



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102666583 B

(45) 授权公告日 2015. 11. 25

(21) 申请号 201080041138. 6

C12N 15/13(2006. 01)

(22) 申请日 2010. 07. 15

A61K 39/395(2006. 01)

A61P 31/04(2006. 01)

(30) 优先权数据

09165558. 9 2009. 07. 15 EP

61/225, 878 2009. 07. 15 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 03. 15

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/NL2010/050456 2010. 07. 15

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/008092 EN 2011. 01. 20

(73) 专利权人 AIMM 医疗股份公司

地址 荷兰阿姆斯特丹

专利权人 基因泰克公司

(72) 发明人 T. 博蒙特 M. J. 克瓦肯博斯

E. J. 布朗 J. H. 莫里萨基

W. L. W. 哈曾博斯 S. 马利亚撒桑

K. 卡吉哈拉 Y. 夏

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 张红春

(51) Int. Cl.

C07K 16/12(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101123980 A , 2008. 02. 13, 全文, 尤其是权利要求 1-8.

CN 101302504 A , 2008. 11. 12, 全文.

CN 101460519 A , 2009. 06. 17, 参见说明书全文, 尤其是背景技术以及实施例部分, 权利要求 1-3.

审查员 方晓云

权利要求书6页 说明书21页

序列表28页 附图14页

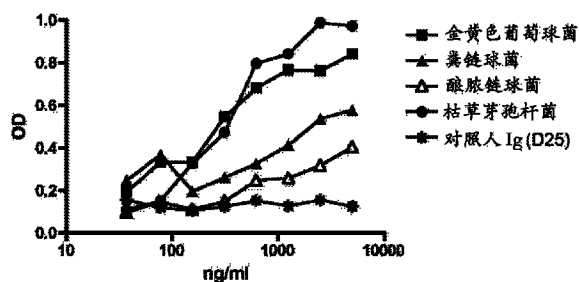
(54) 发明名称

革兰氏阳性细菌特异性结合化合物

(57) 摘要

本发明提供改良的结合化合物, 其能够特异性结合革兰氏阳性细菌。本发明还提供完全人的结合化合物, 其能够在人个体中进行治疗性应用。

FIG 1 对来自不同革兰氏阳性细菌的 LTA 制备物的识别



1. 一种分离的抗体,其包含:
重链可变域,该重链可变域包含:
 - (a) 如 SEQ ID NO:1 所示的重链 CDR1 序列 RFAMS,和
 - (b) 如 SEQ ID NO:2 所示的重链 CDR2 序列 SINNGNNPYYARSVQY 或如 SEQ ID NO:60 所示的 SINSGNNPYYARSVQY,和
 - (c) 如 SEQ ID NO:3 所示的重链 CDR3 序列 DHPSSGWPTFDS;
和轻链可变域,该轻链可变域包含:
 - (d) 如 SEQ ID NO:4 所示的轻链 CDR1 序列 RASENVGDWLA,和
 - (e) 如 SEQ ID NO:5 所示的轻链 CDR2 序列 KTSILES,和
 - (f) 如 SEQ ID NO:6 所示的轻链 CDR3 序列 QHYXRFPYT,其中 X 为 I 或 M。
2. 权利要求 1 的抗体,其中所述轻链 CDR3 序列为 QHYIRFPYT。
3. 权利要求 1 的抗体,其中所述轻链 CDR3 序列为 QHYMRFPYT。
4. 权利要求 1 的抗体,其中所述抗体具有重链可变域序列,该序列包含:
 - (a) 如 SEQ ID NO:38 所示的框架 1 (FW1) 序列 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLS 或如 SEQ ID NO:61 所示的 EVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLS;
 - (b) 如 SEQ ID NO:40 所示的框架 2 (FW2) 序列 WVRQAPGRGLEWVA;
 - (c) 如 SEQ ID NO:42 所示的框架 3 (FW3) 序列 RFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAK;
和
 - (d) 如 SEQ ID NO:44 所示的框架 4 (FW4) 序列 WPGTLTVTVSS。
5. 权利要求 1 的抗体,其中所述抗体包含如 SEQ ID NO:7 所示的重链可变域序列 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNGNNPYYARSVQYRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSSGWPTFDSWPGTLTVTVSS。
6. 权利要求 1 的抗体,其中所述抗体包含如 SEQ ID NO:62 所示的重链可变域序列 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINSGNNPYYARSVQYRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSSGWPTFDSWPGTLTVTVSS。
7. 权利要求 1 的抗体,其中所述抗体具有轻链可变域序列,该序列包含:
 - (a) 如 SEQ ID NO:48 所示的框架 1 (FW1) 序列 DIQLTQSPSALPASVGDRVSITC;
 - (b) 如 SEQ ID NO:50 所示的框架 2 (FW2) 序列 WYRQKPGKAPNLLIY;
 - (c) 如 SEQ ID NO:52 所示的框架 3 (FW3) 序列 GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDFATYYC;
和
 - (d) 如 SEQ ID NO:53 所示的框架 4 (FW4) 序列 FGQGTKLEIKRTV 或如 SEQ ID NO:59 所示的 FGQGTKVEIKRTV。
8. 权利要求 1 的抗体,其中所述抗体具有重链可变域序列和轻链可变域序列,
该重链可变域序列包含:
 - (a) 如 SEQ ID NO:38 所示的框架 1 (FW1) 序列 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLS 或如 SEQ ID NO:61 所示的 EVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLS;
 - (b) 如 SEQ ID NO:40 所示的框架 2 (FW2) 序列 WVRQAPGRGLEWVA;
 - (c) 如 SEQ ID NO:42 所示的框架 3 (FW3) 序列 RFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAK;
和

(d) 如 SEQ ID NO:44 所示的框架 4(FW4) 序列 WPGTLTVSS ;

该轻链可变域序列包含 :

(e) 如 SEQ ID NO:47 所示的框架 1(FW1) 序列 DIQLTQSPSALPASVGDRVSITC ;

(f) 如 SEQ ID NO:49 所示的框架 2(FW2) 序列 WYRQKPGKAPNLLIY ;

(g) 如 SEQ ID NO:51 所示的框架 3(FW3) 序列 GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYC ;

和

(h) 如 SEQ ID NO:53 所示的框架 4(FW4) 序列 FGQGTKLEIKRTV。

9. 权利要求 1 的抗体,其中所述抗体具有重链可变域序列和轻链可变域序列,

该重链可变域序列包含 :

(a) 如 SEQ ID NO:61 所示的框架 1(FW1)EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLS ;

(b) 如 SEQ ID NO:40 所示的框架 2(FW2) 序列 WVRQAPGRGLEWVA ;

(c) 如 SEQ ID NO:42 所示的框架 3(FW3) 序列 RFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAK ;

和

(d) 如 SEQ ID NO:44 所示的框架 4(FW4) 序列 WPGTLTVSS ;

该轻链可变域序列包含 :

(e) 如 SEQ ID NO:48 所示的框架 1(FW1) 序列 DIQLTQSPSALPASVGDRVSITC ;

(f) 如 SEQ ID NO:50 所示的框架 2(FW2) 序列 WYRQKPGKAPNLLIY ;

(g) 如 SEQ ID NO:52 所示的框架 3(FW3) 序列 GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYC ;

和

(h) 如 SEQ ID NO:59 所示的框架 4(FW4) 序列 FGQGTKVEIKRTV。

10. 权利要求 1 的抗体,其中所述抗体包含如 SEQ ID NO:11 所示的轻链可变域序列 DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCQHYXRFPTYFGQGTKVEIKRTV,其中 X 为 I 或 M。

11. 权利要求 1 的抗体,其中所述抗体包含 :

(a) 重链可变域,其包含如 SEQ ID NO:7 所示的序列 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNGNPPYARSVQYRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSSGWPTFDSWGPGLTVTVSS,和

(b) 轻链可变域,其包含如 SEQ ID NO:11 所示的序列 DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCQHYXRFPTYFGQGTKVEIKRTV,其中 X 为 I 或 M。

12. 权利要求 1 的抗体,其中所述抗体包含 :

(a) 重链可变域,其包含如 SEQ ID NO:9 所示的序列 EVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNGNPPYARSVQYRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSSGWPTFDSWGPGLTVTVSS

(b) 轻链可变域,其包含如 SEQ ID NO:8 所示的序列 DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCQHYXRFPTYFGQGTKLEIKRTV,其中 X 为 I 或 M。

13. 权利要求 1 的抗体,其中所述抗体包含 :

(a) 重链可变域,其包含如 SEQ ID NO:9 所示的序列 EVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTL

SRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNGNPPYYARSVQYRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSSGWPT
FDSWGPGLTVTVSS

(b) 轻链可变域,其包含如 SEQ ID NO:10 所示的序列 DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASEN
VGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCQHYXRFPTYFGQGTKLE
IKRA,其中 X 为 I 或 M。

14. 权利要求 1 的抗体,其中所述抗体包含:

(a) 重链可变域,其包含如 SEQ ID NO:9 所示的序列 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTL
SRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNGNPPYYARSVQYRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSSGWPT
FDSWGPGLTVTVSS 和

(b) 轻链可变域,其包含如 SEQ ID NO:11 所示的序列 DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASEN
VGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCQHYXRFPTYFGQGTKVE
IKRTV,其中 X 为 I 或 M。

15. 权利要求 1 的抗体,其中所述抗体包含:

(a) 重链可变域,其包含如 SEQ ID NO:7 所示的序列 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTL
SRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNGNPPYYARSVQYRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSSGWPT
FDSWGPGLTVTVSS 和

(b) 轻链可变域,其包含如 SEQ ID NO:8 所示的序列 DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASEN
GDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCQHYXRFPTYFGQGTKLEI
KRTV,其中 X 为 I 或 M。

16. 权利要求 1 的抗体,其中所述抗体包含:

(a) 重链可变域,其包含如 SEQ ID NO:7 所示的序列 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTL
SRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNGNPPYYARSVQYRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSSGWPT
FDSWGPGLTVTVSS 和

(b) 轻链可变域,其包含如 SEQ ID NO:10 所示的序列 DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASEN
VGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCQHYXRFPTYFGQGTKLE
IKRA,其中 X 为 I 或 M。

17. 权利要求 1 的抗体,其中所述抗体包含:

(a) 重链可变域,其包含如 SEQ ID NO:62 所示的序列 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT
LSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINSGNPPYYARSVQYRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSSGWPT
TFDSWGPGLTVTVSS ;和

(b) 轻链可变域,其包含如 SEQ ID NO:11 所示的序列 DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASEN
VGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCQH YMRFPYTFGQGTKVE
IKRTV。

18. 权利要求 17 的抗体,其进一步包含重链恒定域,该重链恒定域包含如 SEQ ID
NO:63 所示的序列 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP。

19. 权利要求 17 的抗体,其进一步包含轻链恒定域,该轻链恒定域包含如 SEQ ID
NO:64 所示的序列 AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC。

20. 权利要求 17 的抗体,其进一步包含:

(a) 重链恒定域,该重链恒定域包含如 SEQ ID NO:63 所示的序列 ASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTTSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCP ;和

(b) 轻链恒定域,该轻链恒定域包含如 SEQ ID NO:64 所示的序列 AAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVCLLNFPYFPAKQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNREGEC。

21. 权利要求 17 的抗体,其进一步包含:

(a) 重链恒定域,该重链恒定域包含如 SEQ ID NO:63 所示的序列 ASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTTSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCP ;和

(b) 轻链恒定域,该轻链恒定域包含如 SEQ ID NO:65 所示的序列 AAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVCLLNFPYFPAKQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNREGEC。

22. 权利要求 17 的抗体,其进一步包含:

(a) 重链恒定域,该重链恒定域包含如 SEQ ID NO:66 所示的序列 CSTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTTSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCP ;和

(b) 轻链恒定域,该轻链恒定域包含如 SEQ ID NO:65 所示的序列 AAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVCLLNFPYFPAKQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNREGEC。

23. 权利要求 17 的抗体,其进一步包含:

(a) 重链恒定域,该重链恒定域包含如 SEQ ID NO:66 所示的序列 CSTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTTSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCP ;和

(b) 轻链恒定域,该轻链恒定域包含如 SEQ ID NO:64 所示的序列 AAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVCLLNFPYFPAKQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNREGEC。

24. 权利要求 1-23 任一项的抗体,其中所述抗体是偶联至细胞毒剂的。

25. 权利要求 24 的抗体,其中所述细胞毒剂为抗生素。

26. 一种分离的抗体,其包含:

(a) 包含序列 SEQ ID NO:55 的重链,和

(b) 包含序列 SEQ ID NO:57 的轻链。

27. 一种分离的抗体,其包含:

(a) 包含序列 SEQ ID NO:56 的重链,和

(b) 包含序列 SEQ ID NO:58 的轻链。

28. 依照权利要求 26 的抗体,其中重链第 53 位处的天冬酰胺已被另一种氨基酸替换,其中氨基酸编号方式依照 Kabat (1991)。

29. 依照权利要求 28 的抗体,其中所述第 53 位处的天冬酰胺已被丝氨酸替换,其中重

链第 114 位处的丙氨酸用半胱氨酸替换,且其中重链第 222 位处的精氨酸用赖氨酸替换,其中氨基酸编号方式依照 Kabat(1991)。

30. 依照权利要求 26 的抗体,其中轻链第 205 位处的缬氨酸用半胱氨酸替换,轻链第 110 位处的丙氨酸用缬氨酸替换,且轻链第 104 位处的亮氨酸用缬氨酸替换,其中氨基酸编号方式依照 Kabat(1991)。

31. 一种组合物,其包含权利要求 1-30 任一项的抗体的功能性部分,其中所述抗体的功能性部分选自下组:单域抗体,单链抗体,纳米抗体,unibody,单链可变片段(scFv),Fab 片段和 F(ab')₂片段。

32. 权利要求 1 的抗体,其中所述抗体结合革兰氏阳性细菌,其中所述革兰氏阳性细菌为葡萄球菌属物种。

33. 权利要求 32 的抗体,其中所述葡萄球菌属物种为金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)、表皮葡萄球菌(*S. epidermidis*)、山羊葡萄球菌(*S. caprae*)、腐生葡萄球菌(*S. saprophyticus*)、头状葡萄球菌(*S. capitis*)或甲氧西林抗性金黄色葡萄球菌(MRSA)。

34. 权利要求 1-23 或 25-30 中任一项的抗体,其中所述抗体是重组生成的。

35. 一种分离的、合成的或重组的核酸,其编码依照权利要求 1-30 任一项的抗体。

36. 一种分离的、合成的或重组的核酸,其编码重链 CDR1、CDR2 或 CDR3 或轻链 CDR1、CDR2 或 CDR3,其中所述核酸选自下组:如 SEQ ID NO:12 所示的重链 CDR1 序列 cgctttgccatgagc,如 SEQ ID NO:13 所示的重链 CDR2 序列 tcgatcaataatgggaataacccatact acgcacggctcggtacaatac,如 SEQ ID NO:14 所示的重链 CDR3 序列 gatcaccctagtagtggtggcc cacctttgactcc,如 SEQ ID NO:15 所示的轻链 CDR1 序列 cgggccagtgaaaacgttggtgactggtt ggcc,如 SEQ ID NO:16 所示的轻链 CDR2 序列 aagacatctattctagaaagt 和如 SEQ ID NO:17 所示的轻链 CDR3 序列 caacactatatacgtttcccgtagct。

37. 一种分离的细胞,其包含权利要求 35 的核酸。

38. 一种分离的细胞,其包含权利要求 36 的核酸。

39. 依照权利要求 1-23、25-30 或 35-36 任一项的抗体或核酸用于制备药物和/或预防剂的用途,该药物和/或预防剂用于治疗 and/或预防葡萄球菌相关病症。

40. 依照权利要求 24 的抗体用于制备药物和/或预防剂的用途,该药物和/或预防剂用于治疗 and/或预防葡萄球菌相关病症。

41. 一种药物组合物,其包含依照权利要求 1-23、25-30 或 35-36 任一项的抗体或核酸和药学可接受载体、稀释剂或赋形剂。

42. 一种药物组合物,其包含依照权利要求 24 的抗体和药学可接受载体、稀释剂或赋形剂。

43. 权利要求 24 的抗体,所述抗体结合革兰氏阳性细菌,其中所述革兰氏阳性细菌为葡萄球菌属物种。

44. 权利要求 43 的抗体,其中所述葡萄球菌属物种为金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)、表皮葡萄球菌(*S. epidermidis*)、山羊葡萄球菌(*S. caprae*)、腐生葡萄球菌(*S. saprophyticus*)、头状葡萄球菌(*S. capitis*)或甲氧西林抗性金黄色葡萄球菌(MRSA)。

45. 一种分离的或重组的抗体生成细胞,其能够生成依照权利要求 1-30 任一项的抗体。

46. 一种用于生成依照权利要求 1-30 任一项的抗体的方法,包括提供具有依照权利要求 35-36 任一项的核酸的细胞并容许所述细胞翻译所述核酸,由此生成所述抗体。

47. 依照权利要求 46 的方法,进一步包括收获、纯化和 / 或分离所述抗体。

48. 依照权利要求 1-30 或 35-36 任一项的抗体或核酸在制备用于诊断葡萄球菌感染的试剂中的用途。

49. 依照权利要求 1-30 或 35-36 任一项的抗体或核酸在制备用于检测金黄色葡萄球菌和 / 或表皮葡萄球菌的试剂中的用途。

50. 依照权利要求 1-30 任一项的抗体,其用于诊断葡萄球菌感染。

51. 一种使用依照权利要求 1-30 任一项的抗体自溶液分离金黄色葡萄球菌和 / 或表皮葡萄球菌细菌的方法。

革兰氏阳性细菌特异性结合化合物

[0001] 本发明涉及生物学、免疫学和医学领域。

[0002] 革兰氏阳性微生物引起多数系统感染。这些革兰氏阳性病原体的一个重要成员是金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*)。约 20% 的群体是金黄色葡萄球菌的长期携带者。金黄色葡萄球菌能引起一系列病,从局部的皮肤感染,诸如丘疹、脓疱病(也可由酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 引起)、疖、蜂窝织炎、毛囊炎、疔疮、痈、皮肤烫伤综合征和脓肿,到危及生命的疾病,诸如肺炎、脑膜炎、骨髓炎、心内膜炎、中毒性休克综合征 (TSS)、和败血症。金黄色葡萄球菌能够感染所有种类的器官和组织。金黄色葡萄球菌感染发生于免疫胜任的以及免疫受损的人。美国重症监护室中约 50% 的感染是由这种病原体引起的。美国每年报告 300,000 例金黄色葡萄球菌感染,导致 12,000 例死亡 (Moran et al. NEMJ 355,666-674(2006))。

