



(21)申請案號：109132357 (22)申請日：中華民國 109 (2020) 年 09 月 18 日

(51)Int. Cl. : C07K16/12 (2006.01) C12N15/13 (2006.01)
A61K39/40 (2006.01) A61P31/04 (2006.01)

(30)優先權：2019/09/20 中國大陸 201910889697.5

(71)申請人：大陸商邁威(上海)生物科技股份有限公司(中國大陸) (CN)
中國大陸

(72)發明人：安毛毛 AN, MAOMAO (CN)；王驪淳 WANG, LICHUN (CN)；高攀 GAO, PAN (CN)；林鑒 LIN, JIAN (CN)；姜遠英 JIANG, YUANYING (CN)；慎慧 SHEN, HUI (CN)；陳思敏 CHEN, SIMIN (CN)；郭詩雨 GUO, SHIYU (CN)；方瑋 FANG, WEI (CN)

(74)代理人：陳翠華

(56)參考文獻：

TW 201837054A

期刊 Tkaczyk et. al., "Identification of Anti-Alpha Toxin Monoclonal Antibodies That Reduce the Severity of Staphylococcus aureus Dermonecrosis and Exhibit a Correlation between Affinity and Potency" Clin Vaccine Immunol., 19(3), ASM Journal, 2012 Mar, p.377-385.

審查人員：吳佩諄

申請專利範圍項數：26 項 圖式數：13 共 116 頁

(54)名稱

抗 α -溶血素的抗體及其應用

(57)摘要

本發明提供了一種結合金黃色葡萄球菌 α -溶血素的抗體或其片段，以及該抗體或其片段用於預防或治療金黃色葡萄球菌感染的用途。本發明的抗體係通過 α -溶血素的弱毒性免疫、強毒性篩選的策略篩選得到，對 α -溶血素具有高親和力，能夠有效阻斷 α -溶血素的溶血作用，且在 α -溶血素膿毒症模型、MRSA 菌血症模型和 MRSA 肺部感染模型中均證明了顯著的保護或治療作用，且與抗生素具有協同作用，是對金黃色葡萄球菌現有抗生素療法的有利補充。

指定代表圖：

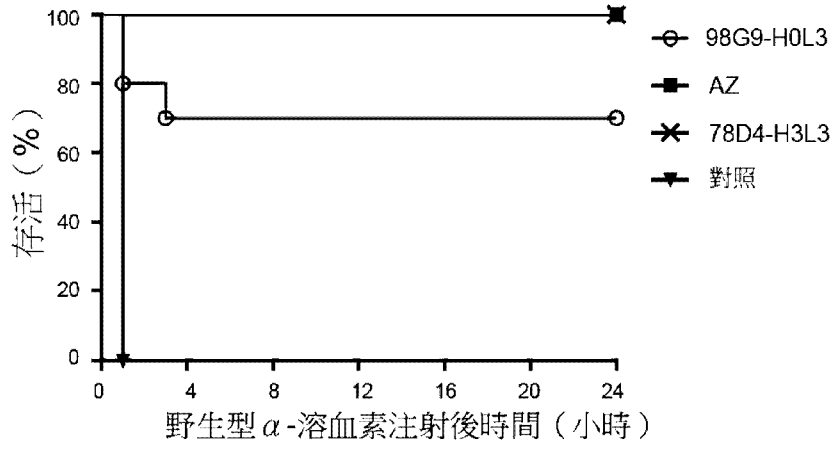


圖10



I861227

【發明摘要】

【中文發明名稱】 抗 α -溶血素的抗體及其應用

【中文】

本發明提供了一種結合金黃色葡萄球菌 α -溶血素的抗體或其片段，以及該抗體或其片段用於預防或治療金黃色葡萄球菌感染的用途。本發明的抗體係通過 α -溶血素的弱毒性免疫、強毒性篩選的策略篩選得到，對 α -溶血素具有高親和力，能夠有效阻斷 α -溶血素的溶血作用，且在 α -溶血素膿毒症模型、MRSA 菌血症模型和 MRSA 肺部感染模型中均證明了顯著的保護或治療作用，且與抗生素具有協同作用，是對金黃色葡萄球菌現有抗生素療法的有利補充。

【指定代表圖】 圖10。

【代表圖之符號簡單說明】 無。

【特徵化學式】 無。

【發明說明書】

【中文發明名稱】 抗 α -溶血素的抗體及其應用

【技術領域】

【0001】 本發明涉及抗體藥物領域，具體而言，本發明涉及一種抗 α -溶血素的抗體及其製藥用途。

【先前技術】

【0002】 金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)屬於葡萄球菌屬，是一種重要的革蘭氏陽性致病菌，是人類最主要的 G⁺致病菌，可引起化膿性感染、肺炎、偽膜性腸炎、心包炎等局部感染，以及敗血症、膿毒血症等全身感染。中國耐藥監測網資料顯示，金黃色葡萄球菌位居醫院內檢出病原菌的第 4 位、醫院內檢出 G⁺菌的第 1 位。

【0003】 金黃色葡萄球菌在感染人體過程中釋放大量的毒素破壞組織細胞，並抑制機體免疫細胞清除病原體。目前臨床上主要採用 β -內醯胺類抗生素來治療金黃色葡萄球菌感染。但是，抗生素只能抑制或者殺死細菌，對細菌釋放的毒素卻無能為力。相反，在抗生素的壓力下細菌會釋放更多的毒素，同時被抗生素殺死的細菌裂解也會釋放出毒素，大量毒素進入血液之後會過度激活宿主免疫系統，釋放過量的發炎因子，形成膿毒症。

【0004】 並且，在與人類鬥爭的過程中，金黃色葡萄球菌已經對 β -內醯胺類抗生素越來越不敏感，例如目前耐甲氧西林金黃色葡萄球菌(MRSA)的分離率越來越高，中國耐藥監測網資料顯示 2016 年 MRSA 的分離率甚至已經高達 38.9%。對於 MRSA，治療藥物臨床上主要包括萬古黴素、利奈唑胺等有限的幾種藥物，而這些藥物又是引起人類感染的「超級耐藥」菌的典型代表。因此，臨床上 MRSA 感染日益嚴重，可供選擇的抗菌藥物

非常受限，臨床患者治療失敗和死亡率居高不下。近年來甚至又不斷出現對萬古黴素耐藥的 VRSA（萬古黴素耐藥金黃色葡萄球菌）感染，人類即將面臨無藥可用的境況。

【0005】 研究發現，金黃色葡萄球菌釋放的致病因子包括溶血素、殺白血球素、腸毒素、凝固酶等。其中溶血素是金黃色葡萄球菌分泌的重要毒性因子之一，可分為 α -溶血素、 β -溶血素、 γ -溶血素及 δ -溶血素四種類型。 α -溶血素（alpha hemolysis, Hla）是由金黃色葡萄球菌 HLA 基因編碼的分泌型毒素蛋白，在幾乎所有菌株中均有表達，相對其他類型的溶血素，是影響金黃色葡萄球菌致病性的更為關鍵的毒性因子，研究表明，表達 α -溶血素之 HLA 基因缺失的金黃色葡萄球菌感染動物的毒性顯著降低。 α -溶血素的蛋白全長為 319 個胺基酸，相對分子質量為 33KD，以單體的形式分泌。作為穿孔毒素（pore forming toxin）家族成員之一， α -溶血素最為明確的生物學特性是能夠快速裂解宿主紅血球及其他組織細胞，其與宿主細胞上的膽固醇和鞘磷脂結合之後聚集形成一個相對分子質量約為 232KD 的七聚體，然後再通過折疊形成一個直徑約 1.5 奈米之 β 桶狀的跨膜結構，使得細胞內水、離子和其他小分子物質外泄，從而發生溶血或者靶細胞的死亡。此外， α -溶血素還可以引發微血管的平滑肌收縮與抽搐痙攣，從而導致微血管堵塞並且造成局部缺血和組織壞死，在金黃色葡萄球菌引發膿毒症、肺炎、乳腺感染、角膜感染以及嚴重的皮膚感染等疾病的過程中發揮重要作用。同時， α -溶血素還可以破壞感染組織內的白血球，阻礙宿主清除感染的金黃色葡萄球菌。在宿主免疫系統以及抗生素的壓力下，感染部位的金黃色葡萄球菌大量釋放 α -溶血素，進入血液後可激活宿主免疫系統釋放過量的發炎因子，形成膿毒症。

【0006】 面對超級細菌的不斷出現，抗體藥物已成為後抗生素時代的利器。抗體是適應性免疫系統產生的天然蛋白，人體經被動免疫給予抗體藥物，不僅能夠中和毒性因子，同時加強宿主對病原體的免疫應答能力，可以加快清除感染的病原菌。而基於以下原因， α -溶血素顯示了其作為抗感染抗體藥物標靶治療金黃色葡萄球菌感染的潛力：

【0007】 α -溶血素在金黃色葡萄球菌中高度保守，在幾乎所有的金黃色葡萄球菌中均有表達； α -溶血素生物學功能明確，在金黃色葡萄球菌形成宿主感染及膿毒症發生過程中發揮重要作用；哺乳動物細胞內不存在 α -溶血素的同源蛋白，靶向 α -溶血素設計抗體藥物，潛在的脫靶可能性小、毒副反應低。

【0008】 因此， α -溶血素是抗金黃色葡萄球菌感染抗體藥物理想的標靶，有效中和 α -溶血素有利於阻斷金黃色葡萄球菌感染人體、避免嚴重感染後膿毒症的發生並改善臨床感染患者的預後。目前 Aridis 製藥公司以 α -溶血素的標靶研發的全人源抗體 R-301 (Salvecin®) 已經進入第 III 期臨床研究，主要適應症為金黃色葡萄球菌(包括耐甲氧西林金黃色葡萄球菌)引起的重症肺炎；阿斯利康製藥有限公司以 α -溶血素的標靶研發的人源化抗體 MEDI4893 正在開展第 II 期臨床研究，主要適應症為金黃色葡萄球菌(包括耐甲氧西林金黃色葡萄球菌)肺炎的預防和治療。

【0009】 目前，抗生素例如萬古黴素等仍然是治療金黃色葡萄球菌感染的一線藥物，但考慮到抗藥性的持續增加及新型抗生素的研發減緩，本領域仍需要開發新穎、高效的通過直接中和毒素來抗金黃色葡萄球菌的抗體藥物。由於金黃色葡萄球菌 α 溶血素具有溶血活性，因此其單株抗體的製備策略主要包括：以 α 溶血素的類毒素作為免疫原通過融合瘤技術製備；以 α 溶血素為靶蛋白通過篩選體外抗體庫製備等。這些方法難以獲得對強

毒性 α 溶血素具有高親和力、高生物活性的抗 α 溶血素抗體。再生元公司採用了弱毒性 α 溶血素作為免疫原，對於陽性選殖株通過表面等離子共振檢測親和力，篩選效率低、且不能高效獲得生物活性高的抗體。

【發明內容】

【0010】 本發明要解決的技術問題是，改進傳統的抗 α -溶血素的抗體分子製備方法，通過弱毒性免疫解決了 α -溶血素對動物的毒性、通過強毒性篩選確保了抗體對野生型強毒性 α 溶血素的高親和力、通過紅血球裂解抑制篩選從源頭上確保了單抗的生物學活性，提高了抗 α -溶血素治療性單抗的篩選效率。本發明還進一步提供一種抗 α -溶血素的抗體分子，特別是人源化 α -溶血素單株抗體，所述抗體具有與金黃色葡萄球菌 α -溶血素結合並抑制其溶血和損傷組織細胞的能力，可以單獨或者與現有抗菌藥物合用於治療由 α -溶血素或產生 α -溶血素的微生物所導致的感染或感染相關疾病。

【0011】 針對上述技術問題，本發明的目的是提供一種抗體或其功能片段，並基於該抗體或其功能片段，提供其用途。

【0012】 本發明的技術方案如下。

【0013】 一方面，本發明提供一種製備抗 α 溶血素單株抗體的方法，包括以下步驟：

- (1) 採用弱毒性 α 溶血素或不具有毒性的 α 溶血素免疫動物；
- (2) 取脾細胞，製備融合瘤；
- (3) 以強毒性 α 溶血素或野生型 α 溶血素篩選對其具有高親和力的抗體；
- (4) 通過紅血球裂解抑制實驗，選擇具有抑制強毒性 α 溶血素或野生型 α 溶血素裂解紅血球活性的抗體。

【0014】 其中該紅血球裂解抑制實驗包括將抗體（融合瘤上清液）稀釋後與 α 溶血素等體積混合，加入紅血球孵育，離心取上清液，通過 OD450 檢測抗體抑制 α 溶血素裂解紅血球的活性。

【0015】 較佳地，在本發明之製備抗 α 溶血素單株抗體的方法中，該強毒性 α 溶血素或野生型 α 溶血素為金黃色 α 溶血素，較佳具有 SEQ ID NO: 78 所示之胺基酸序列；

該弱毒性 α 溶血素或不具有毒性的 α 溶血素為 H35L α 溶血素，較佳具有 SEQ ID NO: 80 所示之胺基酸序列。

【0016】 較佳地，在本發明所述製備抗 α 溶血素單株抗體的方法中，該強毒性 α 溶血素或野生型 α 溶血素、弱毒性 α 溶血素或不具有毒性的 α 溶血素，係獨立地與純化標記、載體蛋白及／或佐劑分子連接；

該連接包括偶聯、交聯、共軛及／或融合。

【0017】 另一方面，本發明還提供通過前述任一方法製備所獲得的抗 α 溶血素單株抗體，該抗體具有選自由以下所組成之群組的至少一種活性：能夠阻斷 α 溶血素的溶血效應、阻斷 α 溶血素對肺上皮細胞的損傷、降低 MRSA 肺部感染組織載菌量、延長 MRSA 菌血症的生存時間、預防或減輕 α 溶血素膿毒症。

【0018】 本發明之通過前述任一方法製備所獲得的抗 α 溶血素單株抗體，該抗體具有以下結構：

VH-CDR1：選自 SEQ ID NO:1、2、3、12、13、14、22、23、24、34、35、36；

VH-CDR2：選自 SEQ ID NO:4、5、6、15、16、17、25、26、27、28、37、38、39；

VH-CDR3：選自 SEQ ID NO:7、18、29、40；

第5頁，共 40 頁(發明說明書)

VL-CDR1：選自 SEQ ID NO:8、19、30、31、41；

VL-CDR2：選自 SEQ ID NO:9、11、20、32、42；

VL-CDR3：選自 SEQ ID NO:10、21、33、43。

【0019】 另一方面，本發明提供一種抗體或其片段，該抗體或其片段包含重鏈可變區及輕鏈可變區，其中該重鏈可變區(VH)及輕鏈可變區(VL)分別包含選自以下的 CDR 組合 (VH-CDR1、VH-CDR2、VH-CDR3；VL-CDR1、VL-CDR2、VL-CDR3)：

(1) 如 SEQ ID NO: 1 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 4 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 7 所示的 VH-CDR3；如 SEQ ID NO: 8 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 9 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 10 所示的 VL-CDR3；

(2) 如 SEQ ID NO: 2 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 5 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 7 所示的 VH-CDR3；如 SEQ ID NO: 8 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 9 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 10 所示的 VL-CDR3；

(3) 如 SEQ ID NO: 3 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 6 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 7 所示的 VH-CDR3；如 SEQ ID NO: 8 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 9 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 10 所示的 VL-CDR3；

(4) 如 SEQ ID NO: 2 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 6 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 7 所示的 VH-CDR3；如 SEQ ID NO: 8 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 9 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 10 所示的 VL-CDR3；

(5) 如 SEQ ID NO: 2 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 6 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 7 所示的 VH-CDR3；如 SEQ ID NO: 8 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 11 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 10 所示的 VL-CDR3；

(6) 如 SEQ ID NO: 12 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 15 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 18 所示的 VH-CDR3；如 SEQ ID NO: 19 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 20 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 21 所示的 VL-CDR3；

(7) 如 SEQ ID NO: 13 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 16 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 18 所示的 VH-CDR3；如 SEQ ID NO: 19 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 20 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 21 所示的 VL-CDR3；

(8) 如 SEQ ID NO: 14 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 17 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 18 所示的 VH-CDR3；如 SEQ ID NO: 19 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 20 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 21 所示的 VL-CDR3；

(9) 如 SEQ ID NO: 13 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 17 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 18 所示的 VH-CDR3；如 SEQ ID NO: 19 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 20 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 21 所示的 VL-CDR3；

(10) 如 SEQ ID NO: 22 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 25 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 29 所示的 VH-CDR3；如 SEQ ID NO: 30 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 32 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 33 所示的 VL-CDR3；

(11) 如 SEQ ID NO: 23 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 26 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 29 所示的 VH-CDR3；如 SEQ ID NO: 30 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 32 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 33 所示的 VL-CDR3；

(12) 如 SEQ ID NO: 24 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 27 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 29 所示的 VH-CDR3；如 SEQ ID NO: 30 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 32 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 33 所示的 VL-CDR3；

(13) 如 SEQ ID NO: 23 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 27 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 29 所示的 VH-CDR3；如 SEQ ID NO: 30 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 32 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 33 所示的 VL-CDR3；

(14) 如 SEQ ID NO: 23 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 28 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 29 所示的 VH-CDR3；如 SEQ ID NO: 31 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 32 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 33 所示的 VL-CDR3；

(15) 如 SEQ ID NO: 34 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 37 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 40 所示的 VH-CDR3；如 SEQ ID NO: 41 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 42 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 43 所示的 VL-CDR3；

(16) 如 SEQ ID NO: 35 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 38 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 40 所示的 VH-CDR3；如 SEQ ID NO: 41 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 42 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 43 所示的 VL-CDR3；

(17) 如 SEQ ID NO: 36 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 39 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 40 所示的 VH-CDR3；如 SEQ ID NO: 41 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 42 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 43 所示的 VL-CDR3；

(18) 如 SEQ ID NO: 35 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 39 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 40 所示的 VH-CDR3；如 SEQ ID NO: 41 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 42 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 43 所示的 VL-CDR3。

【0020】 較佳地，在本發明提供的抗體或其片段中，重鏈可變區包含：如 SEQ ID NO: 44、SEQ ID NO: 48、SEQ ID NO: 52、SEQ ID NO: 56、SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 64、SEQ ID NO: 68 和 SEQ ID NO: 72 中任一個所示的胺基酸序列、或者與所示的胺基酸序列具有至少 75% 同一性的胺基酸序列；及／或

輕鏈可變區包含：

如 SEQ ID NO: 46、SEQ ID NO: 50、SEQ ID NO: 54、SEQ ID NO: 58、SEQ ID NO: 62、SEQ ID NO: 66、SEQ ID NO: 70、SEQ ID NO: 74 和 SEQ ID NO: 76 中任一個所示的胺基酸序列、或者與所示的胺基酸序列具有至少 75% 同一性的胺基酸序列。

