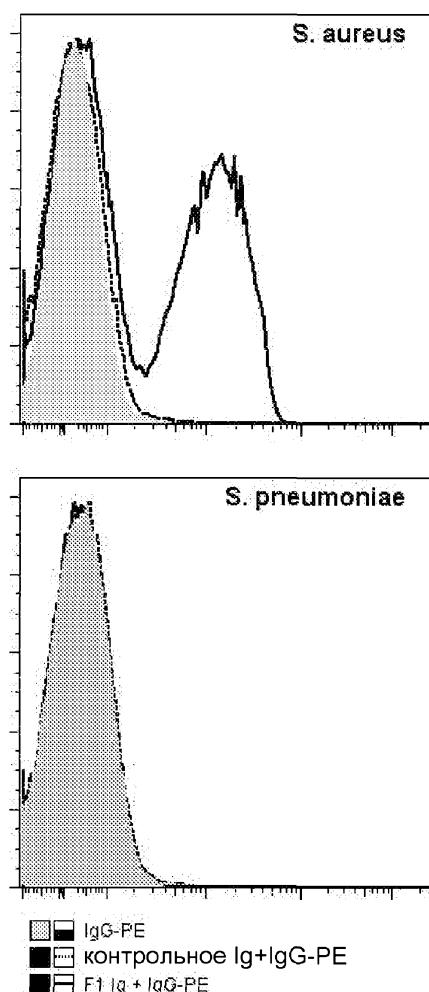
Узнавание F1 препаратов LTA из различных  
грамположительных бактерий



