



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113966343 A

(43) 申请公布日 2022.01.21

(21) 申请号 202080042874.7

(22) 申请日 2020.06.10

(30) 优先权数据

62/860,146 2019.06.11 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.12.10

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/037008 2020.06.10

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/252029 EN 2020.12.17

(71) 申请人 瑞泽恩制药公司

地址 美国纽约州

(72) 发明人 C·基拉索斯 A·科皮

(74) 专利代理机构 北京市君合律师事务所
11517

代理人 吴瑜 张梦倩

(51) Int.Cl.

C07K 16/12 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/40 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

权利要求书5页 说明书48页
序列表42页

(54) 发明名称

结合PcrV的抗PcrV抗体、包含抗PcrV抗体的
组合物及其使用方法

(57) 摘要

本公开提供了结合至铜绿假单胞菌PcrV的
抗体和抗体的抗原结合片段,以及它们的使用方
法。根据某些实施方案,本公开包括结合PcrV的
抗体和抗体的抗原结合片段。所述抗PcrV抗体和
抗原结合片段可用于预防和治疗铜绿假单胞菌
感染。

1. 一种特异性结合至铜绿假单胞菌PcrV的分离的重组抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段具有以下特征中的一者或多者:

(a) 包含三个重链互补决定区(CDR)(HCDR1、HCDR2和HCDR3),所述重链互补决定区被包含在选自由SEQ ID NO:34、50、2和18组成的组的重链可变区(HCVR)序列中的任一者内;以及三个轻链CDR(LCDR1、LCDR2和LCDR3),所述轻链CDR被包含在选自由SEQ ID NO:42、58、10和26组成的组的轻链可变区(LCVR)序列中的任一者内;

(b) 是完全人单克隆抗体;

(c) 以小于 10^{-8} 的解离常数(K^D)结合至全长PcrV,如在25°C下通过表面等离子共振测定法所测量;

(d) 以小于 10^{-8} 的解离常数(K^D)结合至全长PcrV,如在37°C下通过表面等离子共振测定法所测量;

(e) 在细胞毒性测定法中,展示出以约 10^{-11} M至约 10^{-8} M范围内的 IC_{50} 中和铜绿假单胞菌菌株6077;

(f) 在细胞毒性测定法中,展示出以约 10^{-9} M至约 10^{-7} M范围内的 IC_{50} 中和铜绿假单胞菌菌株ATCC 700888;

(g) 在溶血测定法中,展示出以约 10^{-10} M至约 10^{-6} M范围内的 IC_{50} 中和铜绿假单胞菌菌株6077;

(h) 在溶血测定法中,展示出以约 10^{-10} M至约 10^{-7} M范围内的 IC_{50} 中和铜绿假单胞菌菌株ATCC 700888;

(i) 在急性肺炎模型中,相对于未经治疗的小鼠,降低以5mg/kg预防性治疗的小鼠中由铜绿假单胞菌菌株6206或菌株6077导致的死亡率;

(j) 在急性肺炎模型中,相对于未经治疗的小鼠,降低以1.0、0.2或0.04mg/kg预防性治疗的小鼠中由铜绿假单胞菌菌株6206或菌株6077导致的死亡率;

(k) 在急性肺炎模型中,相对于未经治疗的小鼠,降低以0.1mg/kg或0.2mg/kg预防性治疗的小鼠中铜绿假单胞菌菌株6206的肺细菌负荷;

(l) 在急性肺炎模型中,相对于未经治疗的小鼠,降低以25mg/kg预防性治疗的小鼠中铜绿假单胞菌菌株PA01的肺细菌负荷;以及/或者

(m) 与参考抗体交叉竞争,其中所述参考抗体包含重链可变区(HCVR)氨基酸序列和轻链可变区(LCVR)氨基酸序列,其选自由表1的所述HCVR氨基酸序列和所述LCVR氨基酸序列中的任一者组成的组。

2. 一种特异性结合至铜绿假单胞菌PcrV的分离的重组抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段具有以下特征中的一者或多者:

(a) 包含三个重链互补决定区(CDR)(HCDR1、HCDR2和HCDR3),所述重链互补决定区被包含在选自由SEQ ID NO:34、50、2和18组成的组的重链可变区(HCVR)序列中的任一者内;以及三个轻链CDR(LCDR1、LCDR2和LCDR3),所述轻链CDR被包含在选自由SEQ ID NO:42、58、10和26组成的组的轻链可变区(LCVR)序列中的任一者内;

(b) 以小于约 10^{-8} M的 EC^{50} 结合至全长PcrV;

(c) 以小于约 10^{-8} M的 EC^{50} 结合至PcrV 136-233(SEQ ID NO:81);

(d) 与至少一个选自由以下项组成的组的氨基酸序列相互作用:(i) 在SEQ ID NO:78的

约第150位至约第170位的范围内的氨基酸残基和(ii)在SEQ ID NO:78的约第155位至约第170位的范围内的氨基酸残基;以及/或者

(e)与至少一个选自由以下项组成的组的氨基酸序列相互作用:SEQ ID NO:85和SEQ ID NO:86。

3.如权利要求1或2中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其包含HCVR,所述HCVR具有选自由以下项组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:34、50、2和18。

4.如权利要求1至3中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其包含LCVR,所述LCVR具有选自由以下项组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:42、58、10和26。

5.如权利要求1至4中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其包含:

(a)HCDR1结构域,其具有选自由以下项组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:36、52、4和20;

(b)HCDR2结构域,其具有选自由以下项组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:38、54、6和22;

(c)HCDR3结构域,其具有选自由以下项组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:40、56、8和24;

(d)LCDR1结构域,其具有选自由以下项组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:44、60、12和28;

(e)LCDR2结构域,其具有选自由以下项组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:46、62、14和30;以及

(f)LCDR3结构域,其具有选自由以下项组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:48、64、16和32。

6.如权利要求1至5中任一项所述的分离的抗体或抗原结合片段,其包含HCVR/LCVR氨基酸序列对,所述HCVR/LCVR氨基酸序列对选自由以下项组成的组:SEQ ID NO:34/42、50/58、2/10和18/26。

7.如权利要求6所述的分离的抗体或抗原结合片段,其包含HCVR/LCVR氨基酸序列对,所述HCVR/LCVR氨基酸序列对选自由以下项组成的组:SEQ ID NO:34/42和50/58。

8.如权利要求1至7中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其包含SEQ ID NO:36的HCDR1氨基酸序列;SEQ ID NO:38的HCDR2氨基酸序列;SEQ ID NO:40的HCDR3氨基酸序列;SEQ ID NO:44的LCDR1氨基酸序列;SEQ ID NO:46的LCDR2氨基酸序列;和SEQ ID NO:48的LCDR3氨基酸序列。

9.如权利要求1至7中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其包含SEQ ID NO:52的HCDR1氨基酸序列;SEQ ID NO:54的HCDR2氨基酸序列;SEQ ID NO:56的HCDR3氨基酸序列;SEQ ID NO:60的LCDR1氨基酸序列;SEQ ID NO:62的LCDR2氨基酸序列;和SEQ ID NO:64的LCDR3氨基酸序列。

10.如权利要求1至7中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其包含SEQ ID NO:4的HCDR1氨基酸序列;SEQ ID NO:6的HCDR2氨基酸序列;SEQ ID NO:8的HCDR3氨基酸序列;SEQ ID NO:12的LCDR1氨基酸序列;SEQ ID NO:14的LCDR2氨基酸序列;和SEQ ID NO:16的LCDR3氨基酸序列。

11.如权利要求1至7中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其包含SEQ ID

NO:20的HCDR1氨基酸序列;SEQ ID NO:22的HCDR2氨基酸序列;SEQ ID NO:24的HCDR3氨基酸序列;SEQ ID NO:28的LCDR1氨基酸序列;SEQ ID NO:30的LCDR2氨基酸序列;和SEQ ID NO:32的LCDR3氨基酸序列。

12. 一种与参考抗体或抗原结合片段竞争与PcrV的结合的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其包含:HCVR的CDR,其中所述HCVR具有选自由以下项组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:34、50、2和18;以及LCVR的CDR,其中所述LCVR具有选自由以下项组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:42、58、10和26。

13. 如权利要求12所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段与所述参考抗体或其抗原结合片段竞争与PcrV 136-233 (SEQ ID NO:81) 的结合。

14. 一种与参考抗体或抗原结合片段结合至PcrV上的相同表位的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其包含:HCVR的CDR,其中所述HCVR包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:34、50、2和18;以及LCVR的CDR,其中所述LCVR包含选自由以下项组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:42、58、10和26。

15. 一种中和铜绿假单胞菌的方法,所述方法包括使被铜绿假单胞菌感染的细胞暴露于包含根据权利要求1至14中任一项所述的一种或多种抗PcrV抗体或其抗原结合片段的组合物,其中所述暴露导致对细胞死亡的增强保护。

16. 如权利要求15所述的方法,其中所述铜绿假单胞菌在体外或体内中和。

17. 如权利要求15所述的方法,其中当所述抗体单独使用时,或当所述抗体与一种或多种另外的治疗剂或抗铜绿假单胞菌的抗体组合使用时,观察到所述增强保护。

18. 如权利要求17所述的方法,其中所述一种或多种另外的治疗剂选自由以下项组成的组:抗生素、抗炎药物、抗铜绿假单胞菌的不同的抗体和可用于治疗共感染的治疗剂。

19. 如权利要求18所述的方法,其中所述一种或多种另外的治疗剂是可用于治疗共感染的治疗剂,并且其中所述共感染是金黄色葡萄球菌感染。

20. 如权利要求17所述的方法,其中所述一种或多种另外的治疗剂是不同的抗铜绿假单胞菌抗体。

21. 一种药物组合物,其包含一种或多种根据权利要求1至14中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段和药学上可接受的载剂或稀释剂。

22. 如权利要求21所述的药物组合物,其中所述一种或多种分离的抗体或其抗原结合片段包含HCVR/LCVR氨基酸序列对内的三个HCDR和三个LCDR,所述HCVR/LCVR氨基酸序列对选自由以下项组成的组:SEQ ID NO:34/42、50/58、2/10和18/26。

23. 如权利要求21所述的药物组合物,其中所述一种或多种分离的抗体或其抗原结合片段包含所述HCVR/LCVR氨基酸序列对,所述HCVR/LCVR氨基酸序列对选自由以下项组成的组:SEQ ID NO:34/42、50/58、2/10和18/26。

24. 如权利要求23所述的药物组合物,其中所述一种或多种分离的抗体或其抗原结合片段包含所述HCVR/LCVR氨基酸序列对,所述HCVR/LCVR氨基酸序列对选自由以下项组成的组:SEQ ID NO:34/42和50/58。

25. 如权利要求21所述的药物组合物,其中所述分离的抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:36的HCDR1氨基酸序列;SEQ ID NO:38的HCDR2氨基酸序列;SEQ ID NO:40的HCDR3氨基酸序列;SEQ ID NO:44的LCDR1氨基酸序列;SEQ ID NO:46的LCDR2氨基酸序列;和SEQ ID

NO:48的LCDR3氨基酸序列。

26. 如权利要求21所述的药物组合物,其中所述分离的抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:52的HCDR1氨基酸序列;SEQ ID NO:54的HCDR2氨基酸序列;SEQ ID NO:56的HCDR3氨基酸序列;SEQ ID NO:60的LCDR1氨基酸序列;SEQ ID NO:62的LCDR2氨基酸序列;和SEQ ID NO:64的LCDR3氨基酸序列。

27. 如权利要求21所述的药物组合物,其中所述分离的抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:4的HCDR1氨基酸序列;SEQ ID NO:6的HCDR2氨基酸序列;SEQ ID NO:8的HCDR3氨基酸序列;SEQ ID NO:12的LCDR1氨基酸序列;SEQ ID NO:14的LCDR2氨基酸序列;和SEQ ID NO:16的LCDR3氨基酸序列。

28. 如权利要求21所述的药物组合物,其中所述分离的抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:20的HCDR1氨基酸序列;SEQ ID NO:22的HCDR2氨基酸序列;SEQ ID NO:24的HCDR3氨基酸序列;SEQ ID NO:28的LCDR1氨基酸序列;SEQ ID NO:30的LCDR2氨基酸序列;和SEQ ID NO:32的LCDR3氨基酸序列。

29. 一种分离的多核苷酸分子,其包含编码如权利要求1至14中任一项所述的抗体的HCVR和/或LCVR的多核苷酸序列。

30. 一种载体,其包含如权利要求29所述的多核苷酸序列。

31. 一种细胞,其表达如权利要求30所述的载体。

32. 一种降低获得铜绿假单胞菌感染的风险的方法,所述方法包括将如权利要求1至14中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,或如权利要求21至28中任一项所述的药物组合物施用于处于较高的铜绿假单胞菌感染风险中的受试者。

33. 如权利要求32所述的方法,其中所述处于较高的铜绿假单胞菌感染风险中的受试者选自由以下受试者组成的组:接受手术的受试者、接受重大疾病的治疗的受试者、创伤患者、静脉内药物使用者、具有严重烧伤的受试者、使用呼吸机的受试者、使用导管的受试者、接受化疗的受试者、患有糖尿病的受试者、患有囊性纤维化的受试者、患有结核病的受试者、患有HIV的受试者、或免疫系统受损的受试者。

34. 一种降低患有铜绿假单胞菌感染的受试者的细菌载量的方法,所述方法包括将如权利要求1至14中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,或如权利要求21至28中任一项所述的药物组合物施用于所述受试者。

35. 一种增加患有铜绿假单胞菌感染的受试者,或处于铜绿假单胞菌感染风险中的受试者的存活率或存活可能性的方法,所述方法包括将如权利要求1至14中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,或如权利要求21至28中任一项所述的药物组合物施用于所述受试者。

36. 一种改善或降低铜绿假单胞菌感染的至少一种症状的严重性、持续时间或发生率的方法,所述方法包括将如权利要求1至14中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,或如权利要求21至28中任一项所述的药物组合物施用于对其有需要的受试者。

37. 如权利要求36所述的方法,其中所述至少一种症状选自由以下项组成的组:发热、发冷、头痛、疲劳、关节疼痛、僵硬、肌痛、腹泻、呕吐、疼痛、瘙痒、耳液排出、皮疹、皮肤上的充满脓液的突起、眼痛、眼部发红、肺炎、咳嗽、充血、软组织排出绿色脓液、甜水果味和泌尿道感染。

38. 如权利要求36所述的方法,其中所述药物组合物预防性地或治疗性地施用于所述对其有需要的受试者。

39. 如权利要求36所述的方法,其中所述受试者选自由以下受试者组成的组:接受手术的受试者、接受重大疾病的治疗的受试者、创伤患者、静脉内药物使用者、具有严重烧伤的受试者、使用呼吸机的受试者、使用导管的受试者、接受化疗的受试者、患有糖尿病的受试者、患有囊性纤维化的受试者、患有结核病的受试者、患有HIV的受试者、或免疫系统受损的受试者。

40. 如权利要求36所述的方法,其中所述对其有需要的受试者患有铜绿假单胞菌感染。

41. 如权利要求36所述的方法,其中所述受试者处于感染铜绿假单胞菌的风险中。

42. 如权利要求40所述的方法,其中所述受试者患有金黄色葡萄球菌感染。

43. 如权利要求32至42中任一项所述的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段或者包含所述抗体或其抗原结合片段的所述药物组合物与第二治疗剂组合施用。

44. 如权利要求43所述的方法,其中所述第二治疗剂选自由以下项组成的组:抗生素、抗炎药物(例如皮质类固醇和非甾体抗炎药物)和针对铜绿假单胞菌的不同抗体。

45. 如权利要求32至42中任一项所述的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段或者包含所述抗体或其抗原结合片段的所述药物组合物皮下、静脉内、皮内、肌肉内、鼻内或口服施用。

46. 如权利要求40所述的方法,其中所述受试者患有肺炎、菌血症、骨感染、关节感染、皮肤感染、烧伤感染、伤口感染或它们的任何组合。

47. 如权利要求40所述的方法,其中所述铜绿假单胞菌对抗生素具有抗性或部分抗性。

48. 一种增加患有囊性纤维化的受试者的存活率或存活可能性的方法,所述方法包括将如权利要求1至14中任一项所述的至少一种抗体或抗原结合片段,或者如权利要求21至28中任一项所述的药物组合物施用于对其有需要的受试者。

49. 如权利要求48所述的方法,其中所述受试者在施用不具有肺炎症状。

结合PcrV的抗PcrV抗体、包含抗PcrV抗体的组合物及其使用方法

技术领域

[0001] 本发明部分地提供了特异性结合PcrV的抗体、双特异性抗体及其抗原结合片段，以及用于治疗铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 感染的组合物和方法。

[0002] 序列表

[0003] 序列表的正式副本以ASCII格式的序列表与说明书同时通过EFS-Web以电子方式提交，文件名为“10494W001_SEQ_LIST_ST25.txt”，创建日期为2020年6月10日，大小为约76KB。包含在该ASCII格式文档中的序列表是说明书的一部分，并通过引用整体并入本文。

背景技术

[0004] 铜绿假单胞菌是一种存在于多种环境中的革兰氏阴性杆菌。仅需要简单的营养，铜绿假单胞菌即可在蒸馏水中生长，并且在乙酸盐培养基和硫酸铵培养基中生长良好。它可以在高达42°C的温度下生长，并且对高浓度的盐、弱防腐剂和很多抗生素具有耐受性。

[0005] 该细菌是一种机会性病原体，是主要的健康问题，通常具有耐药性，并且导致社区获得性和院内感染。此类细菌感染可以是严重且危及生命的，其中肺炎是最令人关注的表现之一。细菌很少在健康的人和动物中引起疾病，但是对于危重症或免疫受损的个体来说是一个显著的问题。例如，在患有囊性纤维化 (CF) 的个体中，铜绿假单胞菌感染是一个主要问题，它会导致由细菌的复发性和慢性呼吸道感染引起的进行性肺损伤。其他处于风险中的患者包括使用机械呼吸机的患者、结核病患者、中性粒细胞减少症患者和烧伤受害者。

[0006] 细菌3型分泌系统 (T3SS) 是革兰氏阴性菌的重要毒力因子。T3SS是跨过完整细菌细胞壁的复杂多蛋白结构。只有两种蛋白质能够接近抗体：单筒均聚物形成蛋白和针尖蛋白。铜绿假单胞菌的V尖蛋白 (PcrV) 是很多革兰氏阴性菌T3SS常见的V尖蛋白的实例。PcrV定位于T3SS蛋白的末端，在针尖上形成五聚体环型结构。

[0007] T3SS的中空针样分子结构通过将毒素 (ExoS、ExoT、ExoU和ExoY) 易位至真核细胞中来发挥作用，从而导致细胞死亡和裂解。然而，易位孔本身足以通过孔介导的膜渗透性增加直接导致感染细胞的死亡，或通过广泛细胞防御反应的活化间接导致感染细胞的死亡。通过杀死白细胞和上皮细胞以及触发炎症，T3SS毒力机制使铜绿假单胞菌能够逃避人类免疫防御。

[0008] 对于治疗或预防铜绿假单胞菌感染的改善的抗生素药物，仍存在显著的未满足的医学需求。

发明内容

[0009] 本文提供了结合铜绿假单胞菌的V尖蛋白 (PcrV) 的抗体及其抗原结合片段。此类抗体可用于抑制或中和细菌3型分泌系统 (T3SS) 在铜绿假单胞菌中的活性。在一些实施方案中，所述抗体可用于阻断毒素从所述细菌至宿主细胞的易位和/或用于预防所述宿主细胞的死亡。在一些实施方案中，所述抗体通过阻断所述宿主细胞中的孔介导的膜渗透性来

发挥功能。

[0010] 在某些实施方案中,所述抗体可用于预防、治疗或改善受试者的铜绿假单胞菌感染的至少一种症状。在某些实施方案中,所述抗体可以预防性地或治疗性地施用于患有铜绿假单胞菌感染或处于获得铜绿假单胞菌感染风险中的患者。在某些实施方案中,含有本公开的至少一种抗体的组合物可以施用于患有铜绿假单胞菌感染的患者。在某些实施方案中,含有本公开的至少一种抗体的组合物可以施用于处于铜绿假单胞菌感染风险中的患者,例如,患有囊性纤维化的患者、患有糖尿病的患者、使用机械呼吸机的患者、接受手术的患者、患有结核病的患者、患有HIV的患者、免疫系统受损的患者、患有中性粒细胞减少的患者、使用留置导管的患者、身体创伤后的患者、烧伤患者、在重症监护室中的患者、卧床不起的患者、患有恶性肿瘤的患者、患有慢性阻塞性肺疾病的患者、在长期健康护理中心中的患者、或静脉内药物使用者。

[0011] 本文提供的抗体可以是全长的(例如,IgG1或IgG4抗体),或可以仅包含抗原结合部分(例如,Fab、F(ab')₂或scFv片段),并且可以被修饰以影响功能,例如消除残留的效应子功能(Reddy等人,2000,J. Immunol. 164:1925-1933)。在某些实施方案中,所述抗体可以是双特异性的。

[0012] 在一些方面,本公开提供了特异性结合至PcrV的分离的重组单克隆抗体或其抗原结合片段。此类抗体通常是所述T3SS的功能拮抗剂,即,所述抗体结合至PcrV并且抑制所述T3SS。

[0013] 在一个实施方案中,本发明提供了特异性结合至PcrV的分离的重组抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体具有以下特征中的一者或多者:

[0014] (a) 包含三个重链互补决定区(CDR)(HCDR1、HCDR2和HCDR3),所述重链互补决定区被包含在选自SEQ ID NO:2、18、34和50组成的组的重链可变区(HCVR)序列中的任一者内;以及三个轻链CDR(LCDR1、LCDR2和LCDR3),所述轻链CDR被包含在选自SEQ ID NO:10、26、42和58组成的组的轻链可变区(LCVR)序列中的任一者内;

[0015] (b) 是完全人单克隆抗体;

[0016] (c) 以小于 10^{-8} 的解离常数(K^D)结合至全长PcrV,如在25°C下通过表面等离子共振测定法所测量;

[0017] (d) 以小于 10^{-8} 的解离常数(K^D)结合至全长PcrV,如在37°C下通过表面等离子共振测定法所测量;

[0018] (e) 在细胞毒性测定法中,展示出以约 10^{-11} M至约 10^{-8} M范围内的IC₅₀中和铜绿假单胞菌菌株6077;

[0019] (f) 在细胞毒性测定法中,展示出以约 10^{-9} M至约 10^{-7} M范围内的IC₅₀中和铜绿假单胞菌菌株ATCC 700888;

[0020] (g) 在溶血测定法中,展示出以约 10^{-10} M至约 10^{-6} M范围内的IC₅₀中和铜绿假单胞菌菌株6077;

[0021] (h) 在溶血测定法中,展示出以约 10^{-10} M至约 10^{-7} M范围内的IC₅₀中和铜绿假单胞菌菌株ATCC 700888;

[0022] (i) 在急性肺炎模型中,相对于未经治疗的小鼠,降低以5mg/kg预防性治疗的小鼠中由铜绿假单胞菌菌株6206或菌株6077导致的死亡率;

[0023] (j) 在急性肺炎模型中,相对于未经治疗的小鼠,降低以1.0、0.2或0.04mg/kg预防性治疗的小鼠中由铜绿假单胞菌菌株6206或菌株6077导致的死亡率;

[0024] (k) 在急性肺炎模型中,相对于未经治疗的小鼠,降低以0.1mg/kg或0.2mg/kg预防性治疗的小鼠中铜绿假单胞菌菌株6206的肺细菌负荷;

[0025] (l) 在急性肺炎模型中,相对于未经治疗的小鼠,降低以25mg/kg预防性治疗的小鼠中铜绿假单胞菌菌株PA01的肺细菌负荷;以及/或者

[0026] (m) 与参考抗体交叉竞争,其中所述参考抗体包含重链可变区(HCVR)氨基酸序列和轻链可变区(LCVR)氨基酸序列,其选自由表1的所述HCVR氨基酸序列和所述LCVR氨基酸序列中的任一者组成的组。

[0027] 在一些方面,所述分离的抗体或其抗原结合片段还具有以下特征中的一者或多者:

[0028] (n) 以小于约 10^{-8} M的 EC^{50} 结合至全长PcrV(SEQ ID NO:77);

[0029] (o) 以小于约 10^{-8} M的 EC^{50} 结合至PcrV 136-233(SEQ ID NO:81);

[0030] (p) 与至少一个选自由以下项组成的组的氨基酸序列相互作用:(i) 在SEQ ID NO:78的约第150位至约第170位的范围内的氨基酸残基和(ii) 在SEQ ID NO:78的约第155位至约第170位的范围内的氨基酸残基;以及/或者

[0031] (q) 与至少一个选自由以下项组成的组的氨基酸序列相互作用:SEQ ID NO:85和SEQ ID NO:86。

[0032] 本文提供的示例性抗PcrV抗体列于本文的表1、2和3中。表1列出了示例性抗PcrV抗体的重链可变区(HCVR)、轻链可变区(LCVR)、重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3)和轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2和LCDR3)的氨基酸序列标识符。表2列出了示例性抗PcrV抗体的HCVR、LCVR、HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3的核酸序列标识符。表3提供了若干示例性抗体的重链和轻链核酸和氨基酸序列。

[0033] 本文提供了包含HCVR的抗体或其抗原结合片段,所述HCVR包含选自表1中列出的所述HCVR氨基酸序列中的任一者的氨基酸序列,或者与它们具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性的它们的基本上相似的序列。在一些方面,所述抗体或其抗原结合片段包含HCVR,所述HCVR具有选自由以下项组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:2、18、34和50。

[0034] 还提供了包含LCVR的抗体或其抗原结合片段,所述LCVR包含选自表1中列出的所述LCVR氨基酸序列中的任一者的氨基酸序列,或者与它们具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性的它们的基本上相似的序列。在一些方面,所述抗体或其抗原结合片段包含LCVR,所述LCVR具有选自由以下项组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:10、26、42和58。

[0035] 本文提供了包含HCVR和LCVR氨基酸序列对(HCVR/LCVR)的抗体或其抗原结合片段,所述HCVR和LCVR氨基酸序列对包含与表1中列出的所述LCVR氨基酸序列中的任一者配对的表1中列出的所述HCVR氨基酸序列中的任一者。根据某些实施方案,本公开提供了包含表1中列出的所述示例性抗PcrV抗体中的任一者中所含有的HCVR/LCVR氨基酸序列对的抗体或其抗原结合片段。