[0003] 一个主要问题是金黄色葡萄球菌越来越强的抗生素抗性。甲氧西林抗性金黄色葡萄球菌 (MRSA) 出现于二十世纪六十年代。它最初是在医疗环境中鉴定到的。然而,MRSA 表现为存在于从未住院的社会中的人。MRSA 的治疗是困难且昂贵的,原因在于 MRSA 对抗生素的有限敏感性。然而,可用的抗生素备选很少。常常使用万古霉素来治疗青霉素抗性 MRSA。美国专利 6,939,543 记载一种针对脂磷壁酸 (LTA) 的鼠抗体,其能够结合金黄色葡萄球菌。基于这种鼠抗体,生成了一种重组嵌合小鼠 / 人抗体,其含有人重链和轻链恒定域。然而,此类嵌合小鼠 / 人抗体具有存在鼠序列的缺点,这涉及施用于人时严重副作用的发现。

[0004] 本发明的一个目标是提供用于抵抗和 / 或预防革兰氏阳性细菌相关疾病的手段和方法。本发明的又一个目标是提供备选的和 / 或改良的针对各种革兰氏阳性细菌,优选葡萄球菌属物种,更优选的 MRSA 的结合化合物。本发明的又一个目标是提供针对各种革兰氏阳性细菌,优选葡萄球菌属物种,更优选 MRSA 的人结合化合物。

[0005] 本发明提供能够特异性结合处于其天然背景中的葡萄球菌属物种的抗体、其功能性部分或免疫球蛋白链或其功能性等同物。因此,它们可用于抵抗和 / 或预防和 / 或诊断与葡萄球菌属物种的存在有关的病症。优选地,抵抗金黄色葡萄球菌。在一个特别优选的实施方案中,抵抗 MRSA。抵抗的另一种优选葡萄球菌属物种是表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*, *S. epidermidis*)。

[0006] 表皮葡萄球菌通常是非致病性的,但是免疫系统受损的患者常常有风险发生感染。感染常常是医院和社区获得的,但是它们对住院患者更加构成威胁。对表皮葡萄球菌感染最易感的人是静脉内药物使用者、新生儿、老年人、和使用导管或其它人工矫正器的人。感染与血管内装置(心瓣膜假体、分流器、等)有关,但是也常常发生于关节假体、导管、和大伤口。症状包括发热、头痛、疲劳、食欲缺乏和呼吸困难。

[0007] 在一个优选的实施方案中,本发明提供分离的或重组的能够特异性结合葡萄球菌属物种的人抗体、其功能性部分或免疫球蛋白链或其功能性等同物。依照本发明的人抗体和功能性部分能够结合处于其天然背景中的葡萄球菌属物种,使得在施用所述抗体、其功能性部分或免疫球蛋白链或其功能性等同物时抵抗各种葡萄球菌属物种。所述人抗体,其功能性部分或免疫球蛋白链或其功能性等同物因此特别适合于治疗或预防此类葡萄球菌

属物种所致感染。与嵌合抗体相比,所述依照本发明的人抗体、其功能性部分或免疫球蛋白链或其功能性等同物更加适合于人个体的治疗和 / 或预防用途,原因在于非人序列的缺失。这显著降低不利副作用的风险。

[0008] 依照本发明的一种特别优选的抗体是称作“F1”的抗体,其具有图 1 所示重链和轻链可变域序列。如本文中使用的,术语“F1”涵盖所有 F1 抗体,例如分离的或重组生成的 F1。重组生成的 F1 在本文中也称作“rF1”。F1 的 CDR 序列对 F1 的抗原结合特性做出特别贡献,它们也描绘于图 1。抗体 F1 是完全人的,能够特异性结合葡萄球菌属物种诸如金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌,而且因此是人个体的治疗用途优选的。

[0009] 重要地,抗体 F1 能够在体内以及在体外结合完整细菌。因此进一步提供一种分离的或重组的能够特异性结合金黄色葡萄球菌和 / 或表皮葡萄球菌的人抗体或其功能性部分。另外,抗体 F1 能够结合已经在例如动物的受感染组织中生长的细菌。因此提供一种分离的结合体内生长的金黄色葡萄球菌的抗体,其中“体内生长”定义为在金黄色葡萄球菌感染期间在动物的受感染组织中生长。还提供一种分离的、重组的或合成的免疫球蛋白链或其功能性等同物,其包含对金黄色葡萄球菌和 / 或表皮葡萄球菌特异性的人免疫球蛋白可变区的至少一种 CDR 序列。

[0010] 抗体的功能性部分定义为在性质上,不必在数量上,与所述抗体具有至少一种共享特性的部分。所述功能性部分能够与所述抗体结合相同抗原,虽然不必以相同的程度。抗体的功能性部分优选包含单域抗体、单链抗体、纳米抗体、unibody、单链可变片段(scFv)、Fab 片段或 F(ab')₂ 片段。

[0011] 抗体的功能性部分也可以这样制备,即通过改变抗体,使得所得化合物的至少一种特性(优选抗原结合特性),在性质上,不必在数量上,基本相同。这以多种方式进行,例如经由保守氨基酸替代,其中一个氨基酸残基用另一种具有大体相似特性(大小、疏水性、等)的残基替代,使得总体功能很可能没有受到严重影响。

[0012] 如技术人员公知的,抗体的重链是构成免疫球蛋白分子的两类链中较大的。重链包含多个恒定域和一个可变域,该可变域涉及抗原结合。抗体的轻链是构成免疫球蛋白分子的两类链中较小的。轻链包含一个恒定域和一个可变域。该可变域与重链的可变域一起参与抗原结合。

[0013] 互补决定区(CDR)是重链可变域和轻链可变域中存在的高变区。抗体的重链和所连接的轻链的 CDR 一起形成抗原结合位点。

[0014] 免疫球蛋白链的功能性等同物在本文中定义为包含免疫球蛋白链的至少一种 CDR 序列的人造结合化合物。

[0015] 由于本发明认识到图 1 所示 CDR 序列提供期望结合特征,因此技术人员完全能够生成包含至少一种改变的 CDR 序列的变体。例如,应用保守氨基酸替代。也可能改变图 1 所示至少一种 CDR 序列以生成与 F1 相比具有至少一种改变的特性的变异抗体或其功能性部分。优选地,提供如下抗体或功能性部分,其包含与图 1 所示 CDR 序列至少 70% 相同的 CDR 序列,使得 F1 的有利结合特征至少部分维持或甚至改进。优选改变图 1 所示 CDR 序列,使得所得抗体或功能性部分包含至少一种与 F1 相比改良的特性,诸如例如改良的结合亲和力、选择性和 / 或稳定性。包含与图 1 所示 CDR 序列至少 70% 相同的氨基酸序列的变异抗体或其功能性部分因此也在本发明的范围内。本领域中有多种方法可用于改变氨基酸序列。

例如,人工合成具有期望 CDR 序列的重链或轻链序列。优选地,突变编码 CDR 序列的核酸序列,例如使用随机或定点诱变。

[0016] 在一个实施方案中,本发明因此提供一种抗体或其功能性部分或免疫球蛋白链或其功能性等同物,其包含:

[0017] - 重链 CDR1 序列,其包含与序列 RFAMS (SEQ ID NO :1) 具有至少 70% 序列同一性的序列,和 / 或

[0018] - 重链 CDR2 序列,其包含与序列 SINNGNNPYARSVQY (SEQ ID NO :2) 具有至少 70% 序列同一性的序列,和 / 或

[0019] - 重链 CDR3 序列,其包含与序列 DHPSSGWPTFDS (SEQ ID NO :3) 具有至少 70% 序列同一性的序列。

[0020] 进一步提供一种抗体或其功能性部分或免疫球蛋白链或其功能性等同物,其包含:

[0021] - 轻链 CDR1 序列,其包含与序列 RASENVGDWLA (SEQ ID NO :4) 具有至少 70% 序列同一性的序列,和 / 或

[0022] - 轻链 CDR2 序列,其包含与序列 KTSILES (SEQ ID NO :5) 具有至少 70% 序列同一性的序列,和 / 或

[0023] - 轻链 CDR3 序列,其包含与序列 QHYXRFPYT (SEQ ID NO :6) 具有至少 70% 序列同一性的序列,其中 X 为 I 或 M。

[0024] 上文所述 CDR 序列是抗体 F1 ;VHIgHV323 和 VLIgKV15,及其变体的 CDR 序列。包含与 F1CDR 具有至少 70% 序列同一性 CDR 序列的结合化合物特别适合于抵抗和 / 或预防金黄色葡萄球菌和 / 或表皮葡萄球菌所致感染 (的影响)。发现了包含 VHIgHV323 和 VLIgKV15 的一种 F1 变体 (其中轻链的轻链 CDR3 中的异亮氨酸改成甲硫氨酸) 仍然能够特异性结合葡萄球菌属物种,诸如金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌。

[0025] 优选地,依照本发明的结合化合物包含与图 1 所示至少一种 CDR 序列至少 75%、更优选至少 80%、更优选至少 85%、更优选至少 86%、更优选至少 87%、更优选至少 88%、更优选至少 89%、更优选至少 90% 相同的 CDR 序列。最优选地,依照本发明的结合化合物包含与图 1 所示至少一种 CDR 序列至少 91%、更优选至少 92%、更优选至少 93%、更优选至少 94%、更优选至少 95% 相同的 CDR 序列。上文所述特别优选的抗体 F1 包含由图 1 所示 CDR 序列组成的 CDR 序列。依照本发明的一个特别优选的实施方案如此提供一种分离的、合成的或重组的抗体或其功能性等同物,其能够特异性结合金黄色葡萄球菌和 / 或表皮葡萄球菌且其包含:

[0026] - 重链 CDR1 序列,其包含序列 RFAMS (SEQ ID NO :1),和 / 或

[0027] - 重链 CDR2 序列,其包含序列 SINNGNNPYARSVQY (SEQ ID NO :2),和 / 或

[0028] - 重链 CDR3 序列,其包含序列 DHPSSGWPTFDS (SEQ ID NO :3),和 / 或

[0029] - 轻链 CDR1 序列,其包含序列 RASENVGDWLA (SEQ ID NO :4),和 / 或

[0030] - 轻链 CDR2 序列,其包含序列 KTSILES (SEQ ID NO :5),和 / 或

[0031] - 轻链 CDR3 序列,其包含序列 QHYXRFPYT,其中 X 为 I 或 M (SEQ ID NO :6)。

[0032] 在一个实施方案中,提供如下结合化合物,其包含图 1 所示重链 CDR1 和 CDR2 序列和轻链 CDR1 和 CDR2 序列,或与其至少 70%、优选至少 75%、更优选至少 80%、更优选至少

81%、更优选至少 82%、更优选至少 83%、更优选至少 84%、更优选至少 85% 相同的序列。因此进一步提供一种分离的、合成的或重组的抗体或其功能性部分或免疫球蛋白链或其功能性等同物,其包含重链 CDR1 序列(其包含与序列 RFAMS(SEQ ID NO :1) 至少 70% 相同的序列)和重链 CDR2 序列(其包含与序列 SINNGNNPYARSVQY(SEQ ID NO :2) 至少 70% 相同的序列)和轻链 CDR1 序列(其包含与序列 RASENVGDWLA(SEQ ID NO :4) 至少 70% 相同的序列)和轻链 CDR2 序列(其包含与序列 KTSILES(SEQ ID NO :5) 至少 70% 相同的序列)。所述结合化合物优选包含与上文所述重链 CDR 序列和轻链 CDR 序列至少 75%、更优选至少 80%、更优选至少 85%、更优选至少 86%、更优选至少 87%、更优选至少 88%、更优选至少 89%、更优选至少 90%、更优选至少 91%、更优选至少 92%、更优选至少 93%、更优选至少 94%、最优选至少 95% 相同的 CDR 序列。优选地,所述结合化合物还包含重链 CDR3 序列(其包含与序列 DHPSSGWPTFDS(SEQ ID NO :3) 至少 70% 相同的序列)和 / 或轻链 CDR3 序列(其包含与序列 QHYXRFPTY 至少 70% 相同的序列,其中 X 为 I 或 M(SEQ ID NO :6))。还提供包含上文所述重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列以及上文所述轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列的结合化合物。

[0033] 由于已通过本发明提供能够特异性结合葡萄球菌属物种的人抗体,因此生成包含对葡萄球菌属物种特异性的人免疫球蛋白可变域的至少一种 CDR 序列的免疫球蛋白链或其功能性等同物变成可能。如此进一步提供一种分离的、重组的或合成的免疫球蛋白链或其功能性等同物,其包含对葡萄球菌属物种特异性的人免疫球蛋白可变区的至少一种 CDR 序列。在一个优选的实施方案中,提供人抗体。任选地,优化所述至少一种人 CDR 序列或至少一种框架区中的至少一种序列,优选为了改进结合效率或稳定性。这例如通过诱变实验进行,其后优选测试所得化合物的稳定性和 / 或结合效率并选择改良的结合化合物。

[0034] 在优化 CDR 序列以改进结合效率或稳定性之外,优化至少一种框架区中的至少一种序列常常是有利的。这优选为了改进结合效率或稳定性进行。框架序列例如通过突变编码此类框架序列的核酸分子,其后优选测试所得抗体或功能性部分的特征来优化。这样,可能获得改良的抗体或功能性部分。在一个优选的实施方案中,将人种系序列用于依照本发明的抗体或其功能性部分或免疫球蛋白链或功能性等同物中的框架区。种系序列的使用优选使所述抗体、免疫球蛋白链或功能性等同物或部分的免疫原性风险降至最低,因为这些序列不太可能含有如下体细胞改变,其对衍生框架区的个体是独特的,且在应用于另一人个体时可引起免疫原性应答。

[0035] 还提供包含与图 1 所示重链序列具有至少 70% 序列同一性的重链氨基酸序列的抗体或其功能性部分或免疫球蛋白链或其功能性等同物。此类重链序列提供期望结合特性,如抗体 F1 证明的。此外,与图 1 所示轻链序列具有至少 70% 序列同一性的轻链氨基酸序列,和其中 CDR3 中的异亮氨酸改成甲硫氨酸的轻链序列也提供期望结合特性,如抗体 F1 和包含所述改变的一种抗体 F1 变体证明的。因此进一步提供依照本发明的抗体或其功能性部分或免疫球蛋白链或功能性等同物,其具有重链序列和 / 或具有轻链序列,该重链序列包含与序列 EVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRLGWASINNGNNPYARSVQYRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSSGWPTFDSWGPGLVTVSS(SEQ ID NO :7) 具有至少 70% 序列同一性的序列,该轻链序列与序列 DIQLTQSPSALPASVGDVRSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCQHYXRFPTYFGQGKLEIKRTV 具有至

少 70% 序列同一性, 其中 X 为 I 或 M (SEQ ID NO :8)。

[0036] 在上文所述变体 (其中轻链 CDR3 中的异亮氨酸改成甲硫氨酸) 之外, 已开发 F1 抗体的数种变体。这些变体能够结合葡萄球菌属物种。此类抗体变体的例子包括依照本发明的抗体或功能性部分或免疫球蛋白链或功能性等同物, 其具有重链序列和轻链序列, 该重链序列包含序列 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNGNNPYAR SVQYRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSSGWPTFDSWGPGLTVTVSS (SEQ ID NO :9), 和 / 或序列 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNGNNPYARSVQYRFTV SRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSSGWPTFDSWGPGLTVTVSS (SEQ ID NO :7), 该轻链序列包含序列 DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCQHYXRFPTYTFGQGGTKLEIKRA, 其中 X 为 I 或 M (SEQ ID NO :10), 和 / 或序列 DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCQHYXRFPTYTFGQGGTKVEIKRTV, 其中 X 为 I 或 M (SEQ ID NO :11), 和 / 或序列 DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCQHYXRFPTYTFGQGGTKLEIKRTV, 其中 X 为 I 或 M (SEQ ID NO :8)。

[0037] 依照本发明的抗体或功能性部分或免疫球蛋白链或其功能性等同物特异性结合包含丝氨酸 - 天冬氨酸 (SD) 重复的蛋白。SD 重复 (Sdr) 蛋白是存在于数种细菌诸如葡萄球菌属物种中的细胞表面结合蛋白。Sdr 蛋白一般包含氨基端信号序列、称作 A 区的功能域、SD 重复区、跨细胞壁区、LPXTG 基序、疏水性跨膜域、和一系列带正电荷的残基。LPXTG 基序是在苏氨酸和甘氨酸残基之间切割该基序且将该蛋白锚定至革兰氏阳性细菌细胞壁肽聚糖的转肽酶的靶物。认为 Sdr 蛋白与宿主分子相互作用。已知的 Sdr 蛋白包括金黄色葡萄球菌的 ClfA (SdrA)、ClfB (SdrB)、SdrC、SdrD 和 SdrE, 表皮葡萄球菌的 SdrF、SdrG 和 SdrH, 腐生葡萄球菌 (*S. saprophyticus*) 的 SdrI, 头状葡萄球菌 (*S. capitis*) 的 SdrX, 和山羊葡萄球菌 (*S. caprae*) 的 SdrY 和 SdrZ。

[0038] 因此, 依照本发明的一种优选的抗体或其功能性部分或免疫球蛋白链或功能性等同物特异性结合金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*)、表皮葡萄球菌 (*S. epidermidis*)、腐生葡萄球菌 (*S. saprophyticus*)、头状葡萄球菌 (*S. capitis*)、和山羊葡萄球菌 (*S. caprae*)。优选所述抗体、免疫球蛋白链或其功能性等同物或其部分结合金黄色葡萄球菌的 ClfA (SdrA)、ClfB (SdrB)、SdrC、SdrD 和 SdrE, 表皮葡萄球菌的 SdrF、SdrG 和 SdrH, 腐生葡萄球菌的 SdrI, 头状葡萄球菌的 SdrX, 和山羊葡萄球菌的 SdrY 和 SdrZ。依照本发明的抗体、免疫球蛋白链或其功能性等同物或部分的表位包含 Sdr 蛋白中的 SD 重复依赖性表位, 例如金黄色葡萄球菌 ClfA、ClfB、SdrC、SdrD 和 SdrE 中存在的 SD 重复依赖性表位。SD 重复依赖性表位在本文中定义为受到抗体 F1 识别的表位, 该表位要求存在于但不限于金黄色葡萄球菌 ClfA、ClfB、SdrC、SdrD 和 SdrE 和表皮葡萄球菌 SdrF、SdrG 和 SdrH 中的至少部分 SD 重复区的存在。在一个实施方案中, 所述表位可包含结合或连接 Sdr 蛋白的分子的至少一部分。此类分子的例子包括但不限于氨基酸、肽、蛋白质、糖和糖残基。在另一个实施方案中, 所述表位包含 SD 重复区的修饰。所述修饰包含例如但不限于糖基化、酰胺化和 / 或磷酸化。技术人员会明白这两个实施方案的组合也是可能的。

[0039] 因此, 本发明提供依照本发明的能够结合 SD 重复依赖性表位的抗体或功能性部分或免疫球蛋白链或功能性等同物。还提供能够结合金黄色葡萄球菌 ClfA、ClfB、SdrC、

SdrD 和 SdrE 的抗体或功能性部分或免疫球蛋白链或功能性等同物。进一步提供能够与依照本发明的抗体或功能性部分或免疫球蛋白链或功能性等同物竞争对葡萄球菌属物种,优选金黄色葡萄球菌和 / 或表皮葡萄球菌和 / 或腐生葡萄球菌和 / 或头状葡萄球菌和 / 或山羊葡萄球菌,更优选 MRSA 的结合的抗体或功能性部分或免疫球蛋白链或功能性等同物。