【0021】 根據本發明的具體實施方式，該抗體或其片段包含的重鏈可變區及輕鏈可變區係選自由以下所組成之群組：

(1) 如 SEQ ID NO: 44 所示的胺基酸序列、或與如 SEQ ID NO: 44 所示的胺基酸序列具有至少 75% 同一性的胺基酸序列；以及，如 SEQ ID NO: 46 所示的胺基酸序列、或與如 SEQ ID NO: 46 所示的胺基酸序列具有至少 75% 同一性的胺基酸序列；

(2) 如 SEQ ID NO: 48 所示的胺基酸序列、或與如 SEQ ID NO: 48 所示的胺基酸序列具有至少 75% 同一性的胺基酸序列；以及，如 SEQ ID NO: 50 所示的胺基酸序列、或與如 SEQ ID NO: 50 所示的胺基酸序列具有至少 75% 同一性的胺基酸序列；

(3) 如 SEQ ID NO: 52 所示的胺基酸序列、或與如 SEQ ID NO: 52 所示的胺基酸序列具有至少 75% 同一性的胺基酸序列；以及，如 SEQ ID NO: 54 所示的胺基酸序列、或與如 SEQ ID NO: 54 所示的胺基酸序列具有至少 75% 同一性的胺基酸序列；

(4) 如 SEQ ID NO: 56 所示的胺基酸序列、或與如 SEQ ID NO: 56 所示的胺基酸序列具有至少 75% 同一性的胺基酸序列；以及，如 SEQ ID NO: 58 所示的胺基酸序列、或與如 SEQ ID NO: 58 所示的胺基酸序列具有至少 75% 同一性的胺基酸序列；

(5) 如 SEQ ID NO: 60 所示的胺基酸序列、或與如 SEQ ID NO: 60 所示的胺基酸序列具有至少 75% 同一性的胺基酸序列；以及，如 SEQ ID NO: 62 所示的胺基酸序列、或與如 SEQ ID NO: 62 所示的胺基酸序列具有至少 75% 同一性的胺基酸序列；

(6) 如 SEQ ID NO: 64 所示的胺基酸序列、或與如 SEQ ID NO: 64 所示的胺基酸序列具有至少 75% 同一性的胺基酸序列；以及，如 SEQ ID NO: 66 所示的胺基酸序列、或與如 SEQ ID NO: 66 所示的胺基酸序列具有至少 75% 同一性的胺基酸序列；

(7) 如 SEQ ID NO: 68 所示的胺基酸序列、或與如 SEQ ID NO: 68 所示的胺基酸序列具有至少 75% 同一性的胺基酸序列；以及，如 SEQ ID NO: 70 所示的胺基酸序列、或與如 SEQ ID NO: 70 所示的胺基酸序列具有至少 75% 同一性的胺基酸序列；

(8) 如 SEQ ID NO: 72 所示的胺基酸序列、或與如 SEQ ID NO: 72 所示的胺基酸序列具有至少 75% 同一性的胺基酸序列；以及，如 SEQ ID NO: 74 所示的胺基酸序列、或與如 SEQ ID NO: 74 所示的胺基酸序列具有至少 75% 同一性的胺基酸序列；

(9) 如 SEQ ID NO: 48 所示的胺基酸序列、或與如 SEQ ID NO: 48 所示的胺基酸序列具有至少 75% 同一性的胺基酸序列；以及，如 SEQ ID NO: 76 所示的胺基酸序列、或與如 SEQ ID NO: 76 所示的胺基酸序列具有至少 75% 同一性的胺基酸序列。

【0022】 其中，上述至少 75% 同一性為至少 80%、較佳至少 85%、更佳至少 90%、進一步較佳至少 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或甚至 99% 同一性等 $\geq 75\%$ 的任何百分比的同一性。

【0023】 本發明所提供的抗體或其片段可以為單株抗體、單鏈抗體、單域抗體、雙功能抗體、奈米抗體、完全或部分人源化的抗體或者嵌合抗體等任意形式；或者，該抗體或其片段為半抗體或半抗體的抗原結合片段，例如 scFv、BsFv、dsFv、(dsFv)₂、Fab、Fab'、F(ab')₂ 或 Fv；關於本發明所提供的抗體的片段，較佳地，該片段為抗體的能夠特異性結合抗原金黃色葡萄球菌 α -溶血素的任何片段。

【0024】 或者，本發明的抗體為 IgA、IgD、IgE、IgG 或 IgM，更佳為 IgG1。抗體的片段選自該抗體的 scFv、Fab、F(ab')₂ 或 Fv 片段。

【0025】 較佳地，該抗體或其片段更包含人或鼠的恆定區，較佳包含人或鼠的輕鏈恆定區 (CL) 及／或重鏈恆定區 (CH)；更佳地，該抗體或其片段包含選自 IgG、IgA、IgM、IgD 或 IgE 的重鏈恆定區及／或 κ 或 λ 型輕鏈恆定區。根據本發明的具體實施方式，該抗體為單株抗體，較佳為

鼠源、嵌合或人源化的單株抗體；更佳地，該單株抗體的重鏈恆定區為 IgG1 或 IgG4 亞型，輕鏈恆定區為 κ 型。

【0026】 較佳地，本發明所提供的抗體或其片段包含如 SEQ ID NO: 86 所示的重鏈恆定區及／或如 SEQ ID NO: 87 所示的輕鏈恆定區，或者與所示的重鏈恆定區或輕鏈恆定區具有至少 75% 同一性的胺基酸序列。

【0027】 另一方面，本發明還提供一種核酸分子，其編碼本發明任意抗體或其片段、或者編碼該抗體或其片段中所包含的重鏈 CDR、輕鏈 CDR、重鏈可變區、輕鏈可變區、重鏈或輕鏈。

【0028】 根據本發明的具體實施方式，該核酸分子編碼本發明之抗體或其片段中的重鏈可變區或輕鏈可變區，例如，該核酸分子包含如 SEQ ID NO: 45、SEQ ID NO: 47、SEQ ID NO: 49、SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 53、SEQ ID NO: 55、SEQ ID NO: 57、SEQ ID NO: 59、SEQ ID NO: 61、SEQ ID NO: 63、SEQ ID NO: 65、SEQ ID NO: 67、SEQ ID NO: 69、SEQ ID NO: 71、SEQ ID NO: 73、SEQ ID NO: 75 及 SEQ ID NO: 77 中任一個所示的核苷酸序列。

【0029】 還一方面，本發明提供一種載體，其包含本發明的核酸分子。該載體可以為真核表達載體、原核表達載體、人工染色體及噬菌體載體等。

【0030】 本發明的載體或核酸分子可以用於轉化或轉染宿主細胞或以任何方式進入宿主細胞內，用於保存或表達抗體等目的。因此，另一方面，本發明提供一種宿主細胞，該宿主細胞包含本發明的核酸分子及／或載體，或者該宿主細胞被本發明的核酸分子及／或載體轉化或轉染。宿主細胞可以是任何原核或真核細胞，例如細菌或昆蟲、真菌、植物或動物細胞。

【0031】 基於本發明的公開內容，本發明提供的抗體或其片段、核酸分子、載體及／或宿主細胞可以通過使用本領域已知的任何常規技術方法獲得。例如，關於抗體，可以先由本發明所提供的核酸分子獲得該抗體的重鏈可變區及／或輕鏈可變區，或者獲得該抗體的重鏈及／或輕鏈，然後與該抗體的任選其他結構域組裝成抗體；或者，在允許本發明所提供的宿主細胞表達該抗體的重鏈可變區及／或輕鏈可變區或者該抗體的重鏈及／或輕鏈以組裝成該抗體的情況下，培養所述宿主細胞。任選地，該方法更包括回收所產生之抗體的步驟。

【0032】 本發明所提供的抗體或其片段還可與其他部分結合，例如細胞表面受體、小分子化合物如胺基酸及糖類、小分子聚合物或對本發明之抗體進行修飾的任何其它部分，或者甚至是活性蛋白或多肽，例如抗菌肽或抗生素。因此，另一方面，本發明提供一種共軛物或融合蛋白，其包含本發明所提供的抗體或其片段。例如，該共軛物或融合蛋白可以是包含本發明之抗體或其片段的雙特異性抗體。

【0033】 本發明所提供的抗體或其片段、核酸分子、載體、宿主細胞、共軛物或融合蛋白等可以被包含在藥物組成物中，更特別地被包含在藥物製劑中，從而根據實際需要用於各種目的。因此，在又一方面，本發明更提供一種藥物組成物，該藥物組成物包含本發明之抗體或其片段、核酸分子、載體、宿主細胞、共軛物及／或融合蛋白，以及視需要的藥學上可接受的輔料。

【0034】 出於任何使用目的，本發明更提供一種試劑盒，該試劑盒包括本發明的抗體分子或其片段、核酸分子、載體、宿主細胞、共軛物、融合蛋白及／或藥物組成物。

【0035】 基於與 α -溶血素結合並抑制其溶血及損傷組織細胞的能力，本發明的抗體或其片段可以單獨或者與其他抗菌藥物合用於治療或改善由 α -溶血素或產生 α -溶血素的微生物感染或者由其感染所導致的其他疾病或症狀。因此，本發明更提供上述主題的相關應用。

【0036】 具體而言，再一方面，本發明提供使用本發明之抗體或其片段、核酸分子、載體、宿主細胞、共軛物、融合蛋白及／或藥物組成物在製備藥物中的用途，該藥物用於預防或治療由 α -溶血素或產生 α -溶血素的微生物所導致的感染及併發症。

【0037】 並且，本發明提供使用該抗體或其片段、核酸分子、載體、宿主細胞、共軛物、融合蛋白及／或藥物組成物與其他抗菌藥物或抗 α -溶血素抗體的組合在製備藥物中的用途，該藥物用於預防或治療由 α -溶血素或產生 α -溶血素的微生物所導致的感染及併發症。

【0038】 另外，本發明提供一種預防或治療由 α -溶血素或產生 α -溶血素的微生物所導致的感染及併發症的方法，該方法包括給有此需要的受試者施用該抗體或其片段、核酸分子、載體、宿主細胞、共軛物、融合蛋白及／或藥物組成物，以及任選的抗菌藥物。該任選的抗菌藥物可以是與本發明抗體或其片段、核酸分子、載體、宿主細胞、共軛物、融合蛋白及／或藥物組成物聯合施用的藥物。二者的聯合施用可以採取任意形式進行，包括同時、連續或間隔一定時間進行。

【0039】 在本發明中，產生 α -溶血素的微生物較佳為金黃色葡萄球菌，包括耐甲氧西林金黃色葡萄球菌。

【0040】 在本發明中，由 α -溶血素或產生 α -溶血素的微生物所導致的感染可為選自上呼吸道感染、肺炎、重症肺炎、腹腔感染、皮下及軟組織感染、菌血症及各種臟器的感染中的一種或多種；該併發症可為選自急

性呼吸窘迫綜合征 (ARDS)、膿毒症以及有機體發炎因子升高中的一種或多種。

【0041】 在本發明中，其他抗菌藥物為可用於治療和預防金黃色葡萄球菌、例如耐甲氧西林金黃色葡萄球菌感染的藥物（包括化學藥物、生物製劑和中藥），較佳為抗生素，例如 β -內醯胺類抗生素。抗生素可以為美國感染病學會 (IDSA, Infectious Diseases Society of America) 或者中國中華醫學會頒佈的指南／治療策略中所列的可用於治療耐甲氧西林金黃色葡萄球菌感染的藥物，較佳為萬古黴素、去甲萬古黴素、替考拉寧、利奈唑胺、達托黴素、頭孢吡普、夫西地酸、頭孢洛林。

【0042】 本發明更提供一種診斷由 α -溶血素或產生 α -溶血素的微生物所導致的感染的方法，該方法包括使該抗體或其片段、核酸分子、載體、宿主細胞、共軛物、融合蛋白及／或藥物組成物與來自受試者的樣品相接觸。

【0043】 在本發明中，「受試者」可以是哺乳動物，例如靈長類動物或齧齒類動物，更佳為人。

【0044】 在本發明中，術語「溶血素 α 」和「溶血素 α 毒素」可互換地指由金黃色葡萄球菌分泌的 33kDa 單聚蛋白質，其在宿主細胞膜中寡聚化成七聚結構以形成孔隙，從而導致細胞溶解、炎症及組織損傷。野生型溶血素 α 的胺基酸序列顯示於 SEQ ID NO: 78 中。經修飾的溶血素 α (H35L 突變體) 的胺基酸序列顯示於 SEQ ID NO: 80 中。除非另外指出，否則提及溶血素 α 是指野生型形式。H1a-H35L 是位置 35 的組胺酸已變成亮胺酸的溶血素 α 。這允許毒素在宿主細胞膜上組裝，直到前孔形成步驟，但未形成完全功能孔隙。這使得溶血素 α 是非產毒的。

【0045】 在本發明中，術語「抗體」意在指包含四個多肽鏈（通過二硫鍵相互連接的兩個重（H）鏈和兩個輕（L）鏈）的免疫球蛋白分子（即，「完全抗體分子」），以及其多聚體（例如 IgM）或其抗原結合片段。各重鏈包含重鏈可變區（「HCVR」或「VH」）和重鏈恆定區（包含結構域 CH1、CH2 和 CH3）。各輕鏈包含輕鏈可變區（「LCVR」或「VL」）和輕鏈恆定區（CL）。VH 和 VL 區可以進一步再分成稱為互補決定區（CDR）的高變異性區域，其間散佈有稱為構架區（FR）的較保守的區域。各 VH 和 VL 由三個 CDR 和四個 FR 組成，自胺基端至羧基端按以下順序排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。在本發明的某些實施例中，抗體（或其抗原結合片段）的 FR 可以與人類生殖系序列相同，或可以經天然或人造修飾。胺基酸共同序列可以基於兩個或更多個 CDR 的並行分析來定義。

【0046】 一個或多個 CDR 殘基的取代或一個或多個 CDR 的省略也是可能的。科學文獻中已描述關於結合可以省掉一或兩個 CDR 的抗體。Padlan 等人（《美國實驗生物學會聯合會會志（FASEB J.）》1995，9：133-139）基於所公開的晶體結構分析了抗體與其抗原之間的接觸區域，且得出以下結論：僅約五分之一到三分之一的 CDR 殘基實際上接觸抗原。Padlan 還發現一或兩個 CDR 中沒有胺基酸與抗原接觸的許多抗體（還參見 Vajdos 等人 2002《分子生物學雜誌（J.Mol.Biol.）》320：415-428）。不接觸抗原的 CDR 殘基可基於先前研究（例如 CDRH2 中的殘基 H60-H65 常常是不需要的）通過分子模型化及／或根據經驗由位於喬西亞（Chothia）CDR 外部的卡巴特（Kabat）CDR 的區域來識別。如果省去 CDR 或其殘基，那麼其通常用另一人類抗體序列或這類序列的共同序列中佔據對應位

置的胺基酸取代。CDR 內用於取代的位置和用於取代的胺基酸也可以根據經驗來選擇。經驗取代可以是保守或非保守取代。

【0047】 術語「特異性結合」或「特異性結合於」等類似術語意指抗體或其抗原結合片段與抗原形成在生理條件下相對穩定的複合物。特異性結合的特徵可以是平衡解離常數是至少約 $1 \times 10^{-6} \text{M}$ 或更小(例如較小的 KD 表示較緊密的結合)。確定兩個分子是否特異性結合的方法是所屬領域中眾所周知的，且包括例如平衡滲析、表面等離子共振和類似方法。如本文所描述，已通過表面等離子共振(例如 BIACORE™)識別特異性結合於溶血素 α 的抗體。此外，如本文所用，結合於溶血素 α 中的一個結構域和一種或多種額外抗原的多特異性抗體或結合於溶血素 α 的兩個不同區的雙特異性抗體仍然被視為「特異性結合」的抗體。

【0048】 術語「高親和力」抗體是指如通過表面等離子共振(例如 BIACORE™)或溶液-親和力 ELISA 所測量之對溶血素 α 具有以 KD 表示至少 10^{-7}M ；較佳 10^{-8}M ；更佳 10^{-9}M ，甚至更佳 10^{-10}M ，甚至更佳 10^{-11}M 之結合親和力的 mAb。

【0049】 術語「緩慢解離速率」、「K 解離」或「kd」意在描述如通過表面等離子共振(例如 BIACORE™)所測定以 $1 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$ 或更小、較佳 $1 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 或更小的速率常數自溶血素 α 解離的抗體。

【0050】 如本文所用，術語抗體的「抗原結合部分」、抗體的「抗原結合片段」和類似術語，包括特異性結合抗原以形成複合物的任何天然存在、酶促可獲得、合成或基因工程改造的多肽或糖蛋白。如本文所用，術語抗體的「抗原結合片段」或「抗體片段」是指抗體中保留結合於溶血素 α 之能力的一個或多個片段。

【0051】 在具體實施例中，本發明的抗體或抗體片段可以結合於治療劑部分（「免疫結合物」），如抗生素、第二抗溶血素 A 抗體或針對如 IL-1、IL-6 或 TGF- β 之細胞因子的抗體或適合用於治療疾病或病狀的任何其它治療劑部分，該疾病或病狀包括金黃色葡萄球菌感染、皮膚和軟組織感染（包括膿腫）、手術部位感染、人造關節感染、菌血症、敗血症、膿毒性關節炎、腦膜炎、骨髓炎、心內膜炎、肺炎、中毒性休克綜合症、乳房炎、及癩病和癰病（癰）。

【0052】 如本文所用，「經分離的抗體」意在指基本上不含具有不同抗原特異性之其它抗體（Ab）的抗體（例如特異性結合溶血素 A 的經分離的抗體或其片段基本上不含特異性結合不是溶血素 A 之抗原的 Ab）。

【0053】 如本文所用，術語「KD」意在指具體抗體-抗原相互作用的平衡解離常數。

【0054】 相對於現有技術，本發明通過大腸桿菌原核表達獲得金黃色葡萄球菌 α -溶血素（ α -Toxin）以及不具有毒性的金黃色葡萄球菌 α -溶血素突變蛋白（ α -Toxin H35L）。利用 α -溶血素 H35L 成功免疫小鼠後取脾細胞，利用融合瘤技術建立抗體庫，篩選獲得與 α -溶血素（ α -Toxin）具有高親和力並且具有生物學活性的 α -溶血素單株抗體，進一步將其人源化後獲得先導抗體分子（IgG1 亞型）。

【0055】 具體而言，本發明利用 α -溶血素 H35L 成功免疫小鼠後取脾細胞，利用融合瘤技術建立抗體庫，篩選獲得與 α -溶血素（ α -Toxin）具有高親和力並且具有生物學活性的 α -溶血素單株抗體。共獲得 16 個先導抗體分子，不僅和 α -溶血素具有高親和力，而且具有阻斷 α -溶血素溶血的活性。特別是在抗原選擇與抗體篩選上，本發明採取了弱毒性免疫、強毒性篩選的策略。