[0036] 在一个实施方案中,所述分离的抗体或其抗原结合片段包含选自由以下项组成的

组的HCVR/LCVR氨基酸序列对:SEQ ID NO:2/10、18/26、34/42和50/58。

[0037] 在一个实施方案中,所述分离的抗体或其抗原结合片段包含:

[0038] (a)HCDR1结构域,其具有选自由以下项组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:4、20、36和52;

[0039] (b)HCDR2结构域,其具有选自由以下项组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:6、22、38和54;

[0040] (c)HCDR3结构域,其具有选自由以下项组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:8、24、40和56;

[0041] (d)LCDR1结构域,其具有选自由以下项组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:12、28、44和60;

[0042] (e)LCDR2结构域,其具有选自由以下项组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:14、30、46和62;以及

[0043] (f)LCDR3结构域,其具有选自由以下项组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:16、32、48和64。

[0044] 在某些实施方案中,所述HCVR/LCVR氨基酸序列对选自由以下项组成的组:SEQ ID NO:2/10 (H1H29329P)、18/26 (H1H29332P)、34/42 (H1H29336P) 和50/58 (H1H29339P)。

[0045] 本文还提供了包含重链CDR1 (HCDR1)的抗体或其抗原结合片段,所述重链CDR1包含选自表1中列出的所述HCDR1氨基酸序列中的任一者的氨基酸序列,或者与它们具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性的它们的基本上相似的序列。

[0046] 本文还提供了包含重链CDR2 (HCDR2)的抗体或其抗原结合片段,所述重链CDR2包含选自表1中列出的所述HCDR2氨基酸序列中的任一者的氨基酸序列,或者与它们具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性的它们的基本上相似的序列。

[0047] 本文还提供了包含重链CDR3 (HCDR3)的抗体或其抗原结合片段,所述重链CDR3包含选自表1中列出的所述HCDR3氨基酸序列中的任一者的氨基酸序列,或者与它们具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性的它们的基本上相似的序列。

[0048] 本文还提供了包含轻链CDR1 (LCDR1)的抗体或其抗原结合片段,所述轻链CDR1包含选自表1中列出的所述LCDR1氨基酸序列中的任一者的氨基酸序列,或者与它们具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性的它们的基本上相似的序列。

[0049] 本文还提供了包含轻链CDR2 (LCDR2)的抗体或其抗原结合片段,所述轻链CDR2包含选自表1中列出的所述LCDR2氨基酸序列中的任一者的氨基酸序列,或者与它们具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性的它们的基本上相似的序列。

[0050] 本文还提供了包含轻链CDR3 (LCDR3)的抗体或其抗原结合片段,所述轻链CDR3包含选自表1中列出的所述LCDR3氨基酸序列中的任一者的氨基酸序列,或者与它们具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性的它们的基本上相似的序列。

[0051] 本文还提供了包含HCDR3和LCDR3氨基酸序列对 (HCDR3/LCDR3)的抗体或其抗原结合片段,所述HCDR3和LCDR3氨基酸序列对包含与表1中列出的所述LCDR3氨基酸序列中的任一者配对的表1中列出的所述HCDR3氨基酸序列中的任一者。根据某些实施方案,本公开提供了包含表1中列出的所述示例性抗PcrV抗体中的任一者中所含有的HCDR3/LCDR3氨基酸序列对的抗体或其抗原结合片段。在某些实施方案中,所述HCDR3/LCDR3氨基酸序列对选自

由以下项组成的组:SEQ ID NO:2/10 (H1H29329P)、18/26 (H1H29332P)、34/42 (H1H29336P) 和50/58 (H1H29339P)。

[0052] 本文还提供了包含一组六个CDR(即,HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3)的抗体或其抗原结合片段,所述CDR被包含在表1中列出的所述的示例性抗PcrV抗体中的任一者内。在某些实施方案中,所述HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3氨基酸序列组选自由以下项组成的组:SEQ ID NO:4-6-8-12-14-16(例如,H1H29329P)、SEQ ID NO:20-22-24-28-30-32(例如,H1H29332P)、SEQ ID NO:36-38-40-44-46-48(例如,H1H29336P)和SEQ ID NO:52-54-56-60-62-64(例如,H1H29339P)。

[0053] 在一个相关实施方案中,本发明提供了包含一组六个CDR(即,HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3)的抗体或其抗原结合片段,所述CDR被包含在表1中列出的所述示例性抗PcrV抗体中的任一者所定义的HCVR/LCVR氨基酸序列对内。例如,本公开包括包含所述HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3氨基酸序列组的抗体或其抗原结合片段,所述氨基酸序列组被包含在选自由以下项组成的组的HCVR/LCVR氨基酸序列对内:SEQ ID NO:2/10(例如,H1H29329P)、SEQ ID NO:18/26(例如,H1H29332P)、SEQ ID NO:34/42(例如,H1H29336P)和SEQ ID NO:50/58(例如,H1H29339P)。用于鉴别在HCVR和LCVR氨基酸序列内的CDR的方法和技术是本领域众所周知的,且可以用于鉴别在本文公开的指定HCVR和/或LCVR氨基酸序列内的CDR。可以用于鉴别CDR的边界的示例性惯例包括,例如,Kabat定义、Chothia定义和AbM定义。一般来说,Kabat定义基于序列差异,Chothia定义基于结构环区域的位置,并且AbM定义是Kabat和Chothia方法之间的折衷方案。参见例如,Kabat,“Sequences of Proteins of Immunological Interest,”National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991);Al-Lazikani等人,J.Mol.Biol.273:927-948(1997);和Martin等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:9268-9272(1989)。公共数据库也可以用于鉴别抗体内的CDR序列。

[0054] 本文还提供了具有表3中提供的所述重链氨基酸序列中的任一者和/或表3中提供的所述轻链氨基酸序列中的任一者的抗体。

[0055] 本文提供了包含HC的抗体,所述HC包含选自表3中列出的所述HC氨基酸序列中的任一者的氨基酸序列,或者与它们具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性的它们的基本上相似的序列。

[0056] 还提供了包含LC的抗体,所述LC包含选自表3中列出的所述LC氨基酸序列中的任一者的氨基酸序列,或者与它们具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性的它们的基本上相似的序列。

[0057] 本文提供了包含HC和LC氨基酸序列对(HC/LC)的抗体,所述HC和LC氨基酸序列对包含与表3中列出的所述LC氨基酸序列中的任一者配对的表3中列出的所述HC氨基酸序列中的任一者。根据某些实施方案,本公开提供了包含表3中列出的所述示例性抗PcrV抗体中的任一者中所含有的HC/LC氨基酸序列对的抗体。

[0058] 在一个实施方案中,所述分离的抗体包含选自由以下项组成的组的HC/LC氨基酸序列对:SEQ ID NO:65/66、67/68、69/70和71/72。

[0059] 本公开包括具有经修饰的糖基化模式的抗PcrV抗体。在某些实施方案中,可以使用修饰以除去不希望的糖基化位点,或者缺乏在寡糖链上存在的岩藻糖部分的抗体,例如,

以增加抗体依赖性的细胞的细胞毒性 (ADCC) 功能 (参见Shield等人 (2002) JBC 277: 26733)。在其他应用中,可以进行半乳糖基化的修饰以改变补体依赖性的细胞毒性 (CDC)。

[0060] 本文还提供了与包含HCVR的所述CDR和LCVR的所述CDR的抗体及其抗原结合片段竞争铜绿假单胞菌PcrV的特异性结合的抗体及其抗原结合片段,其中所述HCVR和LCVR各自具有选自表1中列出的所述HCVR和LCVR序列的氨基酸序列。在一些方面,所述抗体或其抗原结合片段与所述参考抗体或其抗原结合片段竞争与PcrV 136-233 (SEQ ID NO:81) 的结合。

[0061] 还提供了与参考抗体或其抗原结合片段结合相同的铜绿假单胞菌PcrV表位的抗体及其抗原结合片段,其包含HCVR的CDR和LCVR的CDR,其中所述HCVR和LCVR各自具有选自表1中列出的所述HCVR和LCVR序列的氨基酸序列。在一些方面,所述表位包含PcrV 136-233的残基 (SEQ ID NO:81) 或PcrV 150-170的残基 (SEQ ID NO:86) 或PcrV 155-170的残基 (SEQ ID NO:85)。

[0062] 另外还提供了阻断毒素从细菌至宿主细胞的铜绿假单胞菌PcrV易位的分离的抗体及其抗原结合片段。另外还提供了阻断T3SS孔介导的宿主细胞膜渗透性增加的分离的抗体及其抗原结合片段。

[0063] 在某些实施方案中,本公开的抗体或抗原结合片段是双特异性的,所述双特异性包括与所述PcrV蛋白中的第一表位的第一结合特异性和与所述PcrV蛋白中的第二表位的第二结合特异性,其中所述第一表位和所述第二表位是不同的和非重叠的。在某些实施方案中,所述双特异性可以包含结合至所述PcrV蛋白中的表位的第一臂和结合至不同的铜绿假单胞菌抗原的第二臂。

[0064] 在另一个方面,本文提供了编码抗PcrV抗体或其部分的核酸分子。例如,本公开提供了编码表1中列出的HCVR氨基酸序列中的任一者的核酸分子;在某些实施方案中,所述核酸分子包含选自表2中列出的HCVR核酸序列中的任一者的多核苷酸序列,或者与它们具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性的它们的基本上相似的序列。

[0065] 本文还提供了编码表1中列出的所述LCVR氨基酸序列中的任一者的核酸分子;在某些实施方案中,所述核酸分子包含选自表2中列出的所述LCVR核酸序列中的任一者的多核苷酸序列,或者与它们具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性的它们的基本上相似的序列。

[0066] 本文还提供了编码表1中列出的所述HCDR1氨基酸序列中的任一者的核酸分子;在某些实施方案中,所述核酸分子包含选自表2中列出的所述HCDR1核酸序列中的任一者的多核苷酸序列,或者与它们具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性的它们的基本上相似的序列。

[0067] 本文还提供了编码表1中列出的所述HCDR2氨基酸序列中的任一者的核酸分子;在某些实施方案中,所述核酸分子包含选自表2中列出的所述HCDR2核酸序列中的任一者的多核苷酸序列,或者与它们具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性的它们的基本上相似的序列。

[0068] 本文还提供了编码表1中列出的所述HCDR3氨基酸序列中的任一者的核酸分子;在某些实施方案中,所述核酸分子包含选自表2中列出的所述HCDR3核酸序列中的任一者的多核苷酸序列,或者与它们具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性的它们的基本上相似的序列。

[0069] 本文还提供了编码表1中列出的所述LCDR1氨基酸序列中的任一者的核酸分子;在某些实施方案中,所述核酸分子包含选自表2中列出的所述LCDR1核酸序列中的任一者的多核苷酸序列,或者与它们具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性的它们的基本上相似的序列。

[0070] 本文还提供了编码表1中列出的所述LCDR2氨基酸序列中的任一者的核酸分子;在某些实施方案中,所述核酸分子包含选自表2中列出的所述LCDR2核酸序列中的任一者的多核苷酸序列,或者与它们具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性的它们的基本上相似的序列。

[0071] 本文还提供了编码表1中列出的所述LCDR3氨基酸序列中的任一者的核酸分子;在某些实施方案中,所述核酸分子包含选自表2中列出的所述LCDR3核酸序列中的任一者的多核苷酸序列,或者与它们具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性的它们的基本上相似的序列。

[0072] 本文还提供了编码HCVR的核酸分子,其中所述HCVR包含一组三个CDR(即,HCDR1-HCDR2-HCDR3),其中所述HCDR1-HCDR2-HCDR3氨基酸序列组如表1中列出的所述示例性抗PcrV抗体中的任一者所定义。

[0073] 本文还提供了编码LCVR的核酸分子,其中所述LCVR包含一组三个CDR(即,LCDR1-LCDR2-LCDR3),其中所述LCDR1-LCDR2-LCDR3氨基酸序列组如表1中列出的所述示例性抗PcrV抗体中的任一者所定义。

[0074] 本文还提供了编码HCVR和LCVR二者的核酸分子,其中所述HCVR包含表1中列出的所述HCVR氨基酸序列中的任一者的氨基酸序列,并且其中所述LCVR包含表1中列出的所述LCVR氨基酸序列中的任一者的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述核酸分子包含选自表2中列出的HCVR核酸序列中的任一个的多核苷酸序列,或者与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性的其基本上相似的序列,以及选自表2中列出的LCVR核酸序列中的任一个的多核苷酸序列,或者与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性的其基本上相似的序列。在根据本公开的该方面的某些实施方案中,所述核酸分子编码HCVR和LCVR,其中所述HCVR和LCVR二者均衍生自表1中列出的相同的PcrV抗体。

[0075] 本文还提供了编码表1中列出的所述重链氨基酸序列中的任一者的核酸分子。本公开还提供了编码表1中列出的所述轻链氨基酸序列中的任一者的核酸分子。

[0076] 在一个相关方面,本文提供了能够表达包含抗PcrV抗体的重链或轻链可变区的多肽的重组表达载体。例如,本公开包括重组表达载体,所述重组表达载体包含上述核酸分子中的任一个,即编码表1中所示的HCVR、LCVR和/或CDR序列中的任一个的核酸分子。在本公开的范围内还包括的是引入了此类载体的宿主细胞,以及通过在允许抗体或抗体片段产生的条件下培养宿主细胞,并且回收如此产生的抗体和抗体片段,来产生抗体或其部分的方法。

[0077] 在另一个方面,本文提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含一种或多种特异性结合至如本文所公开的PcrV的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段以及药学上可接受的载剂或稀释剂。所述一种或多种分离的抗体可以包含选自由表1中列出的所述HCVR和LCVR序列组成的组的HCVR/LCVR氨基酸序列对内的所述CDR。所述一种或多种分离的抗体可以包含HCVR/LCVR氨基酸序列对,所述HCVR/LCVR氨基酸序列对包含表1中列出的所述HCVR

和LCVR序列。在一个实施方案中,所述HCVR/LCVR氨基酸序列对选自以下项组成的组:SEQ ID NO:2/10、18/26、34/42和50/58。在一个实施方案中,所述HCVR/LCVR氨基酸序列对选自以下项组成的组:SEQ ID NO:34/42和50/58。

[0078] 在另一个相关方面,本文提供了一种组合物,所述组合物是抗PcrV抗体和一种或多种另外的治疗剂的组合。

[0079] 在一个实施方案中,所述另外的治疗剂是有效地与抗PcrV抗体组合的任何药剂。可以有效地与抗PcrV抗体结合的示例性药剂包括但不限于其他结合和/或抑制铜绿假单胞菌活性的药剂(包括其他抗体或其抗原结合片段等)和/或不直接结合PcrV或另一个铜绿假单胞菌抗原但仍然抑制细菌活性包括宿主细胞感染性的药剂。在一些方面,所述第二治疗剂可以是用于治疗与不同的生物体相关的感染的治疗剂,所述不同的生物体可以与铜绿假单胞菌,例如金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)的生物体共感染。在一些方面,所述另外的治疗剂选自以下项组成的组:抗生素、抗炎药物、抗铜绿假单胞菌的不同的抗体和可用于治疗共感染的治疗剂。在一些方面,所述另外的治疗剂可用于治疗金黄色葡萄球菌共感染。

[0080] 在一个相关方面,本文提供了一种中和铜绿假单胞菌的方法,所述方法包括将含有细胞内铜绿假单胞菌的细胞暴露于包含一种或多种抗PcrV抗体或其抗原结合片段的组合物,其中所述暴露导致对细胞死亡的增强保护。在某些实施方案中,所述暴露可以是体外的或体内的。在某些实施方案中,当所述抗体单独使用时,或当所述抗体与一种或多种另外的治疗剂或抗铜绿假单胞菌的抗体组合使用时,观察到增强的保护。在某些实施方案中,所述一种或多种另外的治疗剂选自以下项组成的组:抗生素、抗炎药物、抗铜绿假单胞菌的不同的抗体和可用于治疗共感染的治疗剂。在一些方面,所述一种或多种另外的治疗剂是可用于治疗诸如金黄色葡萄球菌感染的共感染的治疗剂。在一些方面,所述一种或多种另外的治疗剂是不同的抗铜绿假单胞菌抗体。

[0081] 在一些实施方案中,本文提供了降低获得铜绿假单胞菌感染的风险的方法。在一些方面,所述方法包括施用本文提供的一种或多种抗PcrV抗体,或包含一种或多种抗PcrV抗体的药物组合物。铜绿假单胞菌感染风险较大的患者可以是患有囊性纤维化的患者、患有糖尿病的患者、使用机械呼吸机的患者、接受手术的患者、患有结核病的患者、患有HIV的患者、免疫系统受损的患者、患有中性粒细胞减少的患者、使用留置导管的患者、身体创伤后的患者、烧伤患者、在重症监护室中的患者、卧床不起的患者、患有恶性肿瘤的患者、患有慢性阻塞性肺疾病的患者、在长期健康护理中心中的患者、或静脉内药物使用者。

[0082] 在某些实施方案中,本文提供了减少受试者的细菌载量的方法。在某些实施方案中,减少细菌载量在受试者的肺中是明显的。在一些方面,所述方法包括将包含结合PcrV的一种或多种抗体或其抗原结合片段的组合物施用于所述受试者。在一些方面,所述抗体或其抗原结合片段阻断毒素至所述宿主细胞的铜绿假单胞菌递送。在一些方面,用本文提供的抗PcrV抗体治疗减少了铜绿假单胞菌的细菌载量。在一些方面,用本文提供的抗PcrV抗体治疗减少了铜绿假单胞菌的细菌载量和金黄色葡萄球菌的细菌载量。

[0083] 在一些实施方案中,本文提供了增加患有铜绿假单胞菌感染的受试者或处于铜绿假单胞菌感染风险中的受试者的存活率或存活可能性的方法。在一些方面,所述方法包括将本文提供的至少一种抗PcrV抗体或其抗原结合片段,或者包含至少一种抗PcrV抗体的药物组合物施用于对其有需要的受试者。

[0084] 在一些实施方案中,本文提供了增加患有铜绿假单胞菌感染的受试者或处于铜绿假单胞菌感染风险中的受试者的存活率或存活可能性的方法,其中所述受试者患有囊性纤维化。在一些方面,所述方法包括将本文提供的至少一种抗PcrV抗体或其抗原结合片段,或者包含至少一种抗PcrV抗体的药物组合物施用于所述受试者。在一些方面,所述受试者在施用不具有肺炎症状。

[0085] 在一些实施方案中,本文提供了改善或降低受试者的铜绿假单胞菌感染的至少一种症状的严重性、持续时间或发生频率的方法。在一些方面,所述方法包括将本文提供的一种或多种抗PcrV抗体或抗原结合片段,或者包含至少一种抗PcrV抗体或其抗原结合片段的药物组合物施用于对其有需要的受试者。在一些方面,所述至少一种症状选自以下项组成的组:发热、发冷、头痛、疲劳、关节疼痛、僵硬、肌痛、腹泻和呕吐;耳中的疼痛、瘙痒和液体排出;皮疹,包括皮肤上的充满脓液的突起;眼部的疼痛和发红;肺炎、咳嗽和充血;软组织排出绿色脓液和甜水果味;以及泌尿道感染。

[0086] 在一些方面,所述受试者患有由铜绿假单胞菌感染导致的肺炎、菌血症、骨感染、关节感染、皮肤感染、烧伤感染、伤口感染或它们的任何组合。

[0087] 在一些方面,将本文提供的所述一种或多种抗PcrV抗体或其抗原结合片段,或者包含至少一种抗PcrV抗体或其抗原结合片段的所述药物组合物,预防性地或治疗性地施用于所述有需要的受试者,以治疗或预防铜绿假单胞菌侵入性感染的发展。

[0088] 在一个实施方案中,所述有需要的受试者是患有活动性铜绿假单胞菌感染的受试者或处于获得铜绿假单胞菌感染风险中的受试者。在一些方面,所述受试者选自以下受试者组成的组:免疫受损的个体、住院的个体、患有重大疾病的个体、经历手术的个体、接受侵入性手术的个体、创伤患者、静脉内药物使用者、严重烧伤的个体、使用呼吸机的个体、使用导管的个体、接受化疗的个体、患有糖尿病的个体、患有囊性纤维化的个体、患有HIV的个体、患有结核病的个体、或患有任何其他可能损害免疫系统的医学病症的个体。在一些方面,所述受试者患有铜绿假单胞菌感染。在一些方面,所述受试者患有铜绿假单胞菌感染和金黄色葡萄球菌感染。在一些方面,所述受试者患有铜绿假单胞菌感染和一种或多种其他革兰氏阴性菌或革兰氏阳性菌共感染。在一些方面,所述受试者患有由铜绿假单胞菌感染导致的肺炎、菌血症、骨感染、关节感染、皮肤感染、烧伤感染、伤口感染或它们的任何组合。在一些方面,所述铜绿假单胞菌对抗生素具有抗性或部分抗性。

[0089] 在一个实施方案中,可以给所述有需要的受试者施用如本文提供的至少一种抗PcrV抗体或其抗原结合片段,或者包含至少一种抗体或其抗原结合片段的药物组合物与一种或多种另外的治疗剂的组合。所述一种或多种另外的治疗剂可以选自以下项组成的组:抗生素、抗炎药物(诸如皮质类固醇和非甾体抗炎药物)、不同的抗铜绿假单胞菌抗体、可用于治疗共感染(诸如金黄色葡萄球菌感染)的治疗剂、以及可用于改善铜绿假单胞菌感染的至少一种症状或用于减少患者的细菌载量的本领域已知的任何其他药物或疗法。在一个实施方案中,所述一种或多种另外的治疗剂包含一种或多种抗PcrV抗体。在某些实施方案中,如果发生与本公开的抗体或其抗原结合片段相关的任何可能的一种或多种副作用,则所述第二治疗剂可以是有助于抵消或减少此类一种或多种副作用的药剂。

[0090] 在一个实施方案中,所述药物组合物可以皮下、静脉内、皮内、肌肉内、鼻内或口服施用。

[0091] 在某些实施方案中,可以将所述一种或多种抗体或其抗原结合片段预防性或治疗性地施用于患有铜绿假单胞菌感染、或处于获得铜绿假单胞菌感染的风险中、或倾向于发展铜绿假单胞菌感染的受试者。处于风险中的受试者包括但不限于免疫受损的个体、住院的个体、患有重大疾病的个体、经历手术或另一种侵入性手术的个体、创伤患者、静脉内药物使用者、严重烧伤的个体、使用呼吸机的个体、使用导管的个体、接受化疗的个体、患有结核病的个体、患有糖尿病的个体、患有囊性纤维化的个体、患有HIV的个体、或患有任何其他可能损害免疫系统的医学病症的个体。

[0092] 本公开还包括如本文提供的抗PcrV抗体或其抗原结合片段,所述抗PcrV抗体或其抗原结合片段用于治疗患有铜绿假单胞菌感染、或处于获得铜绿假单胞菌感染的风险中的受试者,或者用于制造用于治疗与铜绿假单胞菌感染相关的疾病或障碍的药物。

[0093] 本文提供了包含如本文提供的抗PcrV抗体或其抗原结合片段(例如,具有HCVR/LCVR氨基酸序列对(所述HCVR/LCVR氨基酸序列对选自以下项组成的组:SEQ ID NO:2/10、18/26、34/42和50/58)的抗体)的注射装置(例如,皮下注射针和注射器、自动注射器或预填充注射器)或器皿(例如,小瓶)。

[0094] 还提供了用于将所述组合物施用于受试者(例如,人)的方法,所述方法包括将所述组合物的组分引入(例如胃肠外引入,例如通过使用注射装置注射)所述受试者的身体中的步骤。在本公开的一个实施方案中,所述受试者患有铜绿假单胞菌感染或处于获得铜绿假单胞菌感染的风险中。

[0095] 还提供了用于制备包含所述抗PcrV抗体(例如,包含具有HCVR/LCVR氨基酸序列对(所述HCVR/LCVR氨基酸序列对选自以下项组成的组:SEQ ID NO:2/10、18/26、34/42和50/58)的抗体的组合物)和药学上可接受的载剂的组合物的方法。

[0096] 还提供了制备包含本文公开的组合物的装置或器皿的方法,所述方法包括将所述组合的所述组分引入所述器皿或装置中。

[0097] 通过阅读随后的详细描述,其他实施方案将变得显而易见。

具体实施方式

[0098] 在描述本发明的方法前,应当理解,本发明不限于所述的特定方法和实验条件,因为这类方法和条件可以变化。还应当理解,本文所用的术语仅用于描述具体实施方案的目的,而无意进行限制,因为本发明的范围将仅由所附权利要求书限制。

[0099] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语都具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解相同的含义。尽管与本文中描述的那些方法和材料类似或等效的任何方法和材料均可用于本发明的实践或检验,但现在描述优选的方法和材料。

[0100] 定义

[0101] 如本文所用,术语“抗体”意指免疫球蛋白分子,其由四条多肽链,即两条重(H)链与两条轻(L)链通过二硫键互连(即,“完整抗体分子”);以及其多聚体(例如IgM)或其抗原结合片段构成。每条重链由重链可变区(“HCVR”或“V_H”)和重链恒定区(由域C_H1、C_H2和C_H3构成)构成。每条轻链由轻链可变区(“LCVR”或“V_L”)和轻链恒定区(C_L)构成。V_H和V_L区可以进一步细分为高变区,称为互补决定区(CDR),其间散布着更为保守的区域,称为框架区(FR)。每个V_H和V_L由从氨基末端到羧基末端按照以下次序排列的三个CDR和四个FR构成:FR1、

CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。在本公开的某些实施方案中,抗体(或其抗原结合片段)的FR可以与人种系序列相同,或者可以是经天然或人工修饰的。可以基于两个或更多个CDR的并排分析来定义氨基酸共有序列。

[0102] 取代一个或多个CDR残基或省略一个或多个CDR也是可能的。抗体已在科学文献中描述,其中一个或两个CDR可以被分配用于结合。Padlan等人(1995FASEB J.9:133-139)基于公开的晶体结构分析了抗体与其抗原之间的接触区,并且得出结论,仅约五分之一到三分之一的CDR残基实际接触抗原。Padlan还发现许多抗体,所述抗体中一个或两个CDR没有与抗原接触的氨基酸(另见Vajdos等人2002J Mol Biol 320:415-428)。

