



(21) 申請案號：110110856

(22) 申請日：中華民國 110 (2021) 年 03 月 25 日

(51) Int. Cl. : C07K16/12 (2006.01)

A61K39/40 (2006.01)

A61P31/04 (2006.01)

(30) 優先權：2020/03/25 美國

62/994,744

(71) 申請人：大陸商興盟生物醫藥（蘇州）有限公司（中國大陸）SYNERMORE BIOLOGICS (SUZHOU) CO., LTD. (CN)

中國大陸

(72) 發明人：趙子淵 CHAO, TZU-YUAN (TW)；張瀨文 CHANG, CHING-WEN (TW)；曹一孚 TSAO, ERIC (US)

(74) 代理人：陳長文

(56) 參考文獻：

TW 201331224A

審查人員：王顥棣

申請專利範圍項數：15 項 圖式數：10 共 71 頁

(54) 名稱

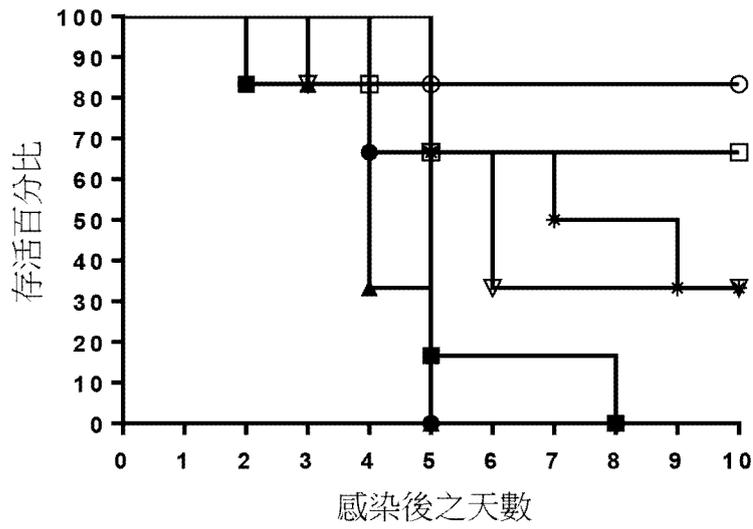
金黃色葡萄球菌 α -毒素特異性抗體及其應用

(57) 摘要

本發明係關於一種特異性結合至金黃色葡萄球菌 α -毒素之抗體或其抗原結合片段。本發明亦係關於一種醫藥組合物、一種用於治療及/或預防有需要個體之由金黃色葡萄球菌感染引起之疾病及/或病症的方法，及一種用於偵測樣品中之金黃色葡萄球菌 α -毒素的方法。

The present disclosure relates to an antibody or antigen-binding fragment thereof that specifically bind to α -toxin of *Staphylococcal aureus*. The present disclosure also relates to a pharmaceutical composition, a method for treating and/or preventing diseases and/or disorders caused by *Staphylococcal aureus* infection in a subject in need, and a method for detecting α -toxin of *Staphylococcal aureus* in a sample.

指定代表圖：



- 媒劑, 5 mL/kg, IP
- 對照抗體, 25 mg/kg, IP
- ▲ 對照抗體, 10 mg/kg, IP
- SYN100-25A1, 50 mg/kg, IP
- SYN100-25A1, 25 mg/kg, IP
- ▽ SYN100-25A1, 10 mg/kg, IP
- * SYN100-25A1, 5 mg/kg, IP

【圖5】



I877334

【發明摘要】

【中文發明名稱】

金黃色葡萄球菌 α -毒素特異性抗體及其應用

【英文發明名稱】

ANTIBODY SPECIFIC TO ALPHA-TOXIN OF *STAPHYLOCOCCAL AUREUS* AND USES THEREOF

【中文】

本發明係關於一種特異性結合至金黃色葡萄球菌 α -毒素之抗體或其抗原結合片段。本發明亦係關於一種醫藥組合物、一種用於治療及/或預防有需要個體之由金黃色葡萄球菌感染引起之疾病及/或病症的方法，及一種用於偵測樣品中之金黃色葡萄球菌 α -毒素的方法。

【英文】

The present disclosure relates to an antibody or antigen-binding fragment thereof that specifically bind to α -toxin of *Staphylococcal aureus*. The present disclosure also relates to a pharmaceutical composition, a method for treating and/or preventing diseases and/or disorders caused by *Staphylococcal aureus* infection in a subject in need, and a method for detecting α -toxin of *Staphylococcal aureus* in a sample.

【指定代表圖】

圖5

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

金黃色葡萄球菌 α -毒素特異性抗體及其應用

【英文發明名稱】

ANTIBODY SPECIFIC TO ALPHA-TOXIN OF *STAPHYLOCOCCAL AUREUS* AND USES THEREOF

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種對金黃色葡萄球菌 α -毒素具有特異性之抗體或其抗原結合片段，及其用途。

【先前技術】

【0002】 金黃色葡萄球菌為一種通常無症狀地攜載於人體內之機會性病原體。病原性菌株通常藉由產生強效蛋白質毒素及避開人類免疫系統之其他毒性因子來促進感染。金黃色葡萄球菌可引起一系列疾病，自輕微皮膚感染至危及生命之疾病，諸如肺炎、腦膜炎、骨髓炎、心內膜炎、毒性休克症候群、菌血症及敗血症。其仍為醫院內感染之五種最常見病因之一且通常為手術後傷口感染之病因。

【0003】 金黃色葡萄球菌之耐抗生素形式((諸如抗二甲苯青黴素金黃色葡萄球菌(MRSA))的出現為臨床醫學中之世界性問題。關於MRSA之毒力機制的當前概念包括一系列顯著的細胞表面及分泌之毒力因子。細胞表面毒力因子包括識別黏合基質分子之微生物表面組分(MSCRAMM)、鐵調節之蛋白質、多醣細胞間黏著性及莢膜多醣。分泌的毒力因子通常在指數後期及穩定期期間產生，且其包括外酶，外毒素 α 、 β 、 γ 及 δ 毒素，Panton-Valentine殺白血球素(PVL)、超抗原及毒性休克症候群毒素-1

(TSST-1)及剝脫性毒素A及B。US 20210079071提供用於治療金黃色葡萄球菌之葡萄球菌凝固酶及vWbp之單株抗體抑制劑。

【0004】 α -毒素(AT)係在金黃色葡萄球菌臨床分離株中具有保守性且已展示在肺炎、皮膚神經機能病、心內膜炎及敗血症中起作用的溶胞成孔毒素。AT係以33 kDa可溶性單體蛋白質形式分泌，其可組裝至真核細胞表面上之環結構中。組裝之毒素插入細胞膜中，形成藉由破壞膜之完整性而促成細胞損傷及死亡的孔。數十年來，作為免疫預防之目標的毒素已成功作為針對諸如白喉、破傷風及肉毒桿菌中毒之細菌性疾病的疫苗或被動性免疫療法之部分。不同於主動性免疫有時需要重複加強免疫及產生最大免疫反應之長時間段，被動性免疫將為未接種疫苗之患者提供即時治療一幫助減輕急性金黃色葡萄球菌疾病之嚴重程度。

【0005】 因此，需要開發一種治療或預防金黃色葡萄球菌感染之新途徑。

【發明內容】

【0006】 本發明提供一種抗體或其抗原結合片段，其特異性結合至金黃色葡萄球菌 α -毒素中之抗原決定基或其片段。本發明之抗體中和金黃色葡萄球菌 α -毒素，且因此適用於治療及/或預防由金黃色葡萄球菌感染引起之疾病及/或病症。本發明之抗體亦適用於偵測金黃色葡萄球菌 α -毒素。

【0007】 本發明提供一種醫藥組合物，其包含如上文所提及之抗體或其抗原結合片段及醫藥學上可接受之載劑或賦形劑。

【0008】 本發明提供一種用於治療及/或預防有需要個體之由金黃色葡萄球菌感染引起之疾病及/或病症的方法，其包含向該個體投與包含如

上文所提及之抗體或其抗原結合片段的醫藥組合物。

【0009】 本發明提供一種用於偵測樣品中之金黃色葡萄球菌 α -毒素的方法，其包含使該樣品與如上文所提及之抗體或其抗原結合片段接觸。

【0010】 本發明亦提供一種用於偵測樣品中之金黃色葡萄球菌 α -毒素之套組，其包含本文所描述之抗體或其抗原結合片段。

【0011】 在以下部分中詳細描述本發明。本發明之其他特徵、目的及優勢可見於實施方式及申請專利範圍中。

【圖式簡單說明】

【0012】 圖1：抗 α -毒素單株抗體增加A549細胞在存在 α -毒素之情況下的細胞生存力。在細胞溶解分析中，在存在8 $\mu\text{g/ml}$ 之 α -毒素的情況下添加濃度為4及40 $\mu\text{g/ml}$ 之純化抗體，以獲得 α -毒素與抗體之比率為1:0.1 (4 $\mu\text{g/ml}$)或1:1 (40 $\mu\text{g/ml}$)。使用比色MTT分析套組分析細胞生存力。「*」抗體展示防止 α -毒素誘導之細胞溶解的能力。

【0013】 圖2：小鼠25A1單株抗體結合至 α -毒素。在Biacore T100上之活性流動細胞上捕獲到25A1之抗原結合概況。不同線代表在1.56至50 nM之不同濃度下25A1針對 α -毒素之結合反應。

【0014】 圖3(A)各種抗 α -毒素 V_H 及 V_L 域之胺基酸序列。人類生殖系序列IGHV1-2及IGVK3-11用於移植。鼠類抗體與人類生殖系序列之間的胺基酸差異以粗體形式且加下劃線展示；CDR殘基以方框展示；回復突變以灰色標記展示。圖3(B)抗體結合至重組 α -毒素之結合動力學的SPR感測圖譜。藉由單循環動力學方法利用BIAcore T200量測結合動力學。圖3(C)25A1-B5B6AQT之胺基酸序列。信號肽之胺基酸序列以粗體形式且加下劃線表示；可變區以灰色標記。

【0015】 圖4：25A1、25A1-B2B4AQT及25A1-B5B6AQT抑制重組 α -毒素或天然 α -毒素誘導之兔RBC細胞溶解。將抗體(100、50、25、12.5、6.25、3.125、1.56及0.78 mg/mL)之連續稀釋液與重組 α -毒素(400 ng/ml)或粗製細菌上清液(1:8至1:16稀釋)以及兔RBC一起培育。藉由上清液中之血紅素釋放量來量測溶血作用。溶血抑制百分比經計算為 $((2\% \text{ TritonX-100之OD450} - \text{測試抗體之OD450})/2\% \text{ TritonX-100之OD450}) \times 100\%$ 。

【0016】 圖5：投與SYN100的感染金黃色葡萄球菌BAA-1717之小鼠的Kaplan-Meier存活率曲線。在第0天向小鼠靜脈內接種USA300 MRSA、BAA-1717，接種液大小為 8×10^7 CFU/小鼠。在感染之前二十四(24)小時腹膜內(IP)投與50、25、10及5 mg/kg之25A1。亦在感染之前24小時腹膜內投與25及10 mg/kg之對照抗體。監測動物死亡率，持續10天。相對於媒劑對照組，50%或更多(50%)的動物存活指示顯著的抗感染活性。

【0017】 圖6：投與SYN100的感染金黃色葡萄球菌ATCC29213之小鼠的Kaplan-Meier存活率曲線。在第0天，向CD-1小鼠腹膜內接種ATCC29213，接種液大小為 2.0×10^7 CFU/小鼠。在感染之前二十四(24)小時向三組小鼠腹膜內(IP)投與100、50及10 mg/kg之SYN100。監測感染動物之存活率，持續4天。

【0018】 圖7：投與SYN100的感染金黃色葡萄球菌BAA-1556、NRS261及SF8300之小鼠的Kaplan-Meier存活率曲線。SYN100防治增加鼠類肺炎模型中之存活率。在第0天，向C57BL/6J小鼠鼻內接種BAA-1556，接種液大小為 1.62×10^7 CFU/小鼠；NRS261，接種液大小為 $3.3 \times$

10^7 CFU/小鼠；或SF8300，接種液大小為 2.82×10^7 cfu。在感染之前二十四(24)小時向感染BAA-1556之小鼠腹膜內(IP)投與10、5及1 mg/kg或100、50及10 mg/kg之SYN100。監測感染動物之存活率，持續7天。

【0019】 圖8：投與SYN100及/或萬古黴素的感染金黃色葡萄球菌NRS261之小鼠的Kaplan-Meier存活率曲線。在第0天，向C57BL/6J小鼠鼻內接種NRS261，接種液大小為 5.0×10^7 CFU/小鼠。在感染之前二十四(24)小時向四組小鼠腹膜內(IP)投與10 mg/kg之SYN100。在感染後兩小時投與30、15及7.5 mg/kg之萬古黴素。三組小鼠均接受萬古黴素及SYN100兩者。監測感染動物之存活率，持續5天。

【0020】 圖9：投與SYN100的感染金黃色葡萄球菌ST20120426之兔子的Kaplan-Meier存活率曲線。在第0天，向新西蘭兔子鼻內接種ST20120426，接種液大小在 3.2 至 5.2×10^7 CFU/兔之間。在感染之前二十四(24)小時靜脈內投與125、100、75、50及25 mg/kg之SYN100。監測感染動物之存活率，持續7天。

【0021】 圖10 (A)投與SYN100及/或利奈唑胺(linezolid)的感染金黃色葡萄球菌ST20120426之兔子的Kaplan-Meier存活率曲線。在第0天，向新西蘭兔子鼻內接種ST20120426，接種液大小在 2.9 至 4.1×10^7 CFU/兔之間。在感染之前二十四(24)小時靜脈內投與30 mg/kg之SYN100。在感染後4小時以50 mg/kg/8h投與利奈唑胺。監測感染動物之存活率，持續48小時。圖10 (B)根據所有治療組之宏觀評分來評估肺部炎症，其中較高評分指示因細菌感染所致的更嚴重損傷。空心圓代表截至感染後30小時死亡的動物。實心圓代表截至感染後30小時存活的動物。圖10 (C)肺部重量(LW)相對於體重(BW)之比率。圖10 (D)肺部組織中之細菌計數。p值<

0.0083指示顯著性。

【實施方式】

【0022】 本發明提供一種抗體或其抗原結合片段，其特異性結合至金黃色葡萄球菌 α -毒素中之抗原決定基或其片段。

【0023】 在以下描述中，使用許多術語且提供以下定義以有助於理解所主張之主題。在本文中未明確定義之術語係根據其普通及一般含義使用。

【0024】 除非另外規定，否則一(a或an)意謂「一或多個」。

【0025】 如本文中所使用，術語「抗原決定基」係指抗體結合至抗原上之位點。

【0026】 如本文中所使用，術語「抗體」意指任何包含至少一個特異性結合至特定抗原(例如 α -毒素)或與其相互作用的互補決定區(CDR)的抗原結合分子或分子複合物。術語「抗體」包括免疫球蛋白分子及其多聚體(例如IgM)，所述免疫球蛋白分子包含四個多肽鏈，即藉由二硫鍵互連的兩個重(H)鏈及兩個輕(L)鏈。各重鏈包含重鏈可變區(本文中縮寫為HCVR或V_H)及重鏈恆定區。重鏈恆定區包含三個域，即C_{H1}、C_{H2}及C_{H3}。各輕鏈包含輕鏈可變區(本文中縮寫為LCVR或V_L)及輕鏈恆定區。輕鏈恆定區包含一個域(C_{L1})。V_H及V_L區可進一步細分成高變區，稱為互補決定區(CDR)，穿插有稱為構架區(FR)之更保守的區。各V_H及V_L由三個CDR及四個FR構成，自胺基端至羧基端按以下順序排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。在本發明之不同實施例中，抗 α -毒素抗體(或其抗原結合部分)之FR可與人類生殖系序列一致，或可經天然或人工修飾。胺基酸共同序列可基於兩個或更多個CDR之並列分析來