[0040] 抗体的一个缺点是它们的稳定性可降低,例如在苛刻条件下。例如,可发生脱酰胺,即除去功能性酰胺基团。脱酰胺是一种蛋白质降解途径,它可影响蛋白质的生物学功能,而且主要发生于天冬酰胺残基且较低程度发生于谷氨酰胺残基。在一个实施方案中,因此,依照本发明的抗体或其功能性部分或免疫球蛋白链或其功能性等同物的脱酰胺通过将天冬酰胺或谷氨酰胺用另一种氨基酸替换来防止。天冬酰胺优选谷氨酰胺以外的氨基酸来替换,因为脱酰胺也可发生于谷氨酰胺残基。对天冬酰胺的替换优选不实质性影响本发明的抗体对抗原的结合亲和力。在一个实施方案中,重链第 53 位(编号方式依照 Kabat, 1991) 处天冬酰胺的脱酰胺通过将所述天冬酰胺用另一种氨基酸替换来防止。通过防止第 53 位处天冬酰胺的脱酰胺,依照本发明的抗体或其功能性部分或免疫球蛋白链或其功能性等同物的稳定性优选提高。如实施例所示,尽管事实是所述天冬酰胺位于 CDR 中,但是替换所述位置处的天冬酰胺不实质性影响本发明的抗体或其功能性部分或免疫球蛋白链或其功能性等同物对抗原的结合亲和力。重链第 53 位处的天冬酰胺优选谷氨酰胺以外的氨基酸来替换,更优选所述位置处的天冬酰胺用丝氨酸来替换。因此,本发明还提供依照本发明的抗体或功能性部分或免疫球蛋白链或功能性等同物,其中天冬酰胺,优选重链第 53 位处的天冬酰胺用另一种氨基酸,优选丝氨酸来替换。

[0041] 在一个实施方案中,将依照本发明的抗体或其功能性部分或免疫球蛋白链或其功能性等同物偶联至另一种模块以形成抗体-药物偶联物。例如将依照本发明的抗体或其功能性部分或免疫球蛋白链或其功能性等同物偶联至细胞毒剂,诸如抗生素。如本文中使用的,术语“细胞毒剂”指降低或阻断细菌的功能或生长和 / 或引起对细菌的破坏的物质。优选经由硫醇基团将所述其它模块,例如细胞毒剂偶联至所述抗体或其功能性部分。因此,优选将一个或多个半胱氨酸掺入所述抗体或其功能性部分或免疫球蛋白链或其功能性等同物。半胱氨酸含有硫醇基团且因此,将一个或多个半胱氨酸掺入依照本发明的抗体或其功能性部分或将依照本发明的抗体或其功能性部分的一个或多个氨基酸用一个或多个半胱氨酸替换能够将其偶联至另一种模块。优选在不影响所述抗体或功能性等同物的折叠且不改变抗原结合或效应器功能的位置将所述一个或多个半胱氨酸引入依照本发明的抗体或其功能性等同物。因此,本发明提供依照本发明的抗体或其功能性部分或免疫球蛋白链或其功能性等同物,其中至少一个半胱氨酸以外的氨基酸已用半胱氨酸替换。优选至少两个半胱氨酸以外的氨基酸已用半胱氨酸替换。在一个优选的实施方案中,所述至少一个半胱氨酸以外的氨基酸是轻链第 15 位处的缬氨酸,和 / 或轻链第 144 位处的丙氨酸,和 / 或轻链第 168 位处的丝氨酸,和 / 或轻链第 205 位处的缬氨酸和 / 或轻链第 110 位处的缬氨酸,和 / 或重链第 84 位处的丙氨酸,和 / 或重链第 114 位处的丙氨酸,和 / 或重链第 168 位处的丙氨酸,和 / 或重链第 172 位处的丝氨酸,更优选轻链第 205 位处的缬氨酸和 / 或轻链第 110 位处的缬氨酸,和 / 或重链第 114 位处的丙氨酸(编号方式依照 Kabat, 1991)。技术人员会理解,作为替换和 / 或补充,重链和 / 或轻链的一个或多个其它氨基酸可以用半胱氨酸替换,如果该替换不影响所述抗体或功能性等同物的折叠且不改变抗原结合或效应器功能

的话。

[0042] 在国际专利申请 W02006/034488、W02008/141044、W02009/052249、W02009/012256、W02009/012268 和 W02009/099728 中,记载了用反应性半胱氨酸残基改造抗体的方法以及适合于半胱氨酸改造的氨基酸位置。

[0043] 依照本发明的抗体或功能性部分或免疫球蛋白链或功能性等同物优选包含与图 1 所示重链序列和 / 或轻链序列,或其中 CDR3 中的异亮氨酸改成甲硫氨酸的图 1 所示轻链序列至少 75%、更优选至少 80%、更优选至少 85%、更优选至少 90%、最优选至少 95% 相同的可变重链序列和 / 或可变轻链序列。同一性越高,所述结合化合物越像抗体 F1。依照本发明的抗体或功能性部分或免疫球蛋白链或功能性等同物优选包含像 F1 重链和轻链的重链以及轻链。因此进一步提供抗体或其功能性部分或免疫球蛋白链或其功能性等同物,其包含与图 1 所示重链序列和轻链序列,或其中 CDR3 中的异亮氨酸改成甲硫氨酸的图 1 所示轻链序列至少 70%、更优选至少 80%、更优选至少 85%、更优选至少 90%、最优选至少 95% 相同的重链序列和轻链序列。在一个实施方案中,提供抗体或功能性部分,其具有图 1 所示重链序列和图 1 所示轻链序列或其中 CDR3 中的异亮氨酸改成甲硫氨酸的图 1 所示轻链序列。

[0044] 一个实施方案提供抗体或其功能性部分或免疫球蛋白链或其功能性等同物,其包含重链序列和 / 或包含轻链序列,该重链序列由图 1 所示重链序列组成,该轻链序列由图 1 所示轻链序列或其中 CDR3 中的异亮氨酸改成甲硫氨酸的图 1 所示轻链序列组成。或者,正如技术人员公知的,可能生成缩短的重链或轻链序列,同时维持感兴趣的结合特性。优选地,生成此类缩短的重链或轻链,其具有与初始重链或轻链相比缩短的恒定区。优选维持可变域。例如,生成基于图 1 所示重链序列或轻链序列的 Fab 片段或 F(ab')₂ 片段或单链抗体或单链抗体或纳米抗体或 unibody 或 scFv 片段。因此还提供抗体的功能性部分,其至少包含图 1 所示序列或其中 CDR3 中的异亮氨酸改成甲硫氨酸的图 1 所示轻链序列的功能性部分。所述功能性部分具有至少 20 个氨基酸的长度且包含至少一种选自下组的序列:与图 1 所示重链 CDR1 序列至少 70% 相同的序列和与图 1 所示重链 CDR2 序列至少 70% 相同的序列和与图 1 所示重链 CDR3 序列至少 70% 相同的序列和与图 1 所示轻链 CDR1 序列至少 70% 相同的序列和与图 1 所示轻链 CDR2 序列至少 70% 相同的序列和与图 1 所示轻链 CDR3 序列或其中异亮氨酸改成甲硫氨酸的图 1 所示轻链 CDR3 序列至少 70% 相同的序列。

[0045] 本发明进一步提供一种分离的、合成的或重组的核酸序列或其功能性等同物,其具有至少 15 个核苷酸、优选至少 30 个核苷酸、更优选至少 50 个核苷酸、更优选至少 75 个核苷酸的长度,编码依照本发明的结合化合物。此类核酸例如分离自能够生成依照本发明的抗体的 B 细胞。一个优选的实施方案提供包含与图 1 所示核酸序列的至少 15 个核苷酸具有至少 70% 序列同一性的序列的核酸序列。依照本发明的核酸序列优选包含与图 1 所示核酸序列的至少 15 个核苷酸具有至少 75%、更优选至少 80%、更优选至少 85%、更优选至少 90%、最优选至少 95% 序列同一性的序列。优选地,所述图 1 所示核酸序列包含至少一种 CDR 编码序列。

[0046] 一个优选的实施方案提供一种分离的、合成的或重组的核酸序列或其功能性等同物,其具有至少 15 个核苷酸的长度,编码依照本发明的抗体或免疫球蛋白链的至少一种 CDR 序列。所述核酸序列优选编码至少一种与抗体 F1 的 CDR 区具有至少 70% 序列同一性的 CDR 序列。编码 F1CDR 区的核酸序列显示于图 1。因此进一步提供一种分离的、合成的

或重组的核酸序列或其功能性等同物,其包含与选自下组的序列具有至少 70%序列同一性的序列:cgctttgccatgagc (SEQ ID NO:12), tcgatcaataatgggaataacccatactacgcacggtcggtacaatac (SEQ ID NO:13), gatcacctagtagtggtggccacctttgactcc (SEQ ID NO:14), cgggccagtgaacggttggtgactggttgccc (SEQ ID NO:15), aagacatctattctagaaagt (SEQ ID NO:16) 和 caacactatatacgtttcccgtagact (SEQ ID NO:17)。

[0047] 所述核酸序列或其功能性等同物优选包含与任何上文所述序列具有至少 75%、更优选至少 80%、更优选至少 85%、更优选至少 90%序列同一性的序列。进一步提供核酸序列或其功能性等同物,其包含与图 1 所示核苷酸序列的至少部分具有至少 70%序列同一性的序列,所述部分具有至少 15 个核苷酸且编码至少一种 CDR 区。

[0048] 依照本发明的核酸序列或其功能性等同物优选编码与 F1CDR 区、F1 重链和 / 或 F1 轻链具有至少 70%序列同一性的区。如此,一个实施方案提供一种分离的、合成的或重组的核酸序列或其功能性等同物,其包含编码下述氨基酸序列的序列,该氨基酸序列与序列 RFAMS (SEQ ID NO:1) 具有至少 70%序列同一性,和 / 或与序列 SINNGNNPYARSVQY (SEQ ID NO:2) 具有至少 70%序列同一性,和 / 或与序列 DHPSSGWPTFDS (SEQ ID NO:3) 具有至少 70%序列同一性,和 / 或与序列 RASENVGDWLA (SEQ ID NO:4) 具有至少 70%序列同一性,和 / 或与序列 KTSILES (SEQ ID NO:5) 具有至少 70%序列同一性,和 / 或与序列 QHYXRFPTYT 具有至少 70%序列同一性,其中 X 为 I 或 M (SEQ ID NO:6),和 / 或与序列 EVQLLESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNGNNPYARSVQYRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSSGWPTFDSWGPGLTVTVSS (SEQ ID NO:7) 具有至少 70%序列同一性,和 / 或与序列 DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQHYXRFPTYTFGQGTKLEIKRTV 具有至少 70%序列同一性,其中 X 为 I 或 M (SEQ ID NO:8)。还提供核酸序列或其功能性等同物,其编码依照本发明的 F1 抗体的变体。本发明提供例如核酸序列,其编码重链序列,该重链序列包含序列 EVQLVESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNGNNPYARSVQYRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSSGWPTFDSWGPGLTVTVSS (SEQ ID NO:9),和 / 或序列 EVQLLESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNGNNPYARSVQYRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSSGWPTFDSWGPGLTVTVSS (SEQ ID NO:7),及编码轻链序列,该轻链序列包含序列 DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQHYXRFPTYTFGQGTKLEIKRA,其中 X 为 I 或 M (SEQ ID NO:10),和 / 或序列 DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQHYXRFPTYTFGQGTKLEIKRTV,其中 X 为 I 或 M (SEQ ID NO:11),和 / 或序列 DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQHYXRFPTYTFGQGTKLEIKRTV,其中 X 为 I 或 M (SEQ ID NO:8)。

[0049] 在一个实施方案中,重链第 53 位 (编号方式依照 Kabat, 1991) 处的天冬酰胺用谷氨酰胺以外的另一种氨基酸替换,以防止所述位置处天冬酰胺的脱酰胺。优选所述天冬酰胺用丝氨酸替换。

[0050] 术语“%序列同一性”在本文中定义为在比对两种序列并在必要时引入缺口以实现最大百分比同一性之后,候选氨基酸或核酸序列中与参照序列中的残基相同的残基的百分比。用于比对的方法和计算机程序是本领域公知的。

[0051] 如本文中使用的,本发明的核酸分子或核酸序列优选包含核苷酸,更优选 DNA 和 / 或 RNA 的链。在其它实施方案中,本发明的核酸分子或核酸序列包含其它种类的核酸结构,诸如例如 DNA/RNA 螺旋、肽核酸 (PNA)、锁定核酸 (LNA) 和 / 或核酶。此类其它核酸结构称作核酸序列的功能性等同物。术语“核酸序列的功能性等同物”还涵盖包含展现与天然核苷酸相同的功能的非天然核苷酸、经修饰核苷酸和 / 或非核苷酸构件块的链。

[0052] 依照本发明的核酸序列特别可用于生成对金黄色葡萄球菌和 / 或表皮葡萄球菌特异性的结合化合物。这例如通过将此类核酸序列导入细胞,使得该细胞的核酸翻译机制会生成编码的结合化合物来进行。在一个实施方案中,编码依照本发明的重和 / 或轻链的基因在所谓的生产者细胞中比对,诸如例如中国仓鼠卵巢 (CHO)、NSO (一种小鼠骨髓瘤) 或 293(T) 细胞系的细胞,它们中的一些适合于商业性抗体生产。所述生产者细胞的增殖导致能够生成依照本发明的抗体或其功能性部分的生产者细胞系。优选地,所述生产者细胞系适合于生成在人中使用的化合物。因此,所述生产者细胞系优选没有致病剂,诸如致病性微生物。最优选地,由人序列组成的结合化合物使用依照本发明的核酸序列来生成。

[0053] 因此还提供能够生成依照本发明的抗体或功能性部分或免疫球蛋白链或功能性等同物的分离的或重组的抗体生成细胞,以及用于生成依照本发明的抗体或功能性部分或免疫球蛋白链或功能性等同物的方法,包括提供具有依照本发明的核酸序列或功能性等同物的细胞并容许所述细胞翻译所述依照本发明的核酸序列或功能性等同物,由此生成所述依照本发明的抗体或功能性部分或免疫球蛋白链或功能性等同物。

[0054] 抗体生成细胞在本文中定义为能够生成和 / 或分泌抗体或其功能性部分的细胞,和 / 或能够开发成能够生成和 / 或分泌抗体或其功能性部分的细胞的细胞。依照本发明的抗体生成细胞优选是适应商业性抗体生产的生产者细胞。优选地,所述生产者细胞适合于生成在人中使用的化合物。

[0055] 依照本发明的方法优选进一步包括收获、纯化和 / 或分离所述依照本发明的抗体或功能性部分或免疫球蛋白链或功能性等同物的步骤。如此获得的依照本发明的结合化合物优选用于诊断葡萄球菌感染,分离或检测葡萄球菌属细菌,区分葡萄球菌属物种和其它革兰氏阳性细菌和对人进行治疗,任选在别的纯化、分离和 / 或其它加工步骤之后。

[0056] 依照本发明的抗体或其功能性部分或免疫球蛋白链或其功能性等同物特别适合于诊断性用途。例如,可以自个体或自怀疑感染有葡萄球菌属细菌,优选金黄色葡萄球菌和 / 或表皮葡萄球菌,更优选 MRSA 的任何其它来源获得样品,诸如组织或血液样品。随后,可以将所述样品与依照本发明的抗体或免疫球蛋白链或其功能性等同物或部分混合。所述抗体、免疫球蛋白链或功能性等同物或部分会特异性结合葡萄球菌属细菌,优选金黄色葡萄球菌和 / 或表皮葡萄球菌。可以使用本领域已知的任何方法自样品分离结合至抗体、免疫球蛋白链或功能性等同物或部分的细菌,例如但不限于使用磁珠、链霉亲和素包被珠的分离、或经由使用柱上固定化的二抗的分离。在清洗结合的细菌和抗体、免疫球蛋白链或其功能性等同物或部分之后,可以通过本领域已知的任何方法自所述抗体、免疫球蛋白链或其功能性等同物或部分洗脱细菌。例如,细菌和抗体、免疫球蛋白链或功能性等同物或部分之间的结合可通过提高盐浓度和 / 或降低或提高 pH, 和 / 或通过添加过量的表位来破坏。

[0057] 葡萄球菌属细菌,优选金黄色葡萄球菌和 / 或表皮葡萄球菌的分离可用于各种应用。例如,数种不同革兰氏阳性细菌的感染均可导致个体中交叠的症状。在此类情况中,区

分金黄色葡萄球菌和 / 或表皮葡萄球菌和其它革兰氏阳性细菌会是困难的。然后,依照本发明的抗体、免疫球蛋白链或其功能性等同物或部分可用于检测金黄色葡萄球菌和 / 或表皮葡萄球菌的存在,或用于区分金黄色葡萄球菌和 / 或表皮葡萄球菌和其它细菌。自怀疑罹患金黄色葡萄球菌和 / 或表皮葡萄球菌感染的个体的样品或自任何其它来源,诸如细菌培养物分离细菌能推动所述葡萄球菌属细菌的检测,因为分离导致所述葡萄球菌属细菌浓度升高和 / 或纯度更高。

[0058] 葡萄球菌属物种,优选金黄色葡萄球菌和 / 或表皮葡萄球菌,更优选 MRSA 的分离可例如进一步用于鉴定样品中的特定金黄色葡萄球菌和 / 或表皮葡萄球菌菌株,优选 MRSA 菌株。所述菌株的鉴定可例如通过测定细菌 DNA 的序列来实施。在此类情况中,优选首先获得分离的金黄色葡萄球菌和 / 或表皮葡萄球菌。

[0059] 在本发明的一个实施方案中,标记依照本发明的抗体、免疫球蛋白链或其功能性等同物或部分以能够检测所述抗体、免疫球蛋白链或功能性等同物或部分,例如但不限于荧光标记或放射性标记。或者,使用经过标记的二抗(其针对所述依照本发明的抗体、免疫球蛋白链或其功能性等同物或部分)来检测依照本发明的抗体或其功能性部分或免疫球蛋白链或其功能性等同物。如果检测到所述抗体、免疫球蛋白链或其功能性等同物或部分的结合,那么存在金黄色葡萄球菌和 / 或表皮葡萄球菌。

[0060] 本发明因此提供依照本发明的抗体或其功能性部分或免疫球蛋白链或其功能性等同物用于诊断葡萄球菌感染,优选金黄色葡萄球菌感染,更优选 MRSA 感染,用于检测金黄色葡萄球菌和 / 或表皮葡萄球菌,优选 MRSA,和用于区分金黄色葡萄球菌和 / 或表皮葡萄球菌,优选 MRSA 和其它革兰氏阳性细菌的用途。还提供用于诊断葡萄球菌感染,优选金黄色葡萄球菌感染,更优选 MRSA 感染的依照本发明的抗体或其功能性部分或免疫球蛋白链或其功能性等同物。

