



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101928343 B

(45) 授权公告日 2014. 09. 17

(21) 申请号 200910250224. 7

(22) 申请日 2002. 01. 28

(30) 优先权数据

60/274, 611 2001. 03. 12 US

60/298, 413 2001. 06. 18 US

60/264, 072 2001. 01. 26 US

60/308, 116 2001. 07. 30 US

(62) 分案原申请数据

02804222. 0 2002. 01. 28

(73) 专利权人 英希比泰克斯公司

地址 美国佐治亚州

(72) 发明人 约瑟夫·M·帕蒂 杰夫·T·哈钦斯

保罗·多罗斯基

普拉蒂斯科沙·帕特尔

安德烈娅·霍尔

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 过晓东

(51) Int. Cl.

C07K 16/12 (2006. 01)

C12N 15/13 (2006. 01)

A61K 39/40 (2006. 01)

A61P 31/04 (2006. 01)

G01N 33/577 (2006. 01)

C12P 21/08 (2006. 01)

C12R 1/445 (2006. 01)

(56) 对比文件

EP 0781847 A1, 1997. 07. 02, 全文.

WO 9743314 A2, 1997. 11. 20, 全文.

US 6008341 A, 1999. 12. 28, 全文.

WO 00/64925 A1, 2000. 11. 02, 全文.

审查员 王慧

权利要求书1页 说明书44页 附图8页

(54) 发明名称

针对 CLFA 蛋白质的单克隆抗体和在治疗或
预防感染中的利用方法

(57) 摘要

本发明提供了可以用于治疗和预防葡萄球菌
如金黄葡萄球菌的感染的可以结合 ClfA 蛋白质,
并且是从金黄葡萄球菌的 ClfA 蛋白质的结合亚
区或活性片段,包括来自它的纤维蛋白原结合区
如 Clf40 蛋白质, Clf33 蛋白质,或 ClfA N3 的活
性片段蛋白质产生的单克隆抗体。另外,为了减少
或消除变成感染或进一步传播感染的可能性,可
以利用本发明的单克隆抗体处理医学仪器。特别
是,本发明的抗体是具有优点的,因为通过损伤或
抑制金黄葡萄球菌 ClfA 结合纤维蛋白原或纤维
蛋白的能力,它们可以预防细菌与寄主细胞的黏
附,所以可以用于治疗或预防葡萄球菌感染的方法中。

1. 一种单克隆抗体 13-2, 具有氨基酸序列 SEQ ID NO :6 的可变轻链和氨基酸序列 SEQ ID NO :8 的可变重链。
2. 一种单克隆抗体 13-2, 含有核酸序列 SEQ ID NO :5 或其简并物编码的可变轻链序列, 和核酸序列 SEQ ID NO :7 或其简并物编码的可变重链。
3. 根据权利要求 1 或者 2 所述的抗体, 所述的抗体在人或动物中治疗或预防金黄色葡萄球菌感染。
4. 根据权利要求 1 或者 2 所述的抗体, 其中所述的抗体抑制葡萄球菌与纤维蛋白原或纤维蛋白的结合。
5. 根据权利要求 1 或者 2 所述的抗体, 其中所述的抗体适于在人或动物中肠胃外, 口服, 鼻内, 皮下, 雾化或静脉内给药。
6. 根据权利要求 1 或者 2 所述的抗体, 其中单克隆抗体是选自包括小鼠, 嵌合, 人化和人单克隆抗体的类型。
7. 根据权利要求 1 或者 2 所述的抗体, 其中抗体是单链单克隆抗体。
8. 根据权利要求 1 或者 2 所述的抗体, 是针对具有选自包括 SEQ ID NO :2 和 SEQ ID NO :4 的组的氨基酸序列的蛋白质产生的。
9. 根据权利要求 8 所述的抗体, 其中蛋白质具有 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :3 或其简并物的核酸序列编码的氨基酸序列。
10. 一种分离的抗血清, 其包括有权利要求 1 或者 2 所述的抗体。
11. 一种诊断试剂盒, 其特征在于包括有权利要求 1 或者 2 所述的抗体, 以及用该抗体检测结合的装置。
12. 根据权利要求 11 所述的诊断试剂盒, 其中所述的装置是检测结合, 其中包括连接所述抗体的可检测标记。
13. 一种药物组合物, 其用于治疗或预防金黄色葡萄球菌感染, 其包括有效量的权利要求 1 或者 2 的抗体和药物可接受载体, 或赋形剂。
14. 具有结合氨基酸序列 SEQ ID NO :2 的能力的权利要求 1 或者 2 所述的单克隆抗体。
15. 具有结合由核酸序列 SEQ ID NO :1 或其简并物编码的氨基酸序列的能力的权利要求 1 或者 2 所述的单克隆抗体。
16. 根据权利要求 1 或者 2 所述的单克隆抗体, 进一步与一种生理可接受抗生素结合。
17. 根据权利要求 1 或者 2 所述的抗体, 其中可变轻链具有包括序列 WASTRES 的 CDR2 区。
18. 根据权利要求 1 或者 2 所述的抗体, 是与金黄色葡萄球菌的多个菌株有交叉反应的。

针对 CLFA 蛋白质的单克隆抗体和在治疗或预防感染中的 利用方法

[0001] 本申请是 2002 年 1 月 28 日递交的申请号为 02804222.0, 发明名称为“针对 CLFA 蛋白质的单克隆抗体和在治疗或预防感染中的利用方法”的分案申请。

[0002] 与相关申请的交叉参考

[0003] 本发明要求保护 2001 年 7 月 30 日递交的系列号 60/308, 116, 2001 年 6 月 18 日递交的系列号 60/298, 413, 2001 年 3 月 12 日递交的系列号 60/274, 611, 和 2001 年 1 月 26 日递交的系列号 60/264, 072, 这些美国临时申请的权利。

发明领域

[0004] 本发明一般涉及已经针对聚集因子 A (或 ClfA) 产生的抗体, 在金黄葡萄球菌和其他葡萄球菌细菌中表达的表面定位蛋白质, 特别是涉及针对 ClfA 蛋白质的单克隆抗体和它的活性片段或来自它的纤维蛋白原结合区如 Clf40, Clf33, 或 ClfA N3 的活性片段或蛋白质, 和它们在抑制 ClfA 蛋白质与纤维蛋白原或纤维蛋白的结合和治疗或预防金黄葡萄球菌感染中的用途。

[0005] 发明背景

[0006] 成功地寄居于寄主是大多数微生物引起动物和人中的感染所需要的过程。微生物黏连是可以最终导致疾病的一系列事件的第一个关键步骤。通过细菌表面上存在的特异的黏附素附着于调节植入的生物材料如导管, 人工关节和血管移植体的寄主的组织或血清, 致病微生物寄居于寄主。NSCRAMM™ (识别黏附基质分子的微生物表面成分) 是识别和特异地结合寄主细胞外基质中的不同成分的一个细胞表面黏附素家族。一旦细菌成功地黏附和寄居于寄主组织, 它们的生理就改变很大, 分泌了损伤成分如毒素和蛋白质水解酶。另外, 黏附细菌经常产生生物薄膜并且快速地变成对大多数的抗生素的杀死作用更具抗性。

[0007] 金黄葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 引起一系列的感染, 范围从皮肤的损伤如损伤感染, 脓包, 和疖到威胁生命的症状, 包括肺炎, 败血性关节炎, 败血病, 心内膜炎和生物材料相关的感染。已知金黄葡萄球菌表达了许多不同的 NSCRAMM, 可以单独或一起简化微生物在特异的寄主组织成分上的黏附。MSCRAMM 提供了抗体, 特别是单克隆抗体的免疫攻击的良好的靶。存在适当的抗 NSCRAMM 高亲和力抗体可以具有双边缘攻击, 第一是可以预防微生物黏附的抗体, 第二是提高简化有机体通过调理吞噬细胞的杀死作用从体内快速清除的 NSCRAMM 抗体的水平。

[0008] 但是, 仍然存在的问题是鉴定和利用关于来自金黄葡萄球菌的 NSCRAMM™ 如 ClfA 蛋白质的信息, 产生有效的单克隆抗体, 因为不同的 NSCRAMM™ 的结合特性和它们的感染性中的作用和细菌感染的传播是不同的。特别是, 开发可以结合 ClfA 和可以用于抑制或损伤葡萄球菌 ClfA 与纤维蛋白原或纤维蛋白, 从而用于预防或治疗葡萄球菌感染的方法中的单克隆抗体已经是一个问题了。所以, 在感染疾病领域的一个极大的愿望仍然是开发特别是通过抑制或损伤细菌结合纤维蛋白原或纤维蛋白的能力成功地治疗和预防许多葡萄球菌感染的单克隆抗体和其他组成。

[0009] 发明概述

[0010] 因此,本发明的一个目的是提供可以结合金黄色葡萄球菌 ClfA 蛋白质,所以用于治疗或预防葡萄球菌感染的方法中的单克隆抗体。

[0011] 也是本发明的一个目的是提供能够结合 ClfA,并且是从金黄色葡萄球菌 ClfA 蛋白质的结合亚区,包括 Clf40, Clf33 和 ClfA N3 蛋白质或它们的活性部分产生,待用于治疗或保护葡萄球菌感染的单克隆抗体。

[0012] 同样是本发明的一个目的是提供 Clf40, Clf33 和 ClfA N3 蛋白质的可以通过抑制或损伤 ClfA 蛋白质与纤维蛋白原或纤维蛋白结合预防葡萄球菌黏附的单克隆抗体。

[0013] 本发明的另一个目的是提供可以识别 ClfA 蛋白质的纤维蛋白原结合 A 区并且所以可以用于治疗,预防,鉴定或诊断葡萄球菌感染的方法中的抗体和抗血清。

[0014] 本发明的另一个目的是提供编码本发明的单克隆抗体的可变的轻序列和可变的重序列的氨基酸序列和核酸序列。

[0015] 本发明的另一个目的是提供保护抵抗金黄色葡萄球菌感染并且可以进行其他类型的葡萄球菌感染的交叉反应的 ClfA 的单克隆抗体。

[0016] 借助本发明提供的这些和其他目的包括分离和利用 ClfA 蛋白质和 / 或它的结合亚区,包括蛋白质 Clf40, Clf33 和 ClfA N3 的 预防和治疗葡萄球菌感染的单克隆抗体。所以本申请叙述了抗 ClfA,借助每个金黄色葡萄球菌菌株表达的一个表面定位蛋白质的单克隆抗体的发现,生产,鉴定和体内评估。本文出现的数据明确地证明了,抗 ClfA 和它的亚区如 Clf40, Clf33 和 N3 的单克隆抗体可以用于治疗或保护金黄色葡萄球菌的感染。

[0017] 所以,根据本发明发现和分离抗 ClfA 单克隆抗体可以用于损伤或抑制 ClfA 蛋白质与纤维蛋白原或纤维蛋白的结合,所以用于治疗或预防葡萄球菌感染的方法中。根据本发明,根据分离的 ClfA 蛋白质亚区和其中产生的抗体的适当的组成和疫苗,以及它们的利用方法也受到关注。

[0018] 阅读本申请书和 / 或通过引证而合并于本文的文献,本公开的发明的精神和范围内的这些实施方案和其他或选物和修改对于本领域技术人员将是容易理解的。

[0019] 附图的简要说明

[0020] 图 1 是当利用兔抗鼠 Fc (RAM-Fc) 抗体将本发明的单克隆抗体 13-1 或 13-2 与条片结合时,用于测量 ClfA 结合和随后结合 / 抑制纤维蛋白原的双核心分析图。

[0021] 图 2 是本发明的嵌合单克隆抗体 12-9 的双核心分析图。

[0022] 图 3 是显示与金黄色葡萄球菌 (菌株 Newman) 结合的单克隆抗体嵌合体 12-9 的流动细胞分析的图。

[0023] 图 4 是显示 ClfA 与本发明的嵌合和人化单克隆抗体 12-9 的结合亲和力的图。

[0024] 图 5 是显示保护抗金黄色葡萄球菌小鼠致死攻击模型的图。

[0025] 图 6 是显示利用本发明的单克隆抗体,整个细胞抑制金黄色葡萄球菌黏附固定的纤维蛋白原的图。

[0026] 图 7 是显示利用本发明的 12-9 小鼠,12-9 嵌合和 12-9 人化单克隆抗体竞争结合金黄色葡萄球菌的图。

[0027] 图 8 是显示 CDR1, CDR2 和 CDR3 区域中的保守序列的本发明的单克隆抗体的可变重链和可变轻链序列的描述。

[0028] 优选实施方案的详细说明

[0029] 根据本发明,提供了可以结合金黄色葡萄球菌的 ClfA 蛋白质的单克隆抗体,这些单克隆抗体已经产生,抗活性结合亚区蛋白质,包括已经由本发明人分离和纯化的 Clf40, Clf33,和 ClfA N3 区。本发明的这些单克隆抗体已经显示能治疗或保护金黄色葡萄球菌感染。

[0030] 过去,McDevitt 等人 (McDevitt et al,1994,分子微生物学,11,237-248) 鉴定了来自金黄色葡萄球菌菌株 Newman 的 92kDa 的表面蛋白质,证明是与细菌的依赖纤维蛋白原的聚集有关的,这现在公开在美国专利号 6,177,084,其被通过在此引述而合并于本文。该基因命名为 ClfA,克隆和测序了,公开在美国专利号 6,008,341,其通过在此引述而合并于本文,该区中出现了 896 个如 DNA 序列描述的氨基酸的蛋白质,介导了细菌与纤维蛋白原包衣的表面的黏附,从而鉴定 ClfA 为 MSCRAMM™。ClfA 基因包括细胞质去,跨膜区,锚在细胞壁上的区,和连接细胞锚区和 NH₂-末端区 A(独特的 520 个残基区段组成)的一个区(命名为 R)。NSCRAMM 的纤维蛋白原结合区已经定位于区域 A 内的 218 个残基区段。McDevitt 等人 (McDevitt et al.,1995,分子微生物,16,895-907) 已经报道,ClfA 的区域 A 对于聚集表现型是足够的。

[0031] 但是,过去,没有人能够生产金黄色葡萄球菌 ClfA 蛋白质的单克隆抗体。因此,本发明涉及可以结合 ClfA 蛋白质或它的结合亚区,包括 Clf40,Clf33 和 ClfA N3 蛋白质并且所以当利用的量能有效预防或治疗感染时,可以用于预防和治疗葡萄球菌感染的方法中的分离的和/或纯化的单克隆抗体。这些单克隆抗体可以利用例如,Kohler and Milstein,自然 256:495-497(1975),或其他本领域已知的适当方法来生产,另外可以本领域已知的方法制备成嵌合的,人化的,或人单克隆抗体。另外,这些单克隆抗体可以从单链,如轻或重链来制备,另外可以从保留整个抗体的结合特征(例如,特异性和/或亲和性)的抗体的活性片段来制备。活性片段是指具有与结合 ClfA 蛋白质的完全抗体相同的结合特异性的抗体片段,术语“抗体”用于本文包括所述的片段。另外,利用本发明的单克隆或多克隆抗体制备的抗血清也受到关注,并且可以许多本领域技术人员认识到的适当方法制备。

[0032] 如上指示,ClfA 可以许多本领域已知的适当方法来制备,如已经确立的上述 Kohler and Milstein 方法,可以用于生产单克隆抗体,在一个这样的方法中,可以用纯化的重组 ClfA 蛋白质,或分离的亚区蛋白质如 Clf40, Clf33 或 ClfA N3,或其活性部分来腹腔内一星期一次注射小鼠一个较长的时期,接着测试从免疫小鼠得到的血液确定与纯化的 ClfA 的反应性。在鉴定了小鼠与 ClfA 的反应后,将来自小鼠脾的淋巴细胞与小鼠骨髓细胞融合,测试对抗 ClfA 的抗体阳性的杂交瘤,然后分离,培养,接着纯化和同型。

[0033] 为了产生本发明的单克隆抗体,所以优选的是利用重组制备的 ClfA,Clf40,Clf33 或 N3 蛋白质,利用本领域已知的常规方法来生产这些抗体。例如,一个这样的方法利用了大肠杆菌表达载体 pQE-30,作为克隆和表达重组蛋白质和肽的表达载体。

[0034] 利用 PCR,从金黄色葡萄球菌基因组 DNA 扩增 ClfA 的 A 区(代表 AA 40-559 的 Clf40 或代表 AA 221-550 的 Clf33),亚克隆进大肠杆菌表达载体 pQE-30(Qiagen),允许表达含有 6 个组氨酸残基的重组融合蛋白质。随后将该载体转化进大肠杆菌菌株 ATCC 55151,生长在 15 升的发酵罐中直到最佳密度(OD₆₀₀)为 0.7,用 0.2mM 异丙基-β-D 半乳糖苷(IPTG)诱导 4 小时。利用 AG 技术中空过滤装置(孔大小为 0.45um)收获细胞,在 -80℃ 冷冻细胞糊。以 1100psi 的压力并两次通过 French Press,在 1XPBS(10ml 缓冲液/1g 细胞

糊)溶解细胞。在 17,000rpm 旋转溶解的细胞 30 分钟,除去细胞碎片。上清液通过用 0.1M NiCl_2 装载的 5 毫升 HiTrap 螯合柱 (Pharmacia)。在装载后,用 5 倍柱体积的 10mM Tris, pH 8.0, 100mM NaCl (缓冲液 A) 洗涤柱。用超过 30 个柱体积的 0-100%梯度的 10mM Tris, pH 8.0, 100mM NaCl, 200mM 咪唑 (缓冲液 B) 洗脱蛋白质。在约 13%缓冲液 B (-26mM 咪唑) 洗脱 Clf40 或 Clf33。检测在 280nm 处的吸光值。在 1XPBS 中透析含有 Clf40 或 Clf33 的部分。

[0035] 然后,将蛋白质通过除去内毒素过程。将这一过程中利用的缓冲液通过 5 毫升的 MonoQ 琼脂糖柱 (Pharmacia) 制成无内毒素的。将蛋白质平均分在 4 个 15 毫升的管中。每个管的体积用缓冲液 A 加到 9 毫升。在每个管中加入 1 毫升 10%的曲通 X-114,在 4℃旋转温育 1 小时。将管放置于 37℃的水浴分离各相。在 2,000rpm 旋转试管 10 分钟,回收每个试管的上层水相,重复用去垢剂萃取。合并来自第二次萃取的水相,通过 5 毫升的 IDA 螯合柱 (Sigma),用 0.1M NiCl_2 洗涤,除去残留的去垢剂。用 9 个柱体积的缓冲液 A 洗涤柱,然后用 3 个柱体积的缓冲液 B 洗涤蛋白质。将洗脱液通过 5 毫升的 Detoxigel 柱 (Sigma),并且流通回收,再加入到柱上。回收第二次通过时的流通液,在 1XPBS 中透析。分析纯化的产物的浓度,纯度,和内毒素水平,然后对小鼠给药。

[0036] 在本文中,用这一方法得到的 Clf40 的氨基酸序列表示为 SEQ ID NO :2,是具有 SEQ ID NO :1 所述的序列的核酸,或其间并物编码的。另外,用这一方法得到的 Clf33 的氨基酸序列在本文中表示为 SEQ ID NO :4,是具有 SEQ ID NO :3 所述的序列的核酸或其间并物编码的。

