



(12) 发明专利 (全文更正)

(10) 授权公告号 CN 103443285 B9

(45) 授权公告日 2017.06.23

(48) 更正文献出版日 2018.04.24

(21) 申请号 201280007986.4

C07K 16/00(2006.01)

(22) 申请日 2012.02.07

A61K 39/40(2006.01)

A61K 39/085(2006.01)

(30) 优先权数据

61/440,581 2011.02.08 US

(56) 对比文件

WO 2009029831 A1, 2009.03.05, 第 55-69, 图 9-12, 14.

(85) PCT 国际申请进入国家阶段日
2013.08.07

Ragle B E. Anti-alpha-hemolysin
monoclonal antibodies mediate protection
against staphylococcus aureus pneumonia.
《Infection and Immunity》. 2009, 第 77 卷 (第
7 期), 第 2712-2718 页.

(86) PCT 国际申请的申请数据

PCT/US2012/024201 2012.02.07

(87) PCT 国际申请的公布数据

W02012/109285 EN 2012.08.16

(73) 专利权人 米迪缪尼有限公司
地址 美国马里兰州

审查员 杨光

(72) 发明人 B·塞尔曼 C·特卡奇克 L·华
P·乔杜里 R·瓦尔肯
M·达姆思克洛德 彭莉
V·奥加尼西安 J·J·西拉德

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100

代理人 沈端

(51) Int. Cl.

C12P 21/08(2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 82 页

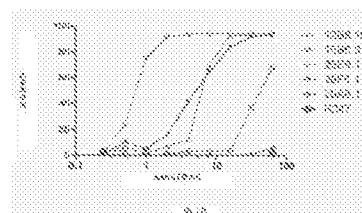
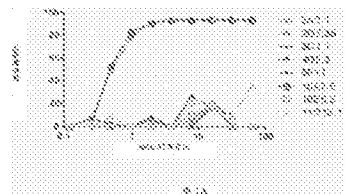
序列表 48 页 附图 29 页

(54) 发明名称

特异性结合金黄色葡萄球菌 α 毒素的抗体
以及使用方法

(57) 摘要

本披露提供了结合金黄色葡萄球菌 α 毒素
的抗体和片段的组合物、制造方法以及使用方法。
更确切地说, 本披露提供了抗体或抗原结合片段的
VH CDR 和 VL CDR 区序列。还披露了预防、治
疗或管理与金黄色葡萄球菌感染相关的病症的方法。



1. 一种分离的抗体或其抗原结合片段,其中该分离的抗体或其抗原结合片段免疫特异性地结合至金黄色葡萄球菌 α 毒素多肽,并且包括:

分别对应于氨基酸序列 SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:68 的 VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3。

2. 一种分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段:(i) 免疫特异性地结合至金黄色葡萄球菌 α 毒素多肽;(ii) 包含重链可变区 VH;(iii) 包含轻链可变区 VL,其中该 VH 和 VL 分别对应于 SEQ ID NO:57 和 58 的氨基酸序列。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的抗体或其抗原结合片段,其中该分离的抗体或其抗原结合片段包括一种另外的药剂,其中该另外的药剂是一种抗生素。

4. 如权利要求 3 所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗生素是万古霉素。

5. 如权利要求 1 或 2 所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述分离的抗体或其抗原结合片段免疫特异性地结合至金黄色葡萄球菌 α 毒素且具有 Fc 变体区,其中该分离的抗体包含 SEQ ID NO:XX 以及 SEQ ID NO:YY:

SEQ ID NO:XX:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHDHVRQATGKGLEWVSGIGTAGDTYYPD SVKGRFTISR
ENAKNSLYLQMNSLRAGDTAVYYCARDYSPTGHYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL
GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS
CDKTHCTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:YY:

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGLVPSRFSRSGSGSGTEF
TLTISSLQPEDFATYYCKQYADYWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW
KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC。

6. 一种组合物,包含如权利要求 1 至 5 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

7. 一种试剂盒,包含

(a) 如权利要求 1 至 5 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或如权利要求 6 所述的组合物;

(b) 用于使用该组合物的说明书或者用于获得使用该组合物的说明书的指导。

8. 如权利要求 1 至 5 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或如权利要求 6 所述的组合物在制备用于预防、治疗或管理在受试者中的肺炎的药物组合物中的应用。

9. 如权利要求 1 至 5 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或如权利要求 6 所述的组合物在制备用于以至少 50%抑制金黄色葡萄球菌 α 毒素寡聚体形成的产品中的应用。

10. 如权利要求 9 所述的应用,其特征在于,所述产品至少 60%抑制金黄色葡萄球菌 α 毒素寡聚体形成。

11. 如权利要求 9 所述的应用,其特征在于,所述产品至少 70%抑制金黄色葡萄球菌 α 毒素寡聚体形成。

12. 如权利要求 9 所述的应用,其特征在于,所述产品至少 80%抑制金黄色葡萄球菌 α 毒素寡聚体形成。

13. 如权利要求9所述的应用,其特征在于,所述产品至少90%抑制金黄色葡萄球菌 α 毒素寡聚体形成。

14. 如权利要求9所述的应用,其特征在于,所述产品至少95%抑制金黄色葡萄球菌 α 毒素寡聚体形成。

特异性结合金黄色葡萄球菌 α 毒素的抗体以及使用方法

[0001] 领域

[0002] 本技术涉及抗体部分,并且在某些实施例中涉及特异性结合至金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) α 毒素的抗体。

[0003] 背景

[0004] 金黄色葡萄球菌是一种革兰氏阳性的、兼性需氧、形成簇的球菌细菌,一般定殖于健康人的鼻子和皮肤。在任何给定时间,大致 20%-30% 的人群被金黄色葡萄球菌定殖。金黄色葡萄球菌细菌(有时也称为“staph”、“*Staph. aureus*”、或“*S. aureus*”)被认为是引起轻微感染(例如,小脓疱、疖)和全身感染的机会致病菌。

[0005] 通常,粘膜和表皮屏障(皮肤)保护人体免于金黄色葡萄球菌感染。由于损伤(例如,烧伤、外伤、外科手术等等)造成的这些天然屏障的破坏显著增加了感染风险。损害免疫系统的疾病(例如,糖尿病、终末期肾病、癌症等等)也增加了感染风险。机会性金黄色葡萄球菌细菌感染可以变得严重,引起多种疾病或病症,其非限制性实例包括菌血症、蜂窝织炎、眼睑感染、食物中毒、关节感染、皮肤感染、烫伤样皮肤综合征、中毒性休克综合征、肺炎、骨髓炎、心内膜炎、脑膜炎以及脓肿形成。

[0006] 金黄色葡萄球菌还可以引起动物中的感染和疾病。例如,金黄色葡萄球菌常常与牛乳腺炎相关。

[0007] 金黄色葡萄球菌表达多种毒力因子,包括荚膜多糖以及蛋白质毒素。经常与金黄色葡萄球菌感染相关的、是主要细胞毒剂的一种毒力因子是 α 毒素(还称为 α -溶血素或 Hla),是一种由金黄色葡萄球菌的致病力最强的菌株产生的成孔且溶血的胞外蛋白。该毒素在易感细胞(例如白细胞、血小板、红细胞、外周血单核细胞、巨噬细胞、角质化细胞、成纤维细胞以及内皮细胞)的膜中形成七聚体孔。 α 毒素孔形成常导致细胞功能障碍或溶解。

[0008] 披露的简要概述

[0009] 在某些实施例中,提供了一种纯化或分离的抗体或其抗原结合片段,该抗体或片段免疫特异性地结合至金黄色葡萄球菌 α 毒素多肽。术语“ α 毒素多肽”、“ α 毒素单体”以及“ α 毒素寡聚体(例如七聚体)”在此分别称为“AT”、“AT 单体”以及“AT 寡聚体”。术语“可变重链”称为“VH”。术语“可变轻链”被称为“VL”。

[0010] 在一些实施例中,免疫特异性地结合至金黄色葡萄球菌 α 毒素多肽的分离抗体或其抗原结合片段包含:(a) VH CDR1,该 VH CDR1 包含与 SEQ ID NO:7、10、13 或 69 一致的氨基酸序列或相对于它们包含 1、2、或 3 个氨基酸残基置换;(b) VH CDR2,该 VH CDR2 包含与 SEQ ID NO:8、11、14、17、70 或 75 一致的氨基酸序列或相对于它们包含 1、2、或 3 个氨基酸残基置换;以及(c) VHCDR3,该 VH CDR3 包含与 SEQ ID NO:9、12、15、18、16、65、66、67、71、72、76 或 78 一致的氨基酸序列或相对于它们包含 1、2、或 3 个氨基酸残基置换。

[0011] 在具体实施例中,分离抗体或其抗原结合片段包含 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3,该 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3 在各自的 CDR 中包含与 SEQ ID NO:7、8 和 9;SEQ ID NO:10、11 和 12;SEQ ID NO:13、14 和 15;SEQ ID NO:7、17 和 18;SEQ ID NO:7、8 和 16;SEQ ID NO:7、8 和 65;SEQ ID NO:7、8 和 66;SEQ ID NO:7、8 和 67;SEQ ID NO:7、8 和 78;SEQ ID NO:69、

70 和 71 ;SEQ ID NO:7、8 和 72 ;SEQ ID NO:69、75 和 71 ;SEQ ID NO:69、75 和 76 ;或 SEQ ID NO:69、70 和 71 一致的氨基酸序列或相对于它们包含 1、2、或 3 个氨基酸残基置换。

[0012] 在一些实施例中,免疫特异性地结合至金黄色葡萄球菌 α 毒素多肽的分离抗体或其抗原结合片段包含:(a)VL CDR1,该 VL CDR1 包含与 SEQ ID NO:1 或 4 一致的氨基酸序列或相对于它们包含 1、2、或 3 个氨基酸残基置换;(b)VLC DR2,该 VL CDR2 包含与 SEQ ID NO:2、5、73 或 77 一致的氨基酸序列或相对于它们包含 1、2、或 3 个氨基酸残基置换;以及(c)VL CDR3,该 VL CDR3 包含与 SEQ ID NO:3、6、64、68 或 74 一致的氨基酸序列或相对于它们包含 1、2、或 3 个氨基酸残基置换。

[0013] 在具体实施例中,分离抗体或其抗原结合片段包含 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3,该 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3 在各自的 CDR 中包含与 SEQ ID NO:1、2 和 3 ;SEQ ID NO:4、5 和 6 ;SEQ ID NO:1、2 和 64 ;SEQ ID NO:1、2 和 68 ;SEQ ID NO:1、73 和 74 ;或 SEQ ID NO:1、77 和 74 一致的氨基酸序列或相对于它们包含 1、2、或 3 个氨基酸残基置换。

[0014] 在一些实施例中,免疫特异性地结合至金黄色葡萄球菌 α 毒素多肽的分离抗体或其抗原结合片段包含 VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VLC DR2 和 VL CDR3,在各自的 CDR 中包含与以下各项一致的氨基酸序列或相对于它们包含 1、2、或 3 个氨基酸残基置换:(a)VH CDR1,该 VH CDR1 包含 SEQ ID NO:7、10、13 或 69 的氨基酸序列;(b)VH CDR2,该 VH CDR2 包含 SEQ ID NO:8、11、14、17、70 或 75 的氨基酸序列;(c)VH CDR3,该 VH CDR3 包含 SEQ ID NO:9、12、15、18、16、65、66、67、71、72、76 或 78 的氨基酸序列;(d)VL CDR1,该 VL CDR1 包含 SEQ ID NO:1 或 4 的氨基酸序列;(e)VL CDR2,该 VL CDR2 包含 SEQ ID NO:2、5、73、或 77 的氨基酸序列;以及(f)VL CDR3,该 VL CDR3 包含 SEQ ID NO:3、6、64、68 或 74 的氨基酸序列。

[0015] 在具体实施例中,分离抗体或其抗原结合片段包含 VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2、以及 VL CDR3,该 VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2、以及 VL CDR3 在各自的 CDR 中包含与 SEQ ID NO:7、8、9、1、2 和 3 ;SEQ ID NO:10、11、12、1、2 和 3 ;SEQ ID NO:13、14、15、4、5 和 6 ;SEQ ID NO:7、17、18、1、2 和 3 ;SEQ ID NO:7、8、16、1、2 和 64 ;SEQ ID NO:7、8、65、1、2 和 64 ;SEQ ID NO:7、8、66、1、2 和 64 ;SEQ ID NO:7、8、67、1、2 和 68 ;SEQ ID NO:7、8、67、1、2 和 64 ;SEQ ID NO:7、8、78、1、2 和 64 ;SEQ ID NO:7、8、65、1、2 和 68 ;SEQ ID NO:69、70、71、1、2 和 68 ;SEQ ID NO:7、8、72、1、73 和 74 ;SEQ ID NO:69、75、71、1、2 和 68 ;SEQ ID NO:69、75、76、1、2 和 68 ;SEQ ID NO:69、75、76、1、77 和 74 ;SEQ ID NO:69、70、71、1、77 和 74 一致的氨基酸序列或相对于它们包含 1、2、或 3 个氨基酸残基置换。

[0016] 在一些实施例中,提供了一种分离抗体或其抗原结合片段的组合物,该分离抗体或其抗原结合片段(i)包括含有三个 CDR 的 VH 链结构域以及含有三个 CDR 的 VL 链结构域;并且(ii)免疫特异性地结合至金黄色葡萄球菌 α 毒素多肽,其中该 VH 链结构域的三个 CDR 包括(a)含有 SEQ ID NO:7、10、13 或 69 的氨基酸序列的 VH CDR1;(b)含有 SEQ ID NO:8、11、14、17、70 或 75 的氨基酸序列的 VH CDR2;以及(c)含有 SEQ ID NO:9、12、15、18、16、65、66、67、71、72、76 或 78 的氨基酸序列的 VH CDR3。在具体实施例中,VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3 相应于 SEQ ID NO:7、8 和 9 ;SEQ ID NO:10、11 和 12 ;SEQ ID NO:13、14 和 15 ;SEQ ID NO:7、17 和 18 ;SEQ ID NO:7、8 和 16 ;SEQ ID NO:7、8 和 65 ;SEQ ID NO:7、8 和 66 ;SEQ ID NO:7、8、和 67 ;SEQ ID NO:7、8 和 78 ;SEQ ID NO:69、70 和 71 ;SEQ ID NO:7、8 和

72 ;SEQ ID NO:69、75 和 71 ;SEQ ID NO:69、75 和 76 ;或 SEQ ID NO:69、70 和 71。

[0017] 在某些实施例中还提供了含有一种分离抗体或其抗原结合片段的组合物,该分离抗体或其抗原结合片段 (i) 包括含有三个 CDR 的 VH 链结构域以及含有三个 CDR 的 VL 链结构域;并且 (ii) 免疫特异性地结合至金黄色葡萄球菌 α 毒素多肽,其中该 VL 链结构域的三个 CDR 包括 (a) 含有 SEQ ID NO:1 或 4 的氨基酸序列的 VL CDR1 ;(b) 含有 SEQ ID NO:2、5、73、或 77 的氨基酸序列的 VL CDR2 ;以及 (c) 含有 SEQ ID NO:3、6、64、68 或 74 的氨基酸序列的 VL CDR3。在具体实施例中,VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3 相应于 SEQ ID NO:1、2 和 3 ;SEQ ID NO:4、5 和 6 ;SEQ ID NO:1、2 和 64 ;SEQ ID NO:1、2 和 68 ;SEQ ID NO:1、73 和 74 ;或 SEQ ID NO:1、77 和 74。

[0018] 在一些实施例中还提供了包含一种分离抗体或其抗原结合片段的组合物,该分离抗体或其抗原结合片段 (i) 免疫特异性地结合至金黄色葡萄球菌 α 毒素多肽, (ii) 包含重链可变域,该重链可变域包含与 SEQ ID NO:20、22、24、26、28、41、43、45、47、49、51、53、55、57、79、59、61、或 62 的氨基酸序列至少 90% 的一致性,并且 (iii) 包含轻链可变域,该轻链可变域包含与 SEQ ID NO:19、21、23、25、27、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60 或 63 的氨基酸序列至少 90% 的一致性。

[0019] 在一些实施例中,分离抗体或其抗原结合片段包含具有 SEQ ID NO:20、22、24、26、28、41、43、45、47、49、51、53、55、57、79、59、61、或 62 的重链可变域以及具有 SEQ ID NO:19、21、23、25、27、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60 或 63 的轻链可变域。

[0020] 在具体实施例中,分离抗体或其抗原结合片段包含 VH 和 VL,其中该 VH 和 VL 各自与 SEQ ID NO:20 和 19 ;SEQ ID NO:22 和 21 ;SEQ ID NO:24 和 23 ;SEQ ID NO:26 和 25 ;SEQ ID NO:28 和 27 ;SEQ ID NO:41 和 42 ;SEQ ID NO:43 和 44 ;SEQ ID NO:45 和 46 ;SEQ ID NO:47 和 48 ;SEQ ID NO:47 和 48 ;SEQ ID NO:49 和 50 ;SEQ ID NO:51 和 52 ;SEQ ID NO:51 和 52 ;SEQ ID NO:53 和 54 ;SEQ ID NO:55 和 56 ;SEQ ID NO:57 和 58 ;SEQ ID NO:59 和 60 ;SEQ ID NO:61 和 58 ;SEQ ID NO:62 和 58 ;SEQ ID NO:62 和 63 ;SEQ ID NO:79 和 63 的 VH 和 VL 氨基酸序列一致或者与它们各自具有至少 90%、95% 或 98% 的一致性。

[0021] 在一些实施例中,一种分离抗体或其抗原结合片段免疫特异性地结合至金黄色葡萄球菌 α 毒素多肽并且具有选自下组的一种或多种特征,该组由以下各项组成:(a) 对于金黄色葡萄球菌 α 毒素多肽的大约 13nM 或更小的亲和力参数 (K_D) ;(b) 以至少 50%、60%、70%、80%、90%、或 95% 抑制金黄色葡萄球菌 α 毒素多肽的寡聚化;以及 (c) 以至少 50%、60%、70%、80%、90%、或 95% 减少 A549 (肺上皮) 溶解或 THP-1 (单核细胞) 以及红细胞溶解,其中分离抗体或抗原结合片段与金黄色葡萄球菌毒素以大约 1:1 的摩尔比存在。

[0022] 在一些实施例中,红细胞是来自血液的细胞。在某些实施例中,来自血液的细胞是红细胞。在一些实施例中,溶解是通过体外溶血试验确定的。在其他实施例中,溶解是通过体外乳酸脱氢酶释放试验确定的。这些试验进一步描述于下文,或者可以由本领域的普通技术人员常规地进行。

[0023] 在一些实施例中,分离抗体或其抗原结合片段包括一种诊断剂。在某些实施例中,诊断剂包括一种显像剂。在一些实施例中,诊断剂包括一种可检测标记物。在某些实施例中,该分离抗体或其抗原结合片段经由一种接头连接至该诊断剂。

[0024] 在一些实施例中,金黄色葡萄球菌 α 毒素多肽是一种天然毒素多肽。在一些实施

例中,相对于天然毒素多肽,金黄色葡萄球菌 α 毒素多肽包括一个或多个氨基酸缺失、添加和 / 或置换(例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 个氨基酸插入、缺失和 / 或置换)。在一些实施例中,金黄色葡萄球菌 α 毒素多肽是一种重组蛋白。在某些实施例中,金黄色葡萄球菌 α 毒素多肽包含 SEQ ID NO:39 的氨基酸序列或其片段。在某些其他实施例中,金黄色葡萄球菌 α 毒素多肽是多肽的减毒形式,如 H35L,其中在野生型多肽的位置 35 处的组氨酸被亮氨酸替换,例如,如通过 SEQ ID NO:40 表示的。

[0025] 在某些实施例中,分离抗体或其抗原结合片段免疫特异性地结合至金黄色葡萄球菌 α 毒素多肽并且包含 VH CDR3,该 VH CDR3 包含与 SEQ ID NO:9、12、15、18、16、65、66、67、71、72、76 或 78 一致的氨基酸序列或相对于它们包含 1、2、或 3 个氨基酸残基置换,其中该抗体或其抗原结合片段中和该金黄色葡萄球菌 α 毒素多肽。在一些实施例中,分离抗体或分离抗体的抗原结合片段免疫特异性地结合至金黄色葡萄球菌 α 毒素多肽并且包含 VL CDR3,该 VL CDR3 包含与 SEQ ID NO:3、6、64、68 或 74 一致的氨基酸序列或相对于它们包含 1、2、或 3 个氨基酸残基置换,其中该抗体或其抗原结合片段中和该金黄色葡萄球菌 α 毒素多肽。

[0026] 在某些实施例中,分离抗体或其抗原结合片段免疫特异性地结合至金黄色葡萄球菌 α 毒素多肽并且包含 VH CDR3,该 VH CDR3 包含与 SEQ ID NO:9、12、15、18、16、65、66、67、71、72、76 或 78 一致的氨基酸序列或相对于它们包含 1、2、或 3 个氨基酸残基置换,其中该抗体或其抗原结合片段抑制该金黄色葡萄球菌 α 毒素多肽的寡聚化。在一些实施例中,分离抗体或其抗原结合片段免疫特异性地结合至金黄色葡萄球菌 α 毒素多肽并且包含 VL CDR3,该 VL CDR3 包含与 SEQ ID NO:3、6、64、68 或 74 一致的氨基酸序列或相对于它们包含 1、2、或 3 个氨基酸残基置换,其中该抗体或其抗原结合片段抑制该金黄色葡萄球菌 α 毒素多肽的寡聚化。在某些实施例中,寡聚化的抑制是通过体外结合和电泳迁移率测定确定的。

[0027] 在此还提供了试剂盒,这些试剂盒包括 (a) 含有分离抗体或其抗原结合片段的组合物,以及 (b) 用于使用该组合物的说明书或者用于获得使用该组合物的说明书的指导。在一些实施例中,在组合物中的抗体连接至一种固体支撑物。在某些实施例中,固体支撑物是一种珠粒,并且在一些实施例中,该珠粒是一种琼脂糖凝胶珠。在一些实施例中,使用说明书包括金黄色葡萄球菌 α 毒素多肽的分离、纯化、检测以及定量中的一项或多项。

[0028] 在某些实施例中,该试剂盒包括一种适用于 Western 印迹的缓冲液和膜。在一些实施例中,该试剂盒包含上样缓冲液和洗脱缓冲液。在某些实施例中,该试剂盒包含一种适用于酶联免疫吸附测定(ELISA)的缓冲液。

[0029] 在此还提供了用于预防、治疗或管理在受试者中的肺炎的方法,该方法包括:将包含免疫特异性地结合至金黄色葡萄球菌 α 毒素多肽的抗体或其抗原结合片段的组合物以用于预防、治疗或管理肺炎有效的量给予至对其有需要的受试者。

[0030] 在一些实施例中,该方法预防肺炎。在某些实施例中,抗体或其抗原结合片段免疫特异性地结合至一种线性或构象表位,该线性或构象表位包含葡萄球菌 α 毒素多肽的氨基酸 1 至 293 或氨基酸 51 至 293 的一个或多个残基或者一部分或片段。在某些实施例中,抗体或其抗原结合片段结合至一种片段,其中该抗体或抗原结合片段在 SEQ ID NO:39 的 T261、T163、N264、K266 和 K271 处具有接触残基。在另外的实施例中,抗体或其抗原结合片段结合至 α 毒素的一个片段,其中该抗体或抗原结合片段在 SEQ ID NO:39 的 N177、W179、

G180、P181、Y182、D183、D185、S186、W187、N188、P189、V190、Y191 和 R200 处具有另外的接触残基。

[0031] 在某些实施例中,抗体或抗原结合片段在SEQ ID NO:39的N177、W179、G180、P181、Y182、D183、D185、S186、W187、N188、P189、V190、Y191、R200、T261、T163、N264、K266 和 K271 处具有接触残基。在其他实施例中,抗体或其抗原结合片段结合至包含SEQ ID NO:39 氨基酸 261-272 的片段。在另外的实施例中,抗体或其抗原结合片段结合至包含SEQ ID NO:39 氨基酸 248-277 的片段。在其他实施例中,抗体或其抗原结合片段结合至包含SEQ ID NO:39 的氨基酸 173-201 的片段以及包含SEQ ID NO:39 的氨基酸 261-272 的片段,或者结合至包含SEQ ID NO:39 的氨基酸 173-201 的片段以及包含SEQ ID NO:39 的氨基酸 248-277 的片段。

[0032] 在某些实施例中,抗体或其抗原结合片段结合至一种片段,其中该抗体或抗原结合片段在SEQ ID NO:40 的T261、T163、N264、K266 和 K271 处具有接触残基。在另外的实施例中,抗体或其抗原结合片段结合至 α 毒素的一个片段,其中该抗体或抗原结合片段在SEQ ID NO:40 的N177、W179、G180、P181、Y182、D183、D185、S186、W187、N188、P189、V190、Y191 和 R200 处具有另外的接触残基。

[0033] 在某些实施例中,抗体或抗原结合片段在SEQ ID NO:40的N177、W179、G180、P181、Y182、D183、D185、S186、W187、N188、P189、V190、Y191、R200、T261、T163、N264、K266 和 K271 处具有接触残基。在其他实施例中,抗体或其抗原结合片段结合至包含SEQ ID NO:40 的氨基酸 261-272 的片段。在另外的实施例中,抗体或其抗原结合片段结合至包含SEQ ID NO:40 的氨基酸 248-277 的片段。在其他实施例中,抗体或其抗原结合片段结合至包含SEQ ID NO:40 氨基酸 173-201 的片段以及包含SEQ ID NO:40 氨基酸 261-272 的片段。

[0034] 在其他实施例中,抗体或其抗原结合片段结合至一个片段,该片段包含葡萄球菌 α 毒素多肽或葡萄球菌 α 毒素多肽变体的(1)氨基酸 261-272,(2)氨基酸 248-277 或(3)氨基酸 173-201 和 261-272,其中氨基酸 261-272、氨基酸 248-277 或氨基酸 173-201 相应于与SEQ ID NO:39 中的相应区域相同的氨基酸序列或者在具有SEQ ID NO:39 中的相应区域的片段之内含有置换,其中这些置换不改变抗体或其抗原结合片段结合至 α 毒素多肽的能力。

[0035] 在一些实施例中提供了用于预防、治疗或管理受试者中的皮肤感染病症的一种方法,该方法包括:将包含根据本发明的免疫特异性地结合至金黄色葡萄球菌 α 毒素多肽的抗体或其抗原结合片段的组合物以用于预防、治疗或管理皮肤感染病症有效的量给予至对其有需要的受试者。在某些实施例中,皮肤感染病症是皮肤坏死。在一些实施例中,皮肤感染病症包括皮肤的金黄色葡萄球菌感染。在某些实施例中,该方法预防皮肤感染病症。

[0036] 在一些实施例中提供了用于预防、治疗或管理与金黄色葡萄球菌感染相关的病症的一种方法,该方法包括:将包含根据本发明的免疫特异性地结合至金黄色葡萄球菌 α 毒素多肽的抗体或其抗原结合片段的组合物以减少该毒素多肽的寡聚化有效的量给予至对其有需要的受试者。在某些实施例中,该方法预防与金黄色葡萄球菌感染相关的病症。

[0037] 在一些实施例中,提供了用于预防、治疗、或管理与透析治疗、高风险手术、肺炎、呼吸机相关性肺炎(VAP)、或在从先前的早先治疗或手术的医院出院之后的再感染相关的金黄色葡萄球菌感染的方法,该方法包括将包含免疫特异性地结合至金黄色葡萄球菌 α

毒素多肽的抗体或其抗原结合片段的组合物给予至对其有需要的受试者。

[0038] 在一些实施例中还提供了用于预防、治疗或管理与金黄色葡萄球菌感染相关的病症的一种方法,该方法包括将包含免疫特异性地结合至金黄色葡萄球菌 α 毒素多肽的抗体或其抗原结合片段的组合物以减少细胞溶解有效的量给予至对其有需要的受试者。在某些实施例中,该方法预防与金黄色葡萄球菌感染相关的病症。在一些实施例中,该细胞是来自血液或肺的红细胞。

[0039] 在一些实施例中,抗体或其抗原结合片段免疫特异性地结合至包含一个或多个残基的线性或构象表位。在某些实施例中,给予至受试者的组合物是根据在此所述的组合物中的任何一种。

[0040] 在某些实施例中还提供了这样一种方法,该方法包括:将在此所述的组合物给予至细胞;并且检测与给予组合物至这些细胞相关的生物效应的存在、不存在或量。在一些实施例中还提供了一种这样方法,该方法包括:将在此所述的组合物给予至受试者;并且检测受试者中与组合物的给予相关的生物效应的存在、不存在或量。在某些实施例中还提供了这样一种方法,该方法包括:将在此所述的组合物给予至受试者;并且监测受试者的病症。

[0041] 在一些实施例中还提供了通过将在此所述的有效量的任一种组合物给予至对其有需要的受试者以便中和毒素多肽而用于中和金黄色葡萄球菌 α 毒素多肽的方法。

[0042] 在某些实施例中还提供了预防、治疗、或管理在对其有需要的受试者中的由金黄色葡萄球菌感染介导的病症的方法,该方法包括将在此所述的有效量的任一种组合物给予至受试者以预防、治疗或管理该病症。在一些实施例中还提供了用于治疗、预防或减轻在对其有需要的受试者中的由金黄色葡萄球菌 α 毒素多肽介导的失调症状的方法,该方法包括将在此所述的有效量的任一种组合物给予至受试者以治疗、预防或减轻症状。

[0043] 在某些实施例中还提供了用于诊断受试者中的由金黄色葡萄球菌 α 毒素介导的病症的方法,该方法包括选择对诊断有需要的受试者,并且将诊断有效剂量的在此所述的任何一种组合物给予至受试者。在一些实施例中,受试者是家畜,并且在某些实施例中,受试者是人。

[0044] 某些实施例进一步描述于以下说明书、实例、权利要求书以及附图中。

[0045] 附图简要说明

[0046] 附图展示了在此的实施例并且不是限制性的。为了清晰和容易地说明,附图未按比例作出,并且在一些情况下,不同的方面可能被夸张或放大地显示以促进具体实施例的理解。

[0047] 图 1A 和 1B 图形展示了红细胞溶解被抗 α 毒素抗体抑制的百分比。实验细节和结果描述于实例 3 中。

[0048] 图 2A 和 2B 图形展示了人 A549 和 THP-1 细胞溶解被抗 α 毒素抗体抑制的百分比。实验细节和结果描述于实例 3 中。

[0049] 图 3A 和 3B 展示了在皮肤坏死模型中用抑制性抗金黄色葡萄球菌 α 毒素 mAb 的被动免疫的结果。将 5 只 BALB/c 小鼠的组用 5mg/kg 的抑制性 mAb 被动免疫,并且然后用金黄色葡萄球菌 Wood 感染并且监测病灶大小持续 6 天。图 3A 显示了感染 6 天后病灶大小的照片。图 3B 图形展示了随着感染时程的推移的病灶大小的减小。实验细节和结果描述

于实例 4 中。

[0050] 图 4-7 图形展示了在肺炎模型中用在此所述的不同 mAb 被动免疫的小鼠的存活。图 4 展示了在用金黄色葡萄球菌 USA300 (3×10^8 cfu) 感染之前 24 小时用 5mg/kg、15mg/kg 和 45mg/kg 纯化的 12B8.19 被动免疫的 C57BL/6J 小鼠的结果。

[0051] 图 5 展示了在用金黄色葡萄球菌 USA300 (3×10^8 cfu) 感染之前 24 小时用 5mg/kg、15mg/kg 和 45mg/kg 纯化的 2A3.1 被动免疫的 C57BL/6J 小鼠的结果。

[0052] 图 6 展示了在用金黄色葡萄球菌 USA300 (3×10^8 cfu) 感染之前 24 小时用 5mg/kg、15mg/kg 和 45mg/kg 纯化的 28F6.1 被动免疫的 C57BL/6J 小鼠的结果。

[0053] 图 7 展示了在用金黄色葡萄球菌 USA300 (3×10^8 cfu) 感染之前 24 小时用 5mg/kg、15mg/kg 和 45mg/kg 纯化的 10A7.5 被动免疫的 C57BL/6J 小鼠的结果。实验细节和结果描述于实例 5 中。

[0054] 图 8A 和 8B 图形展示了在用全人型式的 mAb2A3.1 (例如, 2A3hu) 或同种型对照 (R347) 被动免疫的小鼠中在肺(图 8A) 和肾(图 8B) 中的细菌分布。将 C57BL/6J 小鼠在用 USA300 感染之前 24 小时用 2A3hu (15mg/kg) 被动免疫。还收集样品以测量细胞因子水平并且用于组织病理学分析。实验细节和结果描述于实例 5 中。

[0055] 图 9 图形展示了在用 mAb2A3hu 被动免疫之后炎性细胞因子产生的减少。圈起来的结果来自 24 小时时间点。实验细节和结果描述于实例 6 中。

[0056] 图 10 显示了用 R347 对照处理(参见图 10 左侧的顶部和底部照片)或用 2A3hu 处理(参见图 10 右侧的顶部和底部照片)的小鼠中肺部组织学的代表性照片。实验细节和结果描述于实例 6 中。

[0057] 图 11 图形展示了在此所述的抗 AT (金黄色葡萄球菌 α 毒素) mAb 不抑制天然 α 毒素(nAT) 结合至存在于兔红细胞血影上的受体。实验细节和结果描述于实例 8 中。

[0058] 图 12 是展示被在此所述的抗体抑制七聚体形成的代表性 western 印迹。实验细节和结果描述于实例 8 中。

[0059] 图 13A 和 13B 展示了证实被在此所述的抗 AT mAb 抑制寡聚化的代表性 western 印迹, 并且进一步展示了该抑制可以被消除(titrated)。实验细节和结果描述于实例 8 中。

[0060] 图 14-16 图形展示了在细胞溶解抑制试验中全人抗 AT 抗体的效力。全人型式的抗 AT IgG 抗体展现了类似于相应的嵌合抗 AT IgG 抗体的效力。将全人 IgG 抗体与嵌合 IgG 抗体在兔 RBC (红细胞) 溶解(图 14)、A549 细胞溶解(图 15) 和 THP-1 细胞溶解(图 16) 中的抑制活性进行比较。实验细节和结果描述于实例 9 中。

[0061] 图 17A 和 17B 图形展示了在皮肤坏死模型中在用抑制性抗金黄色葡萄球菌 α 毒素 mAb QD20、QD37、LC10、QD33、2A3 和对照 R347 被动免疫之后随着感染时程的推移的病灶大小的减少。将 5 只 BALB/c 小鼠的组用所示的 1mg/kg (图 17A) 和 0.5mg/kg (图 17B) 的抑制性 mAb 进行被动免疫, 并且然后用金黄色葡萄球菌 Wood 感染并且监测病灶大小持续 6 天。

[0062] 图 18 图形展示了在肺炎模型中用 mAb QD20、QD37、LC10、QD33、2A3 和对照 R347 被动免疫的小鼠的存活。将小鼠在用金黄色葡萄球菌 USA300 (约 2×10^8 cfu) 感染之前 24 小时用 5mg/kg 纯化 mAb 被动免疫。

[0063] 图 19 图形描绘了 LC10YTE 结合至 α 毒素和 LukF-PV 的 ELISA 表征。将含有 His- 标

签的 α 毒素或 LukF-PV 的细菌溶解产物包被在 96 孔的表面上。将 LC10YTE 或小鼠抗 His mAb 添加至包被的孔中,并且孵育 1h。如由抗 His mAb 的结合信号所示, α 毒素和 LukF-PV 的表达水平是相似的,同时 LC10YTE 仅显著地结合至 α 毒素而不是 LukF-PV。

[0064] 图 20 显示了 α 毒素和 LukF-PV 蛋白的序列比对。 α 毒素与 LukF-PV(UniProtKB/TrEMBL 登录号 B1Q018)共享 25% 的氨基酸序列一致性。氨基酸编号是基于成熟蛋白质。使用 Clustal W 的方法进行比对。通过加下划线突出显示区段 aa248-277。

[0065] 图 21 描绘了 α 毒素结构的卡通表示。A) α 毒素的可溶性单体的模型化结构的卡通表示。 α 毒素的模型化单体结构是使用 LukF-PV 的晶体结构作为模板用 Maestro9.1 (薛定谔(Schrodinger)公司)来构建的(蛋白质数据库(ProteinData Bank)入口 1PVL)(佩德拉克(Pedelacq), Maveyraud 等人 1999)。B) 来自六聚体的 α 毒素原聚体(protomer)的晶体结构的卡通表示(蛋白质数据库入口 7AHL)(宋(Song),霍鲍(Hobaugh)等人 1996)。aa101-110 示为蓝色, aa224-231 为橙色,并且 aa248-277 为红色。

[0066] 图 22 是 LC10YTE Fab- α 毒素复合体的带状图。 α 毒素分子是由该带状图的顶部部分中的带指示的。重链是由该带状图的底部部分中的黑色带指示的,并且轻链是由该带状图的底部部分中的浅色带指示的。

[0067] 图 23 是 α 毒素分子的七聚体和单体状态的卡通表示。a. 在宿主细胞的表面上产生孔的蘑菇状的 α 毒素分子七聚体组装物。灰色和黑色区域相应于遮蔽在模型中的 LC10YTE 接触残基。在遮蔽位置中存在的接触残基是阻止七聚体形成的一致的 LC10。b. 在孔形成之前(淡灰色)和之后(深灰色)的 α 毒素分子的重叠结构。

[0068] 图 24 图形表示了 LC10 在鼠的皮肤坏死模型中的治疗功效。将 5 只 Balb/C 小鼠的组用 15mg/kg LC10 或 R347 被动免疫,将 Balb/C 小鼠用 2×10^8 个金黄色葡萄球菌 Wood 进行鼻内感染。感染后 (A) 1 小时、(B) 3 小时或 (C) 6 小时,然后将小鼠用 5mg/kg、15mg/kg 或 45mg/kg LC10 进行治疗,并且监测病灶大小持续 6 天。5 只在细菌激发之前 24 小时被给予 15mg/kg LC10 或 R347 的组被包括为对照。

[0069] 图 25 图形表示了 LC10 在小鼠肺炎模型中的治疗功效。将 10 只 C57BL/6 小鼠的组用 15mg/kg LC10 或 R347 被动免疫,24 小时后用 2×10^8 个金黄色葡萄球菌 USA300 进行鼻内激发。将 10 只 C57BL/6 小鼠的组用 2×10^8 个金黄色葡萄球菌 USA300 进行鼻内感染。感染后 (A) 1 小时, (B) 3 小时或 (C) 6 小时,然后将小鼠用 5mg/kg、15mg/kg 或 45mg/kg LC10 治疗,并且监测存活持续 7 天。10 只在细菌激发之前 24 小时被给予 15mg/kg LC10 或 R347 的组被包括为对照。

[0070] 图 26 图形表示了 LC10 在小鼠肺炎模型中的治疗功效。将 10 只 C57BL/6 小鼠的组用 2×10^8 个金黄色葡萄球菌 USA300 进行皮内感染。感染后一小时,以 (A) 15mg/kg (B) 45mg/kg 给予动物 LC-10 的单次腹膜内注射。动物的同期组群在感染后 1h 接受皮下万古霉素(VAN)。以一天两次间隔 12 小时(BID q12)给予另外的 VAN 治疗,持续总共 6 次治疗。在感染后 1h,将 10 只小鼠的对照组用 15mg/kg R347 治疗。监测存活持续 7 天。

[0071] 图 27 是协同作用的等效线图解法分析的图形显示,其中 $N > 1$:拮抗作用, $N = 1$:加性效应, $N < 1$:协同作用。

[0072] 详细说明

[0073] 在此提供了结合至金黄色葡萄球菌 α 毒素的包括人、人源化和/或嵌合形式的抗

体以及其片段、衍生物 / 偶联物和组合物。此类抗体对于检测和 / 或可视化 α 毒素可以是有用的,并且因此在试验和诊断方法中可以是有用的。在此所述的抗体还干扰 α 毒素七聚体形成,由此抑制活性成孔复合体的形成,并且因此对于治疗和预防方法可以是有用的。

[0074] 金黄色葡萄球菌是普遍存在的病原体,并且有时是其严重性范围为从轻微到致命的多种病症的致病因子。金黄色葡萄球菌产生大量的胞外蛋白和细胞相关蛋白,它们中的许多涉及发病,例如 α 毒素、 β 毒素、 γ 毒素、 δ 毒素、杀白细胞素、中毒性休克综合征毒素(TSST)、肠毒素类、凝固酶、蛋白A、纤维蛋白原、纤连蛋白结合蛋白等等。 α 毒素(例如由 hla 基因编码)是金黄色葡萄球菌的毒力因子之一,并且是由大多数病原性金黄色葡萄球菌菌株产生的。

[0075] 金黄色葡萄球菌感染相对难以治疗,并且在抗生素治疗之后可能发生侵袭性疾病和复发。另外,在医院环境(例如 HA-MRSA 或与医疗保健相关的)和非医院环境(例如 CA-MRSA 或与社区相关的)中,耐甲氧西林金黄色葡萄球菌菌株已经变得更普遍,进一步使得金黄色葡萄球菌感染的治疗复杂化。在许多情况下,耐甲氧西林金黄色葡萄球菌菌株还对一种或多种其他抗生素有抗性,包括氨基糖苷类、四环素、氯霉素、大环内酯类以及林可酰胺类抗生素。

[0076] α 毒素是一种成孔毒素并且在人类以及动物中具有溶解细胞、溶血、皮肤坏死以及致死活性。葡萄球菌 α 毒素被分泌为具有 293 个氨基酸的水溶性单链多肽,为大致 34 千道尔顿(kDa)。不受到理论的限制,人们认为存在着 α 毒素 / 靶标细胞相互作用的两种方法;(i) α 毒素结合至在人血小板、单核细胞、内皮细胞、白细胞、肺泡细胞、巨噬细胞、角质化细胞、成纤维细胞、兔红细胞、以及其他细胞的细胞表面上的特异性的高亲和力受体(ADAM10)(参见例如 Wilke (威尔克)等人, Proc. Natl. Acad. Sci. (美国国家科学院院刊) 107:13473-13478(2010)),或者(ii) α 毒素通过吸附至脂双层非特异性地相互作用。在毒素 / 细胞相互作用的任一模式中,七个 α 毒素单体分子寡聚化以形成 1-2nm 直径的七聚体跨膜通道。随后钾和核苷酸的流出以及钠和钙的流入导致渗透性溶解和 / 或多重继发性作用,包括类二十烷酸产生、分泌过程、收缩功能障碍、细胞凋亡以及细胞因子的释放。人们认为由 α 毒素引起的细胞活性的破坏和细胞溶解促成了与金黄色葡萄球菌感染相关的病症和疾病。

[0077] 由金黄色葡萄球菌感染引起的一些常见病症的非限制性实例包括烧伤、蜂窝织炎、皮肤坏死、眼睑感染、食物中毒、关节感染、肺炎、皮肤感染、手术伤口感染、烫伤样皮肤综合征以及中毒性休克综合征。另外,它是在异物感染中常见的病原体,例如血管内的线(intravascular line)、起搏器、人工心脏瓣膜以及关节植入物。由金黄色葡萄球菌感染引起的一些病症或疾病进一步描述于下文。以下描述的一些或所有的病症和疾病可以涉及作为感染组分或者病症或疾病状态的介质的 α 毒素的直接作用,或者一些或所有的病症可以涉及 α 毒素的间接或继发性作用(例如,原发性毒力因子导致与病症相关的主要症状或大多数症状,而 α 毒素通过它对细胞功能的破坏和细胞溶解活性起着进一步推进疾病的作用)。

[0078] 烧伤

[0079] 烧伤伤口常常最初是无菌的。然而,中度和重度烧伤通常损害针对感染的物理和免疫屏障(例如,皮肤的发泡、开裂或剥离),导致流体和电解质类的丢失,并且引起局部或

全身性生理功能障碍。受损皮肤与活细菌接触有时可以导致在损伤部位的混合定殖。感染可以被限制到烧伤表面上的无活力的碎片(“焦痂”),或者定殖可以进展为全皮肤感染并且侵袭焦痂下的有活力的组织。更严重的感染可以到达皮肤下,进入淋巴系统和/或血液循环,并且发展为败血症。典型地,在定殖烧伤伤口感染处的病原体中发现金黄色葡萄球菌。金黄色葡萄球菌可以破坏肉芽组织并且产生严重的败血症。

[0080] 皮肤和软组织感染

[0081] 蜂窝织炎

[0082] 蜂窝织炎是皮肤的急性感染,常常开始于可以在皮肤层下蔓延的表面感染。蜂窝织炎最常见地是由金黄色葡萄球菌结合化脓性链球菌的混合感染引起。蜂窝织炎可以导致全身感染。蜂窝织炎有时是协同性细菌性坏疽的一个方面。协同性细菌性坏疽典型地是由金黄色葡萄球菌和微需氧链球菌的混合物引起的。协同性细菌性坏疽引起坏死,并且治疗被限制为坏死组织的切除。病症常常是致命的。

[0083] 皮肤坏死

[0084] 皮肤坏死是皮肤和皮下组织的感染,容易跨越皮下组织内的筋膜面(fascial plane)蔓延。该病症引起皮肤的顶层和/或底层变得坏死,并且可以蔓延至在下面的组织和周围组织。

[0085] 坏死性筋膜炎

[0086] 坏死性筋膜炎被称为“食肉病”或“食肉细菌综合征”。坏死性筋膜炎可以由多种微生物感染引起(例如,I型,由混合细菌感染引起)或由单微生物感染引起(例如,II型,由细菌的单个病原菌株引起)。许多类型的细菌可以引起坏死性筋膜炎,这些细菌的非限制性实例包括A群链球菌(例如化脓性链球菌)、金黄色葡萄球菌、创伤弧菌、产气荚膜梭菌、以及脆弱拟杆菌。具有抑制的或受损的免疫系统的个体更可能遭受皮肤坏死(例如,坏死性筋膜炎)。

[0087] 历史上,A群链球菌被诊断为II型皮肤坏死感染的大多数病例的原因。然而,自2001年以来,已经观察到耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)作为单微生物坏死性筋膜炎的原因具有增加的频率。感染局部地(有时在创伤部位)开始,可以是严重的(例如由于手术)、轻微的、或甚至不明显的。患者常常主诉剧烈的疼痛,这种疼痛相对于特定的皮肤外观可能是过度的。随着疾病的进展,组织常常在数小时内变得肿胀。腹泻和呕吐也是常见症状。

[0088] 如果细菌在组织深处,炎症的体征在感染早期可能不明显。如果细菌不在深处,炎症的体征例如发红和肿胀的或皮肤灼热非常快速地显示出来。皮肤颜色可以进展为紫色,并且可以形成水疱,伴随皮下组织的随后的坏死(例如,死亡)。具有坏死性筋膜炎的患者典型地会发热并且看起来病得很重。如果不治疗,已经记录了高达73%的死亡率。在没有适合的医疗救助的情况下,感染进展快速并且最终导致死亡。

[0089] 肺炎

[0090] 金黄色葡萄球菌还已经被诊断为葡萄球菌肺炎的原因。葡萄球菌肺炎导致肺部的炎症和肿胀,进而引起液体聚集在肺中。聚集在肺中的液体可以阻止氧气进入血流。患有流行性感冒的那些人具有发生细菌性肺炎的风险。在已经遭受流行性感冒的那些人中,金黄色葡萄球菌是细菌性肺炎的最常见的原因。葡萄球菌肺炎的常见症状包括咳嗽、呼吸困

难以及发热。另外的症状包括疲劳、黄色或带血粘液、以及随着呼吸恶化的胸痛。耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)逐渐被诊断为在葡萄球菌肺炎中鉴定的菌株。

[0091] 手术伤口感染

[0092] 手术伤口常常深深地穿入身体。因此如果伤口变得被感染,此类伤口的感染对患者造成重大风险。金黄色葡萄球菌时往往是手术伤口中的感染的致病因子。金黄色葡萄球菌非常善于侵入手术伤口,缝合伤口可以被引起正常皮肤感染少得多的金黄色葡萄球菌细胞感染。侵入手术伤口可以导致严重的金黄色葡萄球菌败血症。由金黄色葡萄球菌侵入血流的侵袭可以导致内部器官(特别是心脏瓣膜和骨)的种植(seeding)和感染,引起全身性疾病,例如心内膜炎和骨髓炎。

[0093] 烫伤样皮肤综合征

[0094] 如果不是致病因子的话,金黄色葡萄球菌可能是“烫伤样皮肤综合征”(还被称为“葡萄球菌性烫伤样皮肤综合征”)、“中毒性皮肤坏死”、“局限性大疱性脓疱病”、“里特病(Ritter's disease)”以及“莱尔病(Lyell's disease)”的主要致病因子。烫伤样皮肤综合征频繁发生于大龄儿童中,典型地发生于由产生表皮松解外毒素(例如,表皮剥脱毒素A和B,有时被称为烫伤样皮肤综合征毒素)的金黄色葡萄球菌菌株的繁盛(flowering)所导致的爆发中,这些表皮松解外毒素导致表皮层内的分离。外毒素之一是由细菌染色体编码的,并且另一种是由质粒编码的。外毒素是切割桥粒芯糖蛋白-1的蛋白酶,桥粒芯糖蛋白-1通常将皮肤的颗粒层和棘层(spinosum layer)保持在一起。

[0095] 细菌可以最初仅感染一个较小的病灶,然而,毒素破坏细胞间连接,蔓延表皮层,并且允许感染渗透皮肤外层,产生象征疾病的脱屑。皮肤外层的脱落通常暴露下面的正常皮肤,但是如果不进行适当治疗,在过程中的液体丢失可以在幼儿中产生严重的损伤。

[0096] 中毒性休克综合征

[0097] 中毒性休克综合征(TSS)是由产生所谓的“中毒性休克综合征毒素”的金黄色葡萄球菌菌株引起的。该疾病可以由金黄色葡萄球菌在任何部位的感染引起,但是常常错误地被认为仅仅是使用卫生棉的女性专有的疾病。该疾病涉及毒血症和败血症,并且可以是致命的。

[0098] 中毒性休克综合征的症状取决于基本病因而不同。由于细菌金黄色葡萄球菌的感染引起的TSS典型地另外表现在其他方面健康的具有高热的个体中,伴有低血压、不适以及意识错乱,可以快速进展至昏呆(stupor)、昏迷、以及多器官衰竭。常常在疾病的早期病程中见到的特征性皮疹类似于晒斑,并且可以累及身体的任何区域,包括嘴唇、嘴、眼睛、手掌以及脚底。在最初的感染猛攻(onslaught)中存活的患者中,在10-14天之后皮疹脱屑、或剥落。

[0099] 如上所指出的,由于金黄色葡萄球菌的耐多药菌株的增加,越来越多数目的常用于治疗金黄色葡萄球菌感染的抗生素不再控制或消除耐甲氧西林以及耐多药的金黄色葡萄球菌的感染。针对在此所述的金黄色葡萄球菌 α 毒素的抗体可以帮助降低感染的严重性,并且还可以辅助从感染宿主清除、防止(预防性地)或减少病原性金黄色葡萄球菌。

[0100] 抗体

[0101] 如在此使用的,术语“一种抗体”、“多种抗体”(还被称为“免疫球蛋白”)以及“抗原结合片段”包括单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、从至少两种不同的表位结

合片段形成的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)、人抗体、人源化抗体、骆驼科(camelid)抗体、嵌合抗体、单链 Fv(scFv)、单链抗体、单域抗体、域抗体、Fab 片段、F(ab')₂ 片段、展现所希望的生物活性的抗体片段(例如抗原结合部分)、二硫键连接的 Fv(dsFv)、以及抗独特型(anti-Id)抗体(包括例如针对在此提供的抗体的抗 Id 抗体)、细胞内抗体、以及任何上述各项的表位结合片段。具体而言,抗体包括免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性片段,即,含有至少一个抗原结合部位的分子。免疫球蛋白分子可以具有任何同种型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA 和 IgY)、亚同种型(例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2)或同种异型(例如,Gm,如 G1m(f、z、a 或 x)、G2m(n)、G3m(g、b、或 c),Am,Em,以及 Km(1、2 或 3))。抗体可以衍生自任何哺乳动物,包括但不限于人、猴子、猪、马、兔、狗、猫、小鼠、等等,或者其他动物,例如禽类(例如,鸡)。

[0102] 天然抗体通常是约 150,000 道尔顿的异四聚体糖蛋白,由两个相同的轻(L)链和两个相同的重(H)链组成。每条轻链通过一个共价二硫键与一条重链相连,而二硫键的数目在不同免疫球蛋白同种型的重链之间变化。每条重链和轻链还具有规律性间隔的链间二硫桥。每条重链在一端具有一个可变域(VH),之后跟随多个恒定域(CH)。每条轻链在一端具有一个可变域(VL)并且在另一端具有一个恒定域(CL)。轻链的恒定域与重链的第一恒定域对齐,并且轻链的可变域与重链的可变域对齐。基于轻链恒定区的氨基酸序列,轻链被分类为 λ 链或 κ 链。 κ 轻链的可变域在此还可以表示为 VK。

[0103] 在此提供的抗体包括全长或完整抗体、抗体片段、天然序列抗体或氨基酸变体,人的、人源化的、翻译后修饰的、嵌合的或融合的抗体、免疫偶联物、以及其功能性片段。抗体可以在 Fc 区中被修饰,并且某些修饰可以提供所希望的效应子功能或血清半衰期。

[0104] 具有本发明的抗 α 毒素抗体以及片段的一种或多种生物特征(例如效力, α 毒素亲和力、效应子功能、直系同源物结合亲和力、中和、 α 毒素七聚体形成的抑制、等等)的抗体也是期望的。抗 α 毒素抗体和片段可以用于诊断和 / 或治疗和 / 或减轻和 / 或预防如上所述的在哺乳动物中的与金黄色葡萄球菌相关的疾病的一种或多种症状。

[0105] 在此提供了一种含有抗 α 毒素抗体或片段以及载体的组合物。出于治疗金黄色葡萄球菌相关疾病的目的,可以将组合物给予对这种治疗有需要的患者,其中组合物可以包含一种或多种抗 α 毒素抗体和 / 或其片段。还提供了含有如在此呈现的抗 α 毒素抗体或其片段以及载体的制剂。在一些实施例中,该制剂是含有药学上可接受载体的预防性的或治疗性的制剂。

[0106] 在某些实施例中,这里提供的方法用于治疗在哺乳动物中的与金黄色葡萄球菌相关的和 / 或 α 毒素相关的疾病 / 病症和 / 或预防和 / 或减轻该疾病或病症的一种或多种症状,该方法包括将治疗有效量的抗 α 毒素抗体或片段给予至哺乳动物。可以如医师所指导进行短期(急性)或慢性的、或间歇性地给予抗体预防性或治疗性组合物。

