



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112538112 B

(45) 授权公告日 2023.10.27

(21) 申请号 201910889697.5  
(22) 申请日 2019.09.20  
(65) 同一申请的已公布的文献号  
    申请公布号 CN 112538112 A  
(43) 申请公布日 2021.03.23  
(73) 专利权人 迈威(上海)生物科技股份有限公司  
    地址 201210 上海市浦东新区自由贸易试  
    验区蔡伦路230号2幢105室  
(72) 发明人 安毛毛 王骊淳 高攀 林鉴  
    姜远英 慎慧 陈思敏 郭诗雨  
    方玮  
(74) 专利代理机构 北京瑞恒信达知识产权代理  
    事务所(普通合伙) 11382  
    专利代理师 张伟

(51) Int.Cl.  
    C07K 16/12 (2006.01)  
    C07K 19/00 (2006.01)  
    C12N 15/13 (2006.01)  
    A61K 39/40 (2006.01)  
    A61P 31/04 (2006.01)  
(56) 对比文件  
    CN 107474133 A, 2017.12.15  
    CN 109400704 A, 2019.03.01  
    CN 109553681 A, 2019.04.02  
    CN 109705213 A, 2019.05.03  
    CN 105367632 A, 2016.03.02  
    CN 110167960 A, 2019.08.23  
    审查员 李岚

权利要求书3页 说明书18页  
序列表38页 附图9页

(54) 发明名称

抗 $\alpha$ -溶血素的抗体及其应用

(57) 摘要

本发明提供了一种结合金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素的抗体或其片段,以及所述抗体或其片段用于预防或治疗金黄色葡萄球菌感染的用途。本发明的抗体通过 $\alpha$ -溶血素的弱毒免疫、强毒筛选的策略筛选得到,对 $\alpha$ -溶血素具有高亲和力,能够有效阻断 $\alpha$ -溶血素的溶血作用,且在 $\alpha$ -溶血素脓毒症模型、MRSA菌血症模型和MRSA肺部感染模型中均证明了显著的保护或治疗作用,且与抗生素具有协同作用,是对金黄色葡萄球菌现有抗生素疗法的有利补充。

1. 一种抗 $\alpha$ -溶血素的抗体或其片段,所述抗体或其片段包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)分别包含选自以下的CDR组合(VH-CDR1、VH-CDR2、VH-CDR3;VL-CDR1、VL-CDR2、VL-CDR3),所述 $\alpha$ -溶血素来源于金黄色葡萄球菌:

(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;或

(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。

2. 根据权利要求1所述的抗体或其片段,其特征在于,所述抗体或其片段包含的重链可变区和轻链可变区选自以下组合:

(1) 如SEQ ID NO: 44所示的氨基酸序列;和,如SEQ ID NO: 46所示的氨基酸序列;

(2) 如SEQ ID NO: 48所示的氨基酸序列;和,如SEQ ID NO: 50所示的氨基酸序列;

(3) 如SEQ ID NO: 52所示的氨基酸序列;和,如SEQ ID NO: 54所示的氨基酸序列;

(4) 如SEQ ID NO: 56所示的氨基酸序列;和,如SEQ ID NO: 58所示的氨基酸序列;或

(5) 如SEQ ID NO: 48所示的氨基酸序列;和,如SEQ ID NO: 76所示的氨基酸序列。

3. 根据权利要求1所述的抗体或其片段,其特征在于,所述抗体或其片段为单克隆抗体、单链抗体、双功能抗体、完全或部分人源化的抗体或者嵌合抗体或其片段。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的抗体或其片段,其特征在于,所述抗体或其片段为scFv、BsFv、dsFv、(dsFv)<sub>2</sub>、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>或Fv。