[0037] 根据本发明,在分离了 ClfA 蛋白质或它的活性亚区如 Clf40, Clf33 或 ClfA N3 后,可以用许多适当方法生产这些蛋白质的单克隆抗体。例如,在一个优选的方法中,利用纯化的 Clf40 和 Clf33 蛋白质生产一组小鼠单克隆抗体。简要地说,一组 Balb/C 小鼠接受了一系列的 50g Clf40 或 Clf33 蛋白质溶液或混合如下所述的佐剂的皮下免疫:

[0038]

注射	天	量(ug)	途径	佐剂
初级	0	50	皮下	Freund 完全
加强#1	14	5(Clf40) 10(Clf33)	静脉内	PBS

[0039] 在最后加强后 3 天,除去脾,撕碎放进单细胞悬浮液中,回收淋巴细胞。然后,将淋巴细胞与 SP2/0-Ag14 骨髓瘤细胞系 (ATCC#1581) 融合。细胞融合,随后根据来自现代免疫学方案 (第二章,2 单元) 的单克隆抗体方案来进行平铺和饲喂。

[0040] 然后,利用标准的 ELISA 实验,筛选从融合产生的任何克隆中的特异的抗 Clf40 抗体的产生。扩展阳性克隆,进一步实验。开始时鉴定 15 个阳性克隆,通过有限稀释进一步鉴定。在直接结合的 ELISA 中测试单个细胞的克隆的活性,这是一个修改的 ELISA,通过流动细胞计检测纤维蛋白原与 CLF40 的结合的抑制,整个细菌细胞的结合,和通过双核分析检测 Clf40 结合的亲和性。

[0041] 在用兔 IgG (50mg/ml) 封闭蛋白质 A 位点后,回收金黄葡萄球菌细菌样品 (菌株

Barnett, 67-0, ATCC#25923 和 ATCC#49230), 用浓度 2 毫克 / 毫升的 Mab 13-2, 12-9, 13-1 或 PBS 单独 (对照) 洗涤和温育。在用抗体温育后, 用作为检测抗体的山羊 $-F_{(ab)2}$ - 抗 - 小鼠 $-F_{(ab)2}$ -FITC 温育细菌细胞。在抗体标记后, 通过 FACScaliber 流动细胞计抽吸细菌细胞, 分析荧光发散 (激发波长 : 488, 发散波长 : 570)。对于每个细菌菌株, 回收 10,000 个, 测定。

[0042] 用 PBS (pH 7.4) 中的 1 毫克 / 毫升 Clf40 溶液包衣高结合的 96 孔平板, 覆盖, 和在室温温育 2 小时。然后, 用 PBS, 0.05% 吐温 20 洗涤平板, 在室温用 1% BSA 溶液封闭 1 小时。在洗涤后, 加入单克隆抗体上清液, 在室温温育平板 1 小时。然后, 洗涤平板, 在每个孔中加入 0.1mg/ml 人纤维蛋白原溶液。在室温温育平板 1 小时并且洗涤。以 PBS, 0.05% 吐温 20, 0.1% BSA 中 1 : 750 稀释加入羊抗纤维蛋白原 AP 共轭物, 允许在室温温育 1 小时。然后, 洗涤平板, 加入 pNPP (显影液), 最后浓度为 1mg/ml。在 37°C 温育平板 15-30 分钟, 在 405nm 阅读结果, 用 PerkinElmer HTS 7000Bio-Assay 读数器分析。

[0043] 利用软件中包括的配体捕获方法, 在 Biacore 3000 上进行动力学分析。兔抗 - 小鼠 $-Fc$ 抗体 (Biacore) 是与 CM5 条结合的胺。然后, 将待分析的单克隆抗体通过条, 允许结合 Fc 部分。然后, 将各种浓度的 Clf40 或 Clf33 部分通过条表面, 收集数据。利用 Biacore 提供的评估软件 (3.1 版), 检测 K_{on} 和 K_{off} , 计算 K_A 和 K_D 。

[0044] 正如下面的数据所示, 产生针对 Clf40 或 Clf40 的活性部分 (N2N3 或 N3 区域) 的本发明的单克隆抗体的免疫已经产生了不同的各种反应性和交叉反应方案的单克隆抗体。

[0045] 虽然利用 ClfA 蛋白质的重组形式产生抗体是优选的, 抗体可以从天然分离额和纯化的 ClfA 蛋白质或区域产生, 可以用如上所述的得到这样的抗体的相同方法, 利用天然的 ClfA 蛋白质或活性区域产生单克隆或多克隆抗体。可以利用重组的或天然的纯化 ClfA 蛋白质或它的活性区域, 利用其他的常规方法生产本发明的 ClfA 抗体, 正如本领域的技术人员认识到的。

[0046] 正如本领域技术人员认识到的, 为了治疗或预防葡萄球菌引起的感染, 也可以将本发明的抗体配制成适当的药物组合物对人或动物患者给药。含有本发明的抗体的药物组合物或其有效片段可以与任何适当的药物载体, 赋形剂或本领域常用的载体, 包括如盐水, 葡萄糖, 水, 甘油, 乙醇, 其他治疗化合物和其结合体联合配制。正如本领域技术人员认识到的, 特别的载体, 赋形剂或利用的载体将根据患者和患者的状况来变化, 正如本领域技术人员认识到的, 许多种给药方式都适于于本发明的组合物。本申请书公开的任何药物组合物的适当的给药方法包括, 但不限于局部地, 口服, 阴道, 静脉内, 腹膜内, 肌肉内, 皮下, 鼻内和经皮给药。

[0047] 对于局部给药, 将组合物配制成油膏, 奶液, 凝胶, 洗液, 滴剂 (如眼滴剂和耳滴剂), 或溶液 (如嘴洗液) 形式。伤口或外科抹剂, 缝线和气雾剂可以浸渍本组合物。本组合物可以含有常规添加剂, 如防腐剂, 溶剂, 促进渗透, 和润肤剂。局部配方也可以含有常规载体如奶液或油膏基质, 醇或油醇。

[0048] 抗体组合物的其他形式, 和关于组合物的其他信息, 关于其他 NSCRAMM™ 的方法和申请通常也可以用于本发明, 包括 ClfAMSCRAMM™ 的抗体, 并且公开在例如美国专利 6,288,214 (Hook et al.), 引入作为参考。

[0049] 针对 ClfA 蛋白质或它的有效亚区如 Clf40, Clf33 或 N3 产生的本发明的抗体组合物也可以与适当的佐剂, 以增强针对共轭物的免疫原应答的有效量一起给药。适当的佐剂

例如可以包括铝（磷酸铝或氢氧化铝），在人中广泛使用，其他佐剂如皂甙和它的纯化成分 QuiA, Freund 完全佐剂, RIBBI 佐剂, 和其他用于研究和兽医应用的佐剂。其他化学定义的制剂如胞壁酰二肽, 单磷酸脂 A, 磷酸脂共轭物如 Goodman-Snitkoff et al. 免疫学杂志, 147:410-415(1991) 中所述的, 其通过在此引述而合并于本文, 和在蛋白脂质体内的共轭物的包囊如 Miller et al., J. Exp. Med. 176:1739-1744(1992), 其通过在此引述而合并于本文, 和蛋白质在脂载体中的包囊如 Novasome™ 脂载体 (Micro Vascular Systems, Inc., Nashua, NH) 也可以利用。

[0050] 所以在任何事件中, 利用本发明的抗体组合物在葡萄球菌上的 ClfA 和寄主细胞和组织上的纤维蛋白原之间调节, 抑制结合的相互作用, 或替代已经变成与寄主细胞和组织结合的纤维蛋白原的葡萄球菌。因此, 本发明在开发预防或治疗葡萄球菌感染的组合物和方法中, 和抑制葡萄球菌与寄主组织和 / 或细胞的结合中有特别的应用。

[0051] 根据本发明, 提供了预防或治疗葡萄球菌感染的方法, 包括给药有效量的 ClfA 蛋白质或它的活性亚区如 Clf40, Clf33 或 N3 的抗体治疗或预防感染。另外, 这些多克隆抗体已经显示可用于破坏葡萄球菌与纤维蛋白原或纤维蛋白的结合, 并且所以证明在治疗或预防葡萄球菌如金黄葡萄球菌中是有效的。进一步, 本发明的抗体双倍地有效在于它们已经显示在许多种金黄葡萄球菌菌株中有交叉反应性, 所以能提高基于本发明的单克隆抗体的组合物的效率。

[0052] 因此, 根据本发明, 以任何上述常规方法给药本发明的抗体（如, 局部, 肠胃外, 肌肉内等等）, 将提供治疗或预防人或动物患者中葡萄球菌感染的非常有用的方法。有效量是指利用的水平, 如抗体效价将是足以预防细菌的黏附, 抑制葡萄球菌与寄主细胞的结合, 所以可用于治疗或预防葡萄球菌感染。正如本领域技术人员认识到的, 有效治疗或预防葡萄球菌感染需要的抗体效价水平将根据患者的特征, 状况, 和 / 或已经存在的葡萄球菌的感染的严重性而变化。

[0053] 除了利用 ClfA 蛋白质的抗体和该蛋白质的 A 区中的区域如上所述治疗或预防金黄葡萄球菌感染, 本发明也关注这些抗体的各种利用方法, 包括检测金黄葡萄球菌的存在来诊断葡萄球菌感染, 是否患者或医学仪器也感染了。根据本发明, 检测存在葡萄球菌感染的一个优选的方法包括得到怀疑被一个或多个葡萄球菌种类或菌株感染的样品, 如取自个体, 例如一个人的血液, 唾液, 组织, 骨, 肌肉, 软骨或皮肤的样品。然后, 溶解细胞, 萃取, 沉淀和扩增 DNA。在分离样品后, 可以进行利用本发明的抗体的诊断测试检测金黄葡萄球菌的存在, 这样的检测样品中的细菌的存在的测试技术是本领域技术人员已知的, 包括如放射免疫测试, Western 印迹分析和 ELISA 测试。通常, 根据本发明, 诊断金黄葡萄球菌感染的方法是受到关注的, 其中已经根据本发明在怀疑感染金黄葡萄球菌的样品中加入 ClfA 蛋白质抗体, 抗体结合了样品中的 ClfA 蛋白质就指示有金黄葡萄球菌。

[0054] 因此, 本发明的抗体可以用于特异地检测葡萄球菌图谱蛋白质, 预防葡萄球菌的感染, 治疗正在的感染, 用作研究工具。术语“抗体”如本文所用包括单克隆, 多克隆, 嵌合, 单链, 双特异, 猿化, 人化或灵长类抗体, 以及 Fab 片段, 如维持抗体与 ClfA 蛋白质的结合特异性的那些片段, 包括 Fab 免疫球蛋白表达文库的产物。因此, 本发明关注如上所述的抗体的单链如可变重链和轻链的用途。这些类型的抗体或抗体片段的通性是本领域技术人员已知的。在目前的情况中, ClfA 蛋白质的单克隆抗体已经产生, 分离并且显示能保护葡

萄球菌的感染。

[0055] 任何上述抗体可以直接用可检测标记来标记以鉴定和定量葡萄球菌。用于免疫测试的标记通常是本领域技术人员已知的,包括酶,放射性同位素和荧光,发光的和色素物质,包括带颜色的颗粒如胶质金或乳汁小珠。适当的免疫实验包括酶联免疫吸附实验(ELISA)。

[0056] 或者,抗体可以间接地通过与具有免疫球蛋白亲和力的标记物质反应来标记。抗体可以与第二个物质结合,并且用已标记的与结合抗体的第二个物质有亲和力的第三个物质来检测。例如,抗体可以结合生物素,利用标记的抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白来检测抗体生物素结合物。同样,抗体可以与半抗原结合,利用标记的抗半抗原抗体检测抗体-半抗原结合物。这些和其他标记的抗体和实验结合物的方法是本领域技术人员已知的。

[0057] 如上所述的 C1fA 抗体也可以用于生产设备或实验室分离附加量的蛋白质,如通过亲和层析。例如,本发明的抗体也可以用于分离附加量的 C1fA 蛋白质或它的活性片段。

[0058] 本发明的分离抗体或其活性片段也可以用于开发抗葡萄球菌感染的消极免疫的疫苗。另外,当作为药物组合物对伤口给药或用于体外和体内包衣医学装置或多聚体生物物质时,本发明的抗体可以用于那些已经有葡萄球菌感染的情况中,因为这些抗体具有进一步限制和抑制金黄葡萄球菌与纤维蛋白原或纤维蛋白结合从而限制感染的程度和传播的能力。另外,抗体可以根据需要进行修饰,以致在一些情况中,它在给药的患者中免疫原性很小。例如,如果患者是人,抗体可以通过将杂交瘤起源的抗体的补体确定区移植进人的单克隆抗体来“人化”,如 Jones et al., Nature 321:522-525(1986) 或 Tempest et al. Biotechnology 9:266-273(1991) 所述,或通过改变接触免疫球蛋白的可变区的小鼠框架残基的表面来“veneered”,模拟同源的人框架部分,如 Padlan, 分子免疫学, 28:489-498(1991) 所述,这些参考文献都通过在此引述而合并于本文。甚至,当需要时,本发明的单克隆抗体可以结合适当的抗生素给药,进一步增强本组合物对抗细菌感染的能力。

[0059] 用本文所述的抗体,蛋白质和活性片段包衣的医学装置或多聚体生物物质,包括,但不限于纤维,缝线,替代心脏阀,心脏辅助装置,硬的和软的接触镜,眼内镜植入体(前室或后室),其他植入体如角膜嵌体,角质修补,血管 stents, epikeratophalia 装置,青光眼分流器,视网膜纱布,巩膜带扣,牙科嵌体,甲状腺塑料装置,血管移植体,软的和硬的组织嵌体包括,但不限于泵,电子装置,包括刺激物和记录器,听觉嵌体,起搏器,人工喉,牙科植入体,乳房植入体,阴茎植入体,颅骨/面腱,人工关节,腱,韧带,半月板,和盘,人工骨,人工器官包括人工胰脏,人工心脏,人工假肢,和心脏阀;stents,金属丝,引导金属丝,静脉内和中央静脉导管,激光和气球成形术装置,血管和心脏装置(管,导入管,气球),室辅助器,血管透析成分,血液氧化物,尿道/尿管/泌尿装置(Foley 导管,stents,试管和气球),气道导管(气管内的和气管造口管和切口),内饲管(包括鼻胃的,胃内的和空肠的管),伤口引流管,用于引流体腔的管如胸膜的,腹膜的,颅的,心包腔,血袋,试管,血收集管,真空容器,针筒,针头,吸管,吸管尖,和血管。

[0060] 本领域技术人员能够理解的是,术语“已包衣”或“正包衣”,如本文所用指将抗体或活性片段,或从其起源的药物组合物应用到装置的表面,优选地是接触葡萄球菌感染的外表面。装置的表面不需要全部覆盖蛋白质,抗体或活性片段。

[0061] 在一个优选的实施方案中,抗体也可以用作将用于提供治疗或预防葡萄球菌感染的适当抗体的消极疫苗。正如本领域技术人员已知,可以包装疫苗用于许多适当方法中给药,如肠胃外的(即,肌肉内,皮内,或皮下)给药,或鼻咽的(即,鼻内)给药。一个这样的方式是疫苗肌肉内注射进例如,三角肌,但是特别的给药方式将取决于待处理的细菌感染和患者的状况的特征。疫苗优选地结合药物可接受载体来简化给药,载体通常是水,缓冲盐,有或没有防腐剂。疫苗可以冻干,在给药的时候再悬浮,或在溶液中。

[0062] 给药本发明的抗体组合物的优选剂量是将对预防或治疗葡萄球菌感染有效的量,一个技术人员能容易地认识到,这一量将极大地取决于感染的特征和患者的状况。如上指示,用于本发明的抗体或药物试剂的“有效量”是指非毒性但足够量的试剂,以致产生需要的预防或治疗效果。正如下面指出的,准确量的抗体或需要的特定的试剂在一个主体和另一个主体之间是不同的,取决于种类,年龄,和受试者的一般状况,带治疗的症状的严重性,特定的载体或利用的佐剂,和它的给药方式等等。因此,任何特定抗体组合物的“有效量”将根据特定的情况变化,适当的有效量可以在每个应用情况中由本领域的技术人员利用唯一途径所用来确定。剂量应该调节到适于组合物给药的个体,将根据年龄,体重和个体的代谢情况改变。组合物另外可以含有稳定剂或药物可接受防腐剂,如硫柳汞(乙基(2-巯基苯甲酸盐-S),汞钠盐)(Sigma 化学公司, St Louis, MO)。

[0063] 当利用适当的标记或其他适当的可检测生物分子或化学物时,本文所述的单克隆抗体利用的目的如体内和体外的葡萄球菌感染的诊断或葡萄球菌的检测。实验室研究也可以通过这样的抗体来简化。各种类型的标记和将标记与本发明的抗体结合的方法是本领域技术人员已知的,如下面所述。

[0064] 抗体例如可以直接或通过螯合与放射性标记结合,如,但不限于 ^{32}P , ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{125}I , ^{131}I 。检测标记的方法有闪烁计数, gamma 衍射光谱或放射自显影。生物发光标记,如萤火虫荧光素衍生物也可以利用。生物发光物质可以共价地与蛋白质通过常规方法结合,并且当酶如荧光素酶催化与 ATP 的反应引起生物发光分子放射光子时可以检测标记的蛋白质。荧光原也可以用于标记蛋白质。荧光原的例子包括荧光素和衍生物,藻红素,别藻兰蛋白,藻兰蛋白,罗丹明和 Texas 红。荧光原通常用荧光检测器检测。

[0065] 在细胞中的配体的定位可以通过如上所述地标记抗体,和根据本领域技术人员已知的方法如免疫荧光显微镜检测标记来确定,方法如 Warren and Nelson 所述 (Mol. Cell. Biol., 7 :1326-1337, 1987)。

[0066] 如上指示,本发明的单克隆抗体或其活性部分或片段是特别可以用于干扰有关感染的葡萄球菌病原体和哺乳动物寄主之间的最初的物理相互作用的,如细菌与哺乳动物细胞外基质蛋白质如纤维蛋白原的黏附,并且这一物理相互作用的干扰可以用于治疗患者和预防或减少内住的医学装置的细菌感染,以使它们使用时安全。

[0067] 在本发明的另一个实施方案中,提供了可以用于分离和鉴定葡萄球菌的试剂盒,其中包括适当形式的本发明的抗体,如单个容器中的冻干粉,然后加入怀疑含有葡萄球菌的水溶液样品而变成有活性。这样的试剂盒通常将包括含有适当形式的抗体和适当的免疫检测试剂的适当容器,允许鉴定复合物与本发明的 ClfA 抗体的结合。例如,免疫检测试剂可以含有适当的检测信号或标记,如生物素或产生可检测颜色等等的酶,通常可以与抗体连接,或可以在其他适当的方法中使用,当抗体与抗原结合时提供可检测的结果。

[0068] 简要地说,结合 ClfA 蛋白质或其活性片段的本发明的抗体所以在治疗或预防人和动物患者和医学或其他内居装置的葡萄球菌感染中特别有用。因此,本发明涉及鉴定和分离可以结合 ClfA 的抗体的方法,可以用于治疗葡萄球菌感染的方法中,包括调理吞噬细胞性地杀死该细菌。利用本方法鉴定和 / 或分离的抗体,如 ClfA 抗体可以结合 ClfA 蛋白质,和可以预防或治疗葡萄球菌感染,是本发明的一部分。