[0107] 在某些实施例中,制造的物品(例如在无菌剂型和 / 或在试剂盒中)包含至少一种抗 α 毒素抗体或片段。含有抗 α 毒素抗体或片段的试剂盒可以发现例如用于金黄色葡萄球菌细胞杀伤测定、用于从细胞纯化或免疫沉淀 α 毒素的用途。例如,为了分离和纯化 α 毒素,试剂盒可以含有连接至珠粒的抗 α 毒素抗体或片段(例如,琼脂糖凝胶珠)。试剂盒可以含有用于在 ELISA 或 Western 印迹中体外检测和定量金黄色葡萄球菌和 / 或 α 毒素的抗体。对于检测有用的这样一种抗体可以提供有一种标记物,例如荧光或放射性标记。

[0108] 术语

[0109] 应当理解的是,在此提供的方法不限于特定的组合物或工艺步骤,因为这些可以变化。应当指出,如在本说明书和所附权利要求书中所使用的,单数形式“一种/个”(“a”, “an”)和“该”包括单数和复数指示物,除非在上下文中另有明确规定。

[0110] 特异性结合 α 毒素多肽(例如, α 毒素单体)的分离抗体、或其抗原结合片段在此是指单数形式的“抗 α 毒素抗体或片段”以及复数形式的“抗 α 毒素抗体或片段”。 α 毒素多肽有时称为 α 溶血素。 α 毒素在寡聚化为七聚体之后在细胞膜中形成孔,其中寡聚化的多肽有时统称为“ α 毒素孔”或“ α 毒素七聚体”。

[0111] 常常在此通过公知的三字母符号或通过 IUPAC-IUB 生物化学命名委员会推荐的单字母符号提及氨基酸。同样,常常通过普遍接受的单字母密码提及核苷酸。

[0112] 除非另外指明,在抗体的可变域、互补决定区(CDR)以及框架区(FR)中的氨基酸的编号遵循如在 Kabat (卡巴特) 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest (具有免疫学重要性的蛋白质的序列), Public Health Service, 5th Ed. (公共卫生署第五次编写), National Institutes of Health (国立卫生研究院), Bethesda (贝塞斯达), Maryland (马里兰州) (1991) 中提出的 Kabat 定义。使用这个编号系统,相应于可变域的 FR 或 CDR 的缩短、或插入,实际的线性氨基酸序列可以含有较少的或另外的氨基酸。例如,重链可变域可以包含在 H2 的残基 52 之后的单个氨基酸插入(根据 Kabat 的残基 52a)以及在重链 FR 残基 82 之后的插入残基(例如,根据 Kabat 的残基 82a、82b、和 82c,等等)。可以通过在抗体序列与“标准”Kabat 编号序列的同源区的比对而对给定的抗体确定残基的 Kabat 编号。框架残基的最大比对常常需要在编号系统中的有待用于 Fv 区的“间隔”残基插入。另外,由于种间或等位基因差异,在任何给定的 Kabat 位点编号处的某些个别残基的身份可以从抗体链到抗体链而不同。

[0113] 抗 α 毒素抗体以及片段

[0114] 在某些实施例中,抗 α 毒素抗体或片段是被分离和/或纯化和/或无热原的。在此使用的术语“纯化”是指已经从其天然环境的组分中鉴定和分离和/或回收的感兴趣分子。因此,在一些实施例中,提供的抗体是一种纯化的抗体,其中它已经从其天然环境的一种或多种组分分离。如在此使用的术语“分离抗体”是指基本上没有具有不同抗原特异性的其他抗体分子的抗体(例如,特异性结合至 α 毒素的分离抗体是基本上没有特异性结合不同于 α 毒素的抗原的抗体)。双或多特异性抗体分子是在基本上没有其他抗体分子时的分离抗体。因此,在一些实施例中,提供的抗体是分离抗体,其中它们已经从具有不同特异性的抗体分离。分离抗体可以是单克隆抗体。然而,特异性结合至金黄色葡萄球菌 α 毒素的同种型或变体的表位的分离抗体可以具有与例如来自其他物种(例如葡萄球菌种类同系物)的其他相关抗原的交叉反应性。如提供的分离抗体可以基本上没有一种或多种其他细胞材料。在一些实施例中,“分离的”单克隆抗体的组合被提供,并且涉及具有不同特异性并被组合在定义的组合物中的抗体。在此将更详细地描述抗 α 毒素抗体或片段的产生和纯化/分离的方法。

[0115] 呈现的分离抗体包括在此披露的抗体氨基酸序列,这些抗体氨基酸序列可以由任何适合的多核苷酸编码。分离抗体有时是以配制形式提供的。在一些实施例中,抗 α 毒素抗体或片段结合金黄色葡萄球菌 α 毒素并且由此部分或基本上改变 α 毒素的至少一种

生物活性,例如寡聚化为活性七聚体复合体。

[0116] 抗 α 毒素抗体或片段常常免疫特异性地结合至对 α 毒素蛋白、肽、亚基、片段、部分、寡聚体或其任何组合为特异的一种或多种表位,并且通常不特异性地结合至其他多肽。术语“寡聚体”或“ α 毒素寡聚体”是指形成功能性孔(例如 7 个 α 毒素单体)的 α 毒素单体(例如,2 个单体、3 个单体、4 个单体、5 个单体、6 个单体或 7 个单体)的结合。表位可以包括含有 α 毒素蛋白的至少一部分的至少一个抗体结合区。如在此使用的术语“表位”是指能够结合至抗体的蛋白质决定簇。表位通常包括诸如氨基酸和 / 或糖侧链的分子的化学活性表面基团,并且通常具有特定的三维结构特征、以及特定的化学特征(例如电荷、极性、碱性、酸性、疏水性等等)。构象和非构象表位的区别在于:在变性溶剂的存在下,与前者(而不是后者)的结合消失。在一些实施例中,识别的表位干扰活性七聚体的形成(例如,抑制 α 毒素单体寡聚化为活性七聚体复合体)。

[0117] 在某些实施例中,表位是由涉及 α 毒素七聚体复合体形成的 α 毒素蛋白的至少一部分组成的。指定的表位可以包括 α 毒素蛋白的连续氨基酸的至少 3 个氨基酸残基乃至整个指定部分中的至少一个氨基酸序列的任何组合。在一些实施例中,表位是 α 毒素蛋白的连续氨基酸中的至少 4 个氨基酸残基、至少 5 个氨基酸残基、至少 6 个氨基酸残基、至少 7 个氨基酸残基、至少 8 个氨基酸残基、至少 9 个氨基酸残基、至少 10 个氨基酸残基、至少 11 个氨基酸残基、至少 12 个氨基酸残基、至少 13 个氨基酸残基、至少 14 个氨基酸残基、或至少 15 个氨基酸残基乃至整个指定部分。在某些其他实施例中,表位包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15 个连续或非连续氨基酸残基。在另外的实施例中,包含在表位之内的氨基酸残基涉及 α 毒素七聚体复合体形成。在某些实施例中,接触残基包括 T261、T263、N264、K266 和 K271。在其他实施例中,接触残基包括 SEQ ID NO:39 的 N177、W179、G180、P181、Y182、D183、D185、S186、W187、N188、P189、V190、Y191 和 R200。在另外的实施例中,接触残基包括 SEQ ID NO:39 的 N177、W179、G180、P181、Y182、D183、D185、S186、W187、N188、P189、V190、Y191、R200、T261、T263、N264、K266 和 K271。在某些实施例中,与抗体或其抗原结合片段接触的 α 毒素部分包括 SEQ ID NO:39 的氨基酸 261-272。在其他实施例中,与抗体或其抗原结合片段接触的 α 毒素部分包括 SEQ ID NO:39 的氨基酸 248-277。在其他实施例中,与抗体或其抗原结合片段接触的 α 毒素部分包括 SEQ ID NO:39 的氨基酸 173-201 以及 261-272。

[0118] 因此,在具体实施例中,分离 / 纯化的抗 α 毒素抗体和片段免疫特异性地结合至包含根据 SEQ ID NO:39 的氨基酸序列的分子和 / 或包含根据 SEQ ID NO:40 的氨基酸序列的分子。在某些实施例中,抗 α 毒素抗体和片段还结合来自不同物种的 α 毒素同系物或直系同源物,或者结合至 SEQ ID NO:39 的氨基酸序列的变体,其中在位置 35 处的组氨酸被亮氨酸替换或被相应于本领域的普通技术人员已知的 H35 突变的其他氨基酸替换。

[0119] 可变区

[0120] 在某些实施例中,抗 α 毒素抗体或片段是从亲本抗体制备的。在一些实施例中,抗 α 毒素抗体或片段包含在亲本抗体中。如在此使用的,术语“亲本抗体”是指由用于制备在此定义的变体或衍生物的氨基酸序列编码的抗体。亲本多肽可以包含天然抗体序列(即,天然存在的,包括天然存在的等位基因变体)或天然存在序列的具有事先存在的氨基酸序列修饰(例如其他插入、缺失和 / 或置换)的抗体序列。亲本抗体可以是人源化抗体或人抗

体。在具体实施例中,抗 α 毒素抗体和片段是亲本抗体的变体。如在此使用的,术语“变体”是指借助在亲本抗体序列中添加、缺失和/或置换一个或多个氨基酸残基而在氨基酸序列上不同于“亲本”抗 α 毒素抗体或片段氨基酸序列的抗 α 毒素抗体或片段。

[0121] 抗体的抗原结合部分包含保留特异性结合至抗原(例如 α 毒素)能力的抗体一个或多个片段。已经显示抗体的抗原结合功能可以由全长抗体的片段完成。包含在术语抗体“抗原结合部分”之内的结合片段的实例包括 (i) Fab 片段,由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的单价片段;(ii) F(ab')₂ 片段,包含在铰链区由二硫桥连接的两个 Fab 片段的二价片段;(iii) Fd 片段,由 VH 和 CH1 结构域组成;(iv) Fv 片段,由抗体的单臂的 Fv 片段 VL 和 VH 结构域组成,(v) dAb 片段,由 VH 结构域组成;以及 (vi) 分离的互补决定区(CDR)。虽然 Fv 片段的两个结构域 VL 和 VH 常常由分离的基因编码,可以使用重组方法通过使它们能够被制造为单一蛋白质链的合成接头而将它们结合,该单一蛋白质链中的 VL 和 VH 区配对以形成单价分子(称为单链 Fv (scFv))。此类单链抗体还被包含在术语“抗体”和抗体的“抗原结合部分”之内。可以使用已知的技术获得这些抗体片段,并且这些片段能以与完整抗体相同的方式筛选其结合活性。可以通过重组 DNA 技术或通过完整免疫球蛋白的酶裂解或化学裂解而产生抗原结合部分。

[0122] 本发明的抗 α 毒素抗体和片段包含至少一个抗原结合域。在一些实施例中,抗 α 毒素抗体或片段包括含有 SEQ ID NO:20、22、24、26、28、41、43、45、47、49、51、53、55、57、79、59、61、或 62 的氨基酸序列的 VH。在某些实施例中,抗 α 毒素抗体或片段包括含有 SEQ ID NO:19、21、23、25、27、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60 或 63 的氨基酸序列的 VL。在又一个实施例中,抗 α 毒素抗体或片段包括含有 SEQ ID NO:20、22、24、26、28、41、43、45、47、49、51、53、55、57、79、59、61、或 62 的氨基酸序列的 VH 以及含有 SEQ ID NO:19、21、23、25、27、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60 或 63 的氨基酸序列的 VL。参见实例 11,表 7 表示如在此呈现的 VH 和 VL 序列,这些 VH 和 VL 序列能以形成抗 α 毒素抗体或片段的任何组合存在,或者以形成本发明的 mAb 的一种组合存在。在一些实施例中,VH 选自 SEQ ID NO:20、22、24、26、28、41、43、45、47、49、51、53、55、57、79、59、61、或 62。在不同的实施例中,VL 选自 SEQ ID NO:19、21、23、25、27、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60 或 63。某些 VH 和 VL 核苷酸序列呈现于实例 11、表 8 中。

[0123] 在一些实施例中,分离抗体或其抗原结合片段包含 VH 和 VL,其中该 VH 和 VL 具有由 SEQ ID NO:20 和 19;SEQ ID NO:22 和 21;SEQ ID NO:24 和 23;SEQ ID NO:26 和 25;SEQ ID NO:28 和 27;SEQ ID NO:41 和 42;SEQ ID NO:43 和 44;SEQ ID NO:45 和 46;SEQ ID NO:47 和 48;SEQ ID NO:47 和 48;SEQ ID NO:49 和 50;SEQ ID NO:51 和 52;SEQ ID NO:51 和 52;SEQ ID NO:53 和 54;SEQ ID NO:55 和 56;SEQ ID NO:57 和 58;SEQ ID NO:59 和 60;SEQ ID NO:61 和 58;SEQ ID NO:62 和 58;SEQ ID NO:62 和 63;SEQ ID NO:79 和 63 表示的氨基酸序列。

[0124] 实例 11 的表 1-7 提供了用于在此呈现的抗体和片段的某些实施例的重链可变区(VH)、轻链可变区(VL)、以及互补决定区(CDR)。在某些实施例中,抗 α 毒素抗体和片段包括具有与披露于表 7 中的 VH 和/或 VL 序列的至少一者的给定百分比一致性的 VH 和/或 VL。如在此使用的,术语“序列一致性百分比(%)”(也包括“同源性”)被定义为在比对序列和(如果需要的话)引入空位(以便获得最大的百分比序列一致性)并且不将任何保守性置

换考虑为序列一致性的部分之后,在候选序列中的氨基酸残基或核苷酸与在参考序列(例如亲本抗体序列)中的氨基酸残基或核苷酸一致的百分比。除了手动外,可以借助于本领域已知的局部同源性算法或借助于使用这些算法的计算机程序(威斯康星州,麦迪逊市,科学驱动路 575 号(575 Science Drive),遗传学计算机集团(Genetics Computer Group)的威斯康星遗传学软件包(Wisconsin Genetics Software Package)中的 GAP、BESTFIT、FASTA、BLAST P、BLAST N 以及 TFasta)而产生用于比较的序列的最优比对。

[0125] 在一些实施例中,抗 α 毒素抗体或片段包含这样一种 VH 氨基酸序列,该 VH 氨基酸序列包含与 SEQ ID NO:20、22、24、26、28、41、43、45、47、49、51、53、55、57、79、59、61、或 62 的氨基酸序列至少 65%、70%、75%、80%、85%、90%、95% 的一致性,或包含与其 100% 的一致性。在一些实施例中,抗 α 毒素抗体或片段包含这样一种 VH 氨基酸序列,该 VH 氨基酸序列与 SEQ ID NO:20、22、24、26、28、41、43、45、47、49、51、53、55、57、79、59、61、或 62 的氨基酸序列至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 一致,或 100% 一致。在某些实施例中,抗 α 毒素抗体或片段包含 SEQ ID NO:20、22、24、26、28、41、43、45、47、49、51、53、55、57、79、59、61、或 62 的氨基酸序列中的 1-10 个保守性置换。在某些实施例中,包含具有与 SEQ ID NO:20、22、24、26、28、41、43、45、47、49、51、53、55、57、79、59、61、或 62 的给定百分比一致性的 VH 氨基酸序列的抗 α 毒素抗体或片段具有一种或多种选自下组的特征(以下更详细描述),该组由以下各项组成:

[0126] (a) 对于 α 毒素大约 13nM 或更小的亲和常数(K_D);

[0127] (b) 结合至 α 毒素单体,但不抑制 α 毒素结合至 α 毒素受体;

[0128] (c) 以至少 50%、60%、70%、80%、90% 或 95% 抑制 α 毒素寡聚体的形成;

[0129] (d) 以至少 50%、60%、70%、80%、90% 或 95% 降低 α 毒素的细胞溶解活性(例如,如通过细胞溶解和溶血试验所确定);

[0130] (e) 减少细胞浸润和促炎细胞因子释放(例如,在一种动物肺炎模型中)。

[0131] 在一些实施例中,分离抗体或其抗原结合片段以由解离常数(K_D)表征的亲和力而结合抗原(例如 α 毒素),该解离常数在大约 0.01nM 至大约 50nM、0.05nM、0.1nM、0.5nM、1nM、5nM、10nM、20nM、30nM、或 40nM 的范围内。

[0132] 在某些实施例中,抗 α 毒素抗体或片段包含这样一种 VL 氨基酸序列,该 VL 氨基酸序列与 SEQ ID NO:19、21、23、25、27、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60 或 63 的氨基酸序列至少 65%、70%、75%、80%、85%、90%、95% 一致,或 100% 一致。在一些实施例中,抗 α 毒素抗体或片段包含这样一种 VL 氨基酸序列,该 VL 氨基酸序列与 SEQ ID NO:19、21、23、25、27、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60 或 63 的氨基酸序列至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 一致,或 100% 一致。在不同的实施例中,抗 α 毒素抗体或片段包含在 SEQ ID NO:19、21、23、25、27、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60 或 63 的氨基酸序列中的 1-10 个保守性置换。在某些实施例中,包含具有与 SEQ ID NO:19、21、23、25、27、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60 或 63 的给定百分比一致性的 VL 氨基酸序列的抗 α 毒素抗体或片段具有一种或多种选自下组的特征(以下更详细描述),该组由以下各项组成:

[0133] (a) 对于 α 毒素大约 13nM 或更小的亲和常数(K_D);

[0134] (b) 结合至 α 毒素单体,但不抑制 α 毒素结合至 α 毒素受体;

[0135] (c) 以至少 50%、60%、70%、80%、90% 或 95% 抑制 α 毒素寡聚体的形成;

[0136] (d) 以至少 50%、60%、70%、80%、90% 或 95% 降低 α 毒素的细胞溶解活性(例如,如通过细胞溶解和溶血试验所确定);

[0137] (e) 减少细胞浸润和促炎细胞因子释放(例如,在一种动物肺炎模型中)。

[0138] 在一些实施例中,分离抗体或其抗原结合片段以由解离常数(K_D)表征的亲合力而结合抗原(例如 α 毒素),该解离常数在大约 0.01nM 至大约 50nM、0.05nM、0.1nM、0.5nM、1nM、5nM、10nM、20nM、30nM、或 40nM 的范围内。

[0139] 在具体实施例中,抗体或抗体片段免疫特异性地结合至 α 毒素,并且包含重链可变域,该重链可变域包括与 SEQ ID NO:20、22、24、26、28、41、43、45、47、49、51、53、55、57、79、59、61、或 62 的氨基酸序列至少 90% 的一致性,并且包含轻链可变域,该轻链可变域具有与 SEQ ID NO:19、21、23、25、27、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60 或 63 的氨基酸序列至少 90% 的一致性,其中抗体具有抑制一种或多种 α 毒素毒素单体彼此结合的活性(例如,抑制寡聚化)。

[0140] 互补决定区

[0141] 当可变域(VH 和 VL)包含抗原结合区时,变异性不是通过抗体的可变域均匀分布的。它被集中在轻链(VL 或 VK)和重链(VH)可变域两者中的称为互补决定区(CDR)的区段中。可变域的更高保守性的部分称为框架区(FR)。天然重链和轻链的可变域各自包含由三个 CDR 连接的四个 FR,这四个 FR 大体上采用 β 片层构型,这三个 CDR 形成连接 β 片层结构的环并且在一些情况下形成 β 片层结构的部分。在每个链中的 CDR 由 FR 紧密靠近地保持在一起,与来自另一条链的 CDR 促成了抗体的抗原结合部位的形成(参见 Kabat (卡巴特)等人,上文)。重链的三个 CDR 被指定为 VH-CDR1、VH-CDR2、和 VH-CDR3,而轻链的三个 CDR 被指定为 VL-CDR1、VL-CDR2、和 VL-CDR3。在此使用 Kabat 编号系统。像这样,VH-CDR1 大致开始于氨基酸 31 (即,在第一个半胱氨酸残基之后大致 9 个残基处),包括大致 5-7 个氨基酸,并且结束于下一个丝氨酸残基。VH-CDR2 开始于在 CDR-H1 末端之后的第十五残基,包括大致 16-19 个氨基酸,并且结束于下一个甘氨酸残基。VH-CDR3 开始于在 VH-CDR2 末端之后的大致第三十个氨基酸残基处;包括大致 13-15 个氨基酸;并且结束于序列 M-D-V。VL-CDR1 大致在残基 24 处开始(即,在半胱氨酸残基之后);包括大致 10-15 个残基;并且结束于序列 Y-V-S。VL-CDR2 开始于在 VL-CDR1 末端之后大致第十六个残基处,并且包括大致 7 个残基。VL-CDR3 开始于在 VH-CDR2 末端之后的大致第三十三个残基处;包括大致 7-11 个残基并且结束于序列 T-I-L。注意 CDR 从抗体到抗体相当不同(并且通过限定将不展现与 Kabat 共有序列的同源性)。

[0142] 本发明的抗 α 毒素抗体和片段包含至少一个抗原结合域,该抗原结合域包含至少一个互补决定区(CDR1、CDR2 或 CDR3)。在一些实施例中,抗 α 毒素抗体或片段包括含有至少一个 VH CDR (例如,CDR-H1、CDR-H2 或 CDR-H3) 的 VH。在某些实施例中,抗 α 毒素抗体或片段包括含有至少一个 VL CDR (例如,CDR-L1、CDR-L2 或 CDR-L3) 的 VL。

[0143] 在一些实施例中,免疫特异性地结合至金黄色葡萄球菌 α 毒素多肽的分离抗体或其抗原结合片段包含:(a) VH CDR1,该 VH CDR1 包含与 SEQ ID NO:7、10、13 或 69 一致的氨基酸序列或相对于它们包含 1、2、或 3 个氨基酸残基置换;(b) VH CDR2,该 VH CDR2 包含与 SEQ ID NO:8、11、14、17、70 或 75 一致的氨基酸序列或相对于它们包含 1、2、或 3 个氨基酸残基置换;以及 (c) VH CDR3,该 VH CDR3 包含与 SEQ ID NO:9、12、15、18、16、65、66、67、71、

72、76 或 78 一致的氨基酸序列或相对于它们包含 1、2、或 3 个氨基酸残基置换。

[0144] 在具体实施例中,分离抗体或其抗原结合片段包含 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3,该 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3 在各自的 CDR 中包含与 SEQ ID NO:7、8 和 9;SEQ ID NO:10、11 和 12;SEQ ID NO:13、14 和 15;SEQ ID NO:7、17 和 18;SEQ ID NO:7、8 和 16;SEQ ID NO:7、8 和 65;SEQ ID NO:7、8 和 66;SEQ ID NO:7、8 和 67;SEQ ID NO:7、8 和 78;SEQ ID NO:69、70 和 71;SEQ ID NO:7、8 和 72;SEQ ID NO:69、75 和 71;SEQ ID NO:69、75 和 76;或 SEQ ID NO:69、70 和 71 一致的氨基酸序列或相对于它们包含 1、2、或 3 个氨基酸残基置换。

[0145] 在一些实施例中,免疫特异性地结合至金黄色葡萄球菌 α 毒素多肽的分离抗体或其抗原结合片段包含:(a)VL CDR1,该 VL CDR1 包含与 SEQ ID NO:1 或 4 一致的氨基酸序列或相对于它们包含 1、2、或 3 个氨基酸残基置换;(b)VLC DR2,该 VL CDR2 包含与 SEQ ID NO:2、5、73 或 77 一致的氨基酸序列或相对于它们包含 1、2、或 3 个氨基酸残基置换;以及(c)VL CDR3,该 VL CDR3 包含与 SEQ ID NO:3、6、64、68 或 74 一致的氨基酸序列或相对于它们包含 1、2、或 3 个氨基酸残基置换。

[0146] 在具体实施例中,分离抗体或其抗原结合片段包含 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3,该 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3 在各自的 CDR 中包含与 SEQ ID NO:1、2 和 3;SEQ ID NO:4、5 和 6;SEQ ID NO:1、2 和 64;SEQ ID NO:1、2 和 68;SEQ ID NO:1、73 和 74;或 SEQ ID NO:1、77 和 74 一致的氨基酸序列或相对于它们包含 1、2、或 3 个氨基酸残基置换。

[0147] 在一些实施例中,免疫特异性地结合至金黄色葡萄球菌 α 毒素多肽的分离抗体或其抗原结合片段包含 VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VLC DR2 和 VL CDR3,在各自的 CDR 中包含与以下各项一致的氨基酸序列或相对于它们包含 1、2、或 3 个氨基酸残基置换:(a)VH CDR1,该 VH CDR1 包含 SEQ ID NO:7、10、13 或 69 的氨基酸序列;(b)VH CDR2,该 VH CDR2 包含 SEQ ID NO:8、11、14、17、70 或 75 的氨基酸序列;(c)VH CDR3,该 VH CDR3 包含 SEQ ID NO:9、12、15、18、16、65、66、67、71、72、76 或 78 的氨基酸序列;(d)VL CDR1,该 VL CDR1 包含 SEQ ID NO:1 或 4 的氨基酸序列;(e)VL CDR2,该 VL CDR2 包含 SEQ ID NO:2、5、73、或 77 的氨基酸序列;以及(f)VL CDR3,该 VL CDR3 包含 SEQ ID NO:3、6、64、68 或 74 的氨基酸序列。

[0148] 在具体实施例中,分离抗体或其抗原结合片段包含 VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2、以及 VL CDR3,在各自的 CDR 中包含与 SEQ ID NO:7、8、9、1、2 和 3;SEQ ID NO:10、11、12、1、2 和 3;SEQ ID NO:13、14、15、4、5 和 6;SEQ ID NO:7、17、18、1、2 和 3;SEQ ID NO:7、8、16、1、2 和 64;SEQ ID NO:7、8、65、1、2 和 64;SEQ ID NO:7、8、66、1、2 和 64;SEQ ID NO:7、8、67、1、2 和 68;SEQ ID NO:7、8、67、1、2 和 64;SEQ ID NO:7、8、78、1、2 和 64;SEQ ID NO:7、8、65、1、2 和 68;SEQ ID NO:69、70、71、1、2 和 68;SEQ ID NO:7、8、72、1、73 和 74;SEQ ID NO:69、75、71、1、2 和 68;SEQ ID NO:69、75、76、1、2 和 68;SEQ ID NO:69、75、76、1、77 和 74;SEQ ID NO:69、70、71、1、77 和 74 一致的氨基酸序列或相对于它们包含 1、2、或 3 个氨基酸残基置换。

[0149] 在一些实施例中,提供了一种含有分离抗体或其抗原结合片段的组合物,该分离抗体或其抗原结合片段(i)包括含有三个 CDR 的 VH 链结构域以及含有三个 CDR 的 VL 链结构域;并且(ii)免疫特异性地结合至金黄色葡萄球菌 α 毒素多肽,其中该 VH 链结构域的三个 CDR 包括(a)含有 SEQ ID NO:7、10、13 或 69 的氨基酸序列的 VH CDR1;(b)含有 SEQ

ID NO:8、11、14、17、70 或 75 的氨基酸序列的 VH CDR2 ;以及 (c) 含有 SEQ ID NO:9、12、15、18、16、65、66、67、71、72、76 或 78 的氨基酸序列的 VH CDR3。在具体实施例中, VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3 相应于 SEQ ID NO:7、8 和 9 ;SEQ ID NO:10、11 和 12 ;SEQ ID NO:13、14 和 15 ;SEQ ID NO:7、17 和 18 ;SEQ ID NO:7、8 和 16 ;SEQ ID NO:7、8 和 65 ;SEQ ID NO:7、8 和 66 ;SEQ ID NO:7、8、和 67 ;SEQ ID NO:7、8 和 78 ;SEQ ID NO:69、70 和 71 ;SEQ ID NO:7、8 和 72 ;SEQ ID NO:69、75 和 71 ;SEQ ID NO:69、75 和 76 ;或 SEQ ID NO:69、70 和 71。

[0150] 在某些实施例中还提供了含有一种分离抗体或其抗原结合片段的组合物,该分离抗体或其抗原结合片段 (i) 包括含有三个 CDR 的 VH 链结构域以及含有三个 CDR 的 VL 链结构域 ;并且 (ii) 免疫特异性地结合至金黄色葡萄球菌 α 毒素多肽,其中该 VL 链结构域的三个 CDR 包括 (a) 含有 SEQ ID NO:1 或 4 的氨基酸序列的 VL CDR1 ;(b) 含有 SEQ ID NO:2、5、73、或 77 的氨基酸序列的 VL CDR2 ;以及 (c) 含有 SEQ ID NO:3、6、64、68 或 74 的氨基酸序列的 VL CDR3。在具体实施例中,VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3 相应于 SEQ ID NO:1、2 和 3 ;SEQ ID NO:4、5 和 6 ;SEQ ID NO:1、2 和 64 ;SEQ ID NO:1、2 和 68 ;SEQ ID NO:1、73 和 74 ;或 SEQ ID NO:1、77 和 74。

[0151] 在某些实施例中,抗 α 毒素抗体或片段免疫特异性地结合金黄色葡萄球菌 α 毒素,并且包含 (a) VH CDR1,该 VH CDR1 包含与 SEQ ID NO:7、10、13 或 69 一致的氨基酸序列或相对于它们包含 1、2、或 3 个氨基酸残基置换 ;(b) VH CDR2,该 VH CDR2 包含与 SEQ ID NO:8、11、14、17、70 或 75 一致的氨基酸序列或相对于它们包含 1、2、或 3 个氨基酸残基置换 ;以及 (c) VH CDR3,该 VH CDR3 包含与 SEQ ID NO:9、12、15、18、16、65、66、67、71、72、76 或 78 一致的氨基酸序列或相对于它们包含 1、2、或 3 个氨基酸残基置换 ;(d) VL CDR1,该 VL CDR1 包含 SEQ ID NO:1 或 4 的氨基酸序列 ;(e) VL CDR2,该 VL CDR2 包含 SEQ ID NO:2、5、73、或 77 的氨基酸序列 ;以及 (f) VL CDR3,该 VL CDR3 包含 SEQ ID NO:3、6、64、68 或 74 的氨基酸序列,并且具有选自下组的一种或多种特征(以下更详细描述),该组由以下各项组成 : :

[0152] (a) 对于 α 毒素大约 13nM 或更小的亲和常数(K_D) ;

[0153] (b) 结合至 α 毒素单体,但不抑制 α 毒素结合至 α 毒素受体 ;

[0154] (c) 以至少 50%、60%、70%、80%、90% 或 95% 抑制 α 毒素寡聚体的形成 ;

[0155] (d) 以至少 50%、60%、70%、80%、90% 或 95% 降低 α 毒素的细胞溶解活性(例如,如通过细胞溶解和溶血试验所确定) ;

[0156] (e) 减少细胞浸润和促炎细胞因子释放(例如,在一种动物肺炎模型中)。

[0157] 在一些实施例中,分离抗体或其抗原结合片段以由解离常数(K_D) 表征的亲和力而结合抗原(例如 α 毒素),该解离常数在大约 0.01nM 至大约 50nM、0.05nM、0.1nM、0.5nM、1nM、5nM、10nM、20nM、30nM、或 40nM 的范围内。

[0158] 实例 11、表 1-7 提供了本发明抗体的 VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3 的序列。表 9 提供了 VH 和 VL CDR 的总结。这些区域能以各种组合而组合,因为每个 CDR 区可以被独立选择用于给定的抗体。表 7 展示了可以被选择用于每个区的不同序列。在某些实施例中,VL CDR3 序列能以任何组合存在,从而形成本发明的抗 α 毒素抗体或片段。在某些实施例中,如在表 9 中所描绘,VH CDR1 选自 SEQ ID NO:7、10、13 或 69,VH CDR2 选自 SEQ ID NO:8、11、14、17、70 或 75,并且 VH CDR3 选自 SEQ ID NO:9、12、15、18、16、65、66、67、71、72、76 或 78。在一些实施例中,如在表 9 中所描绘,VL CDR1 选自 SEQ ID

NO:1 或 4, VL CDR2 选自 SEQ ID NO:2、5、73、或 77, 并且 VL CDR3 选自 SEQ ID NO:3、6、64、68 或 74。

[0159] VH CDR3 和 VL CDR3 结构域在针对抗原的抗体结合特异性 / 亲和力中起作用。因此, 在一些实施例中, 抗 α 毒素抗体或片段或其抗原结合片段包含 VH CDR3, 该 VH CDR3 包含与 SEQ ID NO:9、12、15、18、16、65、66、67、71、72、76 或 78 一致的氨基酸序列或相对于它们包含 1、2、或 3 个氨基酸残基置换。在不同的实施例中, 抗 α 毒素抗体或片段包含 VL CDR3, 该 VL CDR3 包含与 SEQ ID NO:3、6、64、68 或 74 一致的氨基酸序列或相对于它们包含 1、2、或 3 个氨基酸残基置换。抗 α 毒素抗体和片段的剩余部分 (例如 CDR1、CDR2、VH、VL, 等等) 可以包含在此披露的特定序列或者已知序列, 前提是这些抗 α 毒素抗体和片段免疫特异性地结合至金黄色葡萄球菌 α 毒素。

[0160] 在一些实施例中, 分离抗体或其抗原结合片段免疫特异性地结合 α 毒素并且包含 VH CDR3, 该 VH CDR3 包含与 SEQ ID NO:9、12、15、18、16、65、66、67、71、72、76 或 78 一致的氨基酸序列或相对于它们包含 1、2、或 3 个氨基酸残基置换, 其中该抗体或抗原结合片段抑制 α 毒素寡聚化。

[0161] 在一些实施例中, 分离抗体或其抗原结合片段免疫特异性地结合 α 毒素并且包含 VL CDR3, 该 VL CDR3 包含与 SEQ ID NO:3、6、64、68 或 74 一致的氨基酸序列或相对于它们包含 1、2、或 3 个氨基酸残基置换, 其中该抗体或抗原结合片段抑制 α 毒素寡聚化。

[0162] 在一些实施例中, 分离抗体或其抗原结合片段免疫特异性地结合 α 毒素并且包含 VH CDR3, 该 VH CDR3 包含与 SEQ ID NO:9、12、15、18、16、65、66、67、71、72、76 或 78 一致的氨基酸序列或相对于它们包含 1、2、或 3 个氨基酸残基置换, 其中该抗体或抗原结合片段减少或抑制细胞因子的释放。

[0163] 在一些实施例中, 分离抗体或其抗原结合片段免疫特异性地结合 α 毒素并且包含 VL CDR3, 该 VL CDR3 包含与 SEQ ID NO:3、6、64、68 或 74 一致的氨基酸序列或相对于它们包含 1、2、或 3 个氨基酸残基置换, 其中该抗体或抗原结合片段减少或抑制细胞因子的释放。

[0164] 在一些实施例中, 分离抗体或其抗原结合片段免疫特异性地结合 α 毒素并且包含 VH CDR3, 该 VH CDR3 包含与 SEQ ID NO:9、12、15、18、16、65、66、67、71、72、76 或 78 一致的氨基酸序列或相对于它们包含 1、2、或 3 个氨基酸残基置换, 其中该抗体或抗原结合片段减轻或消除皮肤坏死。

[0165] 在一些实施例中, 分离抗体或其抗原结合片段免疫特异性地结合 α 毒素并且包含 VL CDR3, 该 VL CDR3 包含与 SEQ ID NO:3、6、64、68 或 74 一致的氨基酸序列或相对于它们包含 1、2、或 3 个氨基酸残基置换, 其中该抗体或抗原结合片段减轻或消除皮肤坏死。

[0166] 抗 α 毒素抗体和片段常常包含与在此所述的氨基酸序列基本上相同的一个或多个氨基酸序列。基本上相同的氨基酸序列包括含有保守性氨基酸置换以及氨基酸缺失和 / 或插入的序列。保守性氨基酸置换是指一个第一氨基酸被一个第二氨基酸替换, 该第二氨基酸具有与第一氨基酸的化学和 / 或物理性质相似的化学和 / 或物理性质 (例如, 电荷、结构、极性、疏水性 / 亲水性)。保守性置换包括将一个氨基酸用在以下组中的另一个氨基酸替换: 赖氨酸(K)、精氨酸(R) 以及组氨酸(H); 天冬氨酸(D) 以及谷氨酸(E); 天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、酪氨酸(Y)、K、R、H、D 和 E; 丙氨酸(A)、缬氨酸(V)、亮

氨酸(L)、异亮氨酸(I)、脯氨酸(P)、苯丙氨酸(F)、色氨酸(W)、甲硫氨酸(M)、半胱氨酸(C)以及甘氨酸(G);F、W和Y;C、S和T。

[0167] 框架区

[0168] 重链和轻链的可变域各自包含四个框架区(通常为FR1、FR2、FR3、FR4或可替代地为FW1、FW2、FW3、FW4),是可变域的更高保守性的部分。重链的四个框架区在此被指定为VH-FW1、VH-FW2、VH-FW3和VH-FW4,并且轻链的四个框架区在此被指定为VL-FW1、VL-FW2、VL-FW3和VL-FW4。在此使用了Kabat编号系统,并且像这样,VH-FW1开始于位置1并且大约在氨基酸30处结束,VH-FW2大致是从氨基酸36至49,VH-FW3大致是从氨基酸66至94,并且VH-FW4大致为氨基酸103至113。VL-FW1开始于氨基酸1并且在大致氨基酸23处结束,VL-FW2大致是从氨基酸35至49,VL-FW3大致是从氨基酸57至88,并且VL-FW4大致是从氨基酸98至107。在某些实施例中,框架区包含根据Kabat编号系统的置换,例如在VL-FW1中106A处的插入。除了天然存在的置换之外,FR残基的一种或多种改变(例如,置换)也可以被引入抗 α 毒素抗体或片段中。在某些实施例中,这些改变导致针对抗 α 毒素的抗体结合亲和力的改进或优化。可以被修饰的框架区残基的非限制性实例包括非共价直接结合抗原、与CDR的构象相互作用/影响CDR构象、和/或参与VL-VH界面的那些残基。

[0169] 在某些实施例中,框架区可以包含一个或多个氨基酸变化,用于“种系化(germlining)”的目的。例如,将所选择的抗体重链和轻链的氨基酸序列与种系重链和轻链氨基酸序列进行比较,并且其中所选择的VL和/或VH链的某些框架残基不同于种系构型(例如,由于用来制备噬菌体文库的免疫球蛋白基因的体细胞突变),可能希望的是使所选择抗体的改变的框架残基“回复突变”为种系构型(即,改变所选择的抗体的框架氨基酸序列,使得它们与种系框架氨基酸序列相同)。框架残基的这种“回复突变”(或“种系化”)可以通过用于引入特定突变的标准分子生物学方法完成(例如,定点诱变;PCR介导的诱变,等等)。在一些实施例中,可变的轻链和/或重链框架残基被回复突变。在某些实施例中,呈现的分离抗体或其抗原结合片段的可变重链被回复突变。在某些实施例中,分离抗体或其抗原结合片段的可变重链包含至少一个、至少两个、至少三个、至少四个或更多个回复突变。

[0170] 在某些实施例中,在此呈现的抗 α 毒素抗体或片段的VH可以包含FR1、FR2、FR3和/或FR4,该FR1、FR2、FR3和/或FR4具有与在SEQ ID NO:20、22、24、26、28、41、43、45、47、49、51、53、55、57、79、59、61、或62内的相应框架区从大约65%至大约100%的氨基酸序列一致性(即,抗体X的FR1相比于抗体Y的FR1)。在一些实施例中,抗 α 毒素抗体或片段包含与SEQ ID NO:20、22、24、26、28、41、43、45、47、49、51、53、55、57、79、59、61、或62的相应FR至少65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%一致或100%一致的VH FR氨基酸序列(FR1、FR2、FR3和/或FR4)。在某些实施例中,抗 α 毒素抗体或片段包含与VH SEQ ID NO:20、22、24、26、28、41、43、45、47、49、51、53、55、57、79、59、61、或62的相应FR至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%一致或100%一致的VH FR氨基酸序列(FR1、FR2、FR3和/或FR4)。

[0171] 在某些实施例中,抗 α 毒素抗体或片段可以包含VH FR(FR1、FR2、FR3和/或FR4),该VH FR包含与VH SEQ ID NO:20、22、24、26、28、41、43、45、47、49、51、53、55、57、79、59、61、或62的相应FR一致的氨基酸序列或相对于它们的相应FR包含1、2或3个氨基酸

置换。具体而言, VH 的 FR1、FR2、FR3 或 FR4 可以各自具有与 VH SEQ ID NO: 20、22、24、26、28、41、43、45、47、49、51、53、55、57、79、59、61、或 62 的相应 FR1、FR2、FR3 或 FR4 一致的氨基酸序列或相对于它们的相应 FR1、FR2、FR3 或 FR4 包含 1、2 或 3 个氨基酸置换。

[0172] 在某些实施例中, 在此提供的抗 α 毒素抗体或片段的 VL 可以包含 FR1、FR2、FR3 和 / 或 FR4, 该 FR1、FR2、FR3 和 / 或 FR4 具有与在 VL SEQ ID NO: 19、21、23、25、27、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60 或 63 之内的相应框架区的氨基酸序列一致性(即, 抗体 X 的 FR1 相比于抗体 Y 的 FR1)(例如, 从大约 65% 至大约 100% 序列一致性)。在一些实施例中, 抗 α 毒素抗体或片段包含与 VL SEQ ID NO: 19、21、23、25、27、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60 或 63 的相应 FR 至少 65%、70%、75%、80%、85%、90%、95% 一致或 100% 一致的 VL FR 氨基酸序列(FR1、FR2、FR3 和 / 或 FR4)。在某些实施例中, 抗 α 毒素抗体或片段包含与 VL SEQ ID NO: 19、21、23、25、27、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60 或 63 的相应 FR 至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 一致或 100% 一致的 VL FR 氨基酸序列(FR1、FR2、FR3 和 / 或 FR4)。

[0173] 在某些实施例中, 抗 α 毒素抗体或片段包含 VL FR (FR1、FR2、FR3 和 / 或 FR4), 该 VL FR 包含与 VL SEQ ID NO: 19、21、23、25、27、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60 或 63 的相应 FR 一致的氨基酸序列或相对于它们的相应 FR 包含 1、2 或 3 个氨基酸置换。具体而言, VL 的 FR1、FR2、FR3 或 FR4 可以各自具有与 VH SEQ ID NO: 19、21、23、25、27、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60 或 63 的相应 FR1、FR2、FR3 或 FR4 一致的氨基酸序列或相对于它们的相应 FR1、FR2、FR3 或 FR4 包含 1、2 或 3 个氨基酸置换。

[0174] 在某些实施例中, 分离抗体或其抗原结合片段免疫特异性地结合 α 毒素并且包含 VH FR (FR1、FR2、FR3 和 / 或 FR4) 和 / 或 VL FR (FR1、FR2、FR3 和 / 或 FR4), 该 VH FR 包含与 VH SEQ ID NO: 20、22、24、26、28、41、43、45、47、49、51、53、55、57、79、59、61、或 62 的相应 FR 一致的氨基酸序列或相对于它们的相应 FR 包含 1、2 或 3 个氨基酸置换, 该 VL FR 包含与 VL SEQ ID NO: 19、21、23、25、27、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60 或 63 的相应 FR 一致的氨基酸序列或相对于它们的相应 FR 包含 1、2 或 3 个氨基酸置换, 其中该抗体具有一种或多种选自下组的特征(以下更详细描述), 该组由以下各项组成:

[0175] (a) 对于 α 毒素大约 13nM 或更小的亲和常数(K_D);

[0176] (b) 结合至 α 毒素单体, 但不抑制 α 毒素结合至 α 毒素受体;

[0177] (c) 以至少 50%、60%、70%、80%、90% 或 95% 抑制 α 毒素寡聚体的形成;

[0178] (d) 以至少 50%、60%、70%、80%、90% 或 95% 降低 α 毒素的细胞溶解活性(例如, 如通过细胞溶解和溶血试验所确定);

[0179] (e) 减少细胞浸润和促炎细胞因子释放(例如, 在一种动物肺炎模型中)。

[0180] 在一些实施例中, 分离抗体或其抗原结合片段以由解离常数(K_D)表征的亲和力而结合抗原(例如 α 毒素), 该解离常数在大约 0.01nM 至大约 50nM、0.05nM、0.1nM、0.5nM、1nM、5nM、10nM、20nM、30nM、或 40nM 的范围内。

[0181] 编码抗 α 毒素抗体和片段的核苷酸序列

[0182] 除了以上所述的氨基酸序列之外, 另外提供了相应于这些氨基酸序列并且编码在此披露的人的、人源化的和 / 或嵌合的抗体的核苷酸序列。在一些实施例中, 多核苷酸包含编码在此所述的抗 α 毒素抗体或片段或其片段的核苷酸序列。这些包括但不限于编码以

上提及的氨基酸序列的核苷酸序列。核苷酸序列提供于实例 11、表 8 中。因此,还提供了编码包括在此所述的抗体的 CDR 和 FR 的 VH 和 VL 框架区的多核苷酸序列以及用于它们在细胞(例如哺乳动物细胞)中有效表达的表达载体。使用多核苷酸制造抗 α 毒素抗体或片段的方法更详细地描述于下文。

[0183] 还包括在严谨或较低严谨性的杂交条件(例如,如在此定义的)下与编码抗 α 毒素抗体或片段的多核苷酸杂交的多核苷酸。如在此使用的术语“严谨性”是指杂交实验的实验条件(例如,温度和盐浓度),指示在两个核酸之间的同源性的程度;严谨性越高,两个核酸之间的同源性百分比越高。

[0184] 严谨杂交条件包括但不限于:在 6X 氯化钠 / 柠檬酸钠(SSC)中、在大约 45°C 下杂交至过滤器结合的 DNA,随后在大约 50°C -65°C 在 0.2X SSC/0.1%SDS 中洗涤一次或多次;高度严谨条件例如在 6X SSC 中、在大约 45°C 下杂交至过滤器结合的 DNA,随后在大约 65°C 在 0.1X SSC/0.2%SDS 中洗涤一次或多次;或者任何其他已知的严谨杂交条件。

[0185] 在某些实施例中,核酸或其片段可以编码抗 α 毒素抗体或片段并且在严谨条件下与包含编码 SEQ ID NO:19、21、23、25、27、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60 或 63 的氨基酸序列的核苷酸序列的核酸杂交。

[0186] 在某些实施例中,多核苷酸序列可以包含编码抗 α 毒素抗体或片段的核苷酸序列,该核苷酸序列与编码 SEQ ID NO:19、21、23、25、27、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60 或 63 的氨基酸序列的核苷酸序列至少大约 65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、或 100% 一致。在一些实施例中,多核苷酸序列可以包含编码抗 α 毒素抗体或片段的核苷酸序列,该核苷酸序列与 SEQ ID NO:30、31、32、33、34、35、36、37 或 38 的核苷酸序列至少大约 65%、70%、75%、80%、85%、90%、95% 或 100% 一致。在一些实施例中,抗 α 毒素抗体或片段包含这样一种核苷酸序列,该核苷酸序列包括与编码 SEQ ID NO:19、21、23、25、27、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60 或 63 的氨基酸序列的核苷酸序列至少大约 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的一致性。

[0187] 在某些实施例中,多核苷酸序列可以包含编码抗 α 毒素抗体或片段的核苷酸序列,该核苷酸序列与编码 SEQ ID NO:20、22、24、26、28、41、43、45、47、49、51、53、55、57、79、59、61、或 62 的 VH 氨基酸序列的 VH 核苷酸序列至少大约 65%、70%、75%、80%、85%、90%、95% 或 100% 一致。在一些实施例中,多核苷酸序列可以包含编码抗 α 毒素抗体或片段的核苷酸序列,该核苷酸序列与 SEQ ID NO:30、32、34、36 或 38 的 VH 核苷酸序列至少大约 65%、70%、75%、80%、85%、90%、95% 或 100% 一致。在一些实施例中,抗 α 毒素抗体或片段是由编码 VH 的核苷酸序列编码的,该编码 VH 的核苷酸序列包括与编码 SEQ ID NO:20、22、24、26、28、41、43、45、47、49、51、53、55、57、79、59、61、或 62 的氨基酸序列的核苷酸序列至少大约 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的一致性。

[0188] 在某些实施例中,多核苷酸序列可以包含编码抗 α 毒素抗体或片段的核苷酸序列,该核苷酸序列与编码 SEQ ID NO:19、21、23、25、27、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60 或 63 的 VL 氨基酸序列的 VL 核苷酸序列至少大约 65%、70%、75%、80%、85%、90%、95% 或 100% 一致。在一些实施例中,多核苷酸序列可以包含编码抗 α 毒素抗体或片段的核苷酸序列,该核苷酸序列与 SEQ ID NO:29、31、33、35 或 37 的 VL 核苷酸序列至少大约 65%、70%、75%、80%、85%、90%、95% 或 100% 一致。在一些实施例中,抗 α 毒素抗体或片段是由编码 VL 的核苷酸

序列编码的,该编码 VL 的核苷酸序列包括与编码 EQ ID NO:19、21、23、25、27、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60 或 63 的氨基酸序列的核苷酸序列至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的一致性。

[0189] 在具体实施例中,多核苷酸序列可以包含编码与 VH 氨基酸序列至少大约 65%、70%、75%、80%、85%、90%、95% 或 100% 一致的抗 α 毒素抗体或片段的核苷酸序列,以及编码与 VL 氨基酸序列至少大约 65%、70%、75%、80%、85%、90%、95% 或 100% 一致的抗 α 毒素抗体或片段的核苷酸序列,其中 VH 和 VL 序列表示为 SEQ ID NO:20 和 19;SEQ ID NO:22 和 21;SEQ ID NO:24 和 23;SEQ ID NO:26 和 25;SEQ ID NO:28 和 27;SEQ ID NO:41 和 42;SEQ ID NO:43 和 44;SEQ ID NO:45 和 46;SEQ ID NO:47 和 48;SEQ ID NO:47 和 48;SEQ ID NO:49 和 50;SEQ ID NO:51 和 52;SEQ ID NO:51 和 52;SEQ ID NO:53 和 54;SEQ ID NO:55 和 56;SEQ ID NO:57 和 58;SEQ ID NO:59 和 60;SEQ ID NO:61 和 58;SEQ ID NO:62 和 58;SEQ ID NO:62 和 63;SEQ ID NO:79 和 63。

[0190] 基本上一致的序列可以是多态性序列,即在一个种群中的可替代序列或等位基因。等位基因差异可以小到一个碱基对。基本上一致的序列还可以包含诱变序列,包括含有沉默突变的序列。突变可以包含一个或多个残基改变、一个或多个残基的缺失、或一个或多个另外的残基的插入。

[0191] 可以通过本领域已知的任何方法获得多核苷酸以及确定的多核苷酸的核苷酸序列。例如,如果抗体核苷酸序列是已知的,编码抗体的多核苷酸可以从化学合成的寡核苷酸组装,简言之,涉及含有编码抗体的序列的部分的重叠寡核苷酸的合成、那些寡核苷酸的退火和连接、以及然后通过 PCR 进行连接的寡核苷酸的扩增。

[0192] 编码抗体的多核苷酸还可以从来自适合来源的核酸产生。如果包含编码具体抗体的核酸的克隆是不可获得的,但是抗体分子的序列是已知的,则编码该免疫球蛋白的核酸可以化学合成或通过使用合成引物(这些合成引物与序列的 3' 和 5' 端可杂交)的 PCR 扩增或者通过使用寡核苷酸探针(对于特定的基因序列具有特异性,以便从 cDNA 文库鉴定编码抗体的 cDNA 克隆)的克隆(例如来自编码抗体的 cDNA 文库的 cDNA 克隆)而从适合来源(例如,抗体 cDNA 文库、或产生自表达抗体的任何组织或细胞的 cDNA 文库或从它们分离的核酸、有时为 polyA+RNA,这些细胞例如被选择为表达抗体的杂交瘤细胞)获得。可以使用本领域已知的任何方法,进而将通过 PCR 产生的扩增核酸克隆进可复制的克隆载体中。

[0193] 一旦确定抗体的核苷酸序列和相应的氨基酸序列,可以使用用于操纵核苷酸序列的本领域中的已知方法(例如重组 DNA 技术、定点诱变、PCR、等等)来操纵抗体的核苷酸序列,从而产生具有不同氨基酸序列的抗体,例如产生氨基酸置换、缺失、和 / 或插入。

[0194] 如在此使用的,术语“严谨条件”是指用于杂交和洗涤的条件。用于杂交反应温度条件优化的方法对于本领域的技术人员是已知的。水性和非水性方法描述于参考文献中并且可以使用任何一种。严谨杂交条件的非限制性实例是在 6X 氯化钠 / 柠檬酸钠(SSC)中、在大约 45°C 下的杂交,随后在 0.2X SSC、0.1%SDS 中在 50°C 下洗涤一次或多次。严谨杂交条件的另一个实例是在 6X 氯化钠 / 柠檬酸钠(SSC)中、在大约 45°C 下的杂交,随后在 0.2X SSC、0.1%SDS 中在 55°C 下洗涤一次或多次。严谨杂交条件的另外的实例是在 6X 氯化钠 / 柠檬酸钠(SSC)中、在大约 45°C 下的杂交,随后在 0.2X SSC、0.1%SDS 中在 60°C 下洗涤一次或多次。经常地,严谨杂交条件是在 6X 氯化钠 / 柠檬酸钠(SSC)中、在大约 45°C 下的杂交,

随后在 0.2X SSC、0.1%SDS 中在 65℃下洗涤一次或多次。更经常地,严谨条件是在 0.5M 磷酸钠、7%SDS、在 65℃,随后在 0.2XSSC、1%SDS 中在 65℃下洗涤一次或多次。还可以用某些有机溶剂(例如甲酰胺)的添加来改变(即,降低)严谨杂交温度。有机溶剂,像甲酰胺,降低了双链多核苷酸的热稳定性,使得杂交可以在较低温度下进行,同时仍然保持严谨条件并且延长可能不耐热的核酸的使用寿命。

[0195] 如在此使用的,短语“杂交”或其语法变体,是指在低、中、或高严谨性条件下,或在核酸合成条件下,将第一核酸分子结合至第二核酸分子。杂交可以包括第一核酸分子结合至第二核酸分子的情况,其中该第一和第二核酸分子是互补的。如在此使用的,相比于杂交至不具有互补序列的核酸分子,“特异性杂交”是指在引物的核酸合成条件下优先杂交至具有与引物互补的序列的核酸分子。例如,特异性杂交包括引物与目标核酸序列的杂交,该目标核酸序列与该引物互补。

[0196] 在一些实施例中,引物可以包括可能与固相核酸引物杂交序列互补或基本上与固相核酸引物序列互补(例如,当比对时,与引物杂交序列互补物大约 75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 99% 以上一致)的核苷酸序列。引物可以包含与固相核酸引物杂交序列不互补或基本上不互补的核苷酸亚序列(例如,在与固相引物杂交序列互补或基本上互补的引物中的核苷酸亚序列的 3' 或 5' 端处)。

[0197] 在某些实施例中引物可以包含修饰,例如肌苷、脱碱基位点、锁核酸、小沟结合剂、双链体稳定剂(例如,吡啶、亚精胺)、Tm 修饰剂或改变引物或探针的结合特性的任何修饰剂。