定義。

【0027】 如本文所用之術語「單株抗體」不限於經由融合瘤技術產生之抗體。單株抗體係藉由任何可用或此項技術中已知的手段衍生自單一純系，包括任何真核、原核或噬菌體純系。

【0028】 如本文所使用，術語「嵌合」抗體係指具有衍生自以下之可變序列的抗體：非人類免疫球蛋白及通常選自人類免疫球蛋白模板的人類免疫球蛋白恆定區。

【0029】 非人類抗體之「人類化」形式為含有衍生自非人類免疫球蛋白之最小序列的嵌合免疫球蛋白。一般而言，人類化抗體將包含實質上所有的至少一個且通常兩個可變域，其中所有或實質上所有的CDR區對應於非人類免疫球蛋白之CDR區且所有或實質上所有的FR區為人類免疫球蛋白序列之FR區。

【0030】 如本文中所使用，術語「互補決定區」(CDR)係指在重鏈與輕鏈多肽之可變區內發現之非連續抗原組合位點。Kabat等人，J.Biol.Chem.252:6609-6616(1977)；Kabat等人，美國衛生及人類服務部(U.S.Dept.of Health and Human Services)，「Sequences of proteins of immunological interest」(1991)；Chothia等人，J.Mol .Biol.196:901-917(1987)；及MacCallum等人，J.Mol.Biol.262:732-745(1996)已經描述CDR，其中定義包括彼此對照比較時胺基酸殘基的重疊或子集。

【0031】 如本文中所使用，術語抗體之「抗原結合部分」、抗體之「抗原結合片段」等包括特異性結合抗原以形成複合物的任何天然存在、可以酶方式獲得、合成或經遺傳工程改造之多肽或糖蛋白。

【0032】 如本文所使用，術語「治療(treatment/treating)」及類似

者涵蓋哺乳動物(尤其人類)之疾病的任何治療，且包括：(a)在可易患但尚未診斷為患有疾病之個體中預防該疾病產生；(b)抑制疾病，亦即，遏制其發展；及(c)緩解疾病，亦即，使疾病消退。

【0033】 如本文中可互換地使用，術語「個人」、「個體」、「主體」及「患者」係指哺乳動物，其包括(但不限於)鼠類(大鼠、小鼠)、非人類靈長類、人類、犬科動物、貓科動物、有蹄動物(例如，馬科動物、牛科動物、綿羊、豬科動物、山羊)等。

【0034】 如本文中所未使用，術語「治療有效量」或「靈驗量」係指當投與哺乳動物或其他個體用於治療疾病時，足以實現對該疾病之該治療的抗體之量。

【0035】 如本文中所未使用，術語「樣品」涵蓋獲自個人、個體或患者之多種樣品類型，且可用於診斷性或監測分析。該定義涵蓋血液及生物來源之其他液體樣品；固體組織樣品，諸如活組織檢查樣品或組織培養物或源自其之細胞，及其後代。

【0036】 本發明開發一種單株抗體，其特異性中和 α -毒素，由此提供在金黃色葡萄球菌感染之情況下的被動性免疫療法。被動性免疫將提供未接種疫苗之患者的即時治療以幫助減輕急性金黃色葡萄球菌疾病之嚴重程度。在功能上，本發明之抗體展現對AT誘導之細胞毒性的顯著抑制活性且在預防、防治性治療及/或治療金黃色葡萄球菌之感染及/或肺炎中展示較強的活體內功效。

【0037】 特定言之，該抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區之互補決定區(CDR)及輕鏈可變區之互補決定區，其中重鏈可變區之互補決定區包含CDRH1、CDRH2及CDRH3區，且輕鏈可變區之互補決定區包含

CDRL1、CDRL2及CDRL3區，且其中：

該CDRH1區包含選自由SEQ ID NO: 1至2或其實質上類似序列組成之群的胺基酸序列；該CDRH2區包含選自由SEQ ID NO: 3至6及31或其實質上類似序列組成之群的胺基酸序列；該CDRH3區包含選自由SEQ ID NO: 7至9或其實質上類似序列組成之群的胺基酸序列；且

該CDRL1區包含選自由SEQ ID NO: 10至13或其實質上類似序列組成之群的胺基酸序列；該CDRL2區包含選自由SEQ ID NO: 14至15或其實質上類似序列組成之群的胺基酸序列；該CDRL3區包含選自由SEQ ID NO: 16至18或其實質上類似序列組成之群的胺基酸序列。

【0038】 序列表展示於表1中。

表1：

SEQ ID No.	名稱	序列
1	25A1 CDRH1	GYSFTDYNMN
2	25G1 CDRH1	GYSFTGYFMN
3	25A1 CDRH2	SINPYYGITSYNQTFKG
4	25E12 CDRH2	SINPHYGITSYNQTFKG
5	25H3 CDRH2	SINPYYGITTYNQTFKG
6	25G1 CDRH2	RINPYNGDTLYKQNFKD
7	25A1 CDRH3	IYYGDSLGLDY
8	25G1 CDRH3	DGDGYYYAMDY
9	5H9 CDRH3	VYYGDSLGLDY
10	25A1 CDRL1	SASSSVSYM
11	25A10 CDRL1	SASSSISYM
12	25B7 CDRL1	SASSSKSYIH
13	5H9 CDRL1	SASSSVSYM
14	25A1 CDRL2	DTSKLAS
15	5H9 CDRL2	DTSNLAS
16	25A1 CDRL3	QQWSSNPLT
17	25A10 CDRL3	QQWSSNPPT
18	25G1 CDRL3	HQRSSYPWT
19	25A1重鏈可變區	QVKLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTDYNMN WVKQSHGKSLEWIGSINPYYGITSYNQTFKGKATLT VDKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCARIYYGDSLGL DYWGQGTTVTVSS
20	25A1輕鏈可變區	DIELTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQ QKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGLTSYSLT ISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLEIKR

21	HU25A1/VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYNM NWVRQAPGQGLEWMGSINPYYGITSYNQTFKGRVT MTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCARIYYGDSL GLDYWGQGTLVTVSS
22	HU25A1/VHB 2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYNM NWVRQAPGQGLEWMGSINPYYGITSYNQTFKGRVT LTVDKSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCARIYYGDSL GLDYWGQGTLVTVSS
23	HU25A1/VHB 5	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYNM NWVRQAPGQGLEWMGSINPYYGITSYNQTFKGRVT LTVDTISISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCARIYYGDSL LDYWGQGTLVTVSS
24	HU25A1/VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHYQQ KPGQAPRLLIYDTSKLASGIPARFSGSGGTDFTLTIS SLEPEDFAVYYCQQWSSNPLTFGQGTKVEIKR
25	HU25A1/VLB 4	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHYQQ KPGQAPRRWIYDTSKLASGIPARFSGSGGTDFTLTIS SLEPEDFAVYYCQQWSSNPLTFGQGTKVEIKR
26	HU25A1/VLB 6	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHYQQ KPGQAPRRLIYDTSKLASGIPARFSGSGGTDFTLTIS SLEPEDFAVYYCQQWSSNPLTFGQGTKVEIKR
27	25A1- B2B4AQT/VH (人類化抗體)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYNM NWVRQAPGQGLEWMGSINPYYGITSYAQTFKGRVT LTVDKSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCARIYYGDSL GLDYWGQGTLVTVSS
28	25A1- B2B4AQT/VL (人類化抗體)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHYQQ KPGQAPRRWIYDTSKLASGIPARFSGSGGTDFTLTIS SLEPEDFAVYYCQQWSSNPLTFGQGTKVEIK
29	25A1- B5B6AQT/VH (人類化抗體)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYNM NWVRQAPGQGLEWMGSINPYYGITSYAQTFKGRVT LTVDTISISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCARIYYGDSL LDYWGQGTLVTVSS
30	25A1- B5B6AQT/VL (人類化抗體)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHYQQ KPGQAPRRLIYDTSKLASGIPARFSGSGGTDFTLTIS SLEPEDFAVYYCQQWSSNPLTFGQGTKVEIK
31	25E4 CDRH2	SINPYYGITSYNQTFRG

【0039】 本發明之抗體可為全長(例如，IgG1或IgG4抗體)或可包含僅抗原結合部分(例如，Fab、F(ab')₂或scFv片段)，且可視需要經修飾以影響功能性。

【0040】 本發明之抗體或其抗原結合片段特異性結合至金黃色葡萄球菌 α -毒素。作為溶胞成孔毒素， α -毒素在金黃色葡萄球菌臨床分離株中為保守性的。 α -毒素為33 kDa可溶性單體蛋白質，其可組裝至真核細胞表

面上之環結構中，且接著組裝之毒素插入細胞膜中，形成藉由破壞膜之完整性來促成細胞損傷及死亡的孔。

【0041】 本發明包括以高親和力結合 α -毒素分子之單體或環結構的抗 α -毒素抗體及其抗原結合片段。

【0042】 可使用一般熟習此項技術者已知的各種技術以判定抗體是否「特異性結合至多肽或蛋白質內之一或多個胺基酸」。例示性技術包括例如常規交叉阻斷分析，諸如Antibodies, Harlow及Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY)所描述；丙胺酸掃描突變分析；肽墨點分析(Reineke, 2004, Methods Mol Biol 248:443-463)及肽裂解分析。另外，可採用諸如抗原決定基切除、抗原決定基提取及抗原化學修飾之方法(Tomer, 2000, Protein Science 9:487-496)。可用於鑑別與抗體特異性結合之多肽內之胺基酸的另一方法為藉由質譜偵測之氫/氬交換。一般而言，氫/氬交換方法涉及氬標記相關蛋白質，接著使抗體與氬標記之蛋白質結合。隨後，將蛋白質/抗體複合物轉移至水中以允許在除了經抗體保護之殘基(其保持經氬標記)以外的所有殘基處發生氫-氬交換。在抗體解離之後，對目標蛋白進行蛋白酶裂解及質譜分析，藉此展現對應於與抗體相互作用之特定胺基酸的氬標記殘基。參見例如Ehring (1999) Analytical Biochemistry 267(2):252-259；Engen及Smith (2001) Anal. Chem. 73:256A-265A。

【0043】 本發明進一步包括特異性結合至相同抗原決定基之抗 α -毒素抗體。

【0044】 藉由使用此項技術中已知之常規方法，吾人可容易地判定抗體是否特異性結合至與參考抗 α -毒素抗體相同之抗原決定基或與參考抗

α -毒素抗體競爭結合。舉例而言，為判定測試抗體是否結合至與本發明之參考抗 α -毒素抗體相同之抗原決定基，使參考抗體結合至 α -毒素蛋白質(例如， α -毒素之單體或環結構)。接著，評估測試抗體結合至 α -毒素分子之能力。若測試抗體在與參考抗 α -毒素抗體飽和結合之後能夠結合至 α -毒素，則可推斷測試抗體結合至與參考抗 α -毒素抗體不同的抗原決定基。另一方面，若測試抗體在與參考抗 α -毒素抗體飽和結合之後不能夠結合至 α -毒素分子，則測試抗體可結合至與本發明之參考抗 α -毒素抗體所結合之抗原決定基相同的抗原決定基。隨後可進行其他常規實驗(例如肽突變及結合分析)，以確認所觀測到之測試抗體之結合缺失實際上是否是由於結合至與參考抗體相同的抗原決定基，或是否是空間阻斷(或另一現象)負責所觀測到之結合缺乏。此類實驗可使用ELISA、RIA、Biacore、流式細胞測量術或此項技術中可用之任何其他定量或定性抗體結合分析來進行。根據本發明之某些實施例，如競爭性結合分析中所量測，若例如1倍、5倍、10倍、20倍或100倍過量之一種抗體抑制另一種抗體之結合至少50%但較佳地75%、90%或甚至99%，則兩種抗體結合至相同的(或重疊)抗原決定基。替代地，若降低或消除一種抗體之結合的抗原中之基本上所有胺基酸突變降低或消除另一種抗體之結合，則將兩種抗體視為結合至相同的抗原決定基。若僅一個子集的減少或消除一種抗體之結合的胺基酸突變減少或消除另一種抗體之結合，則認為兩種抗體具有「重疊的抗原決定基」。

【0045】 如本文中所使用，術語「抗體」亦包括完整抗體分子之抗原結合片段。抗體之抗原結合片段可使用任何適合之標準技術衍生自例如完整抗體分子，諸如涉及編碼抗體可變域及視情況存在之恆定域之DNA之操縱及表現的蛋白水解消化或重組基因工程改造技術。此類DNA為已

知的及/或可自例如商業來源、DNA庫(包括例如噬菌體-抗體庫)容易地獲得，或可以合成。DNA可以化學方式或藉由使用分子生物學技術定序及操縱，例如將一或多個可變域及/或恆定域配置成適合組態，或引入密碼子，產生半胱胺酸殘基，修飾、添加或缺失胺基酸等。

【0046】 抗原結合片段之非限制性實例包括：(i) Fab片段；(ii) F(ab')₂片段；(iii) Fd片段；(iv) Fv片段；(v)單鏈Fv (scFv)分子；(vi) dAb片段；及(vii)由胺基酸殘基組成的模擬抗體高變區之最小識別單元(例如，經分離之互補決定區(CDR)，諸如CDR3肽)，或受限之FR3-CDR3-FR4肽。其他經工程改造之分子，諸如域特異性抗體、單域抗體、域缺失抗體、嵌合抗體、CDR移植抗體、雙功能抗體、三功能抗體、四功能抗體、微型抗體、奈米抗體(例如單價奈米抗體、二價奈米抗體等)、小模塊免疫藥物(SMIP)及鯊魚可變IgNAR域亦涵蓋在如本文所使用之表述「抗原結合片段」內。

【0047】 抗體之抗原結合片段典型地包含至少一個可變域。可變域可為任何尺寸或胺基酸組成且一般將包含至少一個與一或多個構架序列相鄰或同框之CDR。在具有與V_L域相關聯之V_H域的抗原結合片段中，V_H及V_L域可以任何適合的配置相對於彼此定位。舉例而言，可變區可為二聚體且含有V_H-V_H、V_H-V_L或V_L-V_L二聚體。或者，抗體之抗原結合片段可含有單體V_H或V_L域。