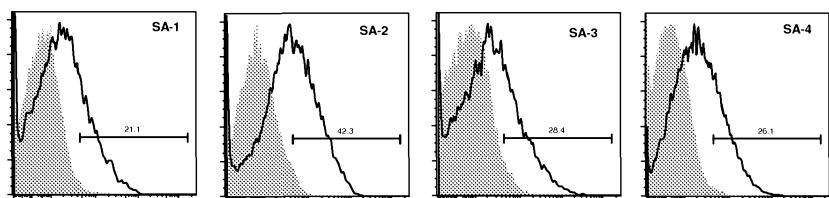
Фиг. 2А



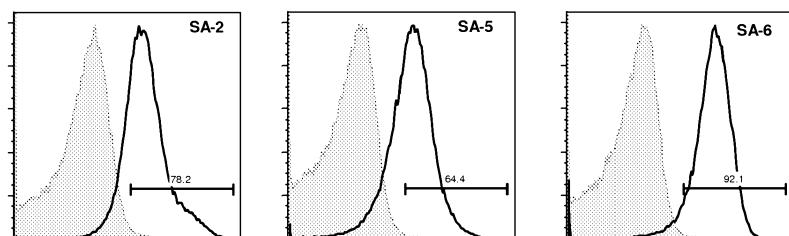
Фиг. 2В



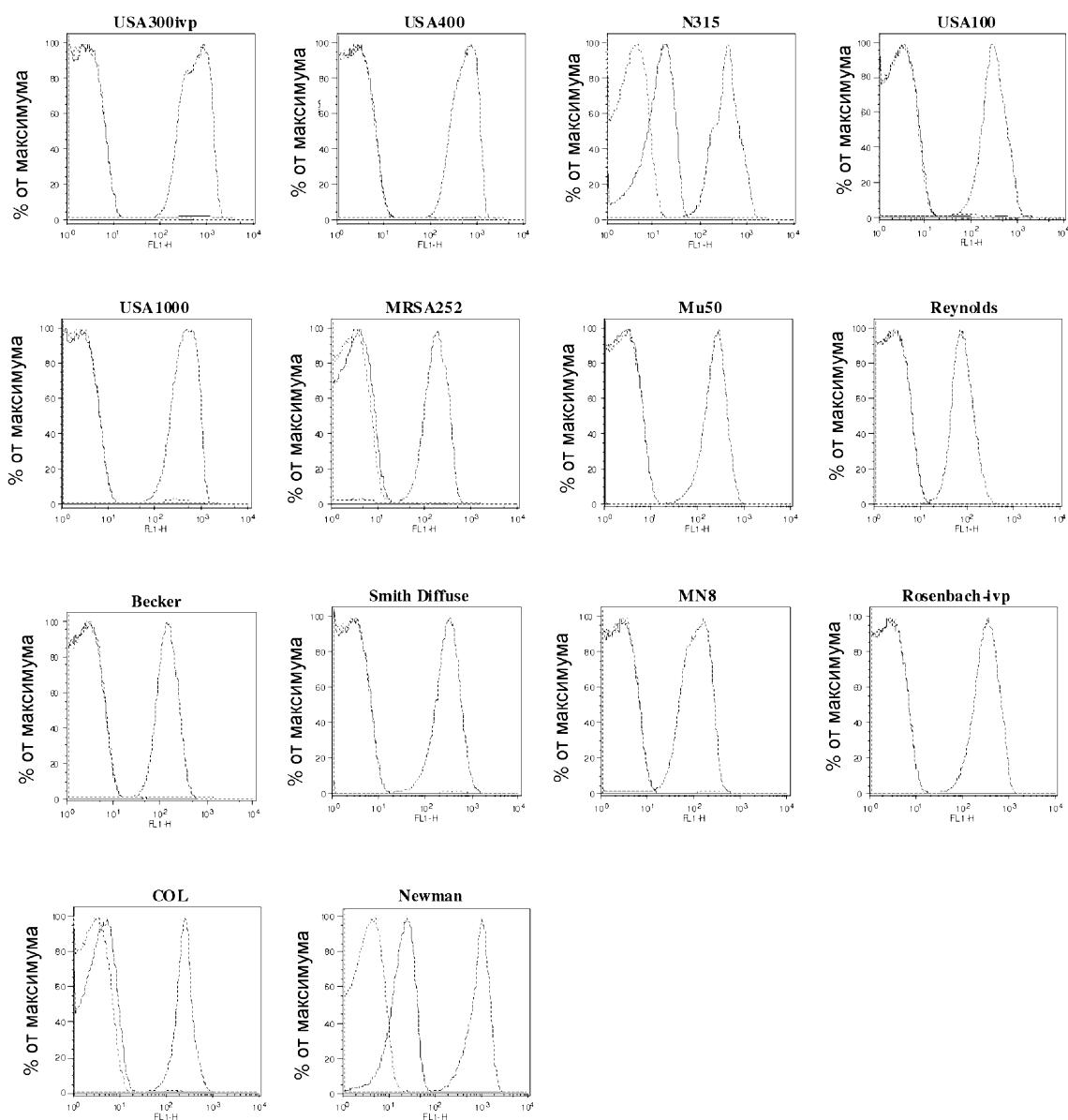
Фиг. 3А



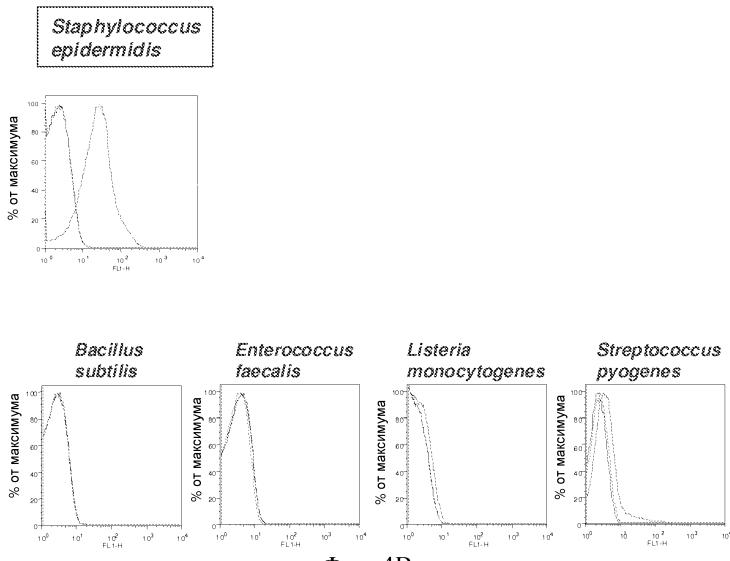
TB, 2 июля 2009 г., клинические штаммы SA