[0198] 在某些实施例中,引物可以包含可检测的分子或实体(例如,荧光团、放射性同位素、比色剂、颗粒、酶等等)。当希望时,可以使用本领域的技术人员已知的任何方法修饰核酸以便包括可检测标记物。在在此所述的任何过程中,可以将标记物掺入作为合成的一部分、或在使用引物之前将其添加。可以在液相中或在固相上进行标记物的掺入。在一些实施例中,可检测标记物对于目标的检测可以是有用的。在一些实施例中,可检测标记物对于目标核酸的定量可以是有用的(例如,确定核酸的特定序列或种类的拷贝数)。任何适用于检测系统中的相互作用或生物活性的可检测标记物可以由技术人员适当地选择并使用。可检测标记物的实例是荧光标记物,例如荧光素、罗丹明、以及其他(例如,Anantha (阿南塔)等人,Biochemistry (《生物化学》)(1998)37:27092714;以及 Qu (曲)& Chaires,Methods Enzymol. (《酶学方法》)(2000)321:353369);放射性同位素(例如,125I、131I、35S、31P、32P、33P、14C、3H、7Be、28Mg、57Co、65Zn、67Cu、68Ge、82Sr、83Rb、95Tc、96Tc、103Pd、109Cd、和 127Xe);光散射标记物(例如,美国专利号 6,214,560,标记物可商购于 Genicon 科学公司(Genicon Sciences Corporation),加利福尼亚州(California);化学发光标记物和酶底物(例如二氧杂环丁烷和吡啶酯),酶标记物或蛋白质标记物(例如,绿色荧光蛋白(GFP)或其颜色变体、萤光素酶、过氧化物酶);其他发色标记物或染料(例如,菁蓝)、以及其他辅因子或生物分子,例如地高辛配基、链霉亲和素(streptavidin)、生物素(例如,结合对的成员,比如像生物素与亲和素)、亲和捕获部分(affinity capture moiety)等等。在一些实施例中,可以用亲和捕获部分来标记引物。还包含在可检测标记物中的是对用于质谱(例如,基质辅助激光解析电离(MALDI)质谱和电喷射(ES)质谱)检测的质量修饰有用的那些标记物。

[0199] 引物还可以是指与目标核酸的亚序列或另一个引物杂交的多核苷酸序列,并且促进引物、目标核酸或两者的检测,例如正如分子信标。如在此使用的术语“分子信标”是指可检测分子,其中该分子的可检测特性仅是在某些特定条件下是可检测的,由此使得它能够作为特异性的和信息性的信号起作用。可检测特性的非限制性实例是光学特性、电性能、磁性能、化学特性以及通过已知大小的开口的时间或速度。

[0200] 在一些实施例中,分子信标可以是能够形成茎环结构的单链寡核苷酸,其中环序列可以与感兴趣的目标核酸序列互补,并且侧翼为能形成茎的短互补臂。可以将寡核苷酸在一端用荧光团标记并且在另一端用淬灭剂分子标记。在茎环构象中,类似于在荧光共振能量转移、或 FRET 中所见到的,来自激发的荧光团的能量通过远程偶极-偶极耦合作用而被转移至淬灭剂,并且作为热而不是光而被释放。当环序列杂交至特定目标序列时,分子的两端分开,并且来自激发的荧光团的能量被发射为光,产生可检测信号。分子信标提供了附加的优势,即,由于未杂交探针的自淬灭性质,过量探针的去除是不必要的。在一些实施例中,分子信标探针可以被设计为在通过调节环-靶标杂交和茎形成的相对强度而区别或容许环与靶序列之间的错配。如在此所提及的术语“错配核苷酸”或“错配”是指在那个位置或那些位置与靶序列不互补的核苷酸。探针可以具有至少一个错配,但还可以具有 2、3、4、5、6 或 7 或更多个错配核苷酸。

[0201] 抗 α 毒素抗体和片段的生物特征

[0202] 一种抗体可以具有与在此所述的抗体一致或相似的一种或多种特征,并且经常具有使它区别于结合至相同抗原 α 毒素的其他抗体的一种或多种生物特征。如在此使用的,抗体的“生物特征”是指生物化学的结合和功能特征的任何一种或多种,可以用来选择用于治疗、研究、以及诊断用途的抗体。例如,抗 α 毒素抗体和片段可以在例如表位结合、靶向、亲和性、中和、以及抑制寡聚化或七聚体孔复合体形成方面相同或不同。

[0203] 抗 α 毒素抗体或片段的生物化学特征包括但不限于等电点(pI)和解链温度(T_m)。抗 α 毒素抗体或片段的结合特征包括但不限于结合特异性;解离常数(K_d)、或它的倒数缔合常数(K_a)、或它的分量 k_{on} 或 k_{off} 率;它结合的表位;在 α 毒素的不同形式和/或制品(例如,重组的、天然的、乙酰化的)之间区分的能力以及结合可溶的和/或固定的抗原的能力。在此呈现的抗体的功能特征包括但不限于 α 毒素受体结合的抑制、 α 毒素寡聚化的抑制、由响应于 α 毒素表达或活性的级联反应诱导的基因表达的抑制、表达 α 毒素的细胞的耗尽、表达 α 毒素的细胞的生长抑制、 α 毒素的定位的抑制,以及在与金黄色葡萄球菌、 α 毒素或金黄色葡萄球菌和 α 毒素相关的一种或多种疾病或病症中的保护。在此描述了抗 α 毒素抗体和片段的特征以及用于修饰和微调那些特征的方法。用于测量抗体特征的方法在本领域是已知的,其中一些详述于下文。

[0204] 结合特征

[0205] 如上所述,抗 α 毒素抗体或片段专有地或相对于其他多肽优先地免疫特异性地结合蛋白质、肽、亚基、片段、部分或其任何组合的至少一个特定表位或抗原决定簇。如在此使用的术语“表位”或“抗原决定簇”是指能够结合至抗体的蛋白质决定簇,其中在此的术语“结合”经常涉及特异性结合。这些蛋白质决定簇或表位经常包括分子(例如氨基酸或糖侧链)的化学活性表面基团,这些基团常常具有特定的三维结构特征,并且常常具有特定的电荷特征。构象和非构象表位的区别在于:在变性溶剂的存在下,与前者(而不是后者)的

结合消失。如在此使用的术语“非连续表位”是指在从蛋白质的一级序列中的至少两个分开的区域形成的蛋白质抗原上的构象表位。

[0206] 在某些实施例中,抗 α 毒素抗体或片段免疫特异性地结合至金黄色葡萄球菌 α 毒素以及它的与 α 毒素寡聚化相关的抗原性片段。在一些实施例中,抗 α 毒素抗体或片段免疫特异性地结合至 α 毒素、或 SEQ ID NO:39 或 40 的至少任何三个连续氨基酸。在一些实施例中,表位是 α 毒素蛋白的连续氨基酸中的至少 4 个氨基酸残基、至少 5 个氨基酸残基、至少 6 个氨基酸残基、至少 7 个氨基酸残基、至少 8 个氨基酸残基或至少 9 个氨基酸残基乃至整个指定部分。在某些实施例中,接触残基包含 T261、T263、N264、K266 和 K271。在其他实施例中,接触残基包括 SEQ ID NO:39 的 N177、W179、G180、P181、Y182、D183、D185、S186、W187、N188、P189、V190、Y191 和 R200。在另外的实施例中,接触残基包括 SEQ ID NO:39 的 N177、W179、G180、P181、Y182、D183、D185、S186、W187、N188、P189、V190、Y191、R200、T261、T263、N264、K266 和 K271。在某些实施例中,与抗体或其抗原结合片段接触的 α 毒素部分包括 SEQ ID NO:39 的氨基酸 261-272。在其他实施例中,与抗体或其抗原结合片段接触的 α 毒素部分包括 SEQ ID NO:39 的氨基酸 248-277。在其他实施例中,与抗体或其抗原结合片段接触的 α 毒素部分包括 SEQ ID NO:39 的氨基酸 173-201 以及 261-272。

[0207] 在不同实施例中,抗 α 毒素抗体或它的与 α 毒素寡聚化相关的片段免疫特异性地结合具有与 SEQ ID NO:39 或 40 的氨基酸序列至少 60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95% 的一致性 or 100% 的一致性的 α 毒素多肽或其抗原性片段。抗 α 毒素抗体或片段有时可以免疫特异性地结合至具有与 SEQ ID NO:39 或 40 的氨基酸序列至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 的一致性 or 100% 的一致性的 α 毒素多肽或其抗原性片段。

[0208] 在某些实施例中,抗 α 毒素抗体或片段可以结合在物种间保守的表位。在一些实施例中,抗 α 毒素抗体或片段结合金黄色葡萄球菌 α 毒素和来自其他细菌种类的 α 毒素同系物或直系同源物以及它们的抗原性片段。在一些实施例中,抗 α 毒素抗体或片段可以结合至一种或多种 α 毒素直系同源物和或同种型。在具体实施例中,抗 α 毒素抗体或片段结合至来自具有 α 毒素同系物或直系同源物的一种或多种细菌种类的 α 毒素以及它的与 α 毒素寡聚化相关的抗原性片段。在某些实施例中,抗 α 毒素抗体或片段可以结合在葡萄球菌属或其他密切相关细菌之内的表位,该表位在 α 毒素同系物和 / 或同种型和 / 或构象变体和 / 或亚型上。

[0209] 在抗原与抗体之间的相互作用常常与其他非共价的蛋白质-蛋白质相互作用相同。通常,四种类型的结合相互作用存在于抗原和抗体之间。(i) 氢键,(ii) 分散力,(iii) 在路易斯酸与路易斯碱之间的静电力,以及 (iv) 疏水相互作用。疏水相互作用是抗体-抗原相互作用的重要的驱动力,并且是基于经由非极性基团的水的排斥而不是分子的吸引。然而,某些物理力也促进抗原-抗体结合,例如表位形状与不同的抗体结合部位的配合或互补。其他材料和抗原可以与抗体发生交叉反应,由此竞争可获得的游离抗体。

[0210] 在抗原与抗体之间的结合的亲和常数和特异性的测量常常是确定使用抗 α 毒素抗体和片段的治疗、诊断和研究方法的效力的一个要素。“结合亲和力”通常是指分子(例如,抗体)的单个结合部位与其结合配偶体(例如,抗原)之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另外指明,如在此使用的“结合亲和力”是指反映在结合对成员(例如,抗体和抗原)之间的 1:1 相互作用的固有结合亲和力。分子 X 对于其配偶体 Y 的亲和力通常可以由平衡

解离常数(K_d)表示,计算为比率 k_{off}/k_{on} 。可以通过本领域已知的常见方法测量亲和力,包括在此所述和示例的那些(例如,BiaCore 方法)。低亲和力抗体通常缓慢地结合抗原并且倾向于易于解离,而高亲和力抗体通常较快结合抗原并且倾向于较长地保持结合。多种测量结合亲和力的方法在本领域是已知的,出于本技术的目的而可以使用它们中的任何一种。

[0211] 抗 α 毒素抗体或片段有时具有对 α 毒素表位的结合亲和力,该结合亲和力由 $1 \times 10^{-2}M$ 或更小、 $1 \times 10^{-3}M$ 或更小、 $1 \times 10^{-4}M$ 或更小、 $1 \times 10^{-5}M$ 或更小、 $1 \times 10^{-6}M$ 或更小、 $1 \times 10^{-7}M$ 或更小、 $1 \times 10^{-8}M$ 或更小、 $1 \times 10^{-9}M$ 或更小、 $1 \times 10^{-10}M$ 或更小、 $1 \times 10^{-11}M$ 或更小、 $1 \times 10^{-12}M$ 或更小、 $1 \times 10^{-13}M$ 或更小、 $1 \times 10^{-14}M$ 或更小或 $1 \times 10^{-15}M$ 或更小的解离常数(K_d)表征。例如, K_d 可以是 $1 \times 10^{-15}M$ 至 $1 \times 10^{-2}M$ 、从 $1 \times 10^{-14}M$ 至 $1 \times 10^{-10}M$ 、从 $1 \times 10^{-9}M$ 至 $1 \times 10^{-5}M$ 以及从 $1 \times 10^{-4}M$ 至 $1 \times 10^{-2}M$ 。

[0212] 在某些实施例中,抗 α 毒素抗体和片段是高亲和力抗体。“高亲和力抗体”表示以小于 $10^{-8}M$ (例如, $10^{-9}M$ 、 $10^{-10}M$ 、等等)的亲和力结合至 α 毒素表位的抗体。

[0213] 在某些实施例中,抗 α 毒素抗体或片段被描述为具有特定摩尔浓度的或更佳结合亲和力。当在此使用“或更佳”时,是指较强的结合,由较小的数字 K_d 值表示。例如,对于一种抗原具有“ $0.6nM$ 或更佳”的亲和力的抗体,对于该抗原的抗体的亲和力是 $< 0.6nM$,即, $0.59nM$ 、 $0.58nM$ 、 $0.57nM$ 等等、或任何小于 $0.6nM$ 的值。

[0214] 在一些实施例中,抗 α 毒素抗体或片段的亲和力是就缔合常数(K_a)而言进行描述的,计算为比率 k_{on}/k_{off} 。在这种情况下,对于 α 毒素表位,本发明的抗 α 毒素抗体和片段具有包括 $1 \times 10^2 M^{-1}$ 或更大、 $1 \times 10^3 M^{-1}$ 或更大、 $1 \times 10^4 M^{-1}$ 或更大、 $1 \times 10^5 M^{-1}$ 或更大、 $1 \times 10^6 M^{-1}$ 或更大、 $1 \times 10^7 M^{-1}$ 或更大、 $1 \times 10^8 M^{-1}$ 或更大、 $1 \times 10^9 M^{-1}$ 或更大、 $1 \times 10^{10} M^{-1}$ 或更大、 $1 \times 10^{11} M^{-1}$ 或更大、 $1 \times 10^{12} M^{-1}$ 或更大、 $1 \times 10^{13} M^{-1}$ 或更大、 $1 \times 10^{14} M^{-1}$ 或更大或者 $1 \times 10^{15} M^{-1}$ 或更大的缔合常数的结合亲和力。例如, K_a 可以是 $1 \times 10^2 M^{-1}$ 至 $1 \times 10^7 M^{-1}$ 、从 $1 \times 10^7 M^{-1}$ 至 $1 \times 10^{10} M^{-1}$ 、以及从 $1 \times 10^{10} M^{-1}$ 至 $1 \times 10^{15} M^{-1}$ 。

[0215] 在某些实施例中,抗 α 毒素抗体或片段从 α 毒素表位解离的速率可能是有意义的。在一些实施例中,抗 α 毒素抗体或片段能以小于 $10^{-3} s^{-1}$ 、小于 $5 \times 10^{-3} s^{-1}$ 、小于 $10^{-4} s^{-1}$ 、小于 $5 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、或小于 $10^{-5} s^{-1}$ 的 k_{off} 结合至 α 毒素。在一些实施例中,抗 α 毒素抗体和片段与 α 毒素表位缔合的速率可以比 K_d 或 K_a 的值更有意义。在这种情况下,本发明的抗 α 毒素抗体和片段以至少 $10^{-4} M^{-1} s^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^{-4} M^{-1} s^{-1}$ 、至少 $10^{-5} M^{-1} s^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^{-5} M^{-1} s^{-1}$ 、至少 $10^{-6} M^{-1} s^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^{-6} M^{-1} s^{-1}$ 、至少 $10^{-7} M^{-1} s^{-1}$ 的 k_{on} 比率结合至 α 毒素。

[0216] 结合亲和力的确定可以使用在实例部分(参见实例 1)中进一步描述的特定技术以及本领域已知的方法来测量。这种方法的一个实例包括通过用感兴趣的抗体的 Fab 型式以及它的抗原来进行的放射性标记抗原结合测定(RIA)而测量解离常数“ K_d ”,该放射性标记抗原结合测定如由以下测定所描述,该测定通过未标记抗原的逐步增高剂量系列(titration series)的存在下平衡 Fab 与 (^{125}I) -标记抗原的最小浓度、然后用抗 Fab 抗体包被的板捕获结合的抗体而测量 Fab 对抗原的溶液结合亲和力。为了建立该测定的条件,将微量滴定板(Dynex)用在 $50mM$ 碳酸钠($pH9.6$)中的 $5 \mu g/ml$ 捕获性抗 Fab 抗体(Cappel Labs)过夜包被,并且随后在室温(大致 $23^\circ C$)用 PBS 中的 2% (w/v) 牛血清白蛋白封闭两至五个小时。在非吸附性板(Nunc#269620)中,将 $100pM$ 或 $26pM$ $[^{125}I]$ -抗原与感兴趣 Fab 的连续稀释物进行混合。然后将感兴趣的 Fab 孵育过夜;然而,孵育可以连续持续较长的时

期(例如,65 小时)以确保达到平衡。此后,将混合物转移至捕获板,以用于在室温孵育(例如,持续一小时)。然后将溶液去除并且将板用在 PBS 中的 0.1% 吐温 20 (Tween-20) 洗涤八次。当板已经干燥时,添加 150 μ l/孔的闪烁体(MicroScint-20 ;Packard),并且将板在 Topcount γ 计数器(Packard)上计数,持续十分钟。选择给出小于或等于 20% 的最大结合的各个 Fab 的浓度以供在竞争性结合测定中使用。

[0217] 在另一种情况下,可以通过使用表面等离子体共振测定来测量 K_d 值,该测定可以例如使用 BIAcore™-2000 或 BIAcore™-3000 (BIAcore 公司,皮斯卡塔韦(Piscataway),新泽西州)在 25°C 用在约 10 个反应单位(response unit, RU)的固定抗原 CM5 芯片来进行。简言之,在这种方法的一个实例中,根据供应商的说明书,将羧甲基化的葡聚糖生物传感器芯片(CM5, BIAcore 公司)用 N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐(EDC)以及 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活化。将抗原用 pH4.8 的 110mM 醋酸钠稀释为 5 μ g/微升(约 0.2 μ M),之后以 5 μ l/分钟的流速注入从而获得偶联蛋白的大致 10 个反应单位(RU)。在注入抗原后,注入 1M 乙醇胺以封闭未反应的基团。为了动力学测量,在 25°C 将 Fab 的两倍连续稀释物(0.78nM 至 500nM)以大致 25 μ l/min 的流速注入具有 0.05% 吐温 20 (Tween20) (PBST) 的 PBS 中。通过同时拟合缔合和解离传感图,使用简单的一对一朗缪尔结合模型(BIAcore 评估软件,3.2 版本)计算缔合速率(k_{on})和解离速率(k_{off})。

[0218] 如果通过以上的表面等离子体共振测定所得缔合速率超过 $10^6 M^{-1} s^{-1}$,则缔合速率可以通过使用荧光淬灭技术来确定,例如,该荧光淬灭技术测量在 25°C、在抗原渐增浓度的存在下在 PBS (pH7.2) 中的 20nM 抗抗原抗体(Fab 形式)的荧光发射强度(激发波长 = 295nm;发射波长 = 340nm,16nm 带通)的增加或降低,如用分光计(例如配备有流动停止的分光光度计(Aviv 仪器公司)或具有搅拌红色比色皿(stir red cuvette)的 8000-系列 SLM-Aminco 分光光度计(ThermoSpectronic 公司))测量的。根据这项技术的“结合速率”(“on-rate”)或“缔合的速率”(“rate of association”)或“ k_{on} ”也可以使用如上所述的 BIAcore™-2000 或 BIAcore™-3000 (BIAcore 公司,皮斯卡塔韦(Piscataway),新泽西州)用以上所述的相同的表面等离子体共振技术来确定。

[0219] 适用于确定所呈现的分离抗体或其抗原结合片段或其改变/突变的衍生物(以下讨论)的结合特征的方法和试剂在本领域中是已知的和/或是可商购的。被设计用于此类动力学分析的设备 and 软件是可商购的(例如, **Biacore®** A100, 和 **Biacore®** 2000 仪器; Biacore International AB, 乌普萨拉(Uppsala), 瑞典)。

[0220] 在一些实施例中,可以将结合测定作为直接结合测定或者作为竞争结合测定而进行。可以使用标准 ELISA 或标准流式细胞术测定来检测结合。在直接结合测定中,测试了候选抗体与 α 毒素抗原的结合。在另一方面,竞争结合测定评定了候选抗体与已知的抗 α 毒素抗体或片段或其他结合 α 毒素的化合物(例如,受体、抑制剂)竞争的能力。通常,任何允许抗体与能被检测的 α 毒素结合的方法被包含在用于检测和测量抗体的结合特征的技术的范围内。还可以采用这些方法来筛选提供所希望的特征的那些的一组抗体。

[0221] 在某些实施例中,分离抗体或其抗原结合片段免疫特异性地结合至 α 毒素并且具有选自下组的一种或多种特征,该组由以下各项组成:

[0222] (a) 对于 α 毒素大约 13nM 或更小的亲和常数(K_D);

[0223] (b) 结合至 α 毒素单体,但不抑制 α 毒素结合至 α 毒素受体;

[0224] (c) 以至少 50%、60%、70%、80%、90% 或 95% 抑制 α 毒素寡聚体的形成；

[0225] (d) 以至少 50%、60%、70%、80%、90% 或 95% 降低 α 毒素的细胞溶解活性(例如,如通过细胞溶解和溶血试验所确定)；

[0226] (e) 减少细胞浸润和促炎细胞因子释放(例如,在一种动物肺炎模型中)。

[0227] 在一些实施例中,分离抗体或其抗原结合片段以由解离常数(K_D)表征的亲合力而结合抗原(例如 α 毒素),该解离常数在大约 0.01nM 至大约 50nM、0.05nM、0.1nM、0.5nM、1nM、5nM、10nM、20nM、30nM、或 40nM 的范围内。

[0228] 功能特征

[0229] 在某些实施例中,抗 α 毒素抗体或片段改变 α 毒素和 / 或表达 α 毒素的细胞的生物特性。在一些实施例中,抗 α 毒素抗体或片段通过结合至多肽以及抑制 α 毒素单体组装成跨膜孔(例如, α 毒素七聚体)而中和 α 毒素的生物活性。可以用本领域已知的、在一些情况下使用可商购试剂的方法来进行中和测定。 α 毒素的中和常常是用 1×10^{-6} M 或更小、 1×10^{-7} M 或更小、 1×10^{-8} M 或更小、 1×10^{-9} M 或更小、 1×10^{-10} M 或更小以及 1×10^{-11} M 或更小的 IC50 来度量的。在某些实施例中,当免疫特异性地结合至金黄色葡萄球菌 α 毒素的抗体或抗原结合片段是在如实例 3-6 中所述的浓度时发生中和。在某些实施例中,抗 α 毒素抗体或片段中和 α 毒素寡聚化并形成跨膜孔的能力。术语“抑制浓度 50%”(缩写为“IC50”)表示用于抑制剂靶向的分子的给定活性(例如,形成跨膜孔七聚体复合体的 α 毒素寡聚化)的 50% 抑制所需要的抑制剂(例如,在此提供的抗 α 毒素抗体或片段)的浓度。较低的 IC50 值通常相应于更有效的抑制剂。

[0230] 在某些实施例中,抗 α 毒素抗体或片段抑制 α 毒素的一种或多种生物活性。如在此使用的术语“抑制”是指任何统计学显著的生物活性的降低,包括活性的完全阻断。例如,“抑制”可以指生物活性大约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、或 100% 的降低。在某些实施例中,抗 α 毒素抗体或片段以至少 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、或 100% 抑制 α 毒素的一种或多种生物活性。

[0231] 在一些实施例中,抗 α 毒素抗体或片段可以耗尽由病原性金黄色葡萄球菌分泌的 α 毒素。在一些实施例中,抗 α 毒素抗体或片段可以实现由金黄色葡萄球菌分泌的 α 毒素的至少大约 20%、至少大约 30%、至少大约 40%、至少大约 50%、至少大约 60%、至少大约 70%、至少大约 80%、至少大约 90%、至少大约 95%、或大约 100% 的耗尽。在具体实施例中,几乎所有可检测的分泌的 α 毒素从金黄色葡萄球菌感染的细胞耗尽。

[0232] 在某些实施例中,抗 α 毒素抗体或片段可以体外抑制刺激的 α 毒素活性(例如,受体结合、寡聚化)和 / 或表达或分泌 α 毒素的细胞的增殖。抗 α 毒素抗体或片段有时以至少大约 10%、至少大约 20%、至少大约 30%、至少大约 40%、至少大约 50% 或至少大约 75% 抑制体外 α 毒素活性,即金黄色葡萄球菌致病性。用于测量细胞增殖、致病性以及 α 溶血素活性的方法在本领域是已知的。

[0233] 在某些实施例中,抗 α 毒素抗体或片段可以抑制一种或多种可诱导基因的表达,这些可诱导基因直接或间接响应于由金黄色葡萄球菌感染和 / 或 α 毒素表达和功能所创造的环境。在具体实施例中,抗 α 毒素抗体或片段以至少 20%、以至少 30%、以至少 40%、以至少 50%、以至少 60%、以至少 70%、以至少 80%、以至少 90%、以至少 100%、以至少 120%、以至少 140%、以至少 160%、以至少 180%、或以至少 200% 抑制一种或多种可诱导基因的表达,这些

可诱导基因直接或间接响应于由金黄色葡萄球菌和 / 或 α 毒素表达和功能所创造的环境。

[0234] 抗 α 毒素抗体和片段的产生

[0235] 以下描述了用于产生抗体的示例性技术。用于产生抗体的 α 毒素抗原可以是例如包含涉及寡聚化的 α 毒素肽序列的肽片段。可以使用包含 SEQ ID NO:39 的天然金黄色葡萄球菌毒素或包含 SEQ ID NO:40 的突变体 α 毒素、变体或抗原性片段而产生针对 α 毒素的抗体。表达并分泌 α 毒素的金黄色葡萄球菌细胞还可以用来产生抗体。 α 毒素的核苷酸和氨基酸序列的实例是可获得的,如提供于例如表 10 中。可以使用标准重组 DNA 技术,以来自细菌或真核细胞的分离形式重组地产生 α 毒素。 α 毒素可以被表达为带标签(例如,表位标签)的蛋白或其他融合蛋白(例如,GST 融合),以便促进在不同测定中的分离和鉴定。结合至不同标签和融合序列的抗体或结合蛋白是可获得的,如下文详尽阐述。也可以使用其他形式的产生抗体有用的 α 毒素。

[0236] 不同的标签多肽和它们的对应的抗体在本领域是已知的。实例包括聚-组氨酸(poly-his)或聚-组氨酸-甘氨酸(poly-his-gly)标签;flu HA 标签多肽及其抗体 12CA5;c-myc 标签及其 8F9、3C7、6E10、G4、B7 和 9E10 抗体;以及单纯疱疹病毒糖蛋白 D (gD) 标签及其抗体。FLAG-肽被抗 FLAG-M2 单克隆抗体识别。可以通过免疫亲和层析进行含 FLAG 肽的蛋白质的纯化,该免疫亲和层析使用包含共价连接至琼脂糖的抗 FLAG M2 单克隆抗体的亲和基质。其他标签多肽包括 KT3 表位肽; α -微管蛋白表位肽;以及 T7 基因 10 蛋白肽标签。

[0237] 可以通过本领域已知的不同程序而产生针对感兴趣抗原的多克隆抗体。例如,可以将 α 毒素多肽或其免疫原性片段给予至不同的宿主动物,包括但不限于兔、小鼠、大鼠、等等,从而诱导含有对抗原具有特异性的多克隆抗体的血清的产生。取决于宿主物种,可以而使用不同的佐剂来增加免疫应答,并且这些佐剂包括但不限于弗氏佐剂(Freund's)(完全的和不完全的)、矿物胶(例如,氢氧化铝)、表面活性物质(例如溶血卵磷脂)、普卢兰尼克多元醇(pluronic polyol)、聚阴离子、肽、油乳剂、钥孔虫戚血蓝蛋白、二硝基苯酚、以及潜在有用的人用佐剂(例如 BCG (卡介苗))以及短小棒状杆菌。此类佐剂在本领域也是已知的。

[0238] 可以通过相关抗原和佐剂的多重皮下(sc)或腹膜内(ip)注射而在动物中产生多克隆抗体。可以有用的是将相关抗原(尤其是在使用合成肽时)结合至一种在有待免疫的物种中为免疫原性的蛋白质。例如,可以使用双功能剂或衍生剂(反应基团),例如活化酯(通过半胱氨酸或赖氨酸残基的结合)、戊二醛、琥珀酸酐、 SOCl_2 、或 $\text{R}_1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ (其中 R 和 R_1 是不同的烷基基团),将抗原结合至钥孔虫戚血蓝蛋白(KLH)、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白、或大豆胰蛋白酶抑制剂。结合物还可以作为融合蛋白产生于重组细胞培养物中。

[0239] 典型地,通过将适当浓度的抗原或结合物与佐剂进行组合并且将溶液在多个部位注射而针对抗原、免疫原性结合物、或衍生物使动物免疫。还可以如在实例 1 中所述进行免疫(免疫/杂交瘤产生)。

[0240] 可以使用本领域已知的多种多样的技术来制备单克隆抗体,包括使用杂交瘤、重组体、以及噬菌体展示技术、或其组合。在此所使用的术语“单克隆抗体”是指从基本上同种或分离的抗体的群体中获得的一种抗体,例如单独的抗体,这些抗体包括除了可能天然存在的突变(可能以少量存在)之外的相同的群体。单克隆抗体类在多特异性的工程化抗

体的情况下针对单个抗原位点或多个抗原位点是高度特异性的。而且,与包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂相反,每种单克隆抗体是针对该抗原上的相同决定簇的。除了它们的特异性之外,单克隆抗体是有利的,因为它们可以在不被其他抗体污染的情况下被合成。修饰词“单克隆”不应当被理解为需要通过任何特定的方法而产生抗体。以下是用于产生单克隆抗体的代表性方法的描述(不是旨在为限制性的),并且可以用来产生例如单克隆哺乳动物的、嵌合的、人源化的、人的结构域、双抗体(diabody)、疫苗体(vaccibody)、线性和多特异性抗体。

[0241] 用于使用杂交瘤技术产生并筛选特异性抗体的方法在本领域是常规的和已知的。在杂交瘤方法中,小鼠或其他适当的宿主动物(例如仓鼠)如上所述被免疫从而引出淋巴细胞,这些淋巴细胞产生或能够产生将特异性结合至用于免疫的抗原的抗体。可替代地,淋巴细胞可以被体外免疫。在免疫之后,分离淋巴细胞,并且然后使用适合的融合剂或融合配偶体(例如聚乙二醇)与骨髓瘤细胞系融合从而形成杂交瘤细胞。在某些实施例中,选择的骨髓瘤细胞是有效融合、支持由所选择的抗体产生细胞的稳定高水平抗体产生、并且对针对未融合的亲代细胞而选择的选择性培养基敏感的那些骨髓瘤细胞。在一方面,骨髓瘤细胞系是鼠类骨髓瘤系,例如衍生自从美国加利福尼亚州圣地亚哥的索尔克研究所细胞分配中心(Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, USA)可获得的MOPC-21和MPC-11小鼠肿瘤的、以及从美国马里兰州罗克维尔的美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA)可获得的SP-2和衍生物如X63-Ag8-653细胞的那些鼠类骨髓瘤系。人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系也已经被描述用于人单克隆抗体的产生。

[0242] 一旦产生具有所希望的特异性、亲和力、和/或活性的抗体的杂交瘤细胞被鉴定,则可以通过有限稀释程序而将这些克隆进行亚克隆并且通过标准方法使其生长。用于这个目的的适合的培养基包括例如D-MEM或RPMI-1640培养基。另外,杂交瘤细胞可以在一种动物中体内生长为腹水瘤,例如通过将细胞腹膜内(i.p.)注射进入小鼠。

[0243] 将由亚克隆分泌的单克隆抗体通过常规抗体纯化程序(例如,如亲和力层析(例如使用蛋白A或蛋白G-琼脂糖凝胶)或离子交换层析、亲和标签、羟基磷灰石色谱、凝胶电泳、透析、等等)而从培养基、腹水液、或血清适当地分离。在下文更详细地描述示例性的纯化方法。

[0244] 重组DNA技术

[0245] 用于使用重组DNA技术而产生和筛选特异性抗体的方法在本领域是常规的和已知的。可以容易地使用常规程序(例如,通过使用能够特异结合至编码鼠抗体的重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)将编码单克隆抗体的DNA分离和/或测序。一旦分离,可以将DNA放在表达载体中,进而将其转染到宿主细胞中,例如大肠杆菌细胞、猴COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、或不以另外的方式产生抗体蛋白的骨髓瘤细胞,从而在重组宿主细胞中获得单克隆抗体的合成。如下对于通过噬菌体展示和抗体人源化所产生的抗体所述的,可以从除了杂交瘤之外的产生抗 α 毒素抗体或片段的一种或多种来源获得用于重组抗体的DNA或基因材料。

[0246] 抗体或其变体的重组表达常常需要包含编码抗体的多核苷酸的表达载体的构建。在此提供了可复制的载体,这些载体包含可操作地连接至启动子的编码抗体分子、抗体重

链或轻链、抗体的重链或轻链可变域或其部分、或者重链或轻链 CDR 的核苷酸序列。此类载体可以包含编码抗体分子恒定区的核苷酸序列,并且可以将抗体可变域克隆到这种载体中,以用于表达整个重链、整个轻链、或整个重链和轻链两者。

[0247] 一旦通过常规技术将表达载体转移至宿主细胞,然后通过常规技术培养转染的细胞以产生抗体。因此,在此提供了包含可操作地连接至异源性启动子的编码在此的所呈现的分离抗体或其抗原结合片段或其片段、或其重链或轻链、或其部分、或单链抗体的多核苷酸的宿主细胞。在某些用于表达双链抗体的实施例中,可以将编码重链和轻链的载体在宿主细胞中共表达,以用于表达整个免疫球蛋白分子,如下所详述。

[0248] 作为表达重组抗体的宿主的可获得哺乳动物细胞系在本领域是已知的,并且包括许多从美国典型培养物保藏中心(ATCC)获得的永生化细胞系,包括但不限于中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、海拉细胞、幼仓鼠肾(BHK)细胞、猴肾细胞(COS)、人肝细胞癌细胞(例如,Hep G2)、人上皮肾 293 细胞、以及多种其他细胞系。不同的宿主细胞具有针对蛋白质和基因产物的翻译后加工和修饰的特有的和特异性的机制。可以选择适当的细胞系或宿主系统以确保所表达的抗体或其部分的正确修饰和加工。为此,可以使用具有用于初级转录物的适当加工、基因产物的糖基化、以及磷酸化的细胞机器(cellular machinery)的真核宿主细胞。此类哺乳动物宿主细胞包括但不限于 CHO、VERY、BHK、Hela、COS、MDCK、293、3T3、W138、BT483、Hs578T、HTB2、BT20 和 T47D、NS0 (不内源地产生任何功能性免疫球蛋白链的鼠骨髓瘤细胞系)、SP20、CRL7030 以及 HsS78Bst 细胞。在某些实施例中,通过使人淋巴细胞永生化而产生的人细胞系可以用来重组产生单克隆抗体。在一些实施例中,可以使用人细胞系 PER.C6. (CruCell, 荷兰) 以重组方式产生单克隆抗体。

[0249] 可以用作表达重组抗体的宿主的另外的细胞系包括但不限于昆虫细胞(例如 Sf21/Sf9, 粉纹夜蛾 Bti-Tn5b1-4) 或酵母细胞(例如啤酒酵母(*S. cerevisiae*), 毕赤酵母属, US7326681; 等等)、植物细胞(US20080066200); 以及鸡细胞。

[0250] 在某些实施例中,在此呈现的抗体被表达在具有抗体稳定表达的细胞系中。稳定表达可以用于重组蛋白的长期、高产量生产。例如,可以产生稳定表达抗体分子的细胞系。可以用适当的包含表达控制元件(例如,启动子、增强子、转录终止子、聚腺苷酸化位点,等等)和选择标记基因的工程化载体转化宿主细胞。在引入外源 DNA 后,可以允许细胞在富集培养基中生长 1-2 天,并且然后切换至选择性培养基。在重组质粒中的选择性标记赋予对选择的抗性,并且允许将质粒稳定整合进其染色体中的细胞生长并且形成病灶,进而可以将其克隆并且扩充成细胞系。用于以高产量产生稳定细胞系的方法在本领域是已知的,并且试剂通常是可商购的。

[0251] 在某些实施例中,在此呈现的抗体被表达于具有抗体的瞬时表达的细胞系中。瞬时转染是这样一种方法:在该方法中将核酸引入一种细胞但不整合入那种细胞的基因组或染色体 DNA 中。核酸常常被维持为细胞中的染色体外因子,例如,作为附加体。附加体的核酸的转录过程不受影响,并且由附加体的核酸编码的蛋白质被产生。

[0252] 可以被稳定或瞬时转染的细胞系被维持在导致单克隆抗体表达和产生的、本领域已知的细胞培养基和条件中。在某些实施例中,哺乳动物细胞培养基是基于可商购的培养基配方,包括例如 DMEM 或汉姆氏(Ham's) F12。在一些实施例中,将细胞培养基进行改变以支持细胞生长和生物蛋白表达两者的增长。如在此使用的术语“细胞培养基”、“培

培养基”、以及“培养基配方”是指在多细胞生物或组织以外的人工体外环境中用于细胞的维持、生长、繁殖、或扩充的营养液。可以将细胞培养基进行优化以用于特定的细胞培养用途,包括例如,被配制为促进细胞生长的细胞培养物生长培养基,或者被配制为促进重组蛋白产生的细胞培养物生产培养基。术语营养素(nutrient)、成分(ingredient)、以及组分(component)在此可互换地使用,是指组成细胞培养基的组分(constituent)。

[0253] 在不同的实施例中,使用补料分批法维持细胞系。如在此使用的“补料分批法”是指在首先用基础培养基培养之后,用另外的营养素供应给补料分批细胞培养物的方法。例如,补料分批法可以包括根据所确定的补料时间表在给定时期内添加补充培养基。因而,“补料分批细胞培养”是这样一种细胞培养:最初将细胞(典型地为哺乳动物细胞)和培养基供应至培养容器,并且在培养期间,连续地或以不连续递增方式将另外的培养营养素馈送至培养物,伴随或不伴随在培养终止之前的定期的细胞和/或产物的收获。

[0254] 使用的细胞培养基以及其中包含的营养素在本领域是已知的。在一些实施例中,细胞培养基包含基础培养基以及产生改良的基础培养基的至少一种水解产物,例如基于大豆的水解产物、基于酵母的水解产物、或这两种类型的水解产物的组合。另外的营养素可以有时候仅包含基础培养基,例如浓缩的基础培养基,或者可以仅包含水解产物、或浓缩的水解产物。适合的基础培养基包括但不限于达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM)、DME/F12、极限必需培养基(MEM)、伊格尔基础培养基(BME)、RPMI1640、F-10、F-12、 α -极限必需培养基(α -MEM)、格拉斯哥极限必需培养基(G-MEM)、PF CHO (参见,例如,用于无蛋白质的 CHO 细胞(SAFC 生物科学公司)的 CHO 无蛋白质培养基(西格玛)或 EX-CELLTM325PF CHO 无血清培养基)、以及伊斯科夫改良达尔伯克培养基(Iscove's Modified Dulbecco's Medium)。可以用于在此的技术的基础培养基的其他实例包括 BME 基础培养基;达尔伯克改良伊格尔培养基(DMEM, 粉末)(Gibco-Invitrogen#31600)。在某些实施例中,基础培养基可以是无血清的,意味着该培养基包括不含血清(例如,胎牛血清(FBS)、马血清、山羊血清、或本领域已知的任何其他动物衍生的血清)或没有动物蛋白的培养基或化学限定培养基。

[0255] 可以改良基础培养基以便去除某些在标准基础培养基中发现的非营养组分,例如不同的无机和有机缓冲液、一种或多种表面活性剂、以及氯化钠。此类组分从基础细胞培养基的去除允许剩余营养组分的增加的浓度,并且可以改进总体的细胞生长和蛋白质表达。另外,可以根据细胞培养条件的要求,将省去的组分添加回到包含改良的基础细胞培养基的细胞培养基中。在某些实施例中,细胞培养基包含改良的基础细胞培养基以及至少一种以下营养素:铁源、重组生长因子;缓冲液;表面活性剂;渗透性调节剂;能源;以及非动物水解产物。另外,改良的细胞培养基可以任选地包含氨基酸、维生素、或氨基酸和维生素两者的组合。在一些培养基中,改良的基础培养基进一步包含谷氨酰胺,例如 L-谷氨酰胺和/或氨甲蝶呤。

[0256] 在一些实施例中,通过使用本领域已知的补料分批、分批、灌注的生物反应器工艺或连续进料生物反应器方法而大量地进行抗体产生。大规模生物反应器具有至少 1000 升的容量,有时大约 1,000 至 100,000 升的容量。这些生物反应器可以使用叶轮搅拌器来分布氧和营养素。小规模生物反应器通常是指在不大于大致 100 升的体积容量中的细胞培养,并且范围可以是大约 1 升至大约 100 升。可替代地,一次性生物反应器(SUB)可以用于

大规模或小规模培养。

[0257] 温度、pH、搅拌、通气以及接种密度可以取决于所使用的宿主细胞以及有待表达的重组蛋白而不同。例如,重组蛋白细胞培养可被维持在 30℃与 45℃之间的温度。可以在培养过程期间监测培养基的 pH,以使得 pH 停留在最佳水平,对于某些宿主细胞该最佳水平可以是在 6.0 至 8.0 的 pH 范围内。叶轮驱使的混合可以用于搅拌的此类培养方法。叶轮的转速可以大致是 50 至 200cm/秒叶尖速度,但可以取决于正被培养的宿主细胞的类型而使用本领域已知的其他气升或其他混合/曝气系统。提供充足的曝气从而在培养物维持中大致 20%至 80%的空气饱和度的溶解氧浓度,这个溶解氧浓度再次取决于正被培养的所选择的宿主细胞。可替代地,生物反应器可以直接将空气或氧气喷射到培养基中。存在供氧的其他方法,包括使用中空纤维膜曝气器的无泡曝气系统。

[0258] 噬菌体展示技术

[0259] 在一些实施例中,可以使用如本领域已知的技术将单克隆抗体或抗体片段从所产生的抗体噬菌体文库分离。在这样的方法中,抗 α 毒素抗体或片段可以通过重组组合抗体文库(有时为 scFv 噬菌体展示文库)的筛选而分离,这些文库是使用从衍生自人淋巴细胞的 mRNA 制备的人 VL 和 VH cDNA 制备的。用于制备和筛选此类文库的方法学在本领域是已知的。

[0260] 抗体纯化和分离

[0261] 一旦抗体分子已经通过重组或杂交瘤表达而产生,可以通过本领域任何已知的用于免疫球蛋白分子纯化的方法将其纯化,例如,通过色谱法(例如,离子交换,特别是通过对于特定抗原蛋白 A 或蛋白 G 的亲力的亲和色谱,以及尺寸柱色谱(sizing column chromatography))、离心、差别溶解度,或者通过用于蛋白质纯化的任何其他标准技术。此外,本技术的抗体或其片段可以融合至以上所述的或者本领域另外已知的异源多肽序列(在此称为“标签”),以便促进纯化。

[0262] 人源化抗体

[0263] 在某些实施例中,本技术的抗体是人源化抗体,是使用本领域已知的方法产生的。人源化抗体可以是嵌合抗体。嵌合抗体是这样的抗体:其中重链和/或轻链的一部分与衍生自特定物种的或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,而这些链的另一部分与衍生自另一物种的或属于另一个抗体类别或亚类的抗体、以及这样的抗体的片段中的相应序列相同或同源,只要它们展现出所希望的生物活性即可。在此感兴趣的嵌合抗体包括“灵长类化”(“primatized”)抗体,这种“灵长类化”抗体包含从非人灵长类(例如,旧世界猴,如狒狒、恒河猴或食蟹猴)衍生的可变域抗原结合序列和人恒定区序列。

[0264] 人抗体

[0265] 作为对人源化的替代方案,可以使用本领域已知的方法来产生人抗体。人抗体避免了一些与具有小鼠或大鼠可变区和/或恒定区的抗体相关的问题。这种小鼠或大鼠衍生的蛋白质的存在可以导致抗体的快速清除或可以导致患者产生针对该抗体的免疫应答。为了避免小鼠或大鼠衍生的抗体的使用,可以通过将功能性人抗体基因座引入啮齿类动物、其他哺乳动物或动物而产生全人抗体,使得该啮齿类动物、其他哺乳动物或动物产生全人抗体。

[0266] 例如,现在可能的是生产能在免疫后在不存在内源性免疫球蛋白产生的情况下产

生全套人抗体的转基因动物(例如,小鼠)。例如,已经描述了在嵌合和种系突变小鼠中的抗体重链连接区(JH)基因的纯合性缺失导致内源性抗体产生的完全抑制。将人种系免疫球蛋白基因阵列转移至这种种系突变小鼠中将导致抗原激发后人抗体的产生。在实践中,使用已经被工程化为含有高达但小于 1000kb 大小的种系的小鼠 **XenoMouse®** 品系,配置人重链基因座和 κ 轻链基因座的片段。**XenoMouse®** 品系可从 Amgen 公司商购(弗里蒙特,加利福尼亚州)。

[0267] 小鼠 **XenoMouse®** 品系的产生以及在那些小鼠中产生的抗体在本领域是已知的。基本上,用感兴趣的抗原(例如, α 毒素)免疫小鼠 **XenoMouse®** 品系,从超免疫小鼠回收淋巴细胞(如 B 细胞),并且将回收的淋巴细胞与髓系细胞系(myeloid-type cell line)融合,从而使用本领域已知的以上所述的技术制备永生杂交瘤细胞系。将这些杂交瘤细胞系进行筛选并且选择以便鉴定产生对感兴趣的抗原具有特异性的抗体的杂交瘤细胞系。

[0268] 在可替代的途径即微基因座(minilocus)途径中,通过包含来自 Ig 基因座的碎片(单独的基因)模拟外源 Ig 基因座。因此,一种或多种 VH 基因、一种或多种 DH 基因、一种或多种 JH 基因、 μ 恒定区、以及通常一个第二恒定区(例如, γ 恒定区)形成用于插入动物中的构建体。

[0269] 来自小鼠的人抗体的产生是本领域已知的,在这些小鼠中通过微细胞融合,已经导入大片的染色体、或整个染色体。另外,已经产生 KM^{TM} -小鼠,这些小鼠是 Kirin's Tc 小鼠与 Medarex's 微基因座(Humab)小鼠杂交育种的结果。这些小鼠具有 Kirin 小鼠的人 IgH 转染色体(transchromosome)以及 Genpharm 小鼠的 κ 链转基因。

[0270] 还可以通过体外方法衍生人抗体。适合的实例包括但不限于噬菌体展示(医学免疫公司(MedImmune, 以前为 CAT)、莫弗西斯生物公司(Morphosys)、Dyax、Biosite/Medarex、Xoma、Symphogen、亚力兄公司(Alexion, 以前为 Proliferon)、Affimed)、核糖体展示(MedImmune (以前为 CAT))、酵母展示、等等。可以使用噬菌体展示技术从来自未免疫供体的免疫球蛋白可变(V)结构域基因谱系体外产生人抗体和抗体片段。根据这项技术,抗体 V 结构域基因是以框内方式克隆到丝状噬菌体(例如 M13 或 fd)的主要或次要外壳蛋白基因中,并且在噬菌体颗粒的表面上展示为功能性抗体片段。因为丝状颗粒含有噬菌体基因组的单链 DNA 拷贝,基于抗体的功能特性的选择还导致编码展现那些特性的抗体的基因的选择。因而,噬菌体模拟 B 细胞的一些特性。能以多种型式进行噬菌体展示。若干 V 基因区段来源可以用于噬菌体展示。已经从衍生自免疫小鼠的脾脏的 V 基因的小随机组合文库分离抗恶唑酮抗体的不同阵列。可以构建来自未免疫人供体的 V 基因谱,并且可以遵循本领域已知的技术而基本上分离针对抗原(包括自身抗原)的不同阵列的抗体。如上所讨论,还可以由体外活化的 B 细胞产生人抗体。

[0271] 在免疫应答的成熟过程中,免疫球蛋白基因经历不同的修饰,包括在 V、D 和 J 基因区段之间的重组、同种型转换、以及可变区中的超突变。重组和体细胞超突变是产生抗体多样性和亲和力成熟的基础,但是它们还可以产生序列文库,这些序列文库可以使作为治疗剂的这种免疫球蛋白的商业生产有困难或者增加抗体的免疫原性风险。通常,虽然在框架区中的突变可以增加免疫原性的风险,CDR 区中的突变可能促成改进的亲和力和功能。这种风险可以通过将框架突变回复为种系而降低,同时确保抗体的活性未受不利影响。多样

化过程还可以产生一些结构文库,或这些结构文库可以存在于促成重链和轻链可变域的种系序列中。不论来源,可能希望的是将潜在的结构文库去除,这些结构文库可以导致产物的不稳定性、聚集、异质性、或者增加的免疫原性。不希望的文库的实例包括不成对的半胱氨酸(可以导致二硫键混乱或可变的巯基加合物形成)、N-连接糖基化位点(导致结构和活性的异质性)、以及脱酰胺作用(例如 NG、NS)、异构化(DG)、氧化(暴露的甲硫氨酸)、以及水解(DP)位点。

[0272] 因此,为了降低免疫原性的风险并且改进在实例 11、表 1-8 中披露的抗体的药学特性,可能希望的是将框架序列回复为种系、将 CDR 回复为种系、和 / 或去除结构倾向(structural liability)。因此,在一些实施例中,在特定的抗体在氨基酸水平上不同于其对应的种系序列的情况下,可以将抗体序列突变回种系序列。通过使用标准分子生物学技术,这种纠正突变可以在一个、二个、三个或更多个位置、或任何突变位置的组合处发生。

[0273] 另外的途径包括 **VelocImmune[®]** 技术(再生元制药公司(Regeneron Pharmaceuticals))。**Velocimmune[®]** 技术可以用来产生针对治疗感兴趣的靶标的全人单克隆抗体,并且涉及一种转基因小鼠的产生,该转基因小鼠具有可操作地连接至内源性小鼠恒定区基因座的、包含人重链和轻链可变区的基因组,使得小鼠响应于抗原性刺激而产生包含人可变区和小鼠恒定区的抗体。编码抗体重链和轻链的可变区的 DNA 被分离并且可操作地连接至编码人重链和轻链恒定区的 DNA。然后在能够表达全人抗体的细胞中得以表达该 DNA。参加,例如,美国专利号 6,596,541。

[0274] 抗体片段

[0275] 在某些实施例中,本发明抗体是抗体片段或包含这些片段的抗体。抗体片段包括全长抗体的一部分,通常是其抗原结合区或可变区。抗体片段的实例包括 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd 和 Fv 片段。双抗体;线性抗体,单链抗体分子;以及多特异性抗体是从这些抗体片段形成的抗体。

[0276] 在传统上,这些片段是使用本领域已知的技术、经由完整抗体的蛋白水解消化而衍生的。然而,现在可以通过重组宿主细胞直接产生这些片段。所有 Fab、Fv 和 scFv 抗体片段都可以表达在大肠杆菌中并且从其分泌,因而允许大量这些片段的容易生产。在一些实施例中,可以从以上讨论的抗体噬菌体文库分离抗体片段。可替代地,还可以将 Fab'-SH 片段直接从大肠杆菌回收,并且将其化学连接以形成 F(ab')₂ 片段。根据另一个途径,可以直接从重组宿主细胞培养物分离 F(ab')₂ 片段。其他用于产生抗体片段的技术是已知的。在一些实施例中,选择的抗体是单链 Fv 片段(scFv)。在某些实施方案中,抗体不是 Fab 片段。Fv 和 scFv 是具有缺乏恒定区的完整结合位点的唯一种类;因而,它们适用于在体内使用过程中减少非特异性结合。可以将 scFv 融合蛋白构建为在 scFv 的氨基端或羧基端产生效应蛋白融合。

[0277] 在某些实施例中,本发明的抗体是域抗体,例如相应于人抗体的重链可变区(VH)或轻链可变区(VL)的、包含抗体的小功能性结合单位的抗体。域抗体的实例包括但不限于从 Domantis 可获得的、对治疗靶标有特异性的那些域抗体。可以使用域抗体的可商购文库来鉴定抗 α 毒素抗体域抗体。在某些实施例中,抗 α 毒素抗体和片段包含 α 毒素功能性结合单位以及 Fc γ 受体功能性结合单位。

[0278] 在此的某些实施方案中,本发明的抗体是线性抗体。线性抗体包括一对串联的 Fd 区段(VH-CH1-VH-CH1),该 Fd 区段形成一对抗原结合区。线性抗体可以是双特异性的或单特异性的。

[0279] 某些氨基酸序列修饰

[0280] 除了以上所述的人、人源化和 / 或嵌合抗体之外,本技术还包括包含一种或多种以下项的抗 α 毒素抗体或片段的另外的修饰以及它们的变体和其片段:在可变轻链(VL)结构域和 / 或可变重链(VH)结构域和 / 或 Fc 区中的氨基酸残基和 / 或多肽置换、添加和 / 或缺失,以及翻译后修饰。包括在这些修饰中的是其中抗体已经共价连接至一个部分的抗体结合物。适用于连接至抗体的部分包括但不限于蛋白质、肽、药物、标记物、以及细胞毒素。可以作出针对抗体的这些改变从而改变或微调抗体的特征(例如,生物化学的、结合和 / 或功能性的),适用于治疗和 / 或诊断金黄色葡萄球菌相关的和 / 或 α 毒素介导的疾病。用于形成结合物、作出氨基酸和 / 或多肽改变以及翻译后修饰的方法在本领域是已知的,其中一些在下文详述。可以作出缺失、插入、以及置换的任何组合以获得最终的构建体,其条件是最终的构建体具有所希望的特征。

[0281] 针对抗体的氨基酸变化导致产生与在此所述的抗体序列或亲本抗体序列小于 100% 一致的序列。在某些实施例中,在这种情况下,抗体可以具有与如在此所述的抗 α 毒素抗体的重链或轻链可变域或片段的氨基酸序列大约 25% 至大约 95% 的序列一致性。因而,在一些实施例中,修饰的抗体可以具有这样一种氨基酸序列:该氨基酸序列具有与如在此所述的抗 α 毒素抗体的重链或轻链可变域或片段的氨基酸序列至少 25%、35%、45%、55%、65%、75%、80%、85%、90%、或 95% 的氨基酸序列一致性或相似性。在某些实施例中,改变的抗体具有这样一种氨基酸序列:该氨基酸序列具有与如在此所述的抗 α 毒素抗体的重链或轻链 CDR1、CDR2、或 CDR3 或片段的氨基酸序列至少 25%、35%、45%、55%、65%、75%、80%、85%、90%、或 95% 的氨基酸序列一致性或相似性。改变的抗体可以有时具有这样一种氨基酸序列:该氨基酸序列具有与如在此所述的抗 α 毒素抗体的重链或轻链 FR1、FR2、FR3 或 FR4 或片段的氨基酸序列至少 25%、35%、45%、55%、65%、75%、80%、85%、90%、或 95% 的氨基酸序列一致性或相似性。