【0048】 在某些實施例中，抗體之抗原結合片段可含有至少一個共價連接至至少一個恆定域之可變域。可發現於本發明抗體之抗原結合片段內之可變域及恆定域之非限制性例示性構型包括：(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) $V_L-C_{H2}-C_{H3}$; 及(xiv) V_L-C_L 。在可變域及恆定域之任何構型中，包括上文所列之任一例示性構型，可變域及恆定域可直接彼此連接或可藉由完全或部分鉸鏈區或連接區連接。鉸鏈區可由至少2個(例如5、10、15、20、40、60或更多個)胺基酸組成，所述胺基酸在單個多肽分子中之相鄰可變域及/或恆定域之間產生撓性或半撓性鍵。此外，本發明抗體之抗原結合片段可包含彼此及/或與一或多個單體 V_H 或 V_L 域非共價締合(例如藉由二硫鍵)的以上列出之可變域及恆定域構型中之任一者之均二聚體或雜二聚體(或其他多聚體)。

【0049】 與完整抗體分子相同，抗原結合片段可為單特異性或多特異性的(例如雙特異性的)。抗體之多特異性抗原結合片段將通常包含至少兩個不同的可變域，其中各可變域能夠特異性結合至獨立抗原或相同抗原上之不同抗原決定基。任何多特異性抗體型式，包括本文所揭示之例示性雙特異性抗體型式可使用此項技術中可用之常規技術而適用於本發明抗體之抗原結合片段的情況下。

【0050】 較佳地，本發明之抗體或其抗原結合片段為哺乳動物抗體。

【0051】 如本文所使用，術語「哺乳動物抗體」意欲包括具有來源於哺乳動物生殖系免疫球蛋白序列之可變區及恆定區的抗體。本發明之哺乳動物抗體可在例如CDR中，且尤其在CDR3中包括並非由哺乳動物生殖系免疫球蛋白序列編碼之胺基酸殘基(例如藉由活體外隨機或位點特異性突變誘發或藉由活體內體細胞突變引入之突變)。

【0052】 如本文所使用，術語「重組哺乳動物抗體」意欲包括藉由

重組方式製備、表現、產生或分離之所有哺乳動物抗體，諸如使用轉染至宿主細胞中之重組表現載體表現的抗體(於下文進一步描述)、自重組、組合哺乳動物抗體庫分離之抗體(於下文進一步描述)、自針對哺乳動物免疫球蛋白基因轉殖基因之動物(例如小鼠)分離的抗體、或藉由涉及將哺乳動物免疫球蛋白基因序列剪接至其他DNA序列之任何其他方式製備、表現、產生或分離的抗體。此類重組哺乳動物抗體具有來源於哺乳動物生殖系免疫球蛋白序列之可變區及恆定區。然而，在某些實施例中，此類重組哺乳動物抗體經歷活體外突變誘發(或當使用針對人類Ig序列轉殖基因之動物時為活體內體細胞突變誘發)且因此重組抗體之V_H及V_L區的胺基酸序列係來源於人類生殖系V_H及V_L序列且與人類生殖系V_H及V_L序列相關，但可能並非天然地存在於活體內哺乳動物抗體生殖系譜系內的序列。

【0053】 哺乳動物抗體，諸如人類抗體可以與較異質性相關之兩種形式存在。在一種形式中，免疫球蛋白分子包含約150至160 kDa之穩定四鏈構築體，其中二聚體藉由鏈間重鏈雙硫鍵固持在一起。在第二形式中，二聚體不經由鏈間雙硫鍵連接且形成由共價偶聯輕鏈及重鏈構成之約75至80 kDa之分子(半抗體)。此等形式極難分離，甚至在親和純化之後亦是如此。

【0054】 與衍生抗體之對應生殖系序列相比，本文所揭示之抗 α -毒素抗體在重鏈及輕鏈可變域之構架區及/或CDR區中可包含一或多個胺基酸取代、插入及/或缺失。此等突變可容易地藉由比較本文所揭示之胺基酸序列與購自例如公共抗體序列資料庫之生殖系序列來確定。本發明包括衍生自本文所揭示之任何胺基酸序列的抗體及其抗原結合片段，其中一或多個構架區及/或CDR區內之一或多個胺基酸突變成衍生抗體之生殖系序

列的相應殘基，或突變成另一哺乳動物生殖系序列之相應殘基，或突變成相應生殖系殘基之保守性胺基酸取代(此等序列變化在本文中統稱為「生殖系突變」)。以本文所揭示之重鏈及輕鏈可變區序列為起始物質，一般熟悉此項技術者可容易地產生許多包含一或多個個別生殖系突變或其組合之抗體及抗原結合片段。在某些實施例中， V_H 及/或 V_L 域內之所有構架及/或CDR殘基全部突變回於衍生抗體之初始生殖系序列中發現之殘基。在其他實施例中，僅某些殘基突變回原始生殖系序列，例如僅FR1之前8個胺基酸內或FR4之最後8個胺基酸內發現之突變殘基，或僅CDR1、CDR2或CDR3內發現之突變殘基。在其他實施例中，構架及/或CDR殘基中之一或多者突變成不同生殖系序列(亦即，不同於最初衍生出抗體之生殖系序列的生殖系序列)之對應殘基。此外，本發明抗體可在構架區及/或CDR區內含有兩個或更多個生殖系突變之任何組合，例如其中某些個別殘基突變為特定生殖系序列之對應殘基，而不同於原始生殖系序列之某些其他殘基得以維持或突變為不同生殖系序列之對應殘基。一旦獲得，即可針對一或多種所期望的特性容易地測試含有一或多個生殖系突變之抗體及抗原結合片段，所述特性諸如改良之結合特異性、增加的之結合親和力、改良或增強之拮抗或促效生物特性(視具體情況而定)、減小之免疫原性等。本發明內涵蓋以此一般方式獲得之抗體及抗原結合片段。

【0055】 本發明亦包括抗 α -毒素抗體，其包含具有一或多個保守性取代的本文所揭示之 V_H 、 V_L 及/或CDR胺基酸序列中之任一者之變異體。舉例而言，相對於本文所揭示之 V_H 、 V_L 及/或CDR胺基酸序列中之任一者，本發明包括具有含例如10個或更少個，8個或更少個，6個或更少個，4個或更少個等保守性胺基酸取代之 V_H 、 V_L 及/或CDR胺基酸序列的

抗 α -毒素抗體。

【0056】 當參考核酸或其片段時，術語「實質一致性」或「實質上一致」指示當與經另一核酸(或其互補鏈)之適當核苷酸插入或缺失最佳比對時，在至少約95%，且更佳至少約96%、97%、98%或99%之核苷酸鹼基中存在核苷酸序列一致性，如藉由序列一致性之任何熟知算法，諸如FASTA、BLAST或Gap所量測，如下文所論述。與參考核酸分子具有實質一致性的核酸分子在某些情況下可編碼具有與由參考核酸分子所編碼之多肽相同或實質上相似之胺基酸序列的多肽。

【0057】 當應用於多肽時，術語「實質類似性」或「實質上類似」意謂兩個肽序列在諸如藉由程式GAP或BESTFIT，使用預設空位權重最佳地比對時，共有至少95%序列一致性，甚至更佳地至少98%或99%序列一致性。較佳地，不一致的殘基位置之差異為保守性胺基酸取代。「保守性胺基酸取代」為一種胺基酸取代，其中胺基酸殘基經側鏈(R群組)具有類似化學特性(例如電荷或疏水性)之另一胺基酸殘基取代。一般而言，保守性胺基酸取代不實質上改變蛋白質之功能特性。在其中兩個或更多個胺基酸序列彼此間差異為保守性取代的情況下，可上調序列一致性或相似度百分比以根據保守取代性質加以校正。進行此調節之方式為熟習此項技術者所熟知的。具有化學特性類似之側鏈的胺基酸之群組之實例包括：(1)脂族側鏈：甘胺酸、丙胺酸、纈胺酸、白胺酸及異白胺酸；(2)脂族羥基側鏈：絲胺酸及蘇胺酸；(3)含醯胺側鏈：天冬醯胺及麩醯胺酸；(4)芳族側鏈：苯丙胺酸、酪胺酸及色胺酸；(5)鹼性側鏈：離胺酸、精胺酸及組胺酸；(6)酸性側鏈：天冬胺酸及麩胺酸；及(7)含硫側鏈：半胱胺酸及甲硫胺酸。較佳的保守性胺基酸取代群組為：纈胺酸-白胺酸-異白胺酸、苯

丙胺酸-酪胺酸、離胺酸-精胺酸、丙胺酸-纈胺酸、麩胺酸-天冬胺酸及天冬醯胺-麩醯胺酸。可替代地，保守性置換係在以引用之方式併入本文中之Gonnet等人 (1992) *Science* 256: 1443-1445中所揭示的PAM250對數似然性矩陣中具有正值之任何變化。「適度保守性」置換係在PAM250對數似然性矩陣中具有非負值的任何變化。

【0058】 典型地使用序列分析軟體來量測多肽之序列相似性，其亦稱為序列一致性。蛋白質分析軟體使用分配於各種取代、缺失及其他修飾，包括保守性胺基酸取代的相似性量度來匹配相似序列。舉例而言，GCG軟體含有諸如Gap及Bestfit之程式，其在預設參數下使用以測定緊密相關之多肽(諸如來自不同生物體物種之同源多肽)之間或野生型蛋白質與其突變體之間的序列同源性或序列一致性。亦可使用FASTA，使用預設或推薦參數，6.1版GCG中之程式，來比較多肽序列。FASTA (例如，FASTA2及FASTA3)提供查詢序列與檢索序列之間的最佳重疊區的比對及序列一致性百分比(前述Pearson (2000))。當比較本發明序列與含有來自不同生物體之大量序列之資料庫時，另一較佳算法為使用預設參數之電腦程式BLAST，尤其為BLASTP或TBLASTN。參見例如Altschul等人 (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410及Altschul等人 (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402，其各自以引用之方式併入本文中。

【0059】 在本發明之一個較佳實施例中，抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區之互補決定區及輕鏈可變區之互補決定區，其中重鏈可變區之互補決定區包含CDRH1、CDRH2及CDRH3區，且輕鏈可變區之互補決定區包含CDRL1、CDRL2及CDRL3區，

該CDRH1區包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO: 1

至2或其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列一致性之實質上類似序列；

該CDRH2區包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO: 3至6及31或其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列一致性之實質上類似序列；

該CDRH3區包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO: 7至9或其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列一致性之實質上類似序列；

該CDRL1區包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO: 10至13或其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列一致性之實質上類似序列；

該CDRL2區包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO: 14至15或其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列一致性之實質上類似序列；

且該CDRL3區包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO: 16至18或其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列一致性之實質上類似序列。

【0060】 在本發明之一個較佳實施例中，抗體或其抗原結合片段包含如表2中所示的重鏈可變區之互補決定區及輕鏈可變區之互補決定區。

表2：

純系	CDRH1 (SEQ ID NO.)	CDRH2 (SEQ ID NO.)	CDRH3 (SEQ ID NO.)
25A1	GYSFTDYNMN (1)	SINPYYGITSYNQTFKG (3)	IYYGDSLGLDY (7)
25A10	GYSFTDYNMN (1)	SINPYYGITSYNQTFKG (3)	IYYGDSLGLDY (7)
25E4	GYSFTDYNMN (1)	SINPYYGITSYNQTFRG (31)	IYYGDSLGLDY (7)
25E12	GYSFTDYNMN (1)	SINPHYGITSYNQTFKG (4)	IYYGDSLGLDY (7)
25H3	GYSFTDYNMN (1)	SINPYYGITTYNQTFKG (5)	IYYGDSLGLDY (7)
25B7	GYSFTDYNMN (1)	SINPYYGITSYNQTFKG (3)	IYYGDSLGLDY (7)

25G1	GYSFTGYFMN (2)	RINPYNGDTLYKQNFKD (6)	DGDGYYYAMDY (8)
25G4	GYSFTDYNMN (1)	SINPYYGITSYNQTFKG (3)	IYYGDSLGLDY (7)
5H9	GYSFTDYNMN (1)	SINPYYGITSYNQTFKG (3)	VYYGDSLGLDY (9)
N2F6	GYSFTDYNMN (1)	SINPYYGITSYNQTFKG (3)	IYYGDSLGLDY (7)

純系	CDRL1 (SEQ ID NO.)	CDRL2 (SEQ ID NO.)	CDRL3 (SEQ ID NO.)
25A1	SASSSVSYMH (10)	DTSKLAS (14)	QQWSSNPLT (16)
25A10	SASSSISYMH (11)	DTSKLAS (14)	QQWSSNPPT (17)
25E4	SASSSVSYMH (10)	DTSKLAS (14)	QQWSSNPPT (17)
25E12	SASSSVSYMH (10)	DTSKLAS (14)	QQWSSNPPT (17)
25H3	SASSSVSYMH (10)	DTSKLAS (14)	QQWSSNPLT (16)
25B7	SASSSKSYIH (12)	DTSKLAS (14)	QQWSSNPLT (16)
25G1	SASSSISYMH (11)	DTSKLAS (14)	HQRSSYPWT (18)
25G4	SASSSVSYMH (10)	DTSKLAS (14)	QQWSSNPPT (17)
5H9	SASSSVSYMY (13)	DTSNLAS (15)	QQWSSNPLT (16)
N2F6	SASSSVSYMY (13)	DTSNLAS (15)	QQWSSNPLT (16)

【0061】 在本發明之一個較佳實施例中，抗體25A1或其抗原結合片段包含：CDRH1區，其包含SEQ ID NO: 1或其實質上類似序列之胺基酸序列；CDRH2區，其包含SEQ ID NO: 3或其實質上類似序列之胺基酸序列；CDRH3區包含SEQ ID NO: 7或其實質上類似序列之胺基酸序列；CDRL1區，其包含SEQ ID NO: 10或其實質上類似序列之胺基酸序列；CDRL2區，其包含SEQ ID NO: 14或其實質上類似序列之胺基酸序列；及CDRL3區，其包含SEQ ID NO: 16或其實質上類似序列之胺基酸序列。較佳地，抗體25A1包含重鏈可變區，該重鏈可變區包含SEQ ID NO: 19或其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列一致性之實質上類似序列的胺基酸序列。較佳地，抗體25A1包含輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含SEQ ID NO: 20或其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列一致性之實質上類似序列的胺基酸序列。

【0062】 在另一態樣中，本發明之抗體較佳為人類化抗體。「人類化抗體」為其中來自一種物種之抗體，例如啮齒動物抗體的CDR自啮齒動

物抗體之可變重鏈及可變輕鏈轉移至人類重鏈及輕鏈可變域，包括人類構架區(FR)序列中的重組蛋白。抗體分子之恆定域源自人類抗體之彼等恆定域。

【0063】 為改良本發明之人類化抗體之結合親和力，人類構架區中之一些胺基酸殘基經CDR之物種(例如嚙齒動物)中的相應胺基酸殘基置換。

【0064】 較佳地，人類化抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區，該重鏈可變區包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO: 21至23或其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列一致性之實質上類似序列。人類化抗體或其抗原結合片段包含輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO: 24至26或其至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列一致性之實質上類似序列或其實質上類似序列。

【0065】 在本發明之一個較佳實施例中，人類化抗體25A1-B2B4AQT或其抗原結合片段包含：重鏈可變區，其包含SEQ ID NO: 27或其實質上類似序列之胺基酸序列；及輕鏈可變區，其包含SEQ ID NO: 28或其實質上類似序列之胺基酸序列。

【0066】 在本發明之一個較佳實施例中，人類化抗體25A1-B5B6AQT或其抗原結合片段包含：重鏈可變區，其包含SEQ ID NO: 29或其實質上類似序列之胺基酸序列；及輕鏈可變區，其包含SEQ ID NO: 30或其實質上類似序列之胺基酸序列。