【0056】 基於鼠源先導抗體分子進行重組表達人鼠親和抗體及人源化抗體，最終獲得具有與鼠源抗體相似生物學活性的人源化抗體分子。

【0057】 體外藥效學研究表明，本發明的人源化抗體能夠成劑量依賴性阻斷 α -溶血素對兔紅血球的溶血效應、阻斷 α -溶血素對肺上皮細胞的損傷作用。此外，本發明還利用小鼠 α -溶血素膿毒症模型、MRSA 菌血症模型和 MRSA 肺部感染模型對先導抗體分子進行了動物體內藥效學評價。研究結果表明，本發明的人源化抗體對小鼠 α -溶血素膿毒症模型具有顯著的保護作用；能夠顯著延長小鼠 MRSA 菌血症模型的生存時間；能夠顯著降低小鼠 MRSA 肺部感染模型組織載菌量。而且，本發明的人源化抗體與常用抗菌藥萬古黴素、利奈唑胺等的聯合應用，在小鼠 α -溶血素膿毒症模型、MRSA 菌血症模型和 MRSA 肺部感染模型中表現出顯著的協同作用。

【0058】 並且，對本發明的抗體按照 20 毫克／公斤劑量在食蟹猴體內開展了單次給藥的藥代動力學研究（N=3），結果表明基本的藥代動力學參數符合成藥性標準（表 1），體內消除半衰期（ $T_{1/2}$ ）為 137 ± 36.9 小時，血漿清除率（CL）為 0.501 ± 0.222 毫升／小時／公斤。此外，在小鼠體內開展了本發明的抗體急性毒性試驗研究（N=10），結果表明最高 24 小時內給予 125 毫克／公斤劑量時，未出現小鼠死亡，連續觀察 14 天未見動物出現任何不適現象，處死動物取主要臟器（心、肝、脾、肺、腎、腦）大體觀察未見異常；食蟹猴單次給藥本發明的抗體 10 毫克／公斤劑量，未出現動物死亡，連續觀察 28 天未見動物出現任何不適現象。急性毒性試驗研究表明本發明的抗體安全性好。

【0059】 本發明的抗體可以有效中和毒素，阻斷其對患者組織細胞的破壞，同時提高患者免疫力，由此減輕臨床金黃色葡萄球菌感染組織損傷、促進患者體內感染菌更快清除、預防或減輕膿毒症。在該抗體的作用下，

患者可以更快地由靜脈輸液治療轉為口服治療、治療療程縮短；同時，本發明的抗體具有更好的臨床療效和耐受性，是對現有抗生素療法的有利補充。

【圖式簡單說明】

【0060】

以下，結合附圖來詳細說明本發明的實施方案，其中：

圖 1 顯示出融合 His 標記的金黃色葡萄球菌 α -溶血素 (α -Toxin) 蛋白的重組表達質體的構建。

圖 2 顯示出融合 His 標記的金黃色葡萄球菌突變 α -溶血素 (H35L α -Toxin) 蛋白的重組表達質體的構建。

圖 3 顯示出重組表達的金黃色葡萄球菌突變 α -溶血素及其突變體 H35L α -溶血素的 10% SDS-PAGE 電泳結果，其中圖 3A 為 α -溶血素，圖 3B 為 H35L α -溶血素，上樣量為 10 微克。

圖 4 顯示出金黃色葡萄球菌 α -溶血素及其突變體 (H35L α -Toxin) 對綿羊血平板的溶血作用。

圖 5 顯示出金黃色葡萄球菌 α -溶血素及其突變體 (H35L α -Toxin) 對兔血的溶血作用，其中圖 5A 為 α -溶血素，圖 5B 為 H35L α -溶血素。

圖 6 顯示出融合瘤細胞株篩選過程中的檢測結果，其中圖 6A 為不同細胞株上清液中抗體與 α -溶血素結合的 ELISA 檢測結果，圖 6B 分別為不同細胞株上清液中抗體對 α -溶血素的抑制結果。

圖 7 顯示出本發明的抗體與 α -溶血素結合的 ELISA 檢測結果，其中圖 7A 至圖 7D 分別顯示出篩選到的抗體 78D4、16H4、78F4 和 98G9 對 α -溶血素的結合。

圖 8 顯示出本發明的抗體 α -溶血素的 Octect 結合和解離曲線，其中圖 8A 至圖 8D 分別顯示出篩選到的 78D4、16H4、78F4 和 98G9 人源化版本抗體對 α -溶血素的結合。

圖 9 顯示出本發明的抗體抗 α -溶血素溶血活性的作用，其中圖 9A 至 9C 分別顯示出不同抗體量時的結果。

圖 10 顯示出本發明的抗體在 α -溶血素導致的膿毒症動物模型中的治療作用。

圖 11 顯示出本發明的抗體在耐甲氧西林金黃色葡萄球菌所導致的菌血症動物模型中的治療作用。

圖 12 顯示出本發明的抗體在耐甲氧西林金黃色葡萄球菌的肺炎動物模型中的治療作用。

圖 13 顯示出本發明的抗體在食蟹猴體內單次給藥後的藥代動力學研究結果。

【實施方式】

【0061】 以下參照具體的實施例來說明本發明。本領域技術人員能夠理解，這些實施例僅用於說明本發明，其不以任何方式限制本發明的範圍。

【0062】 下述實施例中的實驗方法，如無特殊說明，均為常規方法。下述實施例中所用的藥材原料、試劑材料等，如無特殊說明，均為市售購買產品。

【0063】 本文中採用已知抗體作為對照，其中：

Aridis 製藥公司的全人源抗體 R-301 (Salvecin®)，簡稱為 AR (參見 US9249215B2)，重鏈可變區示於 SEQ ID NO: 82，輕鏈可變區示於 SEQ ID NO: 83。

Astrazeneca 製藥公司的人源化抗體 MEDI4893，簡稱為 AZ（參見 US20140072577A1），重鏈可變區示於 SEQ ID NO: 84，輕鏈可變區示於 SEQ ID NO: 85。

【0064】 本發明提供的抗體具有如 SEQ ID NO: 86 所示的重鏈恆定區和 SEQ ID NO: 87 所示的輕鏈恆定區。

【0065】 實施例 1：融合 His 標記的金黃色葡萄球菌 α -溶血素（ α -Toxin）的重組表達

【0066】 以金黃色葡萄球菌 α -溶血素胺基酸序列為目的序列，人工合成相應的鹼基序列，並利用酶切位點 NdeI 和 XhoI 將其選殖至含 His 標記的 Pet-21a 質體中。其中該金黃色葡萄球菌 α -溶血素胺基酸序列如 SEQ ID NO: 78 所示，相應的鹼基序列如 SEQ ID NO: 79 所示，重組質體的構建見圖 1。

【0067】 將獲得的重組質體轉化至感受態細胞 BL21(DE3) pLysS 中，於次日挑取單菌落接種至含 100 微克／毫升之胺苄西林的 LB 液體培養基中，37°C 振盪培養過夜。過夜培養的菌液按 1:100 體積比接種至含 100 微克／毫升之胺苄西林的 LB 液體培養基中，以 200rpm 於 37°C 振盪培養至 OD₆₀₀ 約為 0.6~0.8，向菌液中加入 IPTG 至終濃度為 0.1mM，於 16°C 誘導 16-18 小時。取誘導後菌液，以 8,000rpm 離心 3 分鐘收集菌體，於 -80°C 保存。

【0068】 實施例 2：融合 His 標記的金黃色葡萄球菌 α -溶血素突變體（H35L α -Toxin）的重組表達

【0069】 基於金黃色葡萄球菌 α -溶血素胺基酸序列，將 35 位組胺酸（His）突變為亮胺酸（Leu），得到突變後的胺基酸序列，人工合成相應的鹼基序列，並利用酶切位點 NdeI 和 XhoI 將其選殖至含 His 標記的 Pet-

21a 質體中。其中該金黃色葡萄球菌突變 α -溶血素 (H35L α -Toxin) 胺基酸序列如 SEQ ID NO: 80 所示 (H35L 在該序列中為第 36 位)，相應的鹼基序列如 SEQ ID NO: 81 所示，重組質體的構建見圖 2。

【0070】 將獲得的重組質體轉化至感受態細胞 BL21(DE3) pLysS 中，於次日挑取單菌落接種至含 100 微克／毫升之胺苄西林的 LB 液體培養基中，37°C 振盪培養過夜。過夜培養的菌液按 1:100 體積比接種至含 100 微克／毫升之胺苄西林的 LB 液體培養基中，以 200rpm 於 37°C 振盪培養至 OD₆₀₀ 約為 0.6~0.8，向該菌液加入 IPTG 至終濃度為 0.25mM，於 25°C 誘導 4.5 小時。取誘導後菌液，以 8,000rpm 離心 3 分鐘收集菌體，於 -80°C 保存。

【0071】 實施例 3：金黃色葡萄球菌 α -溶血素 (α -Toxin) 及其突變體 (H35L α -toxin) 的純化

【0072】 將誘導表達金黃色葡萄球菌 α -溶血素及其突變體的大腸桿菌分別用超聲破碎儀破碎，180 瓦 (W) 工作 3 秒間歇 3 秒，時間 7-9 分鐘；以 13,000 rpm 離心 30 分鐘，收集上清液，用 0.22 μ mL 濾器過濾除菌。

【0073】 室溫下將鎳 (Ni) 柱與經過濾的上清液於旋轉混合儀上混合 1 小時，將 Ni 柱裝載到填料柱中。用 5 倍柱床體積的 BD 液 (含咪唑濃度 30mM) 洗脫與 Ni 柱非特異性結合的蛋白，洗至蛋白顯色液不變色，然後用 5 倍柱床體積的 BB 液 (含咪唑濃度 300mM) 洗脫目的蛋白。然後使用 10KD 的濃縮管將含目的蛋白的洗脫液濃縮置換，溶劑為 PBS。所得到之蛋白的電泳結果見圖 3。

【0074】 實施例 4：金黃色葡萄球菌 α -溶血素 (α -Toxin) 及其突變體 (H35L α -toxin) 生物學活性檢測 (體外溶血實驗及小鼠體內毒性作用)

【0075】 分別滴加 10 微升不同濃度(5 微克／毫升, 0.5 微克／毫升, 0.05 微克／毫升)的金黃色葡萄球菌 α -溶血素及其突變體至綿羊血平板(上海科瑪嘉微生物技術有限公司)表面, 並將血平板置於 37°C 培養箱中孵育 24h, 滴加 α -溶血素周圍可見明顯的溶血環, 並且溶血環直徑大小與其濃度呈相關性; 而 α -溶血素突變體周圍未見溶血環。實驗結果見圖 4。

【0076】 向 96 孔板中每孔加入 5%兔紅血球 75 微升 (Bio-channel Biotechnology) 和不同品質的金黃色葡萄球菌 α -溶血素或其突變體, 並加入 PBS 緩衝液至終體積 150 微升。37°C 培養箱中孵育 1 小時, 將 96 孔板以 3000 rpm 離心 3 分鐘。取 100 微升上清液通過用酶標儀檢 405 奈米處吸光度值 (OD₄₀₅) 評價其溶血活性。結果表明 α -溶血素對兔紅血球的溶血活性呈劑量依賴性, 而 α -溶血素突變體沒有溶血活性。實驗結果見圖 5。

【0077】 通過尾靜脈注射給予 C57 小鼠不同劑量的金黃色葡萄球菌 α -溶血素或其突變體, 發現按照實施例 1、實施例 2 和實施例 3 描述的方法重組表達的金黃色葡萄球菌 α -溶血素對 C57 小鼠的最低致死劑量為 3 微克／隻; 最高注射 α -溶血素突變體 200 微克／隻, 小鼠未發生任何不適反應。

【0078】 **實施例 5:** 金黃色葡萄球菌 α -溶血素突變體(H35L α -Toxin) 對 C57 小鼠的毒性作用

【0079】 將 α -溶血素或 α -溶血素突變體用 PBS 稀釋至不同濃度, 尾靜脈注射 C57 小鼠。比較二者對 C57 小鼠的毒性作用, 以選擇出適合後續免疫動物之免疫原及其用量。結果見表 1。

【0080】 表 1. 不同劑量的 α -溶血素和 α -溶血素突變體對小鼠的毒性作用

蛋白	劑量	小鼠狀態
----	----	------

第24頁, 共 40 頁(發明說明書)

野生型 α -溶血素	50 微克／隻小鼠（2.5 毫克／公斤）	瞬間死亡
	10 微克／隻小鼠（0.5 毫克／公斤）	瞬間死亡
	3 微克／隻小鼠（0.15 毫克／公斤）	30 分鐘內死亡
	1 微克／隻小鼠（0.05 毫克／公斤）	出現顫抖、煩躁等不適反應，存活，16 小時（過夜）後恢復正常
	0.1 微克／隻小鼠（0.005 毫克／公斤）	未出現明顯不適反應
H35L α -溶血素	200 微克／隻小鼠（10 毫克／公斤）	未出現明顯不適反應
無關蛋白 BSA	200 微克／隻小鼠（10 毫克／公斤）	未出現明顯不適反應

【0081】 **實施例 6**: 金黃色葡萄球菌 α -溶血素突變體(H35L α -Toxin) 對 Balb/c 小鼠的免疫

【0082】 參考 Antibodies a Laboratory Manual, Second Edition (Edward A. Greenfield 2012)，以 14 天為間隔共計 42 天的過程免疫 8 週齡 Balb/c 小鼠。

【0083】 將金黃色葡萄球菌 α -溶血素突變體在完全或不完全弗氏佐劑中乳化，將其以單側的方式注射於小鼠頸背部、尾根部、腹股溝 3 處皮下組織和腹膜腔內。在免疫第 35 天尾靜脈採血，用 ELISA 方法檢測抗體力價後，取免疫小鼠脾細胞與骨髓瘤細胞融合。

【0084】 **實施例 7**: 融合瘤細胞株的篩選、鑒定及抗體序列測定

【0085】 取金黃色葡萄球菌 α -溶血素突變體 (H35L α -Toxin) 免疫的 Balb/c 小鼠的脾臟細胞，與骨髓瘤細胞 P3X63Ag8.653 使用 PEG 或者

電融合方法進行融合。將融合後的融合瘤細胞接種於 30 塊 384 孔板中，24 小時後加入含 HAT 培養基和含 HT 培養基，篩選融合瘤細胞。於 384 孔板中培養 10-14 天後，取細胞上清液與 α -溶血素進行 ELISA 實驗，篩選能夠分泌和 α -溶血素特異性結合之抗體的融合瘤母克隆（見圖 6A）。隨後，按 ELISA OD 值從高到低排序，每塊板挑選了 94 個孔轉至 96 孔板培養，（其中第 30 號板 ELISA 檢測陽性較差一些，未選孔轉板），共轉板 29 塊 96 孔板。

【0086】 生理條件下， α -溶血素的存在會導致紅血球的裂解，裂解物的釋放會導致溶液上清液顏色發生變化。而細胞分泌上清液中的抗 α -溶血素抗體可以抑制 α -溶血素對紅血球的裂解。通過檢測上清液吸光值，可以檢測 α -溶血素對細胞的裂解程度，以及抗體對 α -溶血素的抑制。

【0087】 對轉板後的 96 孔板培養上清液進行溶血實驗檢測，步驟如下：將野生型- α -溶血素稀釋為 5 微克／毫升濃度母液，取 25 微升與等體積細胞培養上清液混合後，加入至含 5% 兔紅血球（PBS 稀釋至 75 微升）之 96 孔板中，放置於 37°C 培養箱中孵育 1 小時。將 96 孔板以離心機離心 3000rpm，3 分鐘。取 75 微升上清液加入到新的 96 孔板中，用酶標儀測 OD405 和 OD450 吸光度值。部分結果見圖 6B。

【0088】 將篩選到的分泌抗 α -溶血素抗體的融合瘤母克隆採用有限稀釋法加入鋪有飼養細胞的 96 孔板中，第 2-3 天後，於顯微鏡下觀察並標記單株細胞，第 7 天後通過 ELISA 實驗篩選能夠分泌抗 α -溶血素單株抗體的單株融合瘤細胞。

【0089】 將分泌抗 α -溶血素單株抗體的單株融合瘤細胞擴大培養後，按照 RNAfast200 試劑盒（上海飛捷生物技術有限公司）之說明書步驟提取細胞總 RNA；利用 5×PrimeScript RT Master Mix（Takara）將融合瘤

細胞總 RNA 反轉錄成 cDNA；使用退化性引子 (Anke Krebber.1997) 和 Extaq PCR 試劑 (Takara) 擴增抗體輕鏈可變區 IgVL(κ)和重鏈可變區 V_H 的序列。利用 PCR clean-up Gel extraction 試劑盒 (Macherey-Nagel 公司) 純化 PCR 擴增產物；按照 pClone007 Simple Vector Kit 試劑盒 (擎科生物科技有限公司) 之說明書將擴增 PCR 產物連接至 T 載體並轉化大腸桿菌感受態細胞，菌株擴增、抽提質體後進行 DNA 測序獲得單株抗體可變區序列。

【0090】 獲取鼠源抗體可變區序列並分析如下：

> 98G9 鼠源抗體

重鏈可變區：

DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSAASGFTFSTFGMHWVRQAPEKGLE
WVAYISGGSSSTIYYADTVKGRFTISRDNPKNTLFLQMTSLRSEDAM
YYCASGYPYGLDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 44)

輕鏈可變區：

DIDMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINWYLSWFQQKPGKSPKTL
IYRGNRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSEYEDMGIYYCLQYDEFP
FTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 46)

按照不同方法，對98G9鼠源抗體的重鏈和輕鏈CDR進行定義，見表 2。

表 2. 98G9 鼠源抗體的 CDR 序列

方法	重鏈 CDR1	重鏈 CDR2	重鏈 CDR3
喬西亞 (Chothia)	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 7
抗原結合分 子 (AbM)	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 7

卡巴特 (Kabat)	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 7
組合	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 7
方法	輕鏈 CDR1	輕鏈 CDR2	輕鏈 CDR3
喬西亞	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10
抗原結合分子	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10
卡巴特	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10
組合	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10

> 78F4 鼠源抗體

重鏈可變區：

QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYSFTSYWMNWVKQRPGQGL
EWIGMIHPSDSETRLSQKFKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSPTSEDSA
VYYCTRFDWDAMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 52)

輕鏈可變區：

DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIFSYLAWYQQKQKGKSPQLL
VYNTRSLAEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGTYCYCQHHYGTP
WTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 54)

按照不同方法，對78F4鼠源抗體的重鏈和輕鏈CDR進行定義，見表3。

表 3. 78F4 鼠源抗體的 CDR 序列

方法	重鏈 CDR1	重鏈 CDR2	重鏈 CDR3
喬西亞	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 18
抗原結合分子	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 18
卡巴特	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18
組合	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18

方法	輕鏈 CDR1	輕鏈 CDR2	輕鏈 CDR3
喬西亞	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21
抗原結 合分子	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21
卡巴特	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21
組合	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21

> 78D4 鼠源抗體

重鏈可變區：

EVHLQQSGPELMKPGASVKISCKTSGYTFSEYTMHWVKQSHGKSLE
WIGSINPNNGGTTYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAV
YNCARTRDYDNDGGLFAYWGQGLVTVSA (SEQ ID NO: 60)