[0103] 基于先前的研究,通过分子建模和/或凭经验可以从位于Chothia CDR外部的Kabat CDR区域鉴别出不接触抗原的CDR残基(例如CDRH2中的残基H60-H65通常是不需要的)。如果省略其CDR或一个或多个残基,则其通常由氨基酸置换,所述氨基酸占据另一个人抗体序列或此类序列的共有序列中的对应位置。CDR内取代的位置和用于取代的氨基酸也可以凭经验选择。经验取代可以是保守或非保守取代。

[0104] 本文公开的完全人抗PcrV单克隆抗体可以包含与对应种系序列相比,重链和轻链可变结构域的框架和/或CDR区中的一个或多个氨基酸置换、插入和/或缺失。通过将本文公开的氨基酸序列与可得自例如公共抗体序列数据库的种系序列进行对比,可以容易地确定这样的突变。本公开包括来源于本文所公开的氨基酸序列中的任一个的抗体和其抗原结合片段,其中一个或多个框架和/或CDR区内的一个或多个氨基酸突变成得到所述抗体的种系序列的对应残基,或另一人类种系序列的对应残基,或对应种系残基的保守氨基酸置换(此类序列变化在本文中统称为“种系突变”)。本领域的普通技术人员从本文所公开的重链和轻链可变区序列开始,可以容易地产生多种抗体和抗原结合片段,其包含一个或多个个别种系突变或其组合。在某些实施方案中, V_H 和/或 V_L 域内的所有框架和/或CDR残基突变回衍生出抗体的原始种系序列中的残基。在其他实施方案中,仅某些残基被回复突变为原始种系序列,例如,仅在FR1的前8个氨基酸内或FR4的后8个氨基酸内存在的突变残基,或仅在CDR1、CDR2或CDR3内存在的突变残基。在其他实施方案中,框架和/或一个或多个CDR残基中的一个或多个突变为不同的种系序列(即,不同于最初衍生出抗体的种系序列的种系序列)的一个或多个对应残基。此外,本文所公开的抗体可以含有框架和/或CDR区内的两个或更多个种系突变的任何组合,例如,其中某些个别残基突变为特定种系序列的对应残基,而不同于原始种系序列的某些其他残基得以保持或突变为不同种系序列的对应残基。在得到含有一个或多个种系突变的抗体和抗原结合片段后,可以容易地测试所述抗体和抗原结合片段的一种或多种所需特性,如结合特异性的改善、结合亲和力的增加、拮抗性或激动性生物特性(视具体情况而定)的改善或增强、免疫原性降低等。以这种通用方式获得的抗体和抗原结合片段涵盖在本公开内。

[0105] 本文还设想了完全人抗PcrV单克隆抗体,所述单克隆抗体包含具有一个或多个保守置换的本文公开的HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列中的任一者的变体。例如,本公开包括具有HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列的抗PcrV抗体,相对于本文公开的HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列中的任一者,所述HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列具有例如10个或更少、8个或更少、6个或更少、4个或更少等等的保守氨基酸置换。

[0106] 如本文所用,术语“人抗体”意图包括具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变区和

恒定区的抗体。本公开的人mAb可以包括例如在CDR中以及特别是在CDR3中,不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如通过体外随机或定点诱变或通过体内体细胞突变引入的突变)。然而,如本文所用,术语“人抗体”并不意在包括已将源自另一哺乳动物物种(例如,小鼠)的种系的CDR序列移植到人FR序列上的mAb。所述术语包括在非人类哺乳动物中或在非人类哺乳动物的细胞中以重组方式产生的抗体。所述术语并不意图包括从人类个体中分离或在人类个体中产生的抗体。

[0107] 如本文所用,术语“重组”是指通过本领域称为重组DNA技术的技术或方法产生、表达、分离或获得的本公开的抗体或其抗原结合片段,所述技术或方法包括例如DNA剪接和转基因表达。所述术语是指在非人类哺乳动物(包括转基因非人类哺乳动物,例如转基因小鼠),或细胞(例如CHO细胞)表达系统中表达的抗体,或从重组组合人抗体库中分离的抗体。

[0108] 术语“特异性结合”或“特异性结合至”等意指抗体或其抗原结合片段与抗原形成在生理条件下相对较稳定的复合物。特异性结合的特征可以在于至少约 1×10^{-7} M或更低的平衡解离常数(例如,更小的 K_D 指示更紧密的结合)。用于确定两个分子是否特异性结合的方法是本领域众所周知的,并且包括例如平衡透析、表面等离子共振等。如本文所述,已经通过表面等离子共振(例如,BIACORE™)鉴定出特异性结合至PcrV的抗体。此外,如本文所用,结合至铜绿假单胞菌PcrV和一种或多种另外的铜绿假单胞菌抗原的多特异性抗体,或者结合至铜绿假单胞菌PcrV的两个不同的区域的双特异性抗体也被认为是“特异性结合”的抗体。

[0109] 术语“高亲和力”抗体是指具有以至少 10^{-7} M、优选地 10^{-8} M、更优选地 10^{-9} M、甚至更优选地 10^{-10} M、甚至更优选地 10^{-11} M、甚至更优选地 10^{-12} M的 K_D 表示与PcrV的结合亲和力的那些mAb,如通过表面等离子共振,例如BIACORE™或溶液亲和力ELISA所测量。

[0110] 术语“慢解离速率”、“Koff”或“kd”意指抗体以 $1 \times 10^{-3} s^{-1}$ 或更小、优选地 $1 \times 10^{-4} s^{-1}$ 或更小的速率常数从PcrV解离,如通过表面等离子共振,例如BIACORE™所确定。

[0111] 如本文所用,术语抗体的“抗原结合部分”、抗体的“抗原结合片段”等包括特异性结合抗原以形成复合物的任何天然存在的、酶促可获得的、合成性或基因工程化的多肽或糖蛋白。如本文所用,术语抗体的“抗原结合片段”或“抗体片段”是指保留结合至PcrV的能力的抗体的一个或多个片段。

[0112] 在具体实施方案中,本公开的抗体或抗体片段可以与如配体或治疗部分(“免疫缀合物”)的部分缀合,所述部分诸如抗生素、抗铜绿假单胞菌第二抗体,或用于治疗铜绿假单胞菌感染的任何其他治疗部分。

[0113] 如本文所用,“分离的抗体”意指基本上不含具有不同的抗原特异性的其他抗体(Ab)的抗体(例如,特异性结合铜绿假单胞菌PcrV以及作为基本上不含特异性结合除PcrV以外的抗原的Ab的分离的抗体或其片段)。

[0114] 如本文所用,“阻断性抗体”或“中和抗体”(或“中和铜绿假单胞菌活性的抗体”或“拮抗性抗体”)意指与PcrV结合导致抑制铜绿假单胞菌的至少一种生物活性的抗体。例如,本公开的抗体可以预防或阻断铜绿假单胞菌细菌将细菌毒素易位到宿主细胞中。另外,“中和抗体”是能够中和,即防止、抑制、降低、阻碍或干扰病原体在宿主中启动和/或持续感染的能力的抗体。术语“中和抗体”和“中和的抗体”在本文中可互换使用。这些抗体可以单独或组合使用,作为预防剂或治疗剂在适当的配制后与其他抗病毒剂一起使用,或与活性疫

苗结合使用,或作为诊断工具使用。

[0115] “抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”或“ADCC”是细胞介导的免疫防御机制,其中免疫系统的效应细胞主动溶解目标细胞,所述目标细胞的膜表面抗原已经由特定抗体结合,例如由本文所描述的那些抗体。因而,它是一种这样的机制:通过这种机制,例如细菌特异性抗体可以用于限制感染的传播。经典ADCC由天然杀手细胞(NK细胞)、巨噬细胞、嗜中性粒细胞以及在某些情况下嗜酸性粒细胞介导。

[0116] 如本文所用,术语“表面等离子共振”是指一种光学现象,其允许通过例如使用BIAcore™系统(瑞典乌普萨拉(Uppsala, Sweden)和新泽西州皮斯卡塔威(Piscataway, N.J.)的Pharmacia Biosensor AB)检测生物传感器基质内蛋白质浓度的变化分析实时生物分子相互作用。

[0117] 如本文所用,术语“ K_D ”意指特定抗体-抗原相互作用的平衡解离常数。

[0118] 术语“表位”是指与抗体分子可变区中的特定抗原结合位点相互作用的抗原决定子,称为互补位。单个抗原可以具有超过一个表位。因此,不同抗体可以与抗原上的不同区域结合并且可以具有不同的生物效应。术语“表位”还指B细胞和/或T细胞起反应的抗原上的位点。其还指抗体所结合的抗原区域。表位可以定义为结构性或功能性的。功能性表位一般是结构性表位的子集并且具有直接促成相互作用的亲和力的那些残基。表位还可以是构形性的,即,由非线性氨基酸构成。在某些实施方案中,表位可以包括作为分子的化学活性表面基团的决定子,所述基团如氨基酸、糖侧链、磷酸基或磺酰基,并且在某些实施方案中,可以具有特定三维结构特征和/或荷质比特征。

[0119] 如本文所用,术语“交叉竞争”是指抗体或其抗原结合片段结合抗原,并抑制或阻断另一抗体或其抗原结合片段的结合。所述术语还包括两个抗体之间在两个方向上的竞争,即第一抗体结合并阻断第二抗体的结合,反之亦然。在某些实施方案中,第一抗体和第二抗体可以结合同一表位。可替代地,第一抗体和第二抗体可以结合不同但重叠的表位,使得其中一个的结合抑制或阻断第二抗体的结合,例如,通过位阻。抗体之间的交叉竞争可以通过本领域已知的方法来测量,例如通过实时无标记生物层干涉量度分析法。为了确定测试抗体是否与本公开的参考抗PcrV抗体交叉竞争,使参考抗体在饱和条件下结合至PcrV蛋白。然后,评估测试抗体结合至PcrV蛋白的能力。如果测试抗体在与参考抗PcrV抗体饱和结合后能够结合至PcrV蛋白,则可以得出以下结论:测试抗体结合至与参考抗PcrV抗体不同的表位。在另一个方面,如果测试抗体在与参考抗PcrV抗体饱和结合后不能结合至PcrV蛋白,则测试抗体可以结合至与参考抗PcrV抗体所结合的表位相同的表位。

[0120] 通常,一定程度上被修饰的本文提供的抗体或抗原结合片段保留与PcrV特异性结合的能力,例如,当所述活性以摩尔表示时,保留其PcrV结合活性的至少10%(与亲本抗体相比时)。在一些方面,本公开的抗体或抗原结合片段保留与亲本抗体的PcrV结合亲和力的至少20%、50%、70%、80%、90%、95%或100%或更多。还希望本公开的抗体或抗原结合片段可包括保守性或非保守性氨基酸置换(称为抗体的“保守性变体”或“功能保守变体”),这并未基本上改变其生物活性。

[0121] 多核苷酸的“变体”是指包含与本文所示的参考核苷酸序列(例如,SEQ ID NO:1、9、17、25、33、41、49或57)至少约70-99.9%(例如,至少约70、72、74、75、76、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、99.5或99.9%)相同的核苷酸

序列的多核苷酸;当比较通过BLAST算法进行时,其中选择算法的参数以在对应的参考序列的全长上得到对应的序列之间的最大匹配(例如,期望阈值:10;字长:28;查询范围内的最大匹配:0;匹配/错配评分:1,-2;缺口成本:线性)。

[0122] 当提及核酸或其片段时,术语“基本同一性”或“基本相同”指示当通过适当的核苷酸插入或缺失与另一核酸(或其互补链)最佳对齐时,如通过下文所论述的任何众所周知的序列同一性算法如FASTA、BLAST或GAP所测量,至少约90%,并且更优选地至少约95%、96%、97%、98%或99%的核苷酸碱基存在核苷酸序列同一性。在某些情况下,与参考核酸分子具有大体一致性的核酸分子可以编码与参考核酸分子所编码的多肽具有相同或大体上类似的氨基酸序列的多肽。

[0123] 多肽的“变体”,诸如免疫球蛋白链(例如,H1H29329P V_H、V_L、HC或LC、H1H29332P V_H、V_L、HC或LC、H1H29336P V_H、V_L、HC或LC或H1H29339P V_H、V_L、HC或LC),是指包含与本文所示的参考氨基酸序列(例如,SEQ ID NO:2、10、65、66、18、26、67、68、34、42、69、70、50、58、71或72)至少约70-99.9%(例如,70、72、74、75、76、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、99.5、99.9%)相同或相似的氨基酸序列的多肽;当比较通过BLAST算法进行时,其中选择算法的参数以在对应的参考序列的全长上得到对应的序列之间的最大匹配(例如,预期阈值:10;字长:3;查询范围内的最大匹配:0;BLOSUM 62矩阵;缺口成本:存在11,延伸1;条件组成得分矩阵调整)。

[0124] 当应用于多肽时,术语“基本相似性”或“基本上相似”意指两个肽序列使用默认空位权重,如通过程序GAP或BESTFIT最佳地对准时共有至少90%序列同一性,甚至更优选地至少95%、98%或99%序列同一性。优选地,不同的残基位置因保守氨基酸置换而不同。“保守修饰的变体”或“保守置换”是指其中多肽中存在一个或多个氨基酸置换,而其他氨基酸具有类似特征(例如,电荷、侧链大小、疏水性/亲水性、主链构象和刚度等)的变体。可以经常进行这类改变,而不会显著破坏抗体或片段的生物活性。本领域技术人员应认识到,一般说来,多肽非必需区中的单一氨基酸置换基本上不会改变生物活性(参见例如,Watson等人(1987)《基因分子生物学(Molecular Biology of the Gene)》,本杰明/卡明斯出版公司(The Benjamin/Cummings Pub.Co.),第224页(第4版))。另外,在结构上或在功能上类似的氨基酸的取代不大可能显著破坏生物活性。

[0125] 在两个或更多个氨基酸序列因保守取代而彼此不同的情况下,可以上调相似性百分比或程度以校正取代的保守性质。用于进行这种调整的手段是本领域技术人员所熟知的。(参见例如,Pearson(1994)Methods Mol.Biol.24:307-331)。侧链具有类似化学特性的氨基酸组的实例包括1)脂肪族侧链:甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;2)脂肪族羟基侧链:丝氨酸和苏氨酸;3)含酰胺的侧链:天冬酰胺和谷氨酰胺;4)芳香族侧链:苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;5)碱性侧链:赖氨酸、精氨酸和组氨酸;6)酸性侧链:天冬氨酸和谷氨酸;和7)含硫侧链:半胱氨酸和甲硫氨酸。优选的保守氨基酸置换组是:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸、谷氨酸-天冬氨酸以及天冬酰胺-谷氨酰胺。可替代地,保守性替代是在以下文献中公开的PAM250对数似然矩阵中具有正值的任何变化:Gonnet等人(1992)《科学(Science)》256:1443-45。“适度保守”替换是在PAM250对数似然矩阵中具有非负值的任何变化。

[0126] 典型地使用序列分析软件测量多肽的序列相似性。蛋白质分析软件使用关于指定

到包括保守氨基酸置换的各种取代、缺失和其他修饰的相似性度量来匹配相似序列。例如，GCG软件含有如GAP和BESTFIT的程序，其可以在默认参数下使用以确定密切相关的多肽之间，如来自不同生物体物种的同源多肽之间或野生型蛋白质与其突变蛋白之间的序列同源性或序列一致性。参见例如，GCG 6.1版。多肽序列也可以使用默认或推荐参数，使用FASTA进行比较；所述FASTA是GCG 6.1版中的程序。FASTA（例如，FASTA2和FASTA3）提供查询与搜索序列之间的最佳重叠区域的比对和序列一致性百分比（Pearson (2000) 同上）。当将本文提供的序列与含有来自不同生物的大量序列的数据库进行对比时，另一种优选的算法是使用默认参数的计算机程序BLAST，尤其是BLASTP或TBLASTN。参见例如Altschul. 等人。(1990) J.Mol.Biol.215:403-410和(1997) Nucleic Acids Res.25:3389-3402。

[0127] 在一个实施方案中，抗PcrV抗原结合蛋白，例如本公开的抗体和其抗原结合片段包含与SEQ ID NO:2、18、34或50中所示的氨基酸具有至少70%（例如，80%、85%、90%、95%、99%）氨基酸序列同一性的重链免疫球蛋白可变区；和/或与SEQ ID NO:10、26、42或58中所示的氨基酸具有至少70%（例如，80%、85%、90%、95%、99%）氨基酸序列同一性的轻链免疫球蛋白可变区。

[0128] 此外，变体抗PcrV抗原结合蛋白可以包括包含本文所阐述的氨基酸序列的多肽，不同之处在于一个或多个（例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个）突变，例如，错义突变（例如，保守置换）、无义突变、缺失或插入。例如，本公开包括包含免疫球蛋白重链变体和/或免疫球蛋白轻链变体的抗原结合蛋白，所述免疫球蛋白重链变体包含SEQ ID NO:2、18、34或50中所示的氨基酸序列但具有这类突变中的一者或多者，所述免疫球蛋白轻链变体包含SEQ ID NO:10、26、42或58中所示的氨基酸序列但具有这类突变中的一者或多者。在本公开的一个实施方案中，变体抗PcrV抗原结合蛋白包含免疫球蛋白重链变体和/或免疫球蛋白轻链变体，所述免疫球蛋白重链变体包含HCDR1、HCDR2和HCDR3，其中这类CDR中的一者或多者（例如，1个或2个或3个）具有这类突变（例如，保守置换）中的一者或多者，所述免疫球蛋白轻链变体包含LCDR1、LCDR2和LCDR3，其中这类CDR中的一者或多者（例如，1个或2个或3个）具有这类突变（例如，保守置换）中的一者或多者。

[0129] 本公开还提供了变体抗PcrV抗原结合蛋白，例如，抗体或其抗原结合片段，所述变体抗PcrV抗原结合蛋白包含与例如SEQ ID NO:4、6、8、12、14和/或16；或者20、22、24、28、30和/或32；或者36、38、40、44、46和/或48；或者52、54、56、60、62和/或64具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或99.9%序列同一性或相似性的本文所示的一个或多个变体CDR（例如，HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和/或LCDR3中的任何一者或多者）。

[0130] 本公开的实施方案还包括包含免疫球蛋白V_H和V_L或HC和LC的变体抗原结合蛋白，例如抗PcrV抗体及其抗原结合片段，所述免疫球蛋白V_H和V_L或HC和LC包含与本文特别示出的对应的V_H、V_L、HC或LC的氨基酸序列具有70%或更多（例如，80%、85%、90%、95%、97%或99%）的总氨基酸序列同一性或相似性的氨基酸序列，但是其中这类免疫球蛋白的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和/或LCDR3不是变体并且分别包含SEQ ID NO:4、6、8、12、14和/或16；或者20、22、24、28、30和/或32；或者36、38、40、44、46和/或48；或者52、54、56、60、62和/或64中所示的氨基酸序列。因此，在这类实施方案中，变体抗原结合蛋白内的CDR自身不为变体。

[0131] 抗PcrV抗体及其抗原结合片段的功能保守变体也是本发明的一部分。抗PcrV抗体

及其抗原结合片段的任何变体(如本文所论述)可以是“功能保守变体”。在一些情况下,此类功能保守变体也可以表征为保守修饰的变体。如本文所用,“功能保守变体”是指抗PcrV抗体或其抗原结合片段的变体,其中一个或多个氨基酸残基已改变,而不显著改变抗体或片段的一个或多个功能特性。在本发明的一个实施方案中,本公开的抗PcrV抗体或其抗原结合片段的功能保守变体包含变体氨基酸序列,并且表现出以下功能特性中的一者或多者:

[0132] ●以小于 10_{-8} 的解离常数(K^D)结合至全长PcrV,如在25°C下通过表面等离子共振测定法所测量;

[0133] ●以小于 10_{-8} 的解离常数(K^D)结合至全长PcrV,如在37°C下通过表面等离子共振测定法所测量;

[0134] ●在细胞毒性测定法中,展示出以约 10^{-11} M至约 10^{-8} M范围内的 IC_{50} 中和铜绿假单胞菌菌株6077;

[0135] ●在细胞毒性测定法中,展示出以约 10^{-9} M至约 10^{-7} M范围内的 IC_{50} 中和铜绿假单胞菌菌株ATCC 700888;

[0136] ●在溶血测定法中,展示出以约 10^{-10} M至约 10^{-6} M范围内的 IC_{50} 中和铜绿假单胞菌菌株6077;

[0137] ●在溶血测定法中,展示出以约 10^{-10} M至约 10^{-7} M范围内的 IC_{50} 中和铜绿假单胞菌菌株ATCC 700888;

[0138] ●在急性肺炎模型中,相对于未经治疗的小鼠,降低以5mg/kg预防性治疗的小鼠中由铜绿假单胞菌菌株6206或菌株6077导致的死亡率;

[0139] ●在急性肺炎模型中,相对于未经治疗的小鼠,降低以1.0、0.2或0.04mg/kg预防性治疗的小鼠中由铜绿假单胞菌菌株6206或菌株6077导致的死亡率;

[0140] ●在急性肺炎模型中,相对于未经治疗的小鼠,降低以0.1mg/kg或0.2mg/kg预防性治疗的小鼠中铜绿假单胞菌菌株6206的肺细菌负荷;

[0141] ●在急性肺炎模型中,相对于未经治疗的小鼠,降低以25mg/kg预防性治疗的小鼠中铜绿假单胞菌菌株PA01的肺细菌负荷;以及/或者

[0142] ●与参考抗体交叉竞争,其中所述参考抗体包含重链可变区(HCVR)氨基酸序列和轻链可变区(LCVR)氨基酸序列,其选自由表1的所述HCVR氨基酸序列和所述LCVR氨基酸序列中的任一者组成的组;

[0143] ●以小于约 10_{-8} M的 EC^{50} 结合至全长PcrV(SEQ ID NO:77);

[0144] ●以小于约 10_{-8} M的 EC^{50} 结合至PcrV 136-233(SEQ ID NO:81);

[0145] ●与在SEQ ID NO:78的约第150位至约第170位的范围内的氨基酸残基相互作用;

[0146] ●与在SEQ ID NO:78的约第155位至约第170位的范围内的氨基酸残基相互作用;和/或

[0147] ●与至少一个选自由以下项组成的组的氨基酸序列相互作用:SEQ ID NO:85和SEQ ID NO:86。

[0148] 短语“治疗有效量”意指产生施用其所希望达成的作用的量。确切量将取决于治疗目的,并且可由本领域的技术人员使用已知技术确定(参见例如Lloyd(1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*)。

[0149] 如本文所用,术语“受试者”是指需要改善、预防和/或治疗疾病或障碍(诸如铜绿假单胞菌感染)的动物,优选地哺乳动物,更优选地人。受试者可以患有铜绿假单胞菌感染或倾向于发展铜绿假单胞菌感染。“倾向于发展铜绿假单胞菌感染”的受试者、或“可能处于感染铜绿假单胞菌的高风险中”的受试者是这样的受试者:接受手术的受试者、接受重大疾病的治疗的受试者、创伤患者、静脉内药物使用者、具有严重烧伤的受试者、使用呼吸机的受试者、使用导管的受试者、接受化疗的受试者、患有糖尿病的受试者、患有囊性纤维化的受试者、患有结核病的受试者、患有HIV的受试者、和免疫系统受损的受试者。

[0150] 如本文所用,术语“治疗”(“treat”、“treating”或“treatment”)是指治疗性处理,其中目的是清除或减少临床诊断患有感染(例如肺炎、菌血症、腹膜炎、败血症和/或脓肿)的受试者中感染因子的细菌负荷。所述术语包括抑制疾病的进展或感染的恶化。还术语还包括疾病的积极预后,即在施用诸如本文公开的抗体的治疗剂后,受试者可以无感染或可以具有降低的细菌滴定度或细菌滴定度为零。“治疗”也可意指与未接受治疗的预期存活率相比更高的存活率。需要治疗的人包括已经感染的人以及易于获得铜绿假单胞菌感染的人,例如烧伤患者或易受细菌感染(例如,铜绿假单胞菌感染)的免疫抑制患者。治疗剂可以以治疗剂量施用于受试者。

[0151] 如本文所用,术语“预防”或“减轻”是指预防性或防止性措施,其中目的是预防或减缓(减轻)铜绿假单胞菌感染或与所述感染相关的症状。有利的或期望的临床结果包括但不限于症状的减轻、感染程度的减小、疾病的稳定(即,不恶化)状态、受试者中感染因子(诸如,铜绿假单胞菌)的清除或减少、疾病进展的延迟或减缓、疾病状态的改善或缓和以及可检测的或不可检测的缓解(部分或完全)。

[0152] 如本文所用,术语“院内疾病”和“院内感染”是指来源于医院或其他医疗机构的疾病或感染。院内感染可以由铜绿假单胞菌,例如对抗生素具有抗性的铜绿假单胞菌导致。在某些方面,在受试者入院或医疗机构之前不存在或产生院内感染,并且在受试者入院或医疗机构之后获得或产生院内感染。

[0153] 一般说明

[0154] 如上文所述,细菌T3SS是革兰氏阴性菌(包括铜绿假单胞菌)的重要毒力因子。PcrV蛋白定位于T3SS结构末端,在针尖上形成环型结构。针尖蛋白作为存在于细菌外表面的两种蛋白质之一,是抗体可接近的。

[0155] 因此,本文提供了结合铜绿假单胞菌PcrV的抗体、双特异性抗原结合分子及其抗原结合片段。靶向PcrV的抗体可以预防细菌毒素注射到感染的细胞中,导致炎症减少、细胞死亡和细菌传播。靶向PcrV的抗体可以阻断感染的宿主细胞中的孔介导的膜渗透性。这些抗PcrV抗体、双特异性抗原结合分子及其抗原结合片段可用于治疗和/或减轻铜绿假单胞菌感染、治疗和/或减轻铜绿假单胞菌感染的症状,以及预防铜绿假单胞菌感染的症状的发展或进展。在一些方面,抗PcrV抗体预防铜绿假单胞菌导致的肺炎的发展或进展。