【0067】 較佳地，本發明之抗體為單株抗體。

【0068】 本發明之抗體可為單特異性、雙特異性或多特異性的。多

特異性抗體可對一種目標多肽之不同抗原決定基具有特異性或可含有對多於一種目標多肽具有特異性之抗原結合域。本發明之抗 α -毒素抗體可連接至其他功能性分子(例如另一肽或蛋白質)或與其他功能性分子共表現。舉例而言，抗體或其片段可功能上連接(例如藉由化學偶合、基因融合、非共價締合或以其他方式)至一或多個其他分子實體，諸如另一抗體或抗體片段以產生具有第二結合特異性之雙特異性或多特異性抗體。舉例而言，本發明包括雙特異性抗體，其中免疫球蛋白之一個臂對 α -毒素或其片段具有特異性，且免疫球蛋白之另一個臂對第二治療目標具有特異性或結合至治療部分。

【0069】 在本發明之一個較佳實施例中，抗體或其抗原結合片段與治療劑結合。

【0070】 治療劑之實例為抗生素。抗生素之實例包括(但不限於)放線菌素、博萊黴素、光神黴素(mithramycin)、安麴黴素、鏈佐黴素、短桿菌素D或絲裂黴素。

【0071】 在本發明之一個較佳實施例中，抗體或其抗原結合片段可使用任何數目之表現系統，包括原核及真核表現系統來產生。在一些實施例中，表現系統為哺乳動物細胞表現(諸如融合瘤)或CHO細胞表現系統。諸多此類系統係廣泛購自商業供應商。在抗體包含 V_H 及 V_L 區的實施例中， V_H 及 V_L 區可使用單一載體表現，例如以雙順反子表現單位表現；或在不同啟動子的控制下表現。在其他實施例中， V_H 及 V_L 區可使用單獨載體表現。如本文所述之 V_H 及 V_L 區可視情況包含N端處之甲硫胺酸。

【0072】 編碼相關抗體之重鏈及輕鏈的基因可選殖於細胞，例如，編碼單株抗體之基因可選殖於融合瘤且用於產生重組單株抗體。編碼單株

抗體之重鏈及輕鏈的基因庫亦可由融合瘤或漿細胞製得。重鏈及輕鏈基因產物之隨機組合生成具有不同抗原特異性之大抗體池(參見例如，Kuby, Immunology (第3版，1997))。

【0073】用於產生單鏈抗體或重組抗體之技術(美國專利第4,946,778號、美國專利第4,816,567號)可適用於產生本發明之多肽的抗體。另外，可使用轉殖基因小鼠或諸如其他哺乳動物之其他生物體來表現人類化抗體或人類抗體(參見例如美國專利第5,545,807號；第5,545,806號；第5,569,825號；第5,625,126號；第5,633,425號；第5,661,016號；Marks等人, Bio/Technology 10：779-783 (1992)；Lonberg等人, Nature 368：856-859 (1994)；Morrison, Nature 368：812-13 (1994)；Fishwild等人, Nature Biotechnology 14：845-51 (1996)；Neuberger, Nature Biotechnology 14:826(1996)；及Lonberg&Huszar, Intern.Rev.Immunol.13：65-93 (1995))。

【0074】在本發明之一個較佳實施例中，抗體或其抗原結合片段表現於細胞之表面上。更佳地，細胞為T細胞。

【0075】本發明提供包含本發明之抗體或其抗原結合片段之醫藥組合物。本發明之醫藥組合物係藉由適合之稀釋劑、載劑、賦形劑及提供改良之轉移、遞送、耐受性及類似性質之其他藥劑調配。該等組合物可調配用於特定用途，諸如用於獸醫學用途或人類醫藥用途。所用組合物及賦形劑、稀釋劑及/或載劑之形式將視抗體之預期用途及用於治療性用途之投藥模式而定。多種適當的調配物可見於所有醫藥化學家已知之處方集中：Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa。此等調配物包括例如粉末，糊劑，軟膏，凍膠，蠟，油，脂質，含有

囊泡之脂質(陽離子或陰離子) (諸如LIPOFECTIN. TM., Life Technologies, Carlsbad, Calif.)，DNA結合物，無水吸收膏，水包油及油包水乳液，乳液卡波蠟(各種分子量之聚乙二醇)，半固體凝膠及含有聚乙二醇之半固體混合物。亦參見Powell等人「Compendium of excipients for parenteral formulations」 PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311。

【0076】 向患者投與之抗體的劑量可視患者之年齡及身材、目標疾病、病狀、投藥途徑及其類似者而變化。較佳劑量典型地根據體重或體表面積計算。當本發明之抗體用於治療成人患者之與金黃色葡萄球菌感染相關之病狀或疾病時，可能有利的係靜脈內投與本發明之抗體。視病狀之嚴重程度而定，可調整治療之頻率及持續時間。投與抗體之有效劑量及時程可憑經驗確定；舉例而言，可藉由週期性評定監測患者進展，且相應地調節劑量。此外，可使用本領域中熟知之方法(例如Mordenti等人, 1991, Pharmaceut. Res. 8:1351)來進行劑量之種間比例調節。

【0077】 各種遞送系統為吾人所知且可用於投與本發明之醫藥組合物，例如囊封於脂質體中、微粒、微膠囊、能夠表現突變病毒之重組細胞、受體介導之內飲作用(見例如Wu等人, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432)。引入方法包括(但不限於)皮內、肌肉內、腹膜內、靜脈內、皮下、鼻內、硬膜外及經口途徑。組合物可藉由任何適宜途徑，例如藉由輸注或快速注射、藉由經由上皮或黏膜皮膚內層(例如口腔黏膜、直腸黏膜及腸道黏膜等)吸收來投與且可與其他生物學活性劑一起投與。投藥可為全身性或局部的。

【0078】 可使用標準針及注射器皮下或靜脈內遞送本發明之醫藥組合物。此外，關於皮下遞送，筆式遞送裝置易於在遞送本發明之醫藥組合

物時應用。此類筆式遞送裝置可為可再用的或拋棄式的。可再用的筆式遞送裝置通常利用含有醫藥組合物之可替換套筒。在已投與套筒內之所有醫藥組合物且套筒為空的後，可容易地丟棄空套筒且用含有醫藥組合物之新套筒替換。隨後可再使用筆式遞送裝置。在拋棄式筆式遞送裝置中，不存在可替換套筒。實際上，拋棄式筆式遞送裝置用容納在該裝置內之儲集器中的醫藥組合物預填充。一旦清空儲集器之醫藥組合物，即棄去整個裝置。

【0079】 在某些情況中，醫藥組合物可在控制釋放系統中遞送。在一個實施例中，可使用泵(參見Langer，見上文；Sefton 1987 CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14: 201)。在另一實施例中，可使用聚合材料；參見Medical Applications of Controlled Release，Langer及Wise (編)，1974, CRC Pres., Boca Raton, Fla。在又一實施例中，控制釋放系統可置放於組合物之目標附近，因此僅需要一小部分全身劑量(參見，例如，Goodson，1984，Medical Applications of Controlled Release，同上，第2卷，第115至138頁)。其他控制釋放系統論述於Langer, 1990, Science 249: 1527-1533之綜述中。

【0080】 可注射製劑可包括用於靜脈內、皮下、皮內及肌肉內注射、點滴輸注等之劑型。此等可注射製劑可藉由公開已知之方法製備。舉例而言，可注射製劑可例如藉由在習知用於注射之無菌水性介質或油性介質中溶解、懸浮或乳化上文所描述之抗體或其鹽來製備。作為注射用水性介質，存在例如生理鹽水、含有葡萄糖及其他助劑之等滲溶液等，其可與適當增溶劑，諸如醇(例如乙醇)、多元醇(例如丙二醇、聚乙二醇)、非離子界面活性劑[例如聚山梨醇酯80、HCO-50 (氫化蓖麻油之聚氧乙烯(50

mol)加合物)]等組合使用。採用例如芝麻油、大豆油等作為油性介質，其可與增溶劑(諸如苯甲酸苯甲酯、苯甲醇等)組合使用。較佳將由此製備之注射液填充於適當安瓿中。

【0081】 上文所述之用於經口或非經腸使用之醫藥組合物宜製備成呈適於配合活性成分之劑量之單位劑量的劑型。此類呈單位劑量之劑型包括例如錠劑、丸劑、膠囊、注射劑(安瓿)、栓劑等。

【0082】 本發明提供一種用於中和金黃色葡萄球菌 α -毒素之方法，其包含向個體投與本發明之抗體或其抗原結合片段，或本發明之醫藥組合物。在一個實施例中，抗體以介於 1×10^{-7} 至 1×10^{-10} M範圍內之KD；較佳地，介於 1×10^{-8} 至 1×10^{-10} M範圍內之KD；更佳地，介於 1×10^{-9} 至 1×10^{-10} M範圍內之KD結合 α -毒素。在一個實施例中，該方法提供在金黃色葡萄球菌感染之情況下的被動性免疫療法。

【0083】 本發明提供一種用於治療及/或預防有需要個體之由金黃色葡萄球菌感染引起之疾病及/或病症的方法，其包含向該個體投與包含如上文所提及之抗體或其抗原結合片段的醫藥組合物。在一個實施例中，金黃色葡萄球菌感染為肺炎。

【0084】 如本文所使用，術語「治療(treating/treatment)」係指向罹患不良病狀、病症或疾病之有臨床症狀的個體投與藥劑或調配物，以便實現症狀之嚴重程度及/或頻率降低、消除症狀及/或其潛在病因，及/或有助於損傷好轉或修復。術語「預防(preventing/prevention)」係指向易罹患特定不良病狀、病症或疾病之無臨床症狀的個體投與藥劑或組合物，且因此係關於預防症狀出現及/或其潛在病因。如熟習此項技術者所理解，預防(prevention/preventing)不必達成病狀之絕對(完全)阻斷或避免。實

際上，預防可達成待預防之疾病或病狀之實質上(例如，超過約50%)減輕或避免。除非本文中另外明確地或藉由暗示指明，否則若在未提及可能的預防的情況下使用術語「治療(treatment/treating)」，則意欲亦涵蓋預防。

【0085】 本發明提供一種用於偵測樣品中之金黃色葡萄球菌 α -毒素的方法，其包含使該樣品與如上文所提及之抗體或其抗原結合片段接觸。

【0086】 本發明亦提供一種用於偵測樣品中之金黃色葡萄球菌 α -毒素之診斷劑或套組，其包含如上文所提及之抗體或其抗原結合片段。

【0087】 本發明之抗 α -毒素抗體亦可用於偵測及/或量測樣品中之 α -毒素或 α -毒素表現細胞，例如用於診斷目的。舉例而言，抗 α -毒素抗體或其片段可用於診斷藉由 α -毒素之異常表現(例如過度表現、低表現、缺乏表現等)表徵之病狀或疾病。用於 α -毒素之例示性診斷分析法可包含例如使自患者獲得之樣品與本發明之抗 α -毒素抗體接觸，其中抗 α -毒素抗體可用於偵測標記或報導分子標記。替代地，未標記之抗 α -毒素抗體可與自身可偵測地標記之二級抗體組合用於診斷應用中。可偵測標記或報告分子可為放射性同位素，諸如 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 或 ^{125}I ；螢光或化學發光部分，諸如異硫氰酸螢光素或若丹明；或酶，諸如鹼性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、辣根過氧化酶或螢光素酶。可用於偵測或量測樣品中之 α -毒素之特定例示性分析包括酶聯結免疫吸附分析(ELISA)、放射免疫分析(RIA)及螢光活化細胞分選(FACS)。

【0088】 提供以下實例以幫助熟習此項技術者實踐本發明。

實例

【0089】 材料及方法

【0090】 抗原之製備

【0091】 將無毒性 α -毒素突變體AT_{H35L}之序列與C端6×His標記同框構築至pET27b載體中((pET27b TAC1p α -溶血素-6His)。自大腸桿菌(*E. coli*) BL21菌株表現且純化 α -毒素AT_{H35L}。簡言之，使750 mL新鮮培養物在37°C下在OD₆₀₀為0.67下生長。將IPTG (異丙基- β -D-硫代半乳糖苷)添加至最終濃度為0.25 mM以在30°C下誘導蛋白質表現5 h。隨後收集細胞且將其再懸浮於100 ml之裂解緩衝液中，接著藉由使用法式壓力機進行均質化7個週期。使細胞裂解物澄清且接著將其與2ml之Ni-NTA混合。在結合兩小時之後，用20至150 mM咪唑溶液使重組His標籤 α -毒素AT_{H35L}溶離且將其滲析至磷酸鹽緩衝生理鹽水溶液中。

【0092】 免疫化及噬菌體庫產生

【0093】 藉由經由每2週腹膜內注射 α -毒素AT_{H35L}不完全弗洛伊德氏佐劑(Freud's adjuvant)持續10週來使八至十週齡BABL/c小鼠免疫。在最後注射兩週之後，在處死之前每天進行額外增強免疫，持續三天。抗AT scFv (單鏈可變片段)噬菌體庫係由小鼠脾臟細胞產生。簡言之，將小鼠脾臟均質化且用TRIZOL®試劑使其裂解以用於RNA分離且接著使用SuperScript III™合成cDNA。藉由scFV引子集合擴增DNA片段之重鏈可變區(V_H)及輕鏈可變區(V_L)。為產生V_L-連接子-V_H，藉由PCR反應擴增V_L,V_H及可撓性連接子之混合物。用Sfi消化V_L-連接子-V_H片段，將切割之插入片段與噬菌粒載體連接。將連接混合物電穿孔至大腸桿菌TG1勝任細胞中以產生噬菌體庫。多樣性經估計為 1.24×10^9 個轉化體。

【0094】 噬菌體文庫之親和力選擇

【0095】 隨後使用基於溶液之方法及基於盤之方法自噬菌體庫中淘選抗AT抗體。對於基於溶液之淘選，將經生物素標記之 α -毒素與噬菌體

庫及抗生蛋白鏈菌素磁性珠粒一起培育。洗滌之後，使結合之噬菌體抗體溶離。將之噬菌體進行擴增且用於下一輪淘選選擇。進行總共三輪淘選。對於基於盤之淘選，將 α -毒素塗佈於微量盤上且與噬菌體庫一起培育，進行總共三輪基於盤之淘選。最初篩選噬菌體粒子之結合 α -毒素的能力，使用噬菌體ELISA分析其對DNA進行定序。

【0096】 噬菌體ELISA

【0097】 在37°C下將十微升個別噬菌體隔夜培養物在96孔微量盤中之150 μ L 2YT-A培養基中生長2 h。隨後用50 μ L輔助噬菌體(2×10^{10} PFU/ml)感染培養物且將其於37°C下在震盪下再培育2 h。將補充有125 μ g/ml卡那黴素之五十微升2YT-A培養基添加至培養盤中且將其於30°C下在震盪下培育隔夜。藉由在3,300 \times g下離心30分鐘來獲得含有所關注之噬菌體的培養上清液且將其用於噬菌體ELISA篩選。將100 μ l噬菌體上清液添加至AT塗佈之ELISA盤中。用小鼠抗M13-HRP及TMB受質偵測陽性結合物。藉由ELISA盤讀取器量測450 nm下之吸光度。