[0061] 进一步提供使用依照本发明的抗体或功能性部分或免疫球蛋白链或其功能性等同物自溶液分离金黄色葡萄球菌和 / 或表皮葡萄球菌细菌的方法。所述方法优选包括提供怀疑罹患金黄色葡萄球菌和 / 或表皮葡萄球菌,优选 MRSA 感染的个体的或来自任何其它来源,诸如细菌培养物的样品,将依照本发明的抗体或功能性部分或免疫球蛋白链或其功能性等同物添加至所述样品,在存在时容许所述依照本发明的抗体或功能性部分或免疫球蛋白链或其功能性等同物结合金黄色葡萄球菌和 / 或表皮葡萄球菌细菌,并自所述样品分离结合至依照本发明的抗体或功能性部分或免疫球蛋白链或其功能性等同物的金黄色葡萄球菌和 / 或表皮葡萄球菌细菌。

[0062] 由于已提供依照本发明的革兰氏阳性细菌特异性结合化合物和编码它们的核酸序列,包括人结合化合物,因此改良的治疗性应用变得可用。通过依照本发明的结合化合物来抵抗革兰氏阳性细菌诸如金黄色葡萄球菌和 / 或表皮葡萄球菌。依照本发明的结合化合物因此特别适合于用作药物或预防剂。优选地,使用由人序列的组成或具有至多 5% 的非人序列的结合化合物,以降低治疗人个体时不利副作用的机会。本文中因此还提供用作药物和 / 或预防剂的依照本发明的抗体或功能性部分或免疫球蛋白链或其功能性等同物或核酸序列或其功能性等同物。在施用依照本发明的核酸或功能性等同物时,它会原位翻译成依照本发明的结合化合物。在一个特别优选的实施方案中,所述抗体包含抗体 F1 或其功能性部分。所述药物或预防剂优选用于抵抗或至少部分预防金黄色葡萄球菌和 / 或表皮葡

萄球菌所致感染或用于抵抗或至少部分预防金黄色葡萄球菌和 / 或表皮葡萄球菌所致感染的不利效应。因此进一步提供用作药物和 / 或预防剂的依照本发明的抗体或功能性部分或免疫球蛋白链或其功能性等同物或核酸序列或其功能性等同物, 该药物和 / 或预防剂用于至少部分治疗和 / 或预防与金黄色葡萄球菌和 / 或表皮葡萄球菌有关的状况。此类状况的非限制性例子是皮肤感染、丘疹、脓疱病、疖、蜂窝织炎、毛囊炎、疔疮、痈、皮肤烫伤综合征、脓肿、肺炎、脑膜炎、骨髓炎、心内膜炎、中毒性休克综合征和败血症。优选地, 抵抗或至少部分预防金黄色葡萄球菌感染。最优选地, 抵抗、减轻和 / 或至少部分预防 MRSA 相关状况。因此还提供依照本发明的抗体或功能性部分或免疫球蛋白链或其功能性等同物或核酸序列或其功能性等同物用于制备药物和 / 或预防剂的用途, 该药物和 / 或预防剂用于至少部分治疗和 / 或预防金黄色葡萄球菌和 / 或表皮葡萄球菌, 以及用于至少部分治疗或预防与金黄色葡萄球菌和 / 或表皮葡萄球菌有关的状况的方法, 该方法包括对有所需要的个体施用治疗有效量的依照本发明的抗体或功能性部分或免疫球蛋白链或功能性等同物, 优选在所述个体已诊断为受到金黄色葡萄球菌和 / 或表皮葡萄球菌感染之后。所述状况优选包含上文所列金黄色葡萄球菌相关状况中的至少一种, 最优选 MRSA 相关状况。

[0063] 所述抗体优选包含抗体 F1 或其功能性部分。

[0064] 为了抵抗革兰氏阳性细菌, 优选在感染发生之前将依照本发明的结合化合物施用于个体。或者, 在个体早就受到感染时施用依照本发明的结合化合物。优选将所述结合化合物施用于并发症风险升高的个体, 诸如例如住院的个体和 / 或免疫力受损的个体。老年人也具有升高的患细菌性病症风险。优选经一次或多次注射来施用依照本发明的结合化合物。基于存在严格方案要求的临床试验中临床上的越来越多的剂量研究来设计上文所述治疗性应用中要使用的依照本发明的结合化合物的剂量范围。典型剂量介于 0.1 和 10mg 每 kg 体重之间。对于治疗性应用, 通常将依照本发明的结合化合物与药学可接受载体、稀释剂和 / 或赋形剂组合。合适载体的例子例如包含匙孔螯血蓝蛋白 (KLH)、血清清蛋白 (例如 BSA 或 RSA) 和卵清蛋白。在一个优选的实施方案中, 所述合适载体包含溶液, 像例如盐水。

[0065] 在还有另一个实施方案中, 使用编码依照本发明的结合化合物的核酸。正如早就描述的, 在施用此类核酸时, 结合化合物由宿主的机制来生成。生成的结合化合物能够预防和 / 或抵抗革兰氏阳性细菌感染和 / 或此类感染的不利效应。因此, 本文中还提供用作药物和 / 或预防剂的依照本发明的核酸序列或功能性等同物。所述核酸优选用于抵抗金黄色葡萄球菌和 / 或表皮葡萄球菌, 更优选金黄色葡萄球菌, 最优选 MRSA。因此进一步提供依照本发明的核酸序列或功能性等同物用于制备药物和 / 或预防剂的用途, 该药物和 / 或预防剂用于至少部分治疗和 / 或预防革兰氏阳性细菌相关状况。所述革兰氏阳性细菌相关状况优选包含金黄色葡萄球菌或表皮葡萄球菌所致感染, 更优选金黄色葡萄球菌感染, 最优选 MRSA 感染。

[0066] 进一步提供药物组合物, 其包含依照本发明的抗体或功能性部分或免疫球蛋白链或其功能性等同物或核酸序列或其功能性等同物和药学可接受载体、稀释剂或赋形剂。所述药物组合物优选适合于人使用。

[0067] 在下面的实施例中进一步解释本发明。这些实施例不限制本发明的范围, 但是仅仅用来澄清本发明。

[0068] 通过述及将详述中提到的所有专利文件和其它出版物收入本文用于所有目的。

实施例

[0069] 实施例 1

[0070] 方法

[0071] B 细胞分离

[0072] 通过 Ficol1 分离和 MACS 微珠的 CD4/CD8 负选择,如制造商 (Miltenyi Biotech) 所述,自成人的新鲜血液获得 B 细胞。为了获得记忆 B 细胞,在 FACSaria(Becton Dickinson) 上对细胞分选 CD19+CD3-CD27+IgD-IgA-。这些组织的使用得到了科研医学伦理委员会的批准且视知情同意而定。基于携带医院获得的 MRSA 菌株(其具有基因型簇 109 和 16)来选择捐献者。

[0073] 细胞培养

[0074] 在稳定表达 CD40L(CD40L-L 细胞, 10^5 个细胞 /ml) 和重组的小鼠 IL-21(25ng/ml, R&D systems) 的 γ -照射 (50Gy) 的小鼠 L 细胞成纤维细胞上共培养在含有 IMDM(Gibco)、8% FBS(HyClone) 和青霉素 / 链霉素 (Roche) 的标准培养基中维持的 B 细胞。rhIL-4(R&D) 以 50ng/ml 使用。通过 PCR 例行测试细胞,并发现支原体和 EBV 的存在为阴性(数据未显示)。

[0075] 通过 FACS 细胞分选来纯化大批经过转导的对 NGFR 和 GFP 为双重阳性的人记忆 B 细胞,并以 500 个细胞每孔的细胞密度在 96 孔板中培养。在 ELISA 中使用 Newman 和 SH1000 菌株的细菌裂解物测试培养物上清液。以 10 个细胞 / 孔的细胞密度在 96 孔板中亚克隆阳性培养物,并再次通过 ELISA 来测试。随后,以 1 个细胞每孔接种阳性培养物,并再次通过 ELISA 来测试针对金黄色葡萄球菌菌株 Newman 和 SH1000 的反应性。

[0076] 逆转录病毒转导

[0077] BCL6 逆转录病毒构建物之前已有记载 (Shvarts A. et al. Genes Dev 16, 681-686(2002))。编码人 Bcl-xL 的 cDNA 由 Stanley Korsmeyer 博士馈赠。将 BCL6 和 Bcl-xL 分开克隆入 BCL6-NGFR 和 BclxL-GFP 构建物。将这些构建物转染入 LZRS 逆转录病毒包装细胞, phoenix, 如之前所述 (Jaleco A. C. et al. Blood 94, 2637-2646(1999); Scheeren F. A. et al. Nat Immunol 6, 303-313(2005))。在 CD40L-L 细胞上在 rmIL-21 存在下激活 36 小时之后,用含有 BCL6 和 Bcl-xL 的逆转录病毒双重转导记忆 B 细胞,如之前所述 (Diehl S. A. et al. J Immunol 180, 4805-4815(2008); Kwakkenbos M. et al. Nat Med in press(2009))。在具有 rmIL-21 的 CD40L-L 细胞上维持经过转导的细胞。

[0078] ELISA

[0079] 为了测定抗体内容,将 ELISA 板用 PBS 中的 $5 \mu\text{g/ml}$ 抗人 IgG(Jackson ImmunoResearch Laboratories) 于 37°C 包被 1 小时或于 4°C 包被过夜,并在 ELISA 清洗缓冲液 (PBS, 0.5% Tween-20) 中清洗。使用 PBS 中的 4% 牛乳作为封闭剂,之后添加细胞培养物上清液的连续稀释液和偶联有酶的检测抗体(偶联有 HRP 的抗 IgG(Jackson) 1 : 2500 稀释)。使用 TMB 底物 / 终止溶液 (Biosource) 来进行 ELISA 显色。

[0080] 为了筛选目的,我们使用来自 Newman 和 SH1000 菌株的裂解物。二者都在 PBS 中制备,而且以 $5-10 \mu\text{g/ml}$ 直接包被,之后测试 B 细胞培养物上清液或 1 : 2 稀释。

[0081] 为了探索人 IgG1 克隆 F1 的抗原特异性,开发了 LTA 检测 ELISA。将纯化的来自金

黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*, *B. subtilis*)、粪链球菌 (*S. faecalis*) 和酿脓链球菌 (Sigma) 的 LTA 制备物添加至经多克隆 IgG 纯化的小鼠抗 LTA(1/200 储液 1mg ml^{-1} , QED Bioscience) 包被的 ELISA 板, 之后添加二抗。

[0082] 另外, 我们在直接 ELISA 中测试了自由 W. Fischer (Institut für Biochemie, Univ of Erlangen, Germany) 开发且由 B. Appelmeik (VU, Amsterdam, Netherlands) 馈赠的文库衍生的数份 LTA 制备物 (更多详情参见 (Keller R. et al. *Infect Immun* 60, 3664-3672(1992), Polotsky V. Y. et al. *Infection and Immunity* 64, 380-383(1996) 和 Greenberg J. W et al. *Infection and Immunity* 64, 3318-3325(1996)), 而且综述参见 (Weidenmaier C. et al. *Nat Rev Microbiol* 6, 276-287(2008)))。以 $1\mu\text{g ml}^{-1}$ 包被 LTA 制备物, 之后添加 rF1 ($10\mu\text{g ml}^{-1}$) 或对照抗体 (杂交瘤上清液的 1 : 5 稀释液), 并进一步用经过偶联的抗人或小鼠抗体来检测。纯化的 LTA 制备物的组包括: 枯草芽孢杆菌, 金黄色葡萄球菌, 乳酸乳球菌 (*L. lactis*), 格氏乳球菌 (*L. garvieae*), 双歧杆菌 (*B. bifidum*), 藤黄微球菌 (*M. luteus*), 干酪乳杆菌 (*L. casei*), 肠膜明串珠菌 (*L. mesenteroides*), 地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*), 威氏李斯特氏菌 (*L. welshimeri*), 小肠肠球菌 (*E. hirae*), 棉子糖乳球菌 (*L. raffinolactis*), 变异链球菌 (*S. mutans*), 肺炎链球菌 (*S. pneumoniae*)。数种变体含有或缺乏丙氨酸残基和 / 或脂锚 (此处未描绘)。

[0083] F1 抗体对细菌培养物的结合

[0084] 使用 Newman 金黄色葡萄球菌和肺炎肺炎链球菌菌株 (血清型 3)。在 TSH50ml 中培养 Newman 过夜, 然后 1ml 在 100ml 中重悬浮 2-2.5 小时至 OD : 1 并收集细菌。在混有酵母培养基的 Todd Hewitt 培养基中培养肺炎链球菌。之后, 将细菌与 F1 抗体、对照 IgG (D25, 一种人抗 RSV 抗体) 或仅与二抗 (仅 IgG-PE) 一起温育, 用 100% 总小鼠血清预处理细胞以防止背景染色。清洗之后, 添加二抗 (IgG-PE)。抗体在冰上孵育 20 分钟。

[0085] F1 序列测定和表达克隆

[0086] 我们使用 Trizol (Invitrogen) 分离总 RNA, 使用 superscript RT 生成 cDNA, 实施 PCR 并将重链和轻链可变区克隆入 pCR2. 1TA 克隆载体 (Invitrogen)。为了排除逆转录酶或 DNA 聚合酶诱导的突变, 我们实施数个独立的克隆实验。为了生成重组的 F1 单抗, 我们以人 IgG1 和 κ 恒定区的读码框将 F1 重链和轻链可变区克隆入基于 pcDNA3. 1 (Invitrogen) 的载体并瞬时转染 293T 细胞。我们用蛋白 A 自培养物上清液纯化重组的 F1。

[0087] 结果

[0088] F1 克隆的生成

[0089] 自 3 名 MRSA 测试为阳性但没有病的受试者收集 50-60ml 肝素血并在 ficoll 纯化步骤之后分离外周 B 细胞。给来自数个 B 细胞群的 B 细胞双重转导含有 BCL6-NGFR 和 Bcl-xL-GFP 的逆转录病毒 (Diehl et al 和 Kwakkenbos et al)。自 IgG、CD27 阳性群, 多克隆微型培养 B 细胞培养在 96 孔板中以 500 个细胞 / 孔的细胞密度开始。收集这些微型培养物的上清液并在 ELISA 中用于筛选金黄色葡萄球菌特异性 IgG 抗体的存在 (在这些 ELISA 中, 包被是两种金黄色葡萄球菌菌株, SH1000 和 Newman 的细胞裂解物)。SH1000 以及 Newman 金黄色葡萄球菌二者筛选为阳性的微型培养物在新的微型培养中以 10 个细胞 / 孔的密度接种。再次, 收集这些微型培养物的上清液并在 SH1000 和 Newman ELISA 中筛选。两种 ELISA 筛选为阳性的克隆接种入单克隆培养 (即 1 个细胞 / 孔)。在测试这些单克隆

培养物的上清液之后,发现一个克隆(命名为F1)生成金黄色葡萄球菌特异性单克隆 IgG 抗体。

[0090] F1 克隆的上清液中的抗体结合来自金黄色葡萄球菌的 LTA 制备物

[0091] 生成 F1 克隆,我们发现了 F1 的上清液结合两种金黄色葡萄球菌菌株,SH1000 和 Newman 的细菌细胞裂解物。革兰氏阳性细菌的主要细胞壁化合物是 LTA,因此我们决定在 ELISA 中测试 F1 上清液对金黄色葡萄球菌 LTA 制备物的结合。如表 1 所示,F1 克隆的上清液结合 SH1000 和 Newman 金黄色葡萄球菌菌株的细菌细胞裂解物,但也结合商购的纯化的金黄色葡萄球菌 LTA 制备物。然而,我们注意到对 LTA 制备物的结合显著低于用完整细菌观察到的结合。

[0092] 表 1 :F1 克隆的上清液结合金黄色葡萄球菌 LTA 制备物。使用抗小鼠 -HRP 偶联二抗作为阴性对照。另一种对照是只检测流感 H3 蛋白的抗流感病毒抗体。

		F1克隆	小鼠抗LTA	抗流感对照
[0093]	SH100	1.004	-0.010	-0.007
	Newman	0.753	-0.007	0.007
	SA LTA (Sigma)	0.176	-0.005	-0.009
[0094]	流感H3	0.003	-0.002	1.523
	无包被	-0.013	-0.014	-0.015

[0095] 重组生成的 F1 抗体结合来自多种来源的 LTA 制备物

[0096] 将抗体基因克隆入表达载体并在表达系统中生成重组的 F1 (rF1) 抗体之后,在来自数种细菌的纯化的 LTA 制备物上测试 rF1 抗体。如图 2A 所示,rF1 抗体较好地结合自金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌获得的商品化 LTA 样品,且显著性略低一点地结合来自粪链球菌和酿脓链球菌的 LTA 样品。rF1 抗体不结合来自肺炎链球菌的 LTA 样品(数据未显示)。另外,rF1 识别来自枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌和两种金黄色葡萄球菌分离物的高度纯化的 LTA 样品(图 2b)。rF1 不结合来自变异链球菌(图 2b)或来自乳酸乳球菌、格氏乳球菌、双歧杆菌、藤黄微球菌、干酪乳杆菌、肠膜明串珠菌、威氏李斯特氏菌、小肠炎球菌、棉子糖乳球菌、变异链球菌和肺炎链球菌(结果未显示)的 LTA 制备物。

[0097] 重组的 F1 抗体结合活的金黄色葡萄球菌细菌

[0098] 为了研究 rF1 抗体是否也会识别活的革兰氏阳性细菌,使用流式细胞术测试了 rF1 抗体对金黄色葡萄球菌和肺炎链球菌的结合。如图 3A 所示,rF1 抗体结合活的金黄色葡萄球菌细菌(Newman 株),但不结合肺炎链球菌。另外,我们显示了 rF1 识别 6 种临床金黄色葡萄球菌分离物;1 种 PVL 阳性的致病性菌株,3 种常规菌株和 2 种 MRSA 菌株(图 3b)。

[0099] 实施例 2

[0100] 方法

[0101] 细菌菌株和培养。

[0102] 甲氧西林抗性金黄色葡萄球菌(Methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA) 菌株 USA300(1114)、USA400、N315、USA100、USA1000、COL、MRSA252,以及甲氧西林敏感性金黄色

葡萄球菌 (MSSA) 菌株 Reynolds、Becker、Smith 弥散、MN8, 和万古霉素中度敏感性 (VISA) 菌株 Mu50 均得自金黄色葡萄球菌抗生素抗性网络 (NARSA); MSSA 菌株 Newman 和 Rosenbach 来自 ATCC。表皮葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*)、和酿脓链球菌得自 Ward's Natural Science; 单核细胞增生李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*) 得自 ATCC。细菌在补充有 5% 绵羊血的胰蛋白酶大豆琼脂 (TSA) 板上于 37°C 培养 18 小时。对于液体培养, 将来自 TSA 板的单菌落接种入胰蛋白酶大豆液体培养基 (TSB) 并在以 200rpm 摇动中于 37°C 温育 18 小时。这些培养物的新鲜 100 倍稀释液在新鲜的 TSB 中再进行多次培养。