5. 根据权利要求1至3中任一项所述的抗体或其片段,其特征在于,所述抗体为IgA、IgD、IgE、IgG或IgM。

6. 根据权利要求1至3中任一项所述的抗体或其片段,其特征在于,所述抗体为IgG1。

7. 根据权利要求1至3中任一项所述的抗体或其片段,其特征在于,所述抗体的片段选自所述抗体的scFv、Fab、F(ab')<sub>2</sub>或Fv片段。

8. 根据权利要求1至3中任一项所述的抗体或其片段,其特征在于,所述抗体或其片段还包含人或鼠的轻链恒定区(CL)和/或重链恒定区(CH)。

9. 根据权利要求1至3中任一项所述的抗体或其片段,其特征在于,所述抗体或其片段还包含选自IgG、IgA、IgM、IgD或IgE的重链恒定区和/或κ或λ型轻链恒定区。

10. 根据权利要求1至3中任一项所述的抗体或其片段,其特征在于,所述抗体为单克隆抗体。

11. 根据权利要求1至3中任一项所述的抗体或其片段,其特征在于,所述抗体为鼠源、嵌合或人源化的单克隆抗体。

12. 根据权利要求11所述的抗体或其片段,其特征在于,所述单克隆抗体的重链恒定区为IgG1或IgG4亚型,轻链恒定区为κ型。

13. 根据权利要求11所述的抗体或其片段,其特征在于,所述单克隆抗体的重链恒定区包含如SEQ ID NO: 86所示的氨基酸序列。

14. 根据权利要求11所述的抗体或其片段,其特征在于,所述单克隆抗体的轻链恒定区包含如SEQ ID NO: 87所示的氨基酸序列。

15. 一种核酸分子,其编码权利要求1至14中任一项所述的抗体或其片段。

16. 一种载体,其包含权利要求15所述的核酸分子。

17. 一种宿主细胞,其包含权利要求15所述的核酸分子和/或权利要求16所述的载体,或者所述宿主细胞被权利要求15所述的核酸分子和/或权利要求16所述的载体转化或转染。

18. 一种缀合物,其包含权利要求1至14中任一项所述的抗体或其片段。

19. 根据权利要求18所述的缀合物,其特征在于,所述缀合物包含与所述抗体或其片段直接或间接连接的其他部分,所述其他部分为细胞表面受体、小分子化合物、小分子聚合物、活性蛋白或多肽。

20. 一种药物组合物,所述药物组合物包含权利要求1至14中任一项所述的抗体或其片段、权利要求15所述的核酸分子、权利要求16所述的载体、权利要求17所述的宿主细胞和/或权利要求18或19所述的缀合物,以及可选的药学上可接受的辅料。

21. 一种试剂盒,所述试剂盒包括权利要求1至14中任一项所述的抗体或其片段、权利要求15所述的核酸分子、权利要求16所述的载体、权利要求17所述的宿主细胞、权利要求18或19所述的缀合物和/或权利要求20所述的药物组合物。

22. 权利要求1至14中任一项所述的抗体或其片段、权利要求15所述的核酸分子、权利要求16所述的载体、权利要求17所述的宿主细胞、权利要求18或19所述的缀合物和/或权利要求20所述的药物组合物在制备药物中的用途,所述药物用于预防或治疗由来源于金黄色

葡萄球菌的 $\alpha$ -溶血素或产生 $\alpha$ -溶血素的金黄色葡萄球菌导致的感染或并发症。

23. 权利要求1至14中任一项所述的抗体或其片段、权利要求15所述的核酸分子、权利要求16所述的载体、权利要求17所述的宿主细胞、权利要求18或19所述的缀合物和/或权利要求20所述的药物组合物与其他抗菌药物或抗 $\alpha$ -溶血素抗体的组合在制备药物中的用途, 所述药物用于预防或治疗由来源于金黄色葡萄球菌的 $\alpha$ -溶血素或产生 $\alpha$ -溶血素的金黄色葡萄球菌导致的感染或并发症。

24. 根据权利要求23的用途, 其特征在于, 所述金黄色葡萄球菌为耐甲氧西林金黄色葡萄球菌。

25. 根据权利要求22或23的用途, 其特征在于, 所述感染为上呼吸道感染、肺炎、腹腔感染、皮下或软组织感染、菌血症或各种脏器的感染;