[0282] 在某些实施例中,通过引入抗体的一个或多个可变区中的一种或多种氨基酸改变(例如,置换、缺失和 / 或添加)而产生改变的抗体。在不同实施例中,氨基酸改变被引入框架区。框架区残基的一种或多种改变可以导致对于抗原的抗体的结合亲和力的改进。当这些变化是针对人源化抗体(不同于 CDR 区,框架区可以来自不同的物种)做出时,尤其如此。要修饰的框架区残基的实例包括非共价直接结合抗原、与 CDR 的构象相互作用 / 影响 CDR 构象、和 / 或参与 VL-VH 界面的那些残基。在一些实施例中,可以改变从大约一个至大约五个框架残基。有时,甚至在没有任何高变区残基已被改变时,这可能足以产生适合于在临床前试验中使用的抗体突变体。然而,通常改变的抗体将包含另外的一种或多种高变区改变。在某些实施例中,可以随机改变高变区残基,尤其是在针对来自第二哺乳动物种类的抗原的抗 α 毒素抗体或片段的起始结合亲和力是使得如此随机产生的抗体可以容易地被筛选的情况下。

[0283] 一个有用的用于产生改变的抗体的程序称为“丙氨酸扫描诱变”。在这种方法中,一个或多个高变区残基被丙氨酸或聚丙氨酸残基替换,从而改变氨基酸与 α 毒素的相互

作用。然后,对于置换显示功能敏感度的那些高变区残基通过在(或针对)置换位点引入另外的或其他突变而被改善(refined)。因此,尽管用于引入氨基酸序列变异的位点被预先确定,本身突变的本性不需要预先确定。如在此所述,针对以此方式产生的Ala突变体的生物活性来筛选它们。

[0284] 在某些实施例中,置换变体涉及置换亲本抗体(例如,人源化或人抗体)的一个或多个高变区残基。通常,所得的被选择用于进一步开发的一种或多种变体相对于它们从其产生的亲本抗体而言将具有改进的生物特性。用于产生此类置换变体的方便的方式涉及使用噬菌体的亲和力成熟。简言之,若干高变区位点(6-7个位点)被突变以在每个位点产生所有可能的氨基酸置换。因而产生的抗体突变体被展示为来自丝状噬菌体颗粒的、作为与包装在每个颗粒中的M13的基因III产物融合的单价形式。然后,如在此披露,针对噬菌体展示突变体的生物活性(例如,结合亲和力)来筛选它们。

[0285] 在抗体序列中的突变可以包括置换、缺失(包括内部缺失)、添加(包括产生融合蛋白的添加)、或在氨基酸序列之内和/或邻近处的氨基酸残基的保守性置换,但是那导致“沉默”改变,导致这种改变产生功能相当的抗 α 毒素抗体或片段。可以在涉及残基的极性、电荷、溶解度、疏水性、亲水性、和/或两亲性的相似性的基础上做出保守性氨基酸置换。例如,非极性(疏水)氨基酸包括丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、以及甲硫氨酸;极性中性氨基酸包括甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺、以及谷氨酰胺;带正电荷的(碱性)氨基酸包括精氨酸、赖氨酸、以及组氨酸;以及带负电荷的(酸性)氨基酸,包括天冬氨酸和谷氨酸。另外,甘氨酸和脯氨酸是能影响链取向的残基。非保守性置换将使得必需将这些类别之一的成员与另一类别中的成员交换。此外,如果希望的话,非典型氨基酸或化学氨基酸类似物可以作为置换或添加而被引入抗体序列中。非典型氨基酸大体上包括但不限于普通氨基酸的D-异构体、 α -氨基异丁酸、4-氨基丁酸、Abu、2-氨基丁酸、 γ -Abu、 ϵ -Ahx、6-氨基己酸、Aib、2-氨基异丁酸、3-氨基丙酸、鸟氨酸、正亮氨酸、正缬氨酸、羟脯氨酸、肌氨酸、瓜氨酸、磺基丙氨酸、叔丁基甘氨酸、叔丁基丙氨酸、苯基甘氨酸、环己基丙氨酸、 β -丙氨酸、氟代氨基酸、设计者(designer)氨基酸(例如 β -甲基氨基酸、C- α -甲基氨基酸、N- α -甲基氨基酸、以及氨基酸类似物)。

[0286] 在某些实施例中,不涉及维持抗 α 毒素抗体或片段的适当构象的任何半胱氨酸残基还可以被(通常用丝氨酸)置换以改进分子的氧化稳定性并且预防异常交联。相反,可以将半胱氨酸键添加至抗体以改进它的稳定性(特别是在抗体是诸如Fv片段的抗体片段的情况下)。

[0287] 在一些实施例中,可以将抗体修饰为产生融合蛋白,即融合至异源蛋白质、多肽或肽的抗体或其片段。在不同实施例中,融合至抗体部分的蛋白质是抗体导向酶-前体药物治疗法(ADEPT)的酶组分。能被工程化为与抗体的融合蛋白的其他蛋白质或多肽的实例包括但不限于毒素(例如蓖麻毒素、相思豆毒素、核糖核酸酶、DNA酶I、葡萄球菌肠毒素-A、美洲商陆抗病毒蛋白、白树毒素、白喉毒素、假单胞菌外毒素、以及假单胞菌内毒素)。可以使用的酶活性毒素和其片段包括白喉A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素A链(来自铜绿假单胞菌)、蓖麻毒素A链、相思豆毒素A链、莨菪根毒素A链、 α -帚曲菌素、油桐蛋白、石竹素蛋白、美洲商陆蛋白(PAPI、PAPII、和PAP-S)、苦瓜抑制剂、麻风树毒蛋白、巴豆毒蛋白、肥皂草抑制剂、白树毒素、mitogellin、局限曲菌素、酚霉素、伊诺霉素、以及单端孢霉烯

类。

[0288] 可以通过已知的基因改组(gene-shuffling)、基序改组(motif-shuffling)、外显子改组、和/或密码子改组(统称为“DNA 改组”)技术产生另外的融合蛋白。可以采用 DNA 改组以改变抗体或其片段的特征(例如,具有较高亲和力以及较低的解离速率的抗体或其片段)。抗体可以进一步是如本领域已知的结合结构域免疫球蛋白融合蛋白。

[0289] 变体 Fc 区

[0290] 本发明还包括本发明的结合成员,以及尤其是具有修饰的 IgG 恒定域的本发明的抗体。具有多种功能特征(如在血清中的长半衰期和介导不同的效应子功能的能力)的人 IgG 类别的抗体被使用于本发明的某些实施例中(单克隆抗体:原理与应用(Monoclonal Antibodies:Principles and Applications),威利-利斯公司(Wiley-Liss, Inc.),第1章(1995))。人 IgG 类抗体被进一步分成以下4个亚类:IgG1、IgG2、IgG3 以及 IgG4。迄今为止,已经针对作为 IgG 类抗体的效应子功能的 ADCC 和 CDC 进行了大量的研究,并且据报道,在人 IgG 类的抗体中,IgG1 亚类在人体内具有最高的 ADCC 活性和 CDC 活性(化学免疫学(Chemical Immunology),65,88 (1997))。

[0291] “抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用”和“ADCC”是指这样一种细胞介导的反应:其中非特异性细胞毒性细胞(例如,自然杀伤细胞(NK)细胞、嗜中性粒细胞、以及巨噬细胞)识别靶细胞上的结合抗体并且随后导致该靶细胞溶解。在一个实施例中,这样的细胞是人细胞。虽然不希望被限制于任何具体的作用机制,但这些介导 ADCC 的细胞毒性细胞通常表达 Fc 受体(FcR)。用于介导 ADCC 的初级细胞(NK 细胞)表达 Fc γ RIII,而单核细胞表达 Fc γ RI、Fc γ RII、Fc γ RIII 和/或 Fc γ RIV。造血细胞上的 FcR 表达概述在 Ravetch(拉文奇)和 Kinet(基内特),Annu. Rev. Immunol. (免疫学年度评论),9:457-92 (1991)中。为了评定分子的 ADCC 活性,可以进行例如描述于美国专利号 5,500,362 或 5,821,337 中的体外 ADCC 测定。用于这类测定的有用的效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和自然杀伤(NK)细胞。可替代地或另外地,感兴趣的分子的 ADCC 活性可以在体内,例如在如 Clynes(克莱因斯)等人,Proc. Natl. Acad. Sci. (国家科学院院刊(美国)),95:652-656 (1998)中披露的动物模型中进行评定。

[0292] “补体依赖的细胞毒作用”或“CDC”是指在补体的存在下分子启动补体活化和溶解靶标的能力。通过补体系统的第一成分(C1q)结合至与同源抗原复合的分子(例如,抗体)而启动补体活化途径。为了评定补体活化,可以进行如在 Gazzano-Santaro 等人,J. Immunol. Methods (《免疫学方法杂志》),202:163 (1996)中描述的 CDC 测定。

[0293] 人 IgG1 亚类抗体的 ADCC 活性和 CDC 活性的表达通常涉及抗体的 Fc 区结合至存在于效应细胞(例如杀伤细胞、自然杀伤细胞或活化的巨噬细胞)表面上的针对抗体的受体(下文称为“Fc γ R”)。不同的补体成分可以被结合。关于结合,已经提出在铰链区中的若干氨基酸残基以及抗体 C 区的第二结构域(下文称为“C γ 2 结构域”)是重要的(Eur. J. Immunol. (《欧洲免疫学杂志》),23,1098 (1993),Immunology (《免疫学》),86,319 (1995),Chemical Immunology (《化学免疫学》),65,88 (1997)),并且在 C γ 2 结构域中的糖链(Chemical Immunology (《化学免疫学》),65,88 (1997))也是重要的。

[0294] “效应细胞”是表达一种或多种 FcR 并且执行效应子功能的白细胞。这些细胞至少表达 Fc γ RI、Fc γ RII、Fc γ RIII 和/或 Fc γ RIV,并且执行 ADCC 效应子功能。介导 ADCC

的人白细胞的实例包括外周血单核细胞(PBMC)、自然杀伤(NK)细胞、单核细胞、细胞毒性T细胞和嗜中性粒细胞。

[0295] 术语“Fc受体”或“FcR”用来描述结合至抗体Fc区的受体。在一个实施例中,FcR是天然序列人FcR。而且,在某些实施例中,FcR是结合IgG抗体的一种FcR(γ 受体),并且包括Fc γ RI、Fc γ RII、Fc γ RIII、和Fc γ RIV亚类的受体,这些受体包括等位基因变体以及这些受体的选择性剪接形式。Fc γ RII受体包括Fc γ RIIA(一种“活化受体”)和Fc γ RIIB(一种“抑制受体”),两者具有主要在其胞质结构域上不同的相似氨基酸序列。活化受体Fc γ RIIA在其胞质结构域中含有免疫受体酪氨酸活化基序(ITAM)。抑制受体Fc γ RIIB在其胞质结构域中含有免疫受体酪氨酸抑制基序(ITIM)。(参见Daëron, Annu. Rev. Immunol. (《免疫学年度评论》),15:203-234(1997))。FcR被综述于Ravetch(拉文奇)和Kinet(基内特), Annu. Rev. Immunol. (《免疫学年度评论》),9:457-92(1991);Capel(卡博尔)等人, Immunomethods (《免疫方法》),4:25-34(1994);以及de Haas(德哈斯)等人, J. Lab. Clin. Med. (《实验室临床医学杂志》),126:330-41(1995)中。由在此的术语“FcR”来涵盖其他的FcR,包括有待在将来鉴定的那些FcR。该术语还包括新生儿受体FcRn,其负责将母源IgG转移至胎儿(Guyer(盖耶)等人, Immunol. (《免疫学》),117:587(1976)以及Kim(金姆)等人, J. Immunol. (《免疫学杂志》),24:249(1994))。

[0296] 在某些实施例中,抗 α 毒素抗体或片段包含改变的Fc区(在此也被称为“变体Fc区”),其中已经在Fc区做出一种或多种改变以便改变抗体的功能特性和/或药物代谢动力学特性。这样的改变可以导致C1q结合以及依赖补体的细胞毒作用(CDC)、或者对于IgG的Fc γ R结合的减少或增加。本技术涵盖在此所述的具有变体Fc区的抗体,其中已经做出变化以便改变效应子功能,从而提供所希望的效应。因此,在一些实施例中,抗 α 毒素抗体或片段包括变体Fc区(即,如下所讨论的已经改变的Fc区)。在此的包含变体Fc区的抗 α 毒素抗体和片段在这里还被称为“Fc变体抗体”。如在此使用的,天然的是指未修饰的亲本序列,并且包含天然Fc区的抗体在此被称为“天然Fc抗体”。在一些实施例中,如与天然Fc区相比的,变体Fc区展现出相似的诱导效应子功能的水平。在某些实施例中,如与天然Fc区相比的,变体Fc区展现出较高的效应子功能的诱导作用。在某些实施例中,如与天然Fc区相比的,变体Fc区展现出较低的效应子功能的诱导作用。在此详述了变体Fc区的一些具体实施例。用于测量效应子功能的方法在本领域是已知的。

[0297] 可以通过Fc区的变化而改良抗体的效应子功能,这些变化包括但不限于氨基酸置换、氨基酸添加、氨基酸缺失以及对于Fc氨基酸的翻译后修饰(例如,糖基化)的变化。以下所述的方法可以用来改变如在此所述的分离抗体或抗原结合片段的效应子功能,导致具有某些有利于预防或治疗具体的金黄色葡萄球菌相关疾病或病症的特性的抗体或抗原结合片段。

[0298] 在一些实施例中,制备了相对于天然Fc抗体的已经改变了对于Fc配体(例如Fc受体,C1q)的结合特性的Fc变体抗体。结合特性的实例包括但不限于结合特异性、平衡解离常数(K_d)、解离和缔合速率(分别为 k_{off} 和 k_{on})、结合亲和力和/或抗体亲合力。在本领域已知的是平衡解离常数(K_d)被定义为 k_{off}/k_{on} 。在某些方面,相对于具有高 K_d 的抗体,包含具有低 K_d 的Fc变体区的抗体可能是更希望的。然而,在一些情况下,与 K_d 的值相比, k_{on} 或 k_{off} 的值可以更加有意义。可以确定的是哪个动力学参数对于给定抗体应用是更重要的。

[0299] 在一些实施例中,如与天然 Fc 抗体相比的,Fc 变体抗体展现出对于一种或多种 Fc 受体的改变的结合亲和力,这些 Fc 受体包括但不限于 FcRn、Fc γ RI (CD64) (包括同种型 Fc γ RIA、Fc γ RIB、和 Fc γ RIC);Fc γ RII (CD32,包括同种型 Fc γ RIIA、Fc γ RIIB、和 Fc γ RIIC);以及 Fc γ RIII (CD16,包括同种型 Fc γ RIIIA 和 Fc γ RIIB)。

[0300] 在某些实施例中,相对于天然 Fc 抗体,Fc 变体抗体具有增强的对一种或多种 Fc 配体的结合。在某些实施例中,Fc 变体抗体展现出增加或降低的对 Fc 配体的亲和力,该亲和力比天然 Fc 抗体所展现的对于 Fc 配体的亲和力高或低至少 2 倍、或至少 3 倍、或至少 5 倍、或至少 7 倍、或至少 10 倍、或至少 20 倍、或至少 30 倍、或至少 40 倍、或至少 50 倍、或至少 60 倍、或至少 70 倍、或至少 80 倍、或至少 90 倍、或至少 100 倍、或至少 200 倍、或是在 2 倍与 10 倍之间、或在 5 倍与 50 倍之间、或在 25 倍与 100 倍之间、或在 75 倍与 200 倍之间、或在 100 倍与 200 倍之间。在不同的实施例中,Fc 变体抗体展现的对 Fc 配体的亲和力比天然 Fc 抗体所展现的对 Fc 配体的亲和力高或低至少 90%、至少 80%、至少 70%、至少 60%、至少 50%、至少 40%、至少 30%、至少 20%、至少 10%、或至少 5%。在某些实施例中,Fc 变体抗体具有增加的对 Fc 配体的亲和力。Fc 变体抗体有时可以具有降低的对 Fc 配体的亲和力。

[0301] 在一些实施例中,Fc 变体抗体具有增强的对 Fc 受体 Fc γ RIIIA 的结合。在一些实施例中,Fc 变体抗体具有增强的对 Fc 受体 Fc γ RIIB 的结合。在某些实施例中,Fc 变体抗体具有增强的对 Fc 受体 Fc γ RIIIA 和 Fc γ RIIB 两者的结合。在某些实施例中,与天然的 Fc 抗体相比,具有增强的对 Fc γ RIIIA 的结合的 Fc 变体抗体在结合 Fc γ RIIB 受体方面不具有伴随的增加。在某些实施例中,Fc 变体抗体具有降低的对 Fc 受体 Fc γ RIIIA 的结合。Fc 变体抗体有时可以具有降低的对 Fc 受体 Fc γ RIIB 的结合。在不同的实施例中,展现出改变的对 Fc γ RIIIA 和 / 或 Fc γ RIIB 的亲合力的 Fc 变体抗体具有增强的对 Fc 受体 FcRn 的结合。在一些实施例中,相对于天然 Fc 抗体,展现出改变的对 Fc γ RIIIA 和 / 或 Fc γ RIIB 的亲合力的 Fc 变体抗体具有改变的对 Clq 的结合。

[0302] 在某些实施例中,Fc 变体抗体展现的对 Fc γ RIIIA 受体的亲和力比天然 Fc 抗体所展现的对 Fc γ RIIIA 受体的亲和力高或低至少 2 倍、或至少 3 倍、或至少 5 倍、或至少 7 倍、或至少 10 倍、或至少 20 倍、或至少 30 倍、或至少 40 倍、或至少 50 倍、或至少 60 倍、或至少 70 倍、或至少 80 倍、或至少 90 倍、或至少 100 倍、或至少 200 倍、或在 2 倍与 10 倍之间、或在 5 倍与 50 倍之间、或在 25 倍与 100 倍之间、或在 75 倍与 200 倍之间、或在 100 倍与 200 倍之间。在不同的实施例中,Fc 变体抗体展现的对 Fc γ RIIIA 的亲和力比天然 Fc 抗体所展现的对 Fc γ RIIIA 的亲和力高或低至少 90%、至少 80%、至少 70%、至少 60%、至少 50%、至少 40%、至少 30%、至少 20%、至少 10%、或至少 5%。

[0303] 在某些实施例中,Fc 变体抗体展现的对 Fc γ RIIB 受体的亲和力比天然 Fc 抗体所展现的对 Fc γ RIIB 受体的亲和力高或低至少 2 倍、或至少 3 倍、或至少 5 倍、或至少 7 倍、或至少 10 倍、或至少 20 倍、或至少 30 倍、或至少 40 倍、或至少 50 倍、或至少 60 倍、或至少 70 倍、或至少 80 倍、或至少 90 倍、或至少 100 倍、或至少 200 倍、或在 2 倍与 10 倍之间、或在 5 倍与 50 倍之间、或在 25 倍与 100 倍之间、或在 75 倍与 200 倍之间、或在 100 倍与 200 倍之间。在某些实施例中,Fc 变体抗体展现的对 Fc γ RIIB 的亲和力比天然 Fc 抗体所展现的对 Fc γ RIIB 配体的亲和力高或低至少 90%、至少 80%、至少 70%、至少 60%、至少 50%、至少 40%、至少 30%、至少 20%、至少 10%、或至少 5%。

[0304] 在一些实施例中,相对于天然 Fc 抗体,Fc 变体抗体展现出增加或降低的对 C1q 的亲合力。在一些实施例中,Fc 变体抗体展现的对 C1q 受体的亲合力比天然 Fc 抗体所展现的对 C1q 受体的亲合力高或低至少 2 倍、或至少 3 倍、或至少 5 倍、或至少 7 倍、或至少 10 倍、或至少 20 倍、或至少 30 倍、或至少 40 倍、或至少 50 倍、或至少 60 倍、或至少 70 倍、或至少 80 倍、或至少 90 倍、或至少 100 倍、或至少 200 倍、或在 2 倍与 10 倍之间、或在 5 倍与 50 倍之间、或在 25 倍与 100 倍之间、或在 75 倍与 200 倍之间、或在 100 倍与 200 倍之间。在某些实施例中,Fc 变体抗体展现的对 C1q 的亲合力比天然 Fc 抗体所展现的对 C1q 的亲合力高或低至少 90%、至少 80%、至少 70%、至少 60%、至少 50%、至少 40%、至少 30%、至少 20%、至少 10%、或至少 5%。在不同的实施例中,展现出改变的出对 C1q 的亲合力的 Fc 变体抗体具有增强的对 Fc 受体 FcRn 的结合。在又一个具体实施例中,相对于天然 Fc 抗体,展现改变的对 C1q 的亲合力的 Fc 变体抗体具有改变的对 Fc γ RIIA 和 / 或 Fc γ RIIB 的结合。

[0305] 期望的是,通过用于确定一种或多种 Fc γ R 介导的效应细胞功能的体外功能测定来表征 Fc 变体抗体。在某些实施例中,Fc 变体抗体具有相似的结合特性,并且效应细胞如在基于体外测定中那样在体内模型(例如在此描述和披露的那些)中起作用。本技术不排除在基于体外的测定中未展现出所希望的表型但在体内展现出所希望的表型的 Fc 变体抗体。

[0306] 可以通过增加 Fc 区对 FcRn 的结合亲合力而增加包含 Fc 区的蛋白质的血清半衰期。如在此使用的术语“抗体半衰期”表示一种抗体的药物代谢动力学特性,它是抗体分子在它们的给予之后的平均存活时间的量度。抗体半衰期可以表示为从患者(或其他哺乳动物)的身体或其特定区室(例如,如在血清中测量的,即循环半衰期)、或在其他组织中消除 50% 已知量的免疫球蛋白所需要的时间。从一种免疫球蛋白或免疫球蛋白类别到另一种免疫球蛋白或免疫球蛋白类别,半衰期可以不同。通常,抗体半衰期的增加导致循环中所给予抗体的平均停留时间(MRT)的增加。

[0307] 半衰期的增加允许给至患者的药物的量的减少以及给药频率的减少。半衰期的增加也可以是有利的,例如对于金黄色葡萄球菌相关的疾病或病症的预防、以及还有对于在患者一出院就经常发生的感染复发的预防。为了增加抗体的血清半衰期,如在本领域已知的,可以将补救受体结合表位结合到抗体(尤其是抗体片段)中。如在此使用的,术语“补救受体结合表位”是指导致 IgG 分子的体内血清半衰期的增加的、IgG 分子(例如,IgG1、IgG2、IgG3、或 IgG4)的 Fc 区的表位。具有增加的半衰期的抗体还可以通过修饰被鉴定为涉及 Fc 与 FcRn 受体之间的相互作用的氨基酸残基而产生。另外,抗 α 毒素抗体或片段的半衰期可以通过用本领域所广泛使用的技术结合至 PEG 或白蛋白而增加。在一些实施例中,包含抗 α 毒素抗体的 Fc 变体区的抗体与包含天然 Fc 区的抗体相比具有增加大约 5%、大约 10%、大约 15%、大约 20%、大约 25%、大约 30%、大约 35%、大约 40%、大约 45%、大约 50%、大约 60%、大约 65%、大约 70%、大约 80%、大约 85%、大约 90%、大约 95%、大约 100%、大约 125%、大约 150% 或更多的半衰期。在一些实施例中,包含 Fc 变体区的抗体与包含天然 Fc 区的抗体相比具有增加大约 2 倍、大约 3 倍、大约 4 倍、大约 5 倍、大约 10 倍、大约 20 倍、大约 50 倍或更多、或在 2 倍与 10 倍之间、或在 5 倍与 25 倍之间、或在 15 倍与 50 倍之间的半衰期。

[0308] 在一些实施例中,在此呈现的技术提供了 Fc 变体,其中 Fc 区包含在一个或多个选自下组的位置处的修饰(例如,氨基酸置换、氨基酸插入、氨基酸缺失),该组由以下各项

组成:如通过如在 Kabat 中列出的 EU 索引来编号的 234、235、236、237、238、239、240、241、243、244、245、247、251、252、254、255、256、262、263、264、265、266、267、268、269、279、280、284、292、296、297、298、299、305、313、316、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、339、341、343、370、373、378、392、416、419、421、440 和 443。任选地, Fc 区可以包含在本领域已知的另外的和 / 或替代的位置处非天然存在的氨基酸残基。

[0309] 在某些实施例中, 在此提供的是 Fc 变体, 其中 Fc 区包含至少一个选自下组的置换, 该组由以下各项组成: 如通过在 Kabat 中列出的 EU 索引来编号的 234D、234E、234N、234Q、234T、234H、234Y、234I、234V、234F、235A、235D、235R、235W、235P、235S、235N、235Q、235T、235H、235Y、235I、235V、235F、236E、239D、239E、239N、239Q、239F、239T、239H、239Y、240I、240A、240T、240M、241W、241L、241Y、241E、241R、243W、243L、243Y、243R、243Q、244H、245A、247L、247V、247G、251F、252Y、254T、255L、256E、256M、262I、262A、262T、262E、263I、263A、263T、263M、264L、264I、264W、264T、264R、264F、264M、264Y、264E、265G、265N、265Q、265Y、265F、265V、265I、265L、265H、265T、266I、266A、266T、266M、267Q、267L、268E、269H、269Y、269F、269R、270E、280A、284M、292P、292L、296E、296Q、296D、296N、296S、296T、296L、296I、296H、269G、297S、297D、297E、298H、298I、298T、298F、299I、299L、299A、299S、299V、299H、299F、299E、305I、313F、316D、325Q、325L、325I、325D、325E、325A、325T、325V、325H、327G、327W、327N、327L、328S、328M、328D、328E、328N、328Q、328F、328I、328V、328T、328H、328A、329F、329H、329Q、330K、330G、330T、330C、330L、330Y、330V、330I、330F、330R、330H、331G、331A、331L、331M、331F、331W、331K、331Q、331E、331S、331V、331I、331C、331Y、331H、331R、331N、331D、331T、332D、332S、332W、332F、332E、332N、332Q、332T、332H、332Y、332A、339T、370E、370N、378D、392T、396L、416G、419H、421K、440Y 和 434W。任选地, Fc 区可以包含本领域已知的另外的和 / 或替代的非天然存在的氨基酸残基。

[0310] 在不同实施例中, 在此提供的是 Fc 变体抗体, 其中 Fc 区包含在一个或多个选自下组的位置处的至少一种修饰(例如氨基酸置换、氨基酸插入、氨基酸缺失), 该组由 234、235 和 331 组成。在一些实施例中, 非天然存在的氨基酸选自由 234F、235F、235Y、和 331S 组成的组。在此提供的是 Fc 变体, 其中 Fc 区包含在选自由由 239、330 和 332 组成的组的一个或多个位置处的至少一种非天然存在的氨基酸。一些实施例中, 非天然存在的氨基酸选自由 239D、330L 和 332E 组成的组。

[0311] 在一些实施例中, 在此提供的是 Fc 变体抗体, 其中 Fc 区包含在选自由 252、254 和 256 组成的组的一个或多个位置处的至少一种非天然存在的氨基酸。在某些实施例中, 非天然存在的氨基酸选自由 252Y、254T 和 256E 组成的组, 如在美国专利号 7,083,784 中所述, 其内容通过引用以其全文结合在此。

[0312] 在某些实施例中, 在此提供的是具有增加抗体的血清半衰期的 Fc 变体区的抗葡萄糖球菌 α 毒素抗体, 其中该抗体具有以下重链和轻链序列:

[0313] 重链: LC10-IgG1-YTE

[0314] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHDMDHWVRQATGKGLEWVSGIGTAGDTYYPD SVKGRFTI
SRENAKNSLYLQMNSLRAGDTAVYYCARDYRYSPTGHYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPK
SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE

QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
(SEQ ID NO:XX)。

[0315] 轻链:LC10- κ

[0316] DIQMTQSPSTLSASVGDRTTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGT
EFTLTISSLQPDFFATYYCKQYADYWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ
WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSPNRGEC (SEQ ID
NO:YY)

[0317] 在某些实施例中,由 IgG 抗体引出的效应子功能强烈取决于连接至蛋白质 Fc 区的碳水化合物部分。因而,可以修改 Fc 区的糖基化以增强或降低效应子功能。因此,在一些实施例中,在此提供的抗 α 毒素抗体和片段的 Fc 区包含改变的氨基酸残基的糖基化。在某些实施例中,改变的氨基酸残基的糖基化导致降低的效应子功能。在某些实施例中,改变的氨基酸残基的糖基化导致增强的效应子功能。在一些实施例中,Fc 区具有减少的岩藻糖基化。在某些实施例中,Fc 区被无岩藻糖基化(afucosylated)。

[0318] 在一些实施例中,在此的 Fc 变体可以与如在本领域已知的其他已知的 Fc 变体组合。可以引入 Fc 结构域的其他修饰和 / 或置换和 / 或添加和 / 或缺失。

[0319] 糖基化

[0320] 除了糖基化的改变抗体的效应子功能的能力之外,修改的在可变区中的糖基化还可以改变抗体对于靶抗原的亲和力。在一些实施例中,在本发明抗体的可变区中的糖基化模式被修改。例如,可以制作无糖基化的抗体(即,抗体缺乏糖基化)。糖基化可以被改变为例如增加抗体对于靶抗原的亲和力。此类糖类修饰可以通过例如改变在抗体序列之内的一个或多个糖基化位点来完成。例如,可以进行一个或多个氨基酸置换,导致一个或多个可变区框架糖基化位点的消除,由此消除在那个位点的糖基化。这种无糖基化可以增加抗体对于抗原的亲和力。还可以进行一个或多个氨基酸置换,氨基酸置换导致存在于 Fc 区中的糖基化位点(例如,IgG 的天冬酰胺 297)的消除。此外,无糖基化的抗体可以在缺乏必要的糖基化机器(machinery)的细菌细胞中产生。

[0321] 抗体结合物

[0322] 在某些实施例中,使用本领域已知的方法将在此呈现的抗体结合或共价连接至一种物质。在一些实施例中,连接的物质是可检测标记物(在此还被称为报道分子)或固体支撑物。用于连接至抗体的适合的物质包括但不限于氨基酸、肽、蛋白质、多糖、核苷、核苷酸、寡核苷酸、核酸、半抗原、药物、激素、脂质、脂质组装体、合成聚合物、聚合微粒、生物细胞、病毒、荧光团、生色团、染料、毒素、半抗原、酶、抗体、抗体片段、放射性同位素、固体基质、半固体基质、及其组合。用于将另一种物质结合或共价连接至抗体的方法在本领域是已知的。

[0323] 使用的诊断方法

[0324] α 毒素是一般仅在金黄色葡萄球菌的致病菌株中发现的毒力因子。 α 毒素有时结合至作为活性复合体结构的一部分的细胞表面受体。然而,寡聚化和跨膜孔(例如, α 毒素七聚体)的形成可以在不结合至特异性受体的情况下发生。寡聚化 α 毒素在细胞功能障碍和细胞溶解(例如,跨膜孔的形成)中的作用促进侵入的金黄色葡萄球菌细菌的定殖。在此所述的抗体通过直接或间接识别在 α 毒素分子上的涉及 α 毒素单体-单体相互作用的

区域而抑制 α 毒素单体组装或寡聚化为跨膜孔。

[0325] 在某些实施例中,在此呈现的抗 α 毒素抗体和片段以及组合物可以用于体内和/或体外诊断产生 α 毒素的金黄色葡萄球菌菌株和/或与 α 毒素相关的病症/疾病。这可以例如通过使有待测试的样品(任选地伴随对照样品)与抗体在允许抗体与 α 毒素之间的复合体形成的条件下接触来完成。然后检测复合体形成(例如,使用 ELISA)。当使用测试样品连同对照样品时,检测在两种样品中的复合体,并且在样品之间复合体形成中的任何统计学显著性差异指示测试样品中金黄色葡萄球菌、 α 毒素或金黄色葡萄球菌与 α 毒素的存在。

[0326] 在一些实施例中,在此的技术提供了确定在疑似包含金黄色葡萄球菌和/或其他产生 α 毒素同系物的细菌的样品中产生 α 毒素的金黄色葡萄球菌菌株和/或 α 毒素的存在的方法,该方法包括将样品暴露于抗 α 毒素抗体或片段,并且确定抗体与样品中的 α 毒素的结合,其中抗体与样品中的 α 毒素的结合指示样品中金黄色葡萄球菌和/或 α 毒素的存在。在一些实施例中,该样品是生物样品。在某些实施例中,生物样品来自经历或疑似经历与金黄色葡萄球菌相关的疾病/病症的哺乳动物。

[0327] 在某些实施例中,可以使用体内诊断测定使用抗 α 毒素抗体或片段来检测金黄色葡萄球菌的生长和/或 α 毒素的过度表达。在一些实施例中,将抗 α 毒素抗体或片段添加至样品,其中抗体结合有待检测的 α 毒素并且用可检测标记物(例如,放射性同位素或荧光标记物)使其带标签,并且从外部扫描患者以便将标记物定位。

[0328] 可以在福尔马林固定的石蜡包埋的组织上进行 FISH 测定,例如 INFORMTM (由亚利桑那州的 Ventana 公司出售)或 PATHVISIONTM (威赛斯公司(Vysis),伊利诺伊州),从而确定在组织样品中的 α 毒素过度表达的程度(如果有的话)。

[0329] 在某些实施例中,抗 α 毒素抗体和片段可以用于检测组织样品、血液或血清中的 α 毒素(例如,可溶性 α 毒素)的方法中。在一些实施例中,该方法包括使来自疑似经历金黄色葡萄球菌 α 毒素介导的失调的哺乳动物的组织、血液或血清的测试样品与在此呈现的抗 α 毒素抗体或片段接触,并且检测测试样品中相对于来自正常哺乳动物的血液或血清的对照样品的 α 毒素的增加。在一些实施例中,检测方法作为诊断金黄色葡萄球菌和/或 α 毒素介导的与在哺乳动物组织、血液或血清中的 α 毒素的增加相关的失调的方法是有用的。

[0330] 使用的治疗方法

[0331] 在某些实施例中,可以给予抗 α 毒素抗体或片段用于预防和/或治疗 α 毒素介导的病症。在此呈现的是预防、治疗、维持、改善、和/或抑制 α 毒素介导的疾病或病症的方法,其中这些方法包括给予在此提供的抗 α 毒素抗体和片段。

[0332] 致病性金黄色葡萄球菌 α 毒素介导的失调

[0333] 在某些实施例中,提供的是给予和使用如在此呈现的组合物和抗体的方法,以便治疗和预防广泛范围的致病性金黄色葡萄球菌介导的病症/疾病,这些病症/疾病包括慢性和急性病症两者,例如但不限于菌血症、烧伤、蜂窝织炎、皮肤坏死、眼睑感染、食物中毒、关节感染、新生儿结膜炎、骨髓炎、肺炎、皮肤感染、手术伤口感染、烫伤样皮肤综合征、心内膜炎、脑膜炎、脓肿形成和中毒性休克综合征。

[0334] CA-MRSA 和 HA-MRSA 两者对传统的抗葡萄球菌 β -内酰胺类抗生素(例如头孢氨

苄)具有抗性。CA-MRSA 具有较宽的抗微生物敏感性谱,包括对磺胺药物(像复方新诺明 / 甲氧苄氨嘧啶 - 磺胺甲噁唑)、四环素(像多西环素和米诺环素)以及克林霉素,但是根据亨利福特医院研究(Henry Ford Hospital Study)现在认为用于治疗 CA-MRSA 的选择药物是万古霉素。HA-MRSA 甚至对这些抗生素具有抗性,并且经常仅对万古霉素敏感。较新的药物,例如利奈唑胺(属于较新的噁唑烷酮类别)以及达托霉素,对抗 CA-MRSA 和 HA-MRSA 两者是有效的。

[0335] 在某些实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段可以与相应于例如 β -内酰胺类抗生素(例如头孢氨苄)、磺胺药物(像复方新诺明 / 甲氧苄氨嘧啶 - 磺胺甲噁唑)、四环素(像多西环素和米诺环素)、克林霉素、万古霉素、利奈唑胺、达托霉素、替考拉宁、奎奴普丁 / 达福普汀(共杀素)、或替加环素的抗生素组合使用。

[0336] 药物制剂

[0337] 在某些实施例中,在此提供的抗 α 毒素抗体或片段可以与一种药学上可接受的载体配制为药物(治疗)组合物,并且可以通过本领域已知的多种方法来给予。给药路径和 / 或模式可以取决于所希望的结果而不同。如在此使用的,包含抗 α 毒素抗体或片段的药物制剂被称为该技术的制剂。术语“药学上可接受的载体”表示不干扰活性成分的生物活性的有效性的一种或多种非毒性材料。这样的制剂常规地可含有盐、缓冲液、防腐剂、相容的载体、以及任选地其他治疗剂。这样的药学上可接受的制剂常规地还可含有适合于给予人的相容的固体或液体填料、稀释剂或包封物质。术语“载体”表示天然的或合成的有机或无机成分,活性成分与该载体组合以促进应用。药物组合物的组分还能够与本技术的抗体并且与彼此以这样一种方式混合;该方式使得不存在会实质性地减损所希望的药物疗效的相互作用。

[0338] 本技术的治疗组合物可以配制成特定的剂量。可以调整给药方案以提供最优的所希望的反应(例如,治疗反应)。例如,如由治疗情况的紧急状态所指示的,可以给予单次推注,可以随着时间的过去给予若干个分次剂量,或可以按比例地减少或增加剂量。尤其有利的是以剂量单位形式配制肠胃外组合物,以便于剂量的给予和均匀性。如在此使用的剂量单位形式是指用于有待治疗的受试者的、适合作为单一剂量的物理上离散的单位;每个单位含有经计算以与需要的药用载体相关的产生所希望的疗效的预定量的活性化合物。对于剂量单位形式的规格由以下项来指示并且直接取决于以下项:(a) 抗 α 毒素抗体或片段的独特特征以及有待获得的具体疗效,以及 (b) 在配制这种用于治疗个体中的敏感性的抗 α 毒素抗体或片段的领域中的固有限制。

[0339] 本技术的治疗组合物可以被配制为用于特定的给药途经,如口服、经鼻、经肺、局部(包括经颊和舌下)、经直肠、经阴道和 / 或肠胃外给药。这些制剂可以合宜地呈现为单位剂型,并且可以通过药学领域已知的任何方法来制备。可以与载体材料组合以产生单一剂型的活性成分的量将取决于正在被治疗的受试者、以及特定的给药模式而变化。可以与载体材料组合以产生单一剂型的活性成分的量将大体上是产生疗效的组合物的量。

[0340] 治疗有效剂量

[0341] 能以适合的剂量和给药方案而给予在此所述的抗体制剂,并且这样的剂量和给药方案可以取决于有待治疗的疾病或病症。可以通过确定剂量和给药方案是否导致疗效或治疗终点而鉴定治疗有效剂量。

[0342] 制造物品和试剂盒

[0343] 在此提供的是包含用在此的液体制剂或冻干制剂填充的一个或多个容器的药物包或试剂盒。在一些实施例中,用在此的液体制剂填充的容器是预填充注射器。在具体实施例中,在此的制剂包括重组融合或化学结合至另一个部分的抗 α 毒素抗体和片段,该另一个部分包括但不限于异源蛋白质、异源多肽、异源肽、大分子、小分子、标记序列、诊断剂或可检测剂、治疗部分、药物部分、放射性金属离子、第二抗体、以及固体支撑物。在某些实施例中,将在此的制剂作为无菌液体而配制在单剂量小瓶中。在此的制剂有时被提供在预填充注射器中。

[0344] 在某些实施例中,还提供了包含抗 α 毒素抗体和片段的、对于不同目的(例如研究和诊断,包括用于将 α 毒素从细胞纯化或免疫沉淀、 α 毒素的检测,等等)有用的试剂盒。为了分离和纯化 α 毒素,试剂盒可以包含结合至珠粒的抗 α 毒素抗体或片段(例如琼脂糖凝胶珠)。可以提供含有用于体外检测和定量 α 毒素的抗体(例如在 ELISA 或 Western 印迹中)的试剂盒。正如制造物品,试剂盒包含容器和容器上或与容器相关的标签或包装说明书。容器容纳包含至少一种如在此披露的抗 α 毒素抗体或片段的组合物。可以包括另外的含有例如稀释剂和缓冲液、对照抗体的容器。标签或包装说明书可以提供组合物的说明以及用于预期体外或诊断用途的说明书。

[0345] 本技术还包括完成的包装的并且带标签的药物产品。这种制造物品包括在适当器皿或容器(例如,玻璃小瓶、预填充注射器或其他密封容器)中的适当的单位剂型。在一些实施例中,提供了作为包含抗 α 毒素抗体或片段的适合于肠胃外给药的无菌无颗粒溶液的单位剂型。在某些实施例中,提供了作为包含抗 α 毒素抗体或片段的适用于复原的无菌冻干粉的单位剂型。

[0346] 在一些实施例中,单位剂型适合于静脉内、肌内、鼻内、经口、局部或皮下递送。因此,该技术涵盖适用于各个递送路径的无菌溶液。该技术进一步涵盖适合于复原的无菌冻干粉。

[0347] 如同任何药物产品,包装材料和容器被设计为在储存和装运期间保护产品的稳定性。此外,在此的产品包括建议医师、技术员或患者关于如何适当预防或治疗讨论中的疾病或失调的供使用的说明书或其他信息材料。换言之,制造物品包括指示或建议给药方案(包括但不限于实际剂量、监测程序、以及其他监测信息)的说明书工具。

[0348] 确切地说,该技术提供了一种制造物品,包括包装材料,例如盒、瓶、管、小瓶、容器、预填充注射器、喷雾器、吹入器、静脉内(i.v.)袋、封袋等等;以及包含在包装材料之内的药物剂的至少一个单位剂型,其中药物剂包括含有抗体的液体制剂。包装材料包括指示如何可以使用抗体来预防、治疗和/或管理一种或多种与疾病或失调相关的症状的说明书工具。

[0349] 实例

[0350] 在下文列出的实例展示了某些实施例并且不限制该技术。

[0351] 实例 1:材料与方法

[0352] 用于实例 2 至实例 9 和实例 11 至实例 13 的材料和方法提供在下文。

[0353] 野生型(wt)金黄色葡萄球菌 AT 和非溶血性突变体 H35L 的克隆和表达

[0354] 来自金黄色葡萄球菌菌株 ATCC BAA1556 的基因组 DNA 用来通过 PCR 扩增野生型

α 毒素(AT)基因。在使用 Herculase II 聚合酶(Stratagene)的 50 μ l 反应中,反应含有正向引物 atatatgagctcgcagattctgatattaatattaaaacc (SEQ ID NO:41)、反向引物 atataaagcttaatttgtcattttcttttttccc (SEQ ID NO:42)、以及大致 10ng 的基因组 DNA。将生成的片段用 Sac I 和 Hind III 消化,并且连接到 pCold IIDNA 载体(TaKaRa)中,使其在具有 N 端六组氨酸(6X His)标签的框内。根据制造商的说明书,使用 QuikChange II XL 定点诱变试剂盒(Stratagene)通过野生型基因的定点诱变而产生 H35L 突变体。用于诱变的诱变引物是 gataaagaaaatggcatgctcaaaaaagtattttatagttttatc (SEQ ID NO:43) 和 gataaaactataaaaatacttttttggagcatgccattttcttttate (SEQ ID NO:44)。

[0355] 通过自动 DNA 测序证实野生型 AT 和 AT_{H35L} 突变体的序列。野生型和 H35L 突变体 α 毒素表达在大肠杆菌菌株 BL21 中。将在 LB 加羧苄西林中生长的 50ml 过夜培养物以 1:10 稀释在 500ml 培养物中,并且使其在 37°C 生长至大约 0.5 的 A₆₀₀。将培养物移至 15°C 持续 30 分钟,并且然后添加 1M IPTG 以获得大约 100mM 的终浓度。将培养物在 15°C 孵育另外的 24 小时。通过离心收获细胞。

[0356] 重组体,具有 his- 标签的 α 毒素(rAT-his)的纯化

[0357] 将细菌细胞沉淀在冰上进行解冻,并且将其重悬浮于 Ni-NTA 缓冲液 A (20mM 磷酸钠, pH7.2, 300mM NaCl) 中。通过在 20,000psi 微流化(Microfluidics Model M-110P)将细胞溶解,并且通过在 4°C 在 27,000 $\times$ g 下离心 10 分钟将粗溶解产物澄清。在 0.2 μ m 过滤后,将上清液加载到用 Ni-NTA 缓冲液 A 平衡的 5ml Ni-NTA Superflow 柱(凯杰公司(Qiagen))上。将 rAT-his 用 300mM 和 500mM 咪唑分级梯度洗脱,将各部分(fraction)以 1mM 的终浓度收集在含有 EDTA 的管中,并且将其透析在 SP 缓冲液 A (50mM 磷酸钠, pH7.0, 25mM NaCl, 1mM EDTA) 中。将透析液加载到在 SP 缓冲液 A 中的 5ml HiTrap SP 琼脂糖凝胶 FF 柱(通用电气医疗集团),并且将 rAT-his 用至 1M NaCl 的分级梯度洗脱。将含有 rAT-his 的部分透析到具有 1mM EDTA 的 1X PBS (pH7.2) 中,并且将等分部分在 -80°C 下冷冻。

[0358] 来自金黄色葡萄球菌的天然 α 毒素的纯化

[0359] 从金黄色葡萄球菌 Wood 菌株纯化天然 α 毒素(nAT)。使金黄色葡萄球菌 Wood 在大豆胰蛋白酶肉汤(TSB)中在 37°C 生长过夜,伴随振荡(例如,大约 250RPM)。通过离心收获培养物上清液,然后用固体硫酸铵恢复 75% 的饱和度。在 4°C 搅拌 3 小时之后,通过在 12,000 $\times$ g 持续 45 分钟的离心捕获沉淀物,将其重悬浮于 SP 缓冲液 A (25mM 乙酸钠, pH5.2, 20mM NaCl, 1mM EDTA) 中,并且针对 SP 缓冲液 A 在 4°C 透析过夜,伴随一次交换。通过在 4°C 在 27,000 $\times$ g 下离心持续 30 分钟去除不溶性物质。过滤可溶性透析液(0.2 μ m),并且将其加载到用 SP 缓冲液 A 平衡的 10ml SP 琼脂糖凝胶 FF 柱(通用电气医疗集团)上。将结合的 nAT 用至 300mM NaCl 的线性梯度洗脱,随后为在 0.5M 和 1M NaCl 时的步骤。将含有 nAT 的部分合并并且过夜透析到含有 1mM EDTA 的 PBS (pH7.2) 中。为了最终处理,将透析液在具有 1mM EDTA 的 1XPBS (pH7.2) 中以 1.3ml/min 的流速加载到 HiPrep Sephacryl S-200 高分辨柱(通用电气医疗集团)上。将含有 nAT 的部分合并、等分、并且在 -80°C 下冷冻。

[0360] 免疫 / 杂交瘤产生

[0361] 遵循 RIMMS 免疫方案(Kilpatrick (克伯屈)等人(1997)),使八周龄 VelocImmune 小鼠在多个部位接受 5 轮的 rAT_{H35L} 的皮下注射。以 2-3 天的间隔经过 13 天的过程免疫小鼠。对于每一轮的免疫,首先用异氟烷(isofluorane)麻醉小鼠。将免疫原乳化在完全或

不完全弗氏佐剂和 TiterMax Gold 佐剂中,并且将其以双侧的方式注射于颈背部、腋、小腿和腹股沟处。在第 13 天收集测试血液,并且用抗原 ELISA 测定。腹膜内给予小鼠预融合物加强(pre-fusion boost),并且在第 17 天处死。将淋巴结淋巴细胞和脾细胞融合至骨髓瘤配偶体,从而产生稳定的杂交瘤。

[0362] 溶血性活性的中和

[0363] 在 96 孔板中,将五十微升的各个 B 细胞杂交瘤培养物上清液与重组体 α 毒素-His (rAT-his, 0.1 μ g/ml 终浓度)混合,随后添加在 PBS 中的 50 μ l 的 5% 兔红细胞(RBC)。对照孔仅含有 RBC 以及具有或不具有 AT 的培养基。将板在 37°C 孵育 1 小时,并且将完整的细胞通过离心而沉淀。将 50 μ l 的上清液转移至新的 96 孔板,并且用分光光度计测量 A_{490} 。中和活性是相对于仅使用 RBC 和 rAT-his 的溶解来计算的,并且计算为:抑制 % = $100 \times [100 - (A_{490} \text{ nAT+Ab}) / (A_{490} \text{ nAT 无 Ab})]$ 。

[0364] 还测试了使用纯化的 mAb 的抑制。将抗 AT mAb 以在 PBS 中的大约 80 μ g/mL 添加至 96 孔板,并且将样品连续稀释(两倍)于 PBS 中,至 50 μ L 的终体积。非特异性 IgG1 (R347)被包括作为同种型对照。将二十五微升的 mAb 稀释物与在大约 0.1 μ g/mL 的 25 μ L nAT (天然 α 毒素)混合于 96 孔圆底板中,随后添加 50 μ L 5%RBC。如上计算溶血性活性的抑制。

[0365] 嵌合抗 AT mAb 的表达和纯化

[0366] 将澄清的鼠抗 AT 上清液(大致 5L, @30-50mg/L)通过切向流过滤而浓缩。然后将浓缩的上清液依序通过五个 5mL 蛋白 G HiTrap HP 柱,并且将结合的 IgG 用 pH11.0 的 50mM 碳酸氢钠洗脱,并且用 1M 磷酸将其中和至大致 pH7.0。将中和的材料依序加载到两个 1mL HiTrap Q FF (通用电气医疗集团)柱上。将通过的含有 IgG 的流收集,并且将其透析到 pH7.2 的 PBS 中。

[0367] A549 溶解的中和

[0368] 将 A549 细胞维持在 5%CO₂ 37°C 培养箱中的补充有非必需氨基酸谷氨酰胺和 10% 的胎牛血清的 RPMI 中。将细胞用 Hank's 平衡培养基(Hank's balanced media)洗涤一次,并且以 10⁴/孔平板接种在 RPMI、5%FBS 中在 50 μ l 以下,然后在 37°C 用 5%CO₂ 孵育 20 小时。将抗 AT mAb 以 80 μ g/mL 添加至 96 孔板的 RPMI 中,并且将样品连续稀释(两倍)在 RPMI 中。无关的 IgG1 (R347)被包括为同种型对照。在单独的 96 孔板中,将 30 μ l 稀释抗体与 30 μ l nAT 混合(终浓度,5 μ g/ml)。将来自各孔的五十微升转移至含有贴壁的 A549 细胞的板。包括具有或不具有 nAT 的 A549 细胞的对照孔。将板在 37°C 用 5%CO₂ 孵育 3 小时,离心,并且将 50 μ l 上清液转移至新的 96 孔板。遵循制造商的方案,使用 Cytotox96 非放射性测定试剂盒(Promega),将细胞溶解测量为乳酸脱氢酶(LDH)的释放。从每个孔减去背景 LDH,并且 LDH 释放的抑制被计算为:抑制 % = $100 \times [100 - (A_{590} \text{ nAT+Ab}) / (A_{590} \text{ nAT 无 Ab})]$ 。

[0369] THP-1 溶解的中和

[0370] 将 THP-1 细胞维持在 5%CO₂ 37°C 培养箱中在补充有非必需氨基酸(英杰公司(Invitrogen)) 2mM 谷氨酰胺(英杰公司)和 10% 的胎牛血清(英杰公司)的 RPMI 培养基(英杰公司)中。将抗 AT mAb 以 80 μ g/ml 添加至 96 孔板的 RPMI 中,并且将样品连续稀释(两倍)在 RPMI 中,至 50 μ L 的终体积。无关的 IgG1 (R347)被包括为同种型对照。将二十五微升的 mAb 稀释物与 25 μ l 最终达 1.5 μ g/ml 的天然 α 毒素(nAT)混合,随后将 50 μ l 经

RMPI 洗涤的 THP-1 细胞(10^6 个细胞/ml,在具有 10%FBS 的 RPMI 中)添加在 96 孔板中。对照孔由单独的或具有 nAT 的 THP-1 细胞组成。将板在 5%CO₂37℃培养箱中孵育 3 小时,离心,并且将 50 μ l 上清液转移至新的 96 孔板。遵循制造商的说明书,使用 Cytotox96 非放射性测定试剂盒(Promega),将细胞溶解测量为乳酸脱氢酶(LDH)的释放。如上所述计算 LDH 释放的抑制。

[0371] 抗 AT IgG mAb 的克隆和作为全人 mAb 的表达

[0372] 使用 Dynabeads mRNA Direct Kit (英杰公司)分离五种杂交瘤克隆 2A3、10A7、12B8、25E9 和 28F6 的 mRNA。使用 SuperScript III(英杰公司)逆转录酶和七聚体随机引物合成 cDNA 的第一链。使用 Ig 引物组(Novagen,目录号 69830)通过 PCR 扩增人 Ig V_L(κ)和 V_H。将 PCR 扩增的 VL 和 VH 产物克隆到 TOPO TA 载体(Invitrogen (英杰)pCR2.1-TOPO)中,并进行测序。将来自每个杂交瘤的 V_H和 V_L(κ)通过 PCR 进行再扩增,添加用于克隆到 IgG. κ . pOE 载体的限制性内切酶位点,其中 V_L被克隆在与人 c- κ 融合的 BssHII/BsiWI 位点,而 V_H被克隆在与人 IgG-1 重链恒定区融合的 BsrGI/SalI 位点。将所生成的 pOE 质粒通过 DNA 测序来验证。

[0373] 抗 α 毒素 mAb 表达和纯化

[0374] 使用无内毒素质粒大量提取试剂盒(Endofree Plasmid Maxi kit, Qiagen (凯杰公司))来制备 pOE 构建体的质粒 DNA。使用 293fectin 试剂(英杰公司)将 pOE 质粒转染到在 Freestyle293 表达培养基(GIBCO)中的 293F 悬浮细胞中。转染后 6 天和 9 天,收获培养基,并且使用蛋白 A-琼脂糖凝胶柱(通用电气医疗集团)来纯化 IgG。将含有峰值的 IgG 合并,透析到 pH7.4 的 PBS 中,并且在 -70℃储存。通过 SDS-PAGE 验证 IgG 蛋白的纯度。

[0375] 小鼠肺炎模型

[0376] 在感染前二十四小时,使 10 只 7-9 周龄的 C57BL/6J 小鼠(Harlan)的组经由腹膜内注射(i.p.)而接受在指示浓度下的 0.5ml mAb。然后将动物用异氟烷麻醉,垂直保持,并且将在无菌 PBS 中的 0.05ml 金黄色葡萄球菌细菌悬液(1×10^8 CFU 至 3×10^8 CFU)接种在左右鼻孔中。将动物以仰卧位放置在笼中以用于恢复,并且每日观察两次,持续研究的时程。监测动物存活持续 6 天的最大值。

[0377] 可替代地,在细菌感染 48 小时之后使动物通过 CO₂吸入而安乐死。将肺和肾移至无菌 PBS 中,进行均质化,稀释,并且涂平板以用于细菌计数。使用对数秩检验确定死亡率研究的统计学显著性。使用方差分析和 Dunnett 事后检验来计算来自器官的细菌回收的显著性。