[0103] rF1 结合体外培养的完整细菌的 FACS 分析。

[0104] 为了完整细胞的抗体染色, 通过以 1700x g 离心 20 分钟, 自 TSA 板或 TSB 培养物收获细菌, 并用没有酚红、补充有 0.1% BSA (无 IgG; Sigma) 和 10mM Hepes, pH 7.4 (HB 缓冲液) 的 Hank 氏缓冲盐溶液 (HBSS) 清洗。通过读取 630nm 处的光密度来估算细菌浓度。将 HB 缓冲液中 20×10^8 个 CFU/mL 的细菌悬浮液与等体积的 300 μ g/mL 家兔 IgG (Sigma) 混合, 并于室温 (RT) 温育 1 小时以封闭非特异性 IgG 结合。添加一抗 (包括 rF1 和人 IgG1 同种型对照) 至终浓度 2 μ g/mL, 并将这些混合物于 RT 温育 15 分钟。用 HB 清洗两次之后, 在荧光抗人 IgG 二抗 (Jackson ImmunoResearch) 的溶液中重悬浮细菌团粒并于 RT 温育 15 分钟。将细菌用 PBS 清洗两次, 在含 1% 低聚甲醛的 PBS 中重悬浮, 并通过流式细胞术来分析。

[0105] rF1 结合来自受感染组织的完整细菌的 FACS 分析。

[0106] 为了分析抗体对来自受感染组织的细菌的结合, 用 PBS 清洗 USA300 在 TSB 中的 4 小时次培养物。给小鼠静脉内注射 100 μ L USA300 在 PBS 中的悬浮液, 估算浓度为 10×10^8 个 CFU/mL。3 天后, 收获肾、肝、和肺并使用锥形组织研磨管 (VWR) 匀浆。根据指示, 在感染的不同时间点收获器官。为了裂解小鼠细胞, 将匀浆物在含有 0.1% Triton-X100 (Thermo)、10 μ g/mL DNA 酶 I (Roche) 和完全迷你蛋白酶抑制剂鸡尾酒 (Roche) 的 PBS 中于 RT 温育 10 分钟, 并通过 40 μ m 滤器 (Falcon)。将细胞悬浮液用 PBS 清洗两次并在 HB 缓冲液中重悬浮, 与等体积的 600 μ g/mL 人 IgG (Sigma) 混合, 并于 RT 温育 1 小时。添加一抗 (包括 rF1 和人 IgG1 同种型对照) 至终浓度 2 μ g/mL。为了区分来自小鼠器官碎片的细菌, 添加家兔 IgG 抗金黄色葡萄球菌 (Abcam) 至浓度 20 μ g/mL。于 RT 温育 15 分钟之后, 将细胞用 HB 缓冲液清洗两次, 并在抗人 IgG 和抗家兔 IgG 二抗的混合物中重悬浮, 二抗均标记有不同荧光染料 (Jackson ImmunoResearch)。用 PBS 清洗两次之后, 将细胞在含 2% 低聚甲醛的 PBS 中重悬浮并通过流式细胞术来分析。通过对家兔 IgG 抗金黄色葡萄球菌的阳性染色来控门自双重荧光点选择细菌之后, 生成了 rF1 和同种型对照的荧光强度的覆盖式柱状图。

[0107] 结果

[0108] rF1 强烈结合 14 种金黄色葡萄球菌菌株和表皮葡萄球菌

[0109] 7 种甲氧西林抗性金黄色葡萄球菌 (MRSA) 菌株、6 种甲氧西林敏感性金黄色葡萄球菌 (MSSA) 菌株、1 种万古霉素中度敏感性金黄色葡萄球菌 (VISA) 菌株、表皮葡萄球菌和 7 种其它革兰氏阳性物种测试对 rF1 抗体的结合。如图 4 所示, rF1 强烈结合所有 14 种金黄色葡萄球菌菌株 (图 4A) 和表皮葡萄球菌 (图 4B), 但不结合其它测试的革兰氏阳性物种 (图 4B)。

[0110] rF1 结合来自不同生长阶段的和来自体内感染的 MRSA

[0111] 我们测试了单抗 rF1 结合不同组织中的和感染过程里的细菌的能力。我们发现了 rF1 结合感染后 2 天自鼠肾、肝和肺组织分离的细菌,而且对自受感染肾分离的细菌的结合是稳定的,结合感染后 2、3 和 8 天的细菌。

[0112] 测试了 rF1 抗体对 MRSA (菌株 USA300) TSB 培养中的不同生长阶段,即对数生长早期 (2 小时) 和指数生长后 (8 小时),及 TSA 板上固体菌落的生长的结合。rF1 强烈结合所有测试的生长阶段的菌株 (图 5A)。

[0113] 在小鼠受到 MRSA 系统感染后 3 天来自小鼠的匀浆肾中测试了 rF1 抗体对 MRSA (菌株 USA300) 对来自受感染组织的完整细菌的结合。如图 5B 所示,rF1 结合自受感染组织获得的 MRSA。

[0114] 实施例 3

[0115] 实施了进一步实验来鉴定受到抗体 rF1 结合的表位。虽然已观察到对 LTA 制备物的结合 (见例如实施例 1),该结合不像对完整细菌的结合那样强提示 rF1 结合可能涉及另一个表位。

[0116] 方法

[0117] 金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌细胞壁裂解物 and 商品化 WTA 制备物的免疫沉淀、Western 印迹和质谱术

[0118] 将 40 微克来自 Wood46 金黄色葡萄球菌菌株 (Biodesign/Meridian Life Sciences, Maine) 的商品化壁磷壁酸 (WTA) 制备物拆分成两部分并用 1 μ g/ml rF1 或同种型对照抗体免疫沉淀。用蛋白 A/G Ultralink 树脂 (Pierce) 捕捉抗体。然后将样品用 50mM 二硫苏糖醇、10mM 2-碘乙酰胺处理,并在 8% Tris-甘氨酸凝胶上运行,随后用 rF1 进行 Western 印迹。

[0119] 制备 USA300 金黄色葡萄球菌菌株的 20ml 过夜培养物的细胞壁制备物,即在 30% 棉子糖缓冲液中于 37 $^{\circ}$ C 用 100mg/ml 溶葡萄球菌素处理培养物 (40mg 细胞团粒 /ml) 30 分钟。将这个细胞壁制备物过滤,用 NP40 裂解缓冲液稀释至 10ml 并与抗 Flag M2 琼脂糖 (Sigma) 一起温育两次以尽可能多地自细胞壁制备物消减蛋白 A。将最终的细胞壁制备物拆分成两部分并用 1 μ g/ml rF1 或同种型对照抗体免疫沉淀。用蛋白 A/G Ultralink 树脂 (Pierce) 捕捉抗体。然后样品用 50mM 二硫苏糖醇、10mM 2-碘乙酰胺处理,并在 8% Tris-甘氨酸凝胶上运行,随后进行银染色或用 rF1 进行 Western 印迹。

[0120] 通过 NP40 裂解缓冲液中的珠打浆自表皮葡萄球菌的 20ml 过夜培养物制备裂解物。将所得裂解物制备物用 NP40 裂解缓冲液稀释至 10ml,拆分成两部分并用 1 μ g/ml rF1 或对照抗体免疫沉淀。用蛋白 A/G Ultralink 树脂 (Pierce) 捕捉抗体。然后将样品用 50mM 二硫苏糖醇、10mM 2-碘乙酰胺处理,并在 8% Tris-甘氨酸凝胶上运行,随后进行银染色或用 rF1 进行 Western 印迹。

[0121] 为了蛋白质组分析,将样品应用于预装填 SDS PAGE 微型凝胶并用考马斯蓝对解析的蛋白质染色。切出来自凝胶中与通过 rF1 Western 印迹显现的条带对应的区域的凝胶片并还原,用碘乙酰胺烷化,并用胰蛋白酶原位消化。通过微毛细管反相液体层析 - 数据依赖性实验中杂合线性离子阱傅里叶 (Fourier) 变换离子回旋加速器共振质谱仪 (LTQ-FT; Thermo Fisher) 上的纳米电喷射串联质谱术分析所得胰蛋白酶消化肽。使用 Mascot 软件 (Matrix Science) 提交串联质谱结果进行数据库检索。

[0122] 金黄色葡萄球菌和大肠杆菌 (*e. coli*) 中表达的外源 ClfA 的表达

[0123] 带 His 标签的 ClfA 的金黄色葡萄球菌表达:自 USA300 基因组 DNA PCR 扩增聚集因子 (Clumping factor)-A (ClfA) 基因,从编码信号序列的序列到编码 LPXTG 基序中甘氨酸的序列。在 LPXTG 基序的终点处改造 c 端 His 标签并连接入 pTet 金黄色葡萄球菌表达载体 (pSAS10, 来自 Genentech)。然后将所得构建物电穿孔入金黄色葡萄球菌 WT RN4220。自过夜培养物接种经过电穿孔的 RN4220 或 RN4220 空 (不携带 pTet 表达载体) 的 20ml 培养物 (起始 OD₆₀₀ 为 0.15), 在胰蛋白酶大豆液体培养基 (TSB) 培养 1 小时, 然后用去水四环素 (200ng/ml) 诱导蛋白质表达 2 小时。在诱导期结束时, 将金黄色葡萄球菌培养物用溶葡萄球菌素 (50ug/ml) 预裂解, 然后通过裂解缓冲液 (150mM NaCl, 20mM Tris pH 7.5, 1% triton-X, 和 Roche 蛋白酶抑制剂无 EDTA 片) 中的珠打浆进一步裂解。然后在 10mM 咪唑存在下将经过清除的裂解物与 NiNta 树脂 (Qiagen) 一起于 4℃ 温育 1 小时以拉下重组的 ClfA 蛋白。

[0124] 带 His 标签的 ClfA 的大肠杆菌表达:自 USA300 基因组 DNA PCR 扩增聚集因子 -A (ClfA) 基因,从编码 N 端信号序列的序列 (有起始甲硫氨酸) 到编码 C 端 LPXTG 基序中甘氨酸的序列。然后以 c 端 His 标签的读码框将扩增的 PCR 产物连接入 pET 21b(+) 大肠杆菌表达载体 (Novagen)。将所得构建物转化入大肠杆菌 BL21-gold (DE3) 感受态细胞 (Stratagene) 并用 IPTG 依照制造商的指示诱导蛋白质表达 3.5 小时。通过裂解缓冲液 (150mM NaCl, 20mM Tris pH 7.5, 1% triton-X, 和 Roche 蛋白酶抑制剂无 EDTA 片) 中的珠打浆裂解经过诱导的大肠杆菌培养物。然后在 10mM 咪唑存在下将经过清除的裂解物与 NiNta 树脂 (Qiagen) 一起于 4℃ 温育 1 小时以拉下重组的 ClfA 蛋白。

[0125] 大肠杆菌中表达的外源 ClfA 的表达和金黄色葡萄球菌裂解物一起的温育

[0126] 大肠杆菌中金黄色葡萄球菌细胞表面 SDR 蛋白 ClfA、ClfB、SdrC、SdrD、SdrE 的表达和纯化:自 USA300 基因组 DNA PCR 扩增 ClfA、ClfB、SdrC、SdrD 和 SdrE 基因,从编码成熟蛋白起点的序列到编码 LPXTG 基序中甘氨酸的序列并以 N 端 Unizyme 标签的读码框连接入 ST239 载体 (Genentech)。将构建物转化入大肠杆菌 58F3 (Genentech), 诱导蛋白质表达并随后纯化。

[0127] NiNta 对带 NT Unizyme 标签的 SDR 蛋白的捕捉:将 500ug 纯化的 N 端带 Unizyme 标签的 SDR 蛋白 (ClfA、ClfB、SdrC、SdrD、SdrE) 在含有蛋白酶抑制剂的 PBS (无 EDTA) 中稀释并与 NiNta 树脂 (Qiagen) 一起于 4℃ 温育 1.5 小时。然后将 NiNta 树脂及捕捉的带 Unizyme 标签的 SDR 蛋白用清洗缓冲液 (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl; pH 8.0) 清洗一次。

[0128] 金黄色葡萄球菌裂解物对大肠杆菌生成的 SDR 蛋白的修饰:25ml 培养始于 ΔPan Sdr 突变体 (ClfA-ClfB-SdrCDE-null; 由 Tim Foster, Trinity College Dublin 馈赠) Newman 金黄色葡萄球菌的过夜培养物 (起始 OD₆₀₀ 为 0.15) 并在 TSB 中 37℃, 200rpm 培养 3 小时 (指数期)。将指数期培养物在 1ml PBS 中重悬浮并于 37℃ 在 250 个单位 Benzonase 核酸酶 (Novagen) 存在下用 200ug/ml 溶葡萄球菌素裂解 30 分钟。通过在微量离心机中于 4℃ 以最大速度旋转 10 分钟对裂解物清除碎片。进行 NiNta 捕捉的大肠杆菌 SDR 蛋白的修饰,即将与经过清除的 ΔPan Sdr 突变体金黄色葡萄球菌裂解物一起于 37℃ 温育 1 小时。

[0129] 经过修饰的大肠杆菌 SDR 蛋白的 Western 印迹:然后将未经修饰的或经过修饰的 NiNta 捕捉的大肠杆菌 SDR 蛋白样品用清洗缓冲液 (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 10mM 咪唑;

pH 8.0) 清洗三次,准备 Western 印迹并在 8% Tris 甘氨酸凝胶 (Invitrogen) 上运行。用 rF1 抗体或抗 Unizyme 抗体 (Genentech) 进行 Western 印迹。

[0130] SDR 域鉴定为 rF1 的抗原

[0131] MBP-SD 构建物的金黄色葡萄球菌表达:自 pMAL-c5x 载体 (New England BioLabs[NEB], Ipswich, MA, USA)PCR 克隆麦芽糖结合蛋白 (MBP) 基因,从编码成熟蛋白的起点的序列到编码因子 Xa 切割位点的终点的序列。作为单链寡核苷酸合成不同长度的 c 端带 His 标签的 SD (SD、SDS、DSD、SDSD、SDSDS、SDSDSD) 并一起退火以生成双链 DNA。自相应质粒 pTet. ClfA. SD618A 或 pTet. ClfA. SD709S (Genentech)PCR 扩增 ClfA 基因的 Sdr 区,从编码 Sdr 区起点 (560D) 的序列开始,包括直至编码 SD 区 618A 或 709S 的序列,接着是编码 His 标签的 DNA 序列。作为对照,自质粒 pTet. ClfA. Adom. 538G (Genentech)PCR 扩增编码 ClfA 基因的 A 域的序列,从成熟蛋白的起点到编码 A 域终点 (538G) 的序列,接着是编码 His 标签的序列。将 MBP 插入物连同各种 SD 插入物之一或 ClfA 域连接入 pTet 金黄色葡萄球菌表达载体 (pSAS10, 来自 Genentech)。然后将所得构建物电穿孔入金黄色葡萄球菌 RN4220 Δ 分选酶 (RN4220 背景中的分选酶删除突变体菌株)。

[0132] 自过夜培养物接种经过电穿孔的 RN4220 Δ 分选酶或 RN4220 Δ 分选酶空 (不携带 pTet 表达载体) 的 20ml 培养物 (起始 OD600 为 0.15),在补充有葡萄糖 (2g/L) 的胰蛋白酶大豆液体培养基 (TSB) 中培养 1 小时,然后用去水四环素 (200ng/ml) 诱导蛋白质表达 2 小时。在诱导期结束时,将金黄色葡萄球菌培养物在柱缓冲液 (150mM NaCl, 20mM Tris pH 7.5 和 Roche 蛋白酶抑制剂无 EDTA 片) 中重悬浮并于 37°C 在 250 个单位 Benzonase 核酸酶 (Novagen) 存在下用 200ug/ml 溶葡萄球菌素裂解 30 分钟。通过在微量离心机中于 4°C 以最大速度旋转 10 分钟对裂解物清除碎片。然后经过清除的裂解物与直链淀粉树脂 (NEB) 连同终浓度 1mM 的 EDTA 一起于 4°C 温育 1.5 小时以捕捉表达的 MBP-SD 蛋白。

[0133] 金黄色葡萄球菌表达的 MBP-SD 构建物的 Western 印迹:将直链淀粉树脂及捕捉的 MBP-SD 蛋白用柱缓冲液清洗三次,进一步准备 Western 印迹分析并在 8% Tris- 甘氨酸凝胶上运行。用 rF1 抗体、抗五 His 抗体 (Qiagen) 或抗 MBP 抗体 (NEB) 进行 Western 印迹。

[0134] 结果

[0135] rF1 与金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌中的 SDR (Ser-Asp 重复) 蛋白的独特家族反应

[0136] 商品化磷壁酸制备物和金黄色葡萄球菌 (USA300 株) 细胞壁裂解物 (WTA) 测试免疫沉淀后对 rF1 的结合。rF1 结合商品化磷壁酸制备物 (图 6A, 左边小图) 和金黄色葡萄球菌细胞壁裂解物 (图 6B, 左边小图) 的数种成分。使用质谱术,这些 WTA 制备物和细胞壁裂解物成分鉴定为 ClfA (SdrA)、ClfB (SdrB)、SdrC、SdrD 和 SdrE (图 6A, 右边小图和图 6B, 右边小图)。

[0137] 表皮葡萄球菌细胞壁裂解物测试免疫沉淀后对 rF1 的结合。图 6C (左边小图) 显示 rF1 对表皮葡萄球菌细胞壁裂解物的数种成分的结合。这些成分与对照抗体不同。使用质谱术,这些细胞壁成分鉴定为 SdrF、SdrG 和 SdrH (图 6C 右边小图)。

[0138] 金黄色葡萄球菌和大肠杆菌中的外源 ClfA 表达

[0139] 在金黄色葡萄球菌中表达的外源 ClfA 对 rF1 有反应性,而在大肠杆菌中表达的 ClfA 没有 (图 7A)。然而,将大肠杆菌表达的 Sdr 蛋白 ClfA (SdrA)、ClfB (SdrB)、SdrC、SdrD

和 SdrE 与金黄色葡萄球菌裂解物一起温育再次获得 rF1 反应性 (图 7B)。

[0140] rF1 结合在金黄色葡萄球菌中表达的 SDR 域

[0141] rF1 抗体结合在金黄色葡萄球菌中表达的由 ClfA560D-618S 和 ClfA560D-709S 组成的 ClfA Sdr 区 (图 8)。rF1 不结合 ClfA 的 A 域或由多至 3 个 SD 重复组成的小肽序列。

[0142] 实施例 4

[0143] 方法

[0144] rF1 的可变区克隆入 pRK 载体中

[0145] Phusion DNA 聚合酶, 限制酶 EcoRV、KpnI、PvuII、ApaI、AgeI、和 AhdI, T4DNA 连接酶购自 New England BioLabs, Ipswich, MA, USA。Pfu DNA 聚合酶, 快速改变 II 定点诱变试剂盒购自 Stratagene/Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA。2% 琼脂糖凝胶购自 Invitrogen, Carlsbad, California, USA。pRK 载体 pRK. LPG3. HuKappa 和 pRK. LPG4. HumanHC 得自 Genentech/Roche, South San Francisco, California, USA。