[0156] 本文提供了用于治疗患有铜绿假单胞菌感染的患者的方法。本文提供了用于预防铜绿假单胞菌感染的症状的发展或进展的方法。本文提供了用于预防铜绿假单胞菌的征象(诸如来自血液、皮肤、尿液、脓液或其他体液样品的阳性培养物)、或者指示铜绿假单胞菌感染的放射成像、或者指示铜绿假单胞菌感染的身体检查结果(诸如但不限于皮肤或骨溃疡或异常生命体征)的方法。在一些方面,患者可以患有囊性纤维化。在一些方面,患者可以

正在使用机械呼吸机。在一些方面,患者是中性粒细胞减少癌症患者。在一些方面,患者是烧伤受害者。在一些方面,患者患有结核病。

[0157] 在一些实施方案中,患者患有抗生素抗性铜绿假单胞菌感染。在一些实施方案中,患者患有共感染,例如金黄色葡萄球菌感染,例如抗生素抗性金黄色葡萄球菌感染。在一些实施方案中,金黄色葡萄球菌感染和铜绿假单胞菌感染都是抗生素抗性的。在一些实施方案中,患者患有革兰氏阴性菌或革兰阳性细菌共感染。

[0158] 通用方法

[0159] 标准分子生物学方法由Sambrook,Fritsch和Maniatis (1982年和1989年第2版,2001年第3版)《分子克隆实验指南 (Molecular Cloning, A Laboratory Manual)》,冷泉港实验室出版社 (Cold Spring Harbor Laboratory Press), 纽约冷泉港 (Cold Spring Harbor, N.Y.); Sambrook和Russell (2001年)《分子克隆 (Molecular Cloning)》,第3增补版,冷泉港实验室出版社,纽约冷泉港;Wu (1993年)《重组DNA (Recombinant DNA)》,第217卷,学术出版社 (Academic Press), 加利福尼亚州圣地亚哥 (San Diego, Calif.) 描述。标准方法也出现在以下中:Ausbel, 等人 (2001年)《现代分子生物学实验技术 (Current Protocols in Molecular Biology)》,第1-4卷,纽约的约翰·威利父子公司 (John Wiley and Sons, Inc. New York), 纽约,其描述细菌细胞和DNA突变诱发中的克隆 (第1卷)、哺乳动物细胞和酵母菌中的克隆 (第2卷)、糖结合物和蛋白质表现 (第3卷) 和生物资讯学 (第4卷)。

[0160] 描述包括免疫沉淀、色谱法、电泳、离心和结晶的蛋白质纯化方法 (Coligan, 等人 (2000)《最新蛋白质科学实验指南 (Current Protocols in Protein Science)》,第1卷,纽约的约翰·威利父子公司)。描述化学分析、化学修饰、转译后修饰、融合蛋白产生、蛋白质糖基化 (参见例如Coligan, 等人 (2000年)《最新蛋白质科学实验指南》,第2卷,纽约的约翰·威利父子公司;Ausubel, 等人 (2001年) 现代分子生物学实验技术,第3卷,纽约的约翰·威利父子公司,纽约,第16.0.5-16.22.17页;西格玛-奥德里奇公司 (Sigma-Aldrich, Co.) (2001年) 生命科学研究产品 (Products for Life Science Research), 密苏里州圣路易斯 (St. Louis, Mo.); 第45-89页;安玛西亚法玛西亚生物技术 (Amersham Pharmacia Biotech) (2001年) BioDirectory, 新泽西州皮斯卡塔威 (Piscataway, N.J.), 第384-391页)。描述多克隆抗体和单克隆抗体的产生、纯化和片段化 (Coligan, 等人 (2001年)《免疫学最新方案 (Current Protocols in Immunology)》,第1卷,纽约的约翰·威利父子公司;Harlow和Lane (1999年)《使用抗体 (Using Antibodies)》,冷泉港实验室出版社,纽约冷泉港;Harlow和Lane, 同前文献)。表征配体/受体相互作用的标准技术为可用的 (参见例如, Coligan, 等人 (2001年)《免疫学最新方案》,第4卷,纽约的约翰威利公司)。

[0161] 可以制备单克隆抗体、多克隆抗体和人源化抗体 (参见例如, Sheperd和Dean (编) (2000年)《单克隆抗体 (Monoclonal Antibodies)》,纽约的牛津大学出版社 (Oxford Univ. Press, New York), 纽约;Kontermann和Dubel (编) (2001年)《抗体工程 (Antibody Engineering)》,纽约的施普林格 (Springer-Verlag, New York);Harlow和Lane (1988年)《抗体实验室手册 (Antibodies A Laboratory Manual)》,冷泉港实验室出版社,纽约冷泉港,第139-243页;Carpenter, 等人 (2000年)《免疫学杂志 (J. Immunol.)》165:6205;He, 等人 (1998年)《免疫学杂志》160:1029;Tang等人 (1999年)《生物化学杂志 (J. Biol. Chem.)》274:27371-27378;Baca等人 (1997年)《生物化学杂志》272:10678-10684;Chothia等人 (1989年)

《自然 (Nature)》342:877-883;Foote和Winter (1992年)《分子生物学杂志 (J.Mol.Biol.)》224:487-499;美国专利第6,329,511号)。

[0162] 人源化的替代方案为使用呈递于噬菌体上的人抗体库或转基因小鼠中的人抗体库 (Vaughan等人 (1996年)《自然·生物技术 (Nature Biotechnol.)》14:309-314;Barbas (1995年)《自然·医学 (Nature Medicine)》1:837-839;Mendez等人 (1997年)《自然·遗传学 (Nature Genetics)》15:146-156;Hoogenboom和Chames (2000年)《今日免疫学 (Immunol.Today)》21:371-377;Barbas等人 (2001年)《噬菌体呈递:实验室手册 (Phage Display:A Laboratory Manual)》,冷泉港实验室出版社,纽约冷泉港;Kay等人 (1996年)《肽和蛋白质的噬菌体呈递:实验室手册 (Phage Display of Peptides and Proteins:A Laboratory Manual)》,学术出版社,加利福尼亚州圣地亚哥;de Bruin等人 (1999年)《自然·生物技术》17:397-399)。描述单链抗体和双功能抗体 (参见例如,Malecki等人 (2002年)《美国国家科学院院刊 (Proc.Natl.Acad.Sci.USA)》99:213-218;Conrath等人 (2001年)《生物化学杂志 (J.Biol.Chem.)》276:7346-7350;Desmyter等人 (2001年)《生物化学杂志》276:26285-26290;Hudson和Kortt (1999)《免疫学方法杂志 (J.Immunol.Methods)》231:177-189;和美国专利号4,946,778)。提供双功能抗体 (参见例如,Mack,等人 (1995年)《美国国家科学院院刊》92:7021-7025;Carter (2001年)《免疫学方法杂志》248:7-15;Volkel,等人 (2001年)《蛋白质工程》14:815-823;Segal,等人 (2001年)《免疫学方法杂志》248:1-6;Brennan,等人 (1985年)《科学 (Science)》229:81-83;Raso,等人 (1997年)《生物化学杂志》272:27623;Morrison (1985年)《科学》229:1202-1207;Traunecker,等人 (1991年)《欧洲分子生物学杂志 (EMBO J.)》10:3655-3659;和美国专利第5,932,448号、第5,532,210号和第6,129,914号)。完全人抗体还可以在例如VelociMouse的经基因工程改造的小鼠中发展。参见例如DeChiara等人.,《由八细胞期胚胎注射产生完全ES细胞源性小鼠 (Producing fully ES cell-derived mice from eight-cell stage embryo injections)》,《酶学方法 (Methods Enzymol)》,476:285-94 (2010);Dechiara等人.,《VelociMouse:自ES细胞向八细胞期胚胎中的注入获得的完全ES细胞源性F0代小鼠 (VelociMouse:fully ES cell-derived F0-generation mice obtained from the injection of ES cells into eight-cell-stage embryos)》《分子生物学方法 (Methods Mol Biol)》,530:311-24 (2009);美国专利第7576259号;第7659442号;或第7294754号和US2008/0078000A1。

[0163] 抗原纯化通常不为抗体生成所需。动物可以免疫接种携带所关注的抗原的细胞。随后,可以自经免疫动物分离脾细胞,并且脾细胞可以与骨髓瘤细胞系融合以产生融合瘤 (参见例如,Meyaard等人 (1997年)《免疫 (Immunity)》7:283-290;Wright等人 (2000年)《免疫》13:233-242;Preston等人,同前文献;Kaithamana等人 (1999年)《免疫学杂志》163:5157-5164)。

[0164] 抗体可以结合至例如小药物分子、酶、脂质体、聚乙二醇 (PEG)。抗体适用于治疗、诊断、试剂盒或其他目的,并且包括偶合至例如染料、放射性同位素、酶或金属 (例如胶体金) 的抗体 (参见例如,Le Doussal等人 (1991年)《免疫学杂志》146:169-175;Gibellini等人 (1998年)《免疫学杂志》160:3891-3898;Hsing和Bishop (1999年)《免疫学杂志》162:2804-2811;Everts等人 (2002年)《免疫学杂志》168:883-889)。

[0165] 包括荧光活化细胞分选术 (FACS) 的流式细胞术方法为可用的 (参见例如,Owens,

等人(1994年)《用于临床实验室实践的流式细胞术原理(Flow Cytometry Principles for Clinical Laboratory Practice)》,约翰·威利父子出版公司,新泽西州霍博肯(Hoboken, N.J.);Givan(2001年)《流式细胞术(Flow Cytometry)》,第2增补版;Wiley-Liss,新泽西州霍博肯;Shapiro(2003年)《实用流式细胞术(Practical Flow Cytometry)》,约翰·威利父子出版公司,新泽西州霍博肯)。用作例如诊断试剂的适用于修饰包括核酸引物和探针的核酸、多肽和抗体的荧光试剂为可用的(分子探针(2003年)目录,分子探针公司(Molecular Probes, Inc.),俄勒冈州尤金(Eugene, Oreg.);西格玛-奥德里奇(2003年)目录,密苏里州圣路易斯)。

[0166] 描述标准免疫系统组织学方法(参见例如,Muller-Harmelink(编)(1986年)《人类胸腺:组织病理学和病理学(Human Thymus:Histopathology and Pathology)》,纽约的斯普林格出版社(Springer Verlag, New York),纽约;Hiatt,等人(2000年)《组织学彩色图谱(Color Atlas of Histology)》,Lippincott, Williams和Wilkins,宾夕法尼亚州费城(Phila, Pa.);Louis,等人(2002年)《基础组织学:文本和图谱(Basic Histology:Text and Atlas)》,纽约的麦格劳-希尔(McGraw-Hill, New York),纽约)。

[0167] 用于测定例如抗原片段、前导序列、蛋白质折叠、功能结构域、糖基化位点和序列比对的软件包和资料库是可用的(参见例如,《基因库、载体NTI®套件(GenBank, Vector NTI® Suite)》(马里兰州贝塞斯达的迅宏科技公司(Informax, Inc, Bethesda, Md.));GCG威斯康星包(GCG Wisconsin Package)(加利福尼亚州圣地亚哥的Accelrys公司);DeCypher®(TimeLogic公司, Crystal Bay, Nev.);Menne等人(2000年)《生物信息学(Bioinformatics)》16:741-742;Menne等人(2000年)《生物信息学应用笔记(Bioinformatics Applications Note)》16:741-742;Wren等人(2002年)《生物医学的计算机方法程序(Comput.Methods Programs Biomed.)》68:177-181;von Heijne(1983年)《欧洲生物化学杂志(Eur.J.Biochem.)》133:17-21;von Heijne(1986年)《核酸研究(Nucleic Acids Res.)》14:4683-4690)。

[0168] 抗PcrV抗体

[0169] 用于预防或治疗感染性疾病的被动免疫疗法已经使用了一个多世纪,通常采用含有高滴定度中和抗体的康复人血清的形式(Good等人,1991;Cancer68:1415-1421)。如今,若干纯化的单克隆抗体目前在临床前和临床开发中用作抗微生物剂(Marasco等人,2007;Nature Biotechnology 25:1421-1434)。已经描述了结合至铜绿假单胞菌PcrV的某些抗体(参见例如François等人,2012;Crit.Care Med.40:2320-2326;和W02009088032)。

[0170] 本发明人在本文中已经描述了特异性结合至铜绿假单胞菌PcrV并调节T3SS毒力机制的完全人抗体及其抗原结合片段。抗PcrV抗体可以以高亲和力结合至PcrV。在某些实施方案中,抗体可以结合至PcrV,并且预防或减轻细胞死亡。在某些实施方案中,抗体可以预防细菌毒素易位到宿主细胞中,并且因此可以抑制或中和铜绿假单胞菌感染。在一些实施方案中,抗体可以通过阻断宿主细胞中的T3SS孔介导的膜渗透性来发挥功能。在某些实施方案中,本文提供的抗体可以介导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC),并且因此可以帮助破坏携带细菌的细胞。在某些实施方案中,抗体可以以两种方式发挥作用,例如它们可以中和细菌感染性并且可以介导ADCC。在一些方面,相对于类似地定位但未治疗的受试者或群体,抗体可以降低细菌载量,例如肺细菌载量。在一些方面,相对于类似地定位但未

治疗的受试者或群体,抗体可以增加存活率或降低死亡率。在一些实施方案中,抗体可以用于治疗患有铜绿假单胞菌感染的受试者。当施用于有需要的受试者时,抗体可以减少受试者的铜绿假单胞菌感染。它们可以单独或作为辅助疗法与本领域已知的其他治疗部分或模式一起用于治疗细菌感染。此外,所鉴定的抗体可以预防性地(在感染前)用于保护受试者(例如哺乳动物)免受感染,或者可以治疗性地(在感染建立后)用于改善此前建立的感染,或改善与感染相关的至少一种症状。

[0171] 铜绿假单胞菌PcrV蛋白的全长氨基酸序列在GenBank中显示为登录号250397.1,并且以SEQ ID NO:77表示。截短的PcrV蛋白(PcrV_136-257)以SEQ ID NO:79表示。两种蛋白质都可以以6组氨酸标签标记:全长PcrV的SEQ ID NO:78和截短的PcrV的SEQ ID NO:80。

[0172] 在某些实施方案中,本文提供的抗体从用初级免疫原(诸如全长PcrV)免疫或用截短形蛋白质免疫的小鼠获得。免疫原可以是编码活性片段的PcrV蛋白或DNA的任何免疫原性片段。肽可以经过修饰以包括添加或取代某些残基,从而用于进行标记或达到与载体分子如KLH缀合的目的。例如,可以在肽的N-末端或C-末端添加半胱氨酸,或可以添加接头序列,以制备与例如KLH缀合的肽以进行免疫。

[0173] 本文公开的某些抗PcrV抗体能够结合至铜绿假单胞菌并且中和其活性,如体外或体内测定法所确定。可以使用本领域技术人员已知的任何标准方法(包括如本文所述的结合测定法或活性测定法)来测量本公开的抗体结合至铜绿假单胞菌并且中和其活性的能力。

[0174] 用于测量结合活性的非限制性、示例性体外分析在本文实例3中加以说明。在实施例3中,抗PcrV抗体对全长PcrV(6his标记,SEQ ID NO:78)或截短的PcrV(6his标记,SEQ ID NO:80)的结合亲和力和解离常数通过Biacore来确定。在实施例6和7中,使用中和测定法来确定抗体中和两种不同的铜绿假单胞菌菌株的能力。

[0175] 对PcrV具有特异性的抗体可以不含另外的标记或部分,或者它们可以含有N-末端或C-末端标记或部分。在一个实施方案中,所述标记或部分生物素。在结合分析中,标记(如果有的话)的位置可以确定肽相对于肽所结合的表面的取向。举例来说,如果表面涂覆有抗生物素蛋白,则含有N-末端生物素的肽将被定向,使得肽的C-末端部分将在表面远侧。在一个实施方案中,标记可以是放射性核素、荧光染料或MRI可检测的标记。在某些实施方案中,此类标记的抗体可以用于包括成像分析在内的诊断分析中。

[0176] 抗体的抗原结合片段

[0177] 除非另外具体指示,否则如本文所用,术语“抗体”应理解为涵盖包含两条免疫球蛋白重链和两条免疫球蛋白轻链的抗体分子(即,“完整抗体分子”)以及其抗原结合片段。如本文所用,术语抗体的“抗原结合部分”、抗体的“抗原结合片段”等包括特异性结合抗原以形成复合物的任何天然存在的、酶促可获得的、合成性或基因工程化的多肽或糖蛋白。如本文所用,术语抗体的“抗原结合片段”或“抗体片段”是指保留特异性结合至铜绿假单胞菌PcrV的能力的抗体的一个或多个片段。抗体片段可以包括Fab片段、F(ab')₂片段、Fv片段、dAb片段、含有CDR的片段或分离的CDR。在某些实施方案中,术语“抗原结合片段”是指多特异性抗原结合分子的多肽片段。可以使用任何合适的标准技术,如蛋白水解消化或涉及操纵和表达编码抗体可变域和(任选地)恒定域的DNA的重组基因工程技术,例如,从完整抗体分子衍生抗体的抗原结合片段。这样的DNA是已知的,和/或可以容易地从例如商业来源、

DNA文库(包括,例如噬菌体-抗体文库)获得,或者可以被合成。可以对DNA测序,并化学地或通过使用分子生物学技术进行操作,例如,以将一个或多个可变结构域和/或恒定结构域排列为合适的构型,或导入密码子,产生半胱氨酸残基,修饰、添加或删除氨基酸等。

[0178] 抗原结合片段的非限制性例子包括:(i) Fab片段;(ii) F(ab')₂片段;(iii) Fd片段;(iv) Fv片段;(v) 单链Fv(scFv)分子;(vi) dAb片段;和(vii) 由模拟抗体高变区的氨基酸残基组成的最小识别单位(例如,分离的互补性决定区(CDR)诸如CDR3肽)或受限制的FR3-CDR3-FR4肽。如本文所用,其他经工程化的分子(诸如结构域特异性抗体、单结构域抗体、结构域缺失抗体、嵌合抗体、CDR移植抗体、双体、三体、四体、微体、纳米体(例如,单价纳米体、二价纳米体等)、小模块免疫药物(SMIP)和鲨鱼可变IgNAR结构域)也被涵盖在表述“抗原结合片段”内。

[0179] 抗体的抗原结合片段通常将包含至少一个可变结构域。可变结构域可以具有任何尺寸或氨基酸组成并且一般包含邻近一个或多个框架序列或与一个或多个框架序列同框的至少一个CDR。在具有V_H结构域与V_L结构域缔合的抗原结合片段中,V_H和V_L结构域可相对于彼此以任何合适的布置定位。举例来说,可变区可以是二聚体,并且含有V_H-V_H、V_H-V_L或V_L-V_L二聚体。可替代地,抗体的抗原结合片段可含有单体V_H或V_L结构域。

[0180] 在某些实施方案中,抗体的抗原结合片段可以含有与至少一个恒定结构域共价连接的至少一个可变结构域。可以在本公开的抗体的抗原结合片段内发现的可变域和恒定域的非限制性示例性构型包括:(i) V_H-C_H1;(ii) V_H-C_H2;(iii) V_H-C_H3;(iv) V_H-C_H1-C_H2;(v) V_H-C_H1-C_H2-C_H3;(vi) V_H-C_H2-C_H3;(vii) V_H-C_L;(viii) V_L-C_H1;(ix) V_L-C_H2;(x) V_L-C_H3;(xi) V_L-C_H1-C_H2;(xii) V_L-C_H1-C_H2-C_H3;(xiii) V_L-C_H2-C_H3;以及(xiv) V_L-C_L。在可变结构域和恒定结构域的任何构型(包括上面列出的任何示例性构型)中,可变结构域和恒定结构域可以彼此直接连接或者可以通过全长或部分铰链或接头区相连。铰链区可以由在单一多肽分子中相邻可变结构域与/或恒定结构域之间产生柔性或半柔性键联的至少2个(例如,5个、10个、15个、20个、40个、60个或更多个)氨基酸组成。此外,本公开的抗体的抗原结合片段可以包含具有上文所列的可变结构域和恒定结构域构型中的任一个的彼此和/或与一个或多个单体V_H或V_L结构域(例如,通过二硫键)呈非共价缔合的同二聚体或异二聚体(或其他多聚体)。

[0181] 如同完整抗体分子,抗原结合片段可以是单特异性的或多特异性的(例如,双特异性的)。抗体的多特异性抗原结合片段将通常包含至少两个不同的可变域,其中每个可变域能够特异性地结合单独的抗原或同一抗原上的不同表位。使用本领域可用的常规技术,可以使任何多特异性抗体形式(包括本文公开的示例性双特异性抗体形式)适用于本公开的抗体的抗原结合片段的语境中。

[0182] 人抗体的制备

[0183] 用于在转基因小鼠中产生人抗体的方法是本领域中已知的。任何此类已知的方法均可用于本公开的背景中,以制备特异性结合至铜绿假单胞菌PcrV的人抗体。包含以下任一者的免疫原可用于产生针对PcrV的抗体。在某些实施方案中,本公开的抗体从用全长PcrV免疫的小鼠获得,例如GenBank登录号NP_250397.1(SEQ ID NO:77)或截短的PcrV蛋白,例如PcrV_136-257(SEQ ID NO:79)。或者,PcrV蛋白或其片段可以使用标准生物化学技术来产生,并进行修饰以及用作免疫原。在一个实施方案中,免疫原是重组PcrV蛋白或其片段。在某些实施方案中,免疫原可以是可商购获得的PcrV蛋白。在某些实施方案中,可以施

用一次或多次加强注射。在某些实施方案中,加强注射可以包含一种或多种可商购获得的PcrV蛋白。在某些实施方案中,免疫原可以是在大肠杆菌(E.coli)中或在任何其他真核细胞或哺乳动物细胞(诸如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞)中表达的重组PcrV抗原。

[0184] 使用VELOCIMMUNE®技术(参见例如US 6,596,541,雷杰纳荣制药公司(Regeneron Pharmaceuticals),VELOCIMMUNE®)或用于产生单克隆抗体的任何其他已知方法,可以首先分离出具有人可变区和小鼠恒定区的高亲和力的抗PcrV嵌合抗体。VELOCIMMUNE®技术涉及生成转基因小鼠,所述转基因小鼠具有包含与内源性小鼠恒定区基因座可操作地连接的人类重链和轻链可变区的基因组,使得所述小鼠响应于抗原刺激产生包含人类可变区和小鼠恒定区的抗体。分离出编码抗体的重链和轻链可变区的DNA并且将其与编码人类重链和轻链恒定区的DNA可操作地连接。随后,在能够表达完全人抗体的细胞中表达所述DNA。

[0185] 一般来说,用所关注的抗原攻击VELOCIMMUNE®小鼠,并从表达抗体的小鼠中回收淋巴细胞(如B细胞)。淋巴细胞可以与骨髓瘤细胞系融合以制备无限增殖杂交瘤细胞系,并且对此类杂交瘤细胞系进行筛选和选择以鉴别出产生对所关注的抗原具有特异性的抗体的杂交瘤细胞系。可以将编码重链和轻链可变区的DNA分离并与所期望的重链和轻链的同种型恒定区连接。此类抗体蛋白可以在细胞(如CHO细胞)中产生。可替代地,可以直接从抗原特异性淋巴细胞中分离出编码抗原特异性嵌合抗体或轻链和重链可变域的DNA。

[0186] 首先,分离出具有人类可变区和小鼠恒定区的高亲和力嵌合抗体。如在下文实验章节中,针对期望的特征,包括亲和力、选择性、表位等,表征并且选择抗体。小鼠恒定区被所期望的人恒定区替换以产生完全人抗体,例如野生型或经修饰的IgG1或IgG4。虽然所选择的恒定区可以根据具体用途而变化,但高亲和力抗原结合和目标特异性特征存在于可变区中。

[0187] 生物等效物

[0188] 本文公开的抗PcrV抗体和抗体片段涵盖氨基酸序列与所描述的抗体的氨基酸序列不同,但保留结合PcrV的能力的蛋白质。当与亲本序列对比时,这样的变体抗体和抗体片段包含氨基酸的一个或多个添加、缺失或置换,但显示出与所述抗体的生物学活性基本上等效的生物学活性。同样,本公开的编码抗体的DNA序列涵盖这样的序列,所述序列与所公开的序列相比包含一个或多个核苷酸的添加、缺失或置换,但是编码与本文公开的抗体或抗体片段基本上生物等效的抗体或抗体片段。

[0189] 如果例如两种抗原结合蛋白或抗体是当在类似实验条件下以单次剂量或多次剂量施用相同摩尔剂量时,吸收速率和程度不展示显著差异的药物等效物或药物替代物,则将其视为生物等效的。如果某些抗体在吸收程度上是等效的,但是在吸收速率上不是等效的,则将其视为等效物或药物替代物,但因为吸收速率的此类差异是有意的并且反映在标记中,所以可以被视为生物等效的,这些抗体对于例如在长期使用中达到有效体内药物浓度不是必需的,并且被认为对于所研究的特定药品不具有临床意义。

[0190] 在一个实施方案中,如果两种抗原结合蛋白的安全性、纯度或效力无临床上有意義的差异,则这两种抗原结合蛋白是生物等效的。

[0191] 在一个实施方案中,如果与不进行参考产品和生物产品之间的切换的连续疗法相比,患者可以进行此类切换一次或多次,而没有预期的不良反应风险的增加,包括免疫原性

的临床上显著的变化、或减少的有效性,则两种抗原结合蛋白是生物等效的。

[0192] 在一个实施方案中,如果两种抗原结合蛋白都通过针对一个或多个使用条件的一种或多种共同作用机制来发挥作用,以达到此类机制是已知的程度,则所述两种抗原结合蛋白是生物等效的。

[0193] 生物等效性可以由体内和/或体外方法证明。生物等效性度量包括,例如,(a)在人或其他哺乳动物中的体内测试,其中测量了随时间推移的血液、血浆、血清或其他生物流体中的抗体或其代谢物的浓度;(b)与人体内生物利用率数据相关联并且可以合理地预测人体内生物利用率数据的体外测试;(c)在人或其他哺乳动物中的体内测试,其中测量了随时间推移的抗体(或其靶标)的适当急性药理作用;以及(d)建立抗体的安全性、功效或生物利用率或生物等效性的良好对照的临床试验。