輕鏈可變區：

DVQITQSPSYLAASPGETITINCRASKNISKYLAWYQEKPGKTNKLLI
YSGSTLQSGIPSRFSGNRSGTDFTLTSSLEPEDFAMYCYCQQHYEYPFT
FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 62)

按照不同方法，對78D4鼠源抗體的重鏈和輕鏈CDR進行定義，見表
4。

表 4. 78D4 鼠源抗體的 CDR 序列

方法	重鏈 CDR1	重鏈 CDR2	重鏈 CDR3
喬西亞	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 29
抗原結 合分子	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 29
卡巴特	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 29
組合	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 29
方法	輕鏈 CDR1	輕鏈 CDR2	輕鏈 CDR3
喬西亞	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 32	SEQ ID NO: 33

抗原結 合分子	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 32	SEQ ID NO: 33
卡巴特	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 32	SEQ ID NO: 33
組合	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 32	SEQ ID NO: 33

> 16H4 鼠源抗體

重鏈可變區：

EVQLQQSGAELVKPGASVTL SCTVSGFNKDTYMHVVKQRPEQGLE
WIGKIDPASGNTKYDPQFQGGKATITADTSSNTAYLHLSLTSEDSAVY
FCASPYGNDYAMNYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 68)

輕鏈可變區：

DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASEKIYSFLAWYQQKQEKSPQLLV
YNAETLAEGVPSRFSGTGSGIQFSLKIISLQPEDFGIYYCQHHTGTPYT
FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 70)

按照不同方法，對16H4鼠源抗體的重鏈和輕鏈CDR進行定義，見表
5。

表 5. 16H4 鼠源抗體的 CDR 序列

方法	重鏈 CDR1	重鏈 CDR2	重鏈 CDR3
喬西亞	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 37	SEQ ID NO: 40
抗原結 合分子	SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 38	SEQ ID NO: 40
卡巴特	SEQ ID NO: 36	SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 40
組合	SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 40
方法	輕鏈 CDR1	輕鏈 CDR2	輕鏈 CDR3
喬西亞	SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 43
抗原結 合分子	SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 43
卡巴特	SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 43

組合	SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 43
----	---------------	---------------	---------------

【0091】 **實施例 8**：本發明抗體與 α -溶血素 (α -Toxin) 的結合

【0092】 將 α -溶血素用 PBS 緩衝液稀釋至 1 微克／毫升，每孔 100 微升包被於 96 孔板 (Microwell 96F 167008, Thermo) 4°C 孵育過夜；次日取出 96 孔板，用 PBST (含 0.5% PBS) 洗板，每次浸潤 1 分鐘後徹底甩乾殘餘水分。樣品孔中分別加入 200 微升的含 5% BSA PBST，置於 37°C 封閉 1 小時；然後用 PBST 洗板，並甩乾孔中水分。

【0093】 分別向 96 孔板中加入倍比稀釋之不同濃度的重組表達的抗 α -溶血素單株抗體 100 微升 (抗體濃度參見圖 7 橫坐標)，4°C 孵育過夜。取出 96 孔板後用 PBST 洗板，然後每孔加入抗小鼠 IgG 二抗 (IH-0031, 北京鼎國昌盛生物技術) 100 微升，並置於 37°C 孵育 1 小時。再用 PBST 洗 5 次，每孔加入 100 微升受質溶液 (Substrate Solution, Invitrogen)，於 37°C 孵育 10 分鐘；每孔加入 2N 硫酸 50 微升終止反應後於酶標儀 (Multiskcin FC, Thermo) 450 奈米波長處檢測吸光度。

【0094】 結果見圖 7。

【0095】 **實施例 9**：本發明嵌合抗體和人源化抗體的獲得

【0096】 首先將鼠源抗體的完整輕、重鏈可變區和人輕、重鏈恆定區組合，得到嵌合抗體形式作為對照。得到的嵌合抗體命名為「鼠源抗體簡稱-xi」。

【0097】 在對鼠源抗體重鏈序列進行綜合分析，確定抗體與抗原結合的抗原互補決定簇 (CDR) 區域及支撐抗體保守三維構象的框架區 (framework) 後，通過分析搜索已知人源抗體序列，選擇與鼠源抗體最為相似接近的人源抗體重鏈序列，如 IGHV1-3*01，選擇其抗體框架區序列

作為範本。將鼠源抗體重鏈 CDR 嵌入到人源抗體框架區，生成人源化抗體重鏈序列（重鏈版本 0）。隨後，對可能參與抗原抗體結合的鼠源框架區個別胺基酸位點進行回復，生成人源化抗體重鏈序列（版本 1，2，3……）。同樣過程，生成人源化抗體輕鏈序列（版本 0，1，2……）。將設計合成的人源化抗體輕重鏈共轉染 293 細胞，重組表達人源化抗體（版本命名方式例如：重鏈版本 0+輕鏈版本 0 共表達，即為 H0L0，可進一步縮寫為 00 版本）。實驗證明，純化後的人源化抗體與鼠源母本抗體表現出一致的特異性結合 α -溶血素蛋白活性。

【0098】 採用 Octect 儀器對最終獲得的人源化抗體版本和嵌合抗體 xi 版本做抗原結合力的對比，圖 8 為部分抗體的測定結果。由抗體與抗原結合的結合和解離階段的曲線看，特定人源化抗體版本在抗原抗體的結合、解離階段表現出和對照抗體（包括本發明的嵌合抗體或 AZ、AR 抗體）類似或更佳的性質。

【0099】 篩選得到具有以下人源化抗體。

> 人源化抗體 **98G9-02** (98G9-H0L2)

重鏈可變區 (H0) :

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTFGMHWVRQAPGKGLE
WVSYISGGSSSTIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAV
YYCASGYPYGLDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 48)

輕鏈可變區 (L2) :

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINWYLSWFQQKPGKAPKTL
IYRGNRLVDGVPSRFSGSGSGQDYTFTISLQPEDMATYYCLQYDEFP
FTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 76)

> 人源化抗體 **98G9-03** (98G9-H0L3)

重鏈可變區 (H0) :

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTFGMHWVRQAPGKGLE
WVSYISGGSSSTIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAV
YYCASGYPYGLDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 48)

輕鏈可變區 (L3) :

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINWYLSWFQQKPGKAPKTL
IYRGNRLVEGVPSRFSGSGSGQDYTFTISLQPEDMATYYCLQYDEFP
FTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 50)

> 人源化抗體 **78F4-00** (78F4-H0L0)

重鏈可變區 (H0) :

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTSYWMNWVRQAPGQGL
EWMGMIHPSDSETRLSQKFKDRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTA
VYYCARFDWDRAMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 56)

輕鏈可變區 (L0) :

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIFSYLAWYQQKPGKAPKLLI
YNTRSLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHGYGTPW
TFGQGKLEIK (SEQ ID NO: 58)

> 人源化抗體 **78D4-33** (78D4-H3L3)

重鏈可變區 (H3) :

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYTFSEYTMHWVRQAPGQRL
EWMGSINPNQGGTTYNQKFKGRVTITVDKSASTAYMESSLRSEDTA
VYYCARTRDYDNDGGLFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 64)

輕鏈可變區 (L3) :

DVQITQSPSFLSASVGDRVTITCRASKNILKYLAWYQQKPGKAPKLLI
 YSGSTLQSGVPSRFSRSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQHYEYPFT
 FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 66)

> 人源化抗體 **16H4-11** (16H4-H1L1)

重鏈可變區 (H1) :

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNKDTYMHVWVQQAPGKGLE
 WMGKIDPASGNTKYDPQFQGRVTITADTSTNTAYMELSSLRSEDVAV
 YYCATPYGNDYAMNYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 72)

輕鏈可變區 (L1) :

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEKIYSFLAWYQQKPGKAPKLLL
 YNAETLAEGVPSRFSGSGIDFTLTISLQPEDFATYYCQHGYGTPY
 TFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 74)

人源化抗體的重鏈和輕鏈 CDR 見表 6。

表 6. 人源化抗體 CDR 序列

98G9 H0L2	重鏈 CDR1	重鏈 CDR2	重鏈 CDR3
	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 7
	輕鏈 CDR1	輕鏈 CDR2	輕鏈 CDR3
	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10
98G9 H0L3	重鏈 CDR1	重鏈 CDR2	重鏈 CDR3
	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 7
	輕鏈 CDR1	輕鏈 CDR2	輕鏈 CDR3
	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 10
78F4 H0L0	重鏈 CDR1	重鏈 CDR2	重鏈 CDR3
	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18
	輕鏈 CDR1	輕鏈 CDR2	輕鏈 CDR3
	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21
	重鏈 CDR1	重鏈 CDR2	重鏈 CDR3

78D4	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 29
H3L3	輕鏈 CDR1	輕鏈 CDR2	輕鏈 CDR3
	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 32	SEQ ID NO: 33
16H4	重鏈 CDR1	重鏈 CDR2	重鏈 CDR3
H1L1	SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 40
	輕鏈 CDR1	輕鏈 CDR2	輕鏈 CDR3
	SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 43

【0100】 實施例 10：本發明抗體抗 α -溶血素 (α -Toxin) 的溶血活性的檢測

【0101】 向 96 孔板中每孔加入 5% 兔紅血球 75 微升 (Bio-channel Biotechnology)、12.5 奈克之金黃色葡萄球菌 α -溶血素和不同品質的抗 α -溶血素抗體 (12.5 奈克、25 奈克、50 奈克)，並加入 PBS 緩衝液至終體積 150 微升。37°C 培養箱中孵育 1 小時，將 96 孔板以 3000 rpm 離心 3 分鐘。取 100 微升上清液，並通過用酶標儀檢測 405 奈米處吸光度值(OD₄₀₅) 評價其溶血活性。

【0102】 實驗結果表明，本發明的嵌合抗體和人源化抗體具有明顯的抗 α -溶血素溶血活性，並且具有劑量依賴性，部分抗體活性與對照抗體 AR 和 AZ 相當。結果見圖 9。

【0103】 實施例 11：本發明抗體與 α -溶血素 (α -Toxin) 的結合動力學 (K_{on} , K_{off}) 和親和力常數 K_D 的檢測

【0104】 採用 GE 公司 BIAcore 儀器 S200 測定抗體抗原相互作用力。

【0105】 參考 GE 公司人類抗體捕捉套組 (Human antibody capture kit) 商品試劑盒 (貨號 BR-1008-39, Lot10261753) 操作說明，首先在傳感晶片 CM5 分析通道和對照樣品通道都飽和偶聯最大量之抗人 Fc (anti-human Fc) 抗體，然後在分析通道流過 7.5 微克/毫升待測抗體，使抗體

均勻分佈，最後在分析通道和樣品通道一起流過梯度稀釋的抗原樣品（起始濃度 20nM，1:3 稀釋 8 個濃度點，並且設定 0.741 奈米濃度點重複），測定抗體抗原結合後發生的光反應值。隨後，經儀器軟體擬合（1:1）分析，最終得到抗體的結合常數 K_{on} 和解離常數 K_{off} ，以及親和力常數 K_D 。

【0106】 結果見表 7。

表 7. 本發明抗體與抗原的結合動力學和親和力常數

抗體	結合常數 (k_a) (1/Ms)	解離常數 (k_d) (1/s)	親和力常 數 (K_D) (M)	信號值 (R_{max}) (RU)	可信度 (χ^2) (RU ²)
78D4 xiIgG	1.40E+06	3.36E-04	2.39E-10	67.1	0.198
78D4- H3L3	1.25E+06	3.02E-04	2.40E-10	37.2	0.0303
98G9 xiIgG	8.84E+05	3.77E-04	4.26E-10	47.3	0.46
98G9- H0L2	7.76E+05	5.24E-04	6.74E-10	18.9	0.0677
98G9- H0L3	7.19E+05	5.12E-04	7.13E-10	22.5	0.0481
AZ IgG	1.60E+06	2.11E-04	1.32E-10	48.8	0.0552
AR IgG	2.76E+05	6.77E-05	2.45E-10	48.7	0.48

【0107】 **實施例 12**： α -溶血素 (α -Toxin) 導致的膿毒症動物模型複製以及本發明抗體的治療作用檢測

【0108】 將 C57BL/6J 小鼠根據體重隨機分為模型對照組和單株抗體藥物治療組。實驗前 30 分鐘，治療組尾靜脈注射抗 α -溶血素單株抗體（6 微克／隻），對照組小鼠注射相同劑量的 PBS，然後所有小鼠均尾靜脈注

射 α -溶血素 (3 微克/隻) 建立膿毒症感染小鼠模型，觀察記錄實驗動物生存時間，結果見圖 10。

【0109】 實施例 13：耐甲氧西林金黃色葡萄球菌導致的菌血症動物模型複製以及本發明抗體的治療作用檢測

【0110】 耐甲氧西林金黃色葡萄球菌 USA300 在 TSB 固體培養基平板上活化 2 代，接種至 TSB 液體培養基中過夜培養，以 12,000rpm 離心收集菌體，並重新懸浮於生理鹽水中備用。

【0111】 C57BL/6J 小鼠尾靜脈感染 USA300 (6×10^7 CFU/隻)，並根據體重隨機分為模型對照組 (Control)、不同抗 α -溶血素單株抗體藥物治療組。感染 2 小時後經尾靜脈注射，各組單株抗體治療組給予 15 毫克/公斤劑量的相應抗體，對照組注射相同劑量的 PBS，觀察記錄各組小鼠生存時間，結果見圖 11。

【0112】 實施例 14：耐甲氧西林金黃色葡萄球菌的肺炎動物模型複製以及本發明抗體的治療作用檢測

【0113】 耐甲氧西林金黃色葡萄球菌 USA300 在 TSB 固體培養基平板上活化 2 代，接種至 TSB 液體培養基中過夜培養，以 12,000rpm 離心收集菌體，並重新懸浮於生理鹽水中備用。

【0114】 C57BL/6J 小鼠經氣管感染 USA300 (1.8×10^8 CFU/隻)，並根據體重隨機分為模型對照組、單株抗體藥物治療組、萬古黴素治療組、萬古黴素+單株抗體治療組。感染 2 小時後經尾靜脈注射，各組動物給予相應藥物治療，單株抗體給藥劑量為 15 毫克/公斤，萬古黴素給藥劑量為 1.25 毫克/公斤，對照組注射相同劑量的 PBS。感染 24 小時後處死動物，取肺組織勻漿，稱重、勻漿、塗布於 TSB 固體培養基上檢測組織載菌量，

實驗結果表明本發明中抗 α -溶血素抗體能夠增強萬古黴素治療耐甲氧西林金黃色葡萄球菌的肺炎感染的藥效學作用。

【0115】 結果見圖 12。

【0116】 **實施例 15**：本發明抗體的急性毒性研究

【0117】 在小鼠和食蟹猴體內展開本發明 78D4 H3L3 抗體分子的急性毒性試驗研究（小鼠實驗 N=10，食蟹猴實驗 N=3）。

【0118】 C57BL/6 小鼠（18-20 克），雌雄各半，每隻小鼠經尾靜脈 24 小時內注射 125 毫克／公斤的 78D4 H3L3 抗體分子。結果表明，最高 24 小時內給予 125 毫克／公斤劑量時，未出現小鼠死亡，連續觀察 14 天未見動物出現任何不適現象，處死動物取主要臟器（心、肝、脾、肺、腎、腦）大體觀察未見異常。

【0119】 每只雄性食蟹猴動物，經四肢靜脈滴注給予 78D4 H3L3 抗體分子 10 毫克／公斤，單次給藥。結果表明，78D4 H3L3 抗體分子 10 毫克／公斤劑量時，未出現動物死亡，連續觀察 28 天未見動物出現任何不適現象。

【0120】 急性毒性試驗研究表明 78D4 H3L3 抗體分子安全性好。

【0121】 **實施例 16**：本發明抗體的藥代動力學研究

【0122】 78D4 H3L3 抗體分子按照 10 毫克／公斤劑量在食蟹猴體內展開單次給藥的藥代動力學研究（N=3）。

【0123】 食蟹猴，雄性，每隻動物經四肢靜脈滴注給予 78D4 H3L3 抗體分子 10 毫克／公斤，單次給藥。於給藥前 0 小時（pre-dose，0h），給藥開始後 0.25 小時（15 分鐘）、0.5 小時（拔針點）、4 小時、24 小時（D2）、48 小時（D3）、96 小時（D5）、168 小時（D8）、336 小時（D15）、504 小時（D22）、672 小時（D29）進行採血。採血部位為動物四肢外周

靜脈（非給藥肢）或腹股溝靜脈取血。採血量為約 1 毫升全血／隻／時間點。採用 ELISA 法測定食蟹猴血清中抗體濃度；採用非房室模型分析的方法，通過 WinNonlin Phoenix（v6.4, Pharsight 公司）軟體計算 AUC_{last} 、 Cl 、 $T_{1/2}$ 等藥代動力學參數。

【0124】 採用 ELISA 法測定食蟹猴血清中 78D4 H3L3 抗體濃度，血清藥物濃度個體圖見圖 13，藥代動力學參數匯總見表 8，各動物給藥後均可見藥物暴露。

表 8. 抗體 78D4 H3L3 的藥代動力學結果

		動物 ID			N	平均值	標準差 (SD)	變異係數 (CV) %
		111	112	113				
參數	單位	估值						
從給藥開始到外推無窮遠時間的曲線下面積 (AUC_{INF_obs})	小時*奈克／毫升 ($h*ng/mL$)	2690 0000	4470 0000	6430 0000	3	4530 0000	187000 00	41.3
從給藥時間開始到最後一個時間點的時間段內曲線下面積 (AUC_{last})	小時*奈克／毫升	2680 0000	4320 0000	6070 0000	3	4360 0000	170000 00	38.9
最大血清藥物濃度 (C_0)	奈克／毫升 (ng/mL)	4310 00	3870 00	5920 00	3	4700 00	108000	22.9
清除率 (Cl_{obs})	毫升／小時 ／公斤	0.74 4	0.44 7	0.31 1	3	0.50 1	0.222	44.2
平均滯留時間 (MRT_{last})	小時	83.8	160	170	3	138	47.1	34.2
半衰期 ($T_{1/2z}$)	小時	99.2	140	173	3	137	36.9	26.9
表觀分佈容積 (V_{z_obs})	毫升／公斤	107	90.4	77.6	3	91.5	14.5	15.8

【0125】 本專利申請要求於 2019 年 9 月 20 日提交的申請號為 CN201910889697.5 的中國發明專利申請的優先權權益，在此將其全部內容引入作為參考。

【0126】 以上對本發明具體實施方式的描述並不限制本發明，本領域技術人員可以根據本發明作出各種改變或變形，只要不脫離本發明的精神，均應屬於本發明所附申請專利範圍的範圍。