[0146] 将来自 pCPE0 载体的 rF1Mab 重链和轻链可变域放置入 pRK 哺乳动物表达载体。以 50 μ l 总体积使用 Pfu DNA 聚合酶依照标准 PCR 规程实施聚合酶链式反应 (PCR)。用引物 YiHCF)5'-ATG GCT GAG GTG CAG CTG GTG GAGTCT G-3' (SEQ ID NO:18) 和 YiHCR25'-GAA CAC GCT GGG GCC CTT GGTGCT GGC ACT CGA GAC TGT GAC CAG GGT GCC AGG T*CC CCA G-3' (SEQ ID NO:19) 扩增 VH(PvuII 和 ApaI 的限制性位点标有下划线且 * 指示单核苷酸 G 变成 T 以消除内部 ApaI 位点), 并用引物 YiLCF 5'-CGG CTC GAC CGATAT CCA GCT GAC CCA GAG-3' (SEQ ID NO:20) 和 YiLCR 5'-GAT TTCCAG CTT GGT ACC CTG GCC G-3' (SEQ ID NO:21) 扩增 VL(EcoRV 和 KpnI 标有下划线)。直接消化唯一的 PCR 产物, 分别为 393(VH) 和 328(VL)bp, PvuII 和 ApaI 用于 VH, EcoRV 和 KpnI 用于 VL, 接着是凝胶纯化 (Invitrogen, Catalog# K2100-12)。使用 T4DNA 连接酶将 VH 和 VL 各自连接入 pRK 载体片段, pRK/PvuII, ApaI 用于重链, pRK/EcoRV, KpnI 用于轻链。DNA 质粒通过限制酶消化样式来确认, 即在 2% 琼脂糖凝胶上, rF1VH 通过 AgeI 释放 ~ 300bp 和 5.8kb 条带, 而 rF1VL 通过 AhdI 显示 2.3 和 3.1kb 条带。

[0147] 化学应力测试

[0148] 通过将抗体一级序列数据与实验观察到的降解事件比较, 明白了某些序列基序可能趋于降解 (即 DD、DG、和 DS 序列处的天冬氨酸异构化和 NG 序列处的天冬酰胺脱酰胺)。如果抗体的 CDR 中出现此类降解“热点”的话, 结合和效力可能受到负面影响。对于含有热点的分子, 通过将抗体放置入平台配制缓冲液中并将对照样品与于 40°C 承压 2 周的样品比较, 化学应力测试提供评估这些基序对降解的易感性的途径。如果观察到降解的话, 可再次改造一级序列以消除热点。

[0149] 在样品于 40°C 承压 2 周之后, 实施多种分析性测定法来评估降解发生的位置和程度。实施成像毛细管等电聚焦 (icIEF) 分析来检查电荷变体, 并使用质谱术来验证完整和缩小的抗体质量, 并实施 LC-MS/MS 肽图来获得位点特异性降解信息。

[0150] 诱变

[0151] rF1pRK 质粒经快速改变 II 定点试剂盒 (Quik change II Site-Directed Kit) 经历一系列定点诱变以使用 FHV 5'-GGT GGC CAG CAT CAA CAG CGGCAA CAA CCC CTA CTA CG-3' (SEQ ID NO:22) 和 RHV 5'-CGT AGT AGGGGT TGT TGC CGC TGT TGA TGC TGG CCA

CC-3' (SEQ ID NO :23) (诱变位点标有下划线) 通过重链 CDR2 中的 N(AAC)53S(AGC) 来稳定 rF1Mab。

[0152] 对诱变变体测序。

[0153] 结果

[0154] 抗体 rF1 的一级序列含有轻链 CDR2 中的一个潜在的天冬酰胺降解位点 :NNGNN (SEQ ID NO :24)。应力测试揭示了承压样品中在 N53 (编号方式依照 Kabat, 1991) 处的脱酰胺的升高。实施了定点诱变, 通过重链 CDR2 中 N(AAC, (SEQ ID NO :25)) 至 53S(AGC, (SEQ ID NO :26)) 的替代来稳定 rF1Mab。对诱变变体的测序确认了 N53S 突变。

[0155] 实施例 5

[0156] 用于抗体-药物偶联物 (ADC) 应用的 Cys 变体的开发

[0157] rF1pRK 质粒经 Stratagene 的定点法经历一系列定点诱变, 其中使用寡聚物 rF1pRK.LC(205/210)VCF (468075)5'-GGG CCT GAG CTC GCC CTGCAC AAA GAG CTT CAA CAG-3' (SEQ ID NO :27) 和 rF1pRK.LC(205/210)VCR (468076)5'-CTG TTG AAG CTC TTT GTG CAGGGC GAG CTC AGG CCC-3' (SEQ ID NO :28) (Cys 突变体标有下划线) 来生成 rF1thioMab 的轻链接头, 并使用 rF1pRK.HCN53S.A121CF(468464)5'-CTGGTC ACA GTC TCG AGT TGC AGC ACC AAG GGC CCA TC-3' (SEQ ID NO :29) 和 rF1pRK.HCN53S.A121CR(468465)5'-GAT GGG CCC TTG GTG CTG CAA CTC GAG ACT GTG ACC AG-3' (SEQ ID NO :30) (Cys 突变体标有下划线) 来生成 rF1thioMab 的重链接头。轻链 V205C 和重链 A114C 通过对变体测序来确认 (图 9)。

[0158] 附图简述

[0159] 图 1 :抗体 F1 的重链和轻链序列

[0160] 图 2 :F1 抗体结合来自数种革兰氏阳性细菌的 LTA 制备物。(a) LTA 制备物衍生自 Sigma 且在用小鼠多克隆抗 LTA 进行的捕捉 ELISA 中测试或 (b) 一组高度纯化的 LTA 制备物衍生自 W.Fischer。人抗 RSV 抗体 D25 用作非特异性阴性对照且小鼠单克隆抗 LTA 抗体用作阳性对照。

[0161] 图 3 :重组的 F1 抗体结合金黄色葡萄球菌但不结合肺炎链球菌。(a) 将细菌与 F1 抗体或对照 IgG (人抗 RSV 抗体 D25) 一起或在没有一抗的情况 (仅 IgG-PE) 中温育。清洗后, 添加二抗 (IgG-PE)。(b) 对 6 份临床分离物在两个分开的实验中测试 F1 的结合。测试了 PVL+ 菌株 (SA-1)、3 种常规菌株 (SA-2、SA-3 和 SA-4)、和 2 种 MRSA 菌株 (SA-5 和 SA-6)。

[0162] 图 4 : (a) rF1 抗体对 14 种金黄色葡萄球菌菌株的结合。(b) rF1 抗体结合表皮葡萄球菌但不结合枯草芽孢杆菌、粪肠球菌、单核细胞增生李斯特氏菌和酿脓链球菌。

[0163] 图 5 : (a) rF1 抗体结合处于不同生长阶段的 MRSA, Iso C :同种型对照, Med :培养基对照。(b) rF1 抗体结合自受感染组织分离的 MRSA。

[0164] 图 6 :rF1 抗体结合 SDR 蛋白。(a) 商品化金黄色葡萄球菌 (Wood 46 株) 磷壁酸制备物用 rF1 或同种型对照抗体进行的免疫沉淀 (IP), 接着是用 rF1 抗体进行的 Western 印迹 (左边) 和来自 WTA 制备物的受到 rF1 抗体结合的片段的质谱术分析 (右边), (b) 金黄色葡萄球菌 (USA300 株) 细胞壁裂解物用 rF1 或对照抗体进行的免疫沉淀 (IP), 接着是用 rF1 抗体进行的 Western 印迹 (WB) (左边) 和受到 rF1 抗体结合的细胞壁片段 (USA300 株) 的质谱术分析 (右边), (c) 表皮葡萄球菌细胞壁裂解物用 rF1 或同种型对照抗体进行

的免疫沉淀,接着是用 rF1 抗体进行的 Western 印迹(左边)、受到 rF1 抗体结合的细胞壁片段的质谱术分析(右边)。

[0165] 图 7:rF1 对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌中表达的 SDR 蛋白的结合。(a) 含有过表达的带 His 标签的 ClfA 的金黄色葡萄球菌和大肠杆菌裂解物使用抗 His(左边)和 rF1(右边)抗体的 Western 印迹。(b) 含有带 his 标签的 ClfA、ClfB、SdrC、SdrD 和 SdrE 的大肠杆菌细胞裂解物在与金黄色葡萄球菌裂解物一起温育后使用 rF1(顶部)或抗 His(底部)抗体的 Western 印迹。

[0166] 图 8:rF1 结合由金黄色葡萄球菌表达的 SDR 域。构建物由金黄色葡萄球菌表达并测试 rF1 的结合(左边),含有表达的构建物的金黄色葡萄球菌裂解物使用抗 MBP(麦芽糖结合蛋白)、抗 His 和 rF1 抗体的 Western 印迹(右边)。

[0167] 图 9:抗体 rF1 的重链 A114C(a) 和轻链 V205C(b) 变体的序列。编号方式依照 Kabat(1991),框:CDR。

[0168] 参考文献

[0169] Diehl S.A. et al. J Immunol 180,4805-4815(2008) Greenberg J.W et al. Infection and Immunity 64,3318-3325(1996) Jaleco A.C. et al. Blood 94, 2637-2646(1999)

[0170] Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)

[0171] Keller R. et al. Infect Immun 60,3664-3672(1992)

[0172] Kwakkenbos M et al. Nat Med accepted for publication(2009) Moran et al. NEMJ 355,666-674(2006)

[0173] Polotsky V.Y. et al. Infection and Immunity 64,380-383(1996)

[0174] Scheeren F.A. et al. Nat Immunol 6,303-313(2005)

[0175] Shvarts A. et al. Genes Dev 16,681-686(2002)

[0176] Weidenmaier C. et al. Nat Rev Microbiol 6,276-287(2008)

[0001]

序列表

<110> 基因泰克公司 (Genentech, Inc.)
AIMM 医疗股份公司 (AIMM THERAPEUTICS B.V.)
BEAUMONT, Tim
KWAKKENBOS, Mark Jeroen
BROWN, Eric J.
MORTSAKI, John Hiroshi
HAZENBOS, Wouter L.W.
MARIATHASAN, Sanjeev
KAJIHARA, Kimberly
XIA, Yi

<120> 革兰氏阳性细菌特异性结合化合物

<130> 146392008240

<140> PCT/NL2010/050456

<141> 2010-07-15

<150> US 61/225,878

<151> 2009-07-15

<150> EP 091655589

<151> 2009-07-15

<160> 66

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<220>

<223> CDR1 重链

<400> 1

Arg Phe Ala Met Ser

1 5

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0002]

<223> 合成构建物

<220>

<223> CDR2 重链

<400> 2

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

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<220>

<223> CDR3 重链

<400> 3

Asp	His	Pro	Ser	Ser	Gly	Trp	Pro	Thr	Phe	Asp	Ser
1				5					10		

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<220>

<223> CDR1 轻链

<400> 4

Arg	Ala	Ser	Glu	Asn	Val	Gly	Asp	Trp	Leu	Ala
1				5					10	

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<220>

<223> CDR2 轻链

[0003]

<400> 5

Lys Thr Ser Ile Leu Glu Ser

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<220>

<223> CDR3 轻链

<220>

<221> 变体

<222> 4

<223> Xaa = M 或 I

<400> 6

Gln His Tyr Xaa Arg Phe Pro Tyr Thr

1 5

<210> 7

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<220>

<223> F1 抗体变体重链

<400> 7

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Arg Phe

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Ser Ile Asn Asn Gly Asn Asn Pro Tyr Tyr Ala Arg Ser Val Gln

50 55 60

Tyr Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Val Ser Gln Asn Thr Val Ser Leu

65 70 75 80

Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Phe Cys Ala

85 90 95

Lys Asp His Pro Ser Ser Gly Trp Pro Thr Phe Asp Ser Trp Gly Pro

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

[0004]

115

120

<210> 8

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<220>

<223> F1 抗体变体轻链

<220>

<221> 变体

<222> 92

<223> Xaa = M 或 I

<400> 8

```

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

```

<210> 9

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<220>

<223> F1 抗体变体重链

<400> 9

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1             5             10             15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Arg Phe
                20             25             30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val

```

[0005]

```

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

```

<210> 10

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<220>

<223> F1 抗体变体轻链

<220>

<221> 变体

<222> 92

<223> Xaa = M 或 I

<400> 10

```

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

```

<210> 11

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

[0006]

<220>

<223> F1 抗体变体轻链

<220>

<221> 变体

<222> 92

<223> Xaa = M 或 I

<400> 11

```

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

```

<210> 12

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<220>

<223> F1 重链 CDR1

<400> 12

cgctttgccg tggagc

15

<210> 13

<211> 48

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<220>

<223> F1 重链 CDR2

<400> 13

tcgatcaata atgggaataa cccatactac gcacggtcgg tacaatac

48

[0007]

<210> 14
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<220>
<223> F1 重链 CDR3

<400> 14
gacacecta gtagtgctg gccaccttt gactcc 36

<210> 15
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<220>
<223> F1 轻链 CDR1

<400> 15
cgggccagig aaaacgttg tgactggtg gcc 33

<210> 16
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<220>
<223> F1 轻链 CDR2

<400> 16
aagacatcta ttctagaag t 21

<210> 17
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<220>
<223> F1 轻链 CDR3

[0008]

<400> 17 caacactata tacgtttccc gtacact	27
<210> 18 <211> 28 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成构建物	
<220> <223> 引物	
<400> 18 atggctgagg tgcagctggg ggagtcctg	28
<210> 19 <211> 61 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成构建物	
<220> <223> 引物	
<400> 19 gaacacgcctg gggcccttgg tgctggcact cgagactgtg accaggggtgc caggtcccca g	60 61
<210> 20 <211> 30 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成构建物	
<220> <223> 引物	
<400> 20 cggtctgacc gatatccagc tgacccagag	30
<210> 21 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220>	

[0009]

<223> 合成构建物	
<220>	
<223> 引物	
<400> 21	
gatttccagc ttggtaccct ggccg	25
<210> 22	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成构建物	
<220>	
<223> 引物	
<400> 22	
ggtggccagc atcaacagcg gcaacaaccc ctactacg	38
<210> 23	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成构建物	
<220>	
<223> 引物	
<400> 23	
cgtagtaggg gtfgttgccg ctgttgatgc tggccacc	38
<210> 24	
<211> 5	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成构建物	
<220>	
<223> CDR2 重链显示酰胺化的部分	
<220>	
<221> MOD_RES	
<222> 2	
<223> 酰胺化	
<400> 24	

[0010]

Asn Asn Gly Asn Asn
1 5

<210> 25
<211> 3
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<220>
<223> N的密码子

<400> 25
aac 3

<210> 26
<211> 3
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<220>
<223> S的密码子

<400> 26
agc 3

<210> 27
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<220>
<223> 寡聚物

<400> 27
gggcctgagc tcgccctgca caagagctt caacag 36

<210> 28
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

[0011]

<220>	
<223> 寡聚物	
<400> 28	
ctgttgaagc tctttgtgca gggcgagctc aggeccc	36
<210> 29	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成构建物	
<220>	
<223> 寡聚物	
<400> 29	
ctggtcacag tctcgagttg cagcaccaag ggeccatc	38
<210> 30	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成构建物	
<220>	
<223> 寡聚物	
<400> 30	
gatgggccct tggtgctgca actcgagact gtgaccag	38
<210> 31	
<211> 5	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成构建物	
<220>	
<223> 基序	
<220>	
<221> 变体	
<222> 3	
<223> Xaa = 任何氨基酸	
<400> 31	
Leu Pro Xaa Thr Gly	

[0012]

1 5

<210> 32

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<220>

<223> 带 His 标签的 SD 插入物

<400> 32

Ser Asp Ser Asp

1

<210> 33

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<220>

<223> 带 His 标签的 SD 插入物

<400> 33

Ser Asp Ser Asp Ser

1

5

<210> 34

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<220>

<223> 带 His 标签的 SD 插入物

<400> 34

Ser Asp Ser Asp Ser Asp

1

5

<210> 35

<211> 360

[0013]

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<220>

<223> F1 重链

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (360)

<400> 35

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

tcc	ctg	aga	ctc	tcc	tgt	gca	gcc	tct	gga	ttc	acc	ctt	agc	cgc	ttt	96
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Leu	Ser	Arg	Phe	
			20				25					30				

gcc	atg	agc	tgg	gtc	cgc	cag	gct	cca	gga	agg	gga	ctg	gaa	tgg	gtc	144
Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Arg	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
			35				40					45				

gca	tgc	atc	aat	aat	ggg	aat	aac	cca	tac	tac	gca	cgg	tgc	gta	caa	192
Ala	Ser	Ile	Asn	Asn	Gly	Asn	Asn	Pro	Tyr	Tyr	Ala	Arg	Ser	Val	Gln	
			50				55					60				

tac	cgc	ttc	acc	gtc	tcc	cgg	gac	gtc	tcc	cag	aac	act	gtg	tct	ctg	240
Tyr	Arg	Phe	Thr	Val	Ser	Arg	Asp	Val	Ser	Gln	Asn	Thr	Val	Ser	Leu	
65					70				75					80		

cag	atg	aac	aac	ctg	aga	gcc	gaa	gac	tgc	gcc	aca	tat	ttc	tgt	gct	288
Gln	Met	Asn	Asn	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Ser	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Ala	
					85				90					95		

aaa	gat	cac	cct	agt	agt	ggc	tgg	ccc	acc	ttt	gac	tcc	tgg	ggc	ccg	336
Lys	Asp	His	Pro	Ser	Ser	Gly	Trp	Pro	Thr	Phe	Asp	Ser	Trp	Gly	Pro	
			100				105						110			

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

<210> 36

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0014]

<223> 合成构建物

<400> 36

```

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

```

<210> 37

<211> 90

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<220>

<223> F1 重链 FW1

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(90)

<400> 37

```

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

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

```

<210> 38

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

[0015]

<400> 38

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

<210> 39

<211> 42

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<220>

<223> F1 重链 FW2

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(42)

<400> 39

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

<210> 40

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<400> 40

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val Ala
1 5 10

<210> 41

<211> 96

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<220>

<223> F1 重链 FW3

[0016]

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

<400> 41
cgc ttc acc gtc tcc egg gac gtc tcc cag aac act gtg tct ctg cag 48
Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Val Ser Gln Asn Thr Val Ser Leu Gln
1 5 10 15

atg aac aac ctg aga gcc gaa gac tcc gcc aca tat ttc tgt gct aaa 96
Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Lys
20 25 30

<210> 42
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 42
Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Val Ser Gln Asn Thr Val Ser Leu Gln
1 5 10 15
Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Lys
20 25 30

<210> 43
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<220>
<223> F1 重链 FW4

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (33)

<400> 43
tgg ggc ccg gga acc ctg gtc acc gtc tcc tcc 33
Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 44
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

[0017]

<220>

<223> 合成构建物

<400> 44

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

<210> 45

<211> 330

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<220>

<223> F1 轻链

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(330)

<400> 45

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

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

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

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

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

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

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

[0018]

<210> 46
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建物

<400> 46
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Leu Pro Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Val Gly Asp Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Lys Thr Ser Ile Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Ile Arg Phe Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val
 100 105 110

<210> 47
 <211> 69
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建物

<220>
 <223> F1 轻链 FW1

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

<400> 47
 gac atc cag ttg acc cag tct cct tcc gcc ctg cct gea tct gtg gga 48
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Leu Pro Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 gac aga gtc agc atc act tgt 69
 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys
 20

<210> 48
 <211> 23

[0019]

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<400> 48

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

<210> 49

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<220>

<223> F1 轻链 FW2

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(45)

<400> 49

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

<210> 50

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<400> 50

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

<210> 51

<211> 96

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

[0020]

<223> 合成构建物

<220>

<223> F1 轻链 FW3

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(96)

<400> 51

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

ctc acc aic agc agc ctc cag cct gat gat ttt gca act iat iac tgt 96
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 52

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<400> 52

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

<210> 53

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<220>

<223> F1 轻链 FW4

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(39)

<400> 53

ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc aaa cga act gtg 39
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val
1 5 10

[0021]

<210> 54
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建物

<400> 54
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val
 1 5 10

<210> 55
 <211> 230
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建物

<220>
 <223> rFl 重链

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

[0022]