实施例

[0069] 提供的下面的实施例用于举例说明本发明的优选的实施方案。本领域的技术人员应该理解,这些实施例中公开的技术按照本发明人发现的代表技术能在本发明的实践中起良好的作用,所以可以考虑构成它的实践的优选模式。但是,本领域的技术人员应该能够根据本公开对特定的实施方案进行许多改变,并且仍然可以在不脱离本发明的精神和范围内得到类似或相似的结果。

[0070] 实施例 1: Clf40 和 Clf33 的分离和测序

[0071] 利用 PCR,从金黄葡萄球菌 Newman 基因组 DNA 扩增 ClfA 的区域 (Clf40 代表 AA 40-559 或 Clf33 代表 AA 221-550),并且亚克隆进大肠杆菌表达载体 PQE-30 (Qiagen),允许表达含有 6 个组氨酸残基的重组融合蛋白质。随后,将这一载体转化进大肠杆菌菌株 ATCC 55151,生长在 15 升的发酵罐中到最适光密度 (OD_{600}) 为 0.7,用 0.2mM 异丙基- β -D 半乳糖苷 (IPTG) 诱导 4 小时。利用 AG 技术中空纤维装置 (孔大小 0.45 μ m) 收获细胞,在 -80°C 冷冻细胞糊。在 1XPBS (10ml 缓冲液 / 1g 细胞糊) 中以 1100psi 两次通过 French Press 溶解细胞,在 17,000rpm 旋转溶解的细胞 30 分钟除去细胞碎片。将上清液通过用 0.1M $NiCl_2$ 装载的 5 毫升 HiTrap 螯合柱 (Pharmacia)。在装载后,用 5 个柱体积的 10mM Tris pH8.0, 100mM NaCl (缓冲液 A) 洗涤柱。用 0-100% 梯度的 10mM Tris, pH8.0, 100mM NaCl, 200mM 咪唑 (缓冲液 B), 量超过 30 个柱体积来洗脱蛋白质。Clf40 或 Clf33 洗脱在约 13% 缓冲液 B ($\sim$ 26mM 咪唑) 处。检测了 280nm 处的吸光值。在 1XPBS 中透析含有 Clf40 或 Clf33 的部分。

[0072] 然后,将蛋白质通过内毒素除去过程。通过一个 5 毫升的单 Q 琼脂糖柱 (Pharmacia) 将在这一过程中利用的缓冲液制成无内毒素。将蛋白质均分在 4 个 15 毫升的试管中。用缓冲液 A 将每个管的体积加到 9 毫升。在每个管中加 1 毫升 10% 的曲通 X-114,在 4°C 旋转温育 1 小时。将试管放置于 37°C 水浴,分离各相。试管在 2,000rpm 旋转 10 分钟,从每个试管中收集上层,重复用去垢剂萃取。合并来自第二次萃取的水相,通过 5 毫升的 IDA 螯合柱 (Sigma),用 0.1M $NiCl_2$ 装载,除去其余的去垢剂。用 9 个柱体积的缓冲液 A 洗涤柱,然后用 3 个柱体积的缓冲液 B 洗脱蛋白质,将洗脱液通过 5 毫升的 Detoxigel 柱 (Sigma),回收流通液,再加入到柱上。回收来自第二次的流通液,在 1XPBS 中透析。分析纯化的产物的浓度,纯度和内毒素水平,然后对小鼠给药。

[0073] 蛋白质和核酸序列包括如下。Clf40 氨基酸序列包括在 SEQ ID NO:2,这是核酸序列 SEQ ID NO:1 编码的,也是其间并物编码的。Clf33 氨基酸序列包括如下为 SEQ ID NO:4,这是核酸序列 SEQ ID NO:3 编码的,也是其间并物编码的。

[0074] 实施例 2. 利用 Clf40 和 Clf33 进行单克隆抗体生产

[0075] 利用纯化的 Clf40 或 Clf33 蛋白质生产一组小鼠单克隆抗体。简要地说,一组

Balb/C 小鼠接受一系列的溶液中的 50ug Clf40 或 Clf33 蛋白质,或混合如下所述的表 1 中的佐剂进行的皮下免疫。

[0076] 表 1

[0077]

注射	天	量 (ug)	途径	佐剂
初次	0	50	皮下	Freund 完全佐剂
加强#1	14	5(Clf40) 10(Clf33)	静脉内	PBS

[0078] 在最后加强后 3 天,移取脾脏,撕碎放入单细胞悬浮液中,收集淋巴细胞。然后,将淋巴细胞与 SP2/0-Ag14 骨髓瘤细胞系 (ATCC#1581) 融合。细胞融合,随后根据现代免疫学方案第二章,2 单元 (Current Protocols in immunology) 的单克隆抗体生产方案进行平铺和饲喂。

[0079] 然后,利用标准的 ELISA 实验对从融合产生的任何克隆筛选特异的抗 Clf40 抗体的生产。扩展阳性克隆,进一步实验。起初鉴定 15 个阳性克隆,限制稀释克隆进一步鉴定。在直接结合 ELISA 中测试单细胞克隆的活性,是一个检测纤维蛋白原与 CLF40 的结合的抑制的修改的 ELISA,通过流动细胞计检测整个细菌细胞的结合,通过 Biacore 分析检测 Clf40 结合的亲和力。测试结果包括在下面的表 II:

[0080] 表 II

[0081]

CLFA 单克隆抗体	结合动力学	FBG 结合的抑制	与金黄色葡萄球菌 BARNETT 的结合	与金黄色葡萄球菌 67-0 的结合	与金黄色葡萄球菌 ATCC#25923 的结合	与金黄色葡萄球菌 ATCC #49230 的结合
F12-9	$K_{ON} 7.74 \times 10^5$ $K_{OFF} 4.46 \times 10^{-4}$ $K_D 5.76 \times 10^{-10}$	50-70%	72%	62%	60%	94%
F13-1	$K_{ON} 1.11 \times 10^5$ $K_{OFF} 6.13 \times 10^{-3}$ $K_D 5.51 \times 10^{-8}$	0-15%	-	-	-	9%
F13-2	$K_{ON} 1.19 \times 10^5$ $K_{OFF} 2.81 \times 10^{-4}$ $K_D 2.35 \times 10^{-9}$	40-60%	59%	65%	55%	93%

[0082] 与全细菌的结合

[0083] 收集金黄色葡萄球菌样品 (菌株 Barnett, 67-0, ATCC#25923 and ATCC#49230), 洗涤, 用 Mab 13-2, 12-9, 13-1 或 PBS 单独 (对照), 浓度 2mg/ml, 在用兔 IgG (50mg/ml) 封闭蛋白质 A 位点后温育。

[0084] 在用该抗体温育后,用作为检测抗体的山羊 $-F_{(ab)2}$ -抗鼠 $-F_{(ab)2}$ -FITC 温育细菌细胞。在抗体标记后,通过 FACScaliber 流动细胞计抽吸细菌细胞,分析荧光的发散 (激发波长:488, 发散波长:570)。对于每个细菌菌株,收集 10,000 个事件,测量。

[0085] 抑制 (ELISA)

[0086] 用 PBS (pH7.4) 中的 1 μ g/ml 的 Clf40 溶液包衣高结合的 96 孔平板, 覆盖, 在室温下温育 2 小时。然后, 用 PBS, 0.05% 吐温 20 洗涤平板, 用 1% BSA 溶液在室温下封闭 1 小时。在洗涤后, 加入单克隆抗体上清液, 在室温下温育平板 1 小时。然后洗涤平板, 将 0.1mg/ml 人纤维蛋白原溶液加入到每个孔中。在室温下温育平板 1 小时, 洗涤。以 PBS, 0.05% 吐温 20, 0.1% BSA 中 1 : 750 稀释度加入羊抗纤维蛋白原 AP 共轭物, 允许在室温下温育 1 小时。然后洗涤平板, 以最后浓度 1mg/ml 加入 pNPP (显影液)。在 37 $^{\circ}$ C 温育平板 15-30 分钟, 在 405nm 读出结果, 利用 PerkinElmer HTS 7000Bio-Assay 读数器分析。

[0087] 动力学分析

[0088] 在 Biacore 3000 上用软件中包括的配体捕获方法进行动力学分析。兔抗小鼠 Fc 抗体 (Biacore) 是与 CM5 条结合的胺。然后, 将待分析的单克隆抗体通过条带, 允许与 Fc 部分结合。然后, 将各个浓度的 Clf 40 或 Clf33 蛋白质通过条带表面, 收集数据。利用 Biacore 提供的评估软件 (3.1 版), 测量 K_{on} 和 K_{off} , 计算 K_A 和 K_D 。

[0089] 实施例 3 : Clf40 和 Clf33 的其他研究

[0090] 利用 PCR, 从金黄葡萄球菌 Newman 基因组 DNA 扩增 ClfA 的 A 区 (Clf40 代表 AA 40-559, Clf33-N2N3 区代表 AA 221-550 或 Clf-N3 区代表 AA370-559), 亚克隆进大肠杆菌表达载体 PQE-30 (Qiagen), 允许表达含有 6 个组氨酸残基的重组融合蛋白质。这一载体随后转化进大肠杆菌菌株 ATCC 55151, 生长在 15 升的发酵罐中直到光密度 (OD_{600}) 为 0.7, 用 0.2mM 异丙基 -1-beta-D 半乳糖苷 (IPTG) 诱导 4 小时。用 AG 技术的中空纤维装载 (孔大小 0.45mm) 收集细胞, 在 -80 $^{\circ}$ C 冷冻细胞糊。在 1XPBS (10 毫升缓冲液 / 1 克细胞糊), 以 1100psi 两次通过 French Press 溶解细胞。在 17,000rpm 旋转溶解的细胞 30 分钟除去细胞碎片。将上清液通过用 0.1M $NiCl_2$ 装载的 5 毫升 HiTrap 螯合柱 (Pharmacia)。在装载后, 用 5 个体积的 10mM Tris, pH8.0, 100mM NaCl (缓冲液 A) 洗涤柱。用超过 30 个柱体积的 0-100% 梯度的 10mM Tris, pH8.0, 100mM NaCl, 200mM 咪唑 (缓冲液 B) 洗脱蛋白质。在 ~13% 缓冲液 B (~26mM 咪唑) 洗脱 Clf 蛋白质。检测在 280nm 处的吸光值。在 1XPBS 中透析含有 Clf40 或 Clf33 的部分。

[0091] 然后, 将蛋白质通过内毒素除去过程。通过 5 毫升的单 Q 琼脂糖柱 (Pharmacia) 将这一过程中使用的缓冲液制成无内毒素的。将蛋白质均分在 4 个 15 毫升的试管中。用缓冲液 A 将每个试管的体积加到 9 毫升。在每个试管中加入 1 毫升 10% 的曲通 X-114, 在 4 $^{\circ}$ C 旋转温育 1 小时。将试管放置于 37 $^{\circ}$ C 的水浴分离各相。在 2,000rpm 旋转试管 10 分钟, 从各个试管收集上层水相, 重复用去垢剂萃取。合并来自第二次萃取的水相, 通过 5 毫升的用 0.1M $NiCl_2$ 装载的 IDA 螯合柱 (Sigma), 除去其余的去垢剂。用 9 个体积的缓冲液 A 洗涤柱, 然后用 3 个体积的缓冲液 B 洗脱蛋白质。将洗脱液通过 5 毫升的 Detoxigel 柱 (Sigma), 收集流通液, 再加入到柱上。收集来自第二道的流通液, 在 1XPBS 中透析。分析纯化的产物的浓度, 纯度和内毒素水平, 然后对小鼠给药。

[0092] 单克隆抗体生产

[0093] 利用纯化的 Clf40, Clf33 或 N3 蛋白质生产一组小鼠单克隆抗体。简要地说, 一组 Balb/C 或 SJL 小鼠接受了一系列溶液中的或混合表 III 中所述的佐剂的 1-10 毫克蛋白质的皮下免疫:

[0094] 表 III

[0095]

RIMMS

注射	天	量(mg)	途径	佐剂
# 1	0	5	皮下	FCA/RIBI
#2	2	1	皮下	FCA/RIBI
#3	4	1	皮下	FCA/RIBI
#4	7	1	皮下	FCA/RIBI
#5	9	1	皮下	FCA/RIBI

常规

注射	天	量(mg)	途径	佐剂
初次	0	5	皮下	FCA
加强#1	14	1	腹膜内	RIBI
加强 # 2	28	1	腹膜内	RIBI
加强 # 3	42	1	腹膜内	RIBI

[0096] 在杀死 (RIMMS) 时,或在加强 (常规) 后,收集血清,在 ELISA 测试中针对 NSCRAMM 或对全部细胞 (金黄葡萄球菌呵表皮葡萄球菌) 滴定。在最后加强后 3 天,移取脾脏或淋巴结。撕碎放入单细胞悬浮液,收集淋巴细胞。然后,将淋巴细胞与 SP2/0-Ag14 骨髓瘤细胞系 (ATCC#1581) 融合。细胞融合,随后根据现代免疫学方案 (第二章,2 单元) 的单克隆抗体生产方案进行平铺和饲喂。

[0097] 然后,利用标准的 ELISA 实验筛选特异的抗 Clf40, SdrG 或 FnbpA 抗体生产中融合产生的任何克隆。扩展阳性克隆,进一步实验。进一步在直接的结合 ELISA 中测试候选物的活性,这是一个修饰的 ELISA,测量纤维蛋白原与 CLF40 的结合,通过流动细胞计测试全部细菌细胞的结合,通过 Biacore 分析测试 Clf40 结合 / 纤维蛋白原 -Clf40 结合的抑制。

[0098] Biacore 分析

[0099] 通过分析,流动速度仍然恒定在 10ml/ 分钟。在注射 ClfA 40 之前,通过 RAM-Fc 结合将测试抗体吸收到条带上。在 0 时间,将浓度 30mg/ml 的 Clf40 注射到条带上 3 分钟,接着离解 2 分钟。这一时期的分析是测量 Mab/ClfA 相互作用的相对结合呵离解动力学。在第二时期的分析中,测量了 Mab 结合 ClfA 与纤维蛋白原的相互反应和结合的能力。将浓度 100mg/ml 的纤维蛋白原注射到条带上,在 3 分钟后取一个报告点。

[0100] 与全细菌的结合

[0101] 收集细菌样品 (Newman),洗涤,用浓度 2mg/ml 的 Mab 或 PB S 单独 (对照),在用兔 IgG (50mg/ml) 封闭蛋白质 A 位点后温育。在用抗体温育后,用作为检测抗体的山

羊-F_{(ab)2}-抗-小鼠-F_{(ab)2}-FITC 温育细菌细胞。在抗体标记后,通过 FACScaliber 流动细胞计抽吸细胞,分析荧光发散(激发波长:488,发散波长:570)。对于每个细菌菌株,收集 10.000 个事件,测量。

[0102] 抑制 (ELISA)

[0103] 用 PBS 中的 1 μ g/ml C1f40 溶液包衣高结合的 96 孔平板,覆盖,在室温下温育 2 小时。然后用 PBS,0.05%吐温 20 洗涤平板,用 1% BSA 溶液在室温下封闭 1 小时。在洗涤后,加入单克隆抗体上清液,在室温下温育 1 小时。然后洗涤平板,在每个孔中加入 0.1mg/ml 人纤维蛋白原溶液。在室温下温育平板 1 小时,洗涤。以在 PBS,0.05%吐温 20,0.1% BSA 中 1 : 750 稀释度加入羊抗纤维蛋白原 AP 共轭物,允许在室温下温育 1 小时。然后,洗涤平板,以最后浓度 1mg/ml 加入 pNPP(显影液)。在 37°C 温育平板 15-30 分钟,在 405nm 读出结果,利用 Perkin Elmer HTS 7000Bio-Assay 读数器分析。

[0104] 实施例 4:用 C1f40 的个部分免疫产生具有不同反应方式的单克隆抗体

[0105] 下面的表 IV 显示了用本发明的活性区的免疫测试结果。这些活性区包括 C1f40, C1f33(构成了 C1fA A 区的 N2N3 区),和 C1fAN3 区单独。

[0106]

表 IV

抗原	融合	单克隆	反应性							抑制	FY1
			ELISA	Biacore			流动细胞计				
			Cif40	SdrG	FnbpA	结合	抑制				
:IfA N3 包括如下: 29 F30 F31 F32 34 F36	RIMMS	F29-19	Y	N	N	N	N	nt	nt		
		F29-71	Y	N	N	N	N	nt	nt		
		F29-92	Y	N	N	N	N	nt	nt		
		F31-20	Y	N	M	N	N	nt	nt		
		F31-36	Y	N	N	N	N	nt	nt		
		F31-100	Y	N	N	N	N	nt	nt		
		F31-195	Y	N	N	N	N	nt	nt		
		F32-22	Y	N	N	N	N	nt	nt		
		F34-15	Y	N	N	N	N	nt	nt		
		F36-77	Y	N	N	N	N	nt	nt		
:IfA N2N3 (Cif33) 包括如下: 11 F12 F17 F18	常规	F36-197	Y	N	N	N	N	nt	nt		
		INH-M01001	Y	N	N	Y	N	Y	Y	12-9	
		F12-3	Y	nt	Nt	Y	nt	Y	N		
		F12-1	Y	nt	Nt	Y	nt	Y	N		
		F12-5	Y	nt	Nt	Y	nt	Y	N		

[0107]

反应性。

[0109] 实施例 5 :利用 Biacore 选择封闭 ClfA 结合纤维蛋白原的高亲和力 Mab

[0110] Biacore 分析

[0111] 通过图 1 所示的实验,流速仍然恒定在 10ml/min。在注射 ClfA 40 之前,通过 RAM-Fc 结合将 946RU 的 Mab 13-1 和 768RU 的 Mab 13-2 吸收到条带上。在图上的 0 时间,在 3 分钟内将浓度 30mg/ml 的 ClfA 40 注射到条带上,接着离解 2 分钟。在 ClfA 注射时间结束时,13-1Mab 结合 58RU 的 ClfA,13-2Mab 结合 168RU 的 ClfA。这一时期的实验测量了 Mab/ClfA 相互反应的相对结合和离解动力学。在实验的第二时期测量了 Mab 结合 ClfA 相互反应和结合纤维蛋白原的能力。在 100mg/ml 浓度的纤维蛋白原注射到条带上,在 3 分钟后,64RU 的纤维蛋白原结合 ClfA,结合 Mab 13-1,但 0RU 的纤维蛋白原结合 Mab 13-2 的 ClfA。

[0112] 实施例 6 :抗金黄葡萄球菌菌株 Barnett 和金黄葡萄球菌 ATCC15923 的 Mab13.2 的比较

[0113] 抗体规模和纯化

[0114] 在 RPMI/DMEM, 含有 2mM 丙酮酸钠,4mM 谷氨酸和 2X 青霉素 - 链霉素的 1X Nutridoma-SP 介质中生长杂交瘤细胞到 2-3 升培养体积。然后通过离心收获杂交瘤上清液。通过 0.45μm 滤器过滤上清液,利用蛋白质 G 层析亲和纯化 IgG。用 0.1M 甘氨酸, pH2.7 洗脱单克隆抗体,立即用 1-10 个体积的 2M Tris, pH8.0 中和。然后,对 1X D-磷酸缓冲盐, pH7.4 透析纯化的 IgG。如果需要,浓缩纯化的抗体,等分试样冷冻。