[0378] 皮肤坏死的小鼠模型

[0379] 将五只 6-8 周龄的雌性 BALB/c 小鼠(Harlan)的组在它们背部上剃毛,并且通过腹膜内注射而给予在图表上指示的浓度的 0.5ml IgG。二十四小时后,通过皮下注射 50 μ l 的细菌悬液(1×10^8 个金黄色葡萄球菌)而感染小鼠。每日两次监测动物的感染迹象,并且每天同时测量脓肿的大小。使用公式 $A = L \times W$ 来计算病灶的面积。使用方差分析和 Dunnett 事后检验来确定统计学显著性。

[0380] 受体结合测定

[0381] 通过在接近于 4℃、伴随恒定的搅拌下,将 5mL 的洗涤并浓缩的兔红细胞(RBC)在 500mL 溶解缓冲液(5mM 磷酸盐,1mM EDTA, pH7.4)中孵育来制备红细胞血影。然后通过

15,000 $\times$ g 离心将血影移除,并且将其用溶解缓冲液洗涤 3 次。然后将它们在 PBS 中洗涤,并且重悬浮在 3mL 的终体积中。

[0382] 为了评定 nAT 结合至细胞膜,将 RBC 血影在 PBS 中稀释至大致 0.2 的 OD₆₀₀,并且将 50 μ L 涂覆在 1/2-孔 96 孔板(Costar)上,然后在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。然后将液体从板移除,并且在 4 $^{\circ}$ C 将孔用在 PBS (pH7.4) 中的 100 μ L 的 1%BSA 封闭持续 2 小时,然后用 PBS 洗涤 3 次。将 20 摩尔过量的 IgG 与 3 μ g/mL 的 nAT 混合,并且将 50 μ L 添加至封闭的板。将板在 4 $^{\circ}$ C 孵育 2 小时并且用 PBS 洗涤 3 次。将生物素标记的兔抗 AT IgG 以 1mg/mL 添加至孔,并且在 4 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时,洗涤 3 次,然后与链霉亲和素过氧化物酶结合物一起孵育(1:30,000, Jackson ImmunoResearch(《杰克逊免疫研究》))。将孔洗涤 3 次,并且用 SureBlue Reserve (KPL 公司)显色。使用酶标仪(Molecular Devices)读取 A₄₅₀,并且计算结合的 %AT。%结合的 AT = $100 \times (A_{450} - \text{AT} + \text{IgG} / A_{450} - \text{AT 单独})$

[0383] 寡聚化测定

[0384] 使用 Liposofast 挤出机(艾维斯汀(Avestin)公司)以及具有 100nm 孔径的膜产生脂质体。将蛋黄磷脂酰胆碱(15mg,Avanti Polar Lipids)、蛋黄磷脂酰甘油(2.9mg,Avanti Polar Lipids)以及胆固醇(5.8mg,Avanti Polar Lipids)在氯仿中的混合物(5:1:4,摩尔比)在氮气流下在 40 $^{\circ}$ C 干燥。然后将干燥的脂质膜用 pH7.4 的 3mL PBS (英杰公司)再水合,并且将其在 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。然后将样品剧烈涡旋,直至它形成均匀的悬浮液,并且然后使用干冰异丙醇溶和室温水使其经历 3 轮冻融。然后使溶液通过 Liposofast 挤出机 21 次。

[0385] 将 AT(0.5 μ g)与纯化的 IgG、5 μ L RBC 血影以及 PBS 混合于 22 μ L 的终体积中,并且在 37 $^{\circ}$ C 孵育 45 分钟。然后在 37 $^{\circ}$ C 将样品溶解于 5 μ L SDS-PAGE 样品缓冲液中持续 5 分钟,并且使 10 μ L 在 4%-12% 预制聚丙烯酰胺凝胶(英杰公司)中经受 SDS-PAGE。然后将分离的蛋白质转移至硝酸纤维素,用在 PBS 中的封闭剂酪蛋白(赛默科学(Thermo Scientific))封闭 10 分钟,并且在室温伴随恒定振荡下用兔抗 AT IgG (2 μ g/mL)进行探测持续 2 小时。在用碱性磷酸酯酶标记的山羊抗兔 2 孵育 1 小时后检测 AT 带,并且使用 BCIP/NBT 膜磷酸酶底物系统(KPL 公司)显色。

[0386] 动力学速率和结合常数(K_D)的测量

[0387] 使用在 BIAcore3000 仪器(BIAcore 公司)上的 IgG-捕获测定型式测量抗 AT IgG 抗体结合至纯化的 nAT 的动力学速率常数(k_{on}、k_{off})。简言之,根据制造商的说明书将大鼠抗小鼠 IgG 固定在 CM5 传感器芯片上。在传感器芯片上的捕获试剂的最终表面密度是大约 2500 个如在此所述的反应单位(RU)。还使用相同的固定方案并且省略 nAT 而在此传感器芯片上制备了参考流细胞表面。以 20nM 将抗 AT IgG 抗体制备在仪器缓冲液(HBS-EP 缓冲液,包含 0.01M HEPES, pH7.4, 0.15M NaCl, 3mM EDTA 和 0.005%P-20)连同 nAT 的两倍连续稀释物中。制得在大约 0.78nM 至大约 50nM 的范围内的在仪器缓冲液中的 nAT 连续稀释物。

[0388] 使用序贯方法用于动力学测量。首先将每种抗 AT IgG 以 50 μ L/min 的流速注射在捕获物和参考表面上。一旦捕获的 IgG 的结合已经被稳定,在两种表面上以 50 μ L/min 的流速注射单一浓度的 nAT 蛋白。使用所生成的结合反应曲线来确定缔合相数据。在注入 nAT 后,然后将流切换回仪器缓冲液持续 10 分钟从而允许收集解离相数据,随后为 pH1.5 的 10mM 甘氨酸的 1 分钟脉冲以便在芯片上再生 IgG 捕获表面。针对所有的抗 AT IgG,记录来

自每个浓度的 nAT 的二重注射的结合反应。

[0389] 另外,贯穿注射系列,散布若干缓冲液注射。使用选择缓冲液注射连同参考细胞反应(通常称为“双重参照”)以便矫正注射伪影(injection artifacts)和/或非特异性结合相互作用的原始数据集(D. G. Myszk (米什卡), Improving biosensor analysis (改进生物传感器分析). J. Mol. Recognit. (《分子识别杂志》)12(1999), 279-284 页)。然后将完全矫正的结合数据整体性地拟合至 1:1 结合模型(BIAevaluation4.1 软件, BIAcore 公司, 乌普萨拉(Uppsala), 瑞典),该模型包含矫正质量转运限制结合的条目,该结合应该被检测到。这些分析确定了动力学速率(on, off)常数,然后据此将表观 K_D 计算为 k_{off}/k_{on} 。

[0390] 在金黄色葡萄球菌感染的肺中的细胞因子水平的测量

[0391] 将七至九周龄 C57BL/6J 小鼠在用 1.5×10^8 cfu USA300 (BAA-1556, ATCC) 经鼻内感染之前 24 小时用 2A3.1hu (全人 2A3.1) 或 R347 (45mg/kg) 通过腹膜内注射进行处理。在感染后四小时和二十四小时,使小鼠安乐死,并且将肺用 1ml 的 PBS 冲洗 3 次。将支气管肺泡灌洗液(BAL)在 -70°C 储存。根据制造商的说明书,使用 7 个促炎 II 型小鼠细胞因子试剂盒(Mesoscale, 盖瑟斯堡(Gaithersburg), 马里兰州(MD))将促炎细胞因子定量。细胞因子水平表示为 pg/ml。

[0392] GST 融合蛋白的克隆和表达

[0393] 通过 PCR 从以上所述的 pColdII AT 克隆扩增编码 AT₁₋₅₀ 和 AT₅₁₋₂₉₃ 的基因序列。反应包含 10ng 的 AT-pColdII DNA 和 0.1mg 的各个正向引物和反向引物(AT₁₋₅₀-F, atatttgatccgcagattctgatattaatattaaaac (SEQ ID NO:45) 和 AT₁₋₅₀-R, atacttctcgagttatttattatgattttttatcatcgataaaaac (SEQ ID NO:46);或 AT₅₁₋₂₉₃-F, catagggatccaaactgctagttattagaacgaaag (SEQ ID NO:47) 和 AT₅₁₋₂₉₃-R, catagctcgagtcattttgtcatttcttttttcccaate (SEQ ID NO:48)),以及根据制造商的说明书所使用的 **PCR 聚合酶(英杰公司)。将生成的 PCR 片段用 BamHI 和 XhoI 消化,并且连接到 pGex 6P DNA 载体(Stratagene)中,使其在具有 N 端谷胱甘肽 S 转移酶(GST)标签的框内。通过自动 DNA 测序证实克隆的序列。

[0394] 用作为宿主的大肠杆菌的 BL21 (DE3) 菌株完成片段的表达。从平板挑出一些集落并且将其在 100mL LB+100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄西林(西格玛化学公司)中孵育,并且在接近 37°C 下生长。将过夜培养物以 1:100 稀释为 LB+100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄西林的 3x1L 培养物,并且伴随在大致 250RPM 的振荡下使其生长至大致 0.8 的 OD600。然后通过添加 1mMIPTG 诱导蛋白质表达。将培养物在 37°C 下伴随振荡继续孵育 2 小时。通过离心收获细菌细胞,并且将其在 -20°C 冷冻。

[0395] 将细胞沉淀重悬浮于 pH7.4 的 100mL PBS(英杰公司)中,并且通过在 20,000psi 微流化(Microfluidics Model M-110P)将其溶解,并且将粗溶解产物通过在 4°C 在 27,000xg 下离心 10 分钟而澄清。将生成的上清液加载到 GSTrap FF 柱(通用电气医疗集团)上,并且遵循制造商的说明书将 GST-AT₁₋₅₀ 和 GST-AT₅₁₋₂₉₃ 的可溶部分进行纯化。从不溶性细胞沉淀纯化不溶性 GST-AT₅₁₋₂₉₃ 部分。在室温、伴随轻轻摇动下,将不溶性材料溶解在 pH7.4 的 25mM 磷酸钠中的 3M 盐酸胍中,持续大约一小时。将溶解的材料用重折叠缓冲液 A[pH7.4 的 25mM 磷酸钠,具有 2M 盐酸胍] 稀释 7 倍。通过分步透析使 GST-AT₅₁₋₂₉₃ 重折叠。在 4°C 针对大致 2M、1M、然后是 0.5M 的胍浓度透析每 12-15 小时之后,将等体积的重折叠缓冲液 B[25mM 磷酸钠, pH7.4] 添加至透析烧杯。然后将 GST-AT₅₁₋₂₉₃ 针对重折叠缓冲液 B 透析,持续 24 小

时。通过离心澄清最终的透析液,并且如上所述将可溶部分在 GSTrap 柱上纯化。

[0396] 斑点印迹测定

[0397] 化学合成跨越氨基酸 40 至 293 的重叠肽(新英格兰肽公司(New EnglandPeptide))。尝试 AT₁₋₅₀的合成但不成功。将 α 毒素(AT)、AT 肽和 AT 片段(1 μ g)点在硝酸纤维素上,并且用在 PBS 中的封闭剂酪蛋白封闭 10 分钟。然后在室温使用 2 μ g/mL 的单独 IgG 探测印迹,持续 3 小时。将这些印迹洗涤,并且与碱性磷酸酯酶结合的山羊抗小鼠或山羊抗兔 IgG (1:1000, Caltag 实验室)一起孵育 1 小时,并且使用 BCIP/NBT 膜磷酸酶底物系统(KPL 公司)显色。

[0398] LC10YTE 结合至 α 毒素和 LukF-PV 的 ELISA 表征

[0399] 将含带有 His- 标签的 α 毒素或 LukF-PV 的细菌溶解产物包被在 96 孔板的表面上,4°C 过夜。将板用 PBS/0.05% 吐温 20 洗涤六次,并且在 37°C 用 10%Superblock 封闭缓冲液(Pierce,罗克福德(Rockford),伊利诺伊州(IL))封闭 1 小时。将 LC10YTE 或 2 μ g/mL 的小鼠抗 His mAb (R&D Systems, 明尼阿波利斯(Minneapolis), 明尼苏达州(MN))添加至孔中,并且在室温孵育 1h。然后将板用 PBS/0.05% 吐温 20 洗涤六次。分别使用抗人或抗小鼠 IgG HRP 结合物(杰克逊免疫研究实验室公司(Jackson ImmunoResearch laboratories, Inc.), 西格鲁(West Grove), 宾夕法尼亚州(PA))检测结合的 LC10YTE 或小鼠抗 His mAb。

[0400] 在 α 毒素与 LukF-PV 之间的嵌合变体的产生

[0401] 产生由 α 毒素的部分和 LukF-PV 组成的嵌合变体,以鉴定在 α 毒素上的 LC10YTE 的结合区。通过基因合成产生编码在 aa1-51、aa52-110、aa111-147、aa148-205、aa204-241、或 aa248-293 处的 LukF-PV 区的六种 α 毒素嵌合变体的 DNA 构建体。通过使用编码 α 毒素或 LukF-PV 的 pET3d 质粒(内部质粒)作为模板的重叠延伸 PCR 产生编码其他嵌合变体的 DNA 构建体。然后将所有的 DNA 构建体克隆到 pET3d 细菌表达载体(EMD 化学品公司,费城(Philadelphia), 宾夕法尼亚州(PA))中,并且将其转化进大肠杆菌菌株 BL21 (DE3) (英杰公司,卡尔斯巴德(Carlsbad),加利福尼亚州(CA))中。使用标准方案,使转化的 BL21(DE3)细胞在 MagicMedia 大肠杆菌表达培养基(英杰公司,卡尔斯巴德(Carlsbad),加利福尼亚州(CA))中生长从而表达变体蛋白。

[0402] 使用 ProteOn 表征 LC10YTE 与嵌合变体的结合特征

[0403] 使用 ProteOn XPR36 仪器(BioRad,海格立斯(Hercules),加利福尼亚州(CA))对 LC10YTE 与 α 毒素 /LukF-PV 嵌合变体的结合特征进行了研究。使用标准胺偶联将在 10mM 乙酸钠 [pH5.0] 中的抗 α 毒素多克隆抗体(内部产生的抗体)以对于每个通道大约 5000 个反应单位(RU)固定至 GLC 生物传感器芯片的表面。将细菌溶解产物上清液中的 α 毒素 /LukF-PV 嵌合蛋白注射在固定的 GLC 表面上,从而获得大约 200RU 的捕获反应,未转化的细菌溶解产物上清液也在相同的条件下被注射而作为参考通道。将 LC10YTE 样品制备在磷酸盐缓冲盐水(PBS) (pH7.4)、0.005% 吐温 -20 中,并且以 90 μ L/min 以典型范围从 50nM 至 3.125nM 的浓度注射持续 150 秒或 180 秒。使用 600 秒或 800 秒解离时间。还在 LC10YTE 的注射后如下地监测嵌合变体的表达水平:使抗 α 毒素多克隆抗体以 90 μ L/min 在典型范围从 50nM 至 3.125nM 的浓度下流动持续 150 秒或 180 秒,其中解离时间为 600 秒或 800 秒。通过以 100 μ L/min 注射甘氨酸(10mM, pH1.5)持续 30 秒将表面再生。将所有的传感

图数据用 ProteOn Manager3.0.1 软件处理。

[0404] 实例 2:抗 α 毒素 mAb 产生

[0405] 抗 α 毒素(AT)单克隆抗体(mAb)是在 VelocImmune 小鼠中产生的,这种小鼠已经被遗传工程化为含有具有融合至小鼠恒定域的全人可变区的抗体谱。生成的抗体是人:小鼠嵌合体,通过将来自嵌合 mAb 的人可变域与来自克隆的人 IgG-1 的恒定区进行基因融合,该嵌合体容易地转化为全人 IgG。将小鼠用在此所述的非溶血性 AT 突变体(AT_{H35L})免疫,并且使用标准方法产生杂交瘤。最初,通过抗原 ELISA,发现大于 1800 份杂交瘤上清液含有结合重组 AT (rAT-his)的 IgG。然后通过溶血试验中 rAT-his 介导的兔红细胞(RBC)溶解的抑制,将展现结合至 rAT-his 的杂交瘤上清液的活性进行筛选,从而使功能性 mAb 库减少至大约 250 个。然后将杂交瘤上清液针对 IgG 水平进行归一化,并且比较它们的抑制活性。选择十三种或最有力的 rAT-his 抑制剂用于有限稀释克隆,并且用于小规模 IgG 表达和纯化。在这些克隆的筛选和随后的生物化学和体内表征之后,如下所述,VH 和 VL 序列被进一步优化以产生另外的如在下表 7 中列出的抗体。

[0406] 实例 3:细胞溶解活性的抑制

[0407] 在溶血试验中,比较了 13 种纯化的抗 AT IgG 的抑制活性。在溶血试验中,在恒定数量的 nAT 和兔红细胞的存在下,将纯化的抗 AT mAb 逐步增高剂量(titrated)。在恒定量的天然 AT (nAT)和兔红细胞(RBC)的存在下,将 mAb 各自从 20 μ g/mL 降低剂量(titrated down)。通过到上清液中的血红蛋白释放来测量溶血。如下计算溶血抑制百分比(%):抑制% = $100 \times [100 - (A_{490} \text{ nAT+Ab}) / (A_{490} \text{ nAT 无 Ab})]$ 。证明十三种最有力的 rAT-his 抑制剂的代表性溶血试验显示于图 1A 和 1B 中。非特异性 IgG 对照(R347)被包括作为阴性对照。

[0408] 13 种纯化的 mAb 中仅有 7 种(mAb ;2A3.1、10A7.5、11D12.1、12B8.19、15B6.3、25E9.1 和 28F6.1)抑制 nAT 介导的 RBC 溶解(参见图 1A 和 1B)。三种抗体(2A3.1、10A7.5 和 12B8.19)是有力的抑制剂,并且在 1:1 (IgG 摩尔:AT 摩尔)比率下展现对 nAT 介导的 RBC 溶解的大约 80% 抑制。这些结果表明产生的 mAb 可以抑制兔 RBC 中的孔形成。

[0409] 人红细胞不具有大量的针对 AT 的受体。因此,人 RBC 不如兔 RBC 对于 nAT 介导的溶解一样敏感,并且可能不是感染期间针对 AT 的主要目标。其他细胞类型(例如上皮细胞、淋巴细胞、单核细胞和巨噬细胞)是在葡萄球菌感染期间针对 nAT 的效应更有意义的目标。在 nAT 介导的人细胞系 A549 (肺泡上皮细胞系)和 THP-1 (单核细胞系)的溶解中检查了纯化抗体的活性。在 A549 或 THP-1 细胞的存在下,将单克隆抗体类(mAb)针对 nAT 的恒定水平逐步增高剂量。通过乳酸脱氢酶(LDH)的释放以及如在此所述确定的 LDH 释放的抑制 % 来量化细胞溶解。结果以图形方式显示于图 2A 和 2B 中。抑制兔 RBC 溶解的 mAb 也抑制 nAT 介导的人 A549 和 THP-1 细胞两者的溶解(分别参见图 2A 和 B),除了 11D12.1 抑制 A549 细胞的溶解而对 nAT 介导的 THP-1 细胞的溶解没有影响之外。由这些 mAb 展现的有力的抗 AT 活性突出了这些抗体在感染期间抑制 AT 活性的潜在效用,由此限制葡萄球菌相关症状和疾病的进展。

[0410] 实例 4:用抗 AT mAb 的被动免疫减少皮肤坏死病灶

[0411] 金黄色葡萄球菌是医院和社区两者中皮肤和软组织感染(SSTI)的主要原因,这些感染的时常特征为炎症、组织损伤以及脓液形成。AT 可以在这些感染中起着导致高度炎症应答和组织损伤的作用,并且 AT 功能的抑制进而限制细菌引起严重疾病的能力。为了确定

抗 AT mAb 在最小化、减少或消除金黄色葡萄球菌感染的影响中的有用性,在用金黄色葡萄球菌 Wood 皮下感染之前 24 小时将 5 只小鼠的组各自腹膜内 (IP) 注射 7 种抑制性 mAb (例如,大约 5mg/kg) 以及 IgG-1 同种型对照 (R347)。每天测量皮肤坏死病灶的大小,持续 6 天,并且用照相的方式进行记录,如在图 3A 中所示(第 6 天示于图 3A 中)。nAT 功能的 5 种最有力的体外抑制剂 (2A3.1、10A7.5、12B8.19、25E9.1 和 28F6.1) 相对于 R347 对照显著减小了病灶大小,而在体外最小有力的 mAb (11D12.1、15B6.3) 相对于对照不具有对病灶大小的显著影响,如在图 3A 和 3B 所示。图 3B 图形展示了随着时间的过去的病灶大小的减小。2A3.1、10A7.5、12B8.19、25E9.1 和 28F6.1 是体外 AT 功能的有力抑制剂,并且在 SSTI 的小鼠模型中还展现出有力的预防作用。在皮肤坏死模型中,还测试了另外的抗体,LC10、QD20、QD33、和 QD37。在如上所述用金黄色葡萄球菌 Wood 皮下感染之前 24 小时将这些单克隆抗体以 1mg/kg 和 0.5mg/kg 腹膜内 (IP) 注射到每个组的五只小鼠中。结果显示于图 17A 和 B 中。P 值是使用 Dunnett 事后检验计算的。对于 1mg/kg 实验,如与测试 Ab 相比的,对于 R347 对照的 p 值为 $p < 0.0001$ 。对于 0.5mg/kg 实验,如与测试 Ab 相比的,对于 R347 对照的 p 值为 $p < 0.05$ 。

[0412] 实例 5:用抗 AT mAb 被动免疫增加在小鼠肺炎中的存活

[0413] 在小鼠肺炎模型中测试用产生的最有力的抗 AT mAb 进行的预防。在用金黄色葡萄球菌 USA300 (BAA-1556) 鼻内感染之前二十四小时,将 C57BL/6J 小鼠用大约 5mg/kg、大约 15mg/kg、以及大约 45mg/kg 的 2A3.1、10A7.5、12B8.19 或 28F6.1 被动免疫。然后监测存活,持续 6 天,并且如在图 4-7 中所示将其与在 45mg/kg 的同种型对照 (R347) 进行比较。使用对数秩检验计算统计学显著性。图 4 图形展示了在用不同量的 mAB12B.19 进行被动免疫之后在经过金黄色葡萄球菌感染过程中的存活百分比。图 5 图形展示了在用不同量的 mAB2A3.1 进行被动免疫之后在经过金黄色葡萄球菌感染过程中的存活百分比。图 6 图形展示了在用不同量的 mAB28F6.1 进行被动免疫之后在经过金黄色葡萄球菌感染过程中的存活百分比。图 7 图形展示了在用不同量的 mAB10A7.5 进行被动免疫之后在经过金黄色葡萄球菌感染过程中的存活百分比。

[0414] 相对于对照,所有的抗 AT 抗体显示导致存活的显著改进,导致在 45mg/kg 剂量下至少 90% 存活(参见图 4-7)。 α 毒素被认为是葡萄球菌肺炎中的关键的毒力决定因素。在此呈现的结果说明了有力的抑制性 mAb 的被动给予是用于疾病预防的有效途径。总之,在此呈现的动物研究支持 AT 在葡萄球菌疾病中的作用,并且提供了抑制 AT 功能以限制与金黄色葡萄球菌感染相关的疾病严重性或甚至死亡的 mAb 的用途的支持。

[0415] 为了进一步表征在感染期间抗 AT mAb 对细菌数的影响,在用大致 1.3×10^8 cfu 的金黄色葡萄球菌 USA300 鼻内感染之前 24 小时将全人型式 mAb2A3.1 (例如,2A3hu) 预防性地递送至小鼠。感染后四十八小时,使小鼠安乐死,并且将它们的肺和肾收集并且进行处理以用于细菌计数(参见图 8A 和 8B)。在感染后 4 和 24 小时之后,使小鼠安乐死,并且取样品以测量细胞因子产生(下文描述,并且见图 9) 并且用于组织病理学分析(下文描述,并且参见图 10)。P 值是使用 Dunnett 事后检验计算的。细菌计数的代表性结果呈现于图 8A 和 8B 中。2A3hu 的预防性给予相对于 R347 对照导致在肺(见图 8A) 和肾(见图 8B) 两者中细菌数目的显著减少,指示 AT 功能的抑制可以限制疾病进展、增强清除并且还抑制入侵生物的全身性扩散。

[0416] 在肺炎模型中,还测试了另外的抗体,LC10、QD20、QD33、和 QD37。在用大致 2×10^8 cfu 的金黄色葡萄球菌 USA300 鼻内(IN)感染之前 24 小时将这些单克隆抗体以 5mg/kg 腹膜内(IP)注射到每个组的十只小鼠中。这些实验的结果显示于图 18 中。P 值是使用 Dunnett 事后检验计算的。对于与 QD37 相比的 2A3mAb 的 p 值是 $p = 0.0072$;对于与 LC10 相比的 2A3mAb 的 p 值是 $p = 0.0523$;对于与 QD33 相比的 2A3mAb 的 p 值是 $p = 0.0521$ 。

[0417] 实例 6:在肺炎模型中 AT 的抑制减少促炎细胞因子的产生

[0418] 金黄色葡萄球菌感染典型地伴随促炎细胞因子的过度产生,促炎细胞因子被认为导致了增加的免疫细胞活化和浸润,最终导致增加的充血和组织坏死(布贝克沃登伯格(Bubeck Wardenburg, J.) 2007)。在小鼠肺炎模型中,金黄色葡萄球菌 AT 缺失突变体相对于其同基因的野生型金黄色葡萄球菌已经显示展现出降低的毒力。进一步证明的是,针对 AT 的主动和被动免疫减少了急性肺损伤的已知介质 IL-1 β 的表达,并且保护小鼠免于严重的肺炎(布贝克沃登伯格(Bubeck Wardenburg, J.) 2007;布贝克沃登伯格(Bubeck Wardenburg, J.) 2008)。如上所见到的,这些结果表明,在金黄色葡萄球菌感染期间抑制 AT 可以减少促炎细胞因子的产生,并且因此限制过度细胞浸润,伴随的最终结果为较少的肺炎症状以及增强的细菌清除。

[0419] 为了测试这个假设,在用大致 1.3×10^8 cfu 的金黄色葡萄球菌 USA300 鼻内感染之前,将小鼠用 2A3hu 被动免疫。在感染后四和二十四小时,使小鼠安乐死,并且将一半的肺进行固定并制备用于苏木精和曙红染色和显微镜检,同时将支气管肺泡灌洗液从另一面收集并处理以确定细胞因子水平。在被动免疫之后的细胞因子产生的代表性结果显示于图 9 中。图 10 用照相的形式展示了用在此所述的 mAb 进行被动免疫的有效性。

[0420] 在感染后四小时,在 R347 和 2A3hu 处理的小鼠中的细胞因子水平相似,然而到感染后 24 小时后,在 2A3hu 处理的动物中 IL-6、TNF- α 、KC 和 IL-1 β 的水平全部降低,如在图 9 所示(参见在 24 小时时间点处圈出的结果),指示 2A3hu 的预防性给予相对于对照导致检测到降低的细胞因子水平。这些数据由来自肺的组织病理学检查的结果支持,其中 R347 处理的小鼠具有突出的肺部炎症、坏死以及肺泡炎连同菌落的存在(参见图 10 中顶部左边和底部左边图片)。相比之下,2A3hu 处理的动物具有限制的肺部炎症而无坏死、肺泡炎或可见的菌落(参见图 10 中顶部右边和底部右边图片)。在肺炎模型中的抗 AT mAb 的保护效应与减少的炎症应答相关,减少的炎症应答可以限制局部组织损伤并且促进细菌清除。

[0421] 实例 7:结合动力学和竞争

[0422] 使用表面等离子共振 (SPR) 来进行亲和力测量,从而进一步表征展现出蛋白质抑制活性的 mAb。使用大鼠抗小鼠 IgG 将纯化的 IgG 捕获在传感器上,并且将芯片暴露至具有不同浓度的 nAT 的溶液。测量缔合和解离速率常数,从它们确定结合常数。抗体 2A3.1、10A7.5、25E9.1 和 1288.19 具有相似的亲和力,分别具有 601、504、337 和 485pM 的 K_D 值,而 28F6.1 展现出 13nM 的 K_D 值,如下表中所示。 K_D 被计算为 k_{off}/k_{on} 。

[0423]

IgG	k_{on} (1/Ms) ($\times e+5$)	k_{off} (1/s) ($\times e-4$)	K_D (nM)	χ^2
2A3.1	13.7	8.21	0.601	0.433
10A7.5	6.92	3.49	0.504	0.345
12B8.19	5.75	2.78	0.485	0.288
25E9.1	6.24	2.1	0.337	0.291
28F6.1	0.67	8.81	13.1	0.906

[0424] 还使用 SPR 进行竞争实验,其结果表明抗体 2A3.1、10A7.5、25E9.1 和 1288.19 可能结合相同或相似的表位。

[0425] 对于 mAbs QD20、LC10、QD33、QD37 和 2A3GL 的 IC_{50} 和 K_d 值显示如下

[0426]

Ab	IC_{50} (μ g/ml)	K_d (nM)
QD20	0.16	0.087
LC10	0.12	0.17
QD33	0.09	0.33
QD37	0.17	0.18
2A3GL	0.48	1.44

[0427] 用 0.1mg/ml 的金黄色葡萄球菌 α 毒素使用 RBC 溶血试验计算 IC_{50} 。

[0428] 实例 8:抑制性 mAb 阻断抗 SDS 的七聚体的形成

[0429] 金黄色葡萄球菌 α 毒素 (AT) 被认为以多步过程溶解细胞,在该过程中,分泌的可溶性单体 AT 分子结合至细胞表面受体,或非特异性地吸附至细胞膜,在细胞表面上寡聚化为七聚体前孔 (pre-pore) 并且经历构象变化,导致介导随后的靶细胞溶解的 14-链跨膜 B-桶的形成。被在此所述的 mAb 抑制的机制被进一步被表征化以确定抑制性 mAb 在哪个步骤阻断 AT 功能。检验这些 mAb 防止 AT 结合至连接在 96 孔组织培养板上的兔 RBC 血影的能力。将 96 孔 ELISA 板用 PBC 包被,并且用 2% BSA 封闭。然后将血影与 nAT+/- α 20 摩尔过量的抗 AT IgG 一起孵育。然后用兔抗 AT IgG 检测 nAT 的结合,并且计算结合%;结合% = $100 \times [100 - (A_{490}nAT+mAb) / (A_{490}nAT \text{ 无 mAb})]$ 。在 20 摩尔 IgG 过量下,不存在 nAT 结合至兔 RBC 膜的抑制作用,如在图 11 中所示,指示这些抑制性 mAb 在受体结合的步骤中不起作用。

[0430] 除了细胞膜外,已经显示 AT 和其他成孔毒素易于在脂质体膜上组装并且形成孔。最初,在脂质体上测试抗 AT IgG 对 AT 七聚体形成的作用。在 AT 与用 10 倍摩尔过量的脂质体(脂质:AT, wt:wt)孵育后,在 IgG 的存在下,通过 western 印迹分析来检验七聚体形成,如在图 12 中所示。然后在 37°C 将样品溶解于 SDS-PAGE 样品缓冲液中,并且通过 western 印迹分析来检测七聚体形成。抗 SDS 的七聚体存在于在图 12 泳道 6 和 7 (例如,分别为 mAb9D7.3 和无 IgG 的对照泳道)中显示的凝胶的顶部是很清楚的。所有的抑制性 mAb 去除

七聚体形成,而无关的同种型对照(例如,泳道 6 ;9D7. 3)没有影响。寡聚化活性的抑制是在兔 RBC 血影上的寡聚化测定中使用 mAb2A3. 1、10A7. 5 和 12B8. 19 来证实的,如在图 13A 和 13B 中所示的代表性 western 印迹中所展示的。在与兔红细胞血影孵育并且通过 SDS-PAGE 检测七聚体形成之前,孵育 AT 伴随 IgG 的逐步增高剂量(titration)。mAb2A3. 1、10A7. 5 和 12B8. 19 有效地抑制 AT 七聚体形成(甚至在 1:1IgG: 毒素比率下(摩尔: 摩尔)),并且当这些 mAb 水平降低时寡聚化抑制效应被取消(titrated)(参见图 13A 和 13B ;七聚体以 0. 5:1 和 0. 25:1 的摩尔比出现)。这些结果表明,mAb2A3. 1、10A7. 5 和 12B8. 19 通过抑制抗 SDS 的七聚体形成而预防 AT 介导的细胞溶解。

[0431] 实例 9 :全人 IgG 的转化

[0432] 全人 IgG 包括基因融合至人 IgG-1 恒定域的、来自在此所述的嵌合 mAb 的重链(V_H)和轻链(V_L)的可变域。将来自各个嵌合 mAb 的 V_H 和 V_L 进行克隆、测序并且分别融合至人 IgG-1 V_H 和人 κ 恒定域。生成的全人 IgG-1s 显示为保留负责任的人可变区以及感兴趣 mAb 的结合特性。将全人抗体进行表达、纯化,并且将它们的活性与来自 VelocImmune 小鼠杂交瘤的嵌合 mAb 进行比较。除了 25E9. 1hu 之外,全人 mAb 与原始的嵌合体相比在抑制 RBC、A549 和 THP-1 细胞溶解方面展现出相似的效力,它变得比原始的 25E9. 1 嵌合体显著更有力。图 14-16 图形展示了在红细胞(RBC ;见图 14)、A549 细胞(见图 15)和 THP-1 细胞(见图 16)中 LDH 释放的抑制(细胞溶解的特征)。人 25E9. 1mAb (例如,25E9. 1hu)的效力的增加可能是由于在含有 2 种相异的抗 AT IgG 分子的原始杂交瘤中的混合细胞群体所致,其中仅有一种可能已经具有抑制 nAT 功能的活性。因此,对于原始嵌合体 mAb 的体积摩尔浓度计算和活性测量可能不具有直接相关性。

[0433] 实例 10 :针对特异性结合至金黄色葡萄球菌 α 毒素的抗体的代表性氨基酸和核苷酸序列

[0434] 表 1 :针对 mAb2A3. 1、10A7. 5、12B8. 19 和 25E9. 1 的 VL CDR 序列

[0435]

SEQ ID NO:	描述	序列
SEQ ID NO:1	VL CDR1	RASQSISSWLA
SEQ ID NO:2	VL CDR2	KASSLES
SEQ ID NO:3	VL CDR3	QQYNSYWT

[0436] 表 2 :针对 mAB28F6. 1 的 VL CDR 序列

[0437]

SEQ ID NO:	描述			序列
SEQ ID NO: 4	mAb	28F6.1	VL	RASQGIRNDLG
SEQ ID NO: 5	mAb	28F6.1	VL	DASSLQS
SEQ ID NO: 6	mAb	28F6.1	VL	LQDYNYPWT

[0438] 表 3 :针对 mAb2A3.1 的 VH CDR 序列

[0439]

SEQ ID NO:	描述	序列
SEQ ID NO:7	VH CDR1	SYDMH
SEQ ID NO:8	VH CDR2	GIGTAGDTYYPGSVKG
SEQ ID NO:9	VH CDR3	DNYSSTGGYYGMDV

[0440] 表 4 :针对 mAb10A7.5 和 12B8.19 的 VH CDR 序列

[0441]

SEQ ID NO:	描述	序列
SEQ ID NO:10	VH CDR1	RYDMH
SEQ ID NO:11	VH CDR2	VIGTDGDTYYPGSVKG
SEQ ID NO:12	VH CDR3	DRYSSSNHYNGMDV

[0442] 表 5 :针对 mAb28F6.1 的 VH CDR 序列

[0443]

SEQ ID NO:	描述			序列
SEQ ID NO: 13	mAb	28F6.1	VH	SYAMT

[0444]

	CDR1			
SEQ ID NO: 14	mAb	28F6.1	VH	VISGSGGSTYYADSVKG
SEQ ID NO: 15	mAb	28F6.1	VH	DGRQVEDYYYYYGMDV

[0445] 表 6 :针对 mAb25E9.1 的 VH CDR 序列

[0446]

SEQ ID NO:	描述	序列
SEQ ID NO: 7	mAb 25E9.1 VH CDR1	SYDMH
SEQ ID NO: 17	mAb 25E9.1 VH CDR2	VIDTAGDTYYPGSVKG
SEQ ID NO: 18	mAb 25E9.1 VH CDR3	DRYSGNFHYNGMDV

[0447] 表 7: 针对抗 α 毒素 mAb 的 VL 和 VH 氨基酸序列

[0448]

描述	VH 或 VL 序列 (其中 CDR 加下划线)	CDR1	CDR2	CDR3
mAb 2A3.1 VL	DIQMTQSPSTLSASVGDR VTITCRASQSISSWLA WY QQKPGKAPKLLIYKASSLE SGVPSRFSGSGSGTEFTLT I SSLQPDDFATYYCQQYNS YWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 19)	RASQSISS WLA (SEQ ID NO: 1)	KASSLES (SEQ ID NO: 2)	QQYNSY WT (SEQ ID NO: 3)
mAb 2A3.1 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTFSSYDMHW VRQATGKGLEWVSGIGTA GDTYYPGSVKGRFTISREN AKNSLYLQLNSLRAGDTA VYFCARDNYSSTGGYYG MDVWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO: 20)	SYDMH (SEQ ID NO: 7)	GIGTAGD TYYPGSV KG (SEQ ID NO: 8)	DNYSSTG GYYGMD V (SEQ ID NO: 9)
mAb 10A7.5 VL	DIQMTQSPSTLSASVGDR VTITCRASQSISSWLA WY QQKPGKAPKLLIYKASSLE SGVPSRFSGSGSGTEFTLT I SSLQPDDFATYYCQQYNS YWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 21)	RASQSISS WLA (SEQ ID NO: 1)	KASSLES (SEQ ID NO: 2)	QQYNSY WT (SEQ ID NO: 3)

[0449]

描述	VH 或 VL 序列 (其中 CDR 加下划线)	CDR1	CDR2	CDR3
mAb 10A7.5 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTFSRYDMHW VRQATGKGLEWVSVIGTD GDTYYPGSVKGRFIISREN AKNSLYLEMNSLRAGDTA VYYCARDRYSSSNHYNG MDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 22)	RYDMH (SEQ ID NO: 10)	VIGTDGD TYYPGSV KG (SEQ ID NO: 11)	DRYSSSN HYNGMD V (SEQ ID NO: 12)
mAb 12B8.19 VL	DIQMTQSPSTLSASVGDR VTITCRASQSISSWLAWY QQKPGKAPKVLIIYKASSL ESGVPSRFSGSGSGTEFTL TISSLQPDDEFATYYCQQY NSYWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 23)	RASQSISS WLA (SEQ ID NO: 1)	KASSLES (SEQ ID NO: 2)	QQYNSY WT (SEQ ID NO: 3)
mAb 12B8.19 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTFSRYDMHW VRQATGKGLEWVSVIGTD GDTYYPGSVKGRFIISREN AKNSLYLEMNSLRAGDTA VYYCARDRYSSSNHYNG MDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 24)	RYDMH (SEQ ID NO: 10)	VIGTDGD TYYPGSV KG (SEQ ID NO: 11)	DRYSSSN HYNGMD V (SEQ ID NO: 12)
mAb 28F6.1 VL	AIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQGIRNDLGWYQ QKPGKAPKLLIYDASSLQS GVPSRFSGSGSGTDFLTIS SLQPEDFATYYCLQDYN PWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 25)	RASQGIR NDLG (SEQ ID NO: 4)	DASSLQS (SEQ ID NO: 5)	LQDYN PWT (SEQ ID NO: 6)
mAb 28F6.1 VH	EVQLLES GGGLVQPGGSL RLSCAASGFTFSYAMTW VRQAPGKGLEWVSVISGS GGSTYYADSVKGRFTVSR DNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAKDGRQVEDYY YYYGMDVWGQGTTVTVS S (SEQ ID NO: 26)	SYAMT (SEQ ID NO: 13)	VISGSGG STYYADS VKG (SEQ ID NO: 14)	DGRQVE DYYYYY GMDV (SEQ ID NO: 15)

[0450]

描述	VH 或 VL 序列 (其中 CDR 加下划线)	CDR1	CDR2	CDR3
mAb 25E9.1 VL	DIQMTQSPSTLSASVGDR VTITCRASQSISSWLA WY QQKPGKAPKLLIY <u>KASSLE</u> SGVPSRFSGSGSGTEFTLT I SSLQPDDFATYYC <u>QQYNS</u> YWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 27)	RASQSISS WLA (SEQ ID NO: 1)	KASSLES (SEQ ID NO: 2)	QQYNSY WT (SEQ ID NO: 3)
mAb 25E9.1 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCTASGFTFSSYDMHW VRQATGKGLEWVSVIDTA GDTYYPGSVKGRFTISREN AKNSLYLQMNSLRAGDT AVYYCVRDRYSGNFMHYN GMDVWGQGTTTIVSS (SEQ ID NO: 28)	SYDMH (SEQ ID NO: 7)	VIDTAGD TYYPGSV KG (SEQ ID NO: 17)	DRYSGNF HYNGMD V (SEQ ID NO: 18)
mAb QD20 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTFSSYDMHW VRQATGKGLEWVSGIGTA GDTYYPGSVKGRFTISREN AKNSLYLQMNSLRAGDT AVYYCARDRYSPTGHYM GMDVWGQGTTTIVSS (SEQ ID NO: 41)	SYDMH (SEQ ID NO: 7)	GIGTAGD TYYPGSV KG (SEQ ID NO: 8)	DRYSPTG HYMGMD V (SEQ ID NO: 16)
mAb QD20 VL	DIQMTQSPSTLSASVGDR VTITCRASQSISSWLA WY QQKPGKAPKLLIY <u>KASSLE</u> SGVPSRFSGSGSGTEFTLT I SSLQPDDFATYYC <u>QQYDT</u> YWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 42)	RASQSISS WLA (SEQ ID NO: 1)	KASSLES (SEQ ID NO: 2)	QQYDTY WT (SEQ ID NO: 64)
mAb QD33 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTFSSYDMHW VRQATGKGLEWVSGIGTA GDTYYPGSVKGRFTISREN AKNSLYLQMNSLRAGDT AVYYCARDRYSRTGHYM GMDVWGQGTTTIVSS (SEQ ID NO: 43)	SYDMH (SEQ ID NO: 7)	GIGTAGD TYYPGSV KG (SEQ ID NO: 8)	DRYSRTG HYMGMD V (SEQ ID NO: 65)

[0451]

描述	VH 或 VL 序列 (其中 CDR 加下划线)	CDR1	CDR2	CDR3
mAb QD33 VL	DIQMTQSPSTLSASVGDR VTITCRASQSISSWLA WYQQKPGKAPKLLIYKASSLE SGVPSRFSGSGSGTEFTLT ISSLQPDDFATYYCQQYDT YWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 44)	RASQSISS WLA (SEQ ID NO: 1)	KASSLES (SEQ ID NO: 2)	QQYDTY WT (SEQ ID NO: 64)
mAb QD37 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTFSSYDMHW VRQATGKGLEWVSGIGTA GDTYYPGSVKGRFTISREN AKNSLYLQMNSLRAGDT AVYYCARDRYSTRGHYM GMSLWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 45)	SYDMH (SEQ ID NO: 7)	GIGTAGD TYYPGSV KG (SEQ ID NO: 8)	DRYSRTG HYMGMS L (SEQ ID NO: 66)
mAb QD37 VL	DIQMTQSPSTLSASVGDR VTITCRASQSISSWLA WYQQKPGKAPKLLIYKASSLE SGVPSRFSGSGSGTEFTLT ISSLQPDDFATYYCQQYDT YWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 46)	RASQSISS WLA (SEQ ID NO: 1)	KASSLES (SEQ ID NO: 2)	QQYDTY WT (SEQ ID NO: 64)
mAb QD3 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTFSSYDMHW VRQATGKGLEWVSGIGTA GDTYYPGSVKGRFTISREN AKNSLYLQMNSLRAGDT AVYYCARDNYSRTGHY MGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 47)	SYDMH (SEQ ID NO: 7)	GIGTAGD TYYPGSV KG (SEQ ID NO: 8)	DNYSRT GHYMGMD V (SEQ ID NO: 67)
mAb QD3 VL	DIQMTQSPSTLSASVGDR VTITCRASQSISSWLA WYQQKPGKAPKLLIYKASSLE SGVPSRFSGSGSGTEFTLT ISSLQPDDFATYYCKQYAD YWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 48)	RASQSISS WLA (SEQ ID NO: 1)	KASSLES (SEQ ID NO: 2)	KQYADY WT (SEQ ID NO: 68)

[0452]

描述	VH 或 VL 序列 (其中 CDR 加下划线)	CDR1	CDR2	CDR3
mAb QD4 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTFSSYDMHW VRQATGKGLEWVSGIGTA <u>GDTYYPGSVKGRFTISREN</u> AKNSLYLQMNSLRAGDT AVYYCARDNYSRTGHYM <u>GMDVWGQGTTVTVSS</u> (SEQ ID NO: 49)	SYDMH (SEQ ID NO: 7)	GIGTAGD TYYPGSV KG (SEQ ID NO: 8)	DNYSRT GHYMGMDV (SEQ ID NO: 67)
mAb QD4 VL	DIQMTQSPSTLSASVGDR VTITCRASQSISSWLAWY QQKPGKAPKLLIYKASSLE <u>SGVPSRFSGSGSGTEFTLTI</u> <u>SSLQPDDFATYYCQQYDT</u> <u>YWTFGQGTKVEIK</u> (SEQ ID NO: 50)	RASQSISS WLA (SEQ ID NO: 1)	KASSLES (SEQ ID NO: 2)	QQYDTY WT (SEQ ID NO: 64)
mAb QD23 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTFSSYDMHW VRQATGKGLEWVSGIGTA <u>GDTYYPGSVKGRFTISREN</u> AKNSLYLQMNSLRAGDT AVYYCARDRYSPTGHYM <u>GMSLWGQGTTVTVSS</u> (SEQ ID NO: 51)	SYDMH (SEQ ID NO: 7)	GIGTAGD TYYPGSV KG (SEQ ID NO: 8)	DRYSPTG HYMGMS L (SEQ ID NO: 78)
mAb QD23 VL	DIQMTQSPSTLSASVGDR VTITCRASQSISSWLAWY QQKPGKAPKLLIYKASSLE <u>SGVPSRFSGSGSGTEFTLTI</u> <u>SSLQPDDFATYYCQQYDT</u> <u>YWTFGQGTKVEIK</u> (SEQ ID NO: 52)	RASQSISS WLA (SEQ ID NO: 1)	KASSLES (SEQ ID NO: 2)	QQYDTY WT (SEQ ID NO: 64)
mAb QD32 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTFSSYDMHW VRQATGKGLEWVSGIGTA <u>GDTYYPGSVKGRFTISREN</u> AKNSLYLQMNSLRAGDT AVYYCARDRYSRTGHYM <u>GMDVWGQGTTVTVSS</u> (SEQ ID NO: 53)	SYDMH (SEQ ID NO: 7)	GIGTAGD TYYPGSV KG (SEQ ID NO: 8)	DRYSRTG HYMGMD V (SEQ ID NO: 65)

[0453]

描述	VH 或 VL 序列 (其中 CDR 加下划线)	CDR1	CDR2	CDR3
mAb QD32 VL	DIQMTQSPSTLSASVGDR VTITCRASQSISSWLA WYQQKPGKAPKLLIYKASSLE SGVPSRFSGSGSGTEFTLT ISSLQPDDFATYYCKQYAD YWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 54)	RASQSISS WLA (SEQ ID NO: 1)	KASSLES (SEQ ID NO: 2)	KQYADY WT (SEQ ID NO: 68)
mAb 2A3GL VH	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTFSSYDMHW VRQATGKGLEWVSGIGTA GDTYYPGSVKGRFTISREN AKNSLYLQMNSLRAGDT AVYYCARDNYSSTGGYY GMDVWVGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 55)	SYDMH (SEQ ID NO: 7)	GIGTAGD TYYPGSV KG (SEQ ID NO: 8)	DNYSSTG GYYGMD V (SEQ ID NO: 9)
mAb 2A3GL VL	DIQMTQSPSTLSASVGDR VTITCRASQSISSWLA WYQQKPGKAPKLLIYKASSLE SGVPSRFSGSGSGTEFTLT ISSLQPDDFATYYCQQYNS YWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 56)	RASQSISS WLA (SEQ ID NO: 1)	KASSLES (SEQ ID NO: 2)	QQYNSY WT (SEQ ID NO: 3)
mAb LC10 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTFSSHDMHW VRQATGKGLEWVSGIGTA GDTYYPDSVKGRFTISREN AKNSLYLQMNSLRAGDT AVYYCARDRYSPTGHYY GMDVWVGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 57)	SHDMH (SEQ ID NO: 69)	GIGTAGD TYYPDSV KG (SEQ ID NO: 70)	DRYSPTG HYYGMD V (SEQ ID NO: 71)
mAb LC10 VL	DIQMTQSPSTLSASVGDR VTITCRASQSISSWLA WYQQKPGKAPKLLIYKASSLE SGVPSRFSGSGSGTEFTLT ISSLQPDDFATYYCKQYAD YWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 58)	RASQSISS WLA (SEQ ID NO: 1)	KASSLES (SEQ ID NO: 2)	KQYADY WT (SEQ ID NO: 68)

[0454]

描述	VH 或 VL 序列 (其中 CDR 加下划线)	CDR1	CDR2	CDR3
mAb TVES VH	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTFSSYDMHW VRQATGKGLEWVSGIGTA GDTYYPGSVKGRFTISREN AKNSLYLQMNSLRAGDT AVYYCARDNYSPTGGYY GMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 59)	SYDMH (SEQ ID NO: 7)	GIGTAGD TYYPGSV KG (SEQ ID NO: 8)	DNYSPTG GYYGMD V (SEQ ID NO: 72)
mAb TVES VL	DIQMTQSPSTLSASVGDR VTITCRASQSISSWLAWY QQKPGKAPKLLIYKASSL KSGVPSRFSGSGSGTEFTL TISSLQPDDEFATYYCQQYE SYWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 60)	RASQSISS WLA (SEQ ID NO: 1)	KASSLKS (SEQ ID NO: 73)	QQYESY WT (SEQ ID NO: 74)
mAb 3H7KAD VH	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTFSSHDMHW VRQATGKGLEWVSGIGTR GDTYYPDSVKGRFTISREN AKNSLYLQMNSLRAGDT AVYYCARDRYSPTGHYY GMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 61)	SHDMH (SEQ ID NO: 69)	GIGTRGD TYYPDSV KG (SEQ ID NO: 75)	DRYSPTG HYYGMD V (SEQ ID NO: 71)
mAb 3H7KAD VL	DIQMTQSPSTLSASVGDR VTITCRASQSISSWLAWY QQKPGKAPKLLIYKASSLE SGVPSRFSGSGSGTEFTLTI SSLQPDDEFATYYCKQYAD YWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 58)	RASQSISS WLA (SEQ ID NO: 1)	KASSLES (SEQ ID NO: 2)	KQYADY WT (SEQ ID NO: 68)
mAb LC9 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTFSSHDMHW VRQATGKGLEWVSGIGTR GDTYYPDSVKGRFTISREN AKNSLYLQMNSLRAGDT AVYYCARDKYSPTGHYY GMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 62)	SHDMH (SEQ ID NO: 69)	GIGTRGD TYYPDSV KG (SEQ ID NO: 75)	DKYSPTG HYYGMD V (SEQ ID NO: 76)

[0455]

描述	VH 或 VL 序列 (其中 CDR 加下划线)	CDR1	CDR2	CDR3
mAb LC9 VL	DIQMTQSPSTLSASVGDR VTITCRASQSISSWLA <u>WY</u> QQKPGKAPKLLIY <u>KASSLE</u> SGVPSRFSGSGSGTEFTLT SSLPQDDFATYYCKQYAD <u>YWTFGQGTKVEIK</u> (SEQ ID NO: 58)	RASQSISS WLA (SEQ ID NO: 1)	KASSLES (SEQ ID NO: 2)	KQYADY WT (SEQ ID NO: 68)
mAb LC4 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTFSS <u>SHDMHW</u> VRQATGKGLEWVSGIGTR <u>GDTYYPDSVKGRFTISREN</u> AKNSLYLQMNSLRAGDT AVYYCARDKYSPGHYY GMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 62)	SHDMH (SEQ ID NO: 69)	GIGTRGD TYYPDSV KG (SEQ ID NO: 75)	DKYSPTG HYYGMD V (SEQ ID NO: 76)
mAb LC4 VL	DIQMTQSPSTLSASVGDR VTITCRASQSISSWLA <u>WY</u> QQKPGKAPKLLIY <u>KASSL</u> <u>VK</u> GVPSRFSGSGSGTEFTL TISSLPQDDFATYYC <u>QQYE</u> <u>SYWTFGQGTKVEIK</u> (SEQ ID NO: 63)	RASQSISS WLA (SEQ ID NO: 1)	KASSLVK (SEQ ID NO: 77)	QQYESY WT (SEQ ID NO: 74)
mAb LC5 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTFSS <u>SHDMHW</u> VRQATGKGLEWVSGIGTA <u>GDTYYPDSVKGRFTISREN</u> AKNSLYLQMNSLRAGDT AVYYCARDRYSPGHYY GMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 79)	SHDMH (SEQ ID NO: 69)	GIGTAGD TYYPDSV KG (SEQ ID NO: 70)	DRYSPTG HYYGMD V (SEQ ID NO: 71)
mAb LC5 VL	DIQMTQSPSTLSASVGDR VTITCRASQSISSWLA <u>WY</u> QQKPGKAPKLLIY <u>KASSL</u> <u>VK</u> GVPSRFSGSGSGTEFTL TISSLPQDDFATYYC <u>QQYE</u> <u>SYWTFGQGTKVEIK</u> (SEQ ID NO: 63)	RASQSISS WLA (SEQ ID NO: 1)	KASSLVK (SEQ ID NO: 77)	QQYESY WT (SEQ ID NO: 74)

[0456] 表 8: 针对抗 α 毒素 mAb 的 VL 和 VH 核苷酸序列

[0457]

SEQ ID NO:	描述	序列
SEQ ID NO: 29	mAb 2A3.1 VL 核苷酸序列	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTC CACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGAC AGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCA GTCAGAGTATTAGTAGCTGGTTGGC CTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAA GCCCCTAAACTCCTGATCTATAAGG CGTCTAGTTTAGAAAGTGGGGTCCC ATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCT GGGACAGAATTCCTCTCACCATCA GCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGC AACTTATTACTGCCAACAGTATAAT AGTTATTGGACGTTTCGGCCAAGGGA CCAAGGTGGAAATCAAA
SEQ ID NO: 30	mAb 2A3.1 VH 核苷酸序列	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGG GAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTC CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTG GATTCACCTTCAGTAGCTACGACAT GCACTGGGTCCGCCAAGCTACAGGA AAAGGTCTGGAGTGGGTCTCAGGTA TTGGCACTGCTGGTGACACATATTAT CCAGGCTCCGTGAAGGGCCGATTCA CCATCTCCAGAGAAAATGCCAAGAA CTCCTTGTATCTTCAATTGAACAGCC TGAGAGCCGGGGACACGGCTGTGTA CTTCTGTGCAAGAGACAATTATAGC AGCACCGGGGGGTACTACGGTATGG ACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGT CACCGTCTCCTCA
SEQ ID NO: 31	mAb 10A7.5 VL 核苷酸序列	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTC CACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGAC AGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCA GTCAGAGTATTAGTAGCTGGTTGGC CTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAA GCCCCTAAACTCCTGATCTATAAGG CGTCTAGTTTAGAAAGTGGGGTCCC ATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCT GGGACAGAATTCCTCTCACCATCA GCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGC AACTTATTACTGCCAACAGTATAAT AGTTATTGGACGTTTCGGCCAAGGGA CCAAGGTGGAAATCAAA