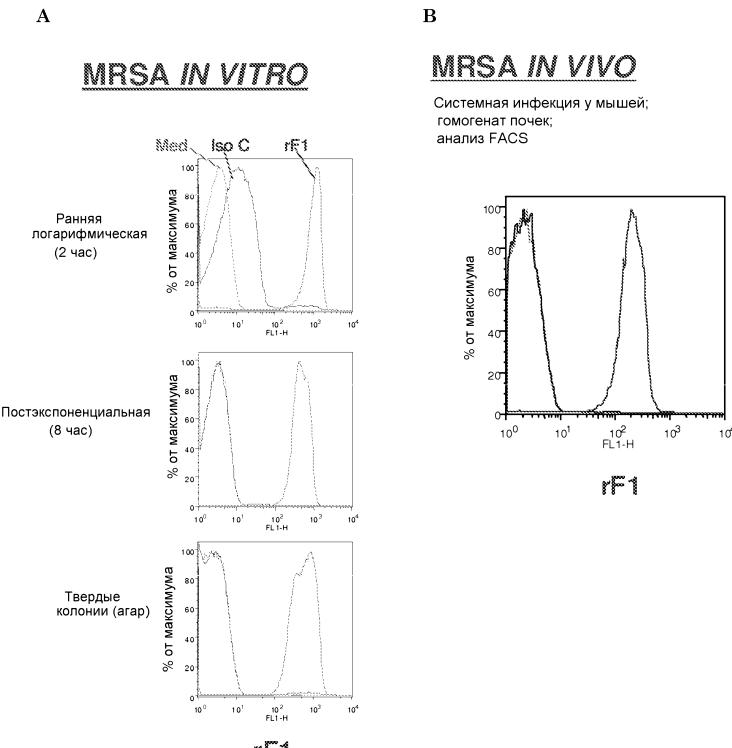
Фиг. 3В



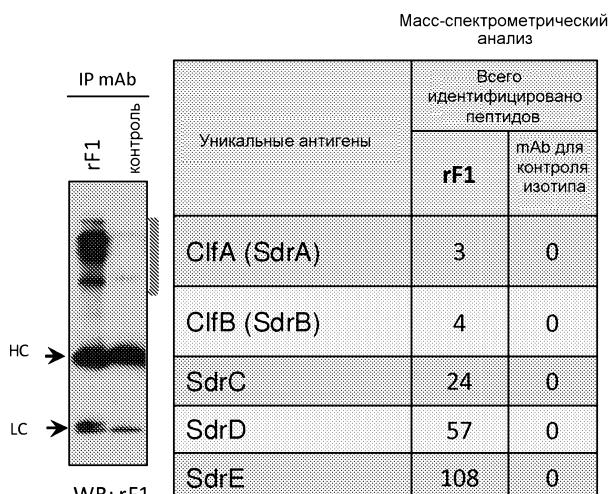
Фиг. 4А



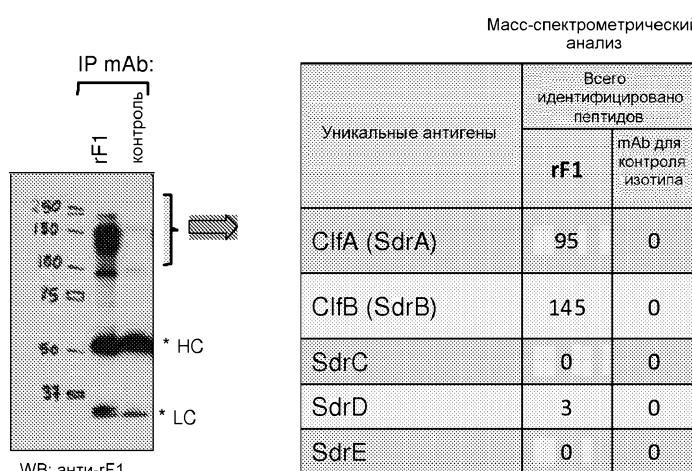
Фиг. 4В



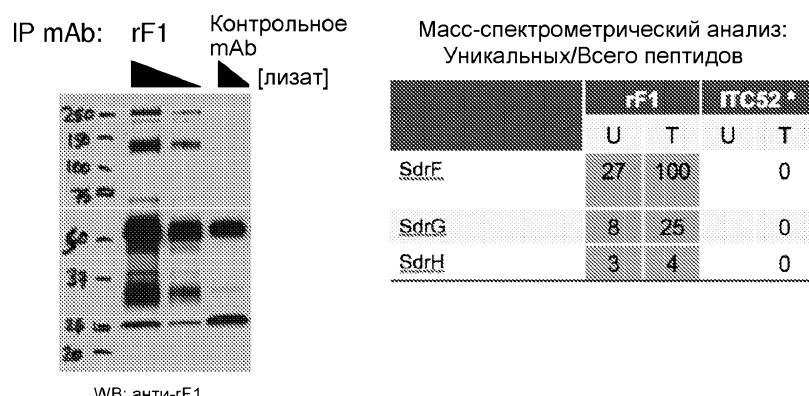
Фиг. 5



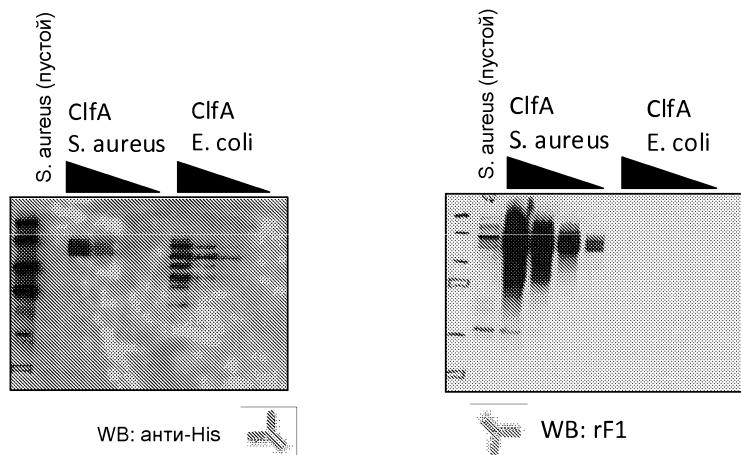
Фиг. 6А



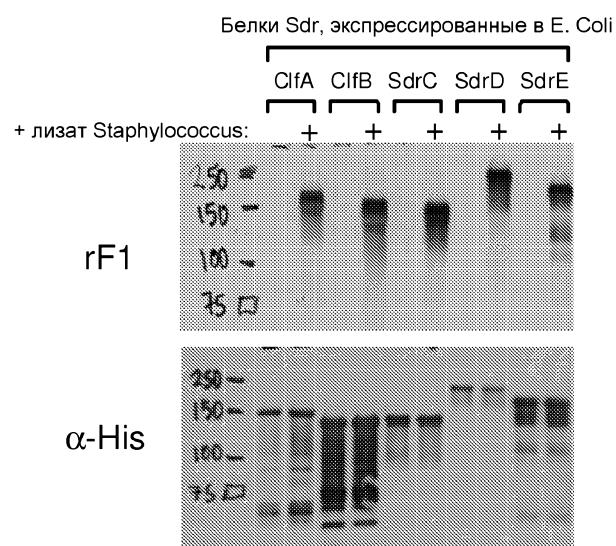
Фиг. 6В



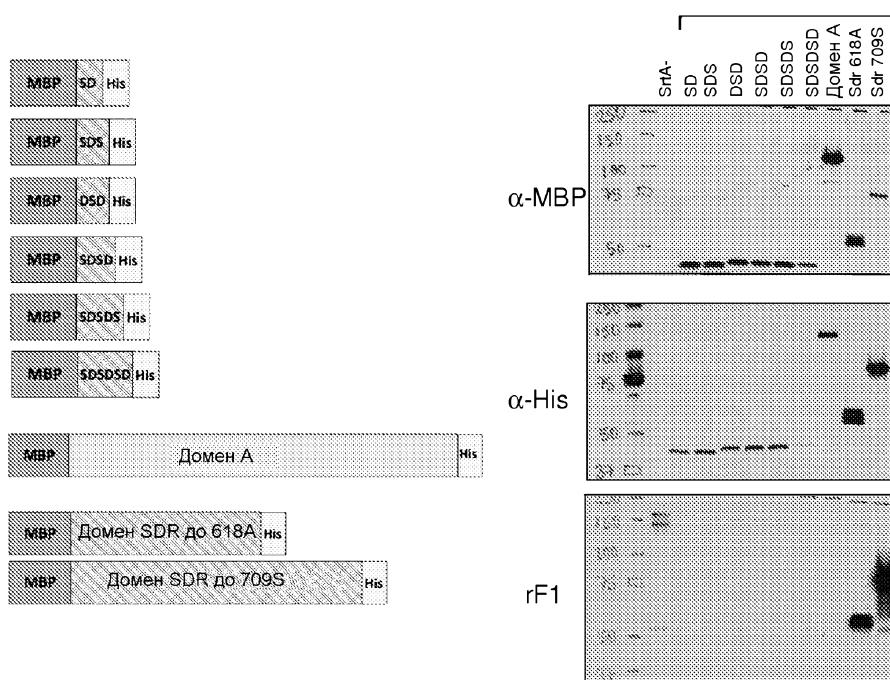
Фиг. 6С



Фиг. 7А



Фиг. 7В



Фиг. 8

тяжелая цепь rF1 rF1 A114C	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34
	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T L S R F A M
тяжелая цепь rF1 rF1 A114C	35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 A B C 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63
	S . W V R Q A P G R G L E W V A S I N N G N N P Y Y A R S V
тяжелая цепь rF1 rF1 A114C	64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 A B C 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94
	O Y R F T V S R D V S O N T V S L Q M N N L R A E D S A T Y F C A K
тяжелая цепь rF1 rF1 A114C	95 96 97 98 99 100 A B C D E F G H I J K 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 A B C D E
	D H P S S G W P T . . . . . F D S W G P G T L V T V S S
тяжелая цепь rF1 rF1 A114C	114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147
	A S T K G P S V F P L A P S S K S . . T S G G T A A L G C L V K D Y