[0115] 金黄葡萄球菌菌株

[0116] 从冷冻的甘油储备液取金黄葡萄球菌细胞,并且将其接种在单血液琼脂平板上,并且在 37℃ 生长 24 小时。然后将单个菌落转移到新的血液琼脂平板上。接种 80 个平板制备 50 毫升的最后的冷冻储备液。然后,在 37℃ 接种平板 24 小时。接种后,从刮每个平板的表面上的菌落到含有 10 毫升 1XPBS (20 个平板一个试管) 的 4 个 50 毫升的试管中,温和旋转从刮菌器上除去细菌。然后,将另外 10 毫升的 1XPBS 加到 10 毫升的细菌悬浮液中,剧烈离心,简化琼脂碎片从细菌中的分离。在 3500xg, 4℃ 下离心 10 分钟。在 D-PBS 中洗涤细菌,再悬浮于 50 毫升冷冻培养基中。将细菌储备液通过在乙醇 / 干冰浴中快速冷冻放置于 1 毫升的等分器中,并且放置于 -80℃ 的冷冻器中。冻融 1 毫升的储备液等分试样,制备 10^{-5} 到 10^{-11} 的稀释系列来确定冷冻储备液的浓度 (CFU/ml)。在血液琼脂平板上双倍放置稀释液,在 37℃ 温育 16-18 小时。确定 CFU/ml ($\text{CFU/ml} = (\text{平均} \# \text{克隆} \times \text{稀释因子}) / 0.050\text{ml}$), 平均每个稀释液确定平均的 CFU/ml。在注射时,冻融每个菌株的等分试样,一个菌株合并一个试管,并且离心。

[0117] 动物,性别,种类,数目,年龄和来源

[0118] 从 Taconic 质量实验室动物和研究服务中心 (Germantown, NY) 购买雌性 Balb/C 小鼠 (5-6 星期的年龄)。允许动物在实验之前至少驯养 14 天。然后,检查小鼠,在有海绵垫的聚碳酸鞋盒状笼子里放入 5 个小鼠 / 笼。在实验室动物的护理和使用的 NIH 指导中的要求的畜牧业标准下,将所有小鼠放置于 12 小时的光暗循环中。

[0119] 鉴定和随机化

[0120] 在使用药量之前,通过尾纹鉴定各个鉴定所有动物。在开始处理之前,称重各个动

物,评估它们的健康。随机取小鼠,利用根据不同的体重分到各处理组。

[0121] ClfA 特异单克隆抗体 (Mab),同种

[0122] 利用 Becton Dickenson 的小鼠同型的细胞计小珠排列对 ClfA 特异小鼠单克隆抗体进行同型化。根据制造商方案,利用流动细胞计确定同型。

[0123] 13.1Clf40Mab, IgG,

[0124] 13.2Clf40Mab, IgG,

[0125] 12.9Clf33Mab, IgG,

[0126] 对照

[0127] ATTC 1771, IgG

[0128] 从生命技术公司 (Cat No.10010-023 ;Lot NO.1078749) 购买磷酸缓冲盐, pH7.4 (PBS)。

[0129] 实验设计

[0130] 表 V

[0131] 处理攻击

[0132]

组号	小鼠号	抗体	剂量	途径	频率	时间点	细菌	储备稀 释液	体积 / 途径
1	12	13-2	36mg/kg	i. p.	Once	-18hr.	ATCC	1 : 20	0.1ml/IV
2	15	CRL1771	36mg/kg				25923	1 : 20	
3	15	D-PBS	N/A				ATCC 25923	1 : 20	
4	12	13-2	36mg/kg				Barnett	1 : 20	
5	15	CRL1771	36mg/kg				Barnett	1 : 20	
6	15	D-PBS	N/A				Barnett	1 : 20	

[0133] 体内动物数据

[0134] 通过用 0.5mg 的单克隆抗体 13-2, 同型对照单克隆抗体 CRL-1771, 或 PB S 腹膜内注射 (IP ;0.5ml) 处理小鼠。在给药 IgG 后 18 小时, 用单个静脉内 (IV) 注射金黄葡萄球菌菌株 Barnett 或金黄葡萄球菌 ATCC 25923 攻击小鼠。接着 12 天后杀死所有其余的小鼠。检查处理组之间相对生存时间的明显差别。接受 Mab 13-2 的小鼠的 83% (10/12), 接受 CRL-1771 的动物的 13% (2/15), 和接受 PBS 的动物的 0% (0/15) 可以在金黄葡萄球菌 Barnett (13-2vs. PBS, $p < 0.0001$; 13-2vs. CRL-1771, $p = 0.0009$) 的细菌攻击中生存。利用 Manetel-Cox(logrank) 实验中的 Kaplan-Meler 生存分析对动物数据进行统计学分析。在金黄葡萄球菌 ATCC 25923 是攻击细菌的实验中, 给药 Mab13-2 的小鼠的 67% (8/12) 生存, 在 CRL -1771 处理小组中 27% (4/12) 生存, 在 PBS 小组中只有 7% (1/15) 生存 (13-2vs. CRL-1771, $p = 0.02$; 13-2vs. PBS, 0.0002)。这些结果清楚地表明, MSCRAMM 特异单克隆抗体提供了明显的抗金黄葡萄球菌菌株致死感染的水平。

[0135] 实施例 7: 分离和测序可变区序列

[0136] A. 单克隆抗体 13-2

[0137] 利用 Fast Track 2.0 试剂盒 (Invitrogen ;cat#K4500) 从 ClfA 13-2 杂交瘤性别分离信使 RNA。简要地说, 用 PBS 洗涤在含有 10% FBS 的 DMEM-10 培养基中培养的 1.4×10^8 杂交瘤细胞, 离心沉淀, 然后在含有蛋白质 /Rnase 降解物的去垢剂中溶解。通过在 oligo-dT 纤维素柱上亲和纯化分离 PolyA⁺mRNA。对可变重链和可变轻链, 在含有 20pmol 的 3' 寡聚核苷酸小鼠特异引物 (Novagen ;cat#69796and 69812) 的 cDNA 合成试剂盒 (Novagen ;cat#69001-3) 中利用 5ug 的 mRNA 和逆转录酶进行第一链 cDNA 的合成。利用 PCR 试剂系统 (生命技术 ;cat#10198-018) 和小鼠可变重链和轻链特异引物系列 (Novagen ;cat#70081-3, 各 5pmol), 通过聚合酶链式反应 (PCR) 30 个循环 (开始 94℃ 加热, 然后 94℃ 1 分钟, 50℃ 1 分钟和 72℃ 1 分钟) 扩增 cDNA 部分 (5 到 50ng)。在乙酸钠缓冲液中, 在 1% 的超纯琼脂糖凝胶中电泳分级分离 PCR 产物, 用溴化乙锭染色观察。从凝胶中切出与推测大小匹配的 PCR 片段, 用 BIO 101Geneclean 旋转柱 (cat#1101-400) 纯化, 连接进 pCR2.1-TOPO (Invitrogen) 质粒, 接着转化进感受态 TOP10 大肠杆菌 (Invitrogen ;cat#K4500)。在利用 QIAprep Spin Miniprep 试剂盒 (QIAGEN ;cat#27106) 分离质粒 DNA 后, 通过限制内切酶消化和琼脂糖凝胶电泳鉴定具有插入片段的阳性克隆, 接着利用 M13 正向和 M13 反向引物在 ABI 自动序列仪上测序。

[0138] 结果如下:

[0139] 13-2VLA-1 (可变轻链序列)

[0140] AACATTAGTATGACACAGTCGCCATCATCTCTGGCTGTGTCTGCAGGAGAAAA

[0141] GGTCACTATGAGCTGTAACCTCCAGTCAAAGTGTTTTATACAGTTCAAATCAGAA

[0142] GAACTACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAACTACTGA

[0143] TCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGTGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGT

[0144] GGATCTGGGACAGATTTTACTCTTACCATCAACAGTGTAAGCTGAAGACCTG

[0145] GCAGTTTATTACTGTCATCAATACCTCTCCTCGCACACGTTCCGAGGGGGGAC

[0146] CAAGCTGGAAATAAAA

[0147] NIMMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIY

[0148] WASTRESGVPDRFTGSGSGTDFLTINSVQAEDLAVYYCHQYLSSTFTGGGTKLE

[0149] IK
[0150] ●代表 CDR 的氨基酸下面划线
[0151] 13-2VHC-3(可变重链序列)
[0152] CAGGTGCATCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCACCCCTCACAGAGCC
[0153] TGTCCATCACATGCACTGTCTCTGGATTCTCATTATCCAGATATAATATACACTG
[0154] GGTTCCGCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAATGATATGGGGT
[0155] GGTGAAAACACAGACTATAATTCAGCTCTCAAAATCCAGACTGAGCATCAGCAA
[0156] GGACAACTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACTGATGA
[0157] CACAGCCATGTACTACTGTGCCAGCGCCTACTATGGTAACTCCTGGTTTGCTTA
[0158] CTGGGGCCAGGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA
[0159] QVHLKESGPGLVAPSQSLSTCTVSGFSLSRYNHWVRQPPGKLEWLGMWGG
[0160] NTDYNSALKSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAMYYCASAYYGNSWFAYWG
[0161] QGTLVTVSA
[0162] ●代表 CDR 的氨基酸下面划线

[0163] B. 单克隆抗体 12-9

[0164] 利用 Fast Track 2.0 试剂盒 (Invitrogen ;cat#K4500) 从 ClfA 12-9 杂交瘤细胞分离信使 RNA。简要地说,用 PBS 洗涤含有 10% FBS 的 DMEM-10 培养基中培养的 1.4×10^8 个杂交瘤细胞,离心沉淀,然后在含有蛋白质/Rnase 降解剂的去垢剂中溶解。通过在 Oligo-dT 纤维素柱上亲和纯化分离 mRNA。对于各个可变重和可变轻链,利用含有 20pmol 3' 寡聚核苷酸小鼠特异引物 (Novagen ;cat#69796and 69812) 的 cDNA 合成试剂盒 (Novagen ;cat#69001-3) 中利用 5ug mRNA 和逆转录酶完成第一链 cDNA 的合成。利用 PCR 试剂系统 (生命技术公司 ;cat#10198-018) 和小鼠可变重和轻链特异引物系列 (Novagen ;cat#70081-3,各 5pmol) 循环 30 次 (开始 94℃,然后 94℃ 1 分钟,50℃ 1 分钟和 72℃ 1 分钟) 的 PCR 链式反应 (PCR) 扩增 cDNA 部分 (5 到 5ng)。在乙酸钠缓冲液中 1% 的超纯化琼脂糖凝胶中电泳分级分离 PCR 产物,用溴化乙锭染色观察。从凝胶中切出匹配预定大小的 PCR 片段,利用 BIO101Geneclean 旋转柱 (cat#1101-400) 纯化,连接进 pCR2.1-TOPO 质粒 (Invitrogen),接着转化进感受态 TOP 10 大肠杆菌 (Invitrogen ;cat#K4500)。在用 QIAprep Spin Miniprep 试剂盒 (QIAGEN ;cat#27106) 分离质粒 DNA 后,通过限制性内切酶消化和琼脂糖凝胶电泳鉴定含有插入片段的阳性克隆,接着利用 M13 正向和 M13 反向引物在 ABI 自动序列仪上测序。

[0165] 得到的序列如下:

[0166] 12-9VLA-1(可变轻链序列)
[0167] AACATTATGATGACACAGTCGCCATCATCTCTGGCTGTGTCTGCAGGAGAAAA
[0168] GGTCATATGAGCTGTAAGTCCAGTCAAAGTGTTTTATACAGTTCAAATCAGAA
[0169] GAACTACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGA
[0170] TCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGTGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGT
[0171] GGATCTGGGACAGATTTTACTCTTACCATCAGCAGTGACAAGCTGAAGACCT
[0172] GGCAGTTTATTACTGTCATCAATACCTCTCCTCGTACACGTTCCGAGGGGGGA
[0173] CCAAGCTGGAAATAAAA

[0174] NIMMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIY
[0175] WASTRESGVDPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCHQYLSSYTFGGGTKLEI
[0176] K
[0177] ●代表 CDR 的氨基酸下面划线
[0178] 12-9VHC-1(可变重链序列)
[0179] CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGACCTGGCCTGGTGGCACCCCTCACAGAGCC
[0180] TGTCCATCACATGCGCTATCTCTGGGTTCTCATTATCCAGATATAGTGTACACT
[0181] GGGTTCGCCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAATGATATGGGG
[0182] TGGTGGAAACACAGACTATAATTCAGCTCTCAAATCCAGACTGAGCATCAGCAA
[0183] GGACAACCTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACTGATGA
[0184] CACAGCCATGTATTACTGTGCCAGAAAAGGGGAATTCTACTATGGTTACGACG
[0185] GGGTTGTTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA
[0186] QVQLKESGPGLVAPSQSLITCAISGFSLSRYSVHWVRQPPGKLEWLGMIVGG
[0187] GNTDYNSALKSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAMYYCARKGEFYGYDGFV
[0188] YWGQGLVTVSA

[0189] ●代表 CDR 的氨基酸下面划线

[0190] C. 单克隆抗体 35-220

[0191] 利用 Fast Track 2.0 试剂盒 (Invitrogen ;cat#K4500) 从 ClfA35-220 杂交瘤细胞中分离信使 RNA。简要地说,用 PBS 洗涤含有 10% FBS 的 DMEM-10 培养基中培养的 1.4×10^8 杂交瘤细胞,离心沉淀,然后在含有蛋白质/Rnase 降解剂的去垢剂中溶解。对于各个可变重和可变轻链,在含有 20pmol 的 3' 寡聚核苷酸小鼠特异引物 (Novagen ;cat#69796and 69812) 的 cDNA 合成试剂盒 (Novagen ;cat#69001-3) 中,利用 5mg 的 mRNA 和逆转录酶完成第一链 cDNA 的合成。利用 PCR 试剂系统 (生命技术公司 ;cat#10198-018) 和小鼠可变重和轻链特异引物系列 (Novagen ;cat#70081-3,各 5pmol) 进行聚合酶链式反应 (PCR) 30 个循环 (开始 94℃ 加热,然后 94℃ 1 分钟,50℃ 1 分钟 72℃ 1 分钟循环) 扩增 cDNA 的部分 (5 到 50ng)。在乙酸钠缓冲液中的 1% 超纯度琼脂糖凝胶中电泳分级分离 PCR 产物,用溴化乙锭染色观察。从凝胶中切出与预定大小匹配的 PCR 片段,用 BIO 101Geneclean spin 柱 (cat#1101-400) 纯化连接进 pCR2.1-TOPO 质粒 (Invitrogen),接着转化进感受态 TOP10 大肠杆菌 (Invitrogen ;cat#K4500)。在利用 QIAprep Spin Miniprep 试剂盒 (QIAGEN ;cat#27106) 分离质粒 DNA 后,通过限制性内切酶消化和琼脂糖凝胶电泳鉴定含有插入片段的阳性克隆,接着在 ABI 自动序列仪上用 M13 正向和 M13 反向引物测序。

[0192] 得到的序列如下:

[0193] 35-220VLD-4(可变轻链序列 DNA)

[0194] AACATTATGATGACACAGTCGCCATCATCTCTGGCTGTGTCTGCAGGAGAAAA
[0195] GGTCACTATGAGCTGTAGGTCCAGTCAAAGTGTTTTATACAGTTCAAATCAGAA
[0196] GAACTACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTACACTGCTGA
[0197] TCTACTGGGCATCCACTAGGGAAATCTGGTGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGT
[0198] GGATCTGGGACAGATTTTACTCTTACCATCAGCAGTGTACAAGCTGAAGACCT
[0199] GGCAGTTTATTACTGTCATCAATACCTCTCCTCGTACACGTTCCGAGGGGGGA

- [0200] CCAAGCTGGAAATAAAA
- [0201] 35-220VLD-4(可变轻链序列)
- [0202] N I M M T Q S P S S L A V S A G E K V T M S C R S S Q S V L
- [0203] Y S S N Q K N Y L A W Y Q Q K P G Q S P T L L I Y W A S T R
- [0204] E S G V P D R F T G S G S G T D F T L T I S S V Q A E D L A
- [0205] V Y Y C H Q Y L S S Y T F G G G T K L E I K
- [0206] ●代表 CDR 的氨基酸下面划线
- [0207] 35-220VHC-1(可变重链 DNA)
- [0208] CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCACCCCTCACAGAGCC
- [0209] TGTCCATCACATGCACTGTCTCTGGGTTCTCATTATCCAGATATAGTGTACACT
- [0210] GGGTTCGCCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAATGATATGGGG
- [0211] TGGTGGAAACACAGACTATAATTCAGCTCTCAAATCCAGACTGAGCATCACCAA
- [0212] GGACAACCTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACTGATGA
- [0213] CACAGCCATGTACTACTGTGCCACCGCCTACTATGGTAACTCCTGGTTTGCTTA
- [0214] CTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA
- [0215] 35-220VHC-1(可变重链序列)
- [0216] Q V Q L K E S G P G L V A P S Q S L S I T C T V S G F S L S R
- [0217] Y S V H W V R Q P P G K G L E W L G M I W G G G N T D Y N
- [0218] S A L K S R L S I T K D N S K S Q V F L K M N S L Q T D D T A
- [0219] M Y Y C A T A Y Y G N S W F A Y W G Q G T L V T V S A
- [0220] ●代表 CDR 的氨基酸下面划线
- [0221] D. 单克隆抗体 35-006
- [0222] 可变区序列的分离和测序:
- [0223] 利用 Fast Track 2.0 试剂盒 (Invitrogen;cat#K4500) 从 ClfA35-006 杂交瘤细胞分离信使 RNA。简要地说,用 PBS 洗涤含有 10% FBS 的 DMEM-10 培养基中培养的 1.4×10^8 个杂交瘤细胞,离心沉淀,然后在含有蛋白质/Rnase 降解剂的去垢剂中溶解。通过在 oligo-dT 纤维柱上亲和纯化分离 Poly A⁺mRNA。对于各个可变重链和可变轻链,在含有 20pmol 3' 寡聚核苷酸小鼠特异引物 (Novagen;cat#69796and 69812) 的 cDNA 合成试剂盒 (Novagen;cat#69001-3) 中利用 5mg 的 mRNA 和逆转录酶完成第一链 cDNA 的合成。利用 PCR 试剂系统 (生命技术公司;cat#10198-018) 和小鼠可变重和轻链特异引物系列 (Novagen;cat#70081-3,各 5pmol),通过 30 个循环 (开始 94℃,然后 94℃ 1 分钟,50℃ 1 分钟和 72℃ 1 分钟循环) 的聚合酶链式反应 (PCR) 扩增 cDNA 部分 (5 到 50ng)。在乙酸缓冲液中 1% 的超纯度琼脂糖凝胶中电泳分级分离 PCR 产物,通过溴化乙锭染色观察。从凝胶中切出与预定大小匹配的 PCR 片段,利用 BIO 101Geneclean 旋转柱 (cat#1101-400) 纯化,连接进 pCR2.1-TOPO(Invitrogen) 质粒,接着转化进感受态 TOP 10 大肠杆菌 (Invitrogen;cat#K4500)。在利用 QIAprep Spin Miniprep 试剂盒 (QIAGEN;cat#27106) 分离质粒 DNA,通过限制性内切酶消化和琼脂糖凝胶电泳鉴定含有 插入片段的阳性克隆,接着利用 M13 正向和 M13 反向引物在 ABI 自动序列仪上测序。
- [0224] 得到的序列如下:

- [0225] 35-006VLD-1 (可变轻链序列 DNA)
- [0226] AACATTATGATGACACAGTCGCCATCATCTCTGGCTGTGTCTGCAGGAGAAAA
- [0227] GGTCACATATGAGCTGTAAGTCCAGTCAAAGTGTTTTATACAGTTCAAATCAGAA
- [0228] GAACTACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGA
- [0229] TCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGTGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGT
- [0230] GGATCTGGGACAGATTTTACTCTTACCATCAGCAGTGTAAGCTGAAGACCT
- [0231] GGCAGTTTATTGCTGTCATCAATACCTCTCCTCGTACACGTTCCGAGGGGGGA
- [0232] CCGAGCTGGAAATAAAAA
- [0233] 35-006VLD-1 (可变轻链序列)
- [0234] N I M M T Q S P S S L A V S A G E K V T M S C K S S Q S V L
- [0235] Y S S N Q K N Y L A W Y Q Q K P G Q S P K L L I Y W A S T R
- [0236] E S G V P D R F T G S G S G T D F T L T I S S V Q A E D L A
- [0237] V Y C C H Q Y L S S Y T F G G G T E L E I K
- [0238] ●代表 CDR 的氨基酸下面划线。
- [0239] 35-006VHC-1 (可变重链序列 DNA)
- [0240] CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCACCCCTCACAGAGCC
- [0241] TGTCCATCACATGCACTGTCTCTGGGTTCATTATCCAGATATAGTGTACACT
- [0242] GGGTTCGCCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAATGATATGGGG
- [0243] TGGTGGAAGCACAGACTATAATTCAGCTCTCAAATCCAGACTGAACATCAGCAA
- [0244] GGACAACTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACTGATGA
- [0245] CACAGCCATGTACTACTGTGCCAGAAGGCTCTGGTACTTCGATGTCTGGGGCG
- [0246] CAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
- [0247] 35-006VHC-1 (可变重链序列)
- [0248] Q V Q L K E S G P G L V A P S Q S L S I T C T V S G F S L S R
- [0249] Y S V H W V R Q P P G K G L E W L G M I W G G G S T D Y N
- [0250] S A L K S R L N I S K D N S K S Q V F L K M N S L Q T D D T A
- [0251] M Y Y C A R R L W Y F D V W G A G T T V T V S S
- [0252] ●代表 CDR 的氨基酸下面划线。
- [0253] 实施例 8:在结合动力学中用等当物生产嵌合 12-9 和整个细胞与小鼠 12-9 的反应性
- [0254] 利用从人志愿者取的全部血液分离的人恒定区域 (轻链 :Kappa ;重链 :G1,3 或 4) 生产嵌合 12-9 (选择 Poly A RNA 和 PCR 扩增第一链 cDNA)。对于哺乳动物细胞中的表达,在重链和轻链可变区序列的 5' 末端加一个独特的限制位点 Bsm 1。在 3' 末端 (与重复的恒定区的拼接接合),在轻链可变区加一个 Bsiw1 位点,在重链可变区加 Apa1 位点。这是通过设计寡聚核苷酸引物和适当的 12-9DNA 模板的 PCR 扩增来完成的,接着进行证实性 DNA 测序。
- [0255] 利用含有人免疫球蛋白引导分泌序列 (Bsm1 作为克隆位点) pCEP4 (Invitrogen, cat#V044-50) 来完成嵌合版本的 12-9 蛋白质的表达,对于轻链表达引导序列是 kappa 恒定区,对于重链表达是 gamma (1,3 或 4) 恒定区。设计哺乳动物表达质粒表达重和轻链,

分开的 hCMV 启动子在同一质粒上,或者通过共转染重链和轻链的表达在分开的 pCEP4 质粒上。在含有 12-9 的重和轻链的质粒 DNA 转染进具有 Eugene 的 HEK293EBNA 细胞 (RocheDiagnostic, cat#1814443) 后,在潮霉素选择 (300ug/ml) 下表达功能性嵌合 12-9。收集上清液,通过 Biacore 分析结合动力学,通过流动细胞计分析与金黄葡萄球菌细胞的结合。

[0256] 图 2 和 3 与重组嵌合体 12-9 代表的结果证实,12-9 的重链和轻链的序列重复了作为杂交瘤上清液特征的原初的 12-9 的结合动力学和特异性。

[0257] 实施例 9:12-9 的重链和轻链可变区的人化

[0258] 这一人化过程的焦点是只改变与小鼠中不参与分子的特异性和与 ClfA 靶抗原的亲合力的可变区的残基接触的溶剂。这些决定簇的信息利用了 Padlan 公开的溶剂获得性决定簇 (这是在保存它们的配体结合特性的同时减少抗体可变区的免疫原性的可能的方法,分子免疫学,28(4);489-498,1991),和硅分子模型或算式确定不用于制造这些决定簇的 T 细胞表位。

[0259] 该途径代表了一个方法,通过该方法位点特异诱变改变了小鼠的轻和重链的可变区残基,反映了来自公共数据库的与小鼠同源的人可变区的结构暴露的表面。特异地,将确定可变的轻和重链的氨基酸指定了 Kabot 位置数目和基于 Padlan 的“暴露”设计,允许将氨基酸从人构架亚组排列 (重链是 I-III 和轻链是 I-IV)。为了支持这一分析,对人免疫球蛋白数据库以及全部的蛋白质数据库进行 BLAST 研究,其中选择与小鼠序列具有最高同源性的 (种系和成熟) 呵与需要的小鼠序列相异的可变区。一旦相异,鉴定与小鼠序列有最高同源性的人亚组。暴露的小鼠氨基酸残基突变了,模拟了最同源的人亚组。在该位置的亚组中发现不至一个氨基酸的情况中,利用了在与 12-9 有最高同源性的人种系序列中出现的氨基酸。通过 PCR 利用诱变的寡聚核苷酸完成这些变化,接着证实了 DNA 测序。

[0260] 12-9VL-Hu (人化可变轻链序列 DNA)

[0261] GACATTGTGATGACACAGTCGCCAGACTCTCTGGCTGTGTCTCTGGGAGAAAAG

[0262] GGTCACTATGAACTGTAAGTCCAGTCAAAGTGTTTTATACAGTTCAAATCAGAA

[0263] GAACTACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGA

[0264] TCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGTGTCCCTGATCGCTTCAGCGGCAGT

[0265] GGATCTGGGACAGATTTTACTCTTACCATCAGCAGTGTACAAGCTGAAGACCT

[0266] GGCAGTTTATTACTGTCATCAATACCTCTCCTCGTACACGTTCCGAGGGGGGA

[0267] CCAAGCTGGAAATAAAA

[0268] 12-9VL-Hu (人化可变轻链序列)

[0269] DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIY

[0270] WASTRESGVPDRFSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCHQYLSSYTFGGGTKLE

[0271] IK

[0272] ●代表 CDR 的氨基酸下面划线,黑体的氨基酸代表人化的变化

[0273] 12-9VH-Hu (人化的可变重链序列 DNA)

[0274] CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGAAGCCCTCACAGACCC

[0275] TGTCCATCACATGCACCATCTCTGGGTTCTCATTATCCAGATATAGTGTAACCT

[0276] GGGTTCGCCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAATGATATGGGG

[0277] TGGTGGAAACACAGACTATAATTCAGCTCTCAAATCCAGACTGAGCATCAGCAA
 [0278] AGACAACCTCCAAGAACCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGACCGCCGCTGA
 [0279] CACAGCCGTGTATTACTGTGCCAGAAAAGGGGAATTCTACTATGGTTACGACG
 [0280] GGTGGTTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCC
 [0281] 12-9VH-Hu (人化的可变重链序列)
 [0282] QVQLKESGPGLVKPSQTLSTCTISGFSLSRYSVHWVRQPPGKLEWLGMIEWG
 [0283] GNTDYNALKSRLSISKDNSKNQVFLKMNSLTAADTAVYYCARKGEFYGYDGFV
 [0284] YWGQGTLLTVSS

[0285] ●代表 CDR 的氨基酸下面划线,黑体的氨基酸代表人化的变化

[0286] 实施例 10:利用二甲氧基苯青霉素抗性金黄葡萄球菌菌株 67-0 (MRSA),在小鼠脓毒模型中,比较 C1fA 单克隆抗体,12-9A (INH-M010001) 和 35-052.1 (INH-M01016) 和同型匹配对照 CRL1771 抗体,INH-M000029

[0287] 该实施例的目的是利用 0.3mg 剂量的抗体和小鼠脓毒模型中的金黄葡萄球菌 67-D,比较同型匹配对照 CRL1771 抗体 (INH-M000029),鉴定 C1fA 单克隆抗体,12-9A (INH-M010001) 和 35-052.1 (INH-M01016)。

[0288]

种类	菌株	性别	数目	年龄 *	体重 *	来源
小鼠	Balb/C	雌性	90	4-5 星期	12- 16 克	Taconic Farms, Inc. (Germantown, NY)

[0289] * 在开始研究时的估计范围

[0290] 对适当的动物腹膜内 (i. p) 注射单克隆抗体给药给予剂量 (如下)。在静脉内注射金黄葡萄球菌前约 18 小时给药抗体。利用单个参数 (致死率) 测量系统注射。

[0291] 处理攻击

[0292]

组号 #	小鼠 号	抗体	剂量	途 径	频 率	时间 点*	细菌	CFU	体积 / 途径
1	30	12-9A	0.3mg	i. p.	1 次	-18 小 时	金黄葡萄 球菌 67-0	-10 ³	0.1ml/i . v.
2	30	35-052	0.3mg						
3	30	CRL1771	0.3mg						

[0293] * 时间点反映的是细菌攻击后的小时

[0294] 制备,储存和操作:

[0295] 金黄葡萄球菌

[0296] 从冷冻的甘油储备液取 MRSA 菌株 67-0 细胞,接种到单个血液琼脂平板上,在 37°C 生长 24 小时。然后,将单个菌落转移到新的血液琼脂平板上。然后,在 37°C 接种平板 24 小时。在接种后,从每个平板的表面刮下菌落进含有 10 毫升 1XPBS 的 4 个 50 毫升试管中 (每个试管 20 个平板),同时温和旋转从刮菌 2 器上除去细菌。然后,在 10 毫升细菌悬浮液中再加 10 毫升 1XPBS,剧烈旋转简化从细菌分离任何琼脂碎片。在 4°C,3500xg 离心沉淀悬浮液 10 分钟。在 D-PB S 中洗涤细菌,再悬浮于 50 毫升的冷冻培养基中。通过在乙醇 / 冰浴中快速冷冻,将细菌储备液放置于 1 毫升等分管中,放置于 -80°C 的冷冻器中。通过冻融 1 毫升储备液的等分试样确定冷冻储备液的浓度 (CFU/ml),制备 10⁻⁵ 到 10⁻¹¹ 的系列稀释液。在血液琼脂平板上铺稀释液 2 份,在 37°C 温育 16-18 小时。确定 CFU/ml (CFU/ml = (平均

菌落 X 稀释因子)/0.050mls),均分各个稀释液确定平均的 CFU/ml。在注射的日子,冻融各个菌株的等分试样,合并在一个试管中,离心。然后制备各个储备液的稀释液。

[0297] ClfA 12-9A 单克隆抗体, INH-M010001(LN:IAA2E1354)

[0298] 利用蛋白质 G 亲和层析,从无血清杂交瘤培养基纯化 12-9A 单克隆抗体(IgG,亚型)。报道该物质的浓度是 7.0mg/ml,内毒素的浓度是 1.0EU/mg 的蛋白质。物质冷藏在 4℃。在注射的日子,将该物质稀释到 0.6mg/ml,通过腹膜内注射对适当的动物给药 0.5ml。给药的最后剂量是 0.3mg IgG。

[0299] ClfA 35-052.1 单克隆抗体, INH-M01016(LN:IAA2H1422)

[0300] 利用蛋白质 G 亲和层析从无血清杂交瘤培养基中纯化 35-052 单克隆抗体(IgG,亚型)。该物质的报道浓度是 4.2mg/ml,内毒素浓度是 1.0EU/mg 蛋白质。该物质储存在 4℃。在注射的日子,该物质稀释到 0.6mg/ml,通过腹膜内注射对适当的动物组给药 0.5ml。给药的最后剂量是 0.3mg IgG。

[0301] 对照 CRL 1771 单克隆抗体(INH-M000029, LN:IAA2E1337)

[0302] 利用蛋白质 G 亲和层析从无血清的杂交瘤培养基中纯化 CRL 1771 单克隆抗体(IgG,亚型)。该物质的报道浓度是 5.0mg/ml,内毒素浓度是 0.2EU/mg 蛋白质。该物质储存在 4℃的冰箱中。在注射的日子,将该物质稀释到 0.6mg/ml,通过腹膜内注射给药 0.5ml。给药的最后剂量是 0.3mg IgG。

[0303] 住所,食物,水和环境:

[0304] 在接受后,检测所有动物,将动物组(5个/笼)放入有海绵垫的聚碳酸鞋盒型笼子中。所有动物可以随意地吃(Harlan/Teklad Mouse Pelleted Diet#7012),在 12 小时光-暗循环下吸水。所有动物方面的护理所需要的畜牧条件是根据实验室动物护理和使用的 NIH 指导的。

[0305] 鉴定和随机化

[0306] 在处理之前,通过尾纹各个鉴定所有的小鼠。在处理之前,单个称重小鼠,再评估它们的健康。根据不同的体重将小鼠指派到各处理组。

[0307] 数据证明,比较非 ClfA 特异同型对照(CRL 1771)以及识别 ClfA 的特异的对照(35-052)在独立于 ClfA-纤维蛋白原结合的位点干扰 ClfA-纤维蛋白原黏连的抗 ClfA 抗体如 12-9 的治疗值。

[0308] 实施例 11:比较同型对照(CRL 1771),金黄葡萄球菌识别 12-9 和 35-052

[0309] 在 3 小时中收集金黄葡萄球菌样品(菌株 Newman-WT,67-0,560Sal 1,203Sal 2,451Sal 4,206Sal 5,397Sal 6,49,189,203 and 4046),过夜,洗涤,与浓度 2mg/ml 的 Mab 12-9,35-52 或 1771 单独(对照)在用兔 IgG(50mg/ml)封闭蛋白质 A 位点后温育。含有 Sal 命名的金黄葡萄球菌菌株代表 5 个不同的系,达到 65.68%的所有临床分离物(Booth, et al., Infect. Immun. 69, 345-353, 2001)。并且,用和特异性对照相同的方式分析 Newman ClfA::emr(ClifA 敲出)和 Newman Spa::kan(蛋白质 A 敲出)。在用抗体温育后,将细菌细胞与作为检测抗体的山羊-F_(ab)₂-抗-小鼠-F_(ab)₂-FITC 温育。在抗体标记后,通过 FACScaliber 流动细胞计抽吸细菌细胞分析荧光发散(激发波长:488,发散波长:570)。对于每个细菌菌株,收集 10,000 个事件,测定。

[0310] 表 VI:金黄葡萄球菌菌株反应性

[0311]

		荧光强度(几何平均值)		
金黄葡萄球菌菌株	培养时间	12-9	35-052	CRL1771
Newman WT	3 小时	30.8	11.1	0.5
	过夜	44.3	30	0.9
67-0	3 小时	11.2	4.2	2
	过夜	27.6	1.9	1.1
560 SAL 1	3 小时	28.8	8.4	3.9
	过夜	36.1	6.2	1.2
203 SAL2	3 小时	16.1	0.6	2.2
	过夜	40.4	1.9	1.4
451 SAL4	3 小时	1.1	0	0
	过夜	12.9	0	0
206 SAL5	3 小时	8.8	1.3	1

[0312]

	过夜	33.5	7.7	0.9
397 SAL6	3 小时	28.9	7.9	0.3
	过夜	62.1	40.0	1.0
49 欧洲	3 小时	7.3	1.2	0
	过夜	11.3	5.7	0
189 日本	3 小时	11.0	0	0
	过夜	15.7	0	0
203 新加坡	3 小时	22.1	3.3	0.1
	过夜	15.4	2.5	0.2
4046 美国	3 小时	27.7	2.5	1.3
	过夜	23.5	1.2	0.3
Newman CifA:emr	3 小时	0.2	0.3	0.2
	过夜	1.4	0.8	0.9
Newman Spa::kan	3 小时	18.6	4.9	0
	过夜	23.9	9.2	0

[0313] □指示阳性活性

[0314] 这一数据表现了选择抗 CifA 抗体（如 12-9）的重要性，即能够识别 CifA 分子上的功能表位，即纤维蛋白原的结合位点。

[0315] 另一系列的金黄葡萄球菌分离物，代表了 11 个不同的克隆基因型复合物，经鉴定与疾病的起因一样常见，是通过多座位序列同型派生的 (Day, et al. 2001. 金黄葡萄球菌天然群体中的毒力和生态丰度之间的关联, Science, 292 :114-116)。通过如上所述的流动细胞计测试各个菌株的抗 12-9 的反应性。

[0316] 表 VII. 12-9 与金黄葡萄球菌分离物的反应性

[0317]

金黄葡萄球菌命名	序列类型	克隆复合物	12-9 反应性
16	25	8	+
96	47	10	+
117	12	4	+
138	30	9	+

150	9	14	+
160	34	7	+
207	15	5	+
252	36	9	+
315	8	3	+
364	39	9	+
396	30	9	+
433	5	2	+
434	8	3	+
451	5	2	+
456	45	10	+
458	15	5	+
476	1	1	+
481	47	10	+
512	1	1	+
597	25	8	+
720	22	7	+
730	45	10	+
837	12	4	+
863	20	11	+
888	39	9	+
959	34	9	+

[0318] 这一反应性进一步证明了金黄葡萄球菌分离菌株的 ClfA 上的 12-9 表位的保守性,表明 ClfA- 纤维蛋白原结合是功能性保守的。

[0319] 实施例 12 :在抑制全部金黄葡萄球菌细胞结合的抗 ClfA 抗体中的可变区的同源性

[0320] 根据抑制 ClfA 与纤维蛋白原的结合的能力选择抗 ClfA 抗体的出乎意料的结果是在轻和重的可变链区的互补决定区 (CDR) 的氨基酸序列中的相似性。为此,在整个金黄葡萄球菌细胞抑制纤维蛋白原包衣的平板的基础上选择抗 ClfA 抗体,其中利用了下面的方法:在实验缓冲液中将需要的抗体在 4ug/ml 开始系列稀释。同时,洗涤过夜培养的金黄葡萄球菌 (Newman spa::kan),用兔 IgG 封闭,然后用可渗透荧光 DNA 染色的 Syto 13 细胞染色,温育 10 分钟。将等体积的染色细胞和稀释的抗体混合,在 4℃温育 30 分钟,然后将各个样品加到人纤维蛋白原包衣 / 封闭的微滴平板的复制的孔中。在 4℃温育平板 1 小时,洗涤,在每个孔中加入缓冲液,在荧光平板读数器中读数。