[0458]

SEQ ID NO:	描述	序列
SEQ ID NO: 32	mAb 10A7.5 VH 核苷酸序列	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGG GAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTC CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTG GATTCACCTTCAGTAGGTACGACAT GCACTGGGTCCGCCAAGCTACAGGA AAAGGTCTGGAGTGGGTCTCAGTTA TTGGTACTGATGGTGACACATACTAT CCAGGCTCCGTGAAGGGCCGATTCA TCATCTCCAGAGAAAATGCCAAGAA CTCCTTGTATCTTGAAATGAACAGCC TGAGAGCCGGGGACACGGCTGTGTA TACTGTGCAAGAGATCGGTATAGC AGCTCGAACCACTACAACGGTATGG ACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGT CACCGTCTCCTCA
SEQ ID NO: 33	mAb 12B8.19 VL 核苷酸序列	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTC CACCTGTCTGCATCTGTAGGAGAC AGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCA GTCAGAGTATTAGTAGCTGGTTGGC CTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAA GCCCCTAAGGTCCTGATCTATAAGG CGTCTAGTTTAGAAAGTGGGGTCCC ATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCT GGGACAGAATTCCTCTCACCATCA GCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGC AACTTATTACTGCCAACAGTATAAT AGTTATTGGACGTTTCGGCCAAGGGA CCAAGGTGGAAATCAAA
SEQ ID NO: 34	mAb 12B8.19 VH 核苷酸序列	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGG GAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTC CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTG GATTCACCTTCAGTAGGTACGACAT GCACTGGGTCCGCCAAGCTACAGGA AAAGGTCTGGAGTGGGTCTCAGTTA TTGGTACTGATGGTGACACATACTAT CCAGGCTCCGTGAAGGGCCGATTCA TCATCTCCAGAGAAAATGCCAAGAA CTCCTTGTATCTTGAAATGAACAGCC TGAGAGCCGGGGACACGGCTGTGTA TACTGTGCAAGAGATCGGTATAGC AGCTCGAACCACTACAACGGTATGG ACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGT CACCGTCTCCTCA

[0459]

SEQ ID NO:	描述	序列
SEQ ID NO: 35	mAb 28F6.1 VL 核苷酸序列	GCCATCCAGATGACCCAGTCTCCAT CCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGAC AGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAA GTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGG CTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAA GCCCCTAAGCTCCTGATCTATGATGC ATCCAGTTTACAAAGTGGGGTCCCA TCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTG GCACAGATTTCACTCTCACCATCAGC AGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAA CTTATTACTGTCTACAAGATTACAAT TACCCGTGGACGTTTCGGCCAAGGGA CCAAGGTGGAAATCAAA
SEQ ID NO: 36	mAb 28F6.1 VH 核苷酸序列	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGG GAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTC CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTG GATTCACCTTTAGCAGCTATGCCATG ACCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA AGGGGCTGGAATGGGTCTCAGTTAT TAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATAC TACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGT TCACCGTCTCCAGAGACAATTCCAA GAACACGCTGTATCTGCAAATGAAC AGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCG TATATTACTGTGCGAAAGATGGGAG GCAGGTCGAGGATTACTACTACTAC TACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAG GGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
SEQ ID NO: 37	mAb 25E9.1 VL 核苷酸序列	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTC CACCTGTCTGCATCTGTAGGAGAC AGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCA GTCAGAGTATTAGTAGCTGGTTGGC CTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAA GCCCCTAAGCTCCTGATCTATAAGG CGTCTAGTTTAGAAAGTGGGGTCCC ATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCT GGGACAGAATTCCTCTCACCATCA GCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGC AACTTATTACTGCCAACAGTATAAT AGTTATTGGACGTTTCGGCCAAGGGA CCAAGGTGGAAATCAAA

[0460]

SEQ ID NO:	描述	序列
SEQ ID NO: 38	mAb 25E9.1 VH 核苷酸序列	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGG GAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCTC CCTGAGACTCTCCTGTACAGCCTCTG GATTCACCTTCAGTAGTTACGACATG CACTGGGTCCGCCAAGCTACAGGAA AAGGTCTGGAGTGGGTCTCAGTTAT TGATACTGCTGGTGACACATACTATC CAGGCTCCGTGAAGGGCCGATTAC CATCTCCAGAGAAAATGCCAAGAAC TCCTTGTATCTTCAAATGAACAGCCT GAGAGCCGGGGACACGGCTGTGTAT TACTGTGTAAGAGATAGGTATAGTG GGAACCTCCACTACAACGGTATGGA CGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTC ACCGTCTCCTCA

[0461] 表 9: VL 和 VH CDR 总结表

描述	SEQ ID NO
VL CDR 1	1、4
VL CDR 2	2、5、73、77
VL CDR 3	3、6、64、68、74
VH CDR 1	7、10、13、69
VH CDR 2	8、11、14、17、70、75
VH CDR 3	9、12、15、18、16、65、66、67、71、72、76、78

[0463] 表 10: α 毒素氨基酸序列

[0464]

金黄色葡萄球菌 α 毒素	adsdiniktgttdigsnttvktgdlvtydkengmhkkvfysfiddknhnklvirkgtiagqyr vyseeganksglawpsafkvqlqldnevaqisdyyprnsidtkkeymstltgyfngnvtgddt gkiggliganvsightlkyvqpdkfildesptdkkvgwkvifnmmvqnwgpdrdswnpv ygnqlfinktrngsmkaadnflpdkassllssgfsdpfatvitmdrkaskqqtnidviyervrd dyqlhwtstnwkgntfkdktwdrsserykidwekeemtn (SEQ ID NO: 39)
金黄色葡萄球菌 α 毒素 H35L 突变体	adsdiniktgttdigsnttvktgdlvtydkengmlkkvfysfiddknhnklvirkgtiagqyr vyseeganksglawpsafkvqlqldnevaqisdyyprnsidtkkeymstltgyfngnvtgddt gkiggliganvsightlkyvqpdkfildesptdkkvgwkvifnmmvqnwgpdrdswnpv ygnqlfinktrngsmkaadnflpdkassllssgfsdpfatvitmdrkaskqqtnidviyervrd dyqlhwtstnwkgntfkdktwdrsserykidwekeemtn (SEQ ID NO: 40)

[0465] 实例 11: 抗葡萄球菌 α 毒素抗体结合区的作图

[0466] 将由 α 毒素的部分和 LukF-PV 组成的嵌合变体构建为鉴定相应于含有 Fc 变体的 mAb LC10 的抗体 (LC10YTE) 所结合的 α 毒素片段。选择 LukF-PV 作为嵌合配偶体, 因为它不被 LC10YTE 识别 (图 19), 但与 α 毒素共享高的结构相似性 (古奥 (Gouaux), E., M. Hobaugh (霍鲍), 等人 “alpha-Hemolysin, gamma-hemolysin, and leukocidin from *Staphylococcus aureus*: distant in sequence but similar in structure.” (“来自金黄色葡萄球菌的 α -溶血素、 γ 溶血素、以及杀白细胞素: 序列上远离但结构上相似”), Protein Sci (《蛋白质科学》) 6(12):2631-5 (1997); Meesters (米斯特斯), C., A. Brack (布拉克), 等人 “Structural characterization of the alpha-hemolysin monomer from *Staphylococcus aureus*.” (“来自金黄色葡萄球菌的 α -溶血素单体的结构表征”), Proteins (《蛋白质》) 75(1):118-26(2009)) 以及 25% 的序列一致性 (图 20)。通过系统性地用它们的相应 LukF-PV 对应物替换 50 个 α 毒素氨基酸 (aa), 构建了一系列的嵌合变体。在选择的感兴趣的 50aa 区段之内的较短的区域也被替换 (表 11)。使用 ProteOn 仪器来分析 LC10YTE 与这些变体的结合亲和力。LC10YTE 与变体的结合结果概述于表 11 中。

[0467] 表 11: LC10YTE 与 α 毒素 /LukF-PV 嵌合变体的结合谱

[0468]

嵌合变体	用 LukF-PV 对应物替换的 α 毒素的区域	通过抗 α 毒素多克隆抗体监测的表达水平	MEDI4893 的结合亲和力
α 毒素	N/A	良好*	~100pM
LukF-PV	N/A	N/A	无结合
KO_1-51	aa 1-51	低**	~100pM
KO_52-110	aa 52-110	低	无结合
KO_111-147	aa 111-147	良好	~100pM
KO_148-205	aa 148-205	良好	~100pM
KO_204-241	aa 204-241	低	无结合
KO_248-293	aa 248-293	低	无结合
KO_52-62	aa 52-62	良好	~100pM
KO_63-72	aa 63-72	良好	~100pM
KO_73-81	aa 73-81	无表达	N/A
KO_82-90	aa 82-90	良好	~100pM
KO_91-100	aa 91-100	良好	~100pM
KO_101-110	aa 101-110	良好	无结合
KO_204-231	aa 204-231	良好	无结合

[0469]

KO_204-213	aa 204-213	良好	~100pM
KO_214-223	aa 214-223	良好	~100pM
KO_224-231	aa 224-231	良好	无结合
KO_232-247	aa 232-247	良好	~100pM
KO_248-277	aa 248-277	良好	~1100pM (下降 10 倍的 KD)
KO_278-293	aa 278-293	良好	~100pM

[0470] * 在 50nM 的抗 α 毒素多聚物(poly)的结合信号是在 100RU 以上。** 在 50nM 的抗 α 毒素多聚物的结合信号是在 100RU 以下。

[0471] 除了 KO_73-81 之外,所有嵌合构建体可以按某一水平表达(表 11)。LC10YTE 不结合至编码取代 α 毒素的 aa101-110(KO_52-110 和 KO_101-110)或 aa224-231(KO_204-241、KO_204-231 和 KO_224-231)的 LukF-PV 的变体。当分别替换 aa248-277 (KO_248-277) 或其较大区段 aa248-293 (KO_248-293) 时,LC10YTE 的结合被显著损害或完全被破坏。

[0472] 在某些情况下,与 LC10YTE 结合的明显缺乏可以通过单独的展现不正确的折叠的 α 毒素 /LukF-PV 变体来解释。总体无能力正确折叠也可以解释 KO73-81 的表达的明显缺乏的原因。另外,在 α 毒素与 LukF-PV 之间的氨基酸序列同源性在不同的区域基本上不同。例如,相应于 α 毒素的 aa179-193 的区段与 LukF-PV 共享 67% 的一致性,而整个序列共享 25% 的一致性。因此,虽然在对换具有高度序列同源性的区域时没有看到对 LC10YTE 结合的影响,这些区域仍可以潜在地含有 LC10YTE 抗体与之结合的另外的序列。

[0473] 来自以上诱变分析的结果指示 α 毒素的 aa101-110、aa224-231、和 248-293 三个区域的任一个被 LukF-PV 残基的替换损害了 LC10YTE 结合,而替换剩余的 aa 区域没有显著影响。

[0474] 这三个区域代表在 α 毒素的三维结构中的两个不同位置。相应于 aa101-110 和 224-231 的区段在空间上靠近,并且被定位在 β -三明治结构域的一侧,而相应于 aa248-277 的区段主要定位于“Rim”结构域上(Song (宋), L., M. R. Hobaugh (霍鲍), 等人, “Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore.” (“葡萄球菌 α 溶血素的结构,七聚体的跨膜孔”), Science (《科学》) 274(5294):1859-66 (1996)) (图 21)。

[0475] 相应于 aa248-277 的区段显示对结合的影响,并且还包含被鉴定为包含 aa261-272 的 X 射线结构的接触残基(其中 T263、N264、和 K266 是真正的接触残基)(图 20)。另外,晶体结构揭露了相应于 aa173-201 的另一个区段,其中 D183、W187、和 N188 是真正的接触残基(图 20)。含有这个特定区段的嵌合变体(KO_148-205)仍然展现出对 LC10YTE 的良好结合。这可能归因于在 α 毒素与 LukF-PV 之间的这个特定区域的高度序列同源性(52% 一致性和 63% 的相似性)。在接触残基周围的氨基酸(aa179-193)共享甚至更高的同源性(67% 一致性),而相比之下整个序列仅共享 25% 的一致性。

[0476] 使用基于诱变的途径,相应于 aa248-277 的区段被鉴定为对于 LC10YTE 的结合是重要的。这被进一步通过 LC10YTE/ α 毒素复合体结构的结构分析来证实。结构分析还揭示了在某些在 aa248-277 片段之内、存在于 aa261-272 内的接触残基。

[0477] 如上所讨论,进行确定 LC10YTE mAb 的接触残基的 X 射线晶体学实验。将纯化的

α 毒素(通过 293 的残基 1)和 LC10YTE Fab 分开进行浓缩。将几乎等摩尔量的这些蛋白质混合在一起,并且使溶液经受用 Sephadex S75 (通用电气医疗集团)柱的凝胶过滤色谱。洗脱峰包含结合至彼此的两种蛋白质分子。进一步的浓缩和结晶产生衍射至 2.5Å 的晶体。

[0478] 使用分子置换方法来解析复合体的结构。使用预先确定的、具有去除互补决定区的 Fab 结构(D25)作为用于 LC10YTE Fab 的模板。使用从七聚体复合体(PDB Id. 7AHL)衍生的具有一些截短的 α 毒素分子单体作为用于 α 毒素分子的模板。用于晶体学研究的 α 毒素分子的序列相应于 SEQ ID NO:39 的序列。使用来自 CCP4 程序套的 Phaser 程序来鉴定 LC10YTE- α 毒素复合体的每个不对称单元中的两种复合体。使用来自 CCP4 程序套的 Refmac 程序进一步细化结构的模型。使用特定的晶体学程序“O”进行手工建造和迭代模型改进。

[0479] 发现 Fab 的重链和轻链两者与 α 毒素分子接触(图 22)。具体而言,晶体学研究确定了对于重链和轻链两者的相应于以下项的在 α 毒素分子之内的接触残基: N177、W179、G180、P181、Y182、D183、D185、S186、W187、N188、P189、V190、Y191 和 R200。另外,确定了轻链具有与 T261、T263、N264、K266 和 K271 的接触。互补位(paratope)鉴定为 LC - W32 (CDR1)、K50 (CDR2)、Y91、A92、N93、Y94、W95 (CDR3); HC - D33 (CDR1)、T53、A54、D56、Y58 (CDR2)、D98、Y100、P102、T103、G104、H105、Y106 (CDR3)。

[0480] 结合来自晶体学分析的结构数据的分子建模揭示,在从单体态到七聚体态的转换过程中多数 α 毒素结构保持不变。然而,显示关键结合区(其中接触残基被鉴定为 T261、T263、N264、K266 和 K271)相应于参与七聚体形成的 α 毒素分子的一部分。当 α 毒素分子处于单体态时,这个关键区被紧凑折叠,该关键区在插入宿主细胞膜之前延伸为环(图 23b),并且最后在组装成七聚体态之后形成蘑菇状结构的茎(图 23a)。在七聚体态中,如在图 24a 中所示的这个区将预期被遮蔽而免于被 LC10YTE 抗体分子结合。

[0481] 实例 12: 抗葡萄球菌 α 毒素抗体的治疗效力

[0482] 以上讨论的结果描述了在预防中使用的抗 AT mAb 的效力。为了探讨这些 mAb 还可以起治疗作用的可能性,在皮肤坏死和肺炎模型两者中在治疗环境中测试了 LC10 的效力。在皮肤坏死模型中,在细菌激发之前 24 小时(预防)、以及在皮内注射后 1、3 或 6 小时后(治疗)给予 LC10 (IV)。监测在动物上的病灶大小持续 6 天。预防(-24 小时)和感染后 1 或 3 小时后的治疗导致相对于阴性对照(R347)的病灶大小的减少(图 24)。在这个模型中当感染后 6 小时递送 LC10 时,强的治疗益处丧失。这些结果指示 LC10 可以作为葡萄球菌性皮肤和软组织感染的有效疗法起作用。

[0483] 在肺炎模型中进行了相似的实验,其中在预防中或鼻内感染后 1、3 或 6 小时,将 LC10 递送至小鼠(IV)。如所预期的,预防性 mAb 给予导致完全的存活。(图 25)虽然当感染后 1、3 或 6 小时给予 LC10 时不导致完全存活,当 LC10 以最高的 LC10 剂量用于感染后 1 小时的治疗中时,在死亡时间上的益处相对于阴性对照仍然存在。鉴于模型对高感染剂量以及迅速的死亡起始的要求,这些存活的改进指示在人感染期间的治疗改进可以出现。

[0484] 实例 13: 万古霉素与抗 α 毒素 mAb LC-10 组合的效力

[0485] 进行了这样的研究,该研究通过比较抗 α 毒素 mAb 和万古霉素单一疗法与组合疗法而评定在小鼠肺炎模型中抗 α 毒素 mAb LC10 供在用万古霉素的辅助治疗中使用的潜力。

[0486] 将七周龄雌性 C57BL/6J 小鼠用 2×10^8 cfu (LD100) 的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 USA300 进行鼻内感染。将万古霉素和 LC-10 单独地逐步增高剂量以确定最佳的和次有效的剂量。为了在单一疗法或具有万古霉素的二联疗法中评估 mAb, 将小鼠在感染后一小时用 LC-10 的单一腹膜内剂量或阴性对照抗体 R347 (15mg/kg) 进行治疗。在单一疗法或二联疗法中的万古霉素治疗在感染后 1 小时后起始, 并且一日二次 (BID) 皮下给予 3 天。在第七天结束时确定所有治疗组的存活百分比。使用 Mandel-Cox 对数秩检验分析存活曲线。

[0487] 用万古霉素以 200mg/kg/天或 40mg/kg/天治疗分别导致 90% 和 43% 的存活。感染后使用在 45mg/kg 或 15mg/kg 的 LC-10 的单一疗法保护 50% 和 33% 的小鼠。(图 26A 和 B) 用 LC-10 的单一的次有效剂量 (15mg/kg) 与在 40mg/kg 的万古霉素的一日二次 (BID) 给药的组合疗法导致 75% 的动物存活。随着 40mg/kg/天万古霉素与 45mg/kg LC-10 的组合, 百分之九十的小鼠存活。在用万古霉素的单一疗法与用 15mg/kg 或 45mg/kg LC-10 的组合疗法之间的存活的差异是统计显著性的。(对应地 $p = 0.026$ 而 $p = 0.015$)。通过等效线图解法分析, 万古霉素和 LC-10 的共同给药产生协同效应(图 27)。

[0488] 实例 14: 具体实施方式的实例

[0489] 在下文提供了某些实施方式的非限制性实例。

[0490] A1. 一种分离抗体或其抗原结合片段免疫特异性地结合至金黄色葡萄球菌 α 毒素多肽并且包括:

[0491] (a) VH CDR1, 该 VH CDR1 包含与 SEQ ID NO: 7、10、13 或 69 一致的氨基酸序列或相对于它们包含 1、2、或 3 个氨基酸残基置换;

[0492] (b) VH CDR2, 该 VH CDR2 包含与 SEQ ID NO: 8、11、14、17、70 或 75 一致的氨基酸序列或相对于它们包含 1、2、或 3 个氨基酸残基置换, 以及

[0493] (c) VH CDR3, 该 VH CDR 包含与 SEQ ID NO: 9、12、15、18、16、65、66、67、71、72、76 或 78 一致的氨基酸序列或相对于它们包含 1、2、或 3 个氨基酸残基置换。

[0494] A2. 如实施例 A1 所述的抗体或抗原结合片段, 其中该 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3 由 SEQ ID NO: 7、8 和 9; SEQ ID NO: 10、11 和 12; SEQ ID NO: 13、14 和 15; SEQ ID NO: 7、17 和 18; SEQ ID NO: 7、8 和 16; SEQ ID NO: 7、8 和 65; SEQ ID NO: 7、8 和 66; SEQ ID NO: 7、8、和 67; SEQ ID NO: 7、8 和 78; SEQ ID NO: 69、70 和 71; SEQ ID NO: 7、8 和 72; SEQ ID NO: 69、75 和 71; SEQ ID NO: 69、75 和 76; 或 SEQ ID NO: 69、70 和 71 表示。

[0495] A3. 一种分离抗体或其抗原结合片段, 其中该分离抗体或其抗原结合片段免疫特异性地结合至金黄色葡萄球菌 α 毒素多肽, 并且包括:

[0496] (a) VH CDR1, 该 VH CDR1 包含 SEQ ID NO: 7、10、13 或 69 的氨基酸序列;

[0497] (b) VH CDR2, 该 VH CDR2 包含 SEQ ID NO: 8、11、14、17、70 或 75 的氨基酸序列;

[0498] (c) VH CDR3, 该 VH CDR3 包含 SEQ ID NO: 9、12、15、18、16、65、66、67、71、72、76 或 78 的氨基酸序列;

[0499] (d) VL CDR1, 该 VL CDR1 包含 SEQ ID NO: 1 或 4 的氨基酸序列;

[0500] (e) VL CDR2, 该 VL CDR2 包含 SEQ ID NO: 2、5、73 或 77 的氨基酸序列; 以及

[0501] (f) VL CDR3, 该 VL CDR3 包含 SEQ ID NO: 3、6、64、68 或 74 的氨基酸序列。

[0502] A4. 如实施例 A3 所述的抗体或抗原结合片段, 其中该 VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3 相应于 SEQ ID NO: 7、8、9、1、2 和 3; SEQ ID NO: 10、11、12、1、2

和3;SEQ ID NO:13、14、15、4、5和6;SEQ ID NO:7、17、18、1、2和3;SEQ ID NO:7、8、16、1、2和64;SEQ ID NO:7、8、65、1、2和64;SEQ ID NO:7、8、66、1、2和64;SEQ ID NO:7、8、67、1、2和68;SEQ ID NO:7、8、67、1、2和64;SEQ ID NO:7、8、78、1、2和64;SEQ ID NO:7、8、65、1、2和68;SEQ ID NO:69、70、71、1、2和68;SEQ ID NO:7、8、72、1、73和74;SEQ ID NO:69、75、71、1、2和68;SEQ ID NO:69、75、76、1、2和68;SEQ ID NO:69、75、76、1、77和74;SEQ ID NO:69、70、71、1、77和74的氨基酸序列。

[0503] A5. 如实施例A1所述的分离抗体或其抗原结合片段,其中该分离抗体或其抗原结合片段(i)包括含有三个CDR的VH链结构域以及含有三个CDR的VL链结构域;并且(ii)免疫特异性地结合至金黄色葡萄球菌 α 毒素多肽,其中该VH链结构域的三个CDR包含:

[0504] (a)VH CDR1,该VH CDR1包含SEQ ID NO:7、10、13或69的氨基酸序列;

[0505] (b)VH CDR2,该VH CDR2包含SEQ ID NO:8、11、14、17、70或75的氨基酸序列;以及

[0506] (c)VH CDR3,该VH CDR3包含SEQ ID NO:9、12、15、18、16、65、66、67、71、72、76或78的氨基酸序列。

[0507] A6. 如实施例A5所述的抗体或抗原结合片段,其中该VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3相应于SEQ ID NO:7、8和9;SEQ ID NO:10、11和12;SEQ ID NO:13、14和15;SEQ ID NO:7、17和18;SEQ ID NO:7、8和16;SEQ ID NO:7、8和65;SEQ ID NO:7、8和66;SEQ ID NO:7、8、和67;SEQ ID NO:7、8和78;SEQ ID NO:69、70和71;SEQ ID NO:7、8和72;SEQ ID NO:69、75和71;SEQ ID NO:69、75和76;或SEQ ID NO:69、70和71的氨基酸序列。

[0508] A7. 如实施例A1所述的分离抗体或其抗原结合片段,其中该分离抗体或其抗原结合片段(i)包括含有三个CDR的VH链结构域以及含有三个CDR的VL链结构域;并且(ii)免疫特异性地结合至金黄色葡萄球菌 α 毒素多肽,其中该VL链结构域的三个CDR包含:

[0509] (a)VL CDR1,该VL CDR1包含SEQ ID NO:1或4的氨基酸序列;

[0510] (b)VL CDR2,该VL CDR2包含SEQ ID NO:2、5、73或77的氨基酸序列;以及

[0511] (c)VL CDR3,该VL CDR3包含SEQ ID NO:3、6、64、68或74的氨基酸序列。

[0512] A8. 如实施例A7所述的抗体或抗原结合片段,其中该VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3相应于SEQ ID NO:1、2和3;SEQ ID NO:4、5和6;SEQ ID NO:1、2和64;SEQ ID NO:1、2和68;SEQ ID NO:1、73和74;或SEQ ID NO:1、77和74的氨基酸序列。

[0513] A9. 一种分离抗体或其抗原结合片段,该分离抗体或其抗原结合片段(i)免疫特异性地结合至金黄色葡萄球菌 α 毒素多肽,(ii)包含重链可变域,该重链可变域具有与SEQ ID NO:20、22、24、26、28、41、43、45、47、49、51、53、55、57、79、59、61、或62的氨基酸序列至少90%的一致性,并且(iii)包含轻链可变域,该轻链可变域具有与SEQ ID NO:19、21、23、25、27、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60或63的氨基酸序列至少90%的一致性。

[0514] A10. 如实施例A9所述的抗体或抗原结合片段,其中该VH和VL相应于SEQ ID NO:20和19;SEQ ID NO:22和21;SEQ ID NO:24和23;SEQ ID NO:26和25;SEQ ID NO:28和27;SEQ ID NO:41和42;SEQ ID NO:43和44;SEQ ID NO:45和46;SEQ ID NO:47和48;SEQ ID NO:47和48;SEQ ID NO:49和50;SEQ ID NO:51和52;SEQ ID NO:51和52;SEQ ID NO:53和54;SEQ ID NO:55和56;SEQ ID NO:57和58;SEQ ID NO:59和60;SEQ ID NO:61和58;SEQ ID NO:62和58;SEQ ID NO:62和63;SEQ ID NO:79和63的氨基酸序列。

[0515] A11. 该分离抗体或其抗原结合片段, 其中该该分离抗体或其抗原结合片段包含具有 SEQ ID NO:20、22、24、26、28、41、43、45、47、49、51、53、55、57、79、59、61、或 62 的重链可变域以及具有 SEQ ID NO:19、21、23、25、27、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60 或 63 的轻链可变域。

[0516] A12. 如实施例 A11 所述的抗体或抗原结合片段, 其中该 VH 和 VL 相应于 SEQ ID NO:20 和 19; SEQ ID NO:22 和 21; SEQ ID NO:24 和 23; SEQ ID NO:26 和 25; SEQ ID NO:28 和 27; SEQ ID NO:41 和 42; SEQ ID NO:43 和 44; SEQ ID NO:45 和 46; SEQ ID NO:47 和 48; SEQ ID NO:47 和 48; SEQ ID NO:49 和 50; SEQ ID NO:51 和 52; SEQ ID NO:51 和 52; SEQ ID NO:53 和 54; SEQ ID NO:55 和 56; SEQ ID NO:57 和 58; SEQ ID NO:59 和 60; SEQ ID NO:61 和 58; SEQ ID NO:62 和 58; SEQ ID NO:62 和 63; SEQ ID NO:79 和 63 的氨基酸序列。

[0517] A13. 如实施例 A1 至 A12 中任一项所述的抗体或抗原结合片段, 其中该分离抗体或其抗原结合片段免疫特异性地结合至金黄色葡萄球菌 α 毒素多肽, 并且具有一种或多种选自下组的特征, 该组由以下各项组成:

[0518] (a) 对于 α 毒素大约 13nM 或更小的亲和常数 (K_D);

[0519] (b) 结合至 α 毒素单体, 但不抑制 α 毒素结合至 α 毒素受体;

[0520] (c) 以至少 50%、60%、70%、80%、90%、或 95% 抑制 α 毒素寡聚体的形成;

[0521] (d) 以至少 50%、60%、70%、80%、90%、或 95% 降低 α 毒素的细胞溶解活性(例如, 如通过细胞溶解和溶血试验所确定); 以及

[0522] (e) 减少细胞浸润和促炎细胞因子释放(例如, 在一种动物肺炎模型中)。

[0523] A14. 如实施例 A1 至 A13 中任一项所述的抗体或抗原结合片段, 其中该分离抗体或其抗原结合片段包括一种另外的药剂。

[0524] A15. 如实施例 A14 所述的抗体或抗原结合片段, 其中该另外的药剂是一种抗生素。

[0525] A16. 如实施例 A14 所述的抗体或抗原结合片段, 其中该分离抗体或其抗原结合片段经由一种接头连接至治疗剂。

[0526] A17. 如实施例 A1 至 A13 中任一项所述的抗体或抗原结合片段, 其中该分离抗体或其抗原结合片段进一步包括一种诊断剂。

[0527] A18. 如实施例 A17 所述的抗体或抗原结合片段, 其中该诊断剂包括一种显像剂。

[0528] A19. 如实施例 A17 所述的抗体或抗原结合片段, 其中该诊断剂包括一种可检测标记物。

[0529] A20. 如实施例 A17 所述的抗体或抗原结合片段, 其中该分离抗体或其抗原结合片段经由一种接头连接至该诊断剂。

[0530] A21. 如实施例 A1 至 A20 中任一项所述的抗体或抗原结合片段, 其中该金黄色葡萄球菌毒素多肽是一种天然的毒素多肽。

[0531] A22. 如实施例 A1 至 A20 中任一项所述的抗体或抗原结合片段, 其中该金黄色葡萄球菌 α 毒素多肽包括 SEQ ID NO:39 或 SEQ ID NO:40 的氨基酸序列。

[0532] A23. 如实施例 A13 所述的抗体或抗原结合片段, 其中该细胞来自血液或肺。

[0533] A24. 如实施例 A23 所述的抗体或抗原结合片段, 其中来自血液的细胞是一种红细胞。

[0534] A25. 如实施例 A13、A23 和 A24 中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中该细胞溶解是通过溶血体外试验或乳酸脱氢酶体外试验确定的。

[0535] A26. 如实施例 A1 至 A25 中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中该分离抗体或其抗原结合片段免疫特异性地结合至金黄色葡萄球菌 α 毒素多肽并且包含 VH CDR3,该 VH CDR3 包含与 SEQ ID NO:9、12、15、18、16、65、66、67、71、72、76 或 78 一致的氨基酸序列或相对于它们包含 1、2、或 3 个氨基酸残基置换,其中该抗体或抗原结合片段中和该金黄色葡萄球菌 α 毒素多肽。

[0536] A27. 如实施例 A1 至 A26 中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中该分离抗体或其抗原结合片段免疫特异性地结合至金黄色葡萄球菌 α 毒素多肽并且包含 VL CDR3,该 VL CDR3 包含与 SEQ ID NO:3、6、64、68 或 74 一致的氨基酸序列或相对于它们包含 1、2、或 3 个氨基酸残基置换,其中该抗体或抗原结合片段中和该金黄色葡萄球菌 α 毒素多肽。

[0537] A28. 如实施例 A1 至 A27 中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中该分离抗体或其抗原结合片段免疫特异性地结合至金黄色葡萄球菌 α 毒素多肽并且包含 VH CDR3,该 VH CDR3 包含与 SEQ ID NO:9、12、15、18、16、65、66、67、71、72、76 或 78 一致的氨基酸序列或相对于它们包含 1、2、或 3 个氨基酸残基置换,其中该抗体或抗原结合片段抑制该金黄色葡萄球菌 α 毒素多肽的寡聚化。

[0538] A29. 如实施例 A1 至 A28 中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中该分离抗体或其抗原结合片段免疫特异性地结合至金黄色葡萄球菌 α 毒素多肽并且包括 VL CDR3,该 VL CDR3 包含与 SEQ ID NO:3、6、64、68 或 74 一致的氨基酸序列或相对于它们包含 1、2、或 3 个氨基酸残基置换,其中该抗体或抗原结合片段抑制该金黄色葡萄球菌 α 毒素多肽的寡聚化。

[0539] A30. 如实施例 A13、A28 和 A29 中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中该寡聚化的抑制是通过体外结合和 / 或电泳迁移率测定确定的。

[0540] D1. 一种组合物,包含如实施例 A1 至 A30 中任一项所述的抗体或抗原结合片段。

[0541] B1. 一种试剂盒,包含

[0542] (a) 如实施例 A1 至 A30 中任一项所述的抗体或抗原结合片段或如实施例 D1 所述的组合物;

[0543] (b) 用于使用该组合物的说明书或者用于获得使用该组合物的说明书的指导。

[0544] B2. 如实施例 B1 所述的试剂盒,其中在该组合物中的抗体连接至一种固体支撑物。

[0545] B3. 如实施例 B2 所述的试剂盒,其中该固体支撑物是一种珠粒。

[0546] B4. 如实施例 B3 所述的试剂盒,其中该珠粒是一种琼脂糖凝胶珠。

[0547] B5. 如实施例 B1 至 B4 中任一项所述的试剂盒,其中供使用的这些说明书包括金黄色葡萄球菌 α 毒素多肽的分离、纯化、检测、和定量中的一项或多项。

[0548] B6. 如实施例 B1 至 B5 中任一项所述的试剂盒,包括缓冲液、固体支撑物或者缓冲剂与固体支撑物。

[0549] B7. 如实施例 B6 所述的试剂盒,其中该固体支撑物是珠粒、过滤器、膜和多孔板 (multiwell plate) 中的一种或多种。

[0550] B8. 如实施例 B6 所述的试剂盒,包含一种适用于 Western 印迹的缓冲液和膜。

- [0551] B9. 如实施例 B6 所述的试剂盒, 包含上样缓冲液和洗脱缓冲液。
- [0552] B10. 如实施例 B6 所述的试剂盒, 包含适用于酶联免疫吸附测定 (ELISA) 的缓冲液。
- [0553] C1. 一种用于预防、治疗或管理在受试者中的肺炎的方法, 该方法包括:
- [0554] 将一种如实施例 A1 至 A30 中任一项所述的抗体或抗原结合片段或如实施例 D1 所述的组合物以用于预防、治疗或管理肺炎有效的量给予至对其有需要的受试者。
- [0555] C2. 如实施例 C1 所述的方法, 是一种用于预防肺炎的方法。
- [0556] C3. 如实施例 C1 或 C2 所述的方法, 其中该抗体或其抗原结合片段免疫特异性地结合至在 SEQ ID NO:39 之内的构象表位。
- [0557] C4. 一种用于预防、治疗或管理在受试者中的皮肤感染病症的方法, 该方法包括: 将免疫特异性地结合至金黄色葡萄球菌 α 毒素多肽的一种抗体或其抗原结合片段以用于预防、治疗或管理该皮肤感染病症有效的量给予至对其有需要的受试者。
- [0558] C5. 如实施例 C4 所述的方法, 其中该皮肤感染病症是皮肤坏死。
- [0559] C6. 如实施例 C4 或 C5 所述的方法, 其中该皮肤感染病症包括皮肤的金黄色葡萄球菌感染。
- [0560] C7. 如实施例 C4 至 C6 中任一项所述的方法, 是一种用于预防皮肤感染病症的方法。
- [0561] C8. 一种用于预防、治疗或管理一种与金黄色葡萄球菌感染相关的病症的方法, 该方法包括将免疫特异性地结合至金黄色葡萄球菌 α 毒素多肽的一种抗体或其抗原结合片段以减少该毒素多肽的寡聚化有效的量给予至对其有需要的受试者。
- [0562] C9. 如实施例 C8 所述的方法, 是一种用于预防与金黄色葡萄球菌感染相关的病症的方法。
- [0563] C10. 一种用于预防、治疗或管理与金黄色葡萄球菌感染相关的病症的方法, 该方法包括将免疫特异性地结合至金黄色葡萄球菌 α 毒素多肽的一种抗体或其抗原结合片段以减少红细胞溶解有效的量给予至对其有需要的受试者。
- [0564] C11. 如实施例 C10 所述的方法, 是一种用于预防与金黄色葡萄球菌感染相关的病症的方法。
- [0565] C12. 如实施例 C10 或 C11 所述的方法, 其中该红细胞是一种来自血液或肺的细胞。
- [0566] C13. 如实施例 C4 至 C12 中任一项所述的方法, 其中该抗体或其抗原结合片段具有一种或多种选自下组的特征, 该组由以下各项组成:
- [0567] (a) 对于 α 毒素大约 13nM 或更小的亲和常数 (K_D);
- [0568] (b) 结合至 α 毒素单体, 但不抑制 α 毒素结合至 α 毒素受体;
- [0569] (c) 以至少 50%、60%、70%、80%、90%、或 95% 抑制 α 毒素寡聚体的形成;
- [0570] (d) 以至少 50%、60%、70%、80%、90%、或 95% 降低 α 毒素的细胞溶解活性 (例如, 通过细胞溶解和溶血试验所确定); 以及
- [0571] (e) 减少细胞浸润和促炎细胞因子释放 (例如, 在一种动物肺炎模型中)。
- [0572] C14. 如实施例 C13 所述的方法, 其中该抗体或其抗原结合片段免疫特异性地结合至在 SEQ ID NO:39 之内的构象表位。
- [0573] C15. 如实施例 C1 至 C14 中任一项所述的方法, 其中给予至受试者的抗体或抗原结

合片段或组合物是根据如实施例 A1 至 A30 中任一项或 D1 的。

[0574] C16. 一种方法,包括:

[0575] 将如实施例 A1 至 A30 中任一项所述的抗体或抗原结合片段或如实施例 D1 所述的组合物给予至细胞;并且

[0576] 检测与给予该组合物至这些细胞相关的生物效应的存在、不存在或量。

[0577] C17. 一种方法,包括:

[0578] 将如实施例 A1 至 A30 中任一项所述的抗体或抗原结合片段或如实施例 D1 所述的组合物给予至受试者;并且

[0579] 检测在受试者中与该组合物的给予相关的生物效应的存在、不存在或量。

[0580] C18. 一种方法,包括:

[0581] 将如实施例 A1 至 A30 中任一项所述的抗体或抗原结合片段或如实施例 D1 所述的组合物给予至受试者;并且

[0582] 监测受试者的病症。

[0583] C19. 一种用于中和金黄色葡萄球菌 α 毒素多肽的方法,该方法通过将有效量的如实施例 A1 至 A30 中任一项所述的抗体或抗原结合片段或如实施例 D1 所述的组合物给予至对其有需要的受试者来中和该毒素多肽。

[0584] C20. 一种预防、治疗、或管理对其有需要的受试者中的由金黄色葡萄球菌 α 毒素介导的病症的方法,该方法包括将有效量的如实施例 A1 至 A30 中任一项所述的抗体或抗原结合片段或如实施例 D1 所述的组合物给予至受试者从而预防、治疗或管理该病症。

[0585] C21. 一种治疗、预防、或减轻对其有需要的受试者中的由金黄色葡萄球菌 α 毒素介导的失调的症状的方法,该方法包括将有效量的如实施例 A1 至 A30 中任一项所述的抗体或抗原结合片段或如实施例 D1 所述的组合物给予至受试者从而治疗、预防或减轻这些症状。

[0586] C22. 一种用于诊断在受试者中的由金黄色葡萄球菌 α 毒素介导的病症的方法,该方法包括选择对诊断有需要的受试者,并且将诊断有效剂量的如实施例 A1 至 A30 中任一项所述的抗体或抗原结合片段或如实施例 D1 所述的组合物给予至受试者。

[0587] C23. 如实施例 C1 至 C22 中任一项所述的方法,其中该受试者是一种家畜。

[0588] C24. 如实施例 C1 至 C22 中任一项所述的方法,其中该受试者是人。

[0589] C25. 一种用如实施例 A1 至 A30 中任一项所述的抗体或抗原结合片段或如实施例 D1 所述的组合物以至少 50%、60%、70%、80%、90% 或 95% 抑制金黄色葡萄球菌 α 毒素寡聚体形成的方法。

[0590] C26. 如 C25 所述的方法,其中金黄色葡萄球菌 α 毒素寡聚体的形成的抑制抑制了活性成孔复合体的形成。

[0591] C27. 一种用如实施例 A1 至 A30 中任一项所述的抗体或抗原结合片段或如实施例 D1 所述的组合物以至少 50%、60%、70%、80%、90%、或 95% 降低金黄色葡萄球菌 α 毒素的细胞溶解活性的方法,其中该细胞溶解活性是通过细胞溶解和 / 或溶血试验确定的。

[0592] * * *

[0593] 在此参考的每个专利、专利申请、出版物以及文件的全文特此通过引用结合。以上专利、专利申请、出版物以及文件的引用不是承认前述的任一项是相关的现有技术,它也不

构成关于这些出版物或文件的内容或日期的任何承认。

[0594] 可以在不偏离在此的基本方面的情况下而对前述内容作出修改。虽然本技术已经参考一个或多个特定实施例描述了大量的细节,本领域的普通技术人员将认识到可以对本申请中具体披露的实施例作出改变,然而这些修改和改进是在本技术的精神和范围之内。

[0595] 在此适当说明性地描述的该技术可以在缺乏未在此未明确披露的任何要素下实践。因此,例如,在在此的每种情况下,术语“包括”(“comprising”)、“主要由…组成”(“consisting essentially of”)、以及“由…组成”(“consisting of”)中的任何一个可以用另外两个术语替换。已经使用的术语和表述被用作描述的术语并且没有限制性,并且此类术语和表述的使用不排除所显示和描述的特征或其部分的任何等效物,并且在所要求的技术的范围之内不同的修改是可能的。术语“一种/一个”(“a”或“an”)可以是指它修饰的一个或多个要素(例如,“一种试剂”可以表示一种或多种试剂),除非根据上下文清楚是要素之一还是一个以上的要素被描述。应当理解的是,虽然已经通过代表性实施例和任选特征明确披露了本技术,在此披露的概念的修改和变更可以被本领域普通技术人员采取,并且这样的修改和变更被认为是在本技术的范围之内。

[0596] 在此的某些实施例陈述于下列权利要求中。

[0001]

序列表

<110> 米迪缪尼有限公司 (MEDIMMUNE, LLC)

<120> 特异性结合金黄色葡萄球菌 α 毒素的抗体以及使用方法

<130> ATOX-100W01

<140>

<141>

<150> 61/440, 581

<151> 2011-02-08

<160> 92

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 1

Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Ser	Trp	Leu	Ala
1				5					10	

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 2

Lys	Ala	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser
1				5		

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 3

Gln	Gln	Tyr	Asn	Ser	Tyr	Trp	Thr
1				5			

[0002]

<210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 4
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp Leu Gly
1 5 10

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 5
Asp Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 6
Leu Gln Asp Tyr Asn Tyr Pro Trp Thr
1 5

<210> 7
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 7
Ser Tyr Asp Met His
1 5

<210> 8
<211> 16

[0003]

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 8

Gly	Ile	Gly	Thr	Ala	Gly	Asp	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Gly	Ser	Val	Lys	Gly
1				5					10					15	

<210> 9

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 9

Asp	Asn	Tyr	Ser	Ser	Thr	Gly	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp	Val
1				5					10				

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 10

Arg	Tyr	Asp	Met	His
1			5	

<210> 11

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 11

Val	Ile	Gly	Thr	Asp	Gly	Asp	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Gly	Ser	Val	Lys	Gly
1				5					10					15	

<210> 12

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0004]

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 12

Asp Arg Tyr Ser Ser Ser Asn His Tyr Asn Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 13

Ser Tyr Ala Met Thr
1 5

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 14

Val Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 15

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 15

Asp Gly Arg Gln Val Glu Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 16

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0005]

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 16

Asp Arg Tyr Ser Pro Thr Gly His Tyr Met Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 17

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 17

Val Ile Asp Thr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

<210> 18

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 18

Asp Arg Tyr Ser Gly Asn Phe His Tyr Asn Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 19

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成多肽

<400> 19

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

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

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

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

[0006]

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 Gln Tyr Asn Ser Tyr Trp Thr
85 90 95

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

<210> 20

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 20

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 Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Arg Asp Asn Tyr Ser Ser Thr Gly Gly Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 21

[0007]

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 21

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

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

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

Tyr Lys Ala Ser Ser 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 Gln Tyr Asn Ser Tyr Trp Thr
85 90 95

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

<210> 22

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 22

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 Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

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

[0008]

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

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

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

Arg Asp Arg Tyr Ser Ser Ser Asn His Tyr Asn Gly Met Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 23

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 23

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

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

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

Tyr Lys Ala Ser Ser 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 Gln Tyr Asn Ser Tyr Trp Thr
85 90 95

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

[0009]

<210> 24
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列描述：合成多肽

<400> 24
 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 Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30

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

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

Gly Arg Phe Ile Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

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

Arg Asp Arg Tyr Ser Ser Ser Asn His Tyr Asn Gly Met Asp Val Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 25
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列描述：合成多肽

<400> 25
 Ala Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

[0010]

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asp Tyr Asn Tyr Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Gln Ile Lys
100 105

<210> 26

<211> 125

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 26

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ser Val Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

[0011]

Ala Lys Asp Gly Arg Gln Val Glu Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 27

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 27

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

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

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

Tyr Lys Ala Ser Ser 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 Gln Tyr Asn Ser Tyr Trp Thr
85 90 95

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

<210> 28

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 28

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

[0012]

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

<210> 29

<211> 318

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成多核苷酸

<400> 29

```

gacatccaga tgacccagtc tccttcacc cgtctgcat cgtaggaga cagagtcacc      60
atcaacttgc gccccagtc gagtattagt agctggttgg cctggtatca gcagaacca      120
gggaaagccc ctaaactcct gatctataag gcgtctagtt tagaaagtgg ggteccatca      180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttactctca ccacagcag cctgcagcct      240
gatgatcttg caactatata ctgccaacag tataatagtt attggacgtt eggccaaggg      300
accaaggtgg aaatcaaa      318

```

<210> 30

<211> 366

<212> DNA

[0013]

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成多核苷酸

<400> 30

```
gaggtagcagc tggtaggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc      60
tctgtgcag cctctggatt caccctcagt agctacgaca tgcactgggt ccgccaaagt      120
acaggaaaag gtctggagtg ggtctcaggt attggcactg ctggtgacac atattatcca      180
ggctccgtga agggccgatt caccatctcc agagaaaatg ccaagaactc ctgttatctt      240
caattgaaca gcctgagagc cggggacacg gctgtgtact tctgtgcaag agacaattat      300
agcagcacccg gggggtacta cggtatggac gtctggggcc aagggaaccac ggtcacccgc      360
tcccca
```

<210> 31

<211> 318

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成多核苷酸

<400> 31

```
gacatccaga tgaccacagtc tcttccacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60
atcacttgcc gggccagtcg gagtattagt agcigtgttg cciggtatca gcagaaacca      120
gggaaagccc ctaaaactct gatclataag ggtctagtt tagaaagtgg ggtcccatca      180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct      240
gatgattttg caacttatta ctgccaacag tataatagtt attggaagtt cggccaaggg      300
accaaggtgg aaatcaaa
```

<210> 32

<211> 366

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成多核苷酸

<400> 32

```
gaggtagcagc tggtaggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc      60
tctgtgcag cctctggatt caccctcagt aggtacgaca tgcactgggt ccgccaaagt      120
```

[0014]

acaggaaaag gtcctggagtg ggcttcagtt attggtactg atggigacac atactatcca	180
ggctccgtga agggccgatt caicactccc agagaaaatg ccaagaacac ctigtatctt	240
gaatgaaca gcctgagagc cggggacacg gctgtgtatt actgtgcaag agatcggat	300
agcagctega accactacaa cggtatggac gtctggggcc aagggaaccac ggtcacctgc	360
tctcca	366
<210> 33	
<211> 318	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列描述: 合成多核苷酸	
<400> 33	
gacatccaga tgaccacagc tcttccacc ctgtctgcatt ctgtaggaga cagagtcacc	60
atcaattgcc gggccagtc gagtattagt agctgggtgg cctggatca gcagaaacca	120
gggaagccc ctaaggtcct gatctataag gcgtctagtt tagaaagtgg ggteccatca	180
aggctcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcaactcca ccacagcag cctgcagcct	240
gaigattttg caacttattt ctgccaacag tataatagtt attggacgtt cggecaaggg	300
accaaggtgg aaatcaaa	318
<210> 34	
<211> 366	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列描述: 合成多核苷酸	
<400> 34	
gaggtgcagc tggctggagc tgggggagc ttgttacagc ctggggggc cctgagactc	60
tctgtgcag cctctggatt caccttcagt aggtacgaca tgcactgggt cggecaagct	120
acaggaaaag gtcctggagtg ggcttcagtt attggtactg atggigacac atactatcca	180
ggctccgtga agggccgatt caicactccc agagaaaatg ccaagaacac ctigtatctt	240
gaatgaaca gcctgagagc cggggacacg gctgtgtatt actgtgcaag agatcggat	300
agcagctega accactacaa cggtatggac gtctggggcc aagggaaccac ggtcacctgc	360
tctcca	366

[0015]

<210> 35
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列描述：合成多核苷酸

<400> 35
 gccatccaga tgacccagtc tccatctccc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtc gggcattaga aatgatttag gctggtaica gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgat gcatccagtt tacaaagtgg ggcccacatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tggcacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtctacaa gattacaatt acccgtggac gtccggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 36
 <211> 375
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列描述：合成多核苷酸

<400> 36
 gaggtgcage tgttggagtc tgggggagge ttggtacagc ciggggggtc cctgagactc 60
 tccigtgcag cctctggatt cacctttage agctatgcca tgacctgggt ccgccaggt 120
 ccagggaagg ggciggaatg ggctcagtt attagiggta gttgtggtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaaggccg gttcacctgc tccagagaca attccaagaa cacgtgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac aeggcctat attactgtgc gaaagatggg 300
 aggcaggtcg aggattacta ctactactac ggtatggacg tctggggcca agggaccacg 360
 gtcaccgtct cctca 375

<210> 37
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列描述：合成多核苷酸

<400> 37

[0016]

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

101

50	55	60
Tyr Arg Val Tyr Ser Glu Glu Gly Ala Asn Lys Ser Gly Leu Ala Trp		
65	70	75 80
Pro Ser Ala Phe Lys Val Gln Leu Gln Leu Pro Asp Asn Glu Val Ala		
	85	90 95
Gln Ile Ser Asp Tyr Tyr Pro Arg Asn Ser Ile Asp Thr Lys Glu Tyr		
100	105	110
Met Ser Thr Leu Thr Tyr Gly Phe Asn Gly Asn Val Thr Gly Asp Asp		
115	120	125
Thr Gly Lys Ile Gly Gly Leu Ile Gly Ala Asn Val Ser Ile Gly His		
130	135	140
Thr Leu Lys Tyr Val Gln Pro Asp Phe Lys Thr Ile Leu Glu Ser Pro		
145	150	155 160
Thr Asp Lys Lys Val Gly Trp Lys Val Ile Phe Asn Asn Met Val Asn		
	165	170 175
Gln Asn Trp Gly Pro Tyr Asp Arg Asp Ser Trp Asn Pro Val Tyr Gly		
180	185	190
Asn Gln Leu Phe Met Lys Thr Arg Asn Gly Ser Met Lys Ala Ala Asp		
195	200	205
Asn Phe Leu Asp Pro Asn Lys Ala Ser Ser Leu Leu Ser Ser Gly Phe		
210	215	220
Ser Pro Asp Phe Ala Thr Val Ile Thr Met Asp Arg Lys Ala Ser Lys		
225	230	235 240
Gln Gln Thr Asn Ile Asp Val Ile Tyr Glu Arg Val Arg Asp Asp Tyr		
245	250	255
Gln Leu His Trp Thr Ser Thr Asn Trp Lys Gly Thr Asn Thr Lys Asp		
260	265	270
Lys Trp Thr Asp Arg Ser Ser Glu Arg Tyr Lys Ile Asp Trp Glu Lys		

[0018]

275	280	285
Glu Glu Met Thr Asn		
290		
<210> 40		
<211> 293		
<212> PRT		
<213> 金黄色葡萄球菌		
<400> 40		
Ala Asp Ser Asp Ile Asn Ile Lys Thr Gly Thr Thr Asp Ile Gly Ser		
1 5 10 15		
Asn Thr Thr Val Lys Thr Gly Asp Leu Val Thr Tyr Asp Lys Glu Asn		
20 25 30		
Gly Met Leu Lys Lys Val Phe Tyr Ser Phe Ile Asp Asp Lys Asn His		
35 40 45		
Asn Lys Lys Leu Leu Val Ile Arg Thr Lys Gly Thr Ile Ala Gly Gln		
50 55 60		
Tyr Arg Val Tyr Ser Glu Glu Gly Ala Asn Lys Ser Gly Leu Ala Trp		
65 70 75 80		
Pro Ser Ala Phe Lys Val Gln Leu Gln Leu Pro Asp Asn Glu Val Ala		
85 90 95		
Gln Ile Ser Asp Tyr Tyr Pro Arg Asn Ser Ile Asp Thr Lys Glu Tyr		
100 105 110		
Met Ser Thr Leu Thr Tyr Gly Phe Asn Gly Asn Val Thr Gly Asp Asp		
115 120 125		
Thr Gly Lys Ile Gly Gly Leu Ile Gly Ala Asn Val Ser Ile Gly His		
130 135 140		
Thr Leu Lys Tyr Val Gln Pro Asp Phe Lys Thr Ile Leu Glu Ser Pro		
145 150 155 160		
Thr Asp Lys Lys Val Gly Trp Lys Val Ile Phe Asn Asn Met Val Asn		
165 170 175		

[0019]

Gln Asn Trp Gly Pro Tyr Asp Arg Asp Ser Trp Asn Pro Val Tyr Gly
180 185 190

Asn Gln Leu Phe Met Lys Thr Arg Asn Gly Ser Met Lys Ala Ala Asp
195 200 205

Asn Phe Leu Asp Pro Asn Lys Ala Ser Ser Leu Leu Ser Ser Gly Phe
210 215 220

Ser Pro Asp Phe Ala Thr Val Ile Thr Met Asp Arg Lys Ala Ser Lys
225 230 235 240

Gln Gln Thr Asn Ile Asp Val Ile Tyr Glu Arg Val Arg Asp Asp Tyr
245 250 255

Gln Leu His Trp Thr Ser Thr Asn Trp Lys Gly Thr Asn Thr Lys Asp
260 265 270

Lys Trp Thr Asp Arg Ser Ser Glu Arg Tyr Lys Ile Asp Trp Glu Lys
275 280 285

Glu Glu Met Thr Asn
290

<210> 41
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 41
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 Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

[0020]

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

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

Arg Asp Arg Tyr Ser Pro Thr Gly His Tyr Met Gly Met Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 42

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 42

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

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

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

Tyr Lys Ala Ser Ser 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 Gln Tyr Asp Thr Tyr Trp Thr
85 90 95