所述并发症为急性呼吸窘迫综合征 (ARDS)、脓毒症或机体炎症因子升高。

26. 根据权利要求25的用途, 其特征在于, 所述肺炎为重症肺炎。

27. 根据权利要求23的用途, 其特征在于, 所述其他抗菌药物为用于治疗 and 预防金黄色葡萄球菌感染的药物。

28. 根据权利要求27的用途, 其特征在于, 所述金黄色葡萄球菌为耐甲氧西林金黄色葡萄球菌。

29. 根据权利要求23的用途, 其特征在于, 所述其他抗菌药物为抗生素。

30. 根据权利要求29的用途, 其特征在于, 所述其他抗菌药物为 $\beta$ -内酰胺类抗生素。

31. 根据权利要求29的用途, 其特征在于, 所述其他抗菌药物为万古霉素、去甲万古霉素、替考拉宁、利奈唑胺、达托霉素、头孢吡普、夫西地酸或头孢洛林。

32. 权利要求1至14中任一项所述的抗体或其片段、权利要求15所述的核酸分子、权利要求16所述的载体、权利要求17所述的宿主细胞、权利要求18或19所述的缀合物和/或权利要求20所述的药物组合物在制备用于诊断由来源于金黄色葡萄球菌的 $\alpha$ -溶血素或产生 $\alpha$ -溶血素的金黄色葡萄球菌导致的感染的试剂中的应用。

## 抗 $\alpha$ -溶血素的抗体及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及抗体药物领域,具体而言,本发明涉及一种抗 $\alpha$ -溶血素的抗体及其制药用途。

### 背景技术

[0002] 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)属于葡萄球菌属,是一种重要的革兰氏阳性致病菌,是人类最主要的 $G^+$ 致病菌,可引起化脓性感染、肺炎、伪膜性肠炎、心包炎等局部感染,以及败血症、脓毒血症等全身感染。中国耐药监测网数据显示,金黄色葡萄球菌位居医院内检出病原菌的第4位、医院内检出 $G^+$ 菌的第1位。

[0003] 金黄色葡萄球菌在感染人体过程中释放大量的毒素破坏组织细胞,并抑制机体免疫细胞清除病原体。目前临床上主要采用 $\beta$ -内酰胺类抗生素来治疗金黄色葡萄球菌感染。但是,抗生素只能抑制或者杀死细菌,对细菌释放的毒素却无能为力。相反,在抗生素的压力下细菌会释放更多的毒素,同时被抗生素杀死的细菌裂解也会释放出毒素,大量毒素入血之后会过度激活宿主免疫系统,释放过量的炎症因子,形成脓毒症。

[0004] 并且,在与人类斗争的过程中,金黄色葡萄球菌已经对 $\beta$ -内酰胺类抗生素越来越不敏感,例如目前耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)分离率越来越高,中国耐药监测网数据显示2016年MRSA的分离率甚至已经高达38.9%。对于MRSA,治疗药物临床上主要包括万古霉素、利奈唑胺等有限的几种药物,而这些药物又是引起人类感染的“超级耐药”菌的典型代表。因此,临床上MRSA感染日益严重,可供选择的抗菌药物非常受限,临床患者治疗失败和死亡率居高不下。近年来甚至又不断出现对万古霉素耐药的VRSA(万古霉素耐药金黄色葡萄球菌)感染,人类即将面临无药可用的境况。