【0098】 全長抗體之構築及表現

【0099】 輕鏈及重鏈精擴增且分別用DraIII/BsiWI及MluI/NheI處理。將插入片段接合至含有輕鏈及重鏈恆定區之載體中，且將構築體轉染至F293細胞中以用於表現。測試純化的全長抗體且藉由中和AT誘導之A549細胞溶解的IC₅₀對其進行評級。

【0100】 與重組 α -毒素之SPR結合

【0101】 使用表面電漿共振(SPR)來測定25A1與重組AT之結合動力學。簡言之，使用標準胺偶合程序將大約200個反應單位(RU)之25A1固定於CM5晶片上。隨後，濃度為1.5625、3.125、6.25、12.5、25及50 nM的

經連續稀釋之AT以30 $\mu\text{L}/\text{min}$ 注射180秒且解離480秒。使用Biacore T100評估軟體2.0利用1:1相互作用結合模型計算動力學參數(K_{on} 及 K_{off})及親和力(K_{D})。

【0102】 親本小鼠單株抗體25A1之人類化

【0103】 藉由互補決定區(CDR)移植進行人類化。將小鼠25A1蛋白質序列與人類生殖系序列進行比對以鑑別具有高序列一致性之人類序列，將來自輕鏈家族IGVK3-11及重鏈家族IGHV1-2之序列用作構架序列。除CDR移植以外，進一步分析序列之潛在游離半胱胺酸、去胺作用、離胺酸截割及蛋白酶切割位點形成。嵌合及人類化25A1抗體在F293細胞中瞬時表現且經純化。

【0104】 α -毒素誘導之A549細胞溶解的中和

【0105】 建立抗AT抗體之功能分析。將A549細胞以 2×10^4 個細胞/孔接種於微量盤中且在37°C下在5% CO_2 下培養隔夜。第二天，移除培養基且用培養基洗滌細胞。將純化抗體以0.4、4及40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加至細胞中且與8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之AT共培育。在培育結束時，使用比色MTT分析套組分析細胞生存力。在OD_{690 nm}之背景吸光度下測定結果且自OD_{570 nm}量測值減去該結果(圖1)。

【0106】 兔紅血球溶解分析

【0107】 藉由以6000 rpm離心10分鐘自3 ml胰酶大豆肉湯(TSB)隔夜培養物收集金黃色葡萄球菌粗上清液。隨後將各種菌株之上清液進行過濾器滅菌且儲存於-80°C下直至進一步使用。

【0108】 使用碘克沙醇梯度溶液收集RBC細胞且將最終細胞沈澱物再懸浮於平衡鹽培養基(0.85% NaCl、10 mM HEPES, pH7.4)中且保持在

4°C下。評估抗體中和AT誘導之兔RBC溶血作用的能力。特定言之，將濃度為100、50、25、12.5、6.25、3.125及1.56及0.78的25 µl各抗體與100 µl之10%兔RBC一起添加至孔中，接著添加25 µl來自各種菌株的經1:8至1:16稀釋之金黃色葡萄球菌培養上清液。在37°C下培育45至60分鐘之後，將培養盤離心5 min，將50 µl上清液平緩地移除至新的微量滴定盤中，且在450 nm下讀取吸光度。抗體效價定義為達成α-毒素誘導之溶血作用的50%抑制時的抗體濃度。2% TritonX-100充當100%溶血對照。溶血作用之抑制經計算為 $((2\% \text{ TritonX-100之OD450} - \text{測試抗體之OD450})/2\% \text{ TritonX-100之OD450}) \times 100\%$ 。

【0109】 鼠類菌血症模型

【0110】 藉由腹膜內注射對照抗體或25A1使具有6只雌性BALB/c或CD-1小鼠之組被動免疫，且接著24h後藉由靜脈內(i.v.)注射90%致死性劑量之金黃色葡萄球菌BAA-1717，或藉由腹膜內注射ATCC29213菌株進行刺激。觀測動物死亡率連續10天。記錄存活率且使用GraphPad Prism分析結果。藉由Kaplan-Meier存活分析以對數秩(Mantel-Cox)及Gehan-Breslow-Wilcoxon測試進行統計顯著性分析。

【0111】 鼠類肺炎模型

【0112】 藉由腹膜內注射SYN100 (25A1-B5B6AQT)使具有十隻7至9週齡雌性C57BL/6J小鼠(Jackson Labs, Bar Harbor, MI)之組被動免疫且接著24 h後藉由鼻內(IN)投與致死性劑量之每種金黃色葡萄球菌臨床分離株進行刺激。感染後2h皮下投與萬古黴素。感染後每天普查3次來監測動物之存活率，持續7天。記錄存活率且使用GraphPad Prism分析結果。藉由Kaplan-Meier存活分析以對數秩(Mantel-Cox)及Gehan-Breslow-

Wilcoxon測試進行統計顯著性分析。

【0113】 兔肺炎模型

【0114】 感染之前用不同劑量之SYN100處理具有三至九隻雄性新西蘭兔之組24小時。感染之接種液尺寸保持在 2.9 至 5.2×10^7 CFU/兔內。感染後四小時藉由皮下注射以50 mg/kg/8h投與利奈唑胺(若使用)。感染後每天普查2次來監測動物之存活率，持續7天。記錄存活率且使用GraphPad Prism分析結果。藉由Kaplan-Meir存活分析以對數秩(Mantel-Cox)及Gehan-Breslow-Wilcoxon測試進行統計顯著性分析。

【0115】 實例1 抗 α -毒素抗體之分離

【0116】 用藉由引入H35L突變而特定失活之重組AT使BABL/c小鼠免疫。吾等隨後構築單鏈可變片段(scFv)噬菌體庫且淘選自金黃色葡萄球菌純化之AT。在三輪淘選之後，鑑別、產生且測試29種獨特結合物之針對AT誘導之A549細胞溶解的中和活性。結果顯示當抗體以40 μ g/mL使用時，29種純化抗體中僅10種(25A1、25A10、25E4、25E12、25H3、25B7、25G1、25G4、5H9及N2F6)抑制A549細胞溶解(圖1)。10種抗體之中和活性概述於表3中。隨後將抗體轉化成全長抗體且進一步表徵結合且證實中和活性。10種純系之CDR序列展示於表2(如上文所示)中。CDR序列之比較揭示10種抑制性抗體中之9種的胺基酸序列幾乎一致。其中之五種(25A10、25A1、25E12、25H3及25E4)在中和AT誘導之A549細胞溶解方面具有極類似的功能活性。基於結合及功能活性選擇純系25A1。

表3：

純系	序列分析	細胞毒性	純系	序列分析	細胞毒性
aN2-25A10	√	++	aSTAPH N2F6	√	+
aN2-25D5	√	-	aSTAPH N2H1	√	-
aN3-12.5A7	√	-	aSTAPH N2A2	√	-
aN2-25D8	√	-	aSTAPH N2F11	√	-

aN3-12.5E6	√	-	aSTAPH N2E10	√	-
aN2-25G12	√	-	aSTAPH N2B6	√	-
aN3-25F2	√	-	aN2-25A1	√	++
aN3-25G1	√	+	aSTAPH N2D12	√	-
aN3-12.5D2	√	-	H9395 R4A8	√	-
aN2-25B8	√	-	aN2-25E12	√	++
H9395 R4B11	√	-	aN2-25H3	√	++
aN2-25B7	√	+	aSTAPH N2D1	√	-
aN3-12.5H9	√	+	aN2-25E4	√	++
aSTAPH N2B11	√	-	aN2-25G4	√	+
aSTAPH N2B10	√	-			

【0117】 實例2 25A1與重組 α -毒素之高親和力結合

【0118】 藉由表面電漿共振評估25A1針對重組AT之親和力。如圖2中所示，25A1以 8.346×10^{-10} M之 K_D 結合 α -毒素。締合及解離常數分別為 7.608×10^5 M⁻¹s⁻¹及 6.349×10^{-4} M⁻¹s⁻¹。此資料指示25A1具有針對AT之高親和力。

【0119】 實例3 人類化25A1之工程改造及表徵

【0120】 為降低鼠類抗體所引入之免疫原性，吾等選擇將鼠類25A1抗體之CDR移植於人類構架輕鏈之IGVK3-11*01F及重鏈之IGHV1-2*02F上，此係因為其與鼠類25A1之高序列及構形。產生回復突變之不同組合且測試其抗原結合。基於回復突變之結合親和力及數目，選擇兩種重鏈變異體25A1-VHB2及25A1-VHB5及2種輕鏈25A1-VLB4及25A1-VLB6以構建變異體25A1-HuB2B4、25A1-HuB5B4、25A1HuB2B6及25A1-HuB5B6。CDR移植及回復突變之後的抗體之序列變型展示於圖3(A)中。人類化抗體25A1-HuB2B4、25A1-HuB5B4、25A1HuB2B6及25A1-HuB5B6針對重組 α -毒素之結合動力學(K_D)藉由forteBio測定分別為 1.1×10^{-9} M、 1.5×10^{-9} M、 1.1×10^{-9} M及 1.1×10^{-9} M，其與親本鼠類抗體25A1之 K_D 1.5×10^{-9} M高度類似(圖3(B))。

【0121】 吾等隨後選擇25A1-B2B4及25A1-B5B6用於序列可靠性檢

查。在重鏈CDR2區中之N61處鑑別出潛在糖基化位點(圖3(C))。因此，N61突變成丙胺酸以避免額外醣基化之不必要併發症；N61A突變純系命名為25A1-B2B4AQT及25A1-B5B6AQT。

【0122】 實例4 α -毒素誘導之兔紅血球溶血作用的中和

【0123】 隨後產生人類化25A1、25A1-B2B4AQT及25A1-B5B6AQT且測試對天然 α -毒素誘導之兔RBC溶血作用的抑制。簡言之，自五種金黃色葡萄球菌臨床菌株(BAA-1717、BAA-1756、ATCC33592、BAA-42及Wood46)收集穩定期(隔夜培養物)之細菌上清液且將其與濃度範圍為0.195至25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之各種抗AT抗體一起添加至兔RBC中。對來自五種測試菌株之重組及天然 α -毒素誘導之RBC溶血作用的抑制百分比展示於圖4中。抗體25A1、25A1-B2B4AQT及25A1-B5B6AQT能夠結合來自所測試菌株之天然 α -毒素，且展現對各種天然 α -毒素介導之RBC溶解的約50%至90%抑制。25A1、25A1-B2B4AQT及25A1-B5B6AQT抑制重組 α -毒素誘導之溶血作用的 IC_{50} 值為462.3、442.9及304.2 pg/mL ；對於ATCC33592，為1518、1801及1830 ng/mL ；對於BAA-1756，為6913、7956及7322 ng/mL ；對於Wood46，為1299、1707及1537 ng/mL ；且對於BAA-42，為860.6、910.8及996.3 ng/mL ，表明25A1-B2B4AQT及25A1-B5B6AQT兩者保持與25A1相當的抑制能力。

【0124】 實例5 SYN100增加鼠類菌血症及肺炎模型中之存活率

【0125】 金黃色葡萄球菌為敗血症之常見病因，一種具有多種器官功能障礙之全身性炎症。AT在敗血症模型中起重要作用，因為金黃色葡萄球菌 hla 突變體在小鼠敗血症模型中顯示死亡之時間延遲且存活率增加。因此，吾等測試25A1保護小鼠免於金黃色葡萄球菌感染之能力。如

圖5中所示，在第2天與第5天之間觀測到媒劑對照組之死亡。相比之下，經25A1處理之組展現增加的存活率；50、25、10及5 mg/kg劑量組之總存活率為83%、67%、33%及50% (圖5)，此資料指示用25A1進行防治會提供針對菌血症感染之保護。在用二甲氧苯青黴素敏感性金黃色葡萄球菌菌株ATCC29213建立之另一鼠類敗血症模型中，SYN100亦以100、50及10 mg/kg作為防治性療法展現保護(圖6)。儘管不同菌株之間存在一些變化，但此等觀測之功效支持SYN100在金黃色葡萄球菌敗血症及菌血症中之防治性用途。

【0126】 由於金黃色葡萄球菌為患者之呼吸器相關性肺炎之常見病因，因此在金黃色葡萄球菌誘導之鼠類肺炎模型中評估SYN100之保護性功效。感染係藉由在投與SYN100後24小時用三種金黃色葡萄球菌臨床分離株BAA1556 (USA300)、SF8300(USA300)或NRS261 (USA200)鼻內刺激來誘導。在急性肺炎模型中，媒劑對照組之死亡在刺激後18至20小時之間發生。相比之下，防治性投與SYN100在所有三個模型中引起存活之顯著延長，從而證實SYN100可提供針對不同金黃色葡萄球菌臨床分離株之保護(圖7)。

【0127】 在後續實驗中，在鼠類NRS261肺炎模型中測試SYN100如何與抗生素治療關聯作用。在臨床中通常開處萬古黴素以治療MRSA感染；因此，吾等測試SYN100與作為醫療標準之萬古黴素治療組合的功效。如圖8中所示，10 mg/kg之SYN100或至多30 mg/kg之萬古黴素均未顯著延長小鼠之存活期。然而，接受SYN100及萬古黴素兩者之三組小鼠展現劑量依賴性存活率，其高度指示SYN100與萬古黴素之間的協同作用。

【0128】 實例6 SYN100增加兔肺炎模型中之存活率

【0129】 在許多方面，相比於小鼠，兔子為用於金黃色葡萄球菌感染之更適合模型生物體。因此，吾等在用醫院獲得性MRSA菌株ST20120426建立之兔肺炎模型中測試SYN100之功效。ST20120406為分泌相對較大量之 α -毒素，進而使得對照動物在24h內崩塌的高毒性菌株。如圖9中所示，在此模型中測試之介於25至125 mg/kg範圍內的所有劑量之SYN100提供存活之顯著延長，由此呈現SYN100在金黃色葡萄球菌肺炎中之效用的又一驗證。

【0130】 在ST20120426兔肺炎模型中進一步研究SYN100與抗生素之共治療。圖10A中之資料展示用30 mg/kg之SYN100及50 mg/kg/8h之利奈唑胺(LZD)進行單一治療分別產生56%及33%的總存活率，而接受SYN100及LZD兩者之組具有89%的存活率。對肺組織之進一步檢查揭示僅組合治療組具有顯著減小的肺腫脹、細菌負荷，且在宏觀表現上呈現得更正常。LZD抑制細菌中蛋白質合成之初始化且已顯示與作為細胞壁合成阻斷劑之萬古黴素同等有效。總之，此等結果表明，SYN100補充了兩種抗生素之作用且以附加或協同方式提供針對MRSA感染之進一步保護。

【0131】 雖然已結合上文所闡述之特定實施例來描述本發明，但一般熟習此項技術將對其之許多替代方案及其修改及變化顯而易見。所有此等替代方案、修改及變化被視為屬於本發明之範疇內。

【序列表】

<110> 興盟生物醫藥(蘇州)有限公司(SYNERMORE BIOLOGICS (SUZHOU) CO., LTD.)