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

<210> 43

[0021]

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 43

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	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		

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

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

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

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

Arg	Asp	Arg	Tyr	Ser	Arg	Thr	Gly	His	Tyr	Met	Gly	Met	Asp	Val	Trp
			100					105						110	

Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser
		115					120		

<210> 44

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 44

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

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

[0022]

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

Tyr Lys Ala Ser Ser 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 Gln Tyr Asp Thr Tyr Trp Thr
85 90 95

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

<210> 45

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 45

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 Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Arg Asp Arg Tyr Ser Arg Thr Gly His Tyr Met Gly Met Ser Leu Trp
100 105 110

[0023]

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 46
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成多肽

<400> 46
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

Tyr Lys Ala Ser Ser 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 Gln Tyr Asp Thr Tyr Trp Thr
85 90 95

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

<210> 47
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成多肽

<400> 47
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

[0024]

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Arg Asp Asn Tyr Ser Arg Thr Gly His Tyr Met Gly Met Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 48

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 48

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

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

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

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

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

[0025]

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Lys Gln Tyr Ala Asp Tyr Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Gln Ile Lys
100 105

<210> 49

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 49

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 Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Arg Asp Asn Tyr Ser Arg Thr Gly His Tyr Met Gly Met Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 50

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0026]

<223> 人工序列描述：合成多肽

<400> 50

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

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

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

Tyr Lys Ala Ser Ser 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 Gln Tyr Asp Thr Tyr Trp Thr
85 90 95

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

<210> 51

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成多肽

<400> 51

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 Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

[0027]

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

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

Arg Asp Arg Tyr Ser Pro Thr Gly His Tyr Met Gly Met Ser Leu Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 52

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 52

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

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

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

Tyr Lys Ala Ser Ser 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 Gln Tyr Asp Thr Tyr Trp Thr
85 90 95

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

<210> 53

<211> 122

<212> PRT

[0028]

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成多肽

<400> 53

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Arg Asp Arg Tyr Ser Arg Thr Gly His Tyr Met Gly Met Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 54

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成多肽

<400> 54

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

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

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

[0029]

35	40	45
Tyr Lys Ala Ser Ser 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 Lys Gln Tyr Ala Asp Tyr Trp Thr		
85	90	95
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
100	105	
<210> 55		
<211> 122		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工序列描述: 合成多肽		
<400> 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 Phe Ser Ser Tyr		
20 25 30		
Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
35 40 45		
Ser Gly Ile Gly Thr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys		
50 55 60		
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu		
65 70 75 80		
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala		
85 90 95		
Arg Asp Asn Tyr Ser Ser Thr Gly Gly Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp		
100 105 110		

[0030]

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 56

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 56

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

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

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

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

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

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Gln Ile Lys
100 105

<210> 57

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 57

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 Phe Ser Ser His
20 25 30

[0031]

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

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

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

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

Arg Asp Arg Tyr Ser Pro Thr Gly His Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 58

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成多肽

<400> 58

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

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

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

Tyr Lys Ala Ser Ser 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 Lys Gln Tyr Ala Asp Tyr Trp Thr

[0032]

<400> 60

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

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

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

Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Lys 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 Gln Tyr Glu Ser Tyr Trp Thr
85 90 95

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

<210> 61

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 61

Gln 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 Phe Ser Ser His
20 25 30

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

Ser Gly Ile Gly Thr Arg Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
50 55 60

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

[0034]

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

Arg Asp Arg Tyr Ser Pro Thr Gly His Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 62

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 62

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 Phe Ser Ser His
20 25 30

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

Ser Gly Ile Gly Thr Arg Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
50 55 60

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

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

Arg Asp Lys Tyr Ser Pro Thr Gly His Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 63

[0035]

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 63

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

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

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

Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Val Lys 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 Gln Tyr Glu Ser Tyr Trp Thr
85 90 95

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

<210> 84

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 64

Gln Gln Tyr Asp Thr Tyr Trp Thr
1 5

<210> 85

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

[0036]

<400> 65

Asp Arg Tyr Ser Arg Thr Gly His Tyr Met Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 66

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 66

Asp Arg Tyr Ser Arg Thr Gly His Tyr Met Gly Met Ser Leu
1 5 10

<210> 67

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 67

Asp Asn Tyr Ser Arg Thr Gly His Tyr Met Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 68

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 68

Lys Gln Tyr Ala Asp Tyr Trp Thr
1 5

<210> 69

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 69

Ser His Asp Met His
1 5

[0037]

<210> 70

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 70

Gly Ile Gly Thr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly

1

5

10

15

<210> 71

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 71

Asp Arg Tyr Ser Pro Thr Gly His Tyr Tyr Gly Met Asp Val

1

5

10

<210> 72

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 72

Asp Asn Tyr Ser Pro Thr Gly Gly Tyr Tyr Gly Met Asp Val

1

5

10

<210> 73

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 73

Lys Ala Ser Ser Leu Lys Ser

1

5

<210> 74

<211> 8

[0038]

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 74

Gln Gln Tyr Glu Ser Tyr Trp Thr

1 5

<210> 75

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 75

Gly Ile Gly Thr Arg Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly

1 5 10 15

<210> 76

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 76

Asp Lys Tyr Ser Pro Thr Gly His Tyr Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10

<210> 77

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 77

Lys Ala Ser Ser Leu Val Lys

1 5

<210> 78

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0039]

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 78

Asp Arg Tyr Ser Pro Thr Gly His Tyr Met Gly Met Ser Leu
1 5 10

<210> 79

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成多肽

<400> 79

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 Phe Ser Ser His
20 25 30

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

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

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

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

Arg Asp Arg Tyr Ser Pro Thr Gly His Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 80

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成引物

[0040]

<400> 80 atataatgagc tcgcagattc tgatattaat attaaaacc	39
<210> 81 <211> 36 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列描述: 合成引物	
<400> 81 atatataagc ttaatttgtc atttcttctt ttcccc	36
<210> 82 <211> 6 <212> PRT <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列描述: 合成的 6xHis 标签	
<400> 82 His His His His His His 1 5	
<210> 83 <211> 45 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列描述: 合成引物	
<400> 83 gataaagaaa atggcatgct caaaaaagta ttttatagtt ttatc	45
<210> 84 <211> 45 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列描述: 合成引物	
<400> 84 gataaaaacta taaaatactt ttttgagcat gccattttct ttatc	45
<210> 85 <211> 37 <212> DNA	

[0041]

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成引物

<400> 85

atattggatc cgcagattct gatattaata ttaaaac

37

<210> 86

<211> 44

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成引物

<400> 86

atacttctcg agttatttat tatgatitit atcatcgata aaac

44

<210> 87

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成引物

<400> 87

catagggatc caaacigeta gttattagaa cgaag

36

<210> 88

<211> 41

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成引物

<400> 88

catagctcga gtcaatttgc cattcttctt ttcccaat c

41

<210> 89

<211> 293

<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌

<400> 89

Ala Asp Ser Asp Ile Asn Ile Lys Thr Gly Thr Thr Asp Ile Gly Ser
1 5 10 15

Asn Thr Thr Val Lys Thr Gly Asp Leu Val Thr Tyr Asp Lys Glu Asn

[0042]

20	25	30
Gly Met His Lys Lys Val Phe Tyr Ser Phe Ile Asp Asp Lys Asn His		
35	40	45
Asn Lys Lys Leu Leu Val Ile Arg Thr Lys Gly Thr Ile Ala Gly Gln		
50	55	60
Tyr Arg Val Tyr Ser Gln Glu Gly Ala Asn Lys Ser Gly Leu Ala Trp		
65	70	75 80
Pro Ser Ala Phe Lys Val Gln Leu Gln Leu Pro Asp Asn Glu Val Ala		
85	90	95
Gln Ile Ser Asp Tyr Tyr Pro Arg Asn Ser Ile Asp Thr Lys Glu Tyr		
100	105	110
Met Ser Thr Leu Thr Tyr Gly Phe Asn Gly Asn Val Thr Gly Asp Asp		
115	120	125
Thr Gly Lys Ile Gly Gly Leu Ile Gly Ala Asn Val Ser Ile Gly His		
130	135	140
Thr Leu Lys Tyr Val Gln Pro Asp Phe Lys Thr Ile Leu Glu Ser Pro		
145	150	155 160
Thr Asp Lys Lys Val Gly Trp Lys Val Ile Phe Asn Asn Met Val Asn		
165	170	175
Gln Asn Trp Gly Pro Tyr Asp Arg Asp Ser Trp Asn Pro Val Tyr Gly		
180	185	190
Asn Gln Leu Phe Met Lys Thr Arg Asn Gly Ser Met Lys Ala Ala Asp		
195	200	205
Asn Phe Leu Asp Pro Asn Lys Ala Ser Ser Leu Leu Ser Ser Gly Phe		
210	215	220
Ser Pro Asp Phe Ala Thr Val Ile Thr Met Asp Arg Lys Ala Ser Lys		
225	230	235 240
Gln Gln Thr Asn Ile Asp Val Ile Tyr Glu Arg Val Arg Asp Asp Tyr		

[0043]

	245	250	255
Gln Leu His Trp Thr Ser Thr Asn Trp Lys Gly Thr Asn Thr Lys Asp			
260	265	270	
Lys Trp Ile Asp Arg Ser Ser Glu Arg Tyr Lys Ile Asp Trp Glu Lys			
275	280	285	
Glu Glu Met Thr Asn			
290			
<210> 90			
<211> 299			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 人工序列描述: 合成多肽			
<400> 90			
Ala Gln His Ile Thr Pro Val Ser Glu Lys Lys Val Asp Asp Lys Ile			
1 5 10 15			
Thr Leu Tyr Lys Thr Thr Ala Thr Ser Asp Ser Asp Lys Leu Lys Ile			
20 25 30			
Ser Gln Ile Leu Thr Phe Asn Phe Ile Lys Asp Lys Ser Tyr Asp Lys			
35 40 45			
Asp Thr Leu Ile Leu Lys Ala Ala Gly Asn Ile Tyr Ser Gly Tyr Thr			
50 55 60			
Lys Pro Asn Pro Lys Asp Thr Ile Ser Ser Gln Phe Tyr Trp Gly Ser			
65 70 75 80			
Lys Tyr Asn Ile Ser Ile Asn Ser Asp Ser Asn Asp Ser Val Asn Val			
85 90 95			
Val Asp Tyr Ala Pro Lys Asn Gln Asn Glu Glu Phe Gln Val Gln Gln			
100 105 110			
Thr Val Gly Tyr Ser Tyr Gly Gly Asp Ile Asn Ile Ser Asn Gly Leu			
115 120 125			

[0044]

Ser Gly Gly Gly Asn Gly Ser Lys Ser Phe Ser Glu Thr Ile Asn Tyr
130 135 140

Lys Gln Glu Ser Tyr Arg Thr Ser Leu Asp Lys Arg Thr Asn Phe Lys
145 150 155 160

Lys Ile Gly Trp Asp Val Glu Ala His Lys Ile Met Asn Asn Gly Trp
165 170 175

Gly Pro Tyr Gly Arg Asp Ser Tyr His Ser Thr Tyr Gly Asn Glu Met
180 185 190

Phe Leu Gly Ser Arg Gln Ser Asn Leu Asn Ala Gly Gln Asn Phe Leu
195 200 205

Glu Tyr His Lys Met Pro Val Leu Ser Arg Gly Asn Phe Asn Pro Glu
210 215 220

Phe Ile Gly Val Leu Ser Arg Lys Gln Asn Ala Ala Lys Lys Ser Lys
225 230 235 240

Ile Thr Val Thr Tyr Gln Arg Glu Met Asp Arg Tyr Thr Asn Phe Trp
245 250 255

Asn Gln Leu His Trp Ile Gly Asn Asn Tyr Lys Asp Glu Asn Arg Ala
260 265 270

Thr His Thr Ser Ile Tyr Glu Val Asp Trp Glu Asn His Thr Val Lys
275 280 285

Leu Ile Asp Thr Gln Ser Lys Glu Lys Asn Pro
290 295

<210> 91

<211> 452

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 91

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

[0045]

Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	His
			20					25					30		
Asp	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Thr	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40						45		
Ser	Gly	Ile	Gly	Thr	Ala	Gly	Asp	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val	Lys
	50					55					60				
Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Glu	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr	Leu
65					70					75					80
Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Gly	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala
				85					90					95	
Arg	Asp	Arg	Tyr	Ser	Pro	Thr	Gly	His	Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp	Val	Trp
				100				105					110		
Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro
				115				120					125		
Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr
				130				135					140		
Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr
145					150					155					160
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro
				165					170					175	
Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr
				180				185					190		
Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn
				195				200					205		
His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser
				210			215					220			
Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu
225					230					235					240

[0046]

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu			
245	250	255	
Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser			
260	265	270	
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu			
275	280	285	
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr			
290	295	300	
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn			
305	310	315	320
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro			
325	330	335	
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln			
340	345	350	
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val			
355	360	365	
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val			
370	375	380	
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro			
385	390	395	400
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr			
405	410	415	
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val			
420	425	430	
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu			
435	440	445	
Ser Pro Gly Lys			
450			

[0047]

<210> 92

<211> 212

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 92

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

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

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

Tyr Lys Ala Ser Ser 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 Lys Gln Tyr Ala Asp Tyr Trp Thr
85 90 95

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

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Gln 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
145 150 155 160

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

[0048]

Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe
		195					200						205		

Asn	Arg	Gly	Glu
			210

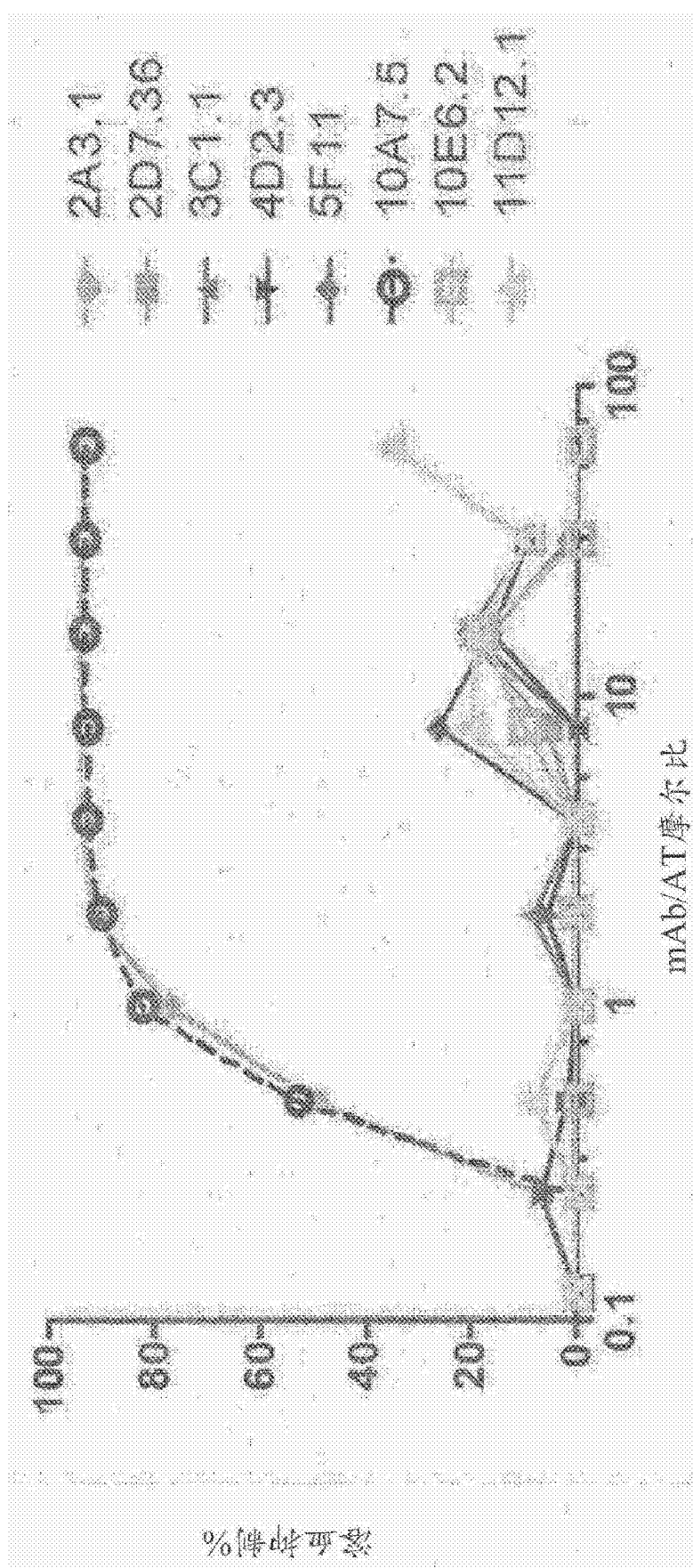


图 1A

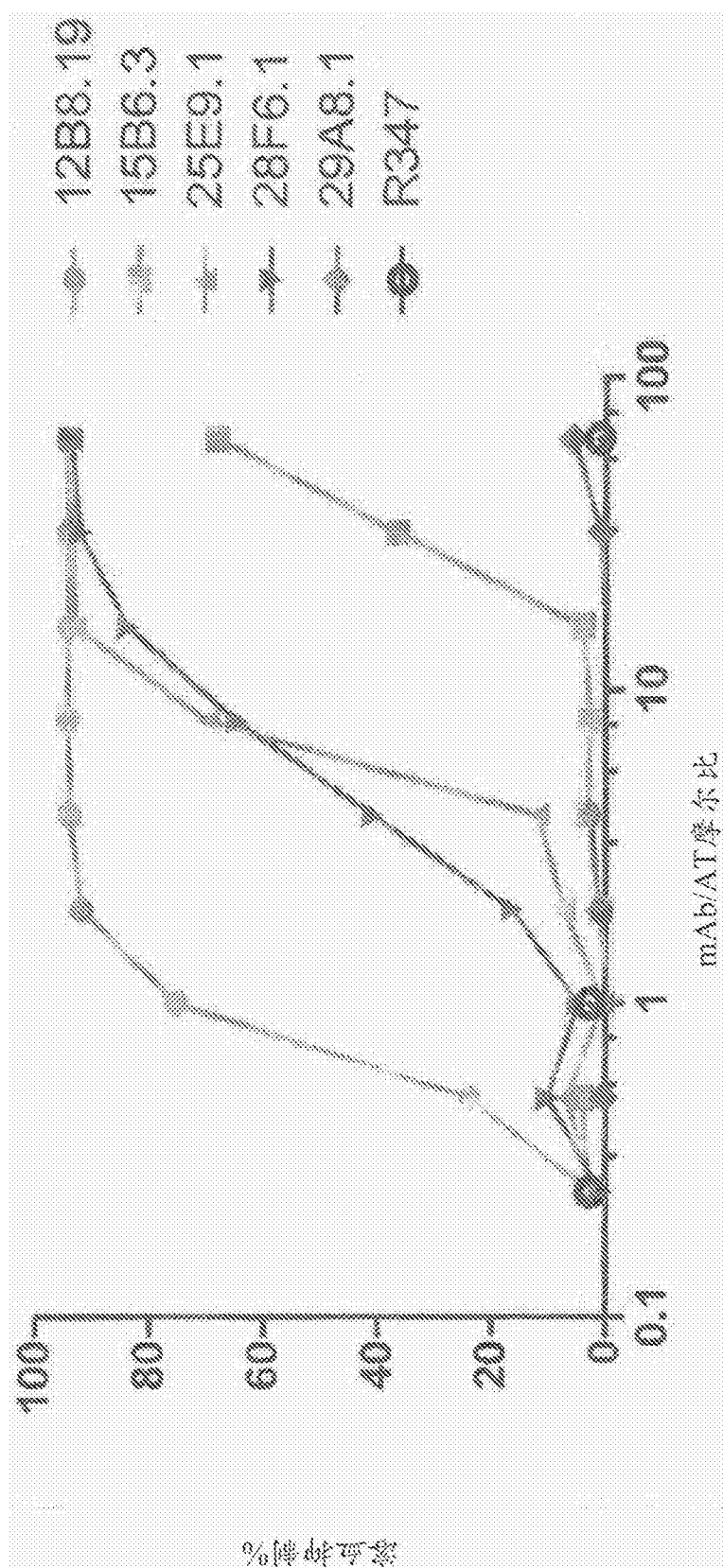


图 1B

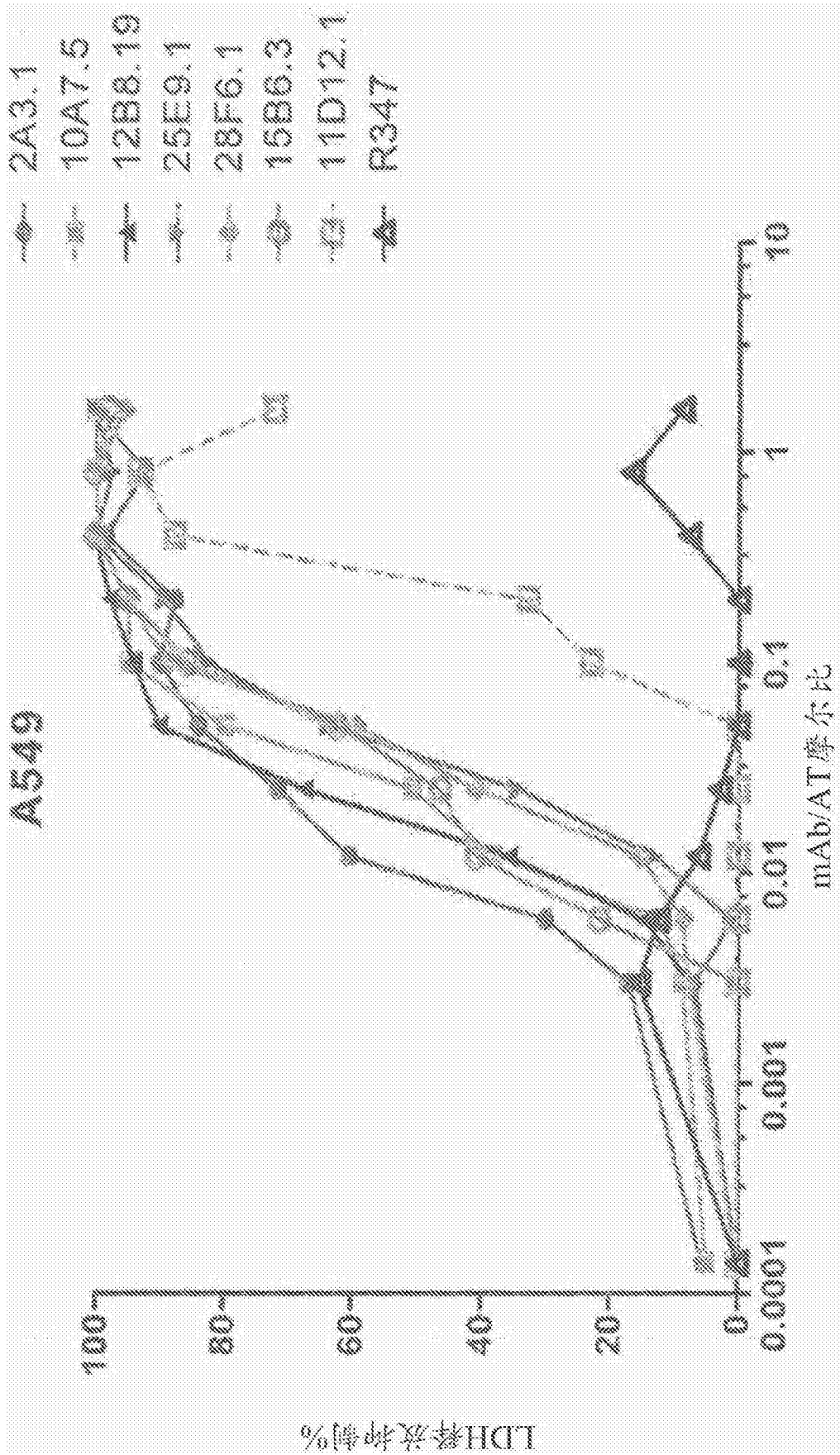


图 2A

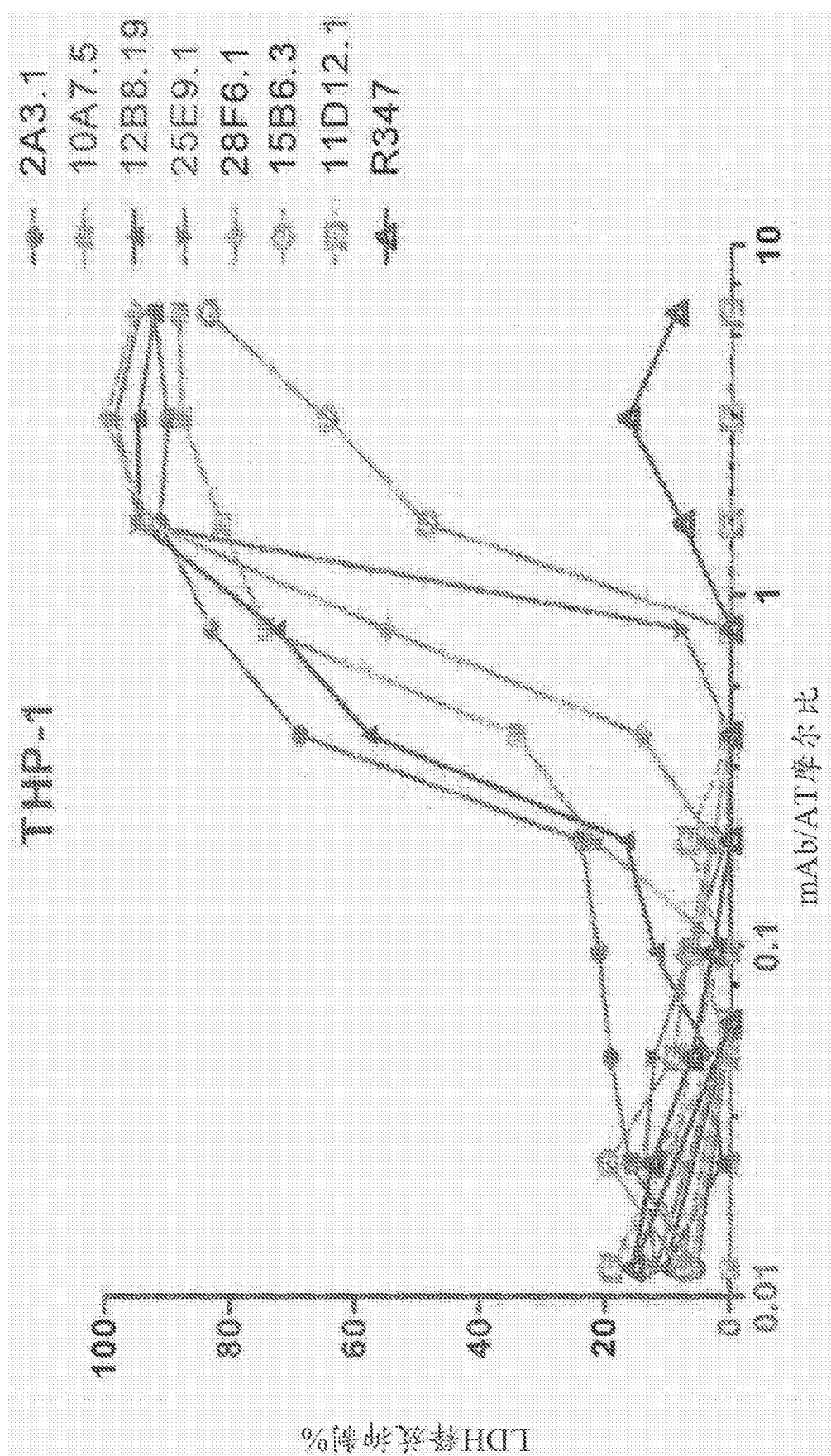


图 2B

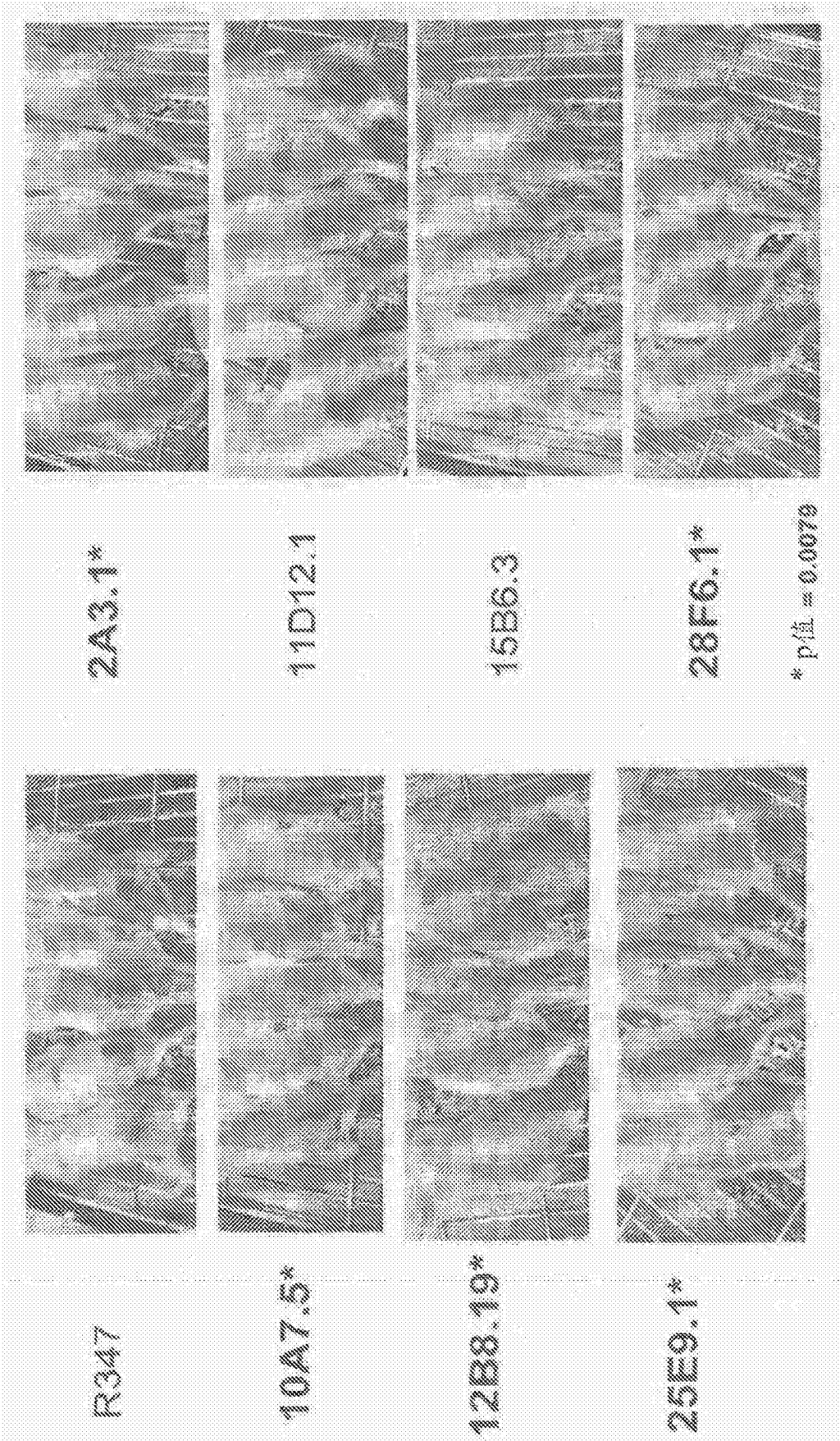


图 3A

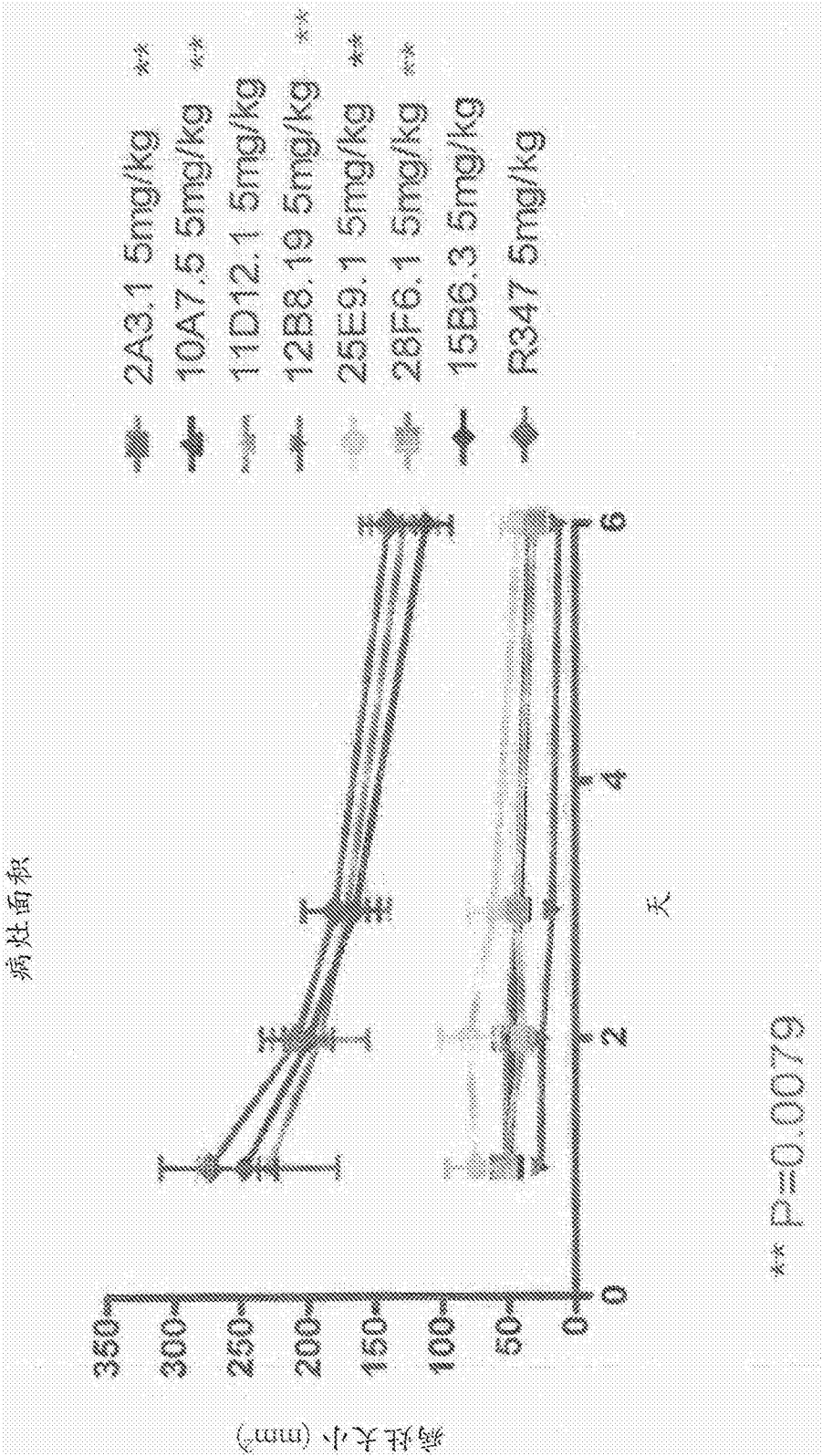


图 3B

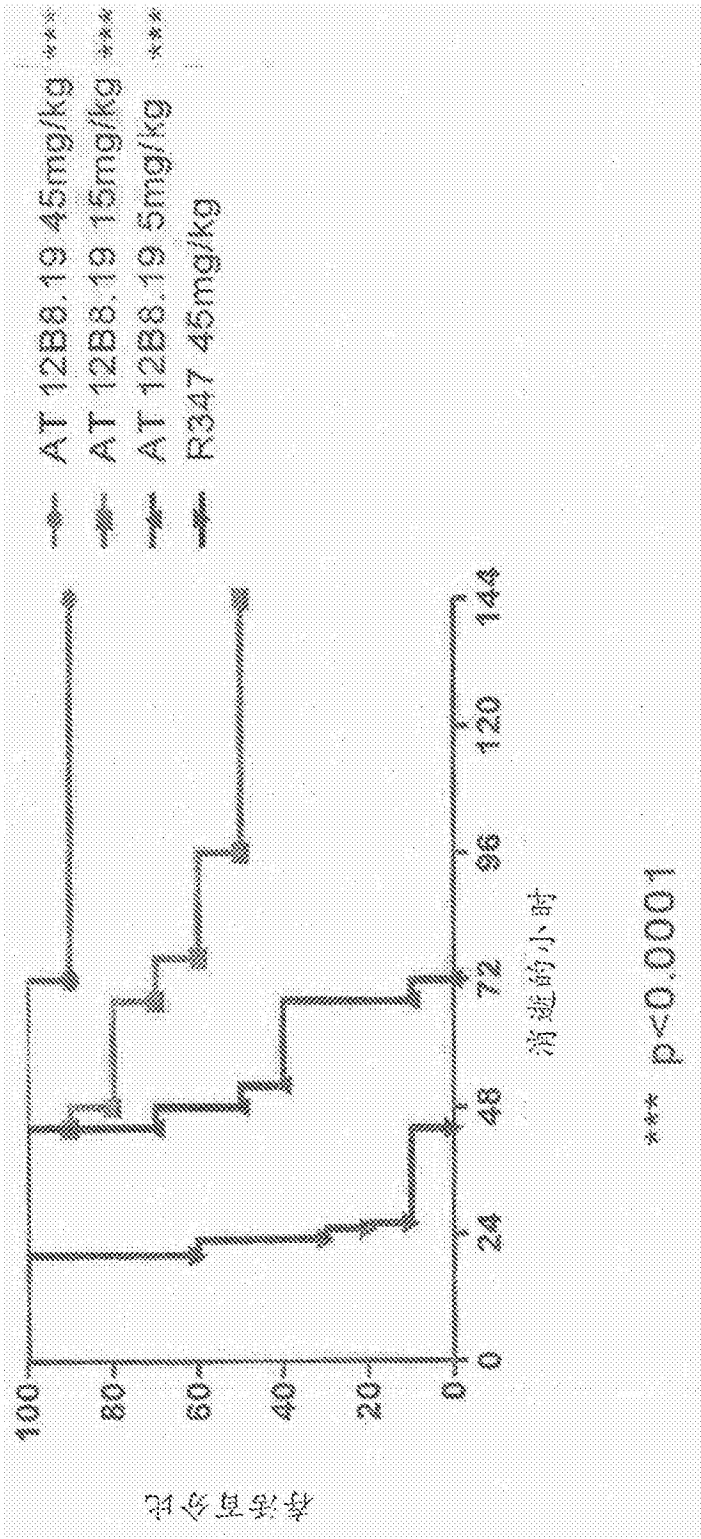


图 4

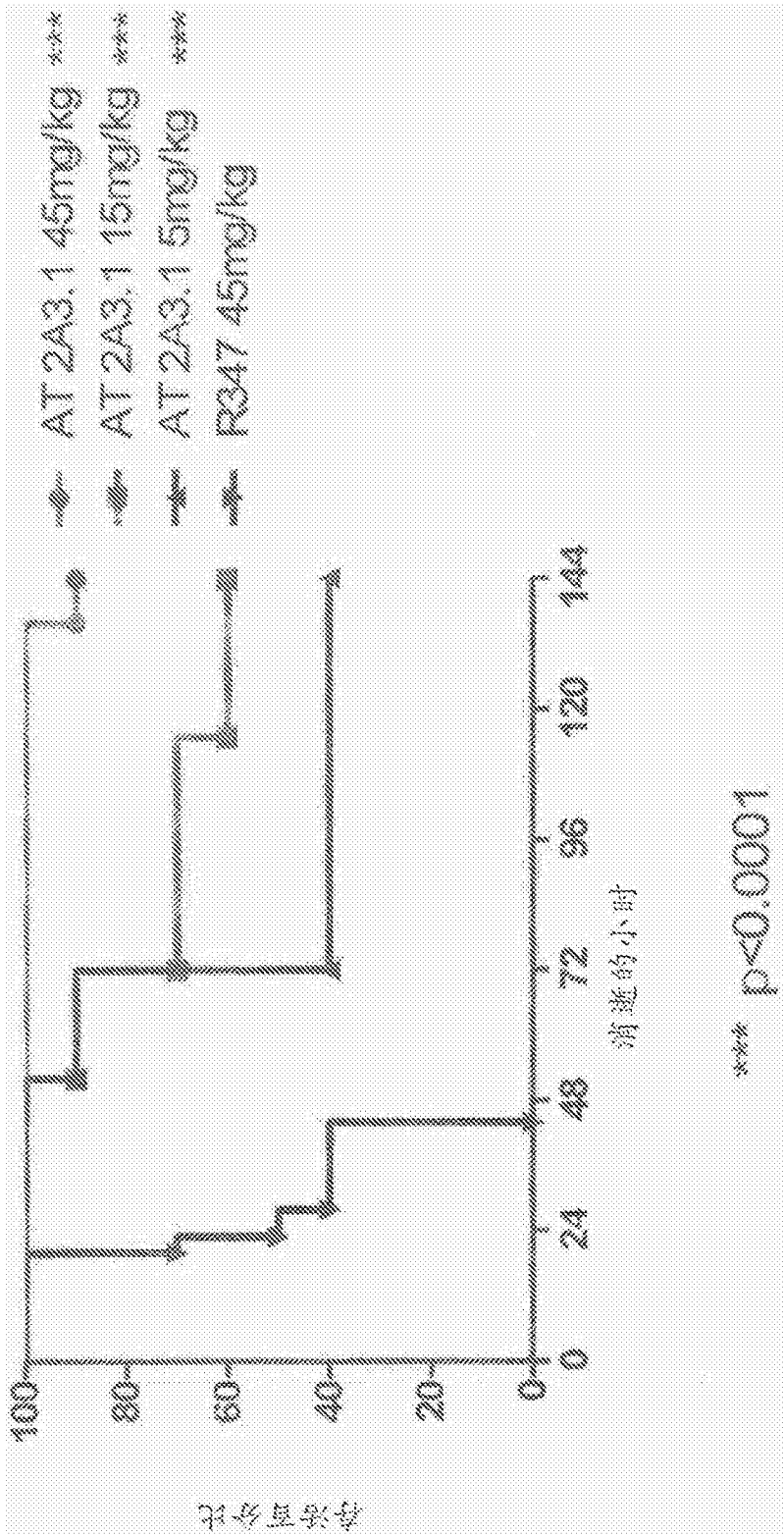


图 5

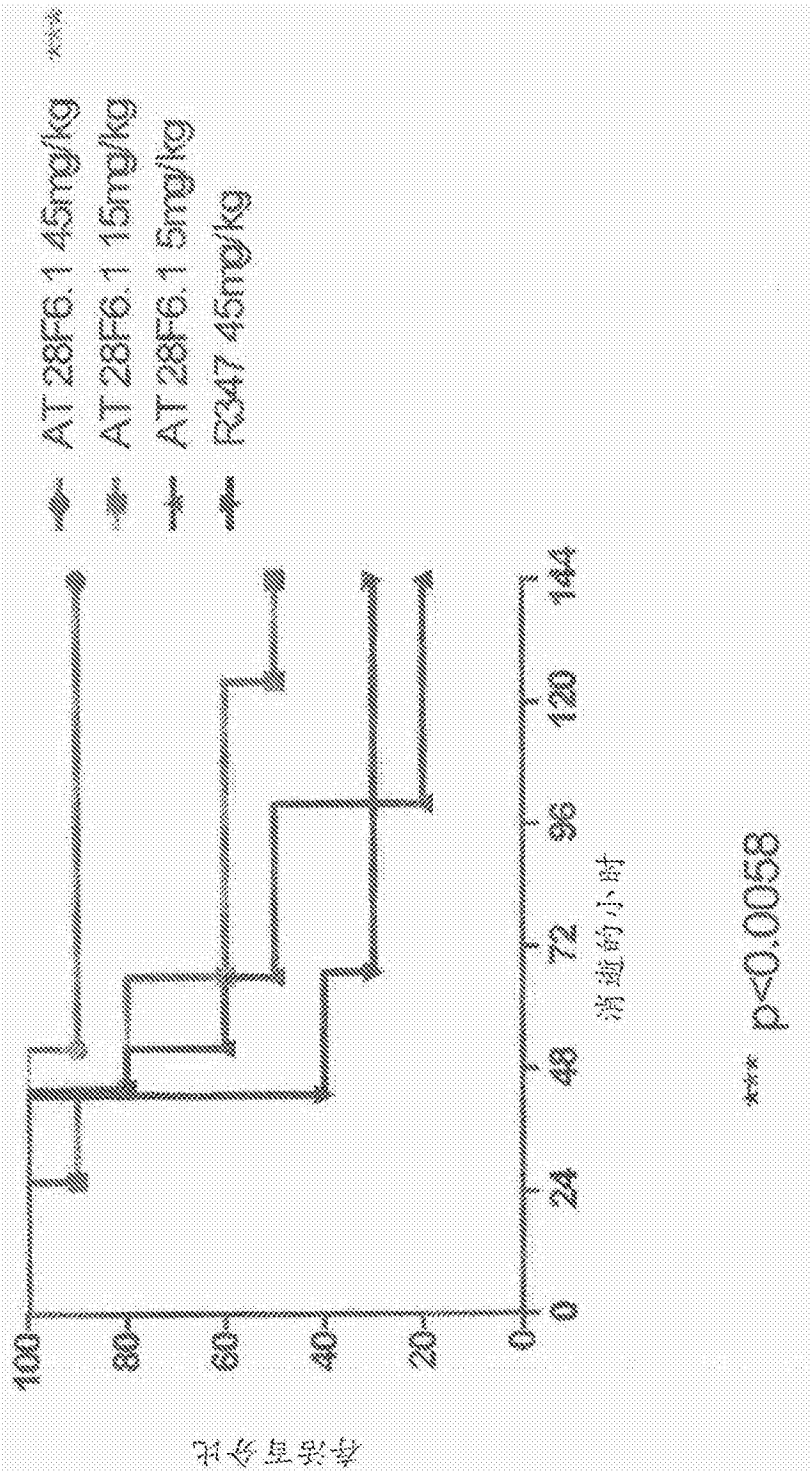


图 6

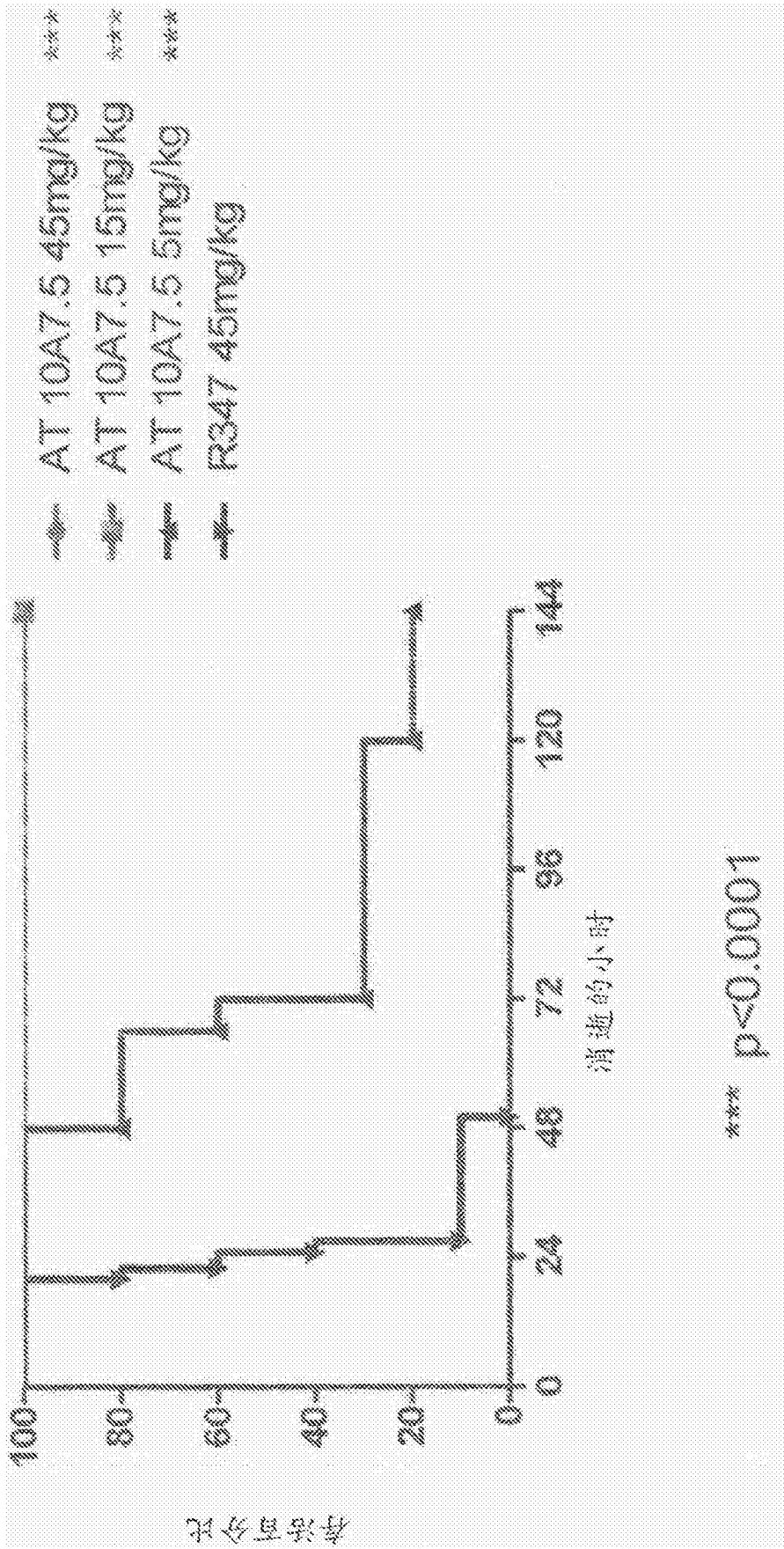


图 7

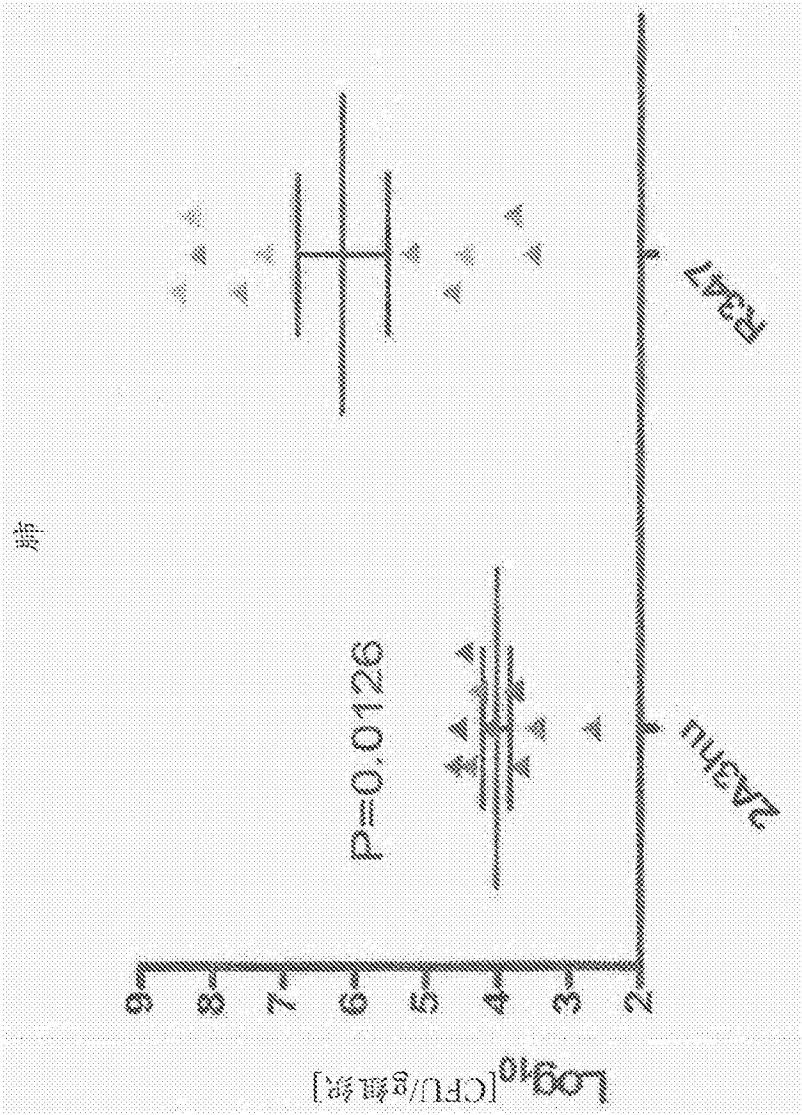


图 8A

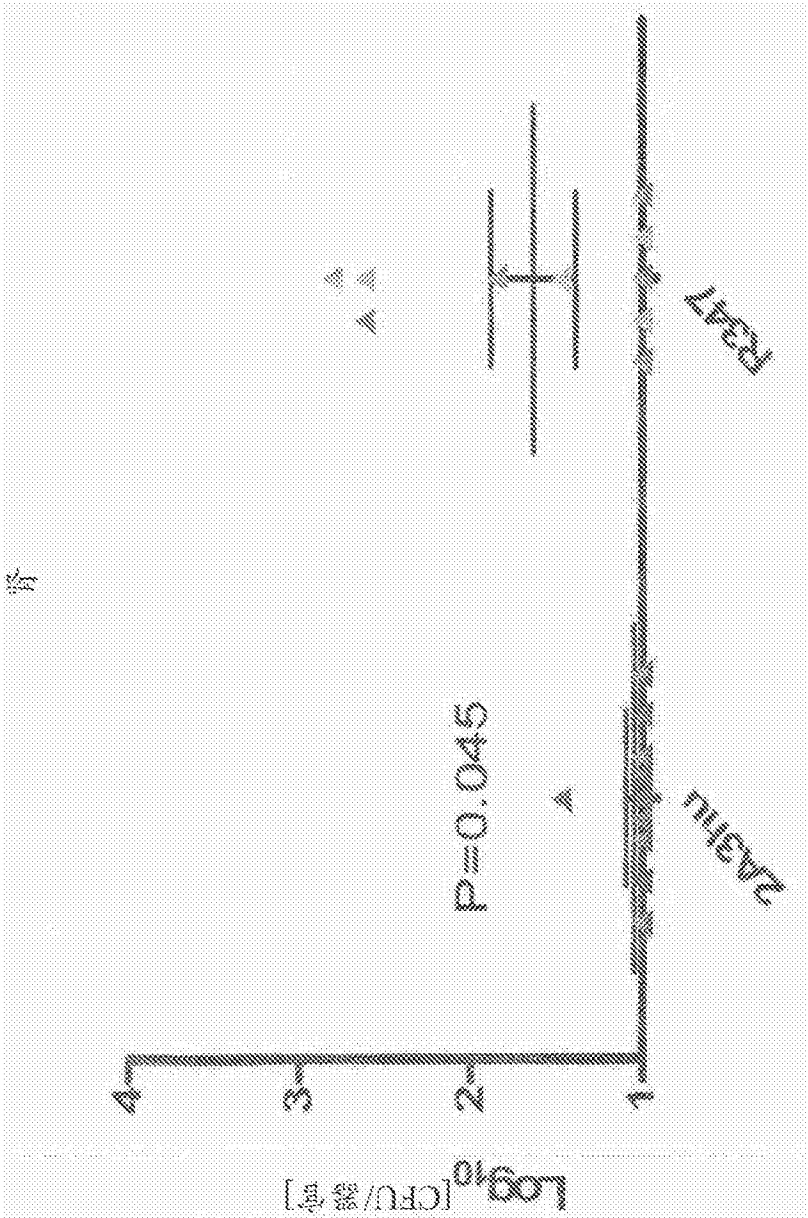


图 8B

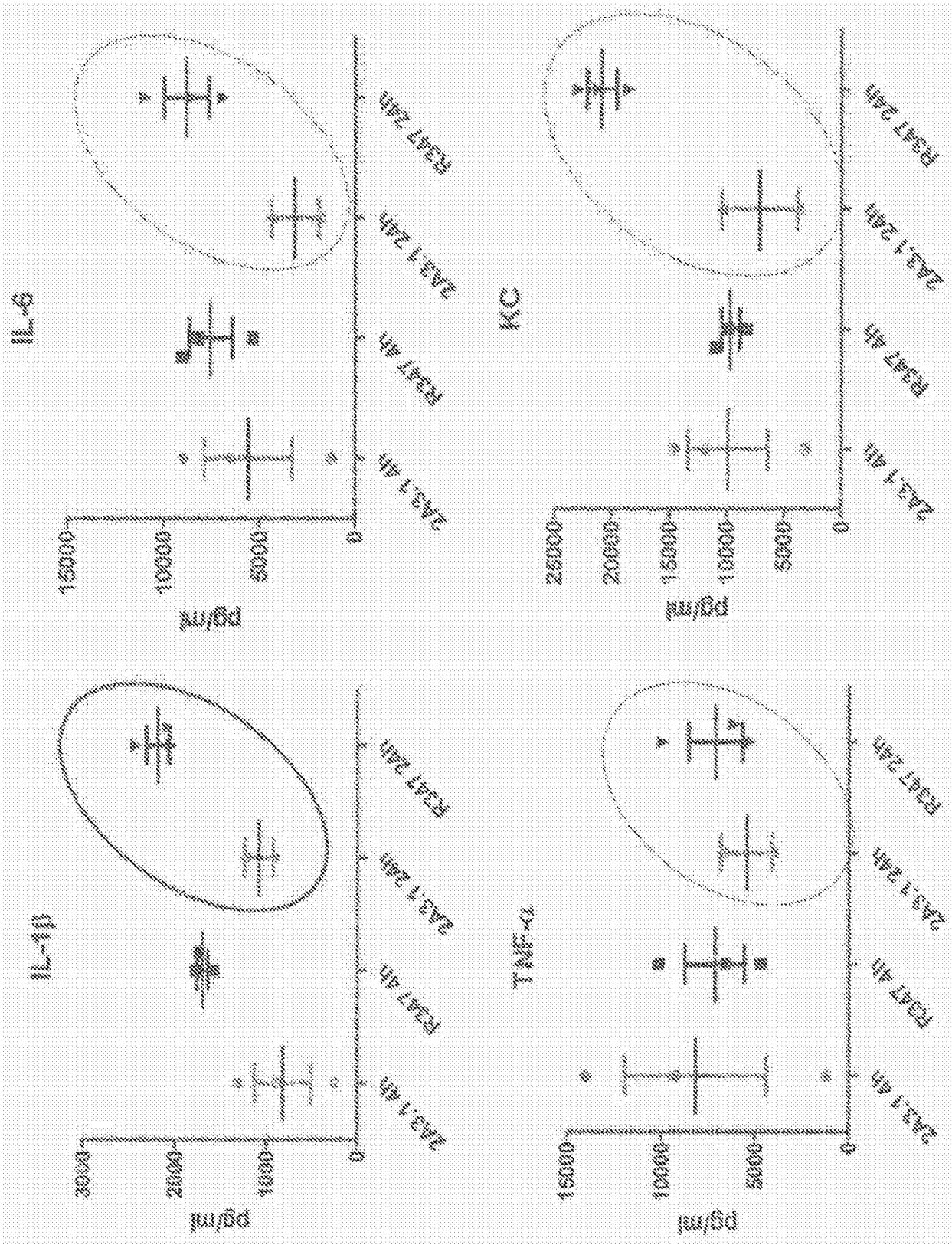
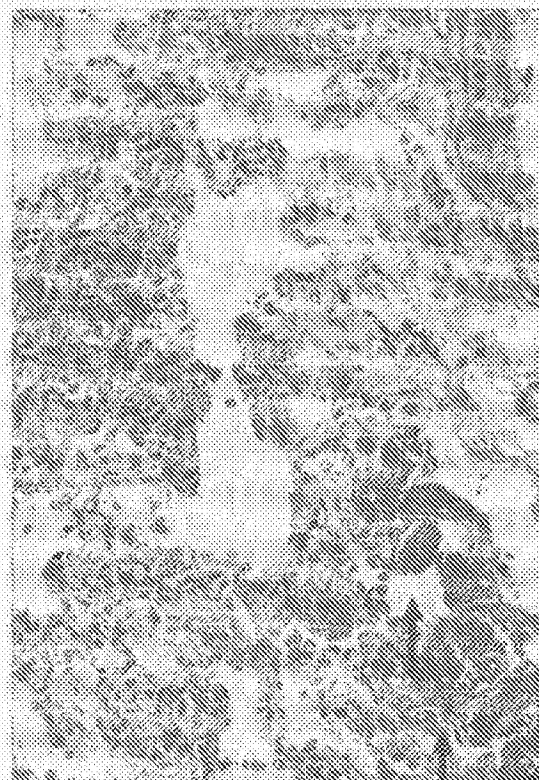
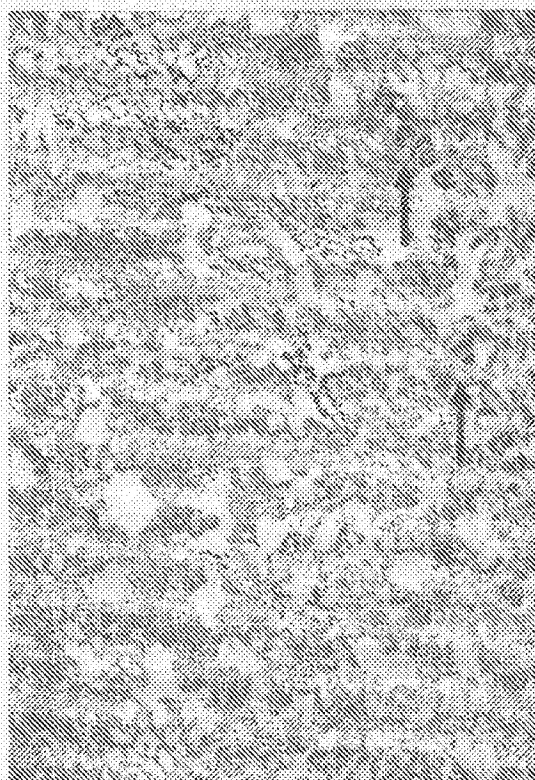