тяжелая цепь rF1 rF1 A114C	C S T K G P S V F P L A P S S K S . . T S G G T A A L G C L V K D Y
тяжелая цепь rF1 rF1 A114C	148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181
	F P E P V T V . S W . . . N S G A L T S G . V H T F P A V L Q S .
тяжелая цепь rF1 rF1 A114C	F P E P V T V . S W . . . N S G A L T S G . V H T F P A V L Q S .
тяжелая цепь rF1 rF1 A114C	182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215
	S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T . . Q . T Y I C N V N H K P S
тяжелая цепь rF1 rF1 A114C	S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T . . Q . T Y I C N V N H K P S
тяжелая цепь rF1 rF1 A114C	216 217 218 219 A 220 221 222 223 A B C 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240
	N T K V . D K R . . . V E P K S C . D . K T H T C P
тяжелая цепь rF1 rF1 A114C	N T K V . D K R . . . V E P K S C . D . K T H T C P

Фиг. 9А

легкая цепь rF1 rF1 V205C	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32
	D I Q L T Q S P S A L P A S V G D R V S I T C R A S E . . . . N V G D W
легкая цепь rF1 rF1 V205C	D I Q L T Q S P S A L P A S V G D R V S I T C R A S E . . . . N V G D W
легкая цепь rF1 rF1 V205C	33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70
	L A W Y R Q K P G K A P N L L I Y K T S I L E S G V P S R F S G S G S G T E