```

210          215          220
Lys Thr His Thr Cys Pro
225          230

<210> 56
<211> 230
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<220>
<223> rF1 A114C

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

<210> 57
<211> 213
<212> PRT
<213> 人工序列

```

[0023]

<220>

<223> 合成构建物

<220>

<223> rFl 轻链

<400> 57

```

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

```

<210> 58

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<220>

<223> rFl V205C

<400> 58

```

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Leu Pro Ala Ser Val Gly
 1           5           10           15
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Val Gly Asp Trp

```

[0024]

```

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

```

<210> 59
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建物

<400> 59

```

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

```

<210> 60
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建物

<220>
 <223> rF1 A114C

<400> 60

[0025]

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

<210> 61

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<220>

<223> rF1 重链

<400> 61

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

<210> 62

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<220>

<223> rF1 A114C

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

<210> 63

<211> 110

[0026]

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<220>

<223> rF1 重链

<400> 63

```

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

```

<210> 64

<211> 104

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<220>

<223> rF1 轻链

<400> 64

```

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

```

[0027]

<210> 65
 <211> 104
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建物

<220>
 <223> rF1 轻链

<400> 65

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

<210> 66
 <211> 104
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建物

<220>
 <223> rF1 重链

<400> 66

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

[0028]

Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro
				100				105				110	

aMRSA F1 克隆

NB: CDR 编号方式依照 Kabat 等 (1991)

重链

自下列基因区段重组得到:

IGHV3-23*01

IGHD6-19*01

IGHJ4*02

氨基酸:

Fw1 EVQLLES G GGLVQPGGSLRLSCAASGFTLS

CDR1 RFAMS

Fw2 WVRQAPGRGLEWVA

CDR2 SINNGNNPYYARSVQY

Fw3 RFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAK

CDR3 DHPSSGWPFFDS

Fw4 WGP GTLVTVSS

核苷酸:

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

CDR1 cgc ttt gcc atg agc

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

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

图 1

Fw3 cgc ttc acc gtc tcc cgg gac gtc tcc cag aac act gtg tet ctg cag atg aac aac ctg aga gcc
gaa gac teg gcc aca tat ttc tgt gct aaa

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

Fw4 tgg ggc ccg gga acc ctg gtc acc gtc tcc teg

轻链

自下列基因区段重组得到:

IGKV1-5*03

IGKJ2*01

氨基酸:

Fw1 DIQLTQSPSALPASVGDRVSITC

CDR1 RASENVGDWLA

Fw2 WYRQKPGKAPNLLIY

CDR2 KTSILES

Fw3 GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYC

CDR3 QHYIRFPYT

Fw4 FGQGTKLEIKRTV

核苷酸:

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

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

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

CDR2 aag aca tet att cta gaa agt

图1(续)

FW3 ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc agt ggg tet ggg aca gaa ttc act etc acc atc agc agc
ctg cag cct gat gat ttt gca act tat tac tgt

CDR3 caa cac tat ata cgt ttc ccg tac act

FW4 ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc aaa cga act gtg

图 1(续)

F1 对来自不同革兰氏阳性细菌的 LTA 制备物的识别

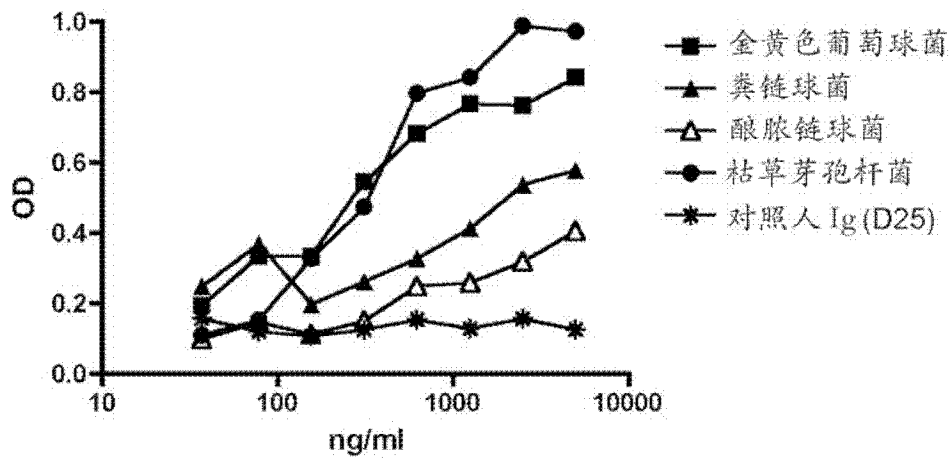


图 2A

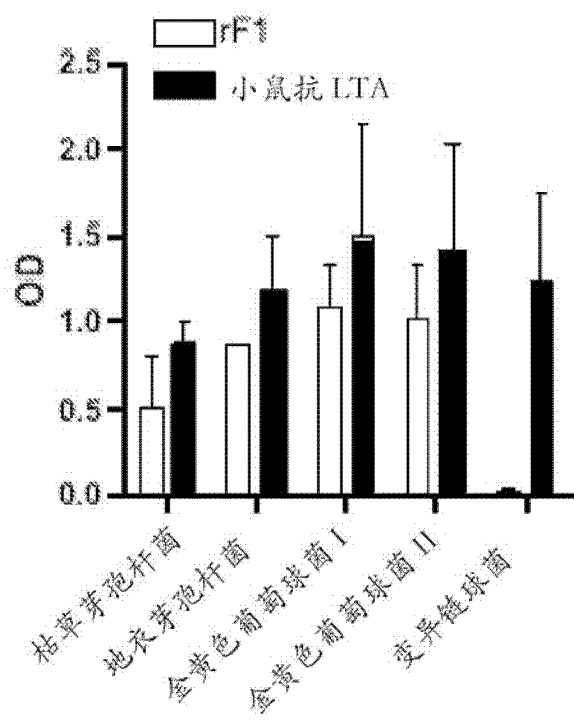


图 2B

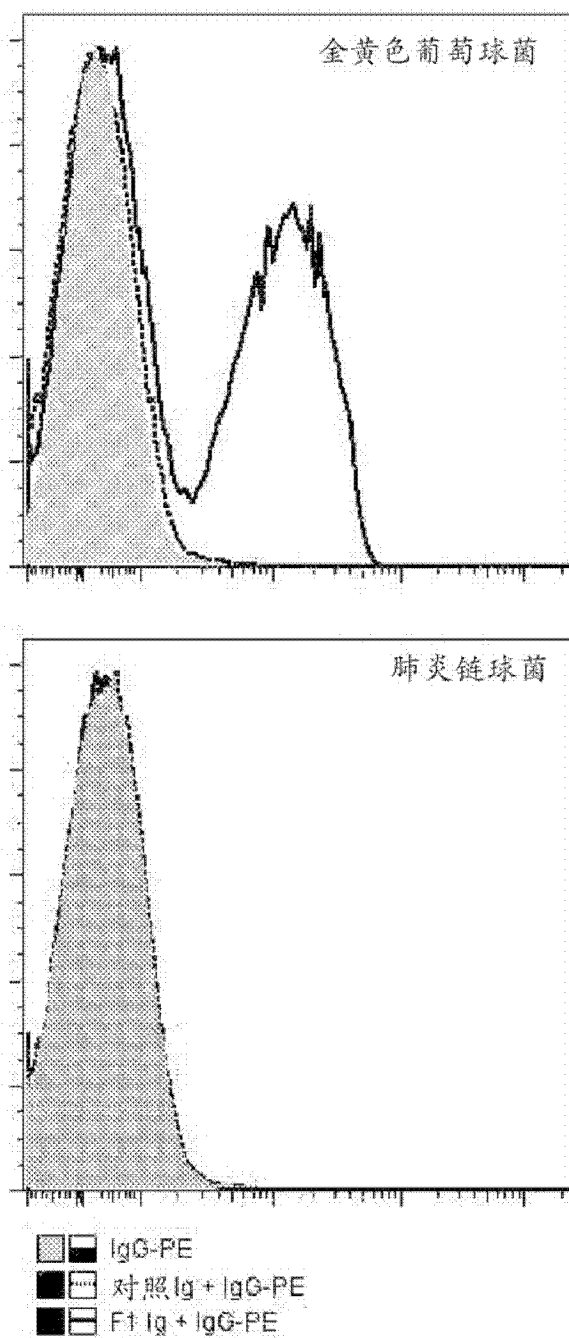


图 3A

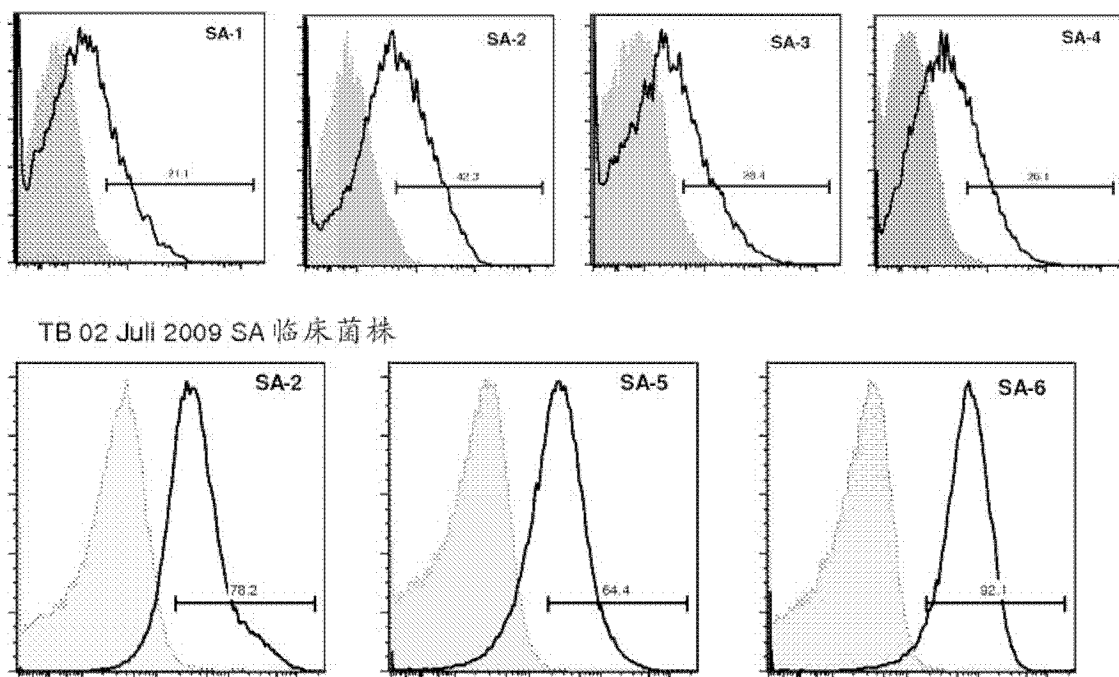


图 3B

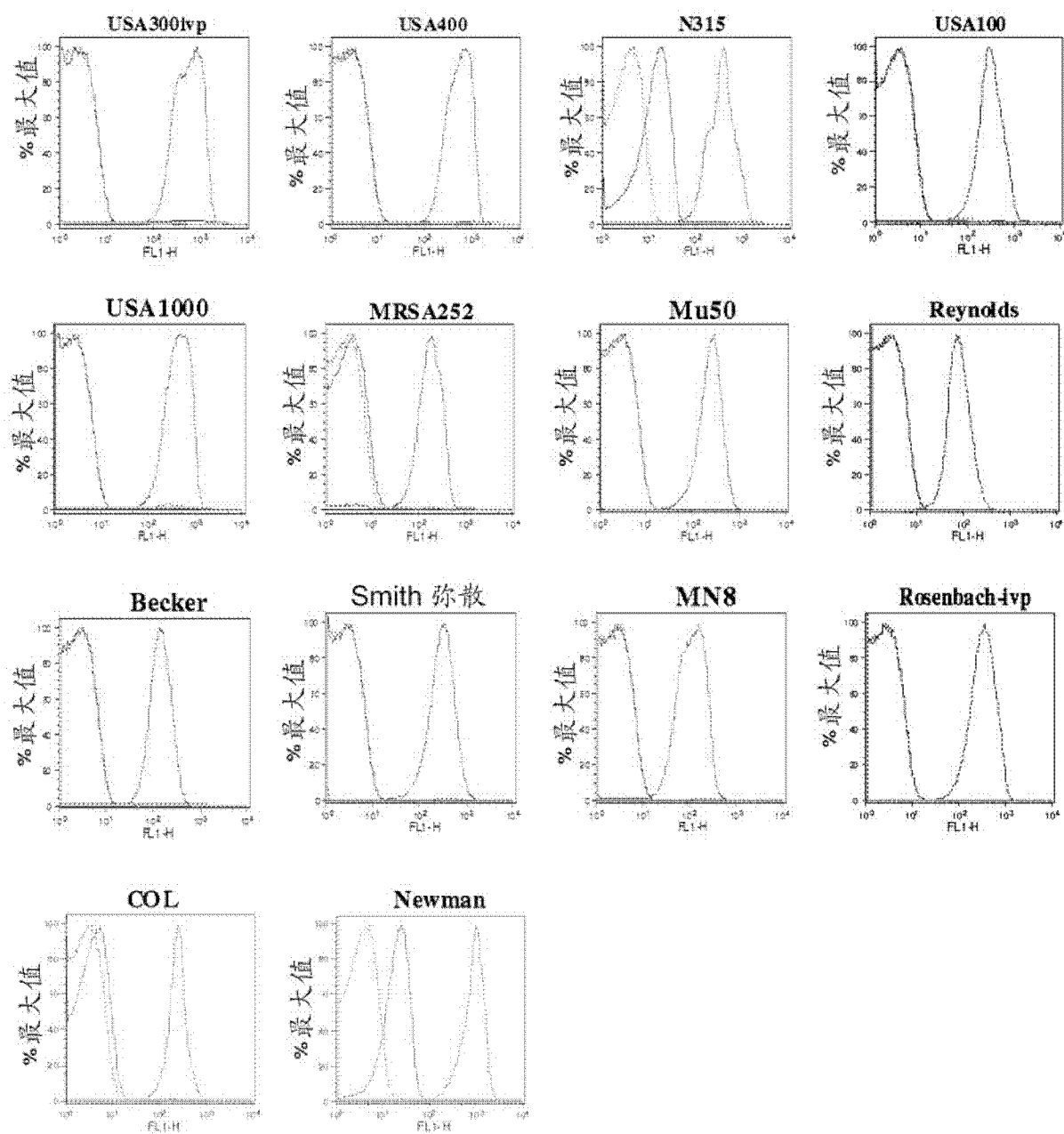


图 4A

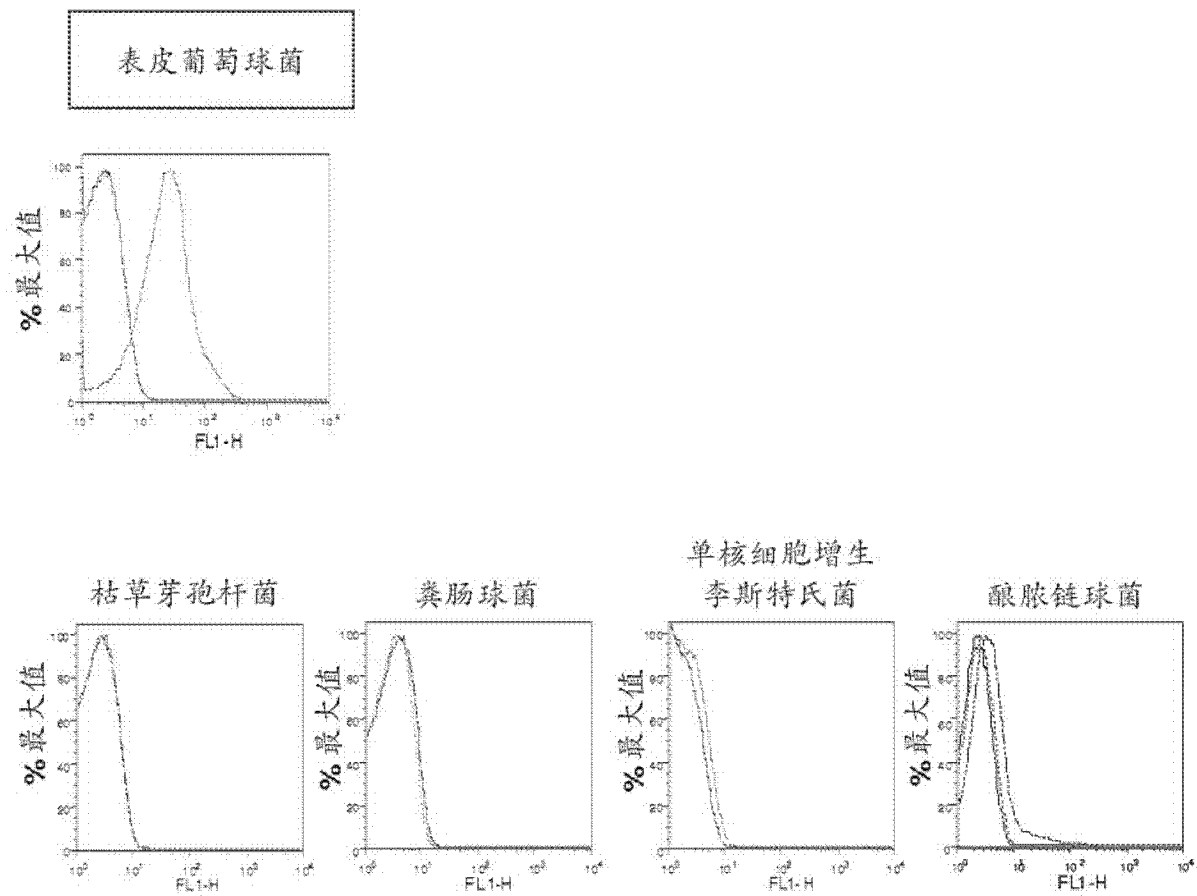


图 4B

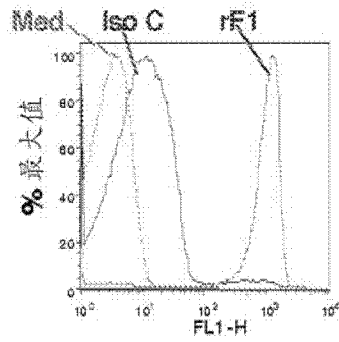
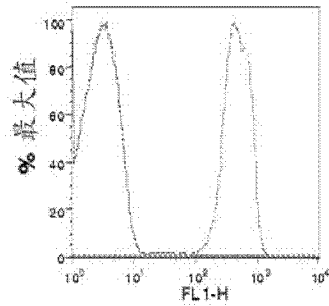
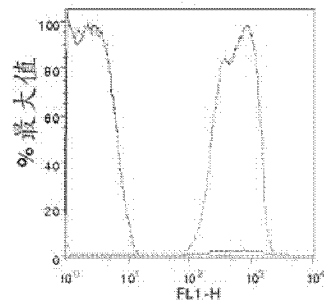