[0321] 克隆抗 ClfA 单克隆,12-9,13-2,35-006 和 35-220 以及 CRL1771 (非特异对照) 的可变轻和重链,并且测序,以下面的方法派生预定的氨基酸序列:用 PB S 洗涤含有 10% 的 FBS 的 DMEM-10 培养基中培养的 1.4×10^8 杂交瘤细胞,离心沉淀,然后在含有蛋白质 / Rnase 降解剂的去垢剂中溶解。通过在 oligo-dT 纤维素柱上亲和纯化分离 PolyA⁺mRNA。对于各个可变的轻和重链,利用 5mg 的 mRNA 和在含有 20pmol 的 3'寡聚核苷酸小鼠特异引物 (Novagen ;cat#69796and 69812) 的 cDNA 合成试剂盒 (Novagen ;cat#69001-3) 中的逆转录酶完成第一链 cDNA 的合成。利用 PCR 试剂系统 (生命技术公司 ;cat#10198-018) 和小鼠可变轻和重链特异引物系列 (Novagen ;cat#70081-3,各 5pmol) 进行聚合酶链式反应 (PCR) 30 个循环 (开始 94℃加热,然后 94℃ 1 分钟,50℃ 1 分钟和 72℃ 1 分钟循环) 扩增 (5 到 50ng) 的 cDNA 部分。在乙酸钠缓冲液中的 1% 的超纯琼脂糖凝胶中电泳分级分离 PCR 产物,用溴化乙锭染色观察。从凝胶中切出与预定大小匹配的 PCR 片段,利用 BIO 101Geneclean 旋转柱

(cat#1101-400) 纯化, 连接进 pCR2.1-TOPO 质粒 (Invitrogen)。接着转化进感受态 TOP10 大肠杆菌 (Invitrogen; cat#K4500)。在利用 QIAprep Spin Miniprep 试剂盒 (QIAGEN; cat#27106) 分离质粒 DNA 后, 通过限制性内切酶消化和琼脂糖凝胶电泳鉴定含有插入片段的阳性克隆, 接着利用 M13 正向和 M13 反向引物, 在 ABI 自动序列仪上测序。

[0322] 如图 7 所示, 数据显示, 在确定抑制金黄葡萄球菌与纤维蛋白原的结合的抗 ClfA 单克隆的结合特异性的免疫球蛋白链的大多数可变部分中具有相当的保守性。在可变的条件如制造 ClfA 抗原, 在融合之前的免疫的方法呵序列下, 从三个产生融合的不同杂交瘤 (12, 13 和 35) 中发现了这一同源性。特定地, 这一数据发现了在结合 ClfA 的单克隆抗体的可变的轻链的 CDR1 和 CDR2 中的同感的保守区, 和本发明的抗体的可变的轻链的 CDR1, CDR2 和 CDR3 区中的保守区。所以, 这一数据显示, 含有保守区的抗体的制备应该具有相同的结合特性, 并且将是在本发明的范围内的。

[0323] 因此, 根据本发明, 利用与图 8 的同感区中相同的关键的 CDR 区的可变的情或重链可以制备与 ClfA 结合的抗体。特定地, 这些抗体将包括具有可变重链的那些, 其中 CDR1 区包括 RYSVH 和 / 或 CDR2 区的序列, 包括 MIVGGGNTDYN SALKS 序列, 这些抗体也将包括具有 CDR1 区的可变的轻链, 包括 KSSQSVLYSSNQKNYLA 序列, 是应该包括序列 WASTRES 的 CDR2 区和 / 或包括 CDR3 区, 包括序列 HQYLSSYT。

[0324] 实施例 13: 表达人化 12-9 用于预临床和临床用途

[0325] 为了同时表达重和轻的免疫球蛋白多肽链, 将两个基因克隆进一个质粒, 各个基因都在独立的 hCMV-MIE 启动子的控制下。这一双基因载体具有一个拷贝的 GS 可选择标记 (Lonza; Slough, UK), 用于在一个转染事件中导入寄主细胞中。用 Eugene-6 (Roche), 在制造商建议的条件下转染细胞。测试上清液中短暂或稳定起源的细胞系, 与小鼠的和嵌合起源的 12-9 比较。

[0326] 这一实施例证明了, 人化 12-9 可以人化, 克隆呵在单个表达盒中表达, 能够产生支持商业规模的质量和纯度。

[0327] 序列表

[0328] <110> 约瑟夫·M·帕蒂

[0329] 杰夫·T·哈钦斯

[0330] 保罗·多罗斯基

[0331] 普拉蒂斯科沙·帕特尔

[0332] 安德烈娅·霍尔

[0333] <120> 针对 CLFA 蛋白质的单克隆抗体

[0334] <130> P07069US04/BAS

[0335] <140> 10/056, 052

[0336] <141> 2002-01-28

[0337] <150> 60/308, 116

[0338] <151> 2001-07-30

[0339] <150> 60/298, 413

[0340] <151> 2001-06-18

[0341] <150> 60/274, 611

[0342]	<151>2001-03-12	
[0343]	<150>60/264, 072	
[0344]	<151>2001-01-26	
[0345]	<160>29	
[0346]	<170>Patent In version 3.1	
[0347]	<210>1	
[0348]	<211>1560	
[0349]	<212>DNA	
[0350]	<213>金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus)	
[0351]	<400>1	
[0352]	agtgaataa gtgttacgca atctgatagc gcaagtaacg aaagcaaaag taatgattca	60
[0353]	agtagcggtta gtgctgcacc taaaacagac gacacaaacg tgagtatac taaaacatcg	120
[0354]	tcaaacacta ataattggcga aacgagtggtg gcgcaaaatc cagcacaaca ggaaacgaca	180
[0355]	caatcatcat caacaaatgc aactacggaa gaaacgccgg taactggtga agctactact	240
[0356]	acgacaacga atcaagctaa tacaccggca acaactcaat caagcaatac aaatgcggag	300
[0357]	gaattagtga atcaacaag taatgaacg acttttaatg atactaatac agtatcatct	360
[0358]	gtaaattcac ctcaaaattc tacaatgcg gaaaatgttt caacaacgca agatacttca	420
[0359]	actgaagcaa caccttcaaa caatgaatca gctccacaga gtacagatgc aagtaataaa	480
[0360]	gatgtagtta atcaagcgggt taatacaagt gcgcctagaa tgagagcatt tagtttagcg	540
[0361]	gcagtagctg cagatgcacc ggcagctggc acagatatta cgaatcagtt gacgaatgtg	600
[0362]	acagttggta ttgactctgg tacgactgtg tatccgcacc aagcagggtta tgtcaaacgt	660
[0363]	aattatgggtt tttagtgcc taattctgct gttaaagggtg acacattcaa aataactgta	720
[0364]	cctaaagaat taaacttaaa tgggtgtaact tcaactgcta aagtgccacc aattatggct	780
[0365]	ggagatcaag tattggcaaa tgggtgtaac gatagtgatg gtaatgttat ttatacatct	840
[0366]	acagactatg taaatactaa agatgatgta aaagcaactt tgaccatgcc cgcttatatt	900
[0367]	gaccctgaaa atgttaaaaa gacaggtaat gtgacattgg ctactggcat aggtagtaca	960
[0368]	acagcaaaaca aaacagtatt agtagattat gaaaaatatg gtaagtttta taacttatct	1020
[0369]	attaaaggta caattgacca aatcgataaa acaataataa cgtatcgtca gacaatttat	1080
[0370]	gtcaatccaa gtggagataa cgttattgcg ccggttttaa caggtaattt aaaaccaa	1140
[0371]	acggatagta atgcattaat agatcagcaa aatacaagta ttaaagtata taaagtagat	1200
[0372]	aatgcagctg atttatctga aagtacttt gtgaatccag aaaactttga ggatgtcact	1260
[0373]	aatagtgtga atattacatt cccaaatcca aatcaatata aagtagagtt taatacgctt	1320
[0374]	gatgatcaaa ttacaacacc gtatatagta gttgttaatg gtcataatga tccgaatagc	1380
[0375]	aaagggtgatt tagctttacg ttcaacttta tatgggtata actcgaatat aatttggcgc	1440
[0376]	tctatgtcat gggacaacga agtagcatct aataacggat caggttctgg tgacggatc	1500
[0377]	gataaaccag ttgttcctga acaacctgat gagcctgggtg aaattgaacc aattccagag	1560
[0378]	<210>2	
[0379]	<211>520	
[0380]	<212>PRT	

[0381] <213> 金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus)

[0382] <400>2

[0383] Ser Glu Asn Ser Val Thr Gln Ser Asp Ser Ala Ser Asn Glu Ser Lys

[0384] 1 5 10 15

[0385] Ser Asn Asp Ser Ser Ser Val Ser Ala Ala Pro Lys Thr Asp Asp Thr

[0386] 20 25 30

[0387] Asn Val Ser Asp Thr Lys Thr Ser Ser Asn Thr Asn Asn Gly Glu Thr

[0388] 35 40 45

[0389] Ser Val Ala Gln Asn Pro Ala Gln Gln Glu Thr Thr Gln Ser Ser Ser

[0390] 50 55 60

[0391] Thr Asn Ala Thr Thr Glu Glu Thr Pro Val Thr Gly Glu Ala Thr Thr

[0392] 65 70 75 80

[0393] Thr Thr Thr Asn Gln Ala Asn Thr Pro Ala Thr Thr Gln Ser Ser Asn

[0394] 85 90 95

[0395] Thr Asn Ala Glu Glu Leu Val Asn Gln Thr Ser Asn Glu Thr Thr Phe

[0396] 100 105 110

[0397] Asn Asp Thr Asn Thr Val Ser Ser Val Asn Ser Pro Gln Asn Ser Thr

[0398] 115 120 125

[0399] Asn Ala Glu Asn Val Ser Thr Thr Gln Asp Thr Ser Thr Glu Ala Thr

[0400] 130 135 140

[0401] Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln Ser Thr Asp Ala Ser Asn Lys

[0402] 145 150 155 160

[0403] Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr Ser Ala Pro Arg Met Arg Ala

[0404] 165 170 175

[0405] Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala Asp Ala Pro Ala Ala Gly Thr Asp

[0406] 180 185 190

[0407] Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asn Val Thr Val Gly Ile Asp Ser Gly Thr

[0408] 195 200 205

[0409] Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr Val Lys Leu Asn Tyr Gly Phe

[0410] 210 215 220

[0411] Ser Val Pro Asn Ser Ala Val Lys Gly Asp Thr Phe Lys Ile Thr Val

[0412] 225 230 235 240

[0413] Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly Val Thr Ser Thr Ala Lys Val Pro

[0414] 245 250 255

[0415] Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val Leu Ala Asn Gly Val Ile Asp Ser

[0416] 260 265 270

[0417] Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Val Asn Thr Lys Asp

[0418] 275 280 285

[0419] Asp Val Lys Ala Thr Leu Thr Met Pro Ala Tyr Ile Asp Pro Glu Asn

[0420]	290	295	300
[0421]	Val Lys Lys Thr Gly Asn Val Thr Leu Ala Thr Gly Ile Gly Ser Thr		
[0422]	305	310	315
[0423]	Thr Ala Asn Lys Thr Val Leu Val Asp Tyr Glu Lys Tyr Gly Lys Phe		320
[0424]		325	330
[0425]	Tyr Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile Asp Gln Ile Asp Lys Thr Asn		335
[0426]		340	345
[0427]	Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val Asn Pro Ser Gly Asp Asn Val		350
[0428]		355	360
[0429]	Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu Lys Pro Asn Thr Asp Ser Asn		365
[0430]		370	375
[0431]	Ala Leu Ile Asp Gln Gln Asn Thr Ser Ile Lys Val Tyr Lys Val Asp		380
[0432]	385	390	395
[0433]	Asn Ala Ala Asp Leu Ser Glu Ser Tyr Phe Val Asn Pro Glu Asn Phe		400
[0434]		405	410
[0435]	Glu Asp Val Thr Asn Ser Val Asn Ile Thr Phe Pro Asn Pro Asn Gln		415
[0436]		420	425
[0437]	Tyr Lys Val Glu Phe Asn Thr Pro Asp Asp Gln Ile Thr Thr Pro Tyr		430
[0438]		435	440
[0439]	Ile Val Val Val Asn Gly His Ile Asp Pro Asn Ser Lys Gly Asp Leu		445
[0440]		450	455
[0441]	Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly Tyr Asn Ser Asn Ile Ile Trp Arg		460
[0442]	465	470	475
[0443]	Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala Phe Asn Asn Gly Ser Gly Ser		480
[0444]		485	490
[0445]	Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val Val Pro Glu Gln Pro Asp Glu Pro		495
[0446]		500	505
[0447]	Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu		510
[0448]		515	520
[0449]	<210>3		
[0450]	<211>990		
[0451]	<212>DNA		
[0452]	<213>金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus)		
[0453]	<400>3		
[0454]	gtagctgcag atgcaccggc agctggcaca gatattacga atcagttgac gaatgtgaca		60
[0455]	gttggtattg actctggtac gactgtgtat ccgcaccaag caggttatgt caaactgaat		120
[0456]	tatggttttt cagtcctaa ttctgtgtt aaaggtgaca cattcaaaat aactgtacct		180
[0457]	aaagaattaa acttaaatgg tgtaattca actgctaaag tgccaccaat tatggetgga		240
[0458]	gatcaagtat tggcaaatgg tgtaatcgat agtgatggta atgttatitta tacatttaca		300

[0459]	gactatgtaa atactaaaga tgatgtaaaa gcaactttga ccatgccccgc ttatattgac	360
[0460]	cctgaaatg ttaaaaagac aggtaatgtg acattggcta ctggcatagg tagtacaaca	420
[0461]	gcaaacaaaa cagtattagt agattatgaa aaatatggta agttttataa cttatctatt	480
[0462]	aaaggtaaca ttgaccaaat cgataaaaca aataatacgt atcgtcagac aatttatgtc	540
[0463]	aatccaagtg gagataacgt tattgcgccg gttttaacag gtaatttaaa accaaatacg	600
[0464]	gatagtaatg cattaataga tcagcaaat acaagtatta aagtatataa agtagataat	660
[0465]	gcagctgatt tatctgaaag ttactttgtg aatccagaaa actttgagga tgtcactaat	720
[0466]	agtgtaata ttacattccc aaatccaat caatataaag tagagtttaa tacgcctgat	780
[0467]	gatcaaatta caacaccgta tatagtagtt gttaatggtc atattgatcc gaatagcaaa	840
[0468]	ggtgatttag ctttacgttc aactttatat gggataact cgaatataat ttggcgtct	900
[0469]	atgtcatggg acaacgaagt agcatttaat aacggatcag gttctgggtga cggtatcgat	960
[0470]	aaaccagttg ttctgaaca acctgatgag	990
[0471]	<210>4	
[0472]	<211>331	
[0473]	<212>PRT	
[0474]	<213> 金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus)	
[0475]	<400>4	
[0476]	Met Val Ala Ala Asp Ala Pro Ala Ala Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln	
[0477]	1 5 10 15	
[0478]	Leu Thr Asn Val Thr Val Gly Ile Asp Ser Gly Thr Thr Val Tyr Pro	
[0479]	20 25 30	
[0480]	His Gln Ala Gly Tyr Val Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn	
[0481]	35 40 45	
[0482]	Ser Ala Val Lys Gly Asp Thr Phe Lys Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu	
[0483]	50 55 60	
[0484]	Asn Leu Asn Gly Val Thr Ser Thr Ala Lys Val Pro Pro Ile Met Ala	
[0485]	65 70 75 80	
[0486]	Gly Asp Gln Val Leu Ala Asn Gly Val Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val	
[0487]	85 90 95	
[0488]	Ile Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Val Asn Thr Lys Asp Asp Val Lys Ala	
[0489]	100 105 110	
[0490]	Thr Leu Thr Met Pro Ala Tyr Ile Asp Pro Glu Asn Val Lys Lys Thr	
[0491]	115 120 125	
[0492]	Gly Asn Val Thr Leu Ala Thr Gly Ile Gly Ser Thr Thr Ala Asn Lys	
[0493]	130 135 140	
[0494]	Thr Val Leu Val Asp Tyr Glu Lys Tyr Gly Lys Phe Tyr Asn Leu Ser	
[0495]	145 150 155 160	
[0496]	Ile Lys Gly Thr Ile Asp Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg	
[0497]	165 170 175	

[0498]	Gln Thr Ile Tyr Val Asn Pro Ser Gly Asp Asn Val Ile Ala Pro Val	
[0499]	180 185 190	
[0500]	Leu Thr Gly Asn Leu Lys Pro Asn Thr Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp	
[0501]	195 200 205	
[0502]	Gln Gln Asn Thr Ser Ile Lys Val Tyr Lys Val Asp Asn Ala Ala Asp	
[0503]	210 215 220	
[0504]	Leu Ser Glu Ser Tyr Phe Val Asn Pro Glu Asn Phe Glu Asp Val Thr	
[0505]	225 230 235 240	
[0506]	Asn Ser Val Asn Ile Thr Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu	
[0507]	245 250 255	
[0508]	Phe Asn Thr Pro Asp Asp Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Val	
[0509]	260 265 270	
[0510]	Asn Gly His Ile Asp Pro Asn Ser Lys Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser	
[0511]	Thr Leu Tyr Gly Tyr Asn Ser Asn Ile Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp	
[0512]	290 295 300	
[0513]	Asp Asn Glu Val Ala Phe Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile	
[0514]	305 310 315 320	
[0515]	Asp Lys Pro Val Val Pro Glu Gln Pro Asp Glu	
[0516]	325 330	
[0517]	<210>5	
[0518]	<211>336	
[0519]	<212>DNA	
[0520]	<213> 金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus)	
[0521]	<400>5	
[0522]	aacattatga tgacacagtc gccatcatct ctggctgtgt ctgcaggaga aaaggtcact	60
[0523]	atgagctgta agtccagtca aagtgtttta tacagttcaa atcagaagaa ctacttggcc	120
[0524]	tggtaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaactactga tctactgggc atccactagg	180
[0525]	gaatctggtg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt tactcttacc	240
[0526]	atcaacagtg tacaagctga agacctggca gtttattact gtcatcaata cctctcctcg	300
[0527]	cacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa	336
[0528]	<210>6	
[0529]	<211>112	
[0530]	<212>PRT	
[0531]	<213> 金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus)	
[0532]	<400>6	
[0533]	Asn Ile Met Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly	
[0534]	1 5 10 15	
[0535]	Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser	
[0536]	20 25 30	

[0537]	Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln	
[0538]	35 40 45	
[0539]	Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val	
[0540]	50 55 60	
[0541]	Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr	
[0542]	65 70 75 80	
[0543]	Ile Asn Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln	
[0544]	85 90 95	
[0545]	Tyr Leu Ser Ser His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
[0546]	100 105 110	
[0547]	<210>7	
[0548]	<211>354	
[0549]	<212>DNA	
[0550]	<213>金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus)	
[0551]	<400>7	
[0552]	caggtgcatc tgaaggagtc aggacctggc ctggtggcac cctcacagag cctgtccatc	60
[0553]	acatgcactg tctctggatt ctcattatcc agatataata tacactgggt tcgccagcct	120
[0554]	ccaggaaagg gtctggagtg gctgggaatg atatgggggtg gtgaaacac agactataat	180
[0555]	tcagctctca aatccagact gagcatcagc aaggacaact ccaagagcca agttttctta	240
[0556]	aaaatgaaca gtctgcaaac tgatgacaca gccatgtact actgtgccag cgcctactat	300
[0557]	ggtaactcct ggtttgctta ctggggccag gggactctgg tcactgtctc tgca	354
[0558]	<210>8	
[0559]	<211>118	
[0560]	<212>PRT	
[0561]	<213>金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus)	
[0562]	<400>8	
[0563]	Gln Val His Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln	
[0564]	1 5 10 15	
[0565]	Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Arg Tyr	
[0566]	20 25 30	
[0567]	Asn Ile His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu	
[0568]	35 40 45	
[0569]	Gly Met Ile Trp Gly Gly Glu Asn Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys	
[0570]	50 55 60	
[0571]	Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu	
[0572]	65 70 75 80	
[0573]	Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala	
[0574]	85 90 95	
[0575]	Ser Ala Tyr Tyr Gly Asn Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr	