【序列表】

<110> 大陸商邁威（上海）生物科技股份有限公司（MABWELL（SHANGHAI）BIOSCIENCE CO., LTD.）

<120> 抗 α -溶血素的抗體及其應用

<130> LC19110042-TWN

<140> TW109132357

<141> 2020-09-18

<150> CN201910889697.5

<151> 2019-09-20

<160> 87

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工(artificial)

<220>

<223> 重鏈，CDR1

<400> 1

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Phe

1 5

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工(artificial)

<220>

<223> 重鏈，CDR1

<400> 2

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Phe Gly Met His
1 5 10

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工(artificial)

<220>

<223> 重鏈，CDR1

<400> 3

Thr Phe Gly Met His
1 5

<210> 4

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工(artificial)

<220>

<223> 重鏈，CDR2

<400> 4

Ser Gly Gly Ser Ser Thr
1 5

<210> 5

<211> 10
<212> PRT
<213> 人工(artificial)

<220>
<223> 重鏈, CDR2

<400> 5

Tyr Ile Ser Gly Gly Ser Ser Thr Ile Tyr
1 5 10

<210> 6
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工(artificial)

<220>
<223> 重鏈, CDR2

<400> 6

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

Gly

<210> 7
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工(artificial)

<220>
<223> 重鏈, CDR3

<400> 7

Gly Tyr Pro Tyr Gly Leu Asp Tyr
1 5

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工(artificial)

<220>

<223> 輕鏈，CDR1

<400> 8

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Trp Tyr Leu Ser
1 5 10

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工(artificial)

<220>

<223> 輕鏈，CDR2

<400> 9

Arg Gly Asn Arg Leu Val Asp
1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工(artificial)

<220>

<223> 輕鏈，CDR3

<400> 10

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Phe Thr

1 5

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工(artificial)

<220>

<223> 輕鏈，CDR2

<400> 11

Arg Gly Asn Arg Leu Val Glu

1 5

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工(artificial)

<220>

<223> 重鏈，CDR1

<400> 12

Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr

1 5

<210> 13
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工(artificial)

<220>
<223> 重鏈, CDR1

<400> 13

Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Met Asn
1 5 10

<210> 14
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工(artificial)

<220>
<223> 重鏈, CDR1

<400> 14

Ser Tyr Trp Met Asn
1 5

<210> 15
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工(artificial)

<220>
<223> 重鏈, CDR2

<400> 15

His Pro Ser Asp Ser Glu
1 5

<210> 16
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工(artificial)

<220>
<223> 重鏈, CDR2

<400> 16

Met Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Arg
1 5 10

<210> 17
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工(artificial)

<220>
<223> 重鏈, CDR2

<400> 17

Met Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Arg Leu Ser Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Asp

<210> 18

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工(artificial)

<220>
<223> 重鏈, CDR3

<400> 18

Phe Asp Trp Asp Arg Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 19
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工(artificial)

<220>
<223> 輕鏈, CDR1

<400> 19

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Phe Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 20
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工(artificial)

<220>
<223> 輕鏈, CDR2

<400> 20

Asn Thr Arg Ser Leu Ala Glu

1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工(artificial)

<220>

<223> 輕鏈，CDR3

<400> 21

Gln His His Tyr Gly Thr Pro Trp Thr

1 5

<210> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工(artificial)

<220>

<223> 重鏈，CDR1

<400> 22

Gly Tyr Thr Phe Ser Glu Tyr

1 5

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工(artificial)

<220>

<223> 重鏈，CDR1

<400> 23

Gly Tyr Thr Phe Ser Glu Tyr Thr Met His
1 5 10

<210> 24

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工(artificial)

<220>

<223> 重鏈, CDR1

<400> 24

Glu Tyr Thr Met His
1 5

<210> 25

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工(artificial)

<220>

<223> 重鏈, CDR2

<400> 25

Asn Pro Asn Asn Gly Gly
1 5

<210> 26

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工(artificial)

<220>

<223> 重鏈，CDR2

<400> 26

Ser Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr
1 5 10

<210> 27

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工(artificial)

<220>

<223> 重鏈，CDR2

<400> 27

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

Gly

<210> 28

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工(artificial)

<220>

<223> 重鏈，CDR2

<400> 28

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

Gly

<210> 29

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工(artificial)

<220>

<223> 重鏈, CDR3

<400> 29

Thr Arg Asp Tyr Asp Asn Asp Gly Gly Leu Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工(artificial)

<220>

<223> 輕鏈, CDR1

<400> 30

Arg Ala Ser Lys Asn Ile Ser Lys Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 31

<211> 11
<212> PRT
<213> 人工(artificial)

<220>
<223> 輕鏈，CDR1

<400> 31

Arg Ala Ser Lys Asn Ile Leu Lys Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 32
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工(artificial)

<220>
<223> 輕鏈，CDR2

<400> 32

Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser
1 5

<210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工(artificial)

<220>
<223> 輕鏈，CDR3

<400> 33

Gln Gln His Tyr Glu Tyr Pro Phe Thr

1 5

<210> 34

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工(artificial)

<220>

<223> 重鏈，CDR1

<400> 34

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr

1 5

<210> 35

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工(artificial)

<220>

<223> 重鏈，CDR1

<400> 35

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Met His

1 5 10

<210> 36

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工(artificial)

<220>

<223> 重鏈，CDR1

<400> 36

Asp Thr Tyr Met His
1 5

<210> 37

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工(artificial)

<220>

<223> 重鏈，CDR2

<400> 37

Asp Pro Ala Ser Gly Asn
1 5

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工(artificial)

<220>

<223> 重鏈，CDR2

<400> 38

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

<210> 39

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工(artificial)

<220>

<223> 重鏈，CDR2

<400> 39

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

Gly

<210> 40

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工(artificial)

<220>

<223> 重鏈，CDR3

<400> 40

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

<210> 41

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工(artificial)

<220>

<223> 輕鏈，CDR1

<400> 41

Arg Ala Ser Glu Lys Ile Tyr Ser Phe Leu Ala
1 5 10

<210> 42
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工(artificial)

<220>
<223> 輕鏈, CDR2

<400> 42

Asn Ala Glu Thr Leu Ala Glu
1 5

<210> 43
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工(artificial)

<220>
<223> 輕鏈, CDR3

<400> 43

Gln His His Tyr Gly Thr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 44
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工(artificial)

<220>

<223> 重鏈可變區

<400> 44

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Pro Lys Asn Thr Leu Phe
 65 70 75 80

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

Ala Ser Gly Tyr Pro Tyr Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 45

<211> 351
 <212> DNA
 <213> 人工(artificial)

<220>
 <223> 重鏈可變區

<400> 45
 gatgtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc ccggaaactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt acctttggaa tgcactgggt tcgtcaggct 120
 ccagagaagg ggctggagtg ggtcgcatac attagtgggt gcagtagtac catctactat 180
 gcagacacag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atcccaagaa caccctgttc 240
 ctgcaaatga ccagtctaag gtctgaggac acggccatgt attactgtgc aagcggctac 300
 ccctatggtt tggactactg ggggtcaagga acctcagtca ccgtctctc a 351

<210> 46
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工(artificial)

<220>
 <223> 輕鏈可變區

<400> 46

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

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Trp Tyr
 20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr
 65 70 75 80

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 47

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工(artificial)

<220>

<223> 輕鏈可變區

<400> 47

gacatcgaca tgaccagtc tccatcttcc atgtatgcat ctctaggaga gagagtcact 60

atcacttgca aggcgagtca ggacattaat tggatattaa gttggttcca gcagaaacca 120

gggaaatctc ctaagaccct gatctatcgt gaaacagat tggtagatgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gcagtgatc tgggcaagat tattctctca ccatcagcag cctggagtat 240

gaagatatgg gaatttatta ttgtctacag tatgatgagt ttccattcac gttcggctcg 300

gggacaaagt tggaataaa a 321

<210> 48

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工(artificial)

<220>

<223> 重鏈可變區

<400> 48

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 Thr Phe
20 25 30

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Ser Gly Tyr Pro Tyr Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 49
 <211> 351
 <212> DNA
 <213> 人工(artificial)

<220>
 <223> 重鏈可變區

<400> 49
 gaggtgcagc tggtggagag cgggggggga ctggtgcagc caggaggaag cctgagactg 60
 agctgtgccg caagcgggtt cacatttagt acctttgaa tgcactgggt gaggcaggcc 120
 cccggcaaag ggctggagtg ggtgtcttat atttccggcg gaagtagcac catatactac 180
 gctgatacag tgaagggcag attcaccata agcagggaca acgccaagaa cagcctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgag agccgaagac accgctgtgt actactgcgc cagcggctac 300
 ccctacggcc tggattactg gggacaagga aacttggtga ccgtgagcag c 351

<210> 50
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工(artificial)

<220>
 <223> 輕鏈可變區

<400> 50

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 Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Trp Tyr
 20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr Leu Ile
 35 40 45

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

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

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

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

<210> 51

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工(artificial)

<220>

<223> 輕鏈可變區

<400> 51
 gacattcaga tgaccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggaga cagagtgacc 60
 ataacctgca aagccagcca agacatcaac tggtatctgt cctggtttca gcagaagccc 120
 ggcaaagccc caaaaacct catctaccgg gaaacagac tggtggaagg ggtgcccagc 180
 agatttagcg gaagcggcag cggccaggac tacaccttca ccatatcaag cctgcagccc 240
 gaagacatgg ccacctacta ctgcctgcag tacgacgaat ttccatttac ctteggacag 300
 ggaaccaag tcgagatcaa a 321

<210> 52
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工(artificial)

<220>
 <223> 重鏈可變區

<400> 52

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

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

Gly Met Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Arg Leu Ser Gln Lys Phe

50

55

60

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

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

Thr Arg Phe Asp Trp Asp Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 53

<211> 354

<212> DNA

<213> 人工(artificial)

<220>

<223> 重鏈可變區

<400> 53

caggtccaac tgcagcagcc tggggctgag ctggtgaggc ctggagcttc agtgaagctg 60

tcttgaagg cttctggcta ctcttcacc agctactgga tgaactgggt gaagcagagg 120

cctggacaag gccttgagtg gattggcatg attcatcctt ccgatagtga aactaggtta 180

agtcagaagt tcaaggacaa ggccacattg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240

atgcaactca gcagcccgcac atctgaggac tctgcggtct attactgtac aagattcgac 300

tgggaccggg ctatggacta ctggggtcaa ggaacctcag tcaccgtctc ctca 354

<210> 54

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工(artificial)

<220>

<223> 輕鏈可變區

<400> 54

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 Glu Asn Ile Phe Ser Tyr
 20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

<210> 55

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工(artificial)

<220>

<223> 輕鏈可變區

<400> 55

gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcat ctgtgggaga aactgtcacc 60

atcacatgtc gagcaagtga gaatattttc agttatttag catggtatca acagaaacag 120

ggaaaatctc ctcagctcct ggtctataat acaagatcct tagcagaagg tgtgccaatca 180

aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag ttttctctga agatcaacag cctgcagcct 240

gaagattttg ggacttatta ctgtcaacat cattatggta ctccgtggac gttcggtgga 300

ggcaccaagc tggaaatcaa a 321

<210> 56

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工(artificial)

<220>

<223> 重鏈可變區

<400> 56

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 Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Met Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Arg Leu Ser Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Phe Asp Trp Asp Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 57

<211> 354

<212> DNA

<213> 人工(artificial)

<220>

<223> 重鏈可變區

<400> 57

caggtccaac tcgtccaaag cggcgcagaa gtcaaaaagc cggcgcate agtcaaagtt 60
 agctgcaagg ccagcggcta cagcttcaca tcatactgga tgaactgggt gcggcaagcc 120
 cccggccaag gtctcgaatg gatgggaatg atccacccca gcgacagcga gaccaggctg 180
 agccagaaat ttaaagacag agtcacatg accagagaca cctccacctc aaccgtetat 240
 atggaactga gcagcctcag aagcgaggac accgccgtgt attactgcgc ccggttegac 300
 tgggacagag ccatggacta ctggggccaa ggcaccctcg ttaccgtgag cagc 354

<210> 58
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工(artificial)

<220>
 <223> 輕鏈可變區

<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 Glu Asn Ile Phe Ser Tyr
 20 25 30

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

Tyr Asn Thr Arg Ser Leu Ala Glu 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 Gln His His Tyr Gly Thr Pro Trp
85 90 95

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

<210> 59

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工(artificial)

<220>

<223> 輕鏈可變區

<400> 59

gacattcaga tgaccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggaga cagagtgacc 60

ataacctgca gagccagcga gaacatattc tcatacctcg cctggtacca gcagaaacce 120

ggcaaagccc caaaactgct catctacaac acaagaagcc tggctgaagg agtgcccagc 180

agattcagcg ggtcaggcag cggcaccgac ttcaccctga ccatcagcag cctgcaacca 240

gaagactteg ccacctacta ctgccaacac cactacggca cccctggac ctteggacaa 300

ggcaccaaac tcgagatcaa a 321

<210> 60

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工(artificial)

<220>

<223> 重鏈可變區

<400> 60

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

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

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

Gly Ser Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys 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 Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Asn Cys
 85 90 95

Ala Arg Thr Arg Asp Tyr Asp Asn Asp Gly Gly Leu Phe Ala Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

<210> 61
 <211> 366
 <212> DNA
 <213> 人工(artificial)

<220>
 <223> 重鏈可變區

<400> 61
 gaggtccacc tgcaacagtc tggacctgag ctgatgaagc ctggggcttc agtgaagata 60
 tcttgcaaga cttctggata cacattcagt gaatacacca tgcactgggt gaagcagagc 120
 catggaaaga gccttgagtg gattggaagt attaatccta acaatggtgg tactacctac 180
 aaccagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgtagaca agtcctccag cacagcctac 240
 atggagctcc gcagcctgac atctgaggat tctgcagtct ataactgtgc aagaactagg 300
 gactatgata acgacggggg tctttttgct tactggggcc aagggactct ggtcactgtc 360
 tctgca 366

<210> 62
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工(artificial)

<220>
 <223> 輕鏈可變區

<400> 62

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

Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Asn Ile Ser Lys Tyr
 20 25 30

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

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Glu Tyr Pro Phe
 85 90 95

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

<210> 63

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工(artificial)

<220>

<223> 輕鏈可變區

<400> 63

gatgtccaga taaccagtc tccatcttat cttgctgcat ctccctggaga aaccattact 60

attaattgca gggcaagtaa gaacattagc aaatatttag cctggtatca agagaaacct 120

gggaaaacta ataagcttct tatctactct ggatccactt tgcaatctgg aattccatca 180
 aggttcagtg gcaatagatc tggtagatc ttcactctca ccatcagtag cctggagcct 240
 gaagattttg caatgtatta ctgtcaacaa cattatgaat acccgttcac gttcggaggg 300
 gggaccaagc tggaaataaa a 321

<210> 64

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工(artificial)

<220>

<223> 重鏈可變區

<400> 64

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 Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Glu Tyr
 20 25 30

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

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

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

<211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工(artificial)

<220>
 <223> 輕鏈可變區

<400> 66

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Asn Ile Leu Lys Tyr
 20 25 30

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

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

Ser Arg 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 His Tyr Glu Tyr Pro Phe
 85 90 95

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

<210> 67

<211> 321
 <212> DNA
 <213> 人工(artificial)

<220>
 <223> 輕鏈可變區

<400> 67
 gacgtgcaga ttacccaaag ccccagcttc ctgtccgcca gcgtgggcga cagagtgaca 60
 attacatgca gagccagcaa gaacatactg aagtacctgg catggtacca acaaaaacce 120
 ggcaaggccc ccaaactgct catctactcc ggcagtaccc tgcagagcgg cgtgcccagc 180
 agattcagcg gaagcagaag cggcaccgag ttcactctga ccatcagcag cctccaacca 240
 gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag cactacgaat accccttcac cttegccagc 300
 ggcaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 68
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工(artificial)

<220>
 <223> 重鏈可變區

<400> 68

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

Ser Val Thr Leu Ser Cys Thr Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

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

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Ser Pro Tyr Gly Asn Asp Tyr Ala Met Asn Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 69
 <211> 357
 <212> DNA
 <213> 人工(artificial)

<220>
 <223> 重鏈可變區

<400> 69
 gaggttcagc tgcagcagtc tggggcagaa cttgtgaagc caggggcctc agtcacgttg 60
 tctgcacag tttctggctt caacattaa gacacctata tgcactgggt gaaacagagg 120

cctgaacagg gcctggagtg gattggaaag attgacctg cgagtggtaa tactaaatat 180
gaccegcagt tccagggcaa ggccactata acagcagaca catcctccaa cacagcctac 240
ctgcacctca gcagcctgac atctgaggac agtgccgtct atttctgtgc tagccctat 300
ggtaacgact atgctatgaa ctactgggga caaggaacct cagtcaccgt ctctca 357

<210> 70

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工(artificial)

<220>

<223> 輕鏈可變區

<400> 70

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 Glu Lys Ile Tyr Ser Phe
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Glu Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
35 40 45

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

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

Glu Asp Phe Gly Ile Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Tyr
 85 90 95

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

<210> 71
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> 人工(artificial)

<220>
 <223> 輕鏈可變區

<400> 71
 gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcat ctgtgggaga aactgtcacc 60
 atcacatgtc gagcaagtga gaaaatttac agtttttttag catggtatca gcagaaacag 120
 gaaaaatctc ctcaactcct ggtctataat gcagaaacct tagcagaagg tgtgccaatca 180
 aggttcagtg gcactggatc gggcatccag ttttctctga agattatcag cctgcagcct 240
 gaagatthttg ggatttatta ctgtcaacat cattatggta ctccgtacac gttcggaggg 300
 gggaccaagt tggaaataaa a 321

<210> 72
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工(artificial)

<220>
 <223> 重鏈可變區

<400> 72

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

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

Tyr Met His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Thr Pro Tyr Gly Asn Asp Tyr Ala Met Asn Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 73

<211> 357

<212> DNA

<213> 人工(artificial)

<220>

<223> 重鏈可變區

<400> 73

gaggtgcagc tgggtgcagag cggagcagag gtgaagaagc caggggccac agtgaagata 60

agctgtaagg tgagcggatt caacattaag gacacatata tgcaactgggt gcagcaggca 120

cccggcaaag gactggagtg gatgggaaag atcgaccccc ccagtggcaa taccaagtac 180

gacccccagt tccagggccg agtgaccatc accgcagaca ccagcaccaa cacagcctac 240

atggagctga gcagcctccg cagcgaagac acagccgtgt actactgcgc caccccctat 300

ggcaacgact acgctatgaa ttactggggc caggaacac tggtcaccgt gtccagc 357

<210> 74

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工(artificial)

<220>

<223> 輕鏈可變區

<400> 74

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 Glu Lys Ile Tyr Ser Phe
 20 25 30

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

35

40

45

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Tyr
 85 90 95

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

<210> 75

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工(artificial)