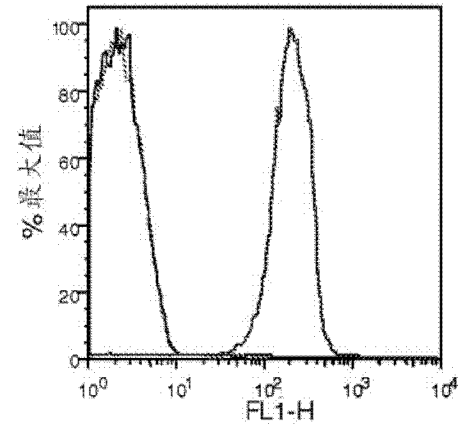
A体外 MRSA对数早期
(2h)指数期后
(8h)固体菌落
(琼脂)**rF1****B**体内 MRSA小鼠中的系统感染;
肾匀浆;
FACS 分析**rF1**

图 5

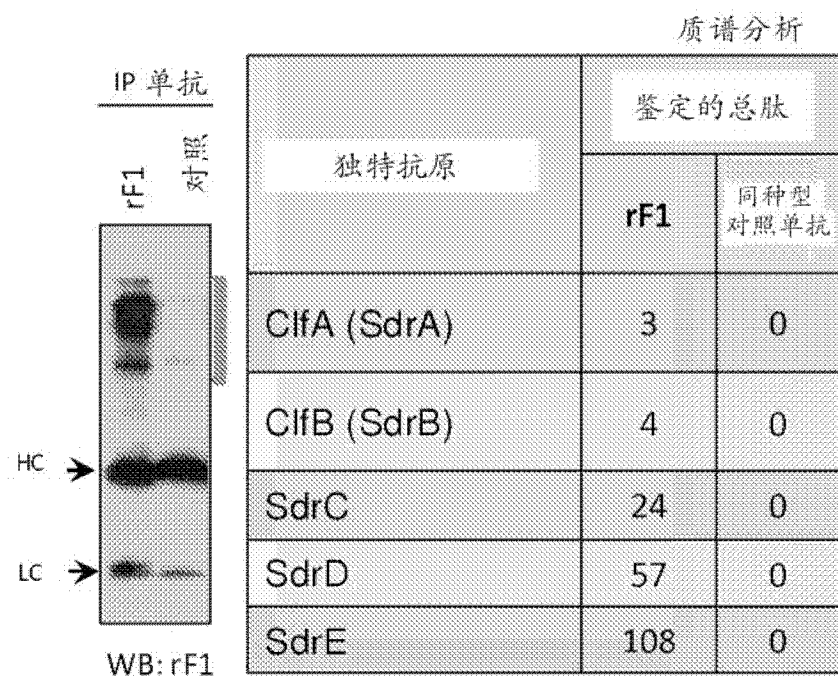


图 6A

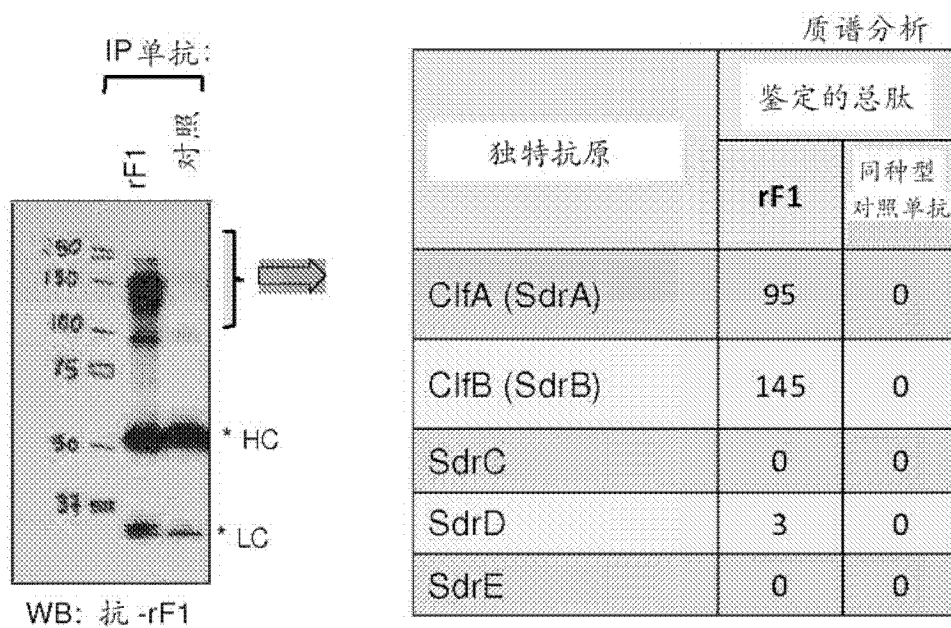


图 6B

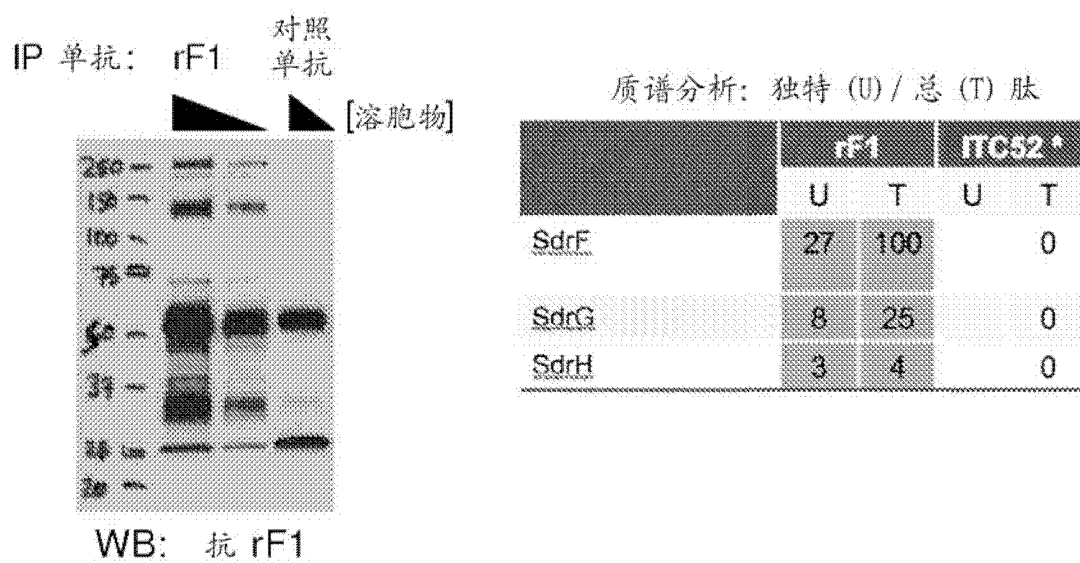


图 6C

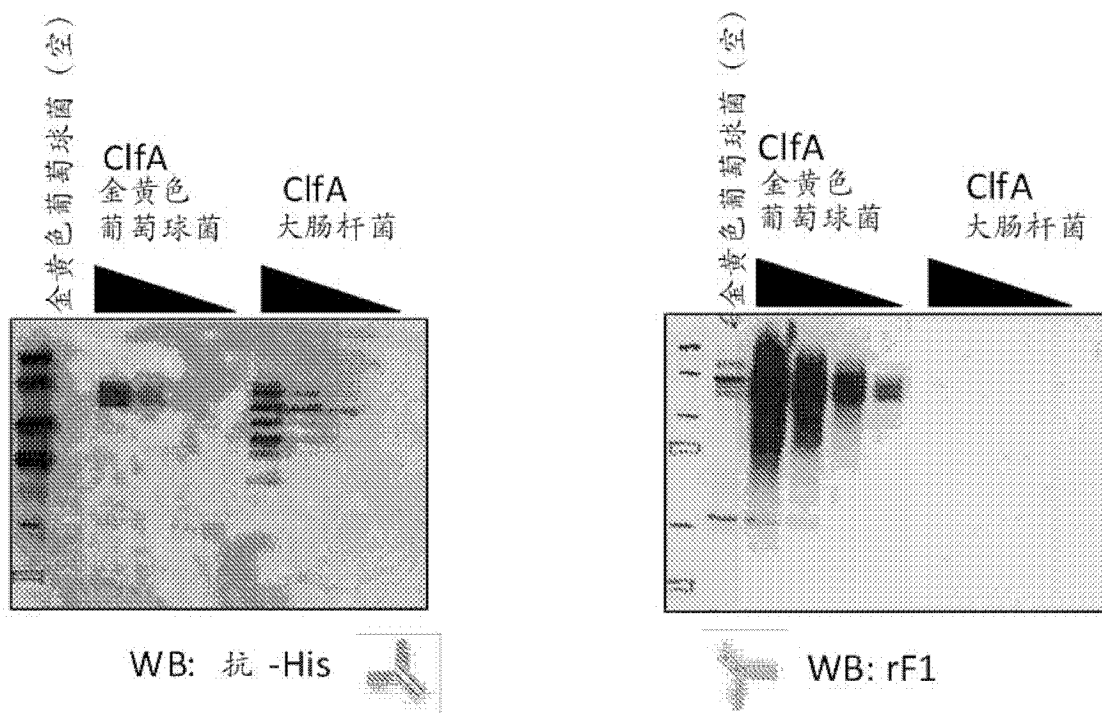


图 7A

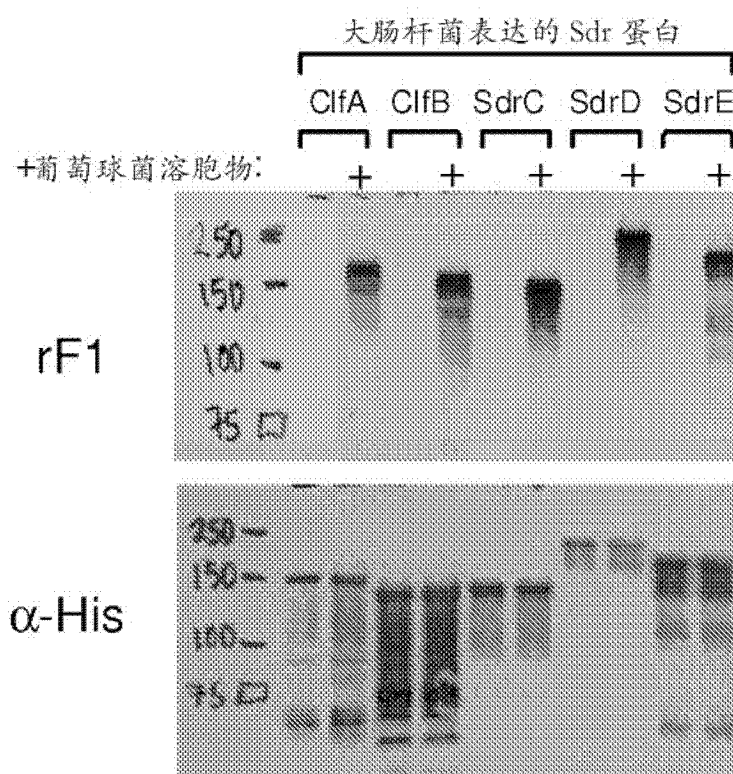


图 7B

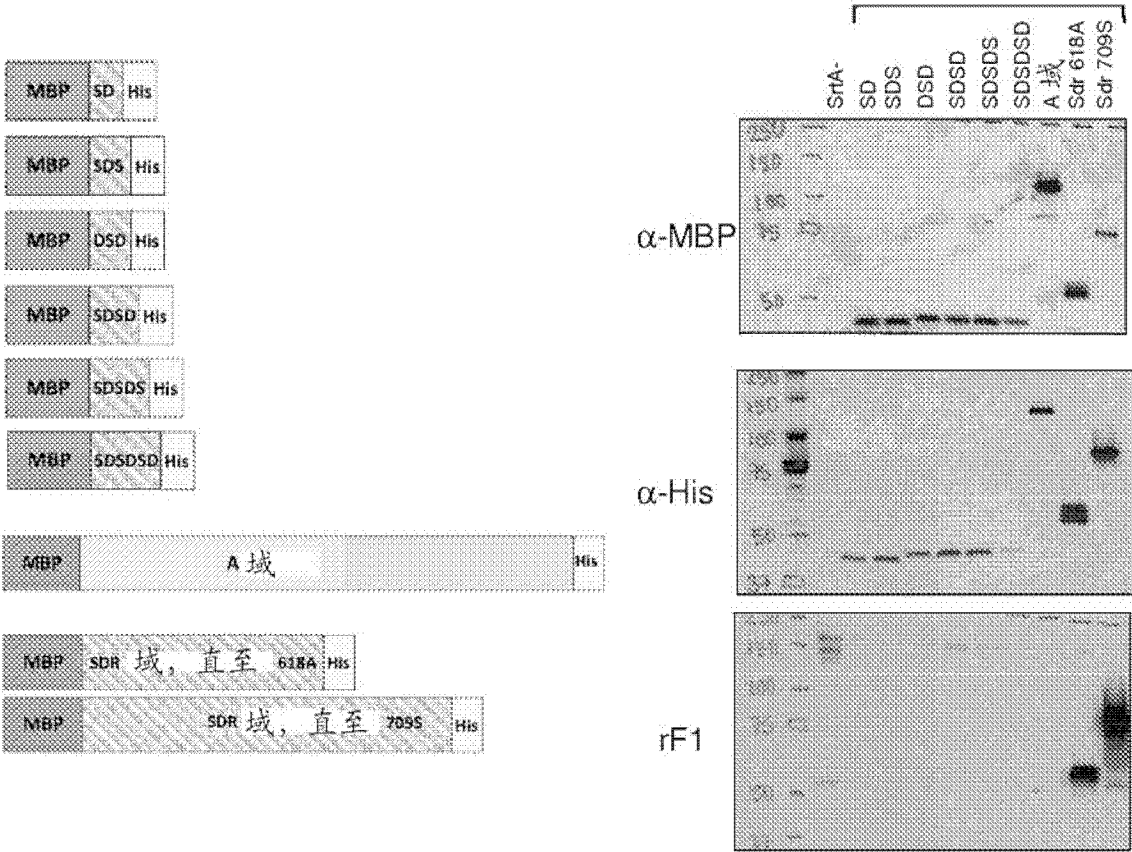


图 8

rF1重链 rF1A114C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	L	S	R	F	A	M
	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	L	S	R	F	A	M

rF1重链 rF1A114C	35	A	B	W	V	R	Q	A	P	G	R	G	L	E	W	V	A	S	I	N	A	B	C	N	G	N	N	P	Y	Y	A	R	S	V
	S	.	.	W	V	R	Q	A	P	G	R	G	L	E	W	V	A	S	I	N	A	B	C	N	G	N	N	P	Y	Y	A	R	S	V

rF1重链 rF1A114C	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	A	B	C	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94
	Q	Y	R	F	T	V	S	R	D	V	S	Q	N	T	V	S	L	Q	M	N	N	L	R	A	E	D	S	A	T	Y	F	C	A	K
	Q	Y	R	F	T	V	S	R	D	V	S	Q	N	T	V	S	L	Q	M	N	N	L	R	A	E	D	S	A	T	Y	F	C	A	K

rF1重链 rF1A114C	95	96	97	98	99	100	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	A	B	C	D
	D	H	P	S	S	G	W	P	T	.	.	.	.	.	.	.	F	D	S	W	G	P	G	T	L	V	T	V	S	S	.	.	.	.
	D	H	P	S	S	G	W	P	T	.	.	.	.	.	.	.	F	D	S	W	G	P	G	T	L	V	T	V	S	S	.	.	.	.

rF1重链 rF1A114C	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147
	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	.	.	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y
	C	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	.	.	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y

rF1重链 rF1A114C	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181
	F	P	E	P	V	T	V	.	S	W	.	.	.	.	N	S	G	A	L	T	S	G	.	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	.
	F	P	E	P	V	T	V	.	S	W	.	.	.	.	N	S	G	A	L	T	S	G	.	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	.

rF1重链 rF1A114C	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215
	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	.	.	Q	.	T	Y	I	C	N	V	N	H	K	P	S
	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	.	.	Q	.	T	Y	I	C	N	V	N	H	K	P	S

rF1重链 rF1A114C	216	217	218	219	A	220	221	222	223	A	B	C	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240				
	N	T	K	V	.	D	K	R	.	.	.	.	.	V	E	P	K	S	C	.	D	.	.	K	T	H	T	C	P				
	N	T	K	V	.	D	K	R	.	.	.	.	.	V	E	P	K	S	C	.	D	.	.	K	T	H	T	C	P				

图 9A

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32		
D	I	Q	L	T	Q	S	P	S	A	L	P	A	S	V	G	D	R	V	S	I	T	C	R	A	S	E	.	.	N	V	G	D	W
D	I	Q	L	T	Q	S	P	S	A	L	P	A	S	V	G	D	R	V	S	I	T	C	R	A	S	E	.	.	N	V	G	D	W

33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
L	A	W	Y	R	Q	K	P	G	K	A	P	N	L	L	I	Y	K	T	S	I	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	E
L	A	W	Y	R	Q	K	P	G	K	A	P	N	L	L	I	Y	K	T	S	I	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	E

71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	
F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	D	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	H	Y	M	R	F	P	.	.	.	F	G	Q	G	T
F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	D	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	H	Y	M	R	F	P	.	.	.	F	G	Q	G	T

103	104	105	106	107	107a	108	109	A	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	A	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137
K	L	E	I	K	.	R	.	.	A	A	A	P	S	V	F	I	F	P	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	
K	V	E	I	K	.	R	.	.	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	

138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175
N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L
N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L

176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	A	207	208	209	210	211	212
S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	V	T	.	K	S	F	N	R	G
S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	V	T	.	K	S	F	N	R	G

213	214	215	216
E	C	.	.
E	C	.	.

--

FF1 轻链

FF1 V205C

FF1 轻链

FF1 V205C

FF1 轻链

FF1 V205C

FF1 轻链

FF1 V205C

FF1 轻链

FF1 V205C

FF1 轻链

FF1 V205C

FF1 轻链

FF1 V205C

FF1 轻链

FF1 V205C

FF1 轻链

FF1 V205C

图 9B