[0194] 本文公开的抗体的生物等效变体可以通过例如对残基或序列进行各种置换或者使生物学活性不需要的末端或内部残基或序列缺失来构建。举例来说,可以缺失不是生物活性必需的半胱氨酸残基或用其他氨基酸替换,以防止在复性时形成不必要的或不正确的分子内二硫桥键。在其他情形下,生物等效抗体可以包括包含氨基酸变化的抗体变体,这些变化修饰抗体的糖基化特征,例如消除或去除糖基化的突变。

[0195] 包含Fc变体的抗PcrV抗体

[0196] 根据某些实施方案,提供了抗PcrV抗体,所述抗PcrV抗体包含Fc结构域,所述Fc结构域包含一个或多个突变,所述突变例如与中性pH相比在酸性pH下增强了或减少了抗体与FcRn受体的结合。例如,本公开包括抗PcrV抗体,所述抗PcrV抗体在Fc结构域的C_H2或C_H3区中包含突变,其中一个或多个突变在酸性环境下(例如,在pH范围为从约5.5至约6.0的胞内体中)增加了Fc结构域与FcRn的亲合力。当向动物施用,这类突变可以导致抗体的血清半衰期增加。此类Fc修饰的非限制性实例包括例如位置250(例如,E或Q);250和428(例如,L或F);252(例如,L/Y/F/W或T)、254(例如,S或T)和256(例如,S/R/Q/E/D或T)处的修饰;或位置428和/或433(例如,H/L/R/S/P/Q或K)和/或434处的修饰(例如,A、W、H、F或Y[N434A、N434W、N434H、N434F或N434Y]);或位置250和/或428处的修饰;或位置307或308处的修饰(例如,308F、V308F)以及位置434处的修饰。在一个实施方案中,修饰包含428L(例如M428L)和434S(例如N434S)修饰;428L、259I(例如V259I)和308F(例如V308F)修饰;433K(例如H433K)和434(例如434Y)修饰;252、254和256(例如252Y、254T和256E)修饰;250Q和428L修饰(例如T250Q和M428L);以及307和/或308修饰(例如308F或308P)。在又一个实施方案中,修饰包含265A(例如D265A)和/或297A(例如N297A)修饰。

[0197] 例如,本文提供了抗PcrV抗体,所述抗PcrV抗体包含Fc结构域,所述Fc结构域包含一对或多对或者一组或多组选自以下组成的组的突变:250Q和248L(例如T250Q和M248L);252Y、254T和256E(例如M252Y、S254T和T256E);428L和434S(例如M428L和N434S);257I和311I(例如P257I和Q311I);257I和434H(例如P257I和N434H);376V和434H(例如D376V和N434H);307A、380A和434A(例如T307A、E380A和N434A);以及433K和434F(例如H433K和N434F)。前述Fc结构域突变的所有可能组合和在本文公开的抗体可变结构域内的其他突变都被涵盖在本公开的范围。

[0198] 本公开还包括包含嵌合重链恒定(C_H)区的抗PcrV抗体,其中所述嵌合C_H区包含来源于多于一种免疫球蛋白同种型的C_H区的区段。举例来说,本公开的抗体可以包含嵌合C_H

区,所述区包含来源于人类IgG1、人类IgG2或人类IgG4分子的C_H2域的部分或全部,其与来源于人类IgG1、人类IgG2或人类IgG4分子的C_H3域的部分或全部组合。根据某些实施方案,本文提供的抗体包含具有嵌合铰链区的嵌合C_H区。举例来说,嵌合铰链可以包含来源于人类IgG1、人类IgG2或人类IgG4铰链区的“上铰链”氨基酸序列(根据EU编号,位置216到227的氨基酸残基),其与来源于人类IgG1、人类IgG2或人类IgG4铰链区的“下铰链”序列(根据EU编号,位置228到236的氨基酸残基)组合。根据某些实施方案,嵌合铰链区包含衍生自人类IgG1或人类IgG4上铰链的氨基酸残基,和衍生自人类IgG2下铰链的氨基酸残基。包含如本文所描述的嵌合C_H区的抗体可以在某些实施方案中呈现修饰的Fc效应功能,而不会不利地影响抗体的治疗或药代动力学特性。(参见例如,2013年2月1日提交的美国临时申请号61/759,578)。

[0199] 抗体的生物特征

[0200] 一般来说,本公开的抗体通过与PcrV结合而起作用。例如,本公开包括抗体和抗体的抗原结合片段,所述抗体和抗体的抗原结合片段以小于10⁻⁷M的K^D结合PcrV或PcrV_136-257(例如,在25°C或37°C下),如通过表面等离子共振,例如使用如本文所述的测定法形式所测量。在某些实施方案中,抗体或其抗原结合片段以小于约10nM、小于约5nM、小于约1nM、小于约500pM、小于250pM或小于100pM的K_D结合PcrV,如例如使用如本文所述的测定法形式或基本上相似的测定法通过表面等离子共振所测量。

[0201] 本公开还包括结合PcrV的抗体及其抗原结合片段,解离半衰期(t_{1/2})大于约10分钟,如在25°C下通过表面等离子共振所测量,或大于约1分钟,如例如使用如本文所定义的测定法形式或基本上相似的测定法在37°C下通过表面等离子共振所测量。在某些实施方案中,本公开的抗体或抗原结合片段以大于约1分钟、大于约10分钟、大于约30分钟、大于约60分钟、大于约100分钟、大于约200分钟、大于约300分钟、大于约400分钟、大于约500分钟、大于约600分钟、大于约700分钟、大于约800分钟、大于约900分钟、大于约1000分钟的t_{1/2}结合PcrV,如例如使用如本文所定义的测定法形式(例如,mAb捕获或抗原捕获形式)或基本上相似的测定法在25°C或37°C下通过表面等离子共振所测量。

[0202] 本文还包括中和例如如实施例6中所示的A549细胞中的铜绿假单胞菌PcrV介导的毒性的抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,抗体表现出针对铜绿假单胞菌菌株6077的中和效力,IC₅₀范围为约10⁻¹¹M至约10⁻⁷M。在一些实施方案中,抗体表现出针对铜绿假单胞菌菌株ATCC 700888的中和效力,IC₅₀范围为约10⁻⁹M至约10⁻⁷M。本文提供的抗体还中和如实施例7所示的铜绿假单胞菌PcrV介导的RBC溶血。在一些实施方案中,抗体表现出针对菌株6077的中和效力,IC₅₀范围为约10⁻¹⁰M至约10⁻⁷M。在一些实施方案中,抗体表现出针对菌株ATCC 700888的中和效力,IC₅₀范围为约10⁻¹⁰M至约10⁻⁸M。此外,本文提供的抗体与结合PcrV的其他抗体交叉竞争,如实施例4所示。

[0203] 本文还包括预防个体死亡或降低群体死亡率的抗体。在一些实施方案中,抗体可以预防性地施用。在一些实施方案中,抗体可以治疗性地施用。在一些实施方案中,当以5mg/kg施用时,抗体在肺炎的小鼠模型中表现出100%改善的存活率,如实施例8中所示。在一些实施方案中,抗体甚至在较低剂量,例如1mg/kg或0.2mg/kg,或甚至0.04mg/kg下表现出改善的存活率,如实施例9中所示。

[0204] 本文还包括减少受试者或群体中的细菌载量(例如肺细菌载量)的抗体。在一些实

实施方案中,抗体可以预防性地施用。在一些实施方案中,抗体可以治疗性地施用。在一些实施方案中,当以0.1或0.2mg/kg或以25mg/kg施用,抗体在肺炎的小鼠模型中展示出与未经治疗的受试者相比细菌载量减少3至4倍对数,如实施例10和实施例11中所示。

[0205] 在一个实施方案中,本文提供的抗体可以具有以下特征中的一者或多者:(a)包含三个重链互补决定区(CDR)(HCDR1、HCDR2和HCDR3),所述重链CDR被包含在选自由以下项组成的组的重链可变区(HCVR)序列中的任一者内:SEQ ID NO:2、18、34和50;和三个轻链CDR(LCDR1、LCDR2和LCDR3),所述轻链CDR被包含在选自由以下项组成的组的轻链可变区(LCVR)序列中的任一者内:SEQ ID NO:10、26、42和58;(a)包含三个重链互补决定区(CDR)(HCDR1、HCDR2和HCDR3),所述重链CDR被包含在选自由以下项组成的组的重链可变区(HCVR)序列中的任一者内:SEQ ID NO:2、18、34和50;和三个轻链CDR(LCDR1、LCDR2和LCDR3),所述轻链CDR被包含在选自由以下项组成的组的轻链可变区(LCVR)序列中的任一者内:SEQ ID NO:10、26、42和58;(b)是完全人单克隆抗体;(c)以小于 10^{-8} M的解离常数(K^D)结合至全长PcrV,如在25°C下通过表面等离子共振测定法所测量;(d)以小于 10^{-8} M的解离常数(K^D)结合至全长PcrV,如在37°C下通过表面等离子共振测定法所测量;(e)在细胞毒性测定法中,展示出以约 10^{-11} M至约 10^{-8} M范围内的 IC_{50} 中和铜绿假单胞菌菌株6077;(f)在细胞毒性测定法中,展示出以约 10^{-9} M至约 10^{-7} M范围内的 IC_{50} 中和铜绿假单胞菌菌株ATCC 700888;(g)在溶血测定法中,展示出以约 10^{-10} M至约 10^{-6} M范围内的 IC_{50} 中和铜绿假单胞菌菌株6077;(h)在溶血测定法中,展示出以约 10^{-10} M至约 10^{-7} M范围内的 IC_{50} 中和铜绿假单胞菌菌株ATCC 700888;(i)在急性肺炎模型中,相对于未经治疗的小鼠,降低以5mg/kg预防性治疗的小鼠中由铜绿假单胞菌菌株6206或菌株6077导致的死亡率;(j)在急性肺炎模型中,相对于未经治疗的小鼠,降低以1.0、0.2或0.04mg/kg预防性治疗的小鼠中由铜绿假单胞菌菌株6206或菌株6077导致的死亡率;(k)在急性肺炎模型中,相对于未经治疗的小鼠,降低以0.1mg/kg或0.2mg/kg预防性治疗的小鼠中铜绿假单胞菌菌株6206的肺细菌负荷;(l)在急性肺炎模型中,相对于未经治疗的小鼠,降低以25mg/kg预防性治疗的小鼠中铜绿假单胞菌菌株PA01的肺细菌负荷;以及/或者(m)与参考抗体交叉竞争,其中所述参考抗体包含重链可变区(HCVR)氨基酸序列和轻链可变区(LCVR)氨基酸序列,其选自由表1的HCVR氨基酸序列和LCVR氨基酸序列中的任一者组成的组。

[0206] 在一个相关实施方案中,如本文提供的抗体或其抗原结合片段可以具有以下特征中的一者或多者:(n)以小于约 10^{-8} M的 EC^{50} 结合至全长PcrV(SEQ ID NO:77);(o)以小于约 10^{-8} M的 EC^{50} 结合至PcrV 136-233(SEQ ID NO:81);(p)与至少一个选自由以下项组成的组的氨基酸序列相互作用:(i)在SEQ ID NO:78的约第150位至约第170位的范围内的氨基酸残基和(ii)在SEQ ID NO:78的约第155位至约第170位的范围内的氨基酸残基;以及/或者(q)与至少一个选自由以下项组成的组的氨基酸序列相互作用:SEQ ID NO:85和SEQ ID NO:86。

[0207] 本文提供的抗体可以具有一种或多种前述生物学特征,或它们的任何组合。抗体的某些特性汇总如下。通过对包括本文工作例在内的本公开的回顾,抗体的其他生物特征将对本领域普通技术人员来说是显而易见的。

[0208] 表位作图和有关的技术

[0209] 本文提供了抗PcrV抗体,所述抗PcrV抗体与铜绿假单胞菌PcrV蛋白内存在的一个

或多个氨基酸相互作用。抗体所结合的表位可以由定位于PcrV蛋白内的3个或更多个(例如,3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或更多个)氨基酸的单个邻接序列(例如,结构域中的线性表位)组成。或者,表位可以由定位于PcrV蛋白内的多个非邻接氨基酸(或氨基酸序列)(例如,构象表位)组成。例如,本文提供的抗PcrV抗体或其抗原结合片段可以结合至PcrV 136-233(SEQ ID NO:81);可以与在SEQ ID NO:78的约第150位至约第170位的范围内的氨基酸残基相互作用;可以与在SEQ ID NO:78的约第155位至约第170位的范围内的氨基酸残基相互作用;和/或可以与选自SEQ ID NO:85和SEQ ID NO:86组成的组的至少一个氨基酸序列相互作用。

[0210] 本领域普通技术人员已知的各种技术可以用于确定抗体是否在多肽或蛋白质内“与一个或多个氨基酸相互作用”。示例性技术包括例如常规交叉阻断分析,如Antibodies, Harlow和Lane(Cold Spring Harbor Press,纽约州冷泉港(Cold Spring Harbor, NY))中所描述的分析。其他方法包括丙氨酸扫描突变分析、肽印迹分析(Reineke(2004) Methods Mol. Biol. 248:443-63)、肽裂解分析结晶学研究和NMR分析。另外,可以采用如抗原的表位切除、表位提取和化学修饰的方法(Tomer(2000) Prot. Sci. 9:487-496)。可以用于鉴别与抗体相互作用的多肽内的氨基酸的另一种方法是通过质谱法检测的氘/氕交换。一般来说,氘/氕交换法涉及所关注的蛋白质的氘标记,接着是抗体与氘标记的蛋白质的结合。接着,将蛋白质/抗体复合物转移到水中,受抗体复合物保护的氨基酸内的可交换质子以比不属于界面的一部分的氨基酸内的可交换质子更慢的速度进行氘氢反交换。因此,形成蛋白质/抗体界面的一部分的氨基酸可能保留氘,并且因此与不包括在界面中的氨基酸相比表现出相对较高的质量。在抗体解离之后,对目标蛋白进行蛋白酶裂解和质谱分析,从而揭露氘标记的残基,所述残基对应于与抗体相互作用的特定氨基酸。参见例如,Ehring(1999) Analytical Biochemistry 267:252-259;Engen和Smith(2001) Anal. Chem. 73:256A-265A。

[0211] 术语“表位”是指B细胞和/或T细胞起反应的抗原上的位点。B细胞表位可以由邻接氨基酸和通过蛋白质的三级折叠并置的非邻接氨基酸形成。由连续氨基酸形成的表位通常在暴露于变性溶剂时保留,而通过三级折叠形成的表位通常在用变性溶剂处理时丢失。表位通常包括处于独特的空间构象中的至少3个,且更通常为至少5个或8-10个氨基酸。

[0212] 修饰辅助概况分析(MAP),也称为基于抗原结构的抗体概况分析(ASAP),是一种根据每个抗体与化学或酶修饰的抗原表面的结合概况的相似性,对针对同一抗原的大量单克隆抗体(mAb)进行分类的方法(参见US 2004/0101920)。每个类别可以反映与另一个类别所代表的表位明显不同或部分重叠的独特表位。这一技术允许快速过滤基因相同的抗体,从而可以使表征集中在基因不同的抗体上。当应用于杂交瘤筛选时,MAP可以促进鉴定产生具有所需特征的mAb的稀有杂交瘤克隆。MAP可以用于将抗体分类为结合不同表位的抗体组。

[0213] 在某些实施方案中,抗PcrV抗体或其抗原结合片段与PcrV蛋白中的示例区域中的任何一个或多个内的表位或其片段结合,所述表位是天然形成的,或以重组方式产生的。

[0214] 本公开包括结合至相同表位或表位的一部分的抗PcrV抗体。同样,本公开还包括与本文所述的特定示例性抗体中的任一者竞争结合至PcrV蛋白或其片段的抗PcrV抗体。例如,本公开包括抗PcrV抗体,所述抗PcrV抗体与从表1和2中所述的那些抗体获得的一种或多种抗体交叉竞争与PcrV的结合。

[0215] 通过使用本领域已知的常规方法,可以容易地确定抗体是否结合至与参考抗PcrV

抗体相同的表位,或者竞争与参考抗PcrV抗体的结合。例如,为了确定测试抗体是否结合至与本公开的参考抗PcrV抗体相同的表位,使参考抗体在饱和条件下结合至PcrV蛋白或肽。然后,评估测试抗体结合至PcrV蛋白的能力。如果测试抗体在与参考抗PcrV抗体饱和结合后能够结合至PcrV,则可以得出以下结论:测试抗体结合至与参考抗PcrV抗体不同的表位。在另一个方面,如果测试抗体在与参考抗PcrV抗体饱和结合后不能结合至PcrV蛋白,则测试抗体可以结合至与本文提供的参考抗PcrV抗体所结合的表位相同的表位。

[0216] 为了确定抗体是否与参考抗PcrV抗体竞争结合,在两个方向上进行上述结合方法:在第一方向上,使参考抗体在饱和条件下结合至PcrV蛋白,然后评估测试抗体与PcrV蛋白的结合。在第二方向上,使测试抗体在饱和条件下结合至PcrV蛋白,然后评估参考抗体与PcrV蛋白的结合。如果在两个方向上只有第一(饱和)抗体能够结合至PcrV蛋白,则可以得出以下结论:测试抗体和参考抗体竞争与PcrV的结合。如本领域的普通技术人员所理解,与参考抗体竞争结合的抗体不一定结合与参考抗体相同的表位,但可以通过结合重叠或相邻的表位来在空间上阻断参考抗体的结合。

[0217] 如果两种抗体各自竞争性地抑制(阻断)另一种抗体与抗原的结合,则两种抗体与相同或重叠的表位结合。即,如在竞争性结合分析中所测量,1倍、5倍、10倍、20倍或100倍过量的一种抗体抑制另一种抗体的结合至少50%,但优选75%、90%或甚至99%(参见例如Junghans等人,Cancer Res.1990 50:1495-1502)。可替代地,如果抗原中减少或消除一种抗体的结合的基本上所有氨基酸突变减少或消除另一种抗体的结合,则两种抗体具有相同的表位。如果减少或消除一种抗体的结合的一些氨基酸突变减少或消除另一种抗体的结合,则两种抗体具有重叠的表位。

[0218] 然后可以进行另外的常规实验(例如,肽突变和结合分析),以确认所观察到的测试抗体结合的缺乏事实上是否是由于结合至与参考抗体相同的表位,或空间阻断(或另一个现象)是否是造成所观察的结合缺乏的原因。可以使用ELISA、RIA、表面等离子共振、流式细胞术或者本领域可用的任何其他定量或定性抗体结合分析来进行这类实验。

[0219] 免疫缀合物

[0220] 本公开提供了与治疗部分(“免疫缀合物”)缀合的人抗PcrV单克隆抗体,所述治疗部分例如用于治疗铜绿假单胞菌感染的抗生素。如本文所用,术语“免疫缀合物”是指与放射性试剂、细胞因子、干扰素、靶标或报告部分、酶、肽或蛋白质或治疗剂化学或生物连接的抗体。抗体可以在沿分子的任何位置与放射性试剂、细胞因子、干扰素、靶标或报告部分、酶、肽或治疗剂连接,只要它能够结合其靶标。免疫缀合物的实例包括抗体药物缀合物和抗体-毒素融合蛋白。在一个实施方案中,药剂可以是针对铜绿假单胞菌的第二不同抗体。在某些实施方案中,抗体可以与特异性针对感染细胞的药剂缀合。可与抗PcrV抗体缀合的治疗部分的类型将考虑待治疗的病症和要实现的所需治疗效果。用于形成免疫缀合物的合适药剂的实例是本领域已知的;参见例如WO 05/103081。

[0221] 多特异性抗体

[0222] 本文提供的抗体可以是单特异性的、双特异性的或多特异性的。多特异性抗体可以对一种目标多肽的不同表位具有特异性,或可以含有对超过一种目标多肽具有特异性的抗原结合域。参见例如,Tutt等人,1991,J. Immunol.147:60-69;Kuffer等人,2004,Trends Biotechnol.22:238-244。

[0223] 本文提供的多特异特异性抗原结合分子中的任一者或其变体可以使用标准分子生物学技术(例如,重组DNA和蛋白质表达技术)来构建,如本领域的普通技术人员所已知。

[0224] 在一些实施方案中,铜绿假单胞菌特异性抗体以双特异性形式(“双特异性”)产生,其中与铜绿假单胞菌PcrV的不同结构域结合的可变区连接在一起,以在单个结合分子内赋予双抗原特异性。适当设计的双特异性可以通过增加特异性和结合亲和力来增强整体T3SS抑制功效。对单个结构域具有特异性的可变区,或可以与一个结构域内的不同区结合的可变区在一个结构支架上配对,所述结构支架允许每个区域同时与单个表位结合,或一个结构域内的不同区域结合。在双特异性的一个实例中,来自对一个域具有特异性的结合物的重链可变区(V_H)与来自一系列对第二个域具有特异性的结合物的轻链可变区(V_L)重新组合,以确定可以与原始 V_H 配对而不破坏所述 V_H 的原始特异性的非同源 V_L 搭配物。以这种方式,单个 V_L 区段(例如 V_{L1})可以与两个不同的 V_H 域(例如 V_{H1} 和 V_{H2})组合,以产生由两个结合“组”($V_{H1}-V_{L1}$ 和 $V_{H2}-V_{L1}$)构成的双特异性。使用单个 V_L 区段降低了系统的复杂性,从而简化了用于产生双特异性的克隆、表达和纯化过程并提高了效率(参见例如USSN13/022759和US2010/0331527)。

[0225] 或者,可以使用本文所描述的技术或本领域技术人员已知的其他技术,以双特异性形式制备结合多于一个结构域和第二靶标的抗体,诸如但不限于例如第二不同抗铜绿假单胞菌抗体。与不同区域结合的抗体可变区可以与结合至例如铜绿假单胞菌上的相关位点的可变区连接在一起,以在单个结合分子内赋予双抗原特异性。适当设计的这种性质的双特异性具有双重功能。对一个铜绿假单胞菌抗原具有特异性的可变区与对PcrV具有特异性的可变区组合,并且在结构支架上配对,以允许每个可变区结合至单独的抗原。

[0226] 可以用于本公开的背景的示例性双特异性抗体形式涉及第一免疫球蛋白(Ig) C_H3 结构域和第二Ig C_H3 结构域的使用,其中所述第一和第二Ig C_H3 结构域的至少一个氨基酸彼此不同,并且其中至少一个氨基酸差异与缺乏氨基酸差异的双特异性抗体相比减少了双特异性抗体与蛋白A的结合。在一个实施方案中,第一Ig C_H3 结构域结合蛋白A并且第二Ig C_H3 结构域含有降低或消除蛋白A结合的突变,例如H95R修饰(根据IMGT外显子编号;根据EU编号的H435R)。第二 C_H3 还可以包含Y96F修饰(按照IMGT;按照EU的Y436F)。在第二 C_H3 内可能发现的其他修饰包括:在IgG1抗体的情况下,D16E、L18M、N44S、K52N、V57M和V82I(按照IMGT;按照EU的D356E、L358M、N384S、K392N、V397M和V422I);在IgG2抗体的情况下,N44S、K52N和V82I(IMGT;按照EU的N384S、K392N和V422I);以及在IgG4抗体的情况下,Q15R、N44S、K52N、V57M、R69K、E79Q和V82I(按照IMGT;按照EU的Q355R、N384S、K392N、V397M、R409K、E419Q和V422I)。在本公开的范围内设想了上文所述的双特异性抗体形式的变化。

[0227] 可以在本公开的语境中使用的其他示例性双特异性形式包括但不限于例如基于scFv的或双体双特异性形式、IgG-scFv融合体、双可变结构域(DVD)-Ig、四源杂交瘤、钮入孔、共同轻链(例如,具有钮入孔的共同轻链等)、CrossMab、CrossFab、(SEED)体、亮氨酸拉链、Duobody、IgG1/IgG2、双重作用Fab(DAF)-IgG和Mab²双特异性形式(关于前述形式的综述,参见例如,Klein等人,2012,mAbs 4:6,1-11,以及其中引用的参考文献)。还可以使用肽/核酸缀合构建双特异性抗体,例如,其中使用具有正交化学反应性的非天然氨基酸来产生位点特异性抗体-寡核苷酸缀合物,然后将其自组装成具有确定组成、价数和几何形状的多聚体复合物。(参见例如,Kazane等人,J. Am. Chem. Soc. [Epub:2012年12月4日])。

[0228] 治疗性施用和配制物

[0229] 本文提供了治疗组合物,所述治疗组合物包含如本文提供的抗PcrV抗体或其抗原结合片段。根据本公开的治疗组合物将与合适的载剂、赋形剂和其他药剂一起施用,所述其他药剂被掺入配制物中,以提供改进的转移、递送、耐受性等。众多的适当配制物可以见于所有医药化学家已知的处方集中:Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, 宾夕法尼亚州伊斯顿 (Easton, PA)。这些配制物包括例如散剂、糊剂、软膏、凝胶剂、蜡、油、脂质、含脂质(阳离子或阴离子脂质)的囊泡(如LIPOFECTIN™)、DNA结合物、无水吸收糊剂、水包油和油包水乳液、乳液卡波蜡(carbowax)(各种分子量的聚乙二醇)、半固体凝胶和含有卡波蜡的半固体混合物。还参见Powell等人“Compendium of excipients for parenteral formulations”PDA(1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311。

[0230] 抗体剂量可以视待施用的个体的年龄和体格、目标疾病、病状、施用途径等而变化。当本公开的抗体用于治疗成年患者的疾病或障碍,或用于预防此类疾病时,通常以0.01至约60mg/kg体重,例如约0.04mg/kg、约0.2mg/kg、约2.0mg/kg、约5mg/kg、约10mg/kg、约15mg/kg、约20mg/kg、约25mg/kg、约30mg/kg、约0.04mg/kg至约2.0mg/kg、约5mg/kg至约60mg/kg、约10mg/kg至约50mg/kg、或约20mg/kg至约50mg/kg体重的单剂量施用抗体是有利的。视病症的严重程度而定,可以调整治疗的频率和持续时间。在某些实施方案中,抗体或其抗原结合片段可以以至少约0.1mg至约800mg、约1至约500mg、约5至约300mg或约10至约200mg、至约100mg或至约50mg的初始剂量施用。在某些实施方案中,初始剂量之后可以施用抗体或其抗原结合片段的第二或多个后续剂量,所述第二或多个后续剂量的量可以大约等于或小于初始剂量的量,其中所述后续剂量间隔至少6小时至24小时、至少1天至3天;至少一周,至少2周;至少3周;至少4周;至少5周;至少6周;至少7周;至少8周;至少9周;至少10周;至少12周;或至少14周。