<220>

<223> 輕鏈可變區

<400> 75

gacattcaga tgaccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggaga cagagtgacc 60

ataacctgca gagccagcga gaaaatata agctttctgg cctggtatca gcagaagccc 120

ggaaaagccc caaaactgct gctgtacaac gcagaaacct tggcagaggg agtgcccagc 180

agattcagcg gatcaggaag cggcatcgac ttcacctga ccatcagcag cctgcaacct 240

gaagactteg ccacctacta ctgccaacac cactacggca cccatacac ctteggagga 300

ggcacaaagg tcgaaatcaa a

321

<210> 76

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工(artificial)

<220>

<223> 輕鏈可變區

<400> 76

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 Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Trp Tyr
 20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr Leu Ile
 35 40 45

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 77

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工(artificial)

<220>

<223> 輕鏈可變區

<400> 77

gacattcaga tgaccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggaga cagagtgacc 60

ataacctgca aagccagcca agacatcaac tggtatctgt cctggtttca gcagaagccc 120

ggcaaagccc caaaaacct catctaccgg ggaaacagac tggtggacgg agtgcccagc 180

agattcagcg gaagcggcag cgggcaagac tacaccttca ccatatcaag cctgcagccc 240

gaagacatgg ccacctacta ctgcctgcag tacgacgaat tcccctttac ctteggccaa 300

gggaccaagg tggagatcaa g 321

<210> 78

<211> 294

<212> PRT

<213> 金黃色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)

<400> 78

Met Ala Asp Ser Asp Ile Asn Ile Lys Thr Gly Thr Thr Asp Ile Gly

1

5

10

15

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

20

25

30

Asn Gly Met His Lys Lys Val Phe Tyr Ser Phe Ile Asp Asp Lys Asn
 35 40 45

His Asn Lys Lys Leu Leu Val Ile Arg Thr Lys Gly Thr Ile Ala Gly
 50 55 60

Gln Tyr Arg Val Tyr Ser Glu Glu Gly Ala Asn Lys Ser Gly Leu Ala
 65 70 75 80

Trp Pro Ser Ala Phe Lys Val Gln Leu Gln Leu Pro Asp Asn Glu Val
 85 90 95

Ala Gln Ile Ser Asp Tyr Tyr Pro Arg Asn Ser Ile Asp Thr Lys Glu
 100 105 110

Tyr Met Ser Thr Leu Thr Tyr Gly Phe Asn Gly Asn Val Thr Gly Asp
 115 120 125

Asp Thr Gly Lys Ile Gly Gly Leu Ile Gly Ala Asn Val Ser Ile Gly
 130 135 140

His Thr Leu Lys Tyr Val Gln Pro Asp Phe Lys Thr Ile Leu Glu Ser
 145 150 155 160

Pro Thr Asp Lys Lys Val Gly Trp Lys Val Ile Phe Asn Asn Met Val
 165 170 175

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

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

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

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

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

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

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

Lys Glu Glu Met Thr Asn
 290

<210> 79

<211> 891

<212> DNA

<213> 金黃色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)

<400> 79

catatggcag acagcgacat taacattaaa accggcacca ccgatatcgg aagcaatacc 60
 accgtaaaaa ccggagatct ggtcacctat gataaagaaa acggcatgct gaaaaaggtg 120
 ttttatagct ttatcgacga taaaaaccac aataaaaagc tgttagtgat ccgcaccaaa 180
 ggtacaatcg caggtcaata cagagtttat agcgaagaag gtgccaataa aagcggctctg 240
 gcatggcccga gcgcatttaa agtgcagctg cagctgccgg acaatgaagt tgcacagata 300
 agcgactatt atccacgtaa tagtattgac acaaaggaat atatgagcac cctgacctat 360
 ggttttaacg gtaatgttac cggatgatgac accggtaaga ttgggggatt aattgggtgca 420
 aatgtttcta ttggtcacac cctgaaatat gttcaaccgg attttaagac catcctggaa 480
 tctccgacag ataaaaaggt ggggtggaaa gttatcttta ataatatggt taaccagaac 540
 tggggcccgt atgatcgca tagctggaat ccagtttatg gtaatcagct gttcatgaaa 600
 acacgcaatg gcagcatgaa agcagcagat aactttctgg acccgaataa agcaagcagc 660
 ctgctgagca gcggtttttc accggacttt gcaaccgtta tcacatgga tcgcaaagcc 720
 tcaaacagc agaccaacat tgatgttatt tacgaaagag tacgcgatga ttaccagtta 780
 cattggacia gcaccaattg gaaagggacc aataccaaag acaaatggac cgatagaagc 840
 agcgaacggt ataaaattga ttgggagaaa gaagaaatga ccaatctcga g 891

- <210> 80
 <211> 294
 <212> PRT
 <213> 人工(artificial)

 <220>
 <223> 突變 α -溶血素

<400> 80

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

Ser Asn Thr Thr Val Lys Thr Gly Asp Leu Val Thr Tyr Asp Lys Glu
 20 25 30

Asn Gly Met Leu Lys Lys Val Phe Tyr Ser Phe Ile Asp Asp Lys Asn
 35 40 45

His Asn Lys Lys Leu Leu Val Ile Arg Thr Lys Gly Thr Ile Ala Gly
 50 55 60

Gln Tyr Arg Val Tyr Ser Glu Glu Gly Ala Asn Lys Ser Gly Leu Ala
 65 70 75 80

Trp Pro Ser Ala Phe Lys Val Gln Leu Gln Leu Pro Asp Asn Glu Val
 85 90 95

Ala Gln Ile Ser Asp Tyr Tyr Pro Arg Asn Ser Ile Asp Thr Lys Glu
 100 105 110

Tyr Met Ser Thr Leu Thr Tyr Gly Phe Asn Gly Asn Val Thr Gly Asp
 115 120 125

Asp Thr Gly Lys Ile Gly Gly Leu Ile Gly Ala Asn Val Ser Ile Gly
 130 135 140

His Thr Leu Lys Tyr Val Gln Pro Asp Phe Lys Thr Ile Leu Glu Ser
 145 150 155 160

Pro Thr Asp Lys Lys Val Gly Trp Lys Val Ile Phe Asn Asn Met Val
 165 170 175

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

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

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

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

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

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

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

Lys Glu Glu Met Thr Asn

290

<210> 81

<211> 891

<212> DNA

<213> 人工(artificial)

<220>

<223> 突變 α -溶血素

<400> 81

catatggcag acagcgacat taacattaaa accggcacca ccgatatcgg aagcaatacc 60
 accgtaaaaa ccggagatct ggtcacctat gataaagaaa acggcatgct gaaaaaggtg 120
 ttttatagct ttatcgacga taaaaaccac aataaaaagc tgttagtgat ccgcaccaaa 180
 ggtacaatcg caggtcaata cagagtttat agcgaagaag gtgccaataa aagcggctctg 240
 gcatggcccga gcgcatttaa agtgcagctg cagctgccgg acaatgaagt tgcacagata 300
 agcgactatt atccacgtaa tagtattgac acaaaggaat atatgagcac cctgacctat 360
 ggttttaacg gtaatgttac cggatgatgac accggtaaga ttgggggatt aattgggtgca 420
 aatgtttcta ttggtcacac cctgaaatat gttcaaccgg attttaagac catcctggaa 480
 tctccgacag ataaaaaggt ggggtggaaa gttatcttta ataatatggt taaccagaac 540
 tggggcccgt atgatcgcca tagctggaat ccagtttatg gtaatcagct gttcatgaaa 600
 acacgcaatg gcagcatgaa agcagcagat aactttctgg acccgaataa agcaagcagc 660
 ctgctgagca gcggtttttc accggacttt gcaaccgtta tcacatgga tcgcaaagcc 720
 tcaaacagc agaccaacat tgatgttata tacgaaagag tacgcgatga ttaccagtta 780

cattggacaa gcaccaattg gaaagggacc aatacceaag acaaatggac cgatagaagc 840

agcgaacggt ataaaattga ttgggagaaa gaagaaatga ccaatctcga g 891

<210> 82

<211> 129

<212> PRT

<213> 人工(artificial)

<220>

<223> 重鏈可變區

<400> 82

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

Pro Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Lys Phe Gly Thr His
20 25 30

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

Gly Ile Ile His Pro Ala Asp Ser Glu Thr Lys Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Ser Phe Ser Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu His Trp Ser Thr Leu Arg Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Ser Gly Ser Ser Ser Trp Tyr Ala Leu Asp Phe Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

Val

<210> 83
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> 人工(artificial)

<220>
 <223> 輕鏈可變區

<400> 83

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Gly Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30

Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Phe Pro Gly Ala Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Asn Gly Leu Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe
115 120

<210> 84

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工(artificial)

<220>

<223> 重鏈可變區

<400> 84

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 85

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工(artificial)

<220>

<223> 輕鏈可變區

<400> 85

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

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

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

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

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

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

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

<210> 86

<211> 330

<212> PRT

<213> 人工(artificial)

<220>

<223> 重鏈恆定區

<400> 86

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

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

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180

185

190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 87
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工(artificial)

<220>
 <223> 輕鏈恆定區

<400> 87

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種抗 α -溶血素的抗體或其片段，該抗體或其片段包含重鏈可變區及輕鏈可變區，其中該重鏈可變區（VH）及輕鏈可變區（VL）分別包含選自以下的 CDR 組合（VH-CDR1、VH-CDR2、VH-CDR3；VL-CDR1、VL-CDR2、VL-CDR3）：

如 SEQ ID NO: 23 所示的 VH-CDR1、如 SEQ ID NO: 28 所示的 VH-CDR2、如 SEQ ID NO: 29 所示的 VH-CDR3；如 SEQ ID NO: 31 所示的 VL-CDR1、如 SEQ ID NO: 32 所示的 VL-CDR2、如 SEQ ID NO: 33 所示的 VL-CDR3。

【請求項2】 如請求項 1 所述的抗 α -溶血素的抗體或其片段，其中，該抗體或其片段所包含的重鏈可變區及輕鏈可變區包含：

如 SEQ ID NO: 64 所示的胺基酸序列；以及，如 SEQ ID NO: 66 所示的胺基酸序列。

【請求項3】 如請求項 1 或 2 之抗 α -溶血素的抗體或其片段，其中，該抗體或其片段為單株抗體、單鏈抗體、雙功能抗體、完全或部分人源化的抗體或者嵌合抗體或其片段；或者，該抗體或其片段為半抗體或半抗體的抗原結合片段。

【請求項4】 如請求項 1 或 2 之抗 α -溶血素的抗體或其片段，其中，該抗體或其片段為 scFv、BsFv、dsFv、(dsFv)₂、Fab、Fab'、F(ab')₂ 或 Fv。

【請求項5】 如請求項 1 或 2 之抗 α -溶血素的抗體或其片段，其中，該抗體為 IgA、IgD、IgE、IgG 或 IgM；該抗體的片段選自該抗體的 scFv、Fab、F(ab')₂ 或 Fv 片段。

【請求項6】 如請求項 1 或 2 之抗 α -溶血素的抗體或其片段，其中，該抗體為 IgG1。

【請求項7】 如請求項 1 或 2 之抗 α -溶血素的抗體或其片段，其中，該抗體或其片段更包含人或鼠的輕鏈恆定區(CL)及／或重鏈恆定區(CH)。

【請求項8】 如請求項 1 或 2 之抗 α -溶血素的抗體或其片段，其中，該抗體或其片段包含選自 IgG、IgA、IgM、IgD 或 IgE 的重鏈恆定區及／或 κ 或 λ 型輕鏈恆定區。

【請求項9】 如請求項 8 之抗 α -溶血素的抗體或其片段，其中，該重鏈恆定區為 IgG1 或 IgG4 亞型，該輕鏈恆定區為 κ 型。

【請求項10】 一種核酸分子，其編碼請求項 1 至 9 中任一項之抗 α -溶血素的抗體或其片段。

【請求項11】 一種載體，其包含請求項 10 之核酸分子。

【請求項12】 一種宿主細胞，其包含請求項 10 之核酸分子及／或請求項 11 之載體。

【請求項13】 一種共軛物或融合蛋白，其包含請求項 1 至 9 中任一項之抗 α -溶血素的抗體或其片段。

【請求項14】 如請求項 13 之共軛物或融合蛋白，其中，該共軛物或融合蛋白包含與該抗體或其片段直接或間接連接的其他部分。

【請求項15】 如請求項 14 之共軛物或融合蛋白，其中，該其他部分為細胞表面受體、小分子化合物、小分子聚合物、活性蛋白或多肽。

【請求項16】 一種藥物組成物，該藥物組成物包含請求項 1 至 9 中任一項之抗 α -溶血素的抗體或其片段、請求項 10 之核酸分子、請求項 11 之

載體、請求項 12 之宿主細胞及／或請求項 13 至 15 中任一項之共軛物或融合蛋白，以及視需要的藥學上可接受的輔料。

【請求項17】 一種試劑盒，該試劑盒包括請求項 1 至 9 中任一項之抗 α -溶血素的抗體或其片段、請求項 10 之核酸分子、請求項 11 之載體、請求項 12 之宿主細胞、請求項 13 至 15 中任一項之共軛物或融合蛋白及／或請求項 16 之藥物組成物。

【請求項18】 一種使用請求項 1 至 9 中任一項之抗 α -溶血素的抗體或其片段、請求項 10 之核酸分子、請求項 11 之載體、請求項 12 之宿主細胞、請求項 13 至 15 中任一項之共軛物或融合蛋白及／或請求項 16 之藥物組成物在製備藥物中的用途，該藥物用於預防或治療由 α -溶血素或產生 α -溶血素的微生物所導致的感染或併發症。

【請求項19】 一種使用請求項 1 至 9 中任一項之抗 α -溶血素的抗體或其片段、請求項 10 之核酸分子、請求項 11 之載體、請求項 12 之宿主細胞、請求項 13 至 15 中任一項之共軛物或融合蛋白及／或請求項 16 之藥物組成物與其他抗菌藥物或抗 α -溶血素抗體之組合在製備藥物中的用途，該藥物用於預防或治療由 α -溶血素或產生 α -溶血素的微生物所導致的感染或併發症。

【請求項20】 如請求項 18 或 19 的用途，其中，該微生物為金黃色葡萄球菌。

【請求項21】 如請求項 20 的用途，其中，該金黃色葡萄球菌為耐甲氧西林金黃色葡萄球菌。

【請求項 22】 如請求項 18 或 19 的用途，其中，該感染為上呼吸道感染、肺炎、重症肺炎、腹腔感染、皮下或軟組織感染、菌血症或各種臟器的感染。

【請求項 23】 如請求項 18 或 19 的用途，其中，該併發症為急性呼吸窘迫綜合征（ARDS）、膿毒症或有機體發炎因子升高。

【請求項 24】 如請求項 19 的用途，其中，該其他抗菌藥物為抗生素。

【請求項 25】 如請求項 19 的用途，其中，該其他抗菌藥物為 β -內醯胺類抗生素。

【請求項 26】 如請求項 19 的用途，其中，該其他抗菌藥物為萬古黴素、去甲萬古黴素、替考拉寧、利奈唑胺、達托黴素、頭孢吡普、夫西地酸或頭孢洛林。

【發明圖式】

*Nde*I-野生型 α -溶血素-*Xho*I-His.tag-stop

ADSDINIKTGTDDIGSNTTVKTGDLVY
 DKENGMHKKVFYSFIDDKNHKLLVI
 RTKGTIAGQYRVYSEEGANKSGLAWP
 SAFKVQLQLPDNEVAQISDYPRNSID
 TKEYMSTLTYGFNGNVTGDDTGKIGG
 LIGANVSIGHTLKYYQPDFKILESPTDK
 KVGWKVIFNNMVNQNWGPYDRDS
 WNPVYGNQLFMKTRNGSMKAADNF
 LDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDRK
 ASKQQTNIDVIYERVRDDYQLHWTST
 NWKGTNTKDKWTDRSSERYKIDWEKE
 EMTN

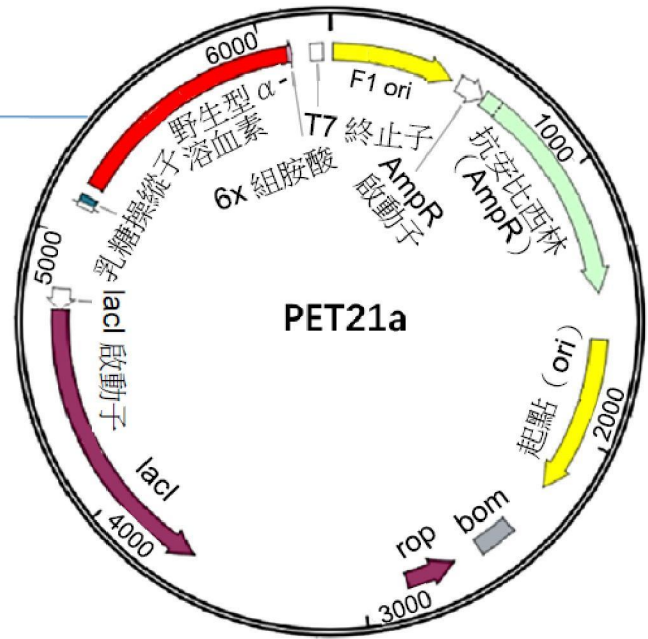


圖1

MADSDINIKTGTDDIGSNTTVKTGDLV
 TYDKENGMHKKVFYSFIDDKNHKLLVI
 VIRTKGTIAGQYRVYSEEGANKSGLAW
 PSAFKVQLQLPDNEVAQISDYPRNSID
 DTKEYMSTLTYGFNGNVTGDDTGKIGG
 GLIGANVSIGHTLKYYQPDFKILESPT
 DKKVGWKVIFNNMVNQNWGPYDRD
 SWNPVYGNQLFMKTRNGSMKAADNF
 FLDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDRK
 ASKQQTNIDVIYERVRDDYQLHWTST
 NWKGTNTKDKWTDRSSERYKIDWEKE
 EMTN