<120> 金黃色葡萄球菌 α -毒素特異性抗體及其應用

<140> 110110856

<141> 2021-03-25

<150> US 62/994,744

<151> 2020-03-25

<160> 31

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 1

Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Asn Met Asn

1 5 10

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 2

Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Phe Met Asn

1 5 10

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 3

Ser Ile Asn Pro Tyr Tyr Gly Ile Thr Ser Tyr Asn Gln Thr Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 4
<211> 17
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 4

Ser Ile Asn Pro His Tyr Gly Ile Thr Ser Tyr Asn Gln Thr Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 5
<211> 17
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 5

Ser Ile Asn Pro Tyr Tyr Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Gln Thr Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 6
<211> 17
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 6

Arg Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Leu Tyr Lys Gln Asn Phe Lys
1 5 10 15

Asp

<210> 7

<211> 11
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 7

Ile Tyr Tyr Gly Asp Ser Leu Gly Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 8
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 8

Asp Gly Asp Gly Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 9
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 9

Val Tyr Tyr Gly Asp Ser Leu Gly Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 10
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 10

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
 1 5 10

<210> 11
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 11

Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Tyr Met His
1 5 10

<210> 12
<211> 10
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 12

Ser Ala Ser Ser Ser Lys Ser Tyr Ile His
1 5 10

<210> 13
<211> 10
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 13

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr
1 5 10

<210> 14
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 14

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

<210> 15
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 15

Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 16
<211> 9

<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 16

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
1 5

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 17

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr
1 5

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 18

His Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
1 5

<210> 19
<211> 120
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 19

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ser Ile Asn Pro Tyr Tyr Gly Ile Thr Ser Tyr Asn Gln Thr Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ile Tyr Tyr Gly Asp Ser Leu Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 20
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 20

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
 35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80

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

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 21
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人類化抗體

<400> 21

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

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

Gly Ser Ile Asn Pro Tyr Tyr Gly Ile Thr Ser Tyr Asn Gln Thr Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ile Tyr Tyr Gly Asp Ser Leu Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 22
 <211> 120
 <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人類化抗體

<400> 22

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

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

Gly Ser Ile Asn Pro Tyr Tyr Gly Ile Thr Ser Tyr Asn Gln Thr Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ile Tyr Tyr Gly Asp Ser Leu Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 23

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人類化抗體

<400> 23

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

35

40

45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

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

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

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

<210> 25

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人類化抗體

<400> 25

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

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

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

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

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr

85

90

95

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

<210> 26

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人類化抗體

<400> 26

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

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

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

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

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

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

<210> 27

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人類化抗體

<400> 27

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

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

Gly Ser Ile Asn Pro Tyr Tyr Gly Ile Thr Ser Tyr Ala Gln Thr Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ile Tyr Tyr Gly Asp Ser Leu Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 28

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人類化抗體

<400> 28

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

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

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

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

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

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

<210> 29

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人類化抗體

<400> 29

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

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

Gly Ser Ile Asn Pro Tyr Tyr Gly Ile Thr Ser Tyr Ala Gln Thr Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ile Tyr Tyr Gly Asp Ser Leu Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 30

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人類化抗體

<400> 30

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

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

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

<210> 31
<211> 17
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 31

Ser Ile Asn Pro Tyr Tyr Gly Ile Thr Ser Tyr Asn Gln Thr Phe Arg
1 5 10 15

Gly

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種抗體或其抗原結合片段，其特異性結合至金黃色葡萄球菌 α -毒素中之抗原決定基或其片段；其中該抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區之互補決定區(CDR)及輕鏈可變區之互補決定區，其中該重鏈可變區之該等互補決定區包含CDRH1、CDRH2及CDRH3區，且該輕鏈可變區之該等互補決定區包含CDRL1、CDRL2及CDRL3區，且其中：

該CDRH1區包含SEQ ID NO: 1的胺基酸序列；該CDRH2區包含SEQ ID NO: 3的胺基酸序列；該CDRH3區包含SEQ ID NO: 7的胺基酸序列；且

該CDRL1區包含SEQ ID NO: 10的胺基酸序列；該CDRL2區包含SEQ ID NO: 14的胺基酸序列；該CDRL3區包含SEQ ID NO: 16的胺基酸序列。

【請求項2】

如請求項1之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體為哺乳動物抗體。

【請求項3】

如請求項1之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含：重鏈可變區，其包含SEQ ID NO: 19之胺基酸序列；及輕鏈可變區，其包含SEQ ID NO: 20之胺基酸序列。

【請求項4】

如請求項1之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含：重鏈可變區，其包含選自由SEQ ID NO: 21至23的胺基酸序列；及輕鏈可變區，其包含選自由SEQ ID NO: 24至26的胺基酸序列。

【請求項5】

如請求項1之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含：重鏈可變區，其包含SEQ ID NO: 27之胺基酸序列；及輕鏈可變區，其包含SEQ ID NO: 28之胺基酸序列。

【請求項6】

如請求項1之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含：重鏈可變區，其包含SEQ ID NO: 29之胺基酸序列；及輕鏈可變區，其包含SEQ ID NO: 30之胺基酸序列。

【請求項7】

如請求項1之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體為單株抗體、嵌合抗體、人類化抗體或人類抗體。

【請求項8】

一種醫藥組合物，其包含如請求項1至7中任一項之抗體或其抗原結合片段及醫藥學上可接受之載劑或賦形劑。

【請求項9】

一種如請求項1至7中任一項之抗體或其抗原結合片段的用途，其用於製造用於中和有需要個體之金黃色葡萄球菌 α -毒素的藥劑。

【請求項10】

如請求項9之用途，其中該抗體以介於 1×10^{-7} 至 1×10^{-10} M範圍內之KD結合 α -毒素。

【請求項11】

如請求項9之用途，其中該藥劑在金黃色葡萄球菌感染之情況下提供被動性免疫療法。

【請求項12】

一種如請求項1至7中任一項之抗體或其抗原結合片段的用途，其用於製造用於治療、防治性治療及/或預防有需要個體之由金黃色葡萄球菌感染引起之疾病及/或病症的藥劑。

【請求項13】

如請求項12之用途，其中該等由金黃色葡萄球菌感染引起之疾病及/或病症為肺炎。

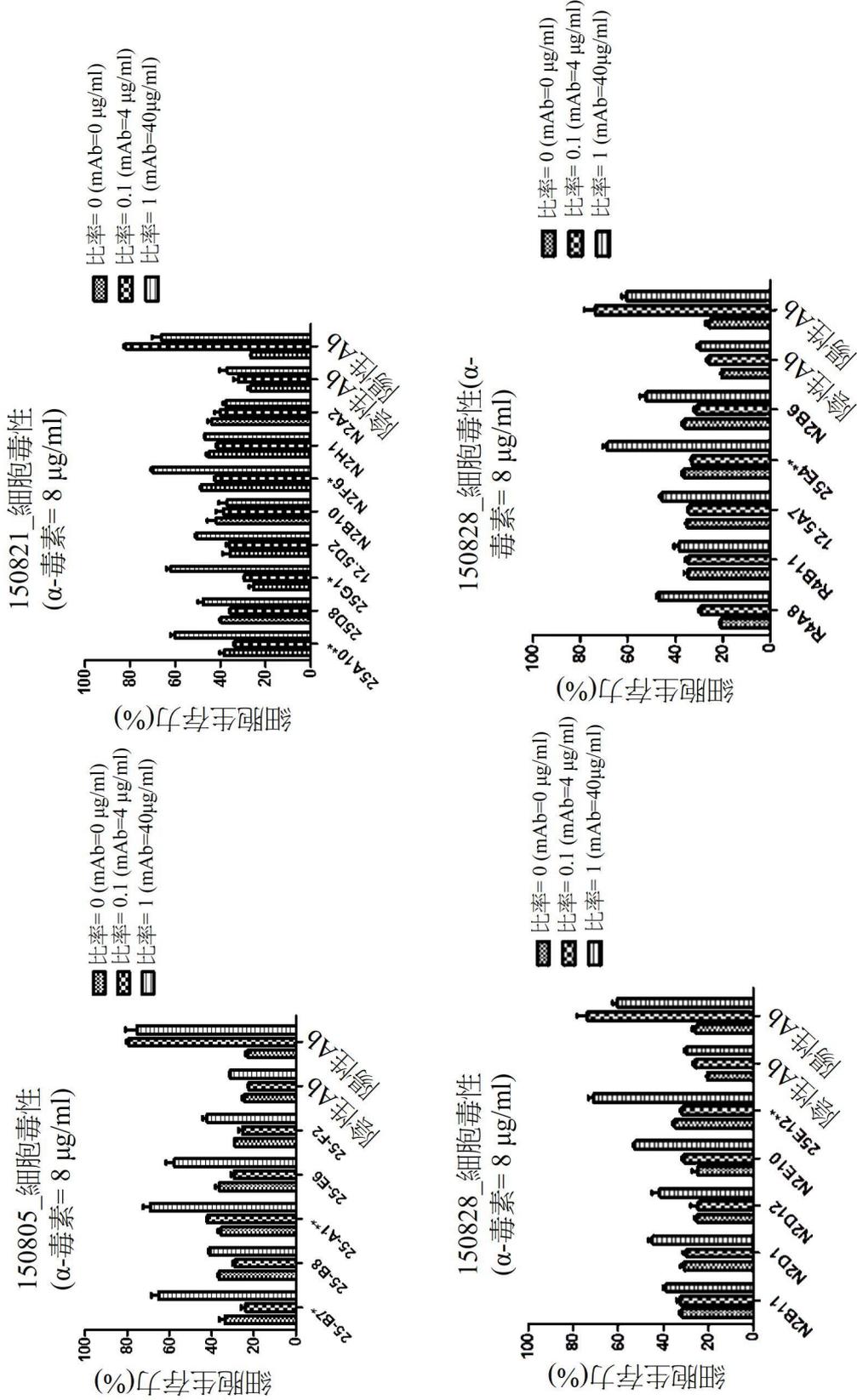
【請求項14】

一種用於偵測樣品中之金黃色葡萄球菌 α -毒素的方法，其中該方法包含使該樣品與如請求項1至7中任一項之抗體或其抗原結合片段接觸。

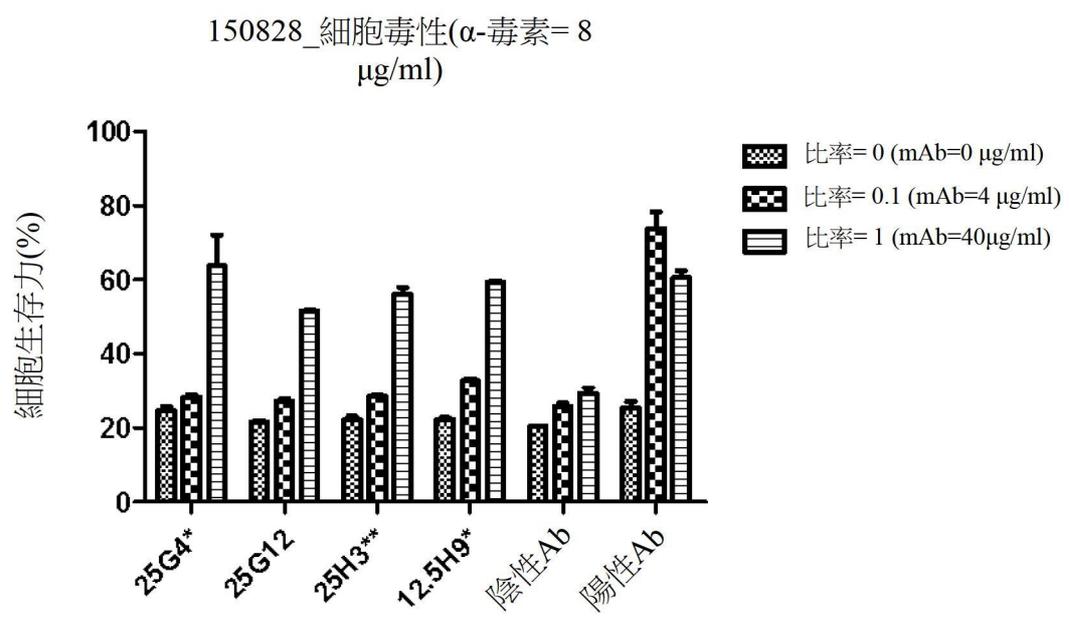
【請求項15】

一種用於偵測樣品中之金黃色葡萄球菌 α -毒素的套組，其中該套組包含如請求項1至7中任一項之抗體或其抗原結合片段。

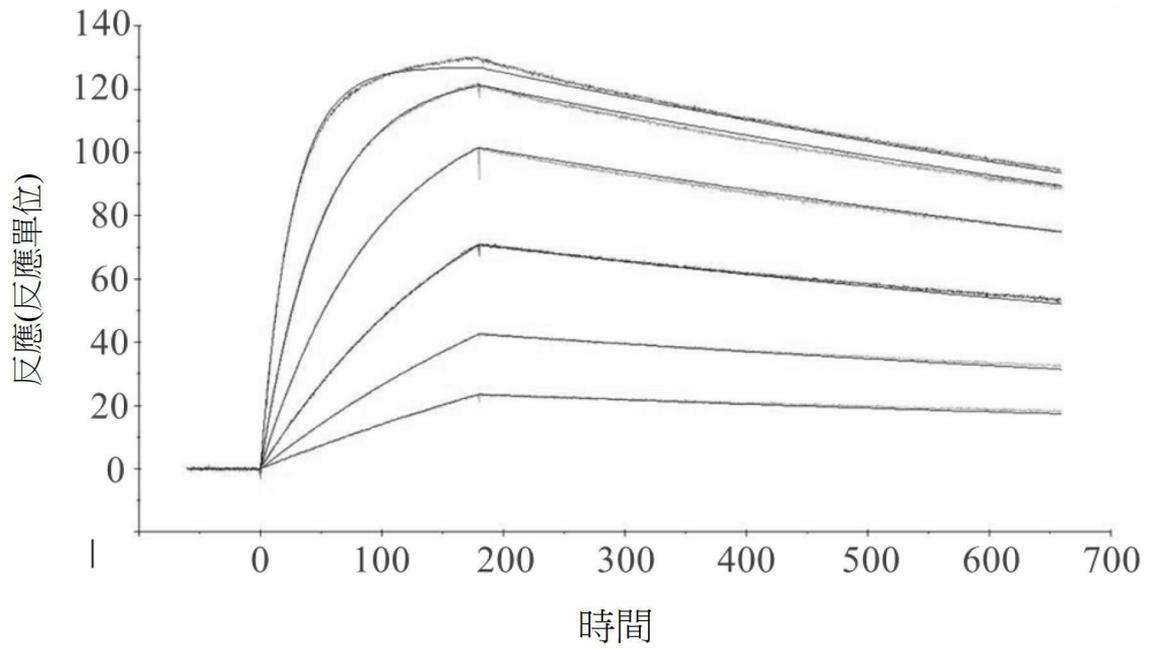
【發明圖式】



【圖1】



【圖1】 (續)



k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (M)	R_{max}	Chi^2
7.608E+5	6.349E-4	8.346E-10	129.0	0.581