[0231] 各种递送系统是已知的并且可以用于施用本文提供的药物组合物,例如在脂质体、微粒、微胶囊内包封、能够表达突变病毒的重组细胞、受体介导的胞吞作用(参见例如Wu等人,(1987) J. Biol. Chem. 262:4429-4432)。引入方法包括(但不限于):皮内、经皮、肌肉内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外以及口服途径。所述组合物可以通过任何便利的途径,例如通过输注或团注、通过经上皮或粘膜皮肤内层(例如,口腔粘膜、直肠和肠道粘膜等)吸收施用,并且可以与其他生物活性剂一起施用。施用可以是全身性或局部的。药物组合物也可以在囊泡,尤其脂质体中递送(参见例如Langer(1990) Science 249:1527-1533)。

[0232] 本文还考虑使用纳米颗粒来递送本文提供的抗体。抗体结合的纳米颗粒可以用于治疗和诊断应用。抗体结合的纳米颗粒以及制备和使用方法由Arruebo, M. 等人, 2009 (“Antibody-conjugated nanoparticles for biomedical applications”, 载于 J. Nanomat. 第2009卷, 文章编号439389, 24页, doi:10.1155/2009/439389) 描述。可以开发纳米颗粒并与药物组合物中所含的抗体结合,以靶向感染细胞。用于药物递送的纳米颗粒也已在例如US 8257740或US 8246995中有所描述。

[0233] 在某些情形下,药物组合物可以在控制释放系统中递送。在一个实施方案中,可以使用泵。在另一个实施方案中,可以使用聚合材料。在又一个实施方案中,可以将控制释放系统放入组合物的目标附近,由此仅需要一部分全身剂量。

[0234] 可注射制剂可以包括用于静脉内、皮下、皮内、颅内、腹膜内和肌肉内注射、滴液输注等的剂型。这些可注射制剂可以通过众所周知的方法制备。举例来说,可注射制剂可以例如将上文所描述的抗体或其盐溶解、悬浮或乳化于常规地用于注射的无菌水性介质或油性介质中来制备。作为用于注射的水性介质,存在例如生理盐水、含有葡萄糖和其他助剂等的等渗溶液,其可以与适当的增溶剂组合使用,所述增溶剂如醇(例如,乙醇)、多元醇(例如,丙二醇、聚乙二醇)、非离子表面活性剂[例如,聚山梨醇酯80、HCO-50(氢化蓖麻油聚氧乙烯(50mol)加合物)]等。作为油性介质,采用例如芝麻油、大豆油等,其可以与增溶剂,如苯甲酸苯甲酯、苯甲醇等组合使用。由此制备的注射剂优选地填充于适当安瓿中。

[0235] 可以用标准针头和注射器皮下或静脉内递送药物组合物。此外,对于皮下递送,笔式递送装置易于应用于递送本公开的药物组合物。这种笔式递送装置可以重复使用或是一次性的。可重复使用的笔式递送装置一般利用含有药物组合物的可更换的筒。一旦筒内的所有药物组合物都已施用并且筒变空时,就可以容易地丢弃空筒并且更换为含有药物组合物的新筒。然后可以再使用笔式递送装置。在一次性笔式递送装置中,没有可更换的筒。实际上,一次性笔式递送装置在装置内的储集器中预填充有药物组合物。一旦清空储集器中的药物组合物,就丢弃整个装置。

[0236] 多种可重复使用的笔式递送装置和自动注射器递送装置应用于皮下递送本公开的药物组合物。实例包括但不限于:AUTOPEIN™(英国伍德斯托克(Woodstock,UK)的Owen Mumford公司);DISETRONIC™笔(瑞士布格多夫(Burghdorf,Switzerland)的Disetronic Medical Systems);HUMALOG MIX 75/25™笔;HUMALOG™笔;HUMALIN 70/30™笔(印第安纳州印第安纳波利斯(Indianapolis,IN)的Eli Lilly and Co.);NOVOPEIN™I、II和III(丹麦哥本哈根(Copenhagen,Denmark)的Novo Nordisk);NOVOPEIN JUNIOR™(丹麦哥本哈根的Novo Nordisk);BD™笔(新泽西州富兰克林湖(Franklin Lakes,NJ)的Becton Dickinson);OPTIPEIN™;OPTIPEIN PRO™;OPTIPEIN STARLET™以及OPTICLIK™(德国法兰克福(Frankfurt,Germany)的sanofi-aventis)等。可用于皮下递送本公开的药物组合物的一次性笔式递送装置的实例包括但不限于SOLOSTAR™笔(Sanofi-Aventis)、FLEXPEN™(Novo Nordisk)和KWIKPEIN™(Eli Lilly)、SURECLICK™自动注射器(加利福尼亚州千橡树市(Thousand Oaks,CA)的Amgen)、PENLET™(德国斯图加特(Stuttgart,Germany)的Haselmeier)、EPIPEIN(Dey, L.P.)以及HUMIRA™笔(伊利诺伊州阿博特帕克(Abbott Park IL)的Abbott Labs)等。

[0237] 有利地,将用于上文所描述的口服或不经肠使用的药物组合物制备成适合于符合活性成分剂量的单位剂量的剂型。此类呈单位剂量的剂型包括例如片剂、丸剂、胶囊、注射液(安瓿)、栓剂等。所含有的抗体的量通常为在单位剂量中每剂型约1至约500mg;尤其是在注射形式中,对于其他剂型,所含有的抗体的量为约1mg至约100mg和约10至约250mg是优选的。

[0238] 抗体的治疗用途

[0239] 本文提供的抗体可用于治疗和/或预防(例如预防性治疗)与铜绿假单胞菌感染相关的疾病或障碍或病症和/或用于改善与此类疾病、障碍或病症相关的至少一种症状。

[0240] 在某些实施方案中,本文公开的抗体可用于治疗患有由铜绿假单胞菌导致的肺炎、菌血症、骨感染、关节感染、皮肤感染、烧伤感染、伤口感染、泌尿道感染或它们的任何组合的受试者。在一个实施方案中,抗体或其抗原结合片段可以以治疗剂量施用于铜绿假单

胞菌感染的患者。

[0241] 在一些实施方案中,本文提供了改善或降低受试者的铜绿假单胞菌感染的至少一种症状的严重性、持续时间或发生频率的方法。例如,本文公开的一种或多种抗PcrV抗体可以施用以缓解或预防或减轻疾病或障碍的一种或多种症状或病症的严重性。抗体可以用于改善或减轻铜绿假单胞菌感染的至少一种症状的严重性,所述症状包括但不限于发热、发冷、头痛、疲劳、关节疼痛、僵硬、肌痛、腹泻、呕吐、疼痛、瘙痒、耳液排出、皮疹、皮肤上的充满脓液的突起、眼痛、眼部发红、肺炎、咳嗽、充血、软组织排出绿色脓液、甜水果味和泌尿道感染。

[0242] 本文还设想了将本文公开的一种或多种抗PcrV抗体预防性地施用于处于发生感染的风险中的受试者,诸如接受手术的受试者、接受重大疾病的治疗的受试者、具有严重烧伤的受试者、使用呼吸机的受试者、使用导管的受试者、接受化疗的受试者、患有糖尿病的受试者、患有囊性纤维化的受试者、患有结核病的受试者、患有HIV的受试者、或免疫系统受损的受试者。

[0243] 处于获得铜绿假单胞菌感染的风险中的其他受试者包括例如由于自身免疫性疾病而免疫受损的人,或那些接受免疫抑制疗法的人(例如,在器官移植后),某些形式的消耗或破坏白血球的贫血形式,那些接受放射或化疗的人或那些患有炎性障碍的人。

[0244] 本文还设想了施用一种或多种抗PcrV抗体,以中和铜绿假单胞菌感染。暴露个体或细胞导致增强的对细胞死亡的保护。在某些实施方案中,所述暴露可以是体外的或体内的。当所述抗体单独使用时,或当所述抗体与一种或多种另外的治疗剂或抗铜绿假单胞菌的抗体组合使用时,可以观察到增强的保护。

[0245] 本文还设想了在受试者中施用一种或多种抗PcrV抗体以减少细菌载量。在一些方面,一种或多种抗PcrV抗体或其抗原结合片段减少受试者的肺中的细菌载量。抗体或其抗原结合片段可以阻断毒素至所述宿主细胞的铜绿假单胞菌递送。在一些方面,用本文提供的抗PcrV抗体治疗减少了铜绿假单胞菌的细菌载量。在一些方面,用本文提供的抗PcrV抗体的治疗减少铜绿假单胞菌和共感染细菌(例如革兰氏阴性菌或革兰氏阳性菌)的细菌载量。在一些方面,用本文提供的抗PcrV抗体治疗减少了铜绿假单胞菌的细菌载量和金黄色葡萄球菌的细菌载量。

[0246] 在一些实施方案中,本文提供了增加患有铜绿假单胞菌感染的受试者或处于铜绿假单胞菌感染风险中的受试者的存活率或存活可能性的方法。

[0247] 可以施用一种或多种抗PcrV抗体以增加患有囊性纤维化的受试者的存活率或存活的可能性。在一些方面,所述受试者在施用不具有肺炎症状。

[0248] 在另一个实施方案中,本发明的抗PcrV抗体用于制备治疗处于铜绿假单胞菌感染的风险中或患有铜绿假单胞菌感染的患者的药物组合物。在另一个实施方案中,本发明的抗体作为辅助疗法与本领域的技术人员已知可用于治疗或改善铜绿假单胞菌感染的任何其他药剂或任何其他疗法一起使用。

[0249] 组合疗法

[0250] 组合疗法可以包括如本文公开的抗PcrV抗体和可以有利地与此类抗体或其生物活性片段组合的任何另外的治疗剂。抗体可以与一种或多种用于治疗铜绿假单胞菌感染的药物或药剂协同组合。

[0251] 用于治疗细菌感染的示例性药剂可以包括例如抗生素、抗炎药物(诸如皮质类固醇和非甾体抗炎药物)、针对铜绿假单胞菌的不同抗体或用于治疗铜绿假单胞菌感染的症状或用于减少患者中的细菌载量的任何其他姑息疗法。在某些实施方案中,如果发生与抗PcrV抗体或其抗原结合片段相关的任何可能的一种或多种副作用,则所述第二治疗剂可以是有助于抵消或减少此类一种或多种副作用的药剂。

[0252] 可以有利地与抗PcrV抗体结合的示例性药剂包括但不限于其他结合和/或抑制铜绿假单胞菌活性的药剂(包括其他抗体或其抗原结合片段等)和/或不直接结合PcrV或另一个铜绿假单胞菌抗原但仍然抑制细菌活性包括宿主细胞感染性的药剂。在一些方面,第二治疗剂可以是用于治疗与不同的生物体相关的感染的治疗剂,所述不同的生物体可以与铜绿假单胞菌,例如革兰阳性生物体或革兰阴性生物体,例如金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)的生物体共感染。在一些方面,另外的治疗剂是可用于治疗共感染的治疗剂。在一些方面,所述另外的治疗剂可用于治疗金黄色葡萄球菌共感染。

[0253] 与抗PcrV抗体组合的示例性抗生素包括:青霉素类(哌拉西林、哌拉西林/他唑巴坦、美洛西林、替卡西林、替卡西林/克拉维酸)、头孢菌素类(头孢他啶、头孢吡酮、头孢吡肟)、碳青霉烯类(亚胺培南/西司他丁;美罗培南)、单酰胺环类(氨曲南)、氨基糖苷类(妥布霉素、庆大霉素、阿米卡星)、喹诺酮类(环丙沙星、左氧氟沙星)和其他抗生素(多粘菌素B、粘菌素)。常见治疗方案包括:对于菌血症:青霉素加氨基糖苷;青霉素加环丙沙星;头孢菌素、氨曲南或碳青霉烯加氨基糖苷或环丙沙星;对于CNS感染:头孢他啶,任选地加氨基糖醇;头孢吡肟;环丙沙星;氨曲南;美罗培南;对于骨或关节感染:青霉素加氨基糖苷或环丙沙星;头孢菌素;氨曲南;氟喹诺酮;碳青霉烯;外耳炎:头孢菌素;碳青霉烯;环丙沙星;头孢菌素加氨基糖苷;角膜炎/角膜溃疡(眼):妥布霉素(局部),任选地使用哌拉西林或替卡西林(局部);环丙沙星或氧氟沙星(局部);以及泌尿道感染:环丙沙星;氨基糖苷;青霉素;头孢菌素;碳青霉烯。(参见例如,Kasper, D.L等人编:Harrison's Principles of Internal Medicine,第16版,McGraw-Hill,2005)。

[0254] 在一个实施方案中,所述一种或多种另外的治疗剂包含一种或多种抗PcrV抗体。在某些实施方案中,第二治疗剂是另一种不同的抗体,例如另一种铜绿假单胞菌抗体,其中所述不同的一种或多种抗体可以结合或可以不结合PcrV或者结合至PcrV上的相同的表位或重叠表位。在某些实施方案中,第二治疗剂是不同的铜绿假单胞菌抗原的抗体。在某些实施方案中,第二治疗剂是不同的感染性细菌(例如金黄色葡萄球菌)的抗体。在一些实施方案中,非竞争抗体可以组合和施用于对其有需要的受试者。包含组合的抗体可以阻断T3SS机制的活性和/或抑制细菌的一些其他活性。

[0255] 如本文所用,术语“与……组合”是指可以在本文提供的至少一种抗PcrV抗体的施用之前、同时或之后施用一种或多种另外的治疗活性组分。术语“与……组合”还包括连续或同时施用抗PcrV抗体和第二治疗剂。

[0256] 在施用抗PcrV抗体之前,可以向受试者施用一种或多种另外的治疗活性组分。举例来说,如果第一组分是在施用第二组分之前1周、之前72小时、之前60小时、之前48小时、之前36小时、之前24小时、之前12小时、之前6小时、之前5小时、之前4小时、之前3小时、之前2小时、之前1小时、之前30分钟、之前15分钟、之前10分钟、之前5分钟或之前不到1分钟施用,则可以认为第一组分是在第二组分“之前”施用。在其他实施方案中,在施用抗PcrV抗体

之后,可以向受试者施用一种或多种另外的治疗活性组分。举例来说,如果第一组分是在施用第二组分之后1分钟、之后5分钟、之后10分钟、之后15分钟、之后30分钟、之后1小时、之后2小时、之后3小时、之后4小时、之后5小时、之后6小时、之后12小时、之后24小时、之后36小时、之后48小时、之后60小时、之后72小时施用,则可以认为第一组分是在第二组分“之后”施用。在另外其他实施方案中,在施用抗PcrV抗体同时,可以向受试者施用一种或多种另外的治疗活性组分。出于本公开的目的,“同时”施用包括例如以单一剂型向受试者施用或以单独的剂型在彼此约30分钟或更短时间内向受试者施用抗PcrV抗体和另外的治疗活性组分。如果以单独的剂型施用,则每个剂型可以通过相同的途径施用(例如,抗PcrV抗体和另外的治疗活性组分都可以静脉内施用等);或者,每个剂型可以通过不同的途径施用(例如,抗PcrV抗体可以静脉内施用,而另外的治疗活性组分可以口服施用)。在任何情况下,出于本公开的目的,以单一剂型、以相同途径的单独剂型或以不同途径的单独剂型施用所述组分都被认为是“同时施用”。出于本公开的目的,在施用另外的治疗活性组分“之前”、“同时”或“之后”(那些术语如上文所定义)施用抗PcrV抗体被视为与另外的治疗活性组分的“组合”施用抗PcrV抗体。

[0257] 本公开包括这样的药物组合物,其中本文所述的抗PcrV抗体与如本文别处所述的一种或多种另外的治疗活性组分共配制。

[0258] 施用方案

[0259] 根据某些实施方案,可以向有需要的受试者施用单剂量的本文公开的抗PcrV抗体(或包含抗PcrV抗体与本文提及的任何另外的治疗活性剂的组合的药物组合物)。根据某些实施方案,可以将多剂量的抗PcrV抗体(或者包含抗PcrV抗体和本文提及的另外的治疗活性剂中的任一者的组合的药物组合物)在限定的时间范围内施用于受试者。根据本公开的该方面的方法包括将多剂量的本文所述的抗PcrV抗体按顺序施用于受试者。如本文所用,“按顺序施用”意指每个剂量的抗PcrV抗体在不同的时间点,例如在以预定间隔(例如,小时、日、周或月)分开的不同日施用于受试者。本公开包括这样的方法:所述方法包括将单一初始剂量的抗PcrV抗体,然后是一个或多个第二剂量的抗PcrV抗体,以及任选地随后是一个或多个第三剂量的抗PcrV抗体按顺序施用于患者。

[0260] 术语“初始剂量”、“第二剂量”和“第三剂量”是指本文公开的抗PcrV抗体的施用的时间顺序。因此,“初始剂量”为在治疗方案的开始时施用的剂量(也称为“基础剂量”);“第二剂量”为在初始剂量之后施用的剂量;并且“第三剂量”为在第二剂量之后施用的剂量。初始、第二和第三剂量都可以含有相同量的抗PcrV抗体,但是通常在施用频率方面可以彼此不同。然而,在某些实施方案中,在初始、第二和/或第三剂量中含有的抗PcrV抗体的量在治疗过程中彼此不同(例如,适当上调或下调)。在某些实施方案中,在治疗方案开始时施用两个或更多个(例如,2、3、4或5个)剂量作为“负荷剂量”,接着以较低频率施用后续剂量(例如,“维持剂量”)。

[0261] 在某些示例性实施方案中,每个第二和/或第三剂量在紧接前一剂量之后1至48小时(例如,1、1^{1/2}、2、2^{1/2}、3、3^{1/2}、4、4^{1/2}、5、5^{1/2}、6、6^{1/2}、7、7^{1/2}、8、8^{1/2}、9、9^{1/2}、10、10^{1/2}、11、11^{1/2}、12、12^{1/2}、13、13^{1/2}、14、14^{1/2}、15、15^{1/2}、16、16^{1/2}、17、17^{1/2}、18、18^{1/2}、19、19^{1/2}、20、20^{1/2}、21、21^{1/2}、22、22^{1/2}、23、23^{1/2}、24、24^{1/2}、25、25^{1/2}、26、26^{1/2}小时或更长)施用。如本文所用,短语“紧接前一剂量”是指在多次施用的顺序中,抗PcrV抗体的剂量在顺序中紧接着

的下一剂量施用之前施用于患者,而没有中间剂量。

[0262] 所述方法可以包括向患者施用任何数量的第二和/或第三剂量的抗PcrV抗体。举例来说,在某些实施方案中,仅向患者施用单次第二剂量。在其他实施方案中,向患者施用两次或更多次(例如,2、3、4、5、6、7、8或更多次)第二剂量。同样,在某些实施方案中,仅向患者施用单次第三剂量。在其他实施方案中,向患者施用两次或更多次(例如,2、3、4、5、6、7、8或更多次)第三剂量。

[0263] 在某些实施方案中,在治疗方案的过程中,向患者施用的第二和/或第三剂量的频率可以变化。在治疗过程中,医生也可以根据临床检查后个别患者的需要来调整施用频率。

[0264] 药物组合物

[0265] 本文提供了这样的药物制剂,所述药物制剂包含根据表1的一种或多种抗PcrV抗体,并且包含例如与药学上可接受的载剂或赋形剂混合的一种或多种(例如,1、2或3种)它们的组分。参见例如《雷明顿氏药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)》和《美国药典:国家处方集(U.S.Pharmacopeia:National Formulary)》,宾夕法尼亚州伊斯顿的马克出版公司(Mack Publishing Company,Easton,Pa.) (1984年)。包含混合药学上可接受的载剂或赋形剂与一种或多种组分的制备此类药物制剂的方法形成本公开的一部分,通过此类方法产生的药物组合物也如此。

[0266] 本公开的范围包括干燥的例如冻干的本公开的抗PcrV抗体及其药物组合物,所述药物组合物包含药学上可接受的载剂,但基本上不含水。在一个实施方案中,药物制剂是水性的(包含水)。在本公开的一个实施方案中,药物制剂是无菌的。

[0267] 治疗剂的药物制剂可以通过与呈例如冻干粉末、浆液、水溶液或悬浮液形式的可接受的载剂、赋形剂或稳定剂混合来制备(参见例如Hardman等人(2001年)Goodman和Gilman的《治疗学的药理学基础(The Pharmacological Basis of Therapeutics)》,纽约的麦格劳希尔,纽约;Gennaro(2000年)《雷明顿:药学技术与实践(Remington:The Science and Practice of Pharmacy)》,纽约的利平科特·威廉斯·威尔金斯出版公司(Lippincott,Williams,and Wilkins),纽约;Avis,等人(编)(1993年)《药物剂型:胃肠外药疗法(Pharmaceutical Dosage Forms:Parenteral Medications)》,马塞尔德克(Marcel Dekker),纽约;Lieberman,等人(编)(1990年)《药物剂型:锭剂(Pharmaceutical Dosage Forms:Tablets)》,马塞尔德克,纽约;Lieberman,等人(编)(1990年)《药物剂型:分散系统(Pharmaceutical Dosage Forms:Disperse Systems)》,马塞尔德克,纽约;Weiner和Kotkoskie(2000年)《赋形剂毒性和安全性(Excipient Toxicity and Safety)》,纽约的马塞尔德克公司,纽约)。

[0268] 包含抗PcrV抗体的药物组合物的施用方式可以变化。施用途径包括经口、经直肠、经粘膜、经肠、胃肠外;肌肉内、皮下、皮内、髓内、鞘内、直接脑室内、静脉内、腹膜内、鼻内、眼内、吸入、吹入、局部、皮肤、经皮或动脉内。

[0269] 本公开提供了用于向受试者(例如,人类)施用包含抗PcrV抗体的药物制剂的方法,所述方法包括将配制物引入受试者的身体中,例如引入受试者的静脉、皮下组织或肌肉组织中。举例来说,所述方法包含用注射器的针穿刺个体的身体并且将配制物注入个体的身体中。

[0270] 本文提供了一种或多种容器(例如,如具有盖或色谱柱、中空孔针或注射器筒的塑

料或玻璃瓶),所述容器包含如本文公开的抗PcrV抗体或包含药学上可接受的载剂的它们的药物组合物。提供了用于制备一种或多种包含组合物的容器的方法,所述方法包括将组合的组分引入一种或多种容器,例如包含共配制的组分组合的单个容器中。在本公开的一个实施方案中,一种或多种容器随后被引入试剂盒中。

[0271] 还提供了一种这样的装置,例如注射装置,所述装置包含本文公开的抗PcrV抗体或它们的药物组合物以及它们的使用方法。注入装置为通过胃肠外途径,例如肌内、皮下或静脉内将物质引入患者的身体中的装置。举例来说,注入装置可以为例如包括用于保持流体被注入(例如包含抗体或片段或其药物组合物)的圆柱体或圆筒、用于穿刺皮肤和/或血管以注入流体的针和用于将流体从圆柱体中推出并且通过针孔的柱塞的注射器(例如预充有药物组合物,例如自动注入器,或在使用点填充,例如由使用者或临床医师进行)。

[0272] 本文所公开的药物组合物还可以用无针皮下注入装置,例如公开于美国专利第6620135号、第6096002号、第5399163号、第5383851号、第5312335号、第5064413号、第4941880号、第4790824号或第4596556号中的装置施用。包含药物组合物的此类无针装置以及它们的使用方法也是本公开的一部分。

[0273] 本文提供了用于制备包含抗PcrV抗体的一种或多种注射装置(例如,预填充注射器或自动注射器)的方法,所述方法包括将组合的组分引入此类装置中的一者或多者中,例如包含抗PcrV抗体的单个装置中。在一个实施方案中,一种或多种注入装置随后被引入试剂盒中。

[0274] 还提供了包含抗PcrV抗体的试剂盒。在一个实施方案中,试剂盒包含在容器或注射装置(例如,预填充注射器或自动注射器)中的抗体。试剂盒可以包括有包括关于试剂盒中的药物组合物和剂型的信息的药品说明书。一般来说,所述信息有助于患者和医生有效且安全地使用被封装的药物组合物。例如,以下关于本文提供的抗体的信息中的任一者可以提供于插页中:药代动力学、药效动力学、临床研究、功效参数、适应症和用途、禁忌症、警告、预防措施、不良反应、过量、适当剂量和施用、供应方式、适当的储存条件、参考物、制造商/经销商信息和专利信息。

[0275] 抗体的诊断用途

[0276] 本文提供的抗PcrV抗体可以用于检测和/或测量样品中的铜绿假单胞菌,例如用于诊断目的。一些实施方案考虑将本文提供的一种或多种抗体用于检测疾病或障碍诸如铜绿假单胞菌感染的测定法中。铜绿假单胞菌的示例性诊断测定法可以包括例如,使从患者获得的样品与本公开的抗PcrV抗体接触,其中所述抗PcrV抗体用可检测标记或报告分子标记或用作捕获配体,以从患者样品中选择性地分离铜绿假单胞菌。或者,未标记的抗PcrV抗体可以与本身被可检测标记的二抗组合用于诊断应用。可检测标记或报告分子可以是放射性同位素,如³H、¹⁴C、³²P、³⁵S或¹²⁵I;荧光或化学发光部分,如异硫氰酸荧光素或罗丹明(rhodamine);或酶,如碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、辣根过氧化酶或荧光素酶。可以用于检测或测量样品中的铜绿假单胞菌的具体示例性测定法包括酶联免疫吸附测定法(ELISA)、放射免疫测定法(RIA)和荧光活化细胞分选(FACS)。

[0277] 可以用于根据本公开的铜绿假单胞菌诊断测定法的样品包括在正常或病理条件下可从患者获得的任何组织或流体样品,所述样品含有可检测数量铜绿假单胞菌或其片段。一般来说,将测量从健康患者(例如,未患与铜绿假单胞菌相关的疾病的患者)获得的特

定样品中的铜绿假单胞菌的水平,以初步建立铜绿假单胞菌的基线或标准水平。铜绿假单胞菌的该基线水平随后可以与从怀疑患有铜绿假单胞菌相关病症或与此类病症相关的症状的个体获得的样品中所测量的铜绿假单胞菌的水平比较。