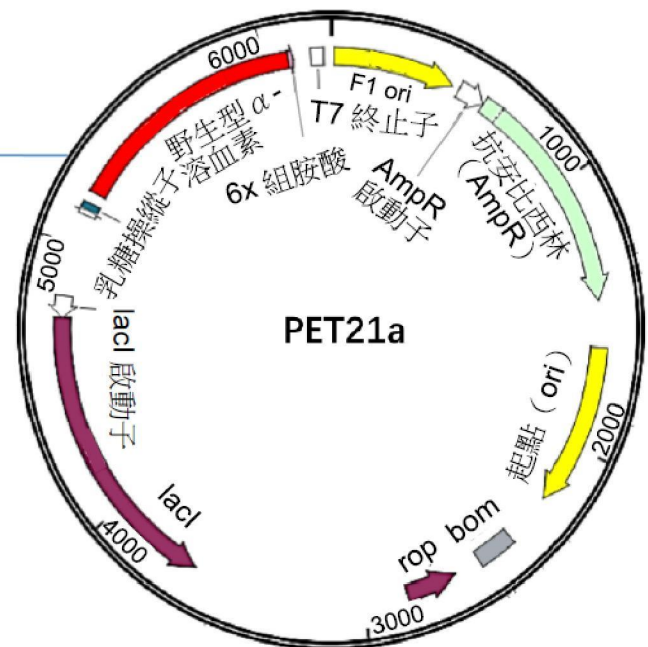


圖2

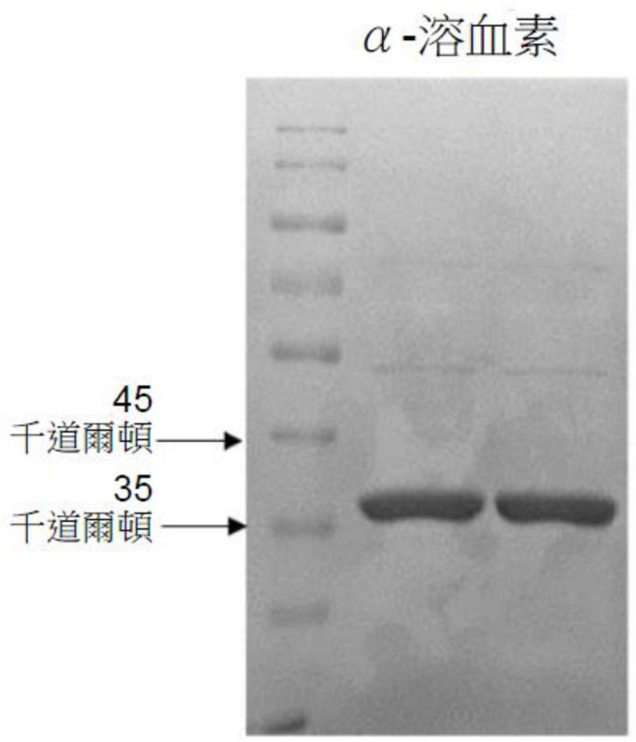


圖3A

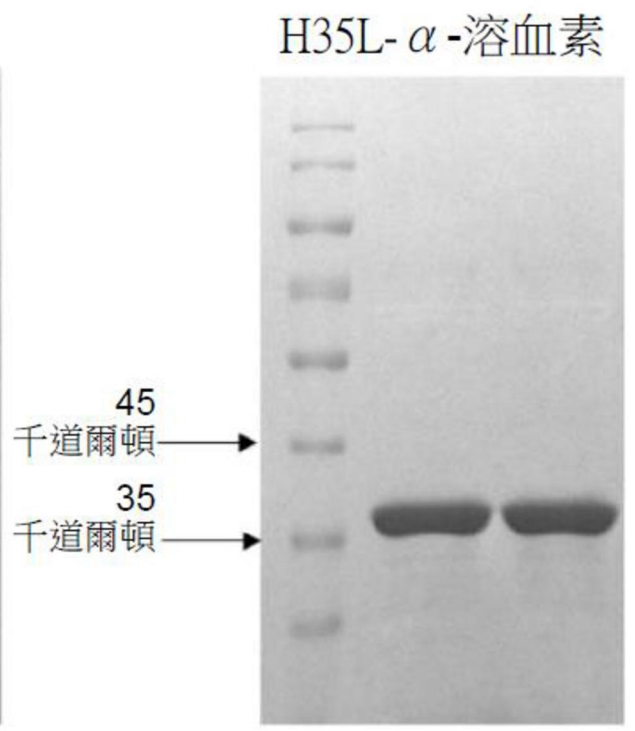


圖3B

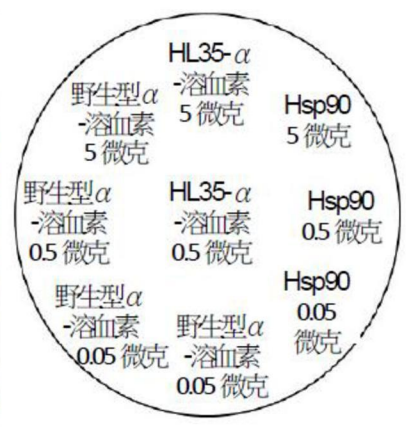


圖4

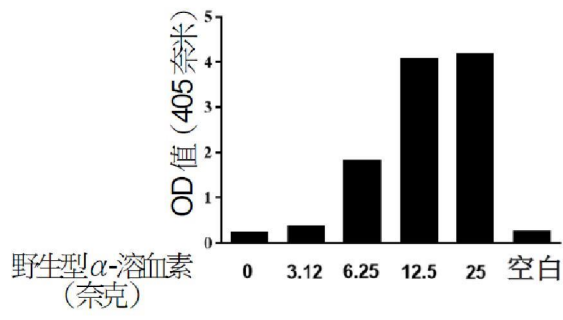


圖5A

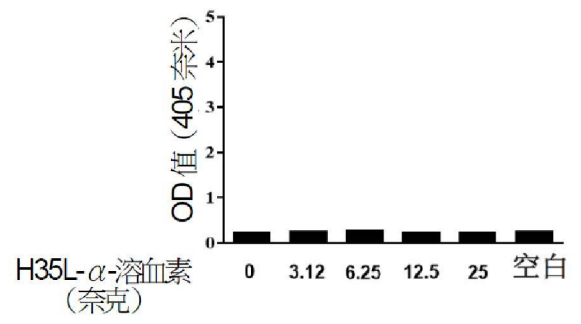


圖5B

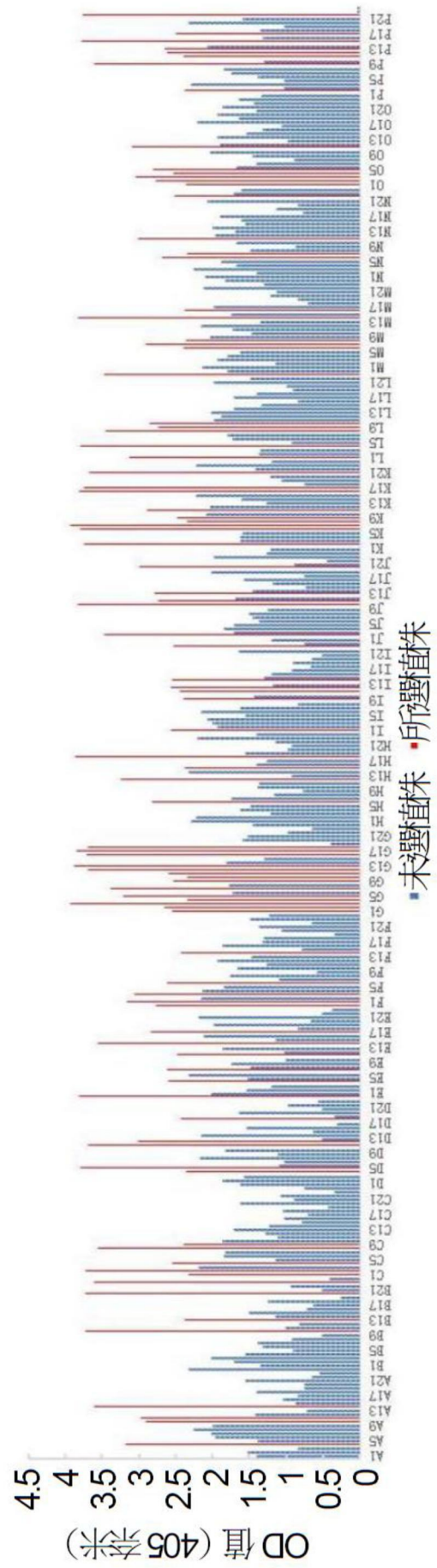


圖6A

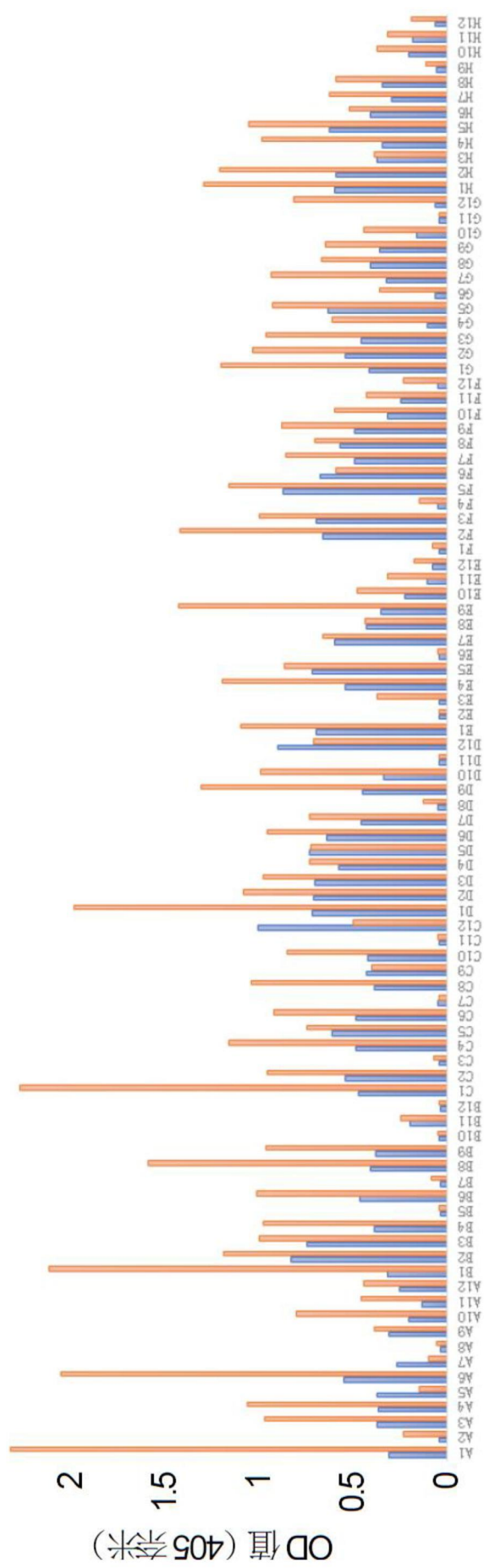


圖9B

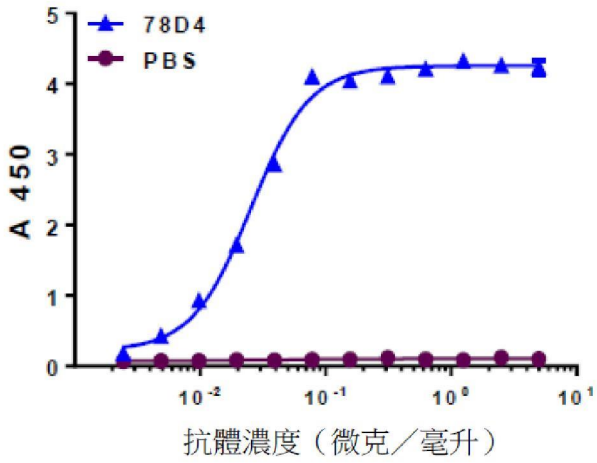


圖7A

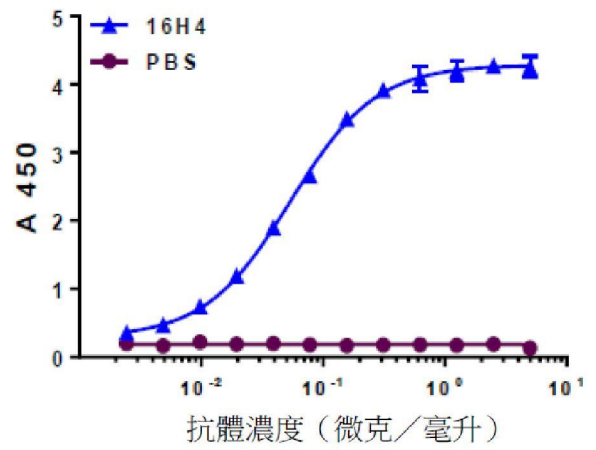


圖7B

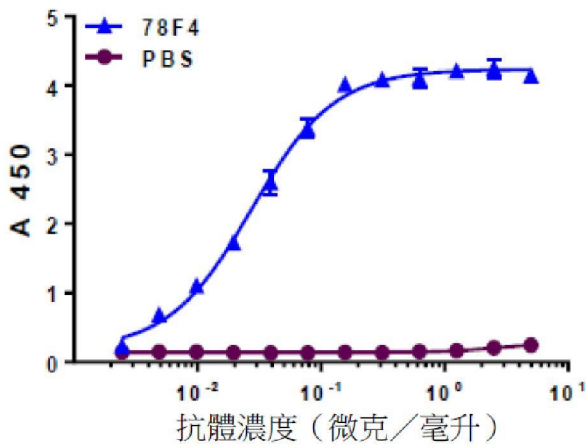


圖7C

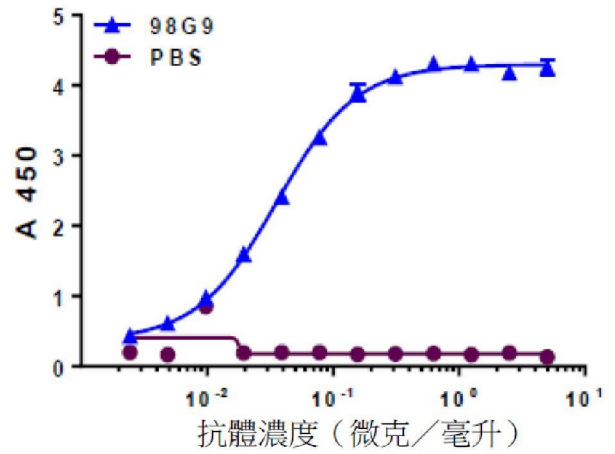