图 9

2A3抗-AT mAb



R347对照



10X

40X

图 10

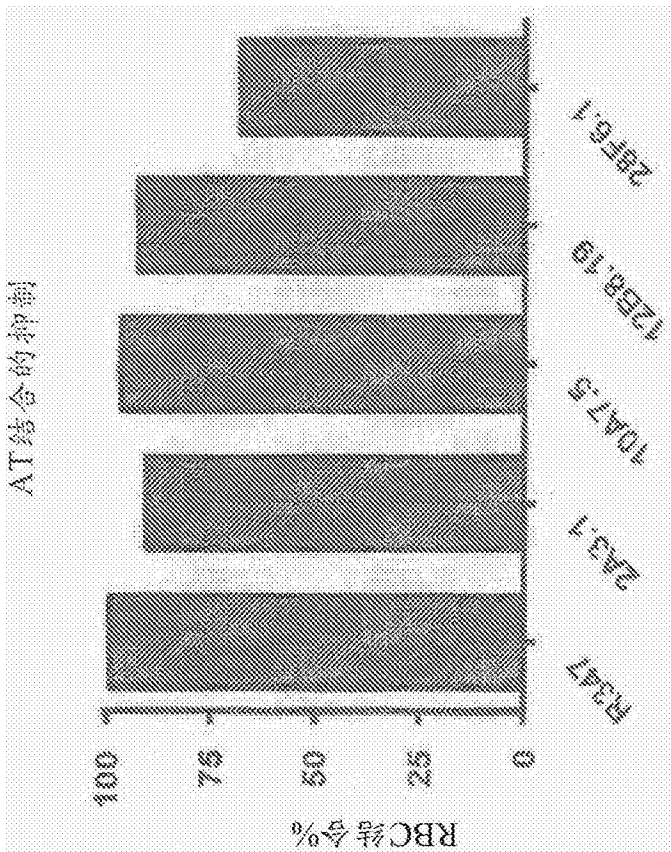


图 11

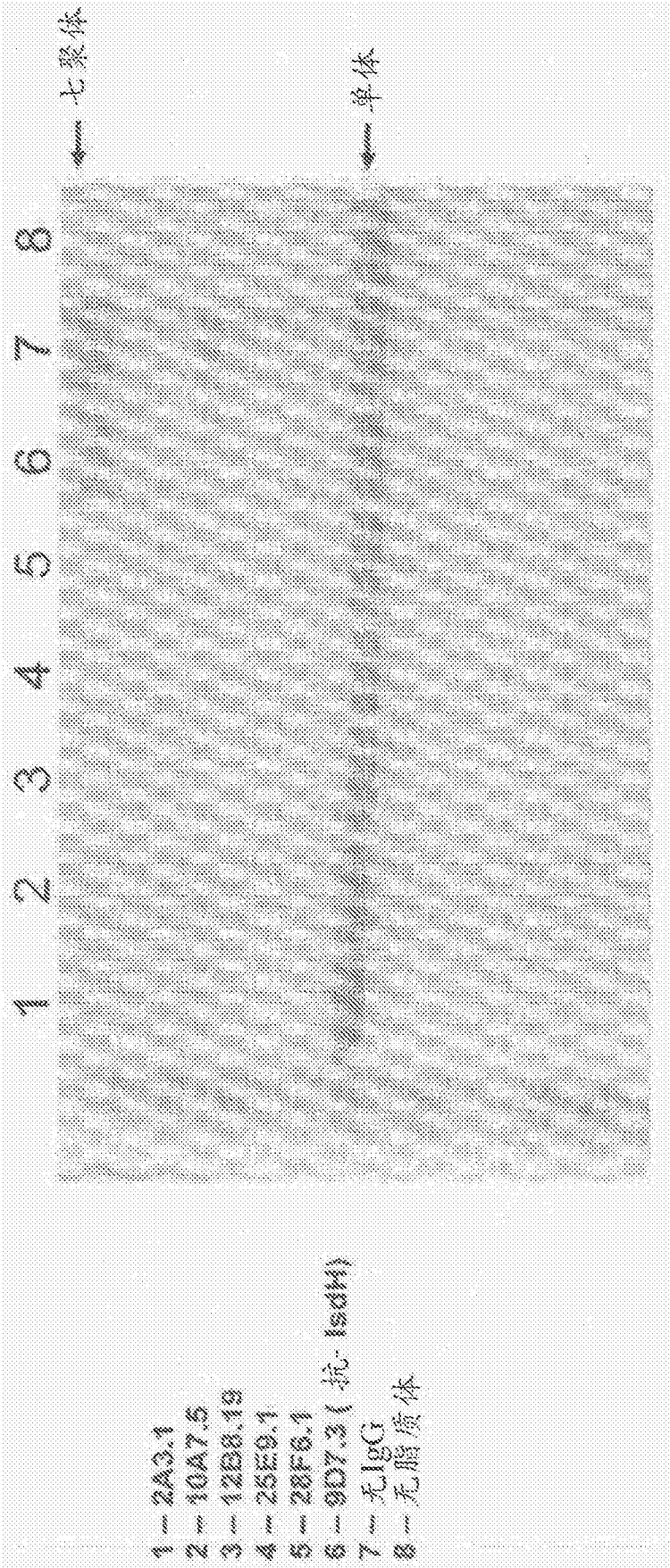


图 12

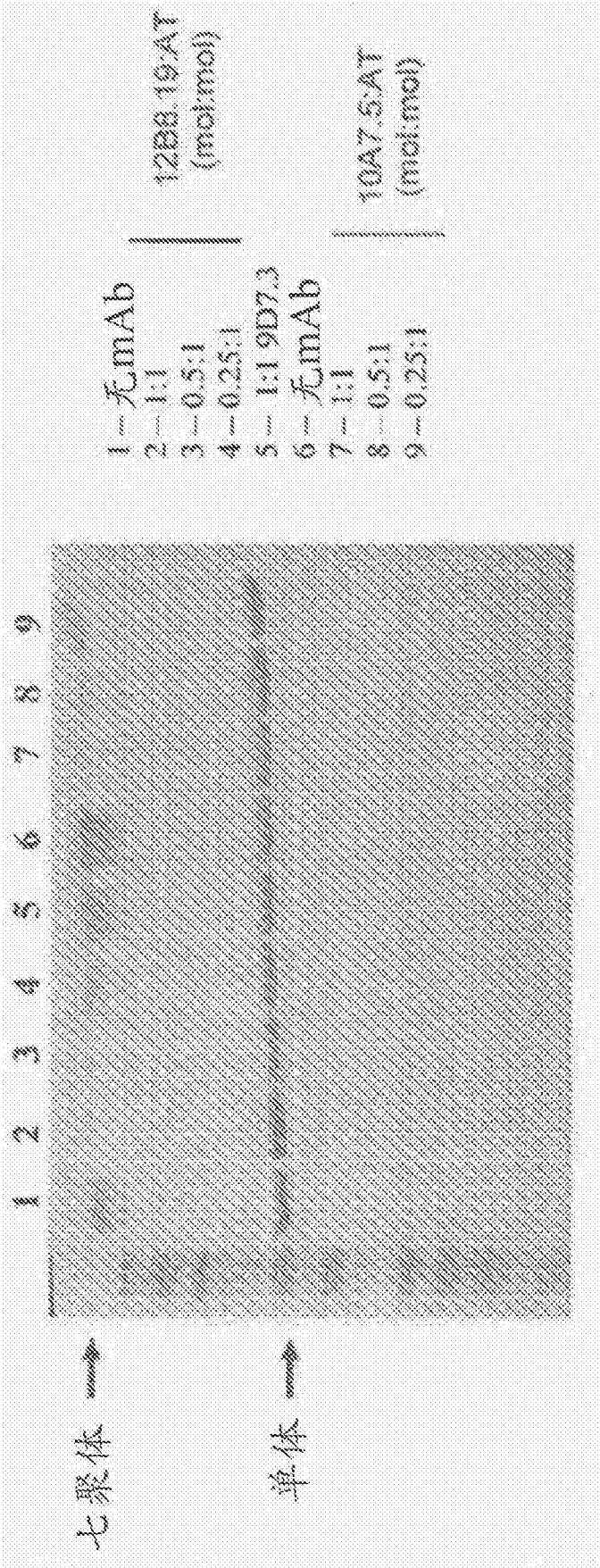


图 13A

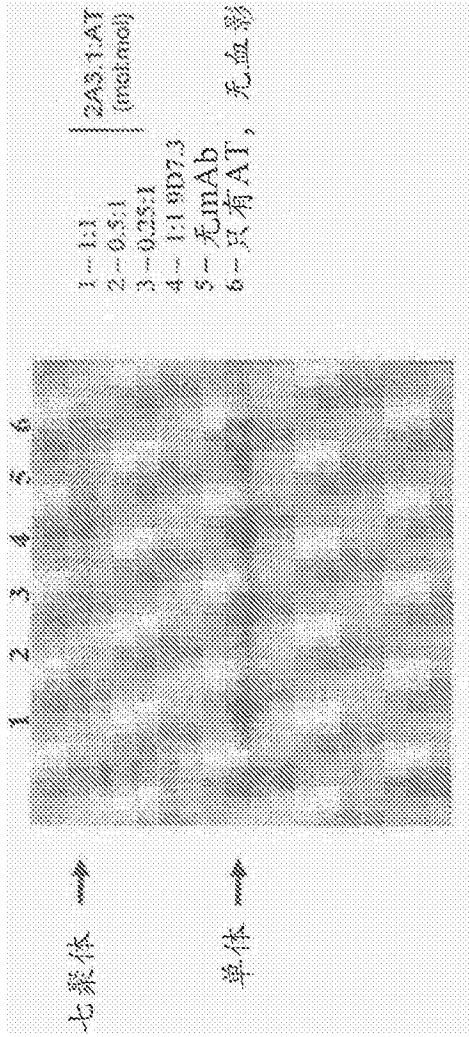


图 13B

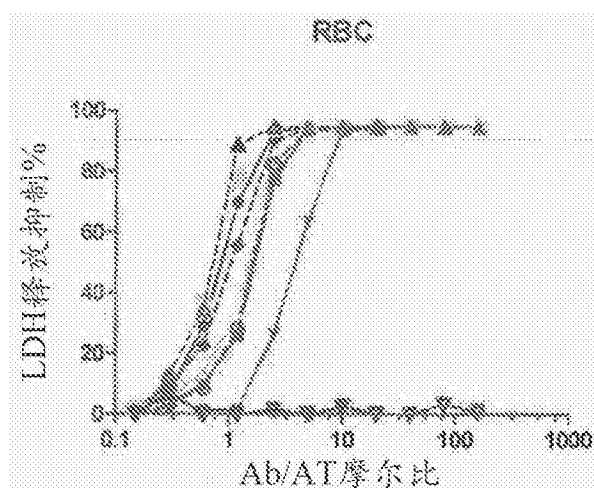


图 14

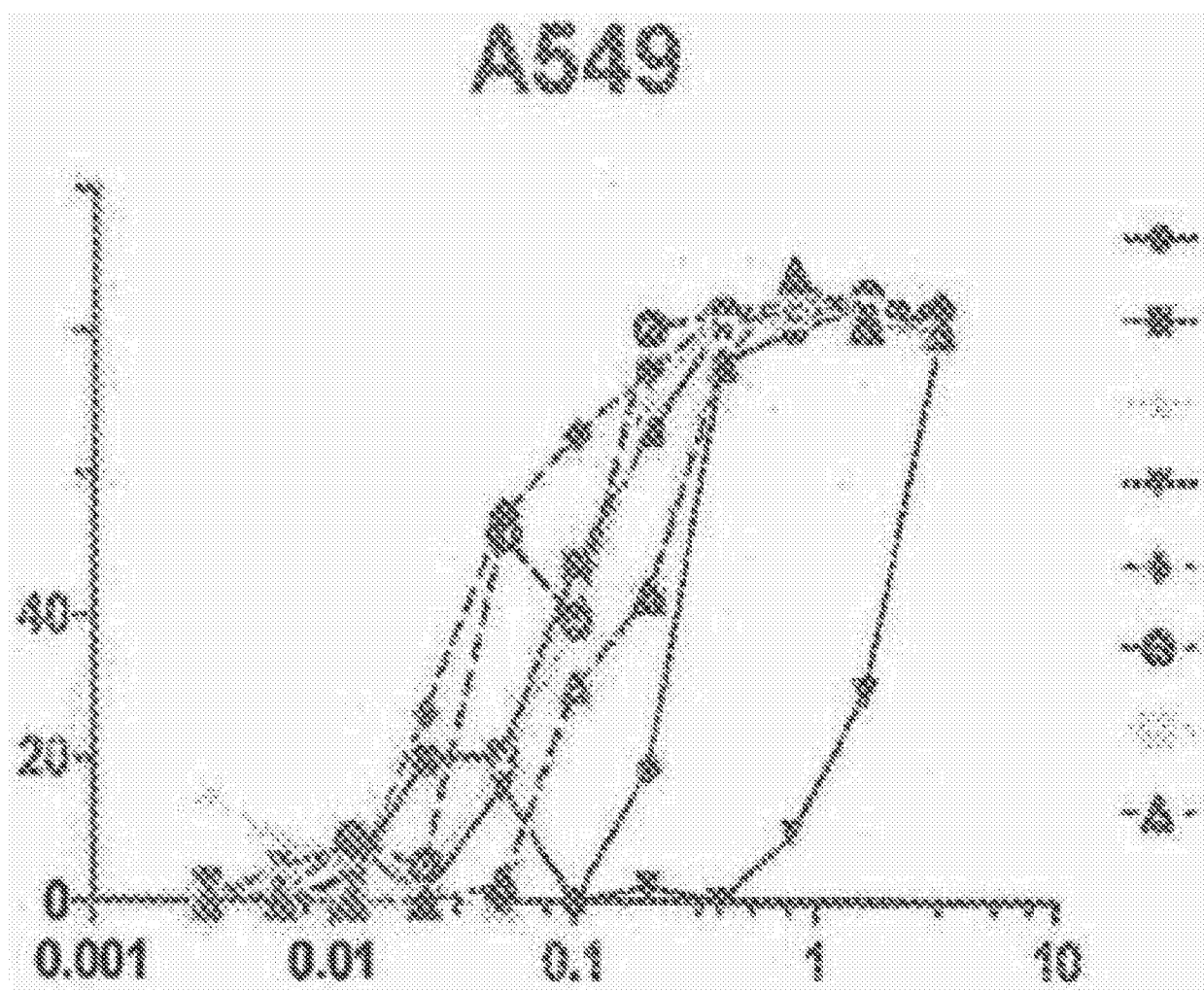


图 15

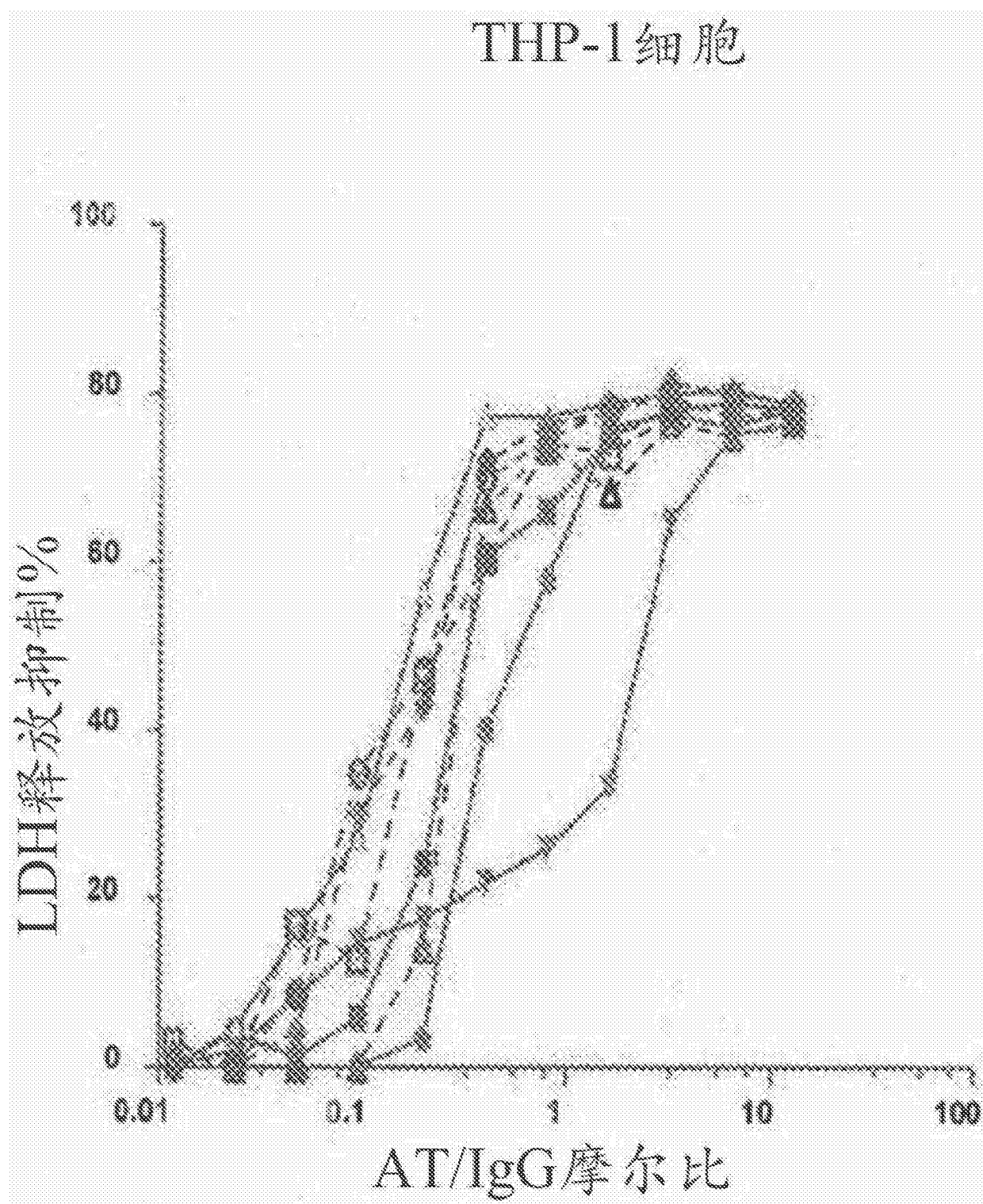
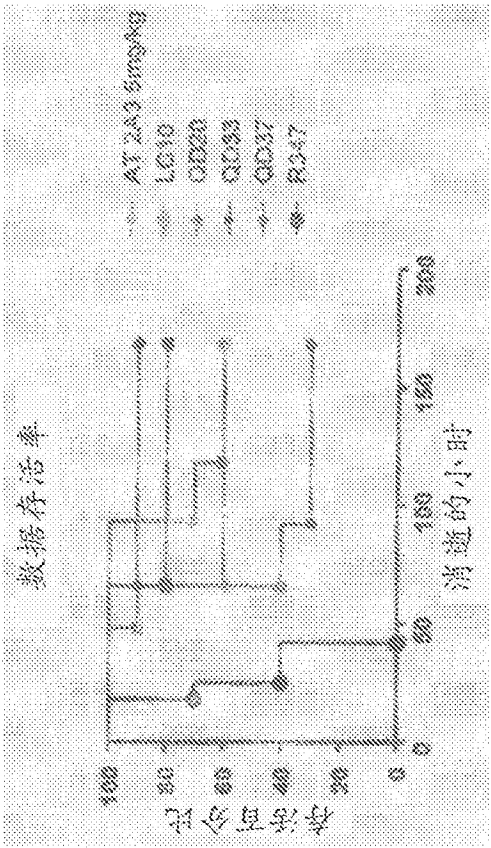
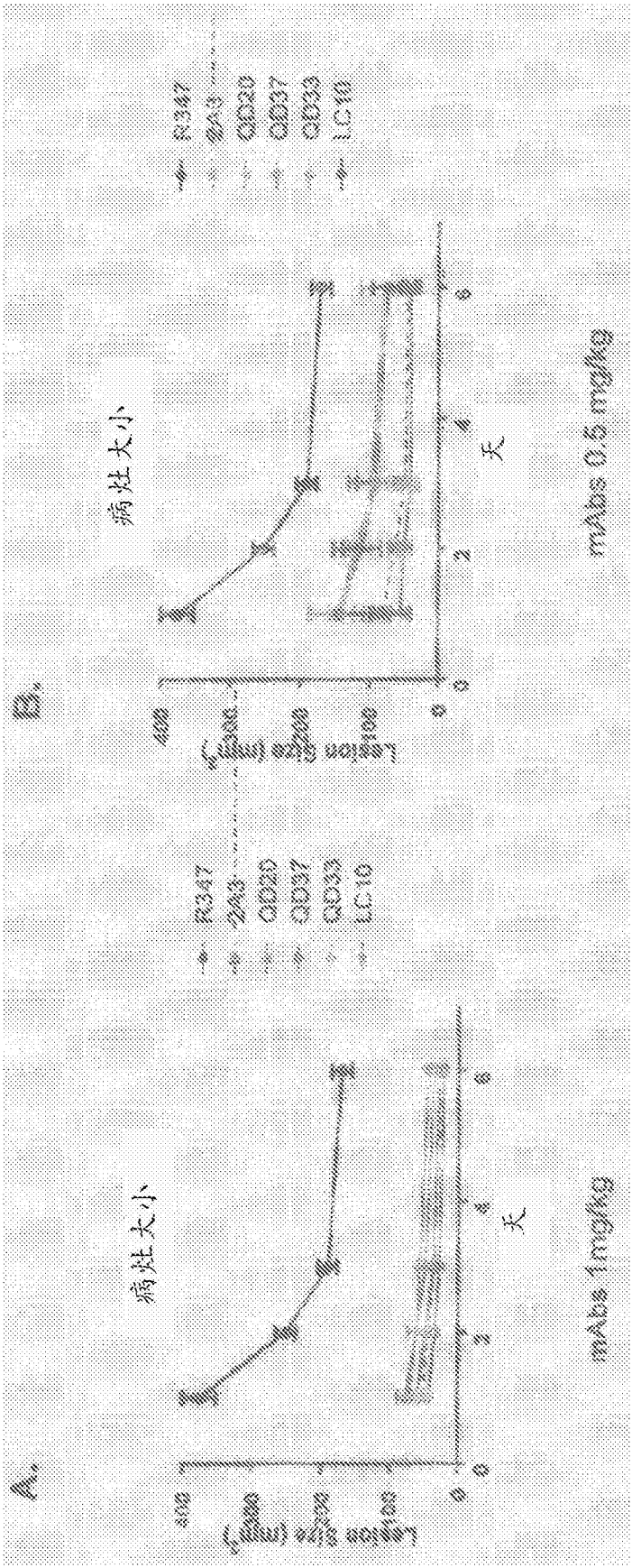


图 16



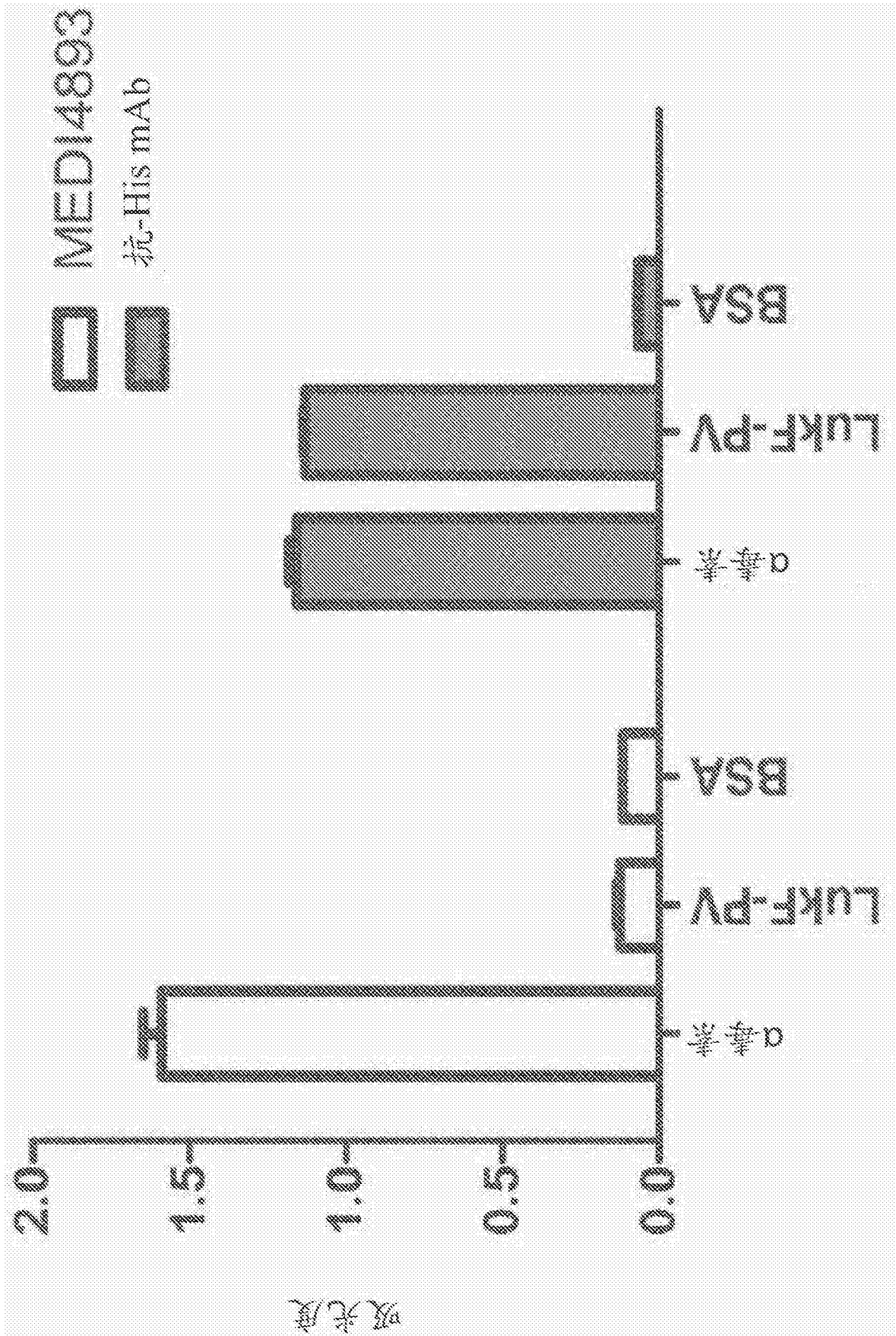


图 19

a毒素
LUKF-PV

a毒素
LUKF-PV

a毒素
LUKF-PV

a毒素
LUKF-PV

a毒素
LUKF-PV

a毒素
LUKF-PV

EKNE 299

图 20

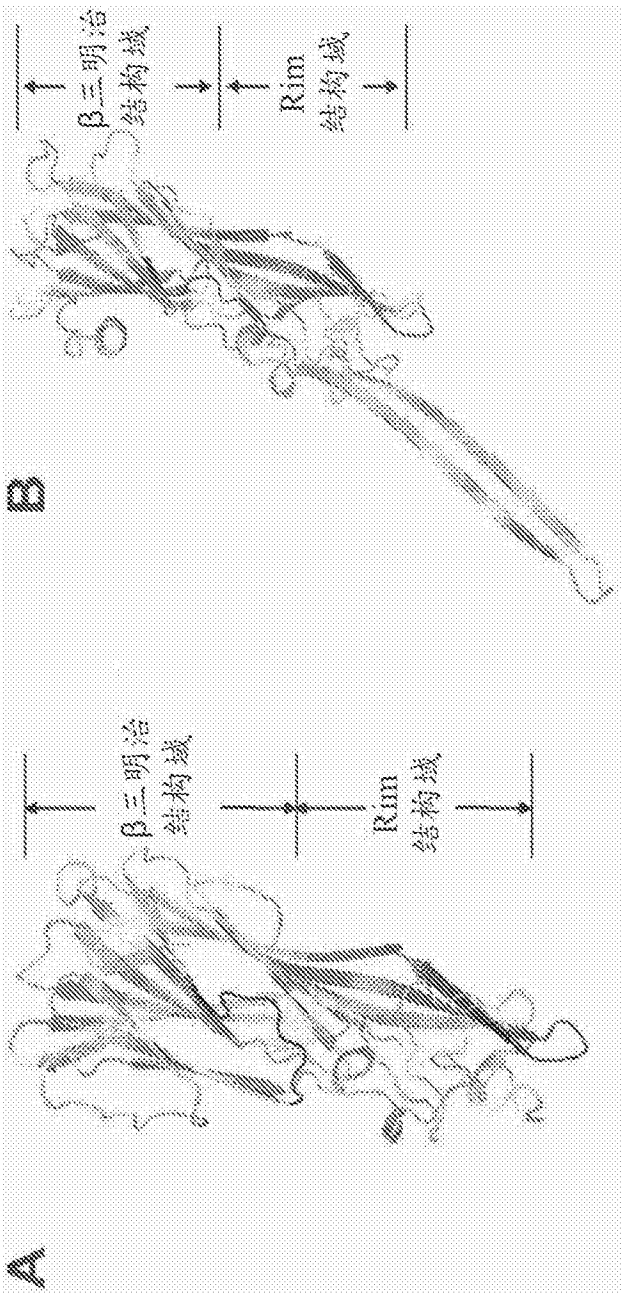


图 21

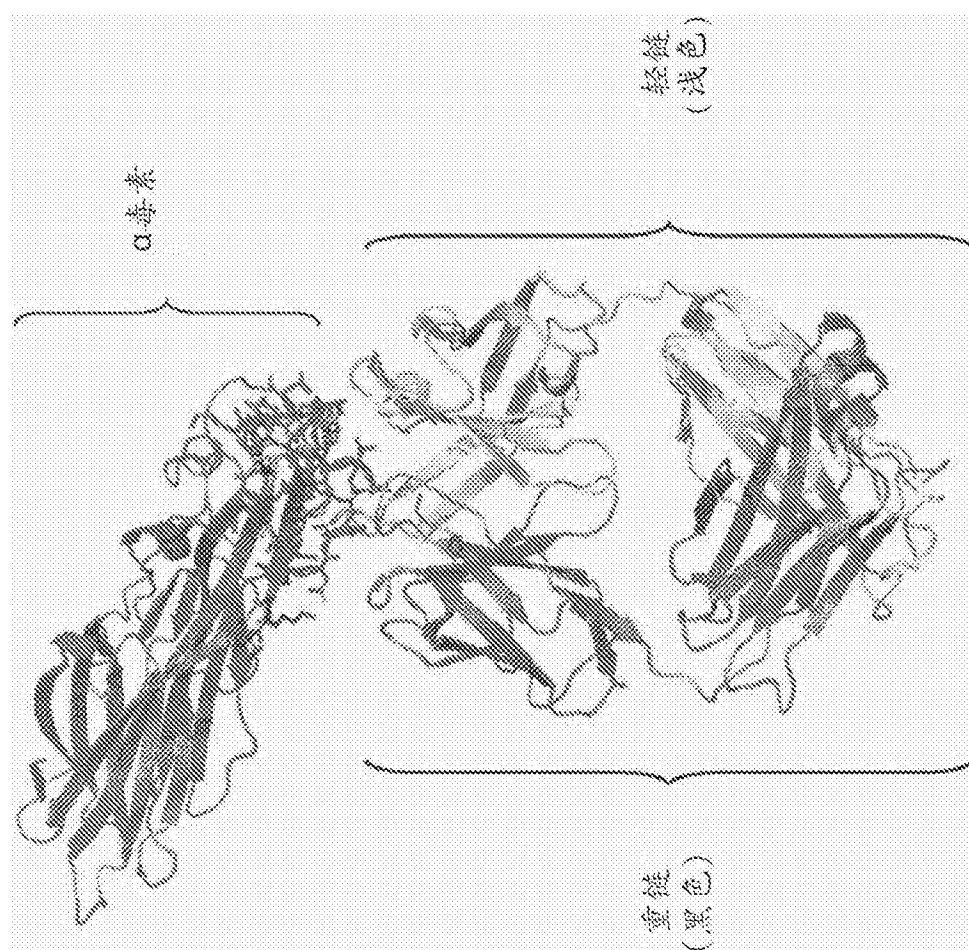


图 22

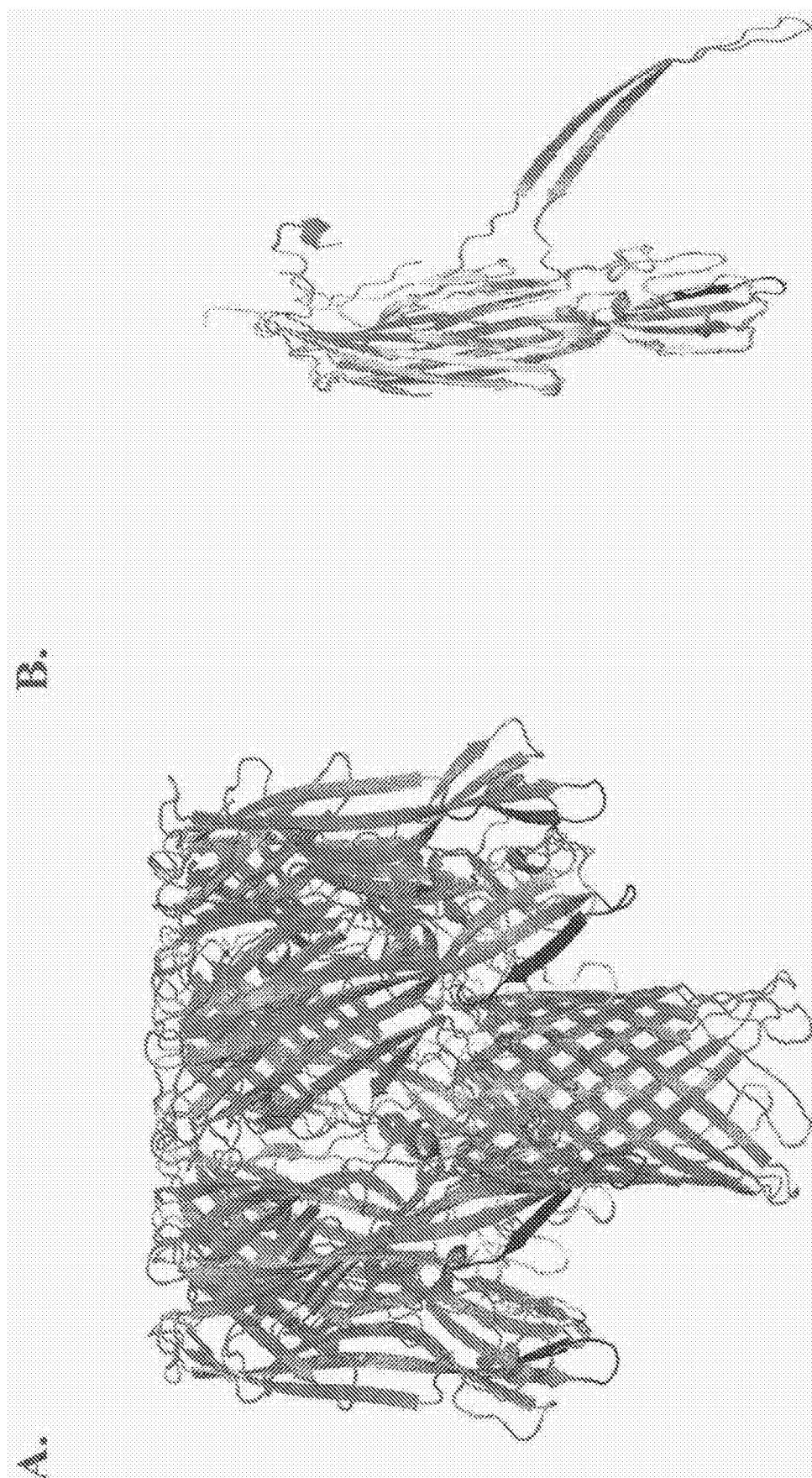


图 23

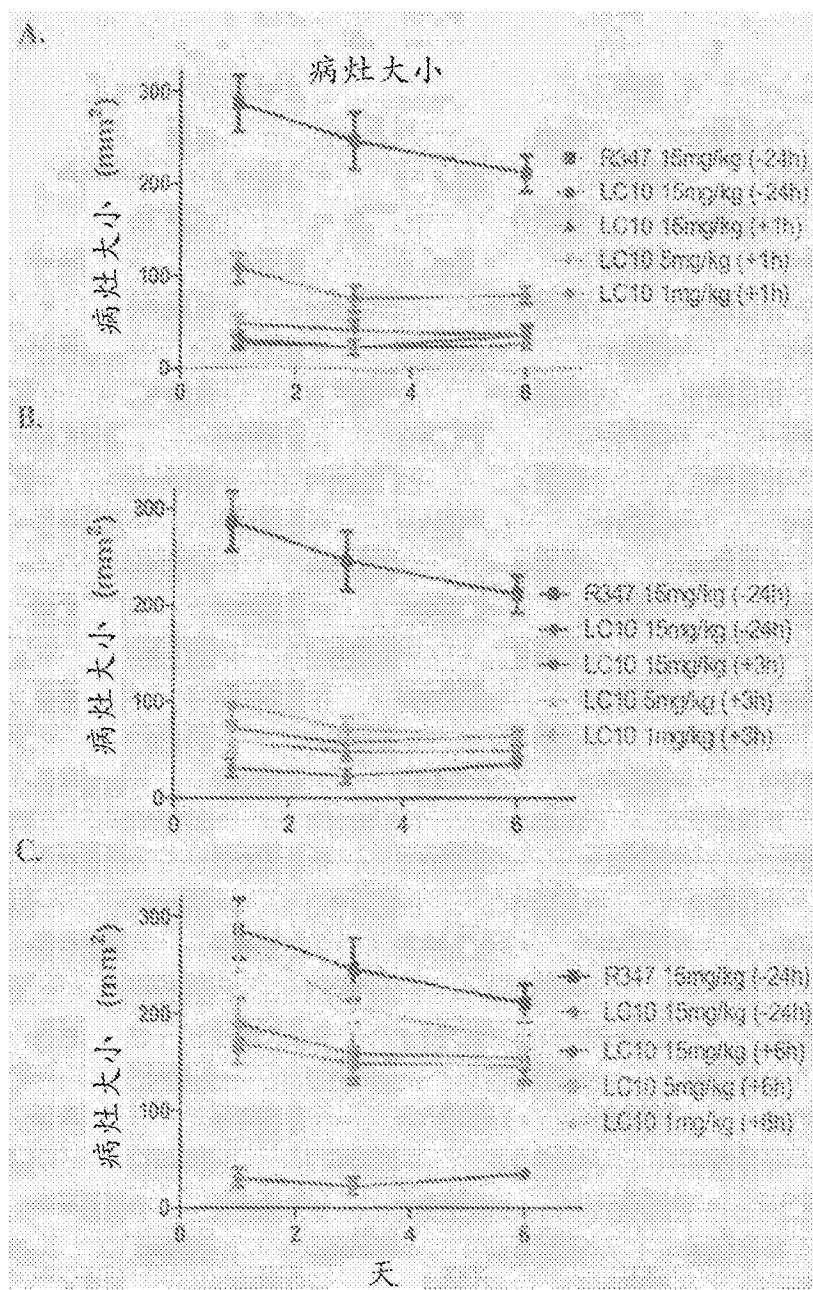


图 24

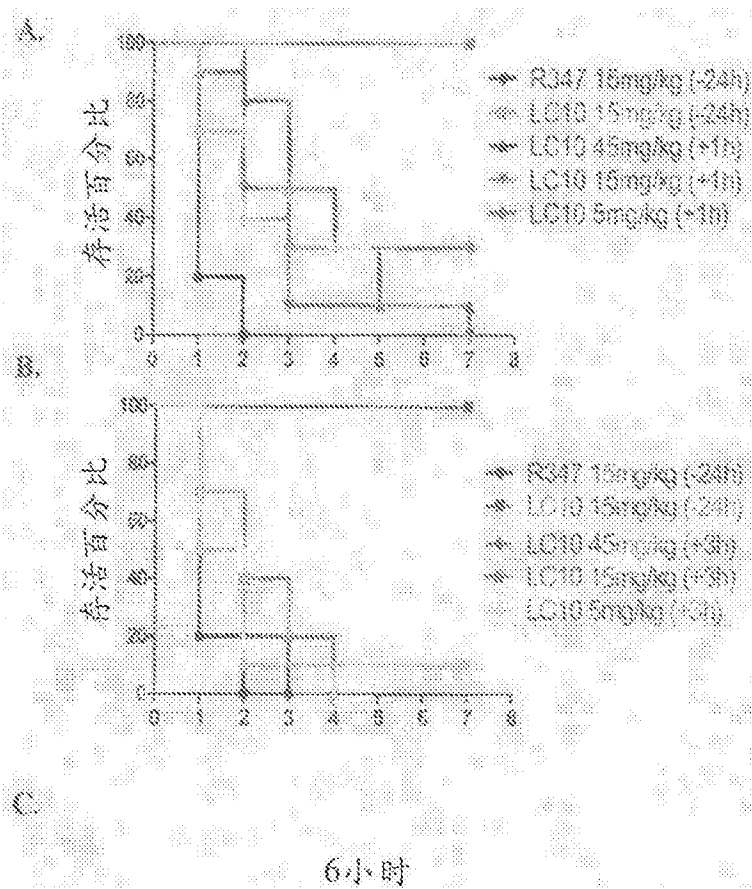


图 25

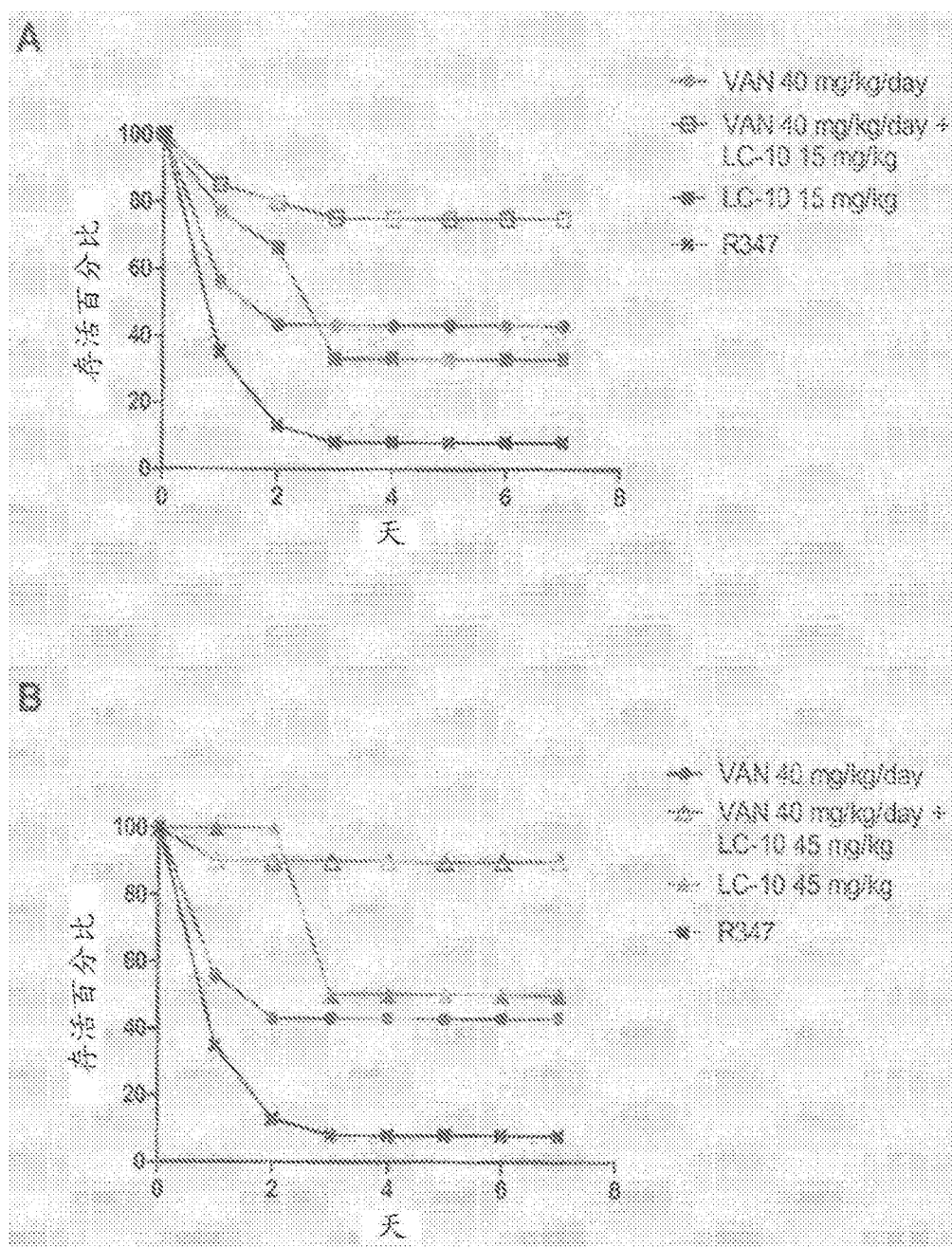


图 26

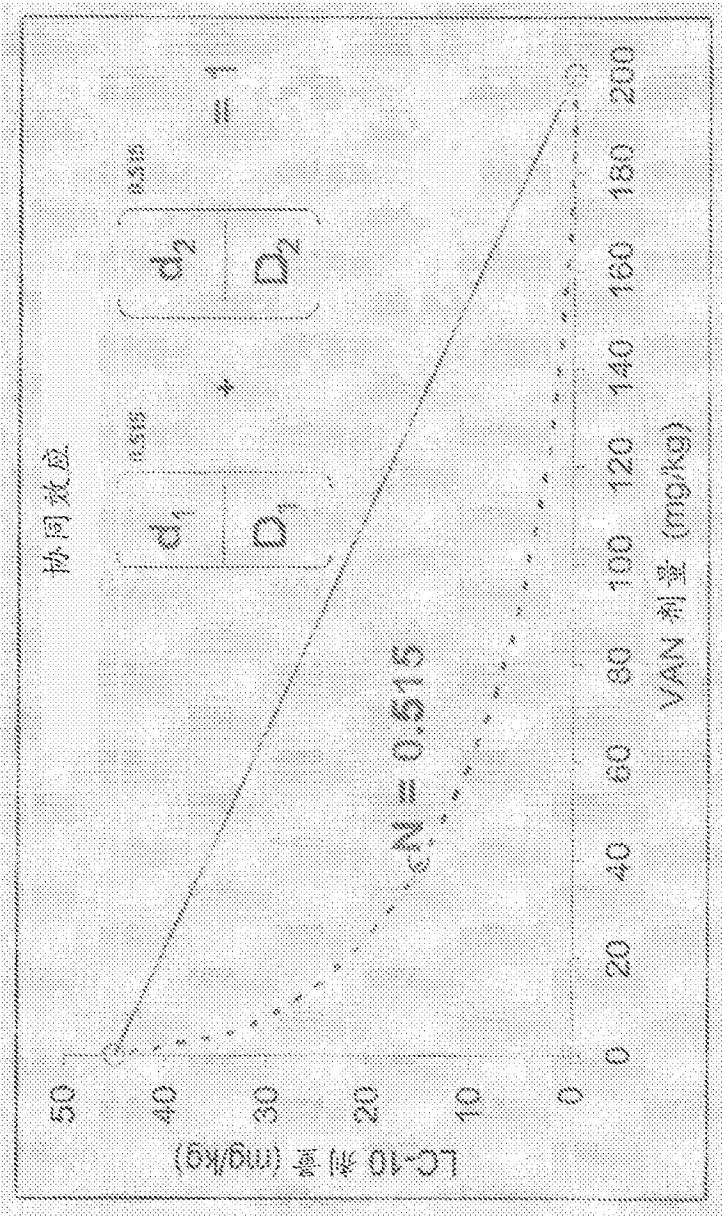


图 27