[0278] 对铜绿假单胞菌具有特异性的抗体可以不含另外的标记或部分,或者它们可以含有N-末端或C-末端标记或部分。在一个实施方案中,所述标记或部分为生物素。在结合分析中,标记(如果有的话)的位置可以确定肽相对于肽所结合的表面的取向。举例来说,如果表面涂覆有抗生物素蛋白,则含有N-末端生物素的肽将被定向,使得肽的C-末端部分将在表面远侧。

[0279] 实施例

[0280] 提出以下实施例以给本领域普通技术人员提供如何制备和使用本文提供的方法和组合物的完整公开和描述,且无意限制发明人视作其发明的内容的范围。已经做出努力来确保关于使用的数字(例如,量、温度等)的准确度,但是应当考虑一些实验误差和偏差。除非另外指出,否则份数是重量份,分子量是平均分子量,温度是以摄氏度为单位,且压强是在或接近大气压。

[0281] 实施例1.抗PcrV抗体的产生

[0282] 将编码全长PcrV或截短形PcrV(PcrV 136-257)的DNA克隆到靶载体中,以在大肠杆菌BL21(DE3)中表达。从来自转化的大肠杆菌细胞的裂解物的上清液纯化重组PcrV或截短形PcrV(PcrV 136-257)。使用全长PcrV.6xHis(还参见GenBank NP_250397.1;PA01菌株;GenScript;还参见SEQ ID NO:77)或截短形PcrV.6xHis蛋白(参见PcrV_136-257;GenScript,还参见SEQ ID NO:79)来产生PcrV的人抗体。将免疫原与刺激免疫应答的佐剂直接施用于VELOCIMMUNE®小鼠(即,包含编码人免疫球蛋白重链和κ轻链可变区的DNA的经工程化的小鼠),例如如美国专利No.8,502,018所述。通过PcrV特异性免疫测定法来监测抗体免疫应答。当实现所期望的免疫应答时,抗PcrV抗体从未融合至骨髓瘤细胞的抗原阳性B细胞直接分离,如美国专利No.7,582,298所述,该专利整体以引用的方式明确地并入本文。使用该方法,获得了多种全人抗PcrV抗体(即,具有人可变结构域和人恒定结构域的抗体)。

[0283] 根据前述方法产生的示例性抗体标示如下:H1H29329P、H1H29332P、H1H29336P和H1H29339P。

[0284] 根据本实施例的方法产生的示例性抗体的生物特性详细地描述于以下阐述的实施例中。

[0285] 实施例2.重链和轻链可变区氨基酸和核苷酸序列

[0286] 表1示出了本发明所选的示例性抗PcrV抗体的重链和轻链可变区和CDR的氨基酸序列标识符。相应的核酸序列标识符列于表2中。表3提供了全长重链和轻链氨基酸序列的序列标识符。

[0287] 表1:氨基酸序列标识符

抗体名称	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1H29329P	2	4	6	8	10	12	14	16
H1H29332P	18	20	22	24	26	28	30	32
H1H29336P	34	36	38	40	42	44	46	48
H1H29339P	50	52	54	56	58	60	62	64

[0289] 表2:核酸序列标识符

抗体名称	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1H29329P	1	3	5	7	9	11	13	15
H1H29332P	17	19	21	23	25	27	29	31
H1H29336P	33	35	37	39	41	43	45	47
H1H29339P	49	51	53	55	57	59	61	63

[0291] 表3:全长重链和轻链序列的序列标识符

抗体名称	SEQ ID NO:	
	全长重链 氨基酸	全长轻链 氨基酸
H1H29329P	65	66
H1H29332P	67	68
H1H29336P	69	70
H1H29339P	71	72

[0294] 抗体在本文中通常根据以下命名法提及:Fc前缀(例如“H4H”),后面是数字标识符(例如“13290”、“13291”、“13295”等),后面是“P”后缀,如表1、2和3中所示。因此,根据该命名法,抗体在本文中可以被称作,例如,“H1H29329P”、“H1H29332P”、“H1H29336P”等。本文使用的抗体名称的前缀指示抗体的特定Fc区同种型。具体地,“H1H”抗体具有人IgG1 Fc(所有可变区都是全人的,如抗体名称中的第一个‘H’所示)。如本领域的普通技术人员所理解,可以将具有特定Fc同种型的抗体转化为具有不同的Fc同种型的抗体(例如,可以将具有小鼠IgG1 Fc的抗体转化为具有人IgG4等的抗体),但无论如何,可变结构域(包括CDR)(以表1-3中示出的数字标识符表示)将保持相同,并且预期结合特性相同或基本上相似,无论Fc结构域的性质如何。

[0295] 抗体比较

[0296] 第一比较抗体REGN3514(对照I,HC/LC SEQ ID NO:73/74)是具有WO 2013/070615中报告的序列的抗PcrV抗体。第二比较抗体REGN3977(对照III,HC/LC SEQ ID NO:75/76)是具有首先在US 7,494,653中报告的序列的抗PcrV抗体。第三比较抗PcrV抗体是REGN7070(对照V,HC/LC SEQ ID NO:83/84)。同种型对照抗体REGN1932和REGN684(分别为对照II和IV)用于以下实验。

[0297] 实施例3.人单克隆抗PcrV抗体的Biacore结合亲和力和动力学常数

[0298] 使用基于实时表面等离子共振的Biacore T200生物传感器来确定与纯化的抗PcrV单克隆抗体结合的不同的PcrV试剂的平衡解离常数(K_D)。所有结合研究在10mM

HEPES、150mM NaCl、3.4mM EDTA和0.05%v/v Tween-20、pH7.4 (HBS-EP) 运行缓冲液中在25℃和37℃下进行。Biacore CM5传感器芯片表面首先通过胺与抗人Fc γ 特异性多克隆抗体 (Jackson ImmunoResearch目录号109-005-098) 偶合以捕获抗PcrV单克隆抗体来衍生化。对在HBS-EP运行缓冲液中制备的不同浓度的全长PcrV.6xhis (SEQ ID NO:78) 和PcrV (aa136-257).6xhis (SEQ ID NO:80) (90nM-3.33nM;3倍连续稀释) 进行结合研究。在50 μ L/min的流动速率下,在所捕获的抗PcrV单克隆抗体表面上注射蛋白质4分钟,同时在HBS-EP运行缓冲液中监测PcrV试剂与单克隆抗体结合的解离10分钟。

[0299] 通过使用Scrubber 2.0c曲线拟合软件将实时传感图拟合至1:1结合模型,确定动力学缔合(k_a)和解离(k_d) 速率常数。如下从动力学速率常数计算结合解离平衡常数(K_D)和解离半衰期($t_{1/2}$):

$$[0300] \quad K_D \text{ (M)} = \frac{k_d}{k_a}, \text{ 和 } t_{1/2} \text{ (min)} = \frac{\ln(2)}{60 \cdot k_d}$$

[0301] 表4至7中示出了在25℃和37℃下与抗PcrV单克隆抗体结合的全长PcrV.6xhis和PcrV (aa136-257).6xhis的结合动力学参数。

[0302] 表4:抗PcrV mAb在25℃下与全长PcrV.6xhis的结合动力学

捕获的mAb	mAb捕获水平 (RU)	结合的 90nM Ag (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
H1H29336P	283.9 \pm 2.2	102.1	4.90E+05	\leq 1.00E-05	2.04E-11	\geq 1155
H1H29339P	364.7 \pm 4.5	140.4	3.65E+05	\leq 1.00E-05	2.74E-11	\geq 1155
H1H29332P	504.4 \pm 2.8	151.9	2.37E+05	1.30E-05	5.48E-11	888.5
[0303] H1H29329P	438.4 \pm 2.3	81	1.84E+05	9.50E-04	5.16E-09	12.2
REGN3977 对照III	498.9 \pm 2.5	146.4	2.07E+05	4.95E-04	2.39E-09	23.4
REGN3514 对照I	618.6 \pm 4.9	169.4	2.67E+05	3.90E-05	1.46E-10	296.2
REGN1932 同种型对照II	-262.2 \pm 0.4	-5.9	NB	NB	NB	NB

[0304] 表5:抗PcrV mAb在37℃下与全长PcrV.6xhis的结合动力学

捕获的mAb	mAb捕获水平 (RU)	结合的 90nM Ag (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
H1H29336P	272.5 \pm 1.4	80.7	8.60E+05	\leq 1.00E-05	1.16E-11	\geq 1155
H1H29339P	370.8 \pm 4.4	129.6	5.08E+05	\leq 1.00E-05	1.97E-11	\geq 1155
H1H29332P	533.4 \pm 2.1	163.2	2.93E+05	2.68E-05	9.20E-11	431.5
[0305] H1H29329P	430.7 \pm 1.8	59.6	5.54E+05	5.05E-03	9.12E-09	2.3
REGN3977 对照III	452.5 \pm 3.0	135.7	2.63E+05	9.17E-04	3.48E-09	12.6
REGN3514 对照I	517.6 \pm 2.9	141.2	4.31E+05	1.96E-04	4.53E-10	59.1
REGN1932 同种型对照II	-230.4 \pm 0.5	-22.5	NB	NB	NB	NB

[0306] 表6:抗PcrV mAb在25℃下与PcrV (aa136-257).6xhis的结合动力学

[0307]	捕获的mAb	mAb捕获水平 (RU)	结合的 90 nM Ag (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
	H1H29336P	287.6±1.5	48.2	3.67E+05	1.48E-05	4.08E-11	783.1
	H1H29339P	370.9±3.3	62.9	2.93E+05	2.76E-05	9.55E-11	418
	H1H29332P	505.4±1.2	68.5	1.33E+05	3.83E-05	2.85E-10	302
	H1H29329P	431.6±1.1	27.5	1.53E+05	2.30E-03	1.50E-08	5
[0308]	REGN3977 对照III	497.7±2.6	66.6	2.23E+05	9.56E-04	4.28E-09	12.1
	REGN3514 对照I	614.9±3.9	75.2	1.47E+05	1.22E-04	8.30E-10	94.7
	REGN1932 同种型对照II	262.4±0.3	0.4	NB	NB	NB	NB

[0309] 表7: 抗PcrV mAb在37°C下与PcrV(aa136-257).6xhis的结合动力学

[0310]	捕获的mAb	mAb捕获水平 (RU)	结合的 90 nM Ag (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
	H1H29336P	270.2±0.7	40.1	5.44E+05	4.36E-05	8.09E-11	264.7
	H1H29339P	364.9±4.7	55.3	4.35E+05	8.15E-05	1.86E-10	141.8
	H1H29332P	530.4±1.9	69.4	1.78E+05	1.06E-04	5.95E-10	109.2
	H1H29329P	421.7±3.6	16.4	1.03E+05	1.10E-02	1.07E-07	1
	REGN3977 对照III	445.8±2.6	54.7	2.16E+05	2.45E-03	1.14E-08	4.7
	REGN3514 - 对照I	517.3±1.7	60.7	2.46E+05	5.96E-04	2.42E-09	19.4
	REGN1932 - 同种型对照II	229.0±1.5	-3	NB	NB	NB	NB

[0311] 在25°C下, 抗PcrV单克隆抗体与全长PcrV.6xhis (SEQ ID NO:78) 结合, K_D 值范围为20.4pM至5.16nM, 如表4所示。在37°C下, 抗PcrV单克隆抗体与全长PcrV.6xhis (SEQ ID NO:78) 结合, K_D 值范围为11.6pM至9.12nM, 如表5所示。同种型对照抗体REGN1932 (对照II) 未显示出结合。

[0312] 在25°C下, 抗PcrV单克隆抗体与PcrV(aa136-257).6xhis (SEQ ID NO:80) 结合, K_D 值范围为40.8pM至15.0nM, 如表6所示。在37°C下, 抗PcrV单克隆抗体与PcrV(aa136-257).6xhis (SEQ ID NO:80) 结合, K_D 值范围为80.9pM至107nM, 如表7所示。同种型对照抗体REGN1932 (对照II) 未显示出结合。

[0313] 实施例4: 抗PcrV单克隆抗体之间的Octet交叉竞争

[0314] 在Octet® HTX生物传感器 (ForteBio, Pall生命科学部门) 上使用实时无标记生物层干涉测量测定法来测定一组抗PcrV单克隆抗体之间的结合竞争。整个实验在25°C下在10mM HEPES、150mM NaCl、3mM EDTA、0.05% v/v表面活性剂Tween-20和1mg/mL BSA pH7.4 (HBS-EBT) 的缓冲液中进行, 平板以1000rpm振荡。用抗五his抗体包被的Octet生物传感器尖端 (ForteBio Inc, #18-5122) 在含有20µg/mL的全长PcrV溶液的孔中浸没90秒, 所述全长PcrV具有C-末端六组氨酸标签 (PcrV.6xhis; SEQ ID NO:78), 以捕获~0.62-0.74nM PcrV.6xhis。然后, 通过浸入含有50µg/mL mAb-1溶液的孔中5分钟, 从而用抗PcrV单克隆抗

体(下文称为mAb-1)来饱和抗原捕获的生物传感器尖端。为了评估2种抗体是否竞争与其各自的表位的结合,随后将生物传感器尖端浸入含有50μg/mL第二抗PcrV单克隆抗体(下文称为mAb-2)溶液的孔中3分钟。在实验的每个步骤之间,在HBS-EBT缓冲液中洗涤生物传感器尖端。在整个实验过程中监测实时结合反应,并记录每个步骤结束时的结合反应。比较mAb-2与预先复合有mAb-1的全长PcrV.6xhis的结合反应,并且确定不同的抗PcrV单克隆抗体的竞争/非竞争行为,如表8所示。

[0315] 表8:用于与全长PcrV.6xhis结合的抗PcrV抗体的交叉竞争。

使用AHC Octet生物传感器捕获的第一mAb-1	展示出与mAb-1竞争的mAb-2抗体
H1H29339P	H1H29329P
	H1H29332P
	H1H29336P
	REGN3514
H1H29329P	H1H29339P
	H1H29332P
	H1H29336P
	REGN3514
H1H29332P	H1H29339P
	H1H29329P
	H1H29336P
	REGN3514
H1H29336P	H1H29339P
	H1H29329P
	H1H29332P
	REGN3514
REGN3514 -	H1H29339P
	H1H29329P

[0316]

使用AHC Octet生物传感器捕获的第一mAb-1	展示出与mAb-1竞争的mAb-2抗体
对照I	H1H29332P
	H1H29336P

[0317]

[0318] 实施例5:通过ELISA评估人单克隆抗体与铜绿假单胞菌PcrV重组蛋白的结合

[0319] 通过ELISA评估抗PcrV单克隆抗体(mAb)结合至重组PcrV蛋白的能力。将Nunc MicroSorp™96孔板用0.2微克/孔的重组全长铜绿假单胞菌PcrV(GenScript)(SEQ ID N0:77)或截短形的蛋白质(包括成熟蛋白质的氨基酸136至233;GenScript)(SEQ ID N0:81)包被,并在4℃下温育过夜。第二天早上,将板用洗涤缓冲液(含Tween-20的咪唑缓冲盐水)洗

涤三次,并且在25℃下用200 μ l封闭缓冲液(含3%BSA的PBS)封闭1.5小时。将板洗涤一次,并且将抗体和同种型匹配的对照抗体的滴定液(范围为33nM-0.1pM,在0.5%BSA/0.05% Tween-20/PBS中1:3连续稀释)添加到含蛋白质的孔中,并在25℃下温育一小时。将孔洗涤三次,然后在25℃下与每孔100ng/ml抗人HRP二抗一起温育一小时。向每个孔中添加100 μ l SuperSignal™ ELISA Pico化学发光底物,并检测信号(Victor X3读板器,Perkin Elmer)。在10点响应曲线(GraphPad Prism)上通过四参数逻辑方程分析发光值。

[0320] 如表9中所示,所有抗PcrV抗体均显示出与铜绿假单胞菌全长PcrV的亚纳摩尔EC₅₀结合和与截短形PcrV蛋白的亚纳摩尔EC₅₀结合。观察到抗PcrV比较抗体(对照I-REGN3514)与全长PcrV蛋白和截短形PcrV蛋白二者的亚纳摩尔EC₅₀结合,而同种型对照mAb(对照IV-REGN684)则不与任一蛋白质结合。

[0321] 表9:抗PcrV mAb与铜绿假单胞菌PcrV蛋白的结合

mAb	结合 (EC ₅₀) [M]	
	全长PcrV	PcrV 136-233
H1H29329P	5.969E-10	7.438E-09
H1H29332P	2.119E-09	8.139E-10
H1H29336P	2.276E-09	1.027E-09
H1H29339P	1.961E-09	8.562E-10
对照I – REGN3514	6.957E-10	7.587E-09
对照IV – 同种型对照	不结合	不结合

[0323] 实施例6. 铜绿假单胞菌抗PcrV单克隆抗体中和PcrV介导的细胞毒性的能力

[0324] 评估抗PcrV单克隆抗体预防人肺上皮细胞系A549细胞的PcrV介导的裂解的能力。A549细胞以大约 4.8×10^5 个细胞/ml的密度在Ham's F-12K(补充有10%热灭活FBS和L-谷氨酰胺)中接种到96孔透明底黑色组织培养处理板中,并在37℃下用5%CO₂培育过夜。第二天,从细胞中除去培养基,并更换为100 μ l测定培养基(不含酚红的DMEM,补充有10%热灭活FBS)。将纯化抗体或同种型匹配的对照(范围为33.3pM-1.33M)的滴定液加入50 μ l中,并且将细胞在37℃下与5%CO₂温育45分钟。

[0325] 同时,如下制备了铜绿假单胞菌菌株6077(Gerald Pier,Brigham and Women's Hospital,Harvard University)和ATCC 700888(ATCC)的对数期培养物:使铜绿假单胞菌培养物在LB中生长过夜,在新鲜LB中以1:50稀释,并且在37℃下振荡生长至OD₆₀₀ = ~1。对于两种铜绿假单胞菌菌株,将培养物用PBS洗涤一次,并且在PBS中稀释至OD₆₀₀ = 0.03。将50 μ l中的细菌添加到含有细胞和抗体的孔中,在37℃下用5%CO₂温育两小时。使用CytoTox-Glo™测定法试剂盒(Promega)确定细胞死亡。使用读板器(Victor,Perkin Elmer)检测发光,并且通过四参数逻辑方程(GraphPad Prism)分析发光值。

[0326] 如表10中所示,抗PcrV mAb(H1H29329P、H1H29332P、H1H29336P和H1H29339P)显示出预防A549细胞死亡的功效。所有四种单克隆抗体都受到针对两种铜绿假单胞菌菌株的保护。对照抗PcrV mAb(对照I-REGN3514)也展示出对两种细菌菌株的功效,并且同种型对照mAb(对照II)则无效果。

[0327] 表10:在A549细胞毒性测定法中铜绿假单胞菌PcrV介导的毒性中和

mAb	A549细胞毒性测定法 (IC50) [M]	
	铜绿假单胞菌菌株 6077	铜绿假单胞菌菌株 ATCC 700888
[0328] H1H29329P	1.079E-08	5.428E-08
H1H29332P	6.474E-09	3.288E-08
H1H29336P	8.400E-10	6.372E-09
H1H29339P	3.329E-11	7.818E-09
对照I - REGN3514	8.070E-10	1.784E-08
对照II - 同种型对照	无功效	无功效

[0329] 实施例7:铜绿假单胞菌抗PcrV单克隆抗体中和PcrV介导的细胞毒性的能力

[0330] 评估抗PcrV单克隆抗体预防兔红细胞 (rRBCs; Colorado Serum Co.) 的PcrV介导的裂解的能力。

[0331] 使铜绿假单胞菌菌株6077和菌株ATCC 700888的过夜培养物在LB中生长,在新鲜LB中以1:50稀释并且在37°C下振荡生长至 $OD_{600} \sim 1$ 。对于两种铜绿假单胞菌菌株,将培养物用PBS洗涤一次,并且在PBS中稀释至 $OD_{600} = 0.15$ 。通过在4°C下以 $2000 \times g$ 离心50% rRBC悬浮液10分钟,用PBS更换上清液,轻轻混合rRBC和PBS,并将rRBC稀释至5%来制备rRBC。在96孔圆底板中,将101的铜绿假单胞菌菌株6077或ATCC 700888与501中的纯化抗体或同种型匹配对照(范围为33.3pM-1.33M)或Triton X-100(裂解阳性对照)的滴定液混合,随后添加501 5% rRBC。将板在37°C下温育两小时,在550rpm下振荡。在温育期结束时,将板在25°C下以 $200 \times g$ 离心一分钟,将751上清液转移到平坦透明底板中,并使用读板器 (Victor X3, Perkin Elmer) 检测吸光度 (A_{405}),并且通过四参数逻辑方程 (GraphPad Prism) 分析吸光度值。

[0332] 如表11中所示,所有四种抗PcrV mAb都显示出预防rRBC溶血的功效,并且受到针对两种铜绿假单胞菌菌株的保护。对照抗PcrV mAb(对照I-REGN3514)也展示出对两种细菌菌株的功效,并且同种型对照mAb(对照IV-REGN684)则无效果。

[0333] 表11:在兔RBC溶血测定法中铜绿假单胞菌PcrV的中和

mAb	兔RBC溶血测定法 (IC50) [M]	
	铜绿假单胞菌菌株 6077	铜绿假单胞菌菌株 ATCC 700888
[0334] H1H29329P	5.640E-08	2.389E-09
H1H29332P	1.525E-08	4.062E-09
H1H29336P	2.051E-10	8.097E-10
H1H29339P	2.302E-09	5.586E-09
对照I - REGN3514	2.441E-09	1.011E-09
对照IV - 同种型对照	无功效	无功效

[0335] 实施例8:抗PcrV单克隆抗体在急性肺炎的体内模型中的功效

[0336] 在鼠急性肺炎模型中,在兔红细胞 (RBC) 溶血测定法(实施例7)或A549细胞毒性测定法(实施例6)中评估了预防PcrV介导的毒性的抗PcrV单克隆抗体 (mAb) 防止死亡的能力。给雌性BALB/c-ELITE小鼠 (Charles River; 7-8周龄; n=5只/组) 皮下注射单剂量5mg/kg的纯化抗体或同种型匹配对照。在注射mAb后两天,用在37°C下在TSB中生长至对数期 ($OD_{600} = 1$) 的 $20 \mu l$ 铜绿假单胞菌菌株6077 ($\sim 4.2 \times 10^5$ CFU/小鼠) 或菌株6206 ($\sim 1.2 \times 10^6$ CFU/小鼠) 对小鼠进行鼻内挑战,洗涤一次并重悬于PBS中。监测小鼠在感染后总共七天的存活率。

[0337] 如表12中所示,当以5mg/kg针对两种铜绿假单胞菌菌株预防性地施用,所有四个抗PcrV mAb,H1H29329P、H1H29332P、H1H29336P和H1H29339P,均防止了急性肺炎模型中的小鼠死亡。对照抗PcrV mAb(对照I-REGN3514)也展示出针对两种细菌菌株的功效。同种型对照mAb(对照IV-REGN684)不具有保护作用。

[0338] 表12:在急性肺炎模型中用抗PcrV mAb进行预防性治疗

mAb	%存活率(感染后第7天)	
	铜绿假单胞菌菌株6077	铜绿假单胞菌菌株6206
H1H29329P	100	100
H1H29332P	100	100
H1H29336P	100	100
H1H29339P	100	100
对照I-REGN3514	100	100
对照IV-REGN684	0	0

[0340] 实施例9.使用铜绿假单胞菌菌株6077和6206,抗PcrV单克隆抗体在急性肺炎模型中的体内功效

[0341] 当以5mg/kg(H1H29329P、H1H29332P、H1H29336P、H1H29339P)预防性地施用,以较低剂量测试在鼠急性肺炎模型中展示出功效的抗PcrV单克隆抗体(mAb),以评估其在鼠急性肺炎模型中防止死亡的能力。给雌性BALB/c-ELITE小鼠(Charles River;7-8周龄;n=5-10只/组)皮下注射单或剂量1.0、0.2或0.04mg/kg的纯化抗体或同种型匹配对照。在注射mAb后两天,用在37°C下在TSB中生长至对数期(OD600=1)的20 μ l^{铜绿假单胞菌}菌株6077($\sim 4.5 \times 10^5$ CFU/小鼠)或6206($\sim 9 \times 10_5$ CFU/小鼠)对小鼠进行鼻内挑战,洗涤一次并重悬于PBS中。监测小鼠在感染后总共七天的存活率。

[0342] 如表13所示,当以低至0.04mg/kg的剂量针对铜绿假单胞菌菌株6077和低至0.2mg/kg的剂量针对铜绿假单胞菌菌株6206预防性地施用,抗PcrV mAb H1H29336P和H1H29339P降低小鼠死亡率。相比之下,当使用更多细胞毒性菌株6206以小于1.0mg/kg的剂量测试时,抗PcrV mAb H1H29329P和H1H29332P无法防止死亡。对照抗PcrV mAb(对照I-RENG3514)分别在小于0.2mg/kg和1.0mg/kg的剂量下丧失针对铜绿假单胞菌菌株6077和菌株6206的功效。同种型对照mAb(对照IV-REGN684)不具有保护作用。

[0343] 表13:在急性肺炎小鼠模型中用抗PcrV mAb进行预防性治疗

mAb	mAb剂量(mg/kg)	%存活率(感染后第7天)	
		铜绿假单胞菌菌株6077	铜绿假单胞菌菌株6206
H1H29329P	1	100	80

[0345]	H1H29332P	0.2	n.d.	0
		0.04	n.d.	n.d.
	H1H29336P	1	100	80
		0.2	n.d.	0
	H1H29339P	0.04	n.d.	n.d.
		1	100	80
		0.2	100	80
	REGN3514 – 对照I	0.04	70	0
		1	100	80
		0.2	100	90
	对照IV – 同种型对照	0.04	60	0
		1	100	40
0.2		80	0	
对照IV – 同种型对照	0.04	0	0	
	1	20	0	
	0.2	0	0	
		0.04	n.d.	n.d.