[0005] 研究发现,金黄色葡萄球菌释放的致病因子包括溶血素、杀白细胞素、肠毒素、凝固酶等。其中溶血素是金黄色葡萄球菌分泌的重要毒力因子之一,可分为 $\alpha$ -溶血素、 $\beta$ -溶血素、 $\gamma$ -溶血素及 $\delta$ -溶血素四种类型。 $\alpha$ -溶血素(alpha hemolysis, Hla)是由金黄色葡萄球菌HLA基因编码的分泌型毒素蛋白,在几乎所有菌株中均有表达,相对其他类型的溶血素,是影响金黄色葡萄球菌致病性的更为关键的毒力因子,研究表明表达 $\alpha$ -溶血素的HLA基因缺失的金黄色葡萄球菌感染动物的毒力显著降低。 $\alpha$ -溶血素的蛋白全长为319个氨基酸,相对分子质量为33KD,以单体的形式分泌。作为穿孔毒素(pore forming toxin)家族成员之一, $\alpha$ -溶血素最为明确的生物学特性是能够快速裂解宿主红细胞及其他组织细胞,其与宿主细胞上的胆固醇和鞘磷脂结合之后聚集形成一个相对分子质量约为232KD的七聚体,然后再通过折叠形成一个直径约1.5nm的 $\beta$ 桶状的跨膜结构,使得细胞内水、离子和其他小分子物质外泄,从而发生溶血或者靶细胞的死亡。此外, $\alpha$ -溶血素还可以引发毛细血管的平滑肌收缩与抽搐痉挛,从而导致毛细血管堵塞并且造成局部缺血和组织坏死,在金黄色葡萄球菌引发脓毒症、肺炎、乳腺感染、角膜感染以及严重的皮肤感染等疾病的过程中发挥重要作用。同时, $\alpha$ -溶血素还可以破坏感染组织内的白细胞,阻碍宿主清除感染的金黄色葡萄球菌。在宿主免疫系统以及抗生素的压力下,感染部位的金黄色葡萄球菌大量释放 $\alpha$ -溶血素,

入血后可激活宿主免疫系统释放大量的炎症因子,形成脓毒症。

[0006] 面对超级细菌的不断出现,抗体药物已成为后抗生素时代的利器。抗体是适应性免疫系统产生的天然蛋白,人体经被动免疫给予抗体药物,不仅能够中和毒力因子,同时加强宿主对病原体的免疫应答能力,可以加快清除感染的病原菌。而基于以下原因, $\alpha$ -溶血素显示了其作为抗感染抗体药物靶点治疗金黄色葡萄球菌感染的潜力:

[0007]  $\alpha$ -溶血素在金黄色葡萄球菌中高度保守,在几乎所有的金黄色葡萄球菌中均有表达; $\alpha$ -溶血素生物学功能明确,在金黄色葡萄球菌形成宿主感染及脓毒症发生过程中发挥重要作用;哺乳动物细胞内不存在 $\alpha$ -溶血素的同源蛋白,靶向 $\alpha$ -溶血素设计抗体药物,潜在的脱靶可能性小、毒副反应低。

[0008] 因此, $\alpha$ -溶血素是抗金黄色葡萄球菌感染抗体药物理想的靶点,有效中和 $\alpha$ -溶血素有利于阻断金黄色葡萄球菌感染人体、避免严重感染后脓毒症的发生并改善临床感染患者的预后。目前Aridis制药公司以 $\alpha$ -溶血素的靶点研发的全人源抗体R-301(Salvecin®)已经进入III期临床研究,主要适应症为金黄色葡萄球菌(包括耐甲氧西林金黄色葡萄球菌)引起的重症肺炎;阿斯利康制药有限公司以 $\alpha$ -溶血素的靶点研发的人源化抗体MEDI4893正在开展II期临床研究,主要适应症为金黄色葡萄球菌(包括耐甲氧西林金黄色葡萄球菌)肺炎的预防和治疗。

[0009] 目前,抗生素例如万古霉素等仍然是治疗金黄色葡萄球菌感染的一线药物,但考虑到抗药性的持续增加及新型抗生素的研发减缓,本领域仍需要开发新颖、高效的通过直接中和毒素来抗金黄色葡萄球菌的抗体药物。