【圖2】

	1	10	20	30	40	50	60
25A1-VH	QVKLQQSGPELVKPGASVKISCKAS			GYSFTDYNM	WVKQSHGKSLEWIG		SINPYYGITSYNQTFKG
IGHV1-2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS			GYTFTGYMH	WVRQAPGQGLEWMG		WINPNSGGTNYAQKFG
HU25A1-VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS			GYSFTDYNM	WVRQAPGQGLEWMG		SINPYYGITSYNQTFKG
HU25A1/VHB2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS			GYSFTDYNM	WVRQAPGQGLEWMG		SINPYYGITSYNQTFKG
HU25A1/VHB5	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS			GYSFTDYNM	WVRQAPGQGLEWMG		SINPYYGITSYNQTFKG

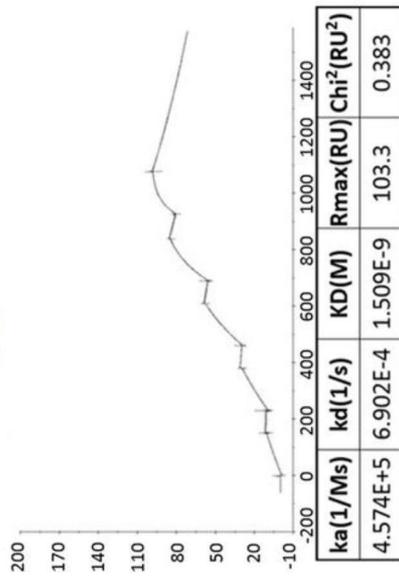
	70	80	90	100	110	
25A1-VH	KATLTVDKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCAR		IYYGDSLGLDY	WGQGT	TVTIVSS	
IGHV1-2	RVTMTRDTSISTAYMELSR	LSRSDDTAVYYCAR	WG	GGDFYAMDV	WGQGT	LTVIVSS
HU25A1-VH	RVTMTRDTSISTAYMELSR	LSRSDDTAVYYCAR	IYYGDSLGLDY	WGQGT	LTVIVSS	
HU25A1/VHB2	RVTLTYDKSISTAYMELSR	LSRSDDTAVYYCAR	IYYGDSLGLDY	WGQGT	LTVIVSS	
HU25A1/VHB5	RVTLTYDTSISTAYMELSR	LSRSDDTAVYYCAR	IYYGDSLGLDY	WGQGT	LTVIVSS	

	1	10	20	30	40	50
25A1-VL	DIELTQSPAIMASAPGKVTMTCS		SASSVSYMH	WYQKSGTSPKRWIY		DTSKLAS
IGVK3-11	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC		RASQSVSSYLA	WYQKPGQAPRLIY		DASNRAT
HU25A1-VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC		SASSVSYMH	WYQKPGQAPRLIY		DTSKLAS
HU25A1/VLB4	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC		SASSVSYMH	WYQKPGQAPRRWIY		DTSKLAS
HU25A1/VLB6	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC		SASSVSYMH	WYQKPGQAPRRIY		DTSKLAS

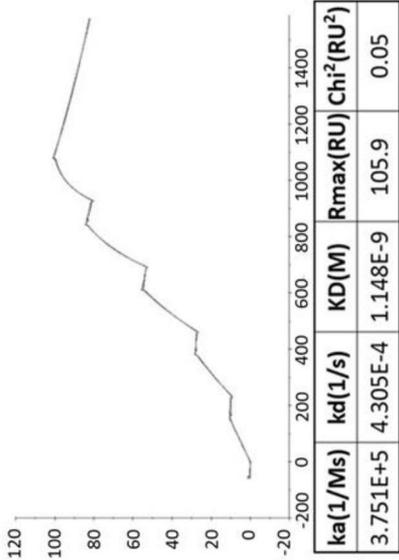
	60	70	80	90	100
25A1-VL	GVPARFSGSGGTSYSLT	ISSMEAEDAATYYC	QQWSSNPLT	FGAGTKLEIKR	
IGVK3-11	GIPARFSGSGGTDFTLT	ISSLEPEDFAVYYC	QQRSNWP	FGQGTKVEIKR	
HU25A1-VL	GIPARFSGSGGTDFTLT	ISSLEPEDFAVYYC	QQWSSNPLT	FGQGTKVEIKR	
HU25A1/VLB4	GIPARFSGSGGTDFTLT	ISSLEPEDFAVYYC	QQWSSNPLT	FGQGTKVEIKR	
HU25A1/VLB6	GIPARFSGSGGTDFTLT	ISSLEPEDFAVYYC	QQWSSNPLT	FGQGTKVEIKR	

【圖3A】

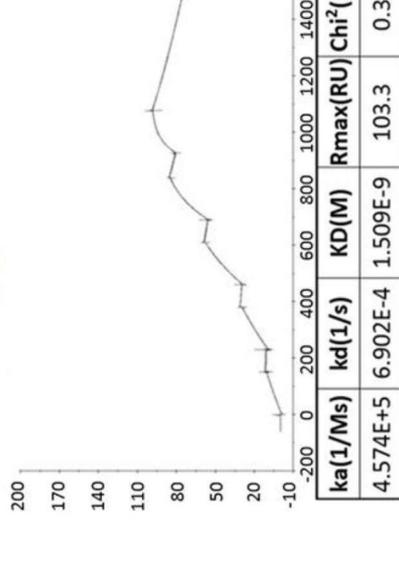
25A1-MM / α -毒素20170207 2017-02-10



25A1-HuB2B4 / α -毒素20170207 2017-05-23



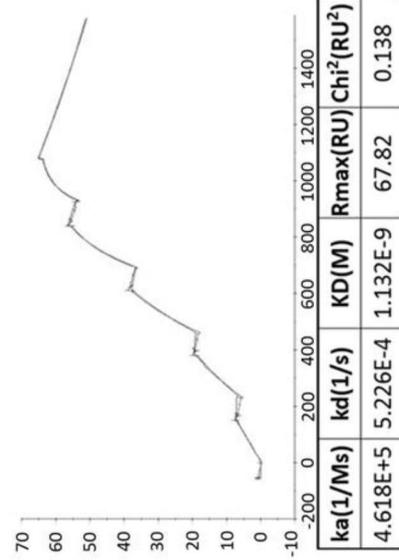
25A1-HuB2B6 / α -毒素20170207 2017-05-24



25A1-HuB5B4 / α -毒素20170207 2017-05-23



25A1-HuB5B6 / α -毒素20170207 2017-05-23



【圖3B】

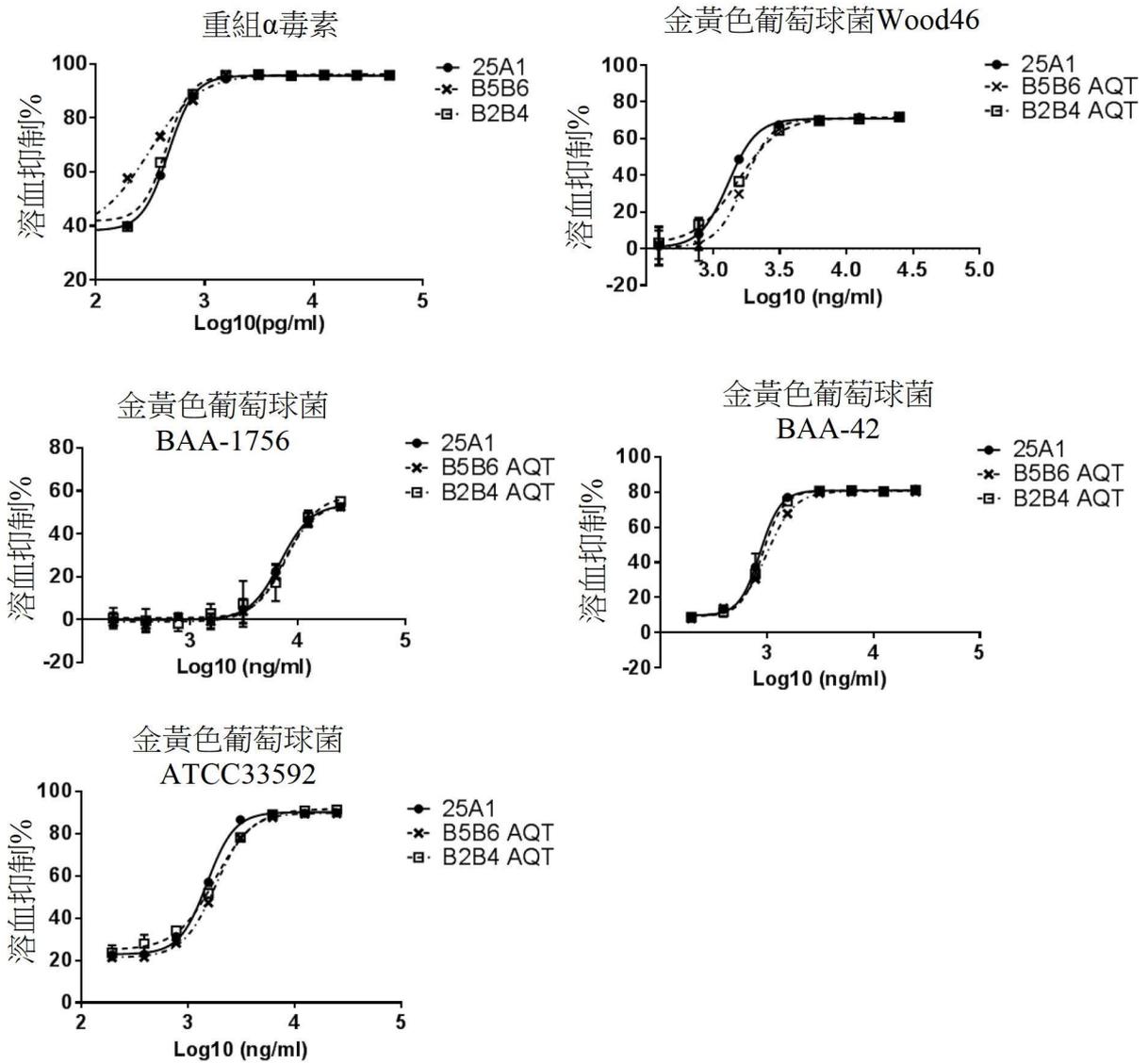
25A1-B5B6AQT重鏈：

DPKGSLSWRILLEFLSLAFELSYGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTFDYMNWVRQAPGQGL
EWMGSINPYYGITSY**A**QTFKGRVTLTVDTSLSTAYMELSRRLRSDDTAVYYCARIYYGDSLGLDYWGQG
TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG*

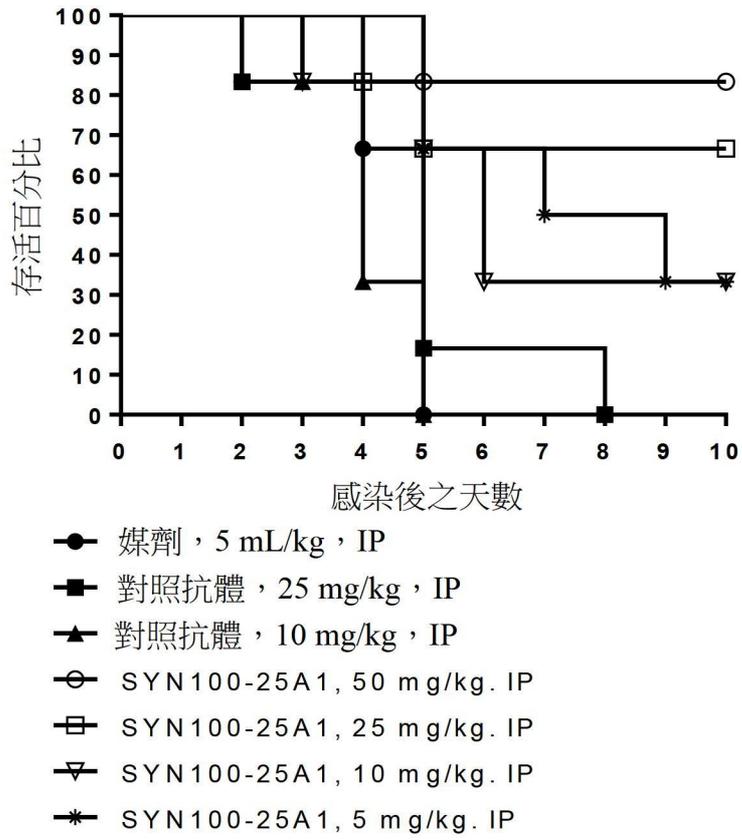
25A1-B5B6AQT輕鏈：

METDTLLLLWVLLWVPGSTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPGQAPRRLIY
DTSKLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQWSSNPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKAD
YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