[0346] n.d.:无数据(实验未进行)

[0347] 实施例10:使用铜绿假单胞菌菌株6206,抗PcrV单克隆抗体在急性肺炎模型中的预防性治疗的体内功效

[0348] 本实施例展示了使用铜绿假单胞菌菌株6206,预防性地施用的抗PcrV单克隆抗体在鼠急性肺炎模型中降低肺中细菌载量的能力。

[0349] 如实施例9中所示,当预防性地施用H1H29339P抗PcrV抗体在鼠急性肺炎模型中防止死亡。在该实验中,使用相同的急性肺炎模型以低剂量测试抗体减少小鼠肺中的细菌载量的能力。给雌性BALB/c-ELITE小鼠(Charles River;7-8周龄;n=5只/组)皮下注射单剂量0.1或0.2mg/kg纯化抗体或0.2mg/kg同种型匹配对照。在注射抗体后两天,用在37°C下在TSB中生长至对数期(OD600=1)的20 μ l^{铜绿假单胞菌}菌株6206($\sim 1.2 \times 10^6$ CFU/小鼠)对小鼠进行鼻内挑战,洗涤一次并重悬于PBS中。在感染后16-18小时处死小鼠,收获肺,并将肺匀浆铺板以在LB琼脂板上进行细菌计数。

[0350] 如表14中所示,当以0.1或0.2mg/kg施用时,抗PcrV mAb H1H29339P减少感染铜绿假单胞菌6206的小鼠的肺中的细菌载量,比对照抗PcrV mAb(对照V-REGN7070)大一个对数,并且比无抗体或同种型对照mAb(对照IV)组大3-4个对数。

[0351] 表14:使用铜绿假单胞菌菌株6206,在急性肺炎模型中预防性地施用0.1或0.2mg/kg抗PcrV mAb的小鼠肺中的细菌载量

[0352]	mAb	mAb剂量 (mg/kg)	肺中的铜绿假单胞菌6206 (CFU/g肺)
[0353]	H1H29339P	0.1	3.23e6
		0.2	1.10e5
	对照V – REGN7070	0.1	2.03e7
		0.2	2.22e6
	对照IV – 同种型对照	0.2	1.21e9
	无mAb	n.a.	1.33e9

[0354] n.a.,不适用

[0355] 实施例11:使用铜绿假单胞菌菌株PA01,抗PcrV单克隆抗体在急性肺炎模型中的预防性治疗的体内功效

[0356] 本实施例展示了使用最常用的研究菌株铜绿假单胞菌菌株PA01,在鼠急性肺炎模型中预防性地施用的抗PcrV单克隆抗体减少肺中的细菌载量的能力,以及相对于最近分离的铜绿假单胞菌菌株,具有较少的细胞毒性。

[0357] H1H29336P抗PcrV抗体在预防性地施用针对铜绿假单胞菌细胞毒性菌株6077和6206时在鼠急性肺炎模型中展示出功效,如实施例8至10中所示。在此处,测试针对无细胞毒性菌株PA01的抗体。给雌性BALB/c-ELITE小鼠(Charles River;7-8周龄;n=10只/组)皮下注射单剂量25mg/kg的纯化抗体或同种型匹配对照。在注射mAb后两天,用在37°C下在TSB中生长至对数期(OD600=1)的20 μ l^{铜绿假单胞菌}菌株PA01($\sim 1 \times 10^8$ CFU/小鼠)对小鼠进行鼻内挑战,洗涤一次并重悬于PBS中。在感染后16-18小时处死小鼠,收获肺,并将肺匀浆铺板以在LB琼脂板上进行细菌计数。

[0358] 如表15中所示,抗PcrV mAb H1H29336P减少感染无细胞毒性铜绿假单胞菌菌株PA01的小鼠的肺中的细菌载量,比对照抗PcrV mAb(对照V-REGN7070)大约2个对数,并且比无抗体或同种型对照mAb(对照IV)组大4个对数。

[0359] 表15:使用铜绿假单胞菌菌株PA01,在急性肺炎模型中预防性地施用25mg/kg抗PcrV mAb的小鼠肺中的细菌载量

	mAb	mAb剂量 (mg/kg)	肺中的铜绿假单胞菌PA01 (CFU/g肺)
[0360]	H1H29336P	25	5.11e7
	对照V - REGN7070	25	1.24e9
	对照IV - 同种型对照	25	9.34e11
	无mAb	n.a.	2.34e11

[0361] n.a.,不适用

[0362] 实施例12:通过HDX-MS评估的抗PcrV抗体表位结合

[0363] 进行氢-氘交换质谱法(HDX-MS)以确定与H1H29336P和H1H29339P抗体相互作用的铜绿假单胞菌PcrV(SEQ ID NO:78)的氨基酸残基。HDX-MS方法的一般描述在例如Ehring(1999)Analytical Biochemistry 267(2):252-259;以及Engen和Smith(2001)Anal.Chem.73:256A-265A中提供。

[0364] HDX-MS实验在集成的HDX-MS平台上进行,该平台由用于氘标记和淬灭的Leaptec HDX PAL系统、用于样品消化和上样的Waters Acquity M-Class(辅助溶剂管理器)、用于分析梯度的Waters Acquity M-Class(μ Binary溶剂管理器)和用于肽质量测量的Thermo Q Exactive HF质谱仪组成。

[0365] 在pD7.0下,将标记溶液制备为D₂O中的PBS缓冲液(10mM磷酸盐缓冲液、140mM NaCl和3mM KCl,在25°C下相当于pH7.4)。对于氘标记,将10 μ l PcrV(来自GenScript,57.3 μ M)或以1:0.6摩尔比与H1H29336P预混合的PcrV(抗原与抗体的复合物)和10 μ l PcrV(来自GenScript,31.7 μ M)或以1:0.6摩尔比与H1H29339P预混合的PcrV(抗原与抗体的复合物)一式两份在20°C下与90 μ l D₂O标记的溶液一起温育各种时间点(例如,非氘代的对照=0秒;氘标记5分钟和10分钟)。通过向每份样品中添加100 μ l淬灭缓冲液(0.5M TCEP-HCl,8M尿素

和1%甲酸)并在20℃下温育5分钟来淬灭氘化反应。然后将淬灭的样品注射到Waters HDX Manager中,以进行联机胃蛋白酶/蛋白酶XIII消化。通过C8柱(1.0mm×50mm, NovaBioassays)在-9.5℃下以0%-90%B(移动相A:0.5%甲酸和4.5%乙腈,溶于水中,移动相B:0.5%甲酸,溶于乙腈中)的22分钟梯度分离消化的肽。通过Thermo Q Exactive HF 质谱法以LC-MS/MS或LC-MS模式分析洗脱的肽。

[0366] 使用Byonic搜索引擎(Protein Metrics)针对包含PcrV序列及其逆序列的数据库搜索未氘化的PcrV样品的LC-MS/MS数据。使用非特异性酶消化和人糖基化作为常见的变量修饰,将搜索参数设置为默认值。然后将鉴定出的肽列表导入HDX工作台软件(3.3版),以计算通过LC-MS从所有氘化样品中检测到的每种肽的氘吸收量。对于给定的肽,使用每个时间点的质心质量(强度加权平均质量)来计算氘吸收量(D)和氘吸收量百分比(%D)。

[0367] 氘吸收量(D-吸收量) = 平均质量(氘化) - 平均质量(未氘化)

[0368] 氘吸收量百分比(%D) =
$$\frac{\text{每个时间点的肽的D-吸收量} \times 100\%}{\text{肽的最大D-吸收量}}$$

[0369] 从单独的PcrV和与H1H29336P样品复合的PcrV中共鉴定出127个来自PcrV的肽,这代表PcrV的95%序列覆盖。展示出高于5%的D-吸收量值差异百分比的任何肽均被定义为受到显著保护。PcrV上对应于氨基酸155-170(ALSAKQGIRIDAGGID-SEQ ID NO:85)的肽显著地受到H1H29336P的保护(PcrV残基根据SEQ ID NO:78的PcrV氨基酸序列进行编号)。参见表16。

[0370] 从单独的PcrV和与H1H29339P样品复合的PcrV中共鉴定出133个来自PcrV的肽,这代表PcrV的98%序列覆盖。展示出高于5%的D-吸收量值差异百分比的任何肽均被定义为受到显著保护。PcrV上对应于氨基酸150-170(SQINAALSAKQGIRIDAGGID-SEQ ID NO:86)的肽显著地受到H1H29339P的保护(PcrV残基根据SEQ ID NO:78的PcrV氨基酸序列进行编号)。参见表17。

[0371] 表16:与单独的PcrV相比,在PcrV-H1H29336P复合物形成时具有显著保护的PcrV肽

PcrV 残基	电 荷 (+)	5 分钟			10 分钟			Δ%D
		PcrV- H1H29336P		PcrV	PcrV- H1H29336P		PcrV	
		质心 MH ⁺	质 心 MH ⁺	ΔD	质心 MH ⁺	质 心 MH ⁺	ΔD	
[0372] 155-165	2	1173.10	1173.74	-0.64	1172.99	1173.80	-0.81	-9.0
155-170	2	1587.45	1588.32	-0.87	1587.37	1588.34	-0.97	-7.3
155-170	3	1587.59	1588.30	-0.70	1587.50	1588.29	-0.79	-5.9
157-165	2	988.46	988.91	-0.45	988.35	988.91	-0.55	-8.0
157-170	3	1402.70	1403.25	-0.55	1402.61	1403.22	-0.61	-5.4
157-170	2	1402.78	1403.33	-0.55	1402.68	1403.25	-0.57	-5.2
161-165	1	573.12	573.29	-0.17	573.08	573.28	-0.20	-6.8
161-170	2	987.44	987.80	-0.36	987.38	987.75	-0.37	-5.1

[0373] 表17:与单独的PcrV相比,在PcrV-H1H29339P复合物形成时具有显著保护的PcrV肽

PcrV 残基	电 荷 (+)	5 分钟			10 分钟			$\Delta\%D$
		PcrV- H1H29339P	PcrV	ΔD	PcrV- H1H29339P	PcrV	ΔD	
		质心 MH^+	质 心 MH^+		质心 MH^+	质 心 MH^+		
[0374] 150-156	1	716.24	716.46	-0.22	716.23	716.63	-0.40	-6.8
155-165	2	1172.94	1173.78	-0.84	1172.84	1173.91	-1.07	-11.8
155-170	2	1587.22	1588.29	-1.07	1587.11	1588.49	-1.38	-9.7
157-165	2	988.35	988.85	-0.50	988.25	988.95	-0.70	-9.5
157-168	2	1173.96	1174.55	-0.59	1173.81	1174.68	-0.87	-8.1
[0375] 157-170	2	1402.67	1403.30	-0.63	1402.46	1403.43	-0.97	-7.4
161-165	1	573.07	573.28	-0.21	573.06	573.30	-0.24	-8.3
161-170	2	987.31	987.71	-0.40	987.17	987.79	-0.62	-7.1

[0376] 本发明在范围上不受本文所描述的具体实施例的限制。实际上,除了本文中所描述的那些内容之外,本领域的技术人员根据前述说明和附图将显而易见本发明的各种修改。这样的改变意图落入所附权利要求的范围内。

序列表

<110> 瑞泽恩制药公司

C·基拉索斯

A·科皮

<120> 结合PcrV的抗PcrV抗体、包含抗PcrV抗体的组合物及其使用方法

<130> 10494W001

<140> TBD

<141> 2020-06-10

<150> 62/860,146

<151> 2019-06-11

<160> 86

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 366

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 1

```
gaggtgcagc  tgggtggagtc  tgggggaggc  ttggtacagc  ctggagggtc  cctgagactc  60
tcctgcgcag  cctctggatt  caccttcagt  gatcatgaaa  tgaattgggt  ccgccaggct  120
ccaggggaagg  ggctggagtg  gatttcatac  attggtagtg  gtgttgttac  catgtactac  180
gcagactctg  tgaggggccg  attcaccatc  tccagagaca  acgccaagaa  aacactgtat  240
ttgcaaatga  acagcctgag  agccgaggac  acggctgttt  attactgtgc  gcgagatcga  300
gggtattact  ttggttcgga  ggcctttcac  tactggggcc  agggaaccct  ggtcaccgtc  360
tcctca  366
```

<210> 2

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 2

```
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 Asp His
           20           25           30
Glu Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
```

	35		40		45												
Ser	Tyr	Ile	Gly	Ser	Gly	Val	Val	Thr	Met	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val		
	50					55						60					
Arg	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Lys	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			
Ala	Arg	Asp	Arg	Gly	Tyr	Tyr	Phe	Gly	Ser	Glu	Ala	Phe	His	Tyr	Trp		
			100					105					110				
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
	115						120										

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 3

ggattcacct tcagtgatca tgaa 24

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 4

Gly Phe Thr Phe Ser Asp His Glu

1 5

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 5

attgtagtg gtgttggttac catg 24

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 10

```

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 Asn 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 Ser 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 Lys Ser Tyr Ser Leu
           85           90           95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
           100           105

```

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 11

cagagtatta gtaactgg 18

<210> 12

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 12

```

Gln Ser Ile Ser Asn Trp
1           5

```

<210> 13

<211> 9

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成
<400> 13
aagtcgtct 9
<210> 14
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 14
Lys Ser Ser
1
<210> 15
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 15
caacagtata agagttattc gctcact 27
<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 16
Gln Gln Tyr Lys Ser Tyr Ser Leu Thr
1 5
<210> 17
<211> 369
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 17
gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggagac ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
tcctgtaaag cctctggatt cacctttagc acctttgcca tgaactgggt ccgtcaggct 120

ccagggaggg gcctggagtg ggtctcagct attggtgcta gtggttatag tacatactac 180
 gtagactcca tgaagggccg cttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcagatga acagcctggg agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagaatat 300
 agtgtctcgt caaactacta ctacggtatg gacgtctggg gccaaggac cacggtcacc 360
 gtctcctca 369

<210> 18

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 18

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

<210> 19

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 19

ggattcacct ttagcacctt tgcc 24

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

<220>
<223> 合成
<400> 27
cagaccatta ggagatat 18
<210> 28
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 28
Gln Thr Ile Arg Arg Tyr
1 5
<210> 29
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 29
gctgcatcc 9
<210> 30
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 30
Ala Ala Ser
1
<210> 31
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 31
caacagactt acagtattcc gatcacc 27
<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 32

Gln Gln Thr Tyr Ser Ile Pro Ile Thr

1 5

<210> 33

<211> 369

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 33

gagggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctacgcca tgacctgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcaagt attagagta gtggttatag ttcagactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccgagaa cacggtttat 240
 ctgcaaatga acagactgag agccgaggac acggccgttt attactgtgc gaaagagagg 300
 tcagtgactg cctactacta ctacggtatg gacgtctggg gccaaggac cacggtcacc 360
 gtctcctca 369

<210> 34

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 34

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
 Ala Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Arg Gly Ser Gly Tyr Ser Ser Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Glu Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80

1 5

<210> 39

<211> 48

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 39

gcgaaagaga ggtcagtgac tgcctactac tactacggta tggacgtc 48

<210> 40

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 40

Ala Lys Glu Arg Ser Val Thr Ala Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val

1

5

10

15

<210> 41

<211> 324

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 41

gacatccagt tgaccagtc tccatccttc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60
 atcacttgct gggccagtca ggacattagc agttttttaa cctggtatca gcaaaagcca 120
 gggatagccc ctaagtcct gatctatact gcatccactt taaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactetca caatcagcag cctgcagcca 240
 gaagattttg caacttatta ctgtcaacaa cttaaagtt acccgctcac tttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa acga 324

<210> 42

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 42

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly

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

<210> 43

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 43

caggacatta gcagtttt 18

<210> 44

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 44

Gln Asp Ile Ser Ser Phe

1 5

<210> 45

<211> 9

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 45

actgcatcc 9

<210> 46

<210> 50
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 50
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
 20 25 30
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Gly Gly Ser Gly Tyr Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Glu Gly Asn Ile Val Ala Leu Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu Trp
 100 105 110
 Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 51
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成
 <400> 51
 ggattcacct ttaacaccta tgcc 24

<210> 52
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成
 <400> 52
 Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Ala

1 5

<210> 53

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 53

attggtggta gtggttacag caca 24

<210> 54

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 54

Ile Gly Gly Ser Gly Tyr Ser Thr

1 5

<210> 55

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 55

gcgaaagaag ggaatatcgt ggctctctac tggacttcg atctc 45

<210> 56

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 56

Ala Lys Glu Gly Asn Ile Val Ala Leu Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu

1 5 10 15

<210> 57

<211> 324

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 57

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agatatttaa attggtatca acagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaggtgg ggtcccatca 180
 aaattcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctacaacct 240
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttccacta ccccgctcac tttcgcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa acga 324

<210> 58

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 58

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Arg	Tyr
			20					25						30	
Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
			35					40						45	
Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Gly	Gly	Val	Pro	Ser	Lys	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	Gln	Gln	Ser	Ser	Thr	Thr	Pro	Leu
						85								90	95
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg				
						100								105	

<210> 59

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 59

cagagcatta gcagatat 18

<210> 60

<400> 64

Gln Gln Ser Ser Thr Thr Pro Leu Thr

1 5

<210> 65

<211> 452

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 65

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 Asp His

20 25 30

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

35 40 45

Ser Tyr Ile Gly Ser Gly Val Val Thr Met Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys 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

Ala Arg Asp Arg Gly Tyr Tyr Phe Gly Ser Glu Ala Phe His Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu 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 Lys 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
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu			
	245	250	255
Met Ile Ser Arg Thr 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 Asp Glu Leu 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			
<210> 66			
<211> 214			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成			
<400> 66			
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 Asn 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	Ser	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	Lys	Ser	Tyr	Ser	Leu				
				85					90					95					
Thr	Phe	Gly	Gly	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	Val	Thr	Lys	Ser				
				195					200					205					
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys														
	210																		
<210>	67																		
<211>	453																		
<212>	PRT																		
<213>	人工序列																		
<220>																			
<223>	合成																		
<400>	67																		
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Asp	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly				
1				5					10					15					
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Thr	Phe				
				20					25					30					
Ala	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Arg	Gly	Leu	Glu	Trp	Val				
				35					40					45					
Ser	Ala	Ile	Gly	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Val	Asp	Ser	Met				

50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Gly Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
	85	90
Ala Lys Glu Tyr Ser Val Ser Ser Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val		
	100	105
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly		
	115	120
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly		
130	135	140
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val		
145	150	155
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe		
	165	170
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val		
	180	185
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val		
195	200	205
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys		
210	215	220
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu		
225	230	235
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr		
	245	250
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val		
	260	265
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val		
275	280	285
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser		
290	295	300
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu		
305	310	315
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala		
	325	330
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro		
	340	345
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln		
355	360	365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445
 Leu Ser Pro Gly Lys
 450
 <210> 68
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 68
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Arg Arg Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ala
 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 Ser Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Tyr Ser Ile Pro Ile
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu 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 Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 69
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 69
 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
 Ala Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Arg Gly Ser Gly Tyr Ser Ser Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Glu Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Arg Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Glu Arg Ser Val Thr Ala Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445
 Leu Ser Pro Gly Lys
 450
 <210> 70
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>

<223> 合成

<400> 70

Asp	Ile	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Phe	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Trp	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Ser	Ser	Phe
			20					25						30	
Leu	Thr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Ile	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
			35				40						45		
Tyr	Thr	Ala	Ser	Thr	Leu	Gln	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
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Leu	Lys	Ser	Tyr	Pro	Leu
				85					90						95
Thr	Phe	Gly	Gly	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	Val	Thr	Lys	Ser
			195				200							205	
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys										
			210												

<210> 71

<211> 452

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 71

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
 20 25 30
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Gly Gly Ser Gly Tyr Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Glu Gly Asn Ile Val Ala Leu Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu Trp
 100 105 110
 Gly Arg Gly Thr Leu 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 Lys 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
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245 250 255
 Met Ile Ser Arg Thr 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	Asp	Glu	Leu	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														
<210>	72														
<211>	214														
<212>	PRT														
<213>	人工序列														
<220>															
<223>	合成														
<400>	72														
Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1			5					10					15		
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Arg	Tyr
	20							25				30			
Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
	35					40					45				
Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Gly	Gly	Val	Pro	Ser	Lys	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	Gln	Gln	Ser	Ser	Thr	Thr	Pro	Leu
	85							90					95		
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala
	100							105					110		
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly

115	120	125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala		
130	135	140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln		
145	150	155
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser		
165	170	175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr		
180	185	190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser		
195	200	205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
210		
<210> 73		
<211> 454		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成		
<400> 73		
Glu Met Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
1	5	10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr		
20	25	30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Val		
35	40	45
Ser Ala Ile Thr Ile Ser Gly Ile Thr Ala Tyr Tyr Thr Asp Ser Val		
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Lys Glu Glu Phe Leu Pro Gly Thr His Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp		
100	105	110
Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys		
115	120	125
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly		
130	135	140
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro		

145	150	155	160
Val Thr Val Ser Trp	Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr		
	165	170	175
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val			
	180	185	190
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn			
	195	200	205
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro			
	210	215	220
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu			
225	230	235	240
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp			
	245	250	255
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp			
	260	265	270
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly			
	275	280	285
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn			
	290	295	300
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp			
305	310	315	320
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro			
	325	330	335
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu			
	340	345	350
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn			
	355	360	365
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile			
	370	375	380
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr			
385	390	395	400
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys			
	405	410	415
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys			
	420	425	430
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu			
	435	440	445
Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
450			

<210> 74
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 74
 Ala Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 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 Val Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Asp 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 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 Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 75
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 75

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile
 50 55 60
 Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Leu Phe Phe
 65 70 75 80
 Lys Met Asn Ser Leu Arg Ala Thr Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asn Arg Gly Asp Ile Tyr Tyr Asp Phe Thr Tyr Ala Met Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445
 Leu Ser Pro Gly Lys
 450
 <210> 76
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 76
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile Gln Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Thr Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Val Ile Gly Val Tyr Lys Asp Val Leu Gln Thr Gln Asp Gly Lys Arg
 115 120 125
 Lys Ala Leu Leu Asp Glu Leu Lys Ala Leu Thr Ala Glu Leu Lys Val
 130 135 140
 Tyr Ser Val Ile Gln Ser Gln Ile Asn Ala Ala Leu Ser Ala Lys Gln
 145 150 155 160
 Gly Ile Arg Ile Asp Ala Gly Gly Ile Asp Leu Val Asp Pro Thr Leu
 165 170 175
 Tyr Gly Tyr Ala Val Gly Asp Pro Arg Trp Lys Asp Ser Pro Glu Tyr
 180 185 190
 Ala Leu Leu Ser Asn Leu Asp Thr Phe Ser Gly Lys Leu Ser Ile Lys
 195 200 205
 Asp Phe Leu Ser Gly Ser Pro Lys Gln Ser Gly Glu Leu Lys Gly Leu
 210 215 220
 Ser Asp Glu Tyr Pro Phe Glu Lys Asp Asn Asn Pro Val Gly Asn Phe
 225 230 235 240
 Ala Thr Thr Val Ser Asp Arg Ser Arg Pro Leu Asn Asp Lys Val Asn
 245 250 255
 Glu Lys Thr Thr Leu Leu Asn Asp Thr Ser Ser Arg Tyr Asn Ser Ala
 260 265 270
 Val Glu Ala Leu Asn Arg Phe Ile Gln Lys Tyr Asp Ser Val Leu Arg
 275 280 285
 Asp Ile Leu Ser Ala Ile
 290
 <210> 78
 <211> 300
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 78
 Met Glu Val Arg Asn Leu Asn Ala Ala Arg Glu Leu Phe Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Leu Leu Ala Ala Ser Ala Ala Pro Ala Ser Ala Glu Gln Glu Glu Leu
 20 25 30
 Leu Ala Leu Leu Arg Ser Glu Arg Ile Val Leu Ala His Ala Gly Gln
 35 40 45
 Pro Leu Ser Glu Ala Gln Val Leu Lys Ala Leu Ala Trp Leu Leu Ala
 50 55 60

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

<210> 80

<211> 128

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 80

Lys Ala Leu Thr Ala Glu Leu Lys Val Tyr Ser Val Ile Gln Ser Gln
 1 5 10 15
 Ile Asn Ala Ala Leu Ser Ala Lys Gln Gly Ile Arg Ile Asp Ala Gly
 20 25 30
 Gly Ile Asp Leu Val Asp Pro Thr Leu Tyr Gly Tyr Ala Val Gly Asp
 35 40 45
 Pro Arg Trp Lys Asp Ser Pro Glu Tyr Ala Leu Leu Ser Asn Leu Asp
 50 55 60
 Thr Phe Ser Gly Lys Leu Ser Ile Lys Asp Phe Leu Ser Gly Ser Pro
 65 70 75 80
 Lys Gln Ser Gly Glu Leu Lys Gly Leu Ser Asp Glu Tyr Pro Phe Glu
 85 90 95
 Lys Asp Asn Asn Pro Val Gly Asn Phe Ala Thr Thr Val Ser Asp Arg
 100 105 110
 Ser Arg Pro Leu Asn Asp Lys Val Asn Glu His His His His His His
 115 120 125

<210> 81

<211> 98

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 81

```

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

```

Lys Asp

<210> 82

<211> 104

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 82

```

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

```

Lys Asp His His His His His His

100

<210> 83
 <211> 454
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 83
 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 Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Thr Met Ser Gly Ile Thr Ala Tyr Tyr Thr Asp Asp Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile 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
 Ala Lys Glu Glu Phe Leu Pro Gly Thr His Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
 100 105 110
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 115 120 125
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 130 135 140
 Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 145 150 155 160
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 165 170 175
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 180 185 190
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 195 200 205
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 210 215 220
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 225 230 235 240
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 245 250 255

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 275 280 285
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 290 295 300
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 305 310 315 320
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 325 330 335
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 340 345 350
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 355 360 365
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 370 375 380
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 385 390 395 400
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 405 410 415
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 420 425 430
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 435 440 445
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450
 <210> 84
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 84
 Ala Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 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 Ser Ala Ser Thr 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 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 Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 85
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 85
 Ala Leu Ser Ala Lys Gln Gly Ile Arg Ile Asp Ala Gly Gly Ile Asp
 1 5 10 15
 <210> 86
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 86
 Ser Gln Ile Asn Ala Ala Leu Ser Ala Lys Gln Gly Ile Arg Ile Asp

1	5	10	15
Ala Gly Gly Ile Asp			
	20		