[0576]	100	105	110
[0577]	Leu Val Thr Val Ser Ala		
[0578]	115		
[0579]	<210>9		
[0580]	<211>336		
[0581]	<212>DNA		
[0582]	<213> 金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus)		
[0583]	<400>9		
[0584]	aacattatga tgacacagtc gccatcatct ctggctgtgt ctgcaggaga aaaggtcact	60	
[0585]	atgagctgta agtccagtca aagtgtttta tacagttcaa atcagaagaa ctacttggcc	120	
[0586]	tggtaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tctactgggc atccactagg	180	
[0587]	gaatctggtg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt tactettacc	240	
[0588]	atcagcagtg tacaagctga agacctggca gtttattact gtcacataa cctctcctcg	300	
[0589]	tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa	336	
[0590]	<210>10		
[0591]	<211>112		
[0592]	<212>PRT		
[0593]	<213> 金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus)		
[0594]	<400>10		
[0595]	Asn Ile Met Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly		
[0596]	1 5 10 15		
[0597]	Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser		
[0598]	20 25 30		
[0599]	Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln		
[0600]	35 40 45		
[0601]	Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val		
[0602]	50 55 60		
[0603]	Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr		
[0604]	65 70 75 80		
[0605]	Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln		
[0606]	85 90 95		
[0607]	Tyr Leu Ser Ser Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
[0608]	100 105 110		
[0609]	<210>11		
[0610]	<211>363		
[0611]	<212>DNA		
[0612]	<213> 金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus)		
[0613]	<400>11		
[0614]	caggtgcage tgaaggagtc aggacctggc ctggtggcac cctcacagag cctgtccatc	60	

[0615]	acatgcgcta tctctgggtt ctcattatcc agatatagtg tacactgggt tegccagcct	120
[0616]	ccaggaaagg gtctggagtg gctgggaatg atatgggggtg gtggaaacac agactataat	180
[0617]	tcagctctca aatccagact gagcatcagc aaggacaact ccaagagcca agttttctta	240
[0618]	aaaatgaaca gtctgcaaac tgatgacaca gccatgtatt actgtgccag aaaaggggaa	300
[0619]	ttctactatg gttacgacgg gtttgtttac tggggccaag ggactctggt cactgtctct	360
[0620]	gca	363
[0621]	<210>12	
[0622]	<211>121	
[0623]	<212>PRT	
[0624]	<213> 金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus)	
[0625]	<400>12	
[0626]	Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln	
[0627]	1 5 10 15	
[0628]	Ser Leu Ser Ile Thr Cys Ala Ile Ser Gly Phe Ser Leu Ser Arg Tyr	
[0629]	20 25 30	
[0630]	Ser Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu	
[0631]	35 40 45	
[0632]	Gly Met Ile Trp Gly Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys	
[0633]	50 55 60	
[0634]	Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu	
[0635]	65 70 75 80	
[0636]	Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala	
[0637]	85 90 95	
[0638]	Arg Lys Gly Glu Phe Tyr Tyr Gly Tyr Asp Gly Phe Val Tyr Trp Gly	
[0639]	100 105 110	
[0640]	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala	
[0641]	115 120	
[0642]	<210>13	
[0643]	<211>336	
[0644]	<212>DNA	
[0645]	<213> 金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus)	
[0646]	<400>13	
[0647]	aacattatga tgacacagtc gccatcatct ctggctgtgt ctgcaggaga aaaggtcact	60
[0648]	atgagctgta ggtccagtca aagtgtttta tacagttcaa atcagaagaa ctacttggcc	120
[0649]	tggtaccagc agaaaccagg gcagtctcct acactgctga tctactgggc atccactagg	180
[0650]	gaatctggtg tcctgatcg ctccacaggc agtggatctg ggacagattt tactettacc	240
[0651]	atcagcagtg tacaagctga agacctggca gtttattact gtcacataa cctctctcg	300
[0652]	tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa	336
[0653]	<210>14	

[0654]	<211>112	
[0655]	<212>PRT	
[0656]	<213> 金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus)	
[0657]	<400>14	
[0658]	Asn Ile Met Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly	
[0659]	1 5 10 15	
[0660]	Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser	
[0661]	20 25 30	
[0662]	Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln	
[0663]	35 40 45	
[0664]	Ser Pro Thr Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val	
[0665]	50 55 60	
[0666]	Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr	
[0667]	65 70 75 80	
[0668]	Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln	
[0669]	85 90 95	
[0670]	Tyr Leu Ser Ser Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
[0671]	100 105 110	
[0672]	<210>15	
[0673]	<211>354	
[0674]	<212>DNA	
[0675]	<213> 金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus)	
[0676]	<400>15	
[0677]	caggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc ctggtggcac cctcacagag cctgtccatc	60
[0678]	acatgcactg tctctgggtt ctcattatcc agatatagtg tacactgggt tcgccagcct	120
[0679]	ccaggaaagg gtctggagtg gctgggaatg atatgggggtg gtggaacac agactataat	180
[0680]	tcagctctca aatccagact gagcatcacc aaggacaact ccaagagcca agttttctta	240
[0681]	aaaatgaaca gtctgcaaac tgatgacaca gccatgtact actgtgccac cgcctactat	300
[0682]	ggtaactcct ggtttgccta ctggggccaa gggactctgg tcactgtctc tgca	354
[0683]	<210>16	
[0684]	<211>118	
[0685]	<212>PRT	
[0686]	<213> 金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus)	
[0687]	<400>16	
[0688]	Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln	
[0689]	1 5 10 15	
[0690]	Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Arg Tyr	
[0691]	20 25 30	
[0692]	Ser Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu	

[0693]	35	40	45	
[0694]	Gly Met Ile Trp Gly Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys			
[0695]	50	55	60	
[0696]	Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu			
[0697]	65	70	75	80
[0698]	Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala			
[0699]	85	90	95	
[0700]	Thr Ala Tyr Tyr Gly Asn Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr			
[0701]	100	105	110	
[0702]	Leu Val Thr Val Ser Ala			
[0703]	115			
[0704]	<210>17			
[0705]	<211>336			
[0706]	<212>DNA			
[0707]	<213>金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus)			
[0708]	<400>17			
[0709]	gacattgtga tgacacagtc gccagactct ctggctgtgt ctctgggaga aagggtcact			60
[0710]	atgaactgta agtccagtca aagtgtttta tacagttcaa atcagaagaa ctacttggcc			120
[0711]	tggtaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tctactgggc atccactagg			180
[0712]	gaatctggtg tccctgatcg cttcageggc agtggatctg ggacagattt tactcttacc			240
[0713]	atcagcagtg tacaagctga agacctggca gtttattact gtcacataa cctctcctcg			300
[0714]	tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa			336
[0715]	<210>18			
[0716]	<211>112			
[0717]	<212>PRT			
[0718]	<213>金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus)			
[0719]	<400>18			
[0720]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly			
[0721]	1	5	10	15
[0722]	Glu Arg Val Thr Met Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser			
[0723]	20	25	30	
[0724]	Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln			
[0725]	35	40	45	
[0726]	Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val			
[0727]	50	55	60	
[0728]	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr			
[0729]	65	70	75	80
[0730]	Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln			
[0731]	85	90	95	

[0732]	Tyr Leu Ser Ser Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
[0733]	100	105 110
[0734]	<210>19	
[0735]	<211>363	
[0736]	<212>DNA	
[0737]	<213> 金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus)	
[0738]	<400>19	
[0739]	caggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc ctggtgaagc cctcacagac cctgtccatc	60
[0740]	acatgcacca tctctgggtt ctcattatcc agatatagtg tacactgggt tcgccagcct	120
[0741]	ccaggaaagg gtctggagtgc gctgggaatg atatgggggtg gtggaaacac agactataat	180
[0742]	tcagctctca aatccagact gagcatcagc aaagacaact ccaagaacca agttttctta	240
[0743]	aaaatgaaca gtctgaccgc cgtgacaca gccgtgtatt actgtgccag aaaaggggaa	300
[0744]	ttctactatg gttacgacgg gtttgtttac tggggccaag ggactctggt cactgtctct	360
[0745]	tcc	363
[0746]	<210>20	
[0747]	<211>121	
[0748]	<212>PRT	
[0749]	<213> 金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus)	
[0750]	<400>20	
[0751]	Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln	
[0752]	1 5 10 15	
[0753]	Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Ile Ser Gly Phe Ser Leu Ser Arg Tyr	
[0754]	20 25 30	
[0755]	Ser Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu	
[0756]	35 40 45	
[0757]	Gly Met Ile Trp Gly Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys	
[0758]	50 55 60	
[0759]	Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys AspA sn Ser Lys Asn Gln Val Phe Leu	
[0760]	65 70 75 80	
[0761]	Lys Met Asn Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala	
[0762]	85 90 95	
[0763]	Arg Lys Gly Glu Phe Tyr Tyr Gly Tyr Asp Gly Phe Val Tyr Trp Gly	
[0764]	100 105 110	
[0765]	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
[0766]	115 120	
[0767]	<210>21	
[0768]	<211>336	
[0769]	<212>DNA	
[0770]	<213> 金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus)	

[0771]	<400>21	
[0772]	aacattatga tgacacagtc gccatcatct ctggctgtgt ctgcaggaga aaaggtcact	60
[0773]	atgagctgta agtccagtca aagtgtttta tacagttcaa atcagaagaa ctacttggcc	120
[0774]	tggtaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tctactgggc atccactagg	180
[0775]	gaatctgggtg tccctgatcg ctccacaggc agtggatctg ggacagattt tactettacc	240
[0776]	atcagcagtg tacaagctga agacctggca gtttattgct gtcataata cctctcctcg	300
[0777]	tacacgttcg gaggggggac cgagctggaa ataaaa	336
[0778]	<210>22	
[0779]	<211>112	
[0780]	<212>PRT	
[0781]	<213> 金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus)	
[0782]	<400>22	
[0783]	Asn Ile Met Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly	
[0784]	1 5 10 15	
[0785]	Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser	
[0786]	20 25 30	
[0787]	Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln	
[0788]	35 40 45	
[0789]	Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val	
[0790]	50 55 60	
[0791]	Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr	
[0792]	65 70 75 80	
[0793]	Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Cys Cys His Gln	
[0794]	85 90 95	
[0795]	Tyr Leu Ser Ser Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu Ile Lys	
[0796]	100 105 110	
[0797]	<210>23	
[0798]	<211>345	
[0799]	<212>DNA	
[0800]	<213> 金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus)	
[0801]	<400>23	
[0802]	caggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc ctggtggcac cctcacagag cctgtccatc	60
[0803]	acatgcactg tctctgggtt ctcatatcc agatatagtg tacactgggt tegccagcct	120
[0804]	ccaggaaagg gtctggagtg gctgggaatg atatggggtg gtggaagcac agactataat	180
[0805]	tcagctctca aatccagact gaacatcagc aaggacaact ccaagagcca agttttctta	240
[0806]	aaaatgaaca gtctgcaaac tgatgacaca gccatgtact actgtgccag aaggtctctgg	300
[0807]	tacttcgatg tctggggcgc agggaccacg gtcaccgtct cctca	345
[0808]	<210>24	
[0809]	<211>115	

[0810] <212>PRT
[0811] <213> 金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus)
[0812] <400>24
[0813] Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
[0814] 1 5 10 15
[0815] Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Arg Tyr
[0816] 20 25 30
[0817] Ser Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
[0818] 35 40 45
[0819] Gly Met Ile Trp Gly Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
[0820] 50 55 60
[0821] Ser Arg Leu Asn Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
[0822] 65 70 75 80
[0823] Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
[0824] 85 90 95
[0825] Arg Arg Leu Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr
[0826] 100 105 110
[0827] Val Ser Ser
[0828] 115
[0829] <210>25
[0830] <211>5
[0831] <212>PRT
[0832] <213> 金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus)
[0833] <400>25
[0834] Arg Tyr Ser Val His
[0835] 1 5
[0836] <210>26
[0837] <211>16
[0838] <212>PRT
[0839] <213> 金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus)
[0840] <400>26
[0841] Met Ile Trp Gly Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
[0842] 1 5 10 15
[0843] <210>27
[0844] <211>17
[0845] <212>PRT
[0846] <213> 金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus)
[0847] <400>27
[0848] Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu

[0849]	1	5	10	15
[0850]	Ala			
[0851]	<210>28			
[0852]	<211>7			
[0853]	<212>PRT			
[0854]	<213> 金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus)			
[0855]	<400>28			
[0856]	Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser			
[0857]	1	5		
[0858]	<210>29			
[0859]	<211>8			
[0860]	<212>PRT			
[0861]	<213> 金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus)			
[0862]	<400>29			
[0863]	His Gln Tyr Leu Ser Ser Tyr Thr			
[0864]	1	5		