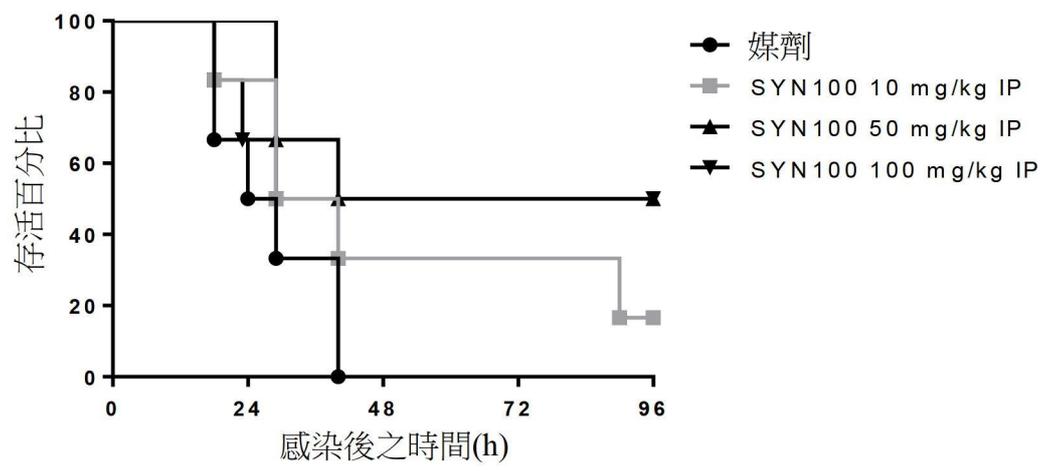
【圖3(C)】



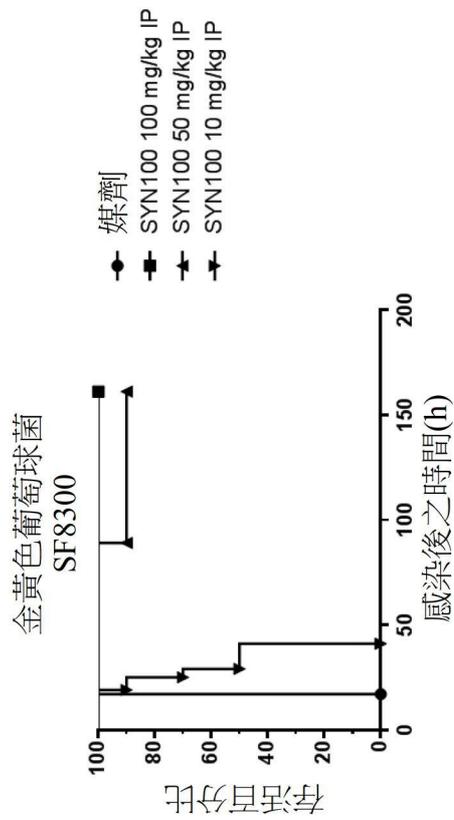
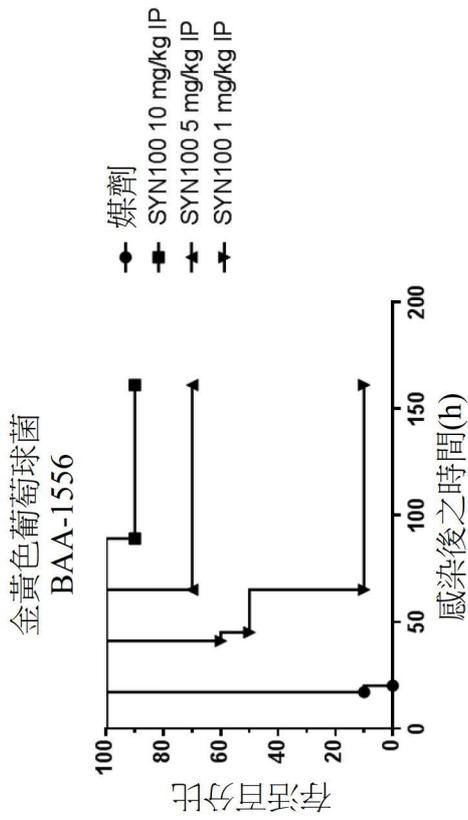
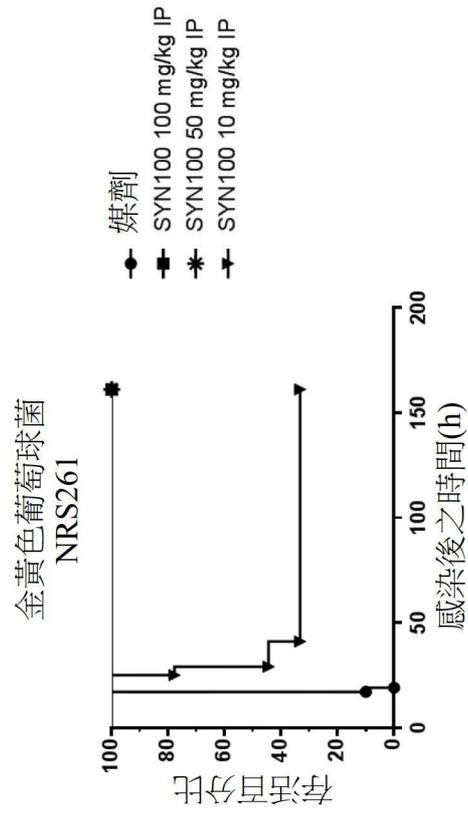
【圖4】



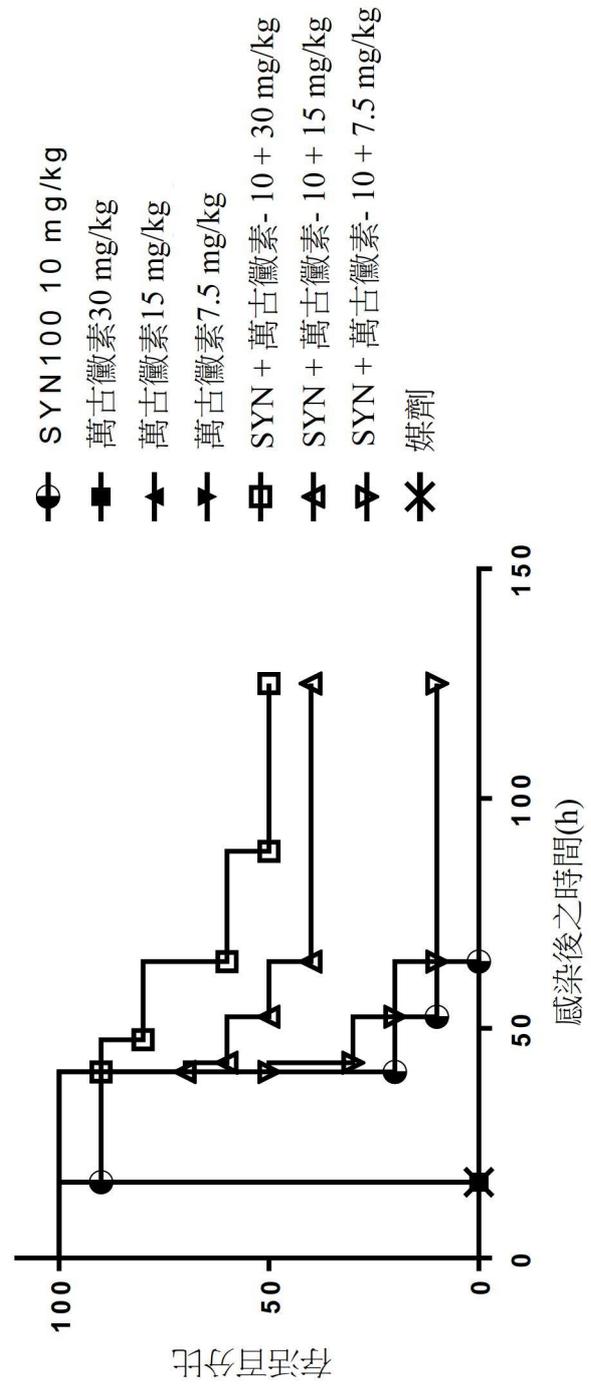
【圖5】



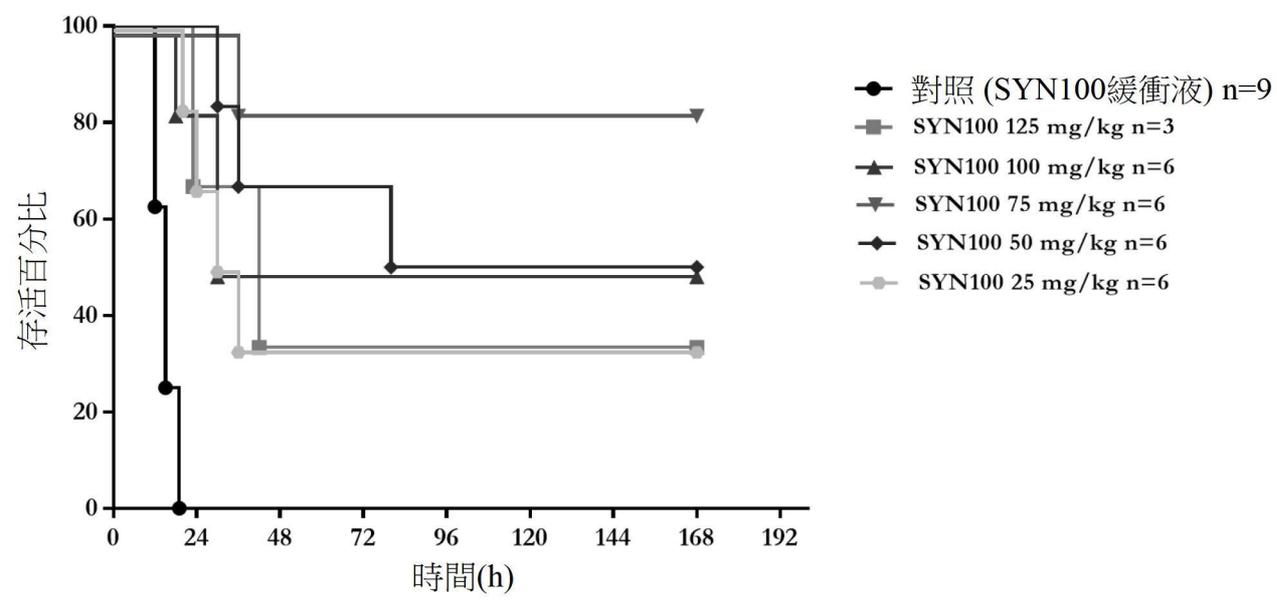
【圖6】



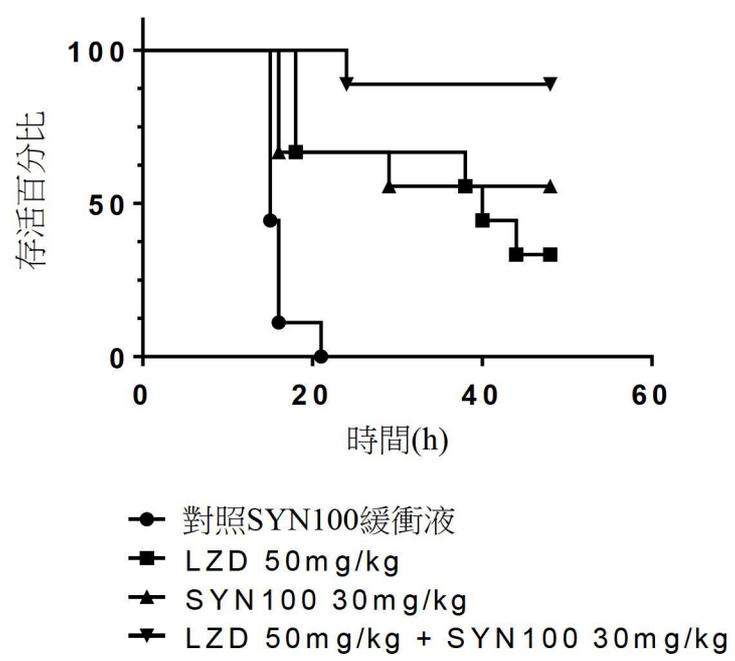
【圖7】



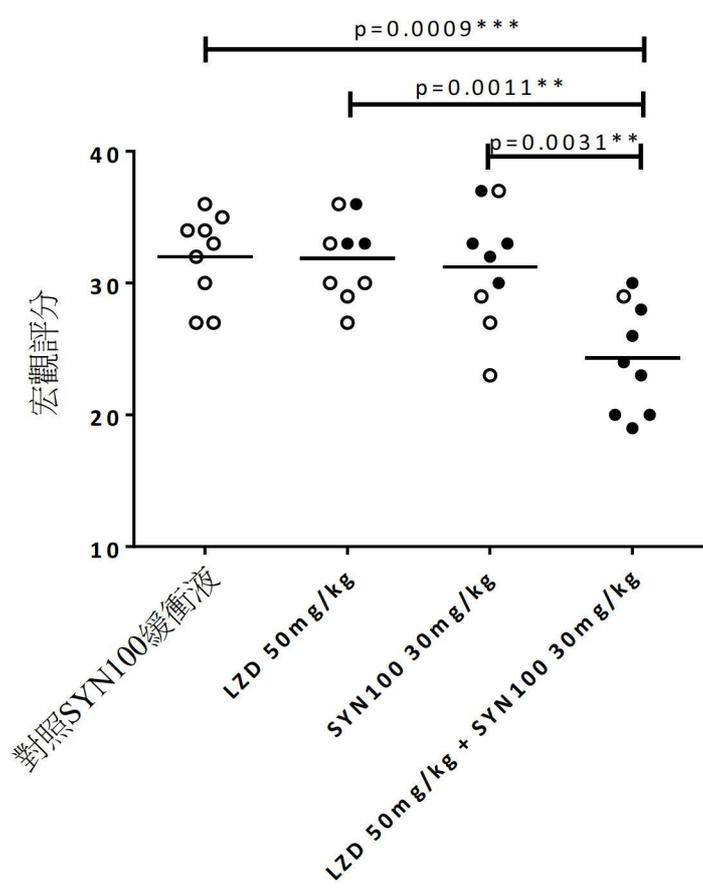
【圖8】



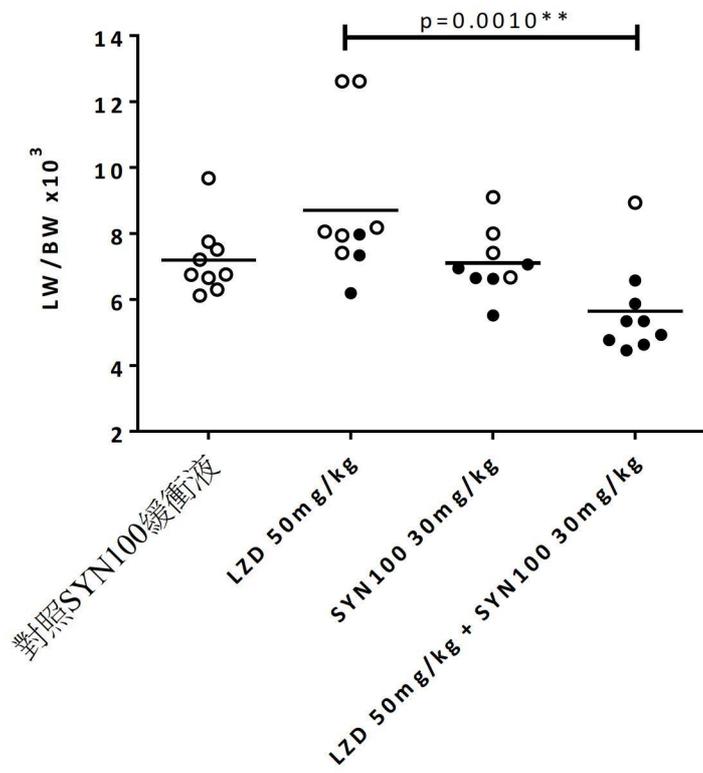
【圖9】



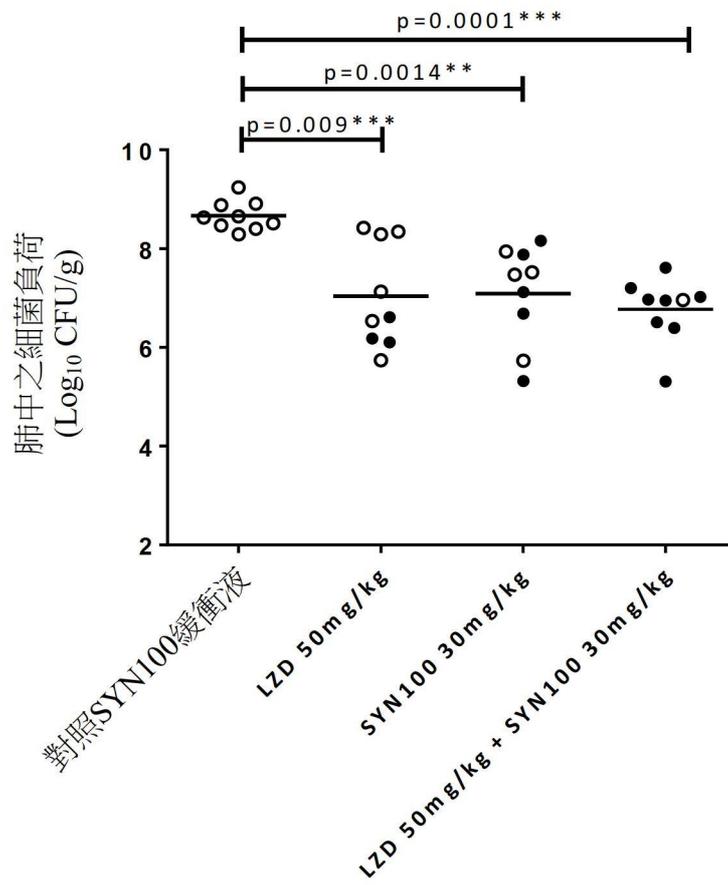
【圖10 (A)】



【圖 10 (B)】



【圖10 (C)】



【圖10 (D)】