圖7D

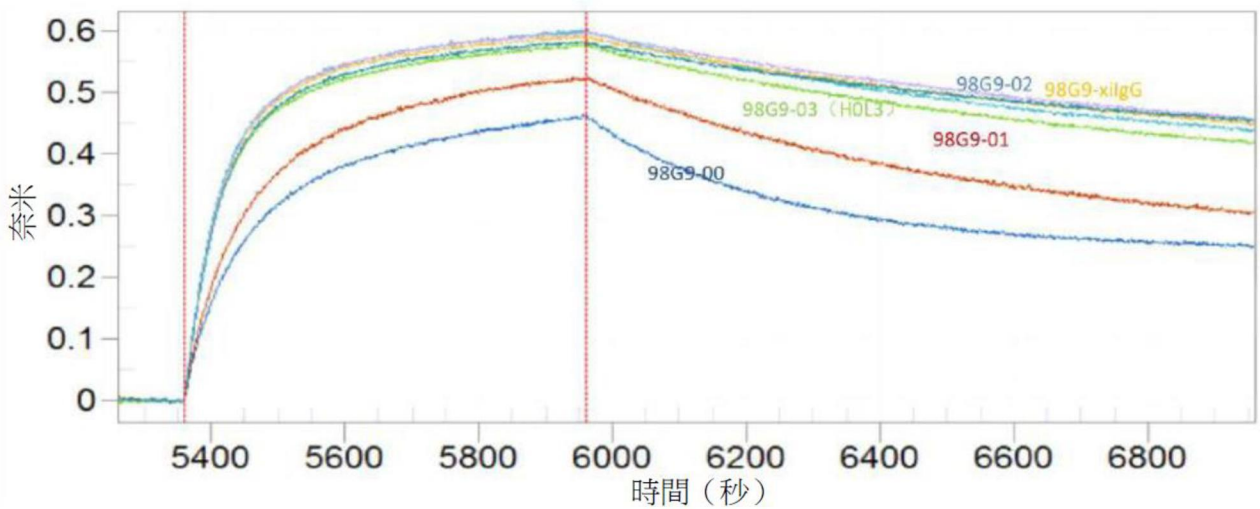


圖8A

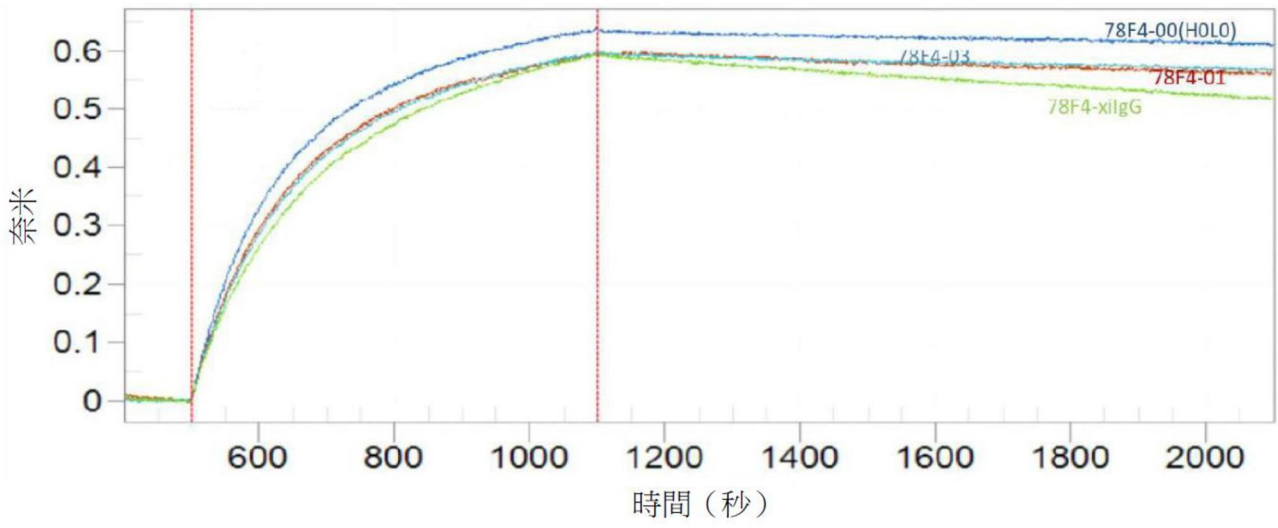


圖8B

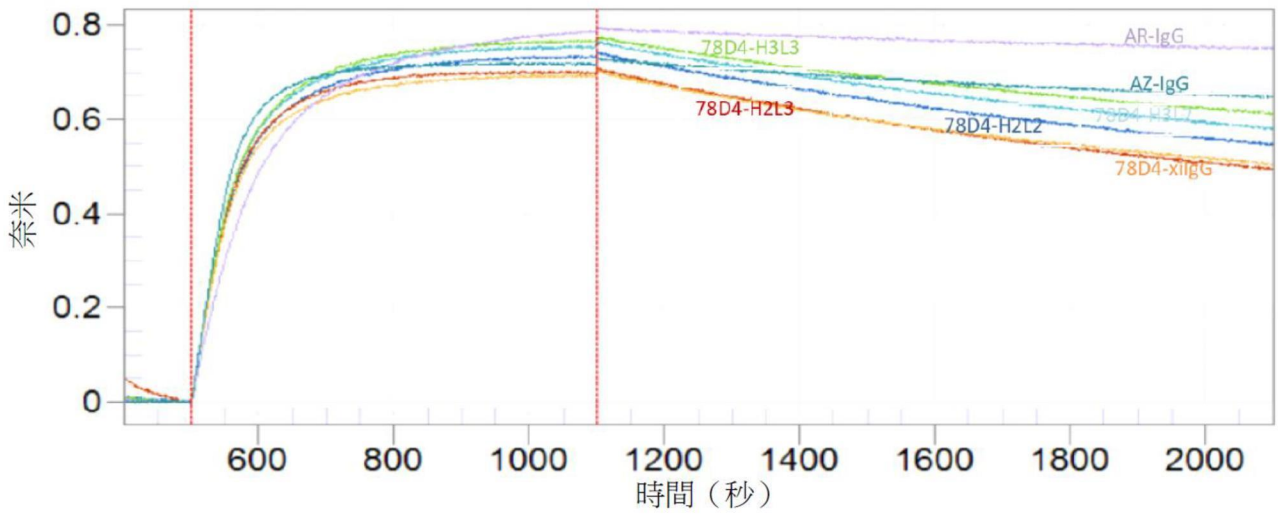


圖8C

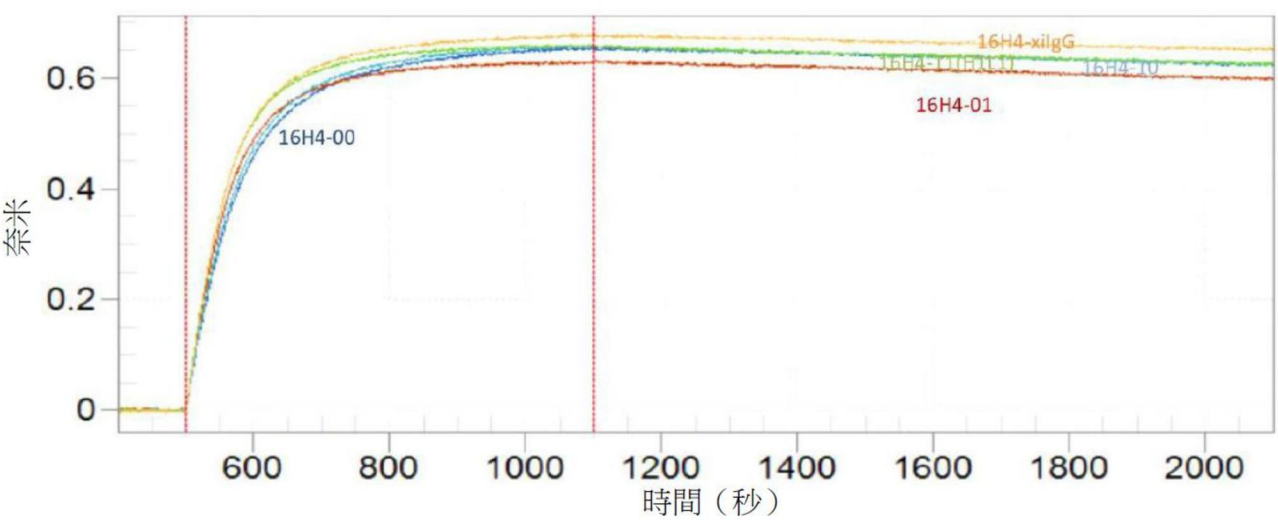


圖8D

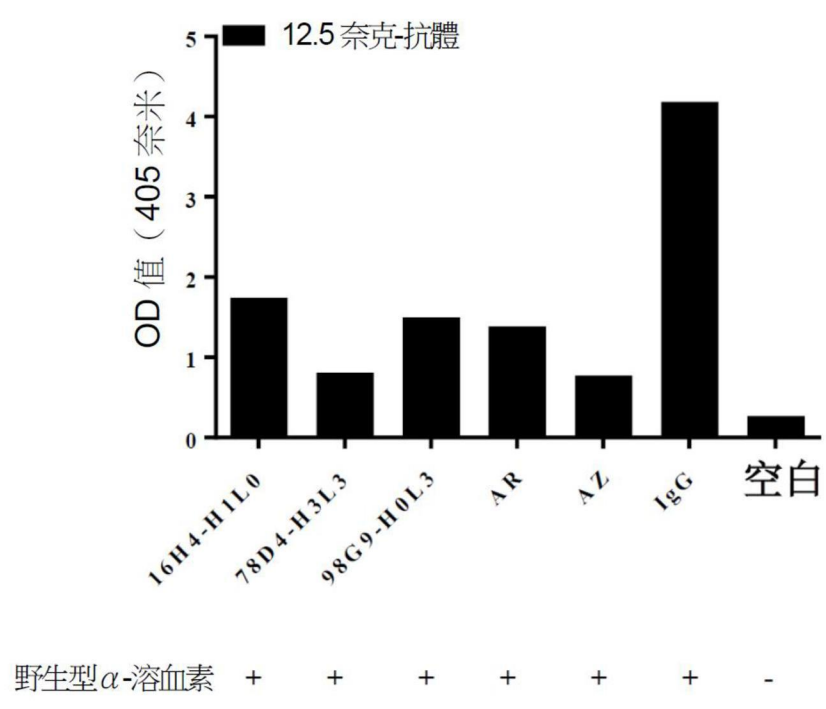


圖9A

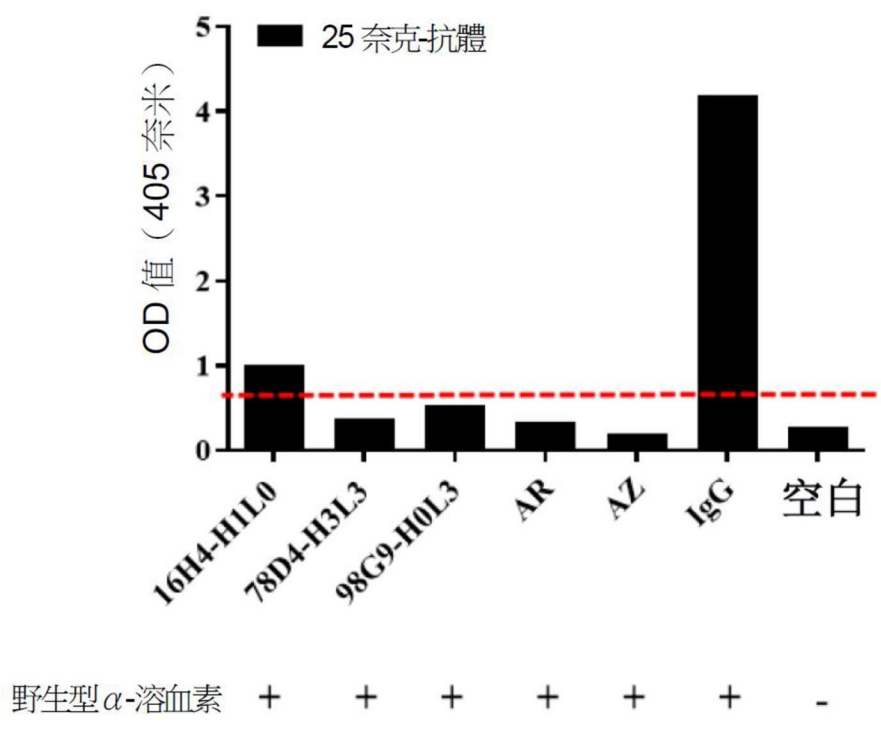


圖9B

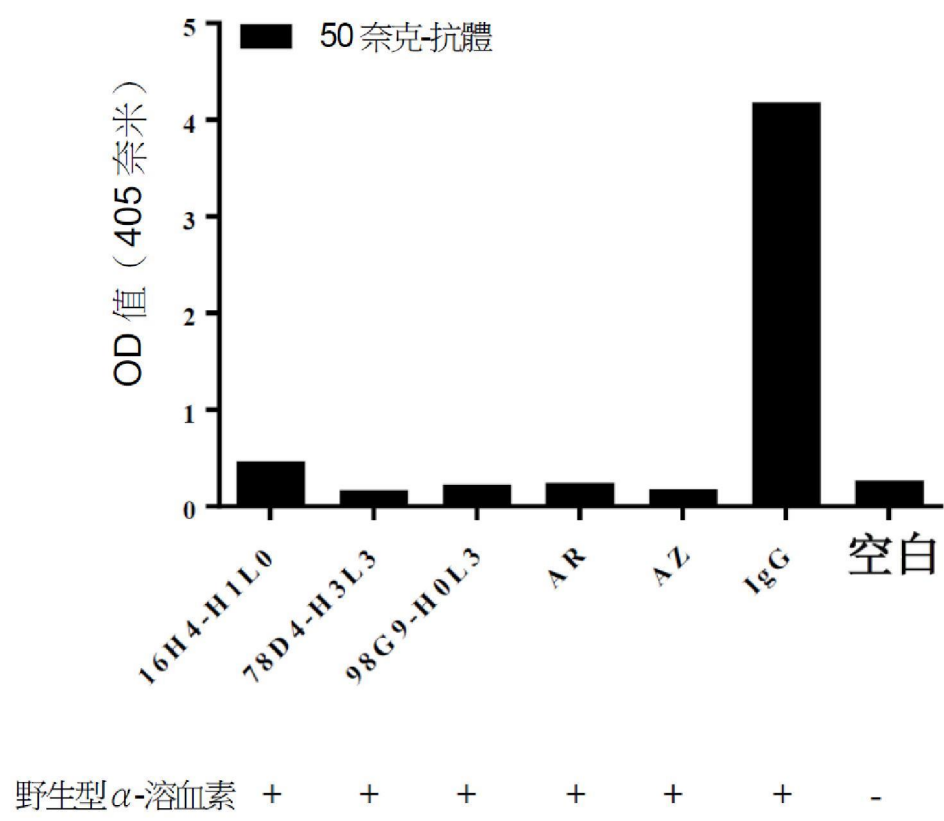


圖9C

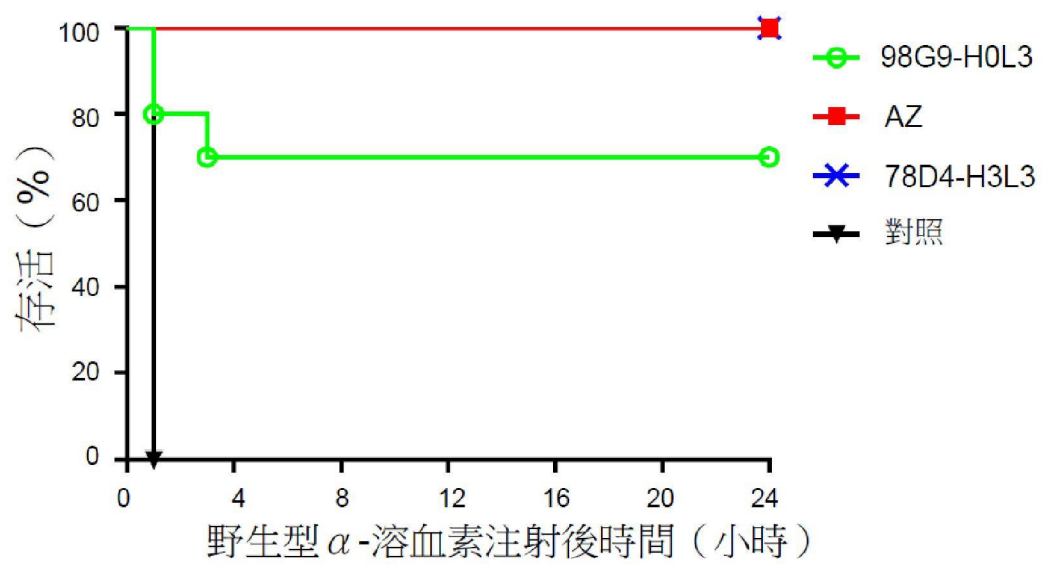


圖10

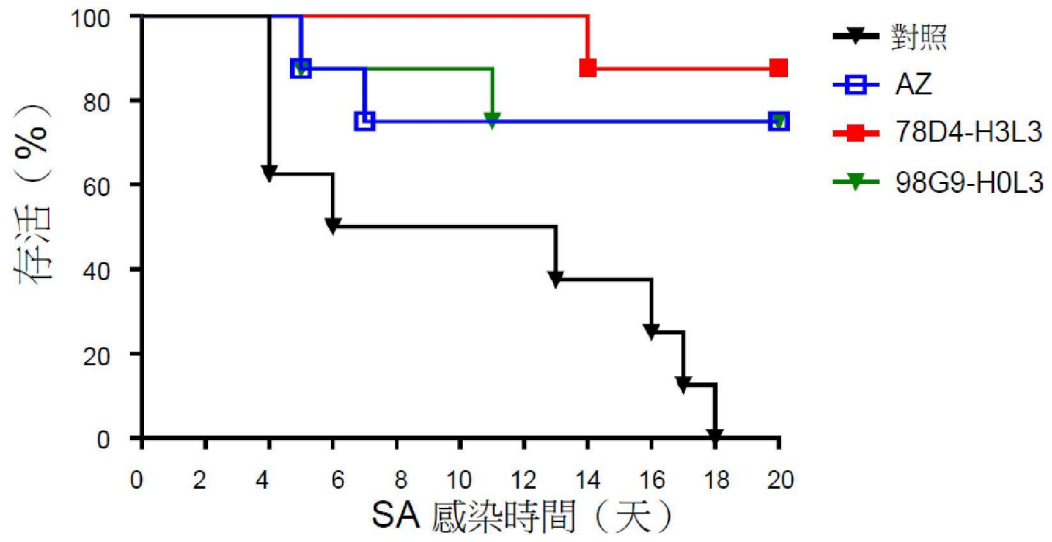


圖11

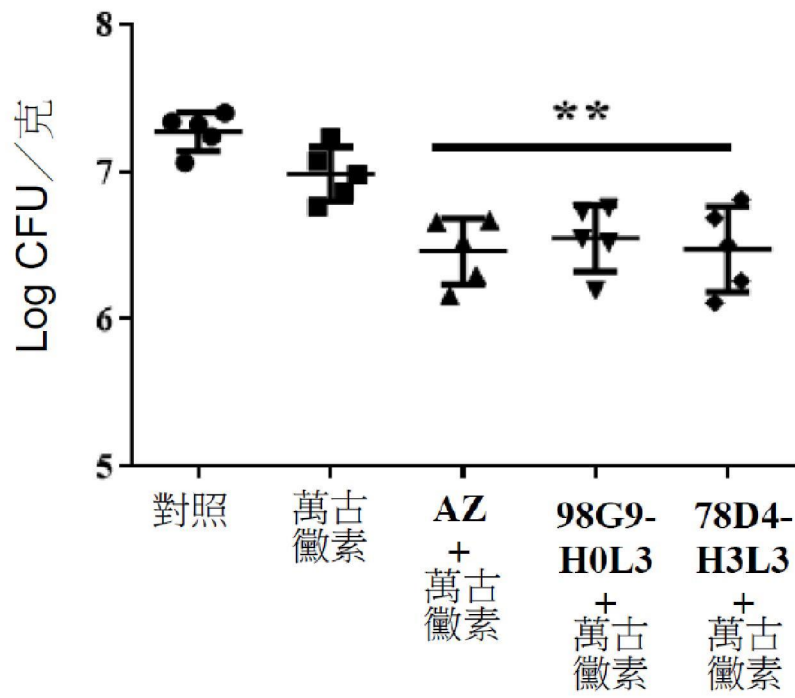


圖12

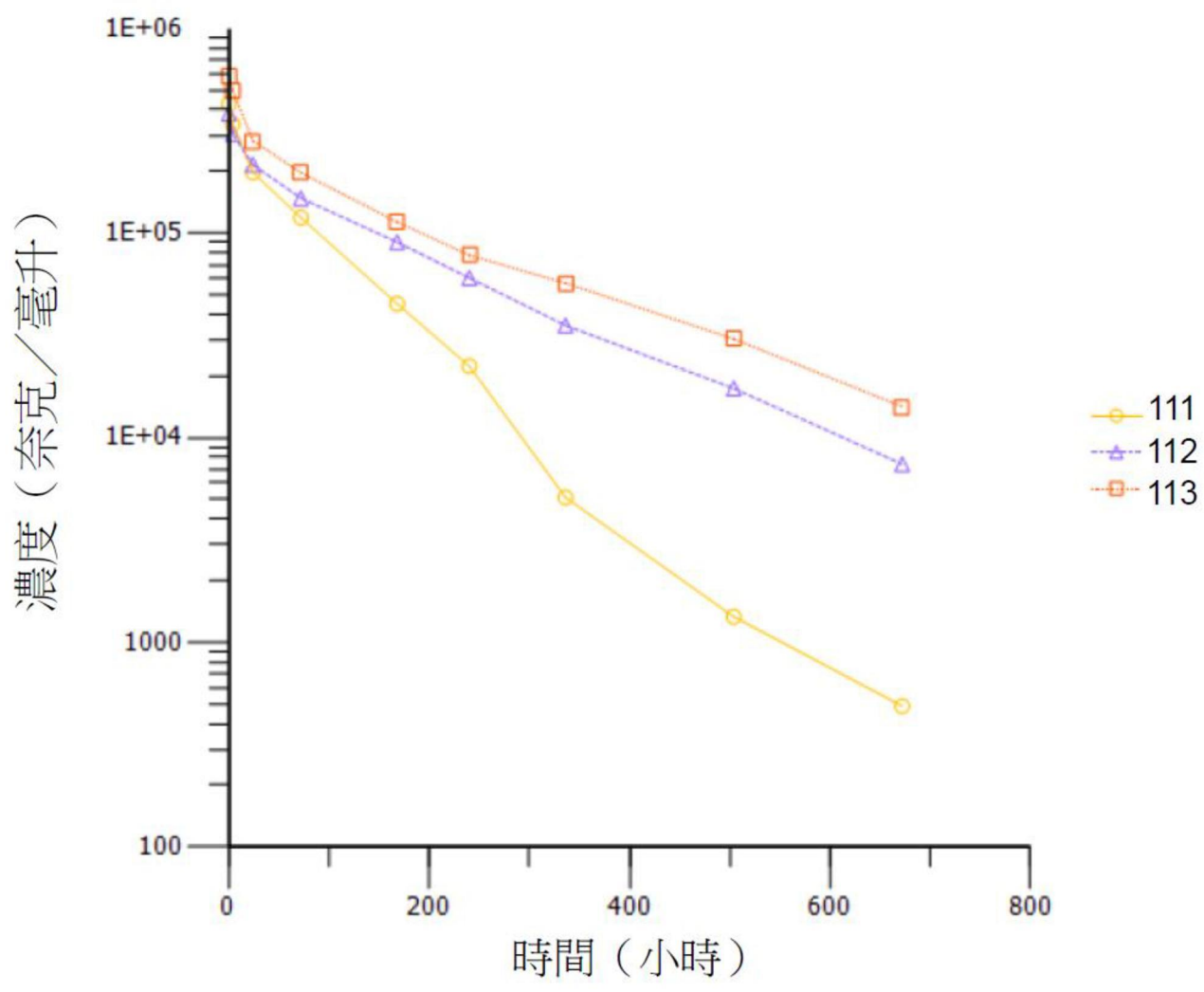


圖13