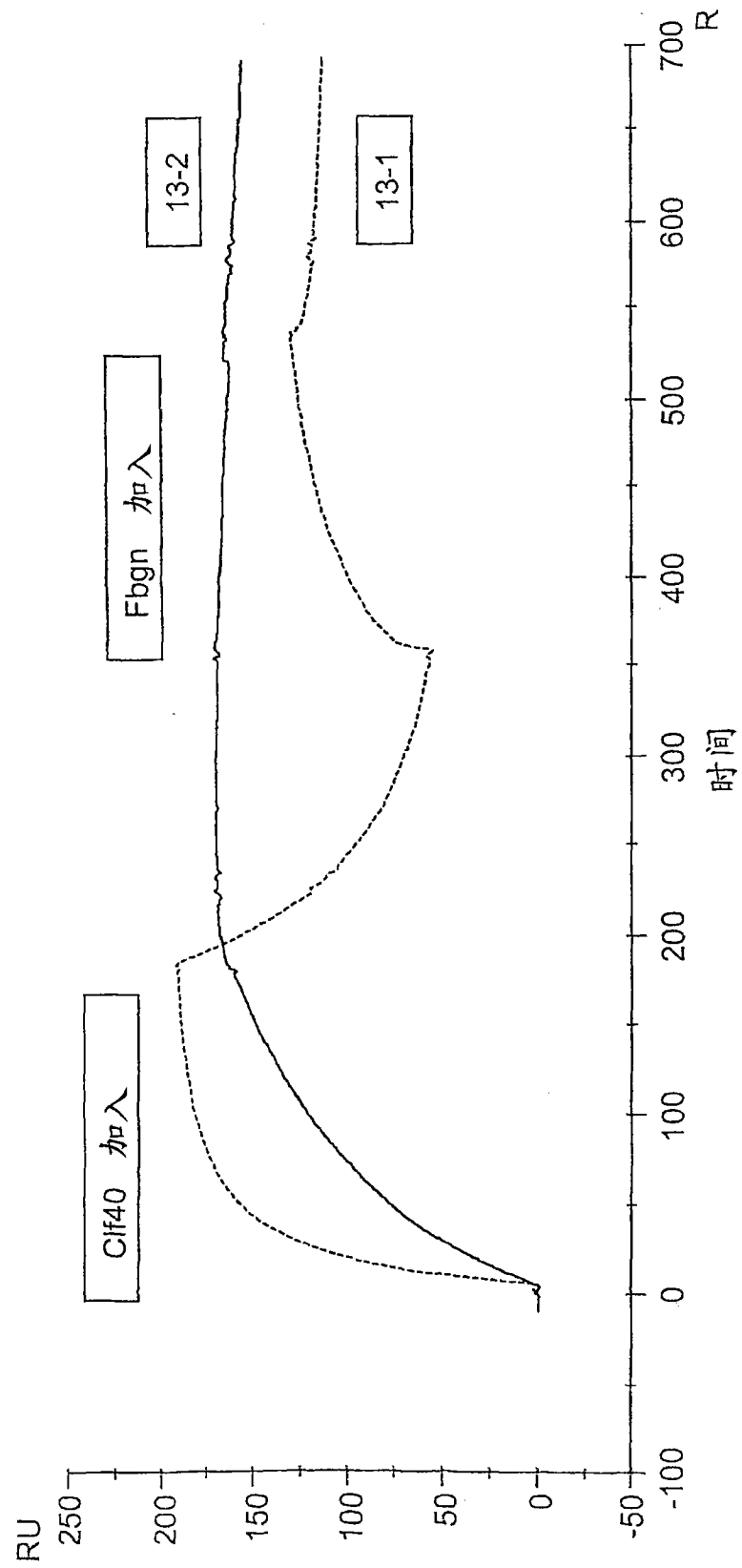


图 1

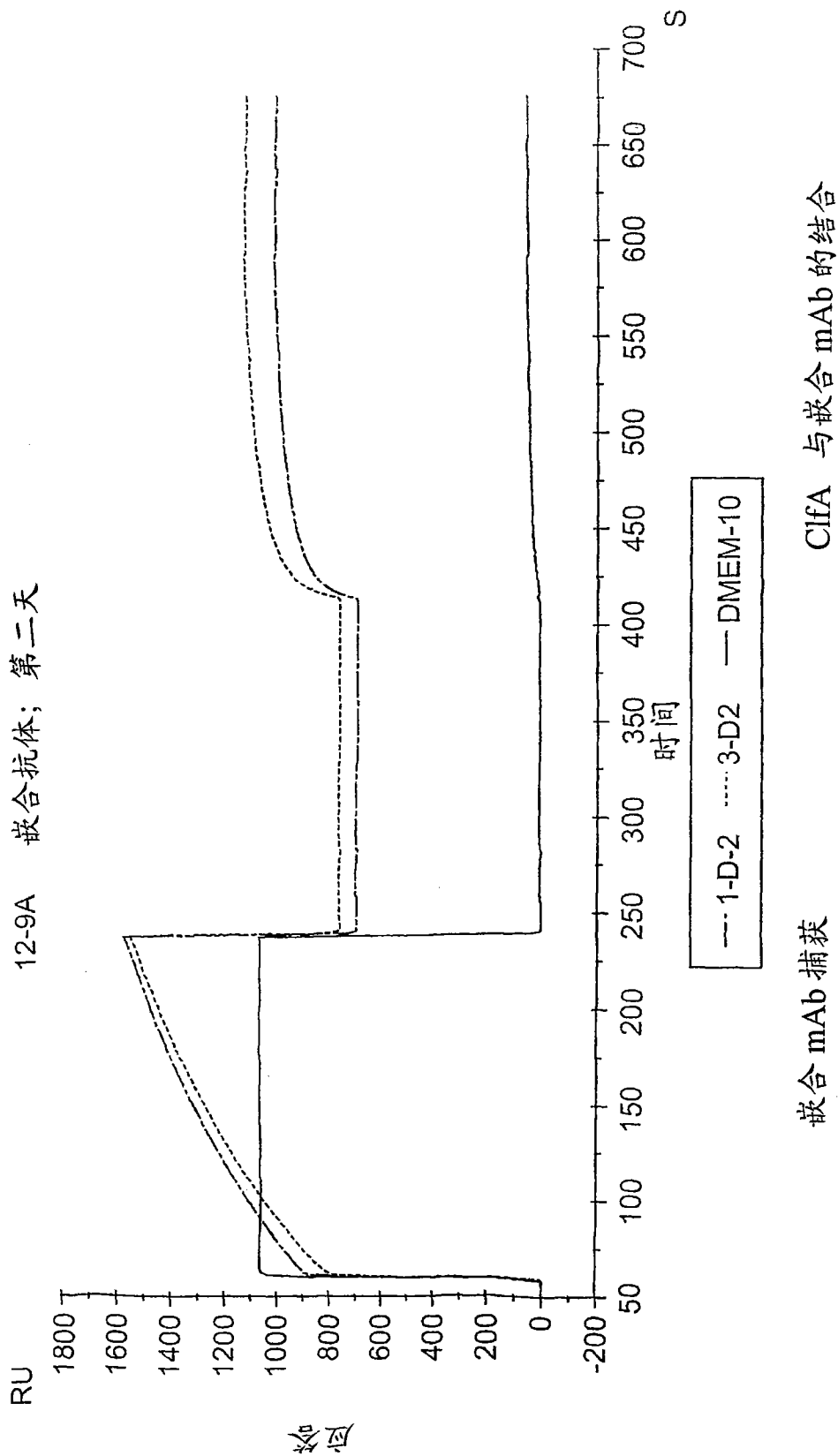


图 2

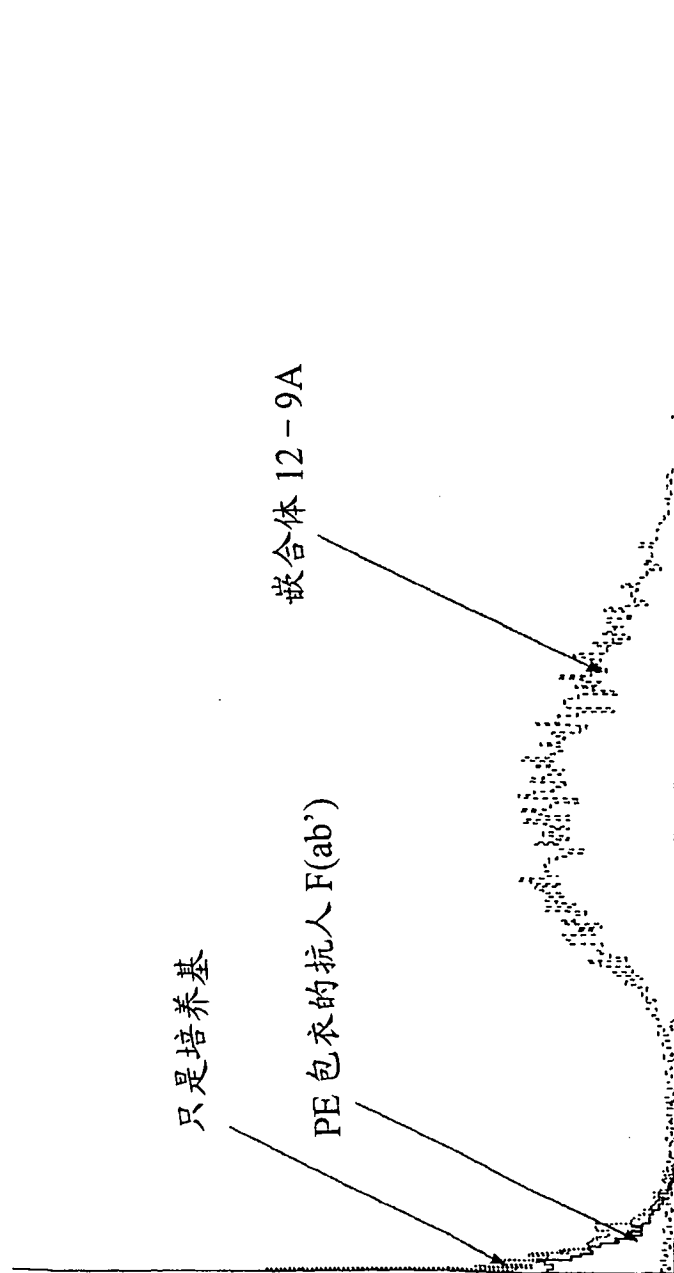


图 3

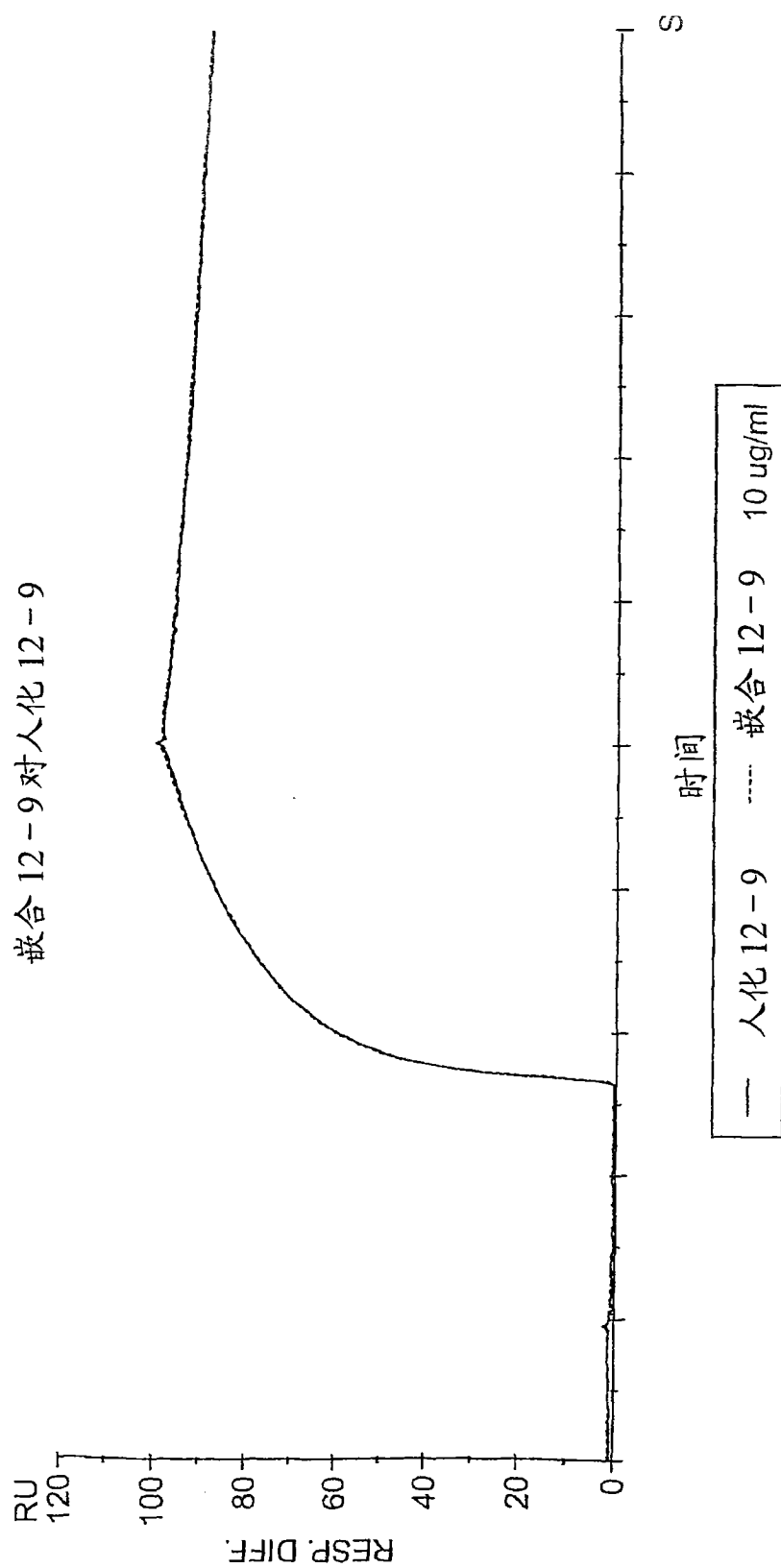


图 4

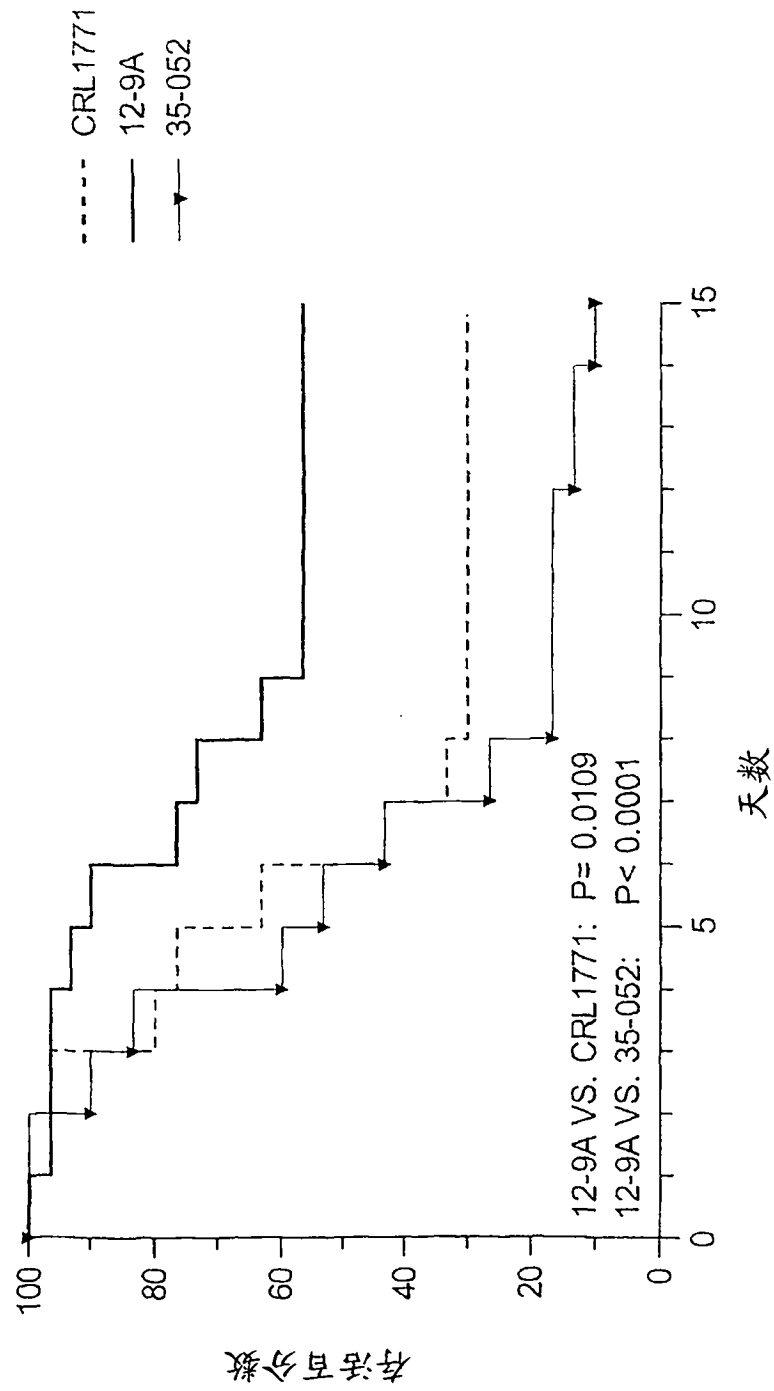


图 5

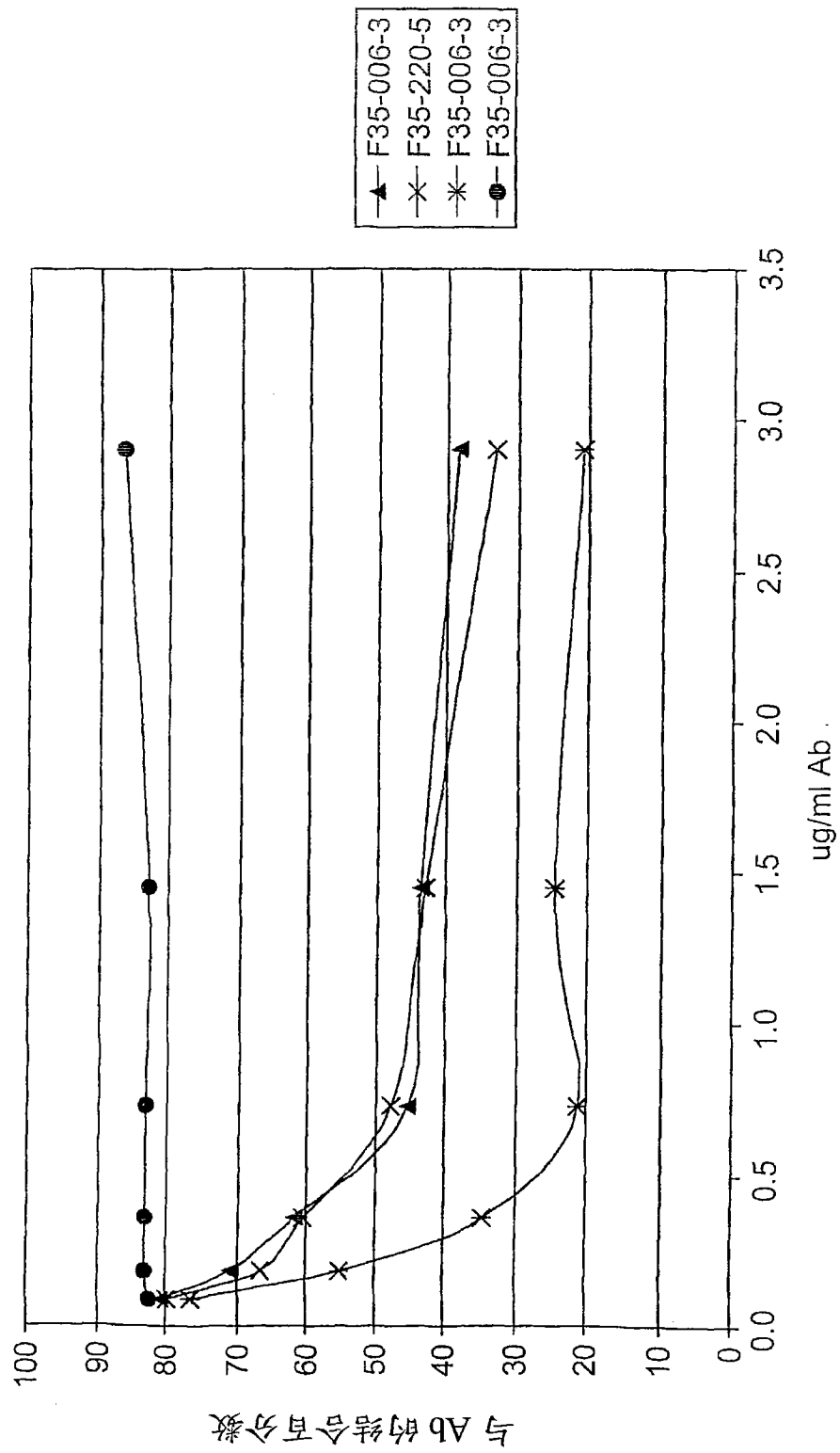


图 6

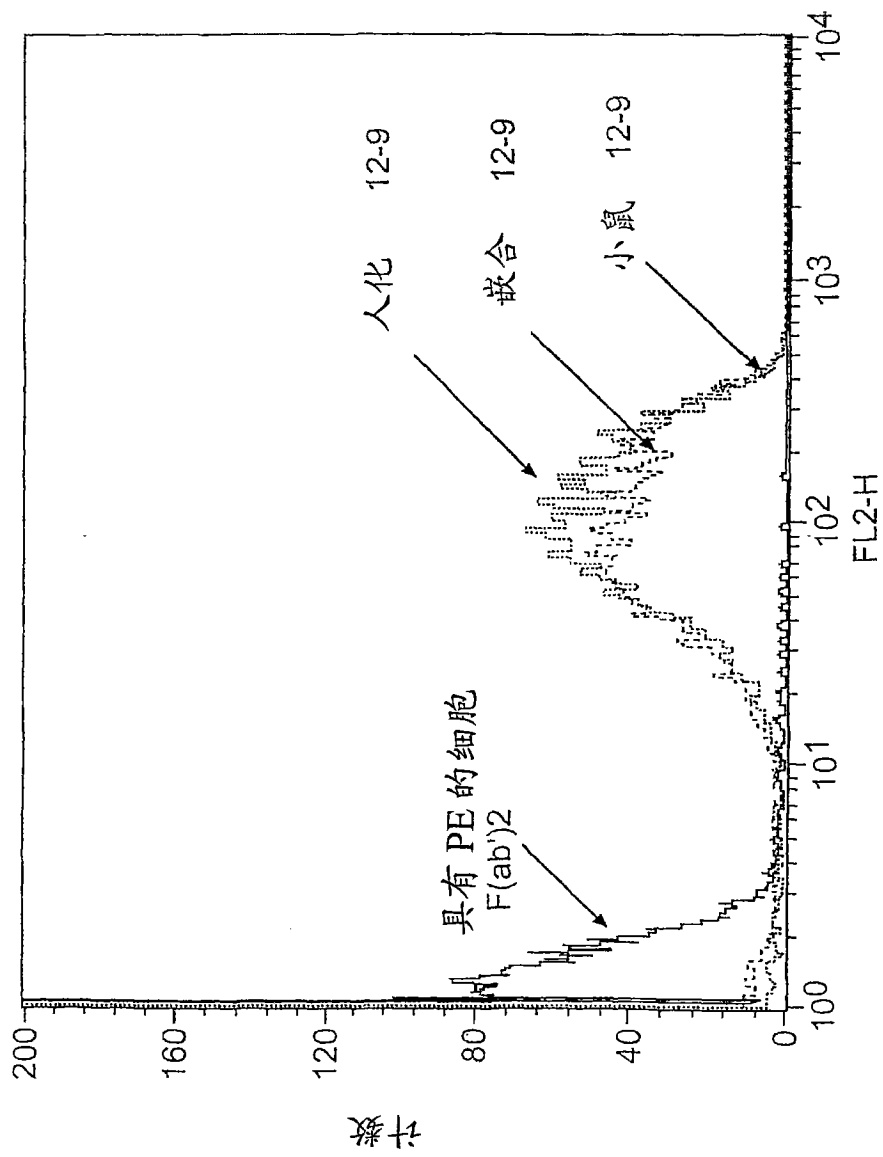


图 7

可变轻链 抗体	CDR ₁	CDR ₂	CDR ₃
1771	LSSQSLLDSDGKTFLN	LVSKLDS	WQGT HFPYT
12-9 (C1fA)	KSSQSVLYSSNQKNYLA	WASTRES	HQY LSSYT
13-2	KSSQSVLYSSNQKNYLA	WASTRES	HQY LSSH T
35-006	KSSQSVLYSSNQKNYLA	WASTRES	HQY LSSYT
35-220	RSSQSVLYSSNQKNYLA	WASTRES	HQY LSSYT
同感	KSSQSVLYSSNQKNYLA R	WASTRES	HQY LSSYT H
可变轻链 抗体	CDR1	CDR2	CDR3
1771	SGFSWH	YIHYSGSTDCNP SLKS	MPDS
12-9 (C1fA)	RYSVH	MIWGGGNTDYNSALKS	KGEFY YGYDGFVY
13-2	RYNIH	MIWGGGNTDYNSALKS	AYYGN SWFAY
35-006	RYSVH	MIWGGGNTDYNSALKS	RLWYFDV
35-220	RYSVH	MIWGGGNTDYNSALKS	AYYGN SWFAY
同感	RYSVH NI	MIWGGGNTDYNSALKS ES	AYYGN SWFA * * * Y KGEFY YGYD RLWYFDV

图 8