легкая цепь rF1 rF1 V205C	L A W Y R Q K P G K A P N L L I Y K T S I L E S G V P S R F S G S G S G T E
легкая цепь rF1 rF1 V205C	71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 A B C D E F 96 97 98 99 100 101 102
	F T L T I S S L Q P D D F A T Y Y C Q H Y M R F P . . . . Y T F G Q G T
легкая цепь rF1 rF1 V205C	F T L T I S S L Q P D D F A T Y Y C Q H Y M R F P . . . . Y T F G Q G T
легкая цепь rF1 rF1 V205C	103 104 105 106 107 107a 108 109 A 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 A 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137
	K L E I K . R T A A A P S V F I F P P S D E O L K S G T A S V V C L L N
легкая цепь rF1 rF1 V205C	K V E I K . R T A A A P S V F I F P P S D E O L K S G T A S V V C L L N
легкая цепь rF1 rF1 V205C	138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175
	N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L
легкая цепь rF1 rF1 V205C	N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L
легкая цепь rF1 rF1 V205C	176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 A 207 208 209 210 211 212
	S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T . K S F N R G
легкая цепь rF1 rF1 V205C	S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P C T . K S F N R G
легкая цепь rF1 rF1 V205C	213 214 215 216
	E C . .
легкая цепь rF1 rF1 V205C	E C . .

Фиг. 9В