## 发明内容

[0010] 本发明要解决的技术问题是,提供一种抗 $\alpha$ -溶血素的抗体分子,特别是人源化 $\alpha$ -溶血素单克隆抗体,所述抗体具有与金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素结合并抑制其溶血和损伤组织细胞的能力,可以单独或者与现有抗菌药物合用于治疗由 $\alpha$ -溶血素或产生 $\alpha$ -溶血素的微生物导致的感染或感染相关疾病。

[0011] 针对上述技术问题,本发明的目的是提供一种抗体或其功能片段,并基于该抗体或其功能片段,提供其用途。

[0012] 本发明的技术方案如下。

[0013] 一方面,本发明提供一种抗体或其片段,所述抗体或其片段包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)分别包含选自以下的CDR组合(VH-CDR1、VH-CDR2、VH-CDR3;VL-CDR1、VL-CDR2、VL-CDR3):

[0014] (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;

[0015] (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;

[0016] (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;

[0017] (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;

[0018] (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;

[0019] (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;

[0020] (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;

[0021] (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;

[0022] (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;

[0023] (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;

[0024] (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;

[0025] (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;

[0026] (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;

[0027] (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;

[0028] (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;

[0029] (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;

[0030] (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;

[0031] (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。

[0032] 优选地,在本发明提供的抗体或其片段中,重链可变区包含:

[0033] 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中任一个所示的氨基酸序列或者与所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;和/或

[0034] 轻链可变区包含:

[0035] 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中任一个所示的氨基酸序列或者与所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列。

[0036] 根据本发明的具体实施方式,所述抗体或其片段包含的重链可变区和轻链可变区选自以下组合:

[0037] (1) 如SEQ ID NO:44所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:44所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;和,如SEQ ID NO:46所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:46所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;

[0038] (2) 如SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;和,如SEQ ID NO:50所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:50所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;

[0039] (3) 如SEQ ID NO:52所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:52所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;和,如SEQ ID NO:54所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:54所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;

[0040] (4) 如SEQ ID NO:56所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:56所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;和,如SEQ ID NO:58所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:58所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;

[0041] (5) 如SEQ ID NO:60所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:60所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;和,如SEQ ID NO:62所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:62所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;

[0042] (6) 如SEQ ID NO:64所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:64所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;和,如SEQ ID NO:66所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:66所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;

[0043] (7) 如SEQ ID NO:68所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:68所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;和,如SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;

[0044] (8) 如SEQ ID NO:72所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:72所示的氨基酸序列具

有至少75%同一性的氨基酸序列;和,如SEQ ID NO:74所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:74所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;

[0045] (9)如SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;和,如SEQ ID NO:76所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:76所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列。

[0046] 其中,上述至少75%同一性为至少80%、优选至少85%、更优选至少90%、进一步优选至少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。

[0047] 本发明提供的抗体或其片段可以为单克隆抗体、单链抗体、单域抗体、双功能抗体、纳米抗体、完全或部分人源化的抗体或者嵌合抗体等任意形式;或者,所述抗体或其片段为半抗体或半抗体的抗原结合片段,例如scFv、BsFv、dsFv、(dsFv)<sub>2</sub>、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>或Fv;关于本发明提供的抗体的片段,优选地,所述片段为抗体的能够特异性结合抗原金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素的任何片段。

[0048] 或者,本发明的抗体为IgA、IgD、IgE、IgG或IgM,更优选为IgG1。抗体的片段选自所述抗体的scFv、Fab、F(ab')<sub>2</sub>或Fv片段。

[0049] 优选地,所述抗体或其片段还包含人或鼠的恒定区,优选包含人或鼠的轻链恒定区(CL)和/或重链恒定区(CH);更优选地,所述抗体或其片段包含选自IgG、IgA、IgM、IgD或IgE的重链恒定区和/或 $\kappa$ 或 $\lambda$ 型轻链恒定区。根据本发明的具体实施方式,所述抗体为单克隆抗体,优选为鼠源、嵌合或人源化的单克隆抗体;更优选地,所述单克隆抗体的重链恒定区为IgG1或IgG4亚型,轻链恒定区为 $\kappa$ 型。

[0050] 优选地,本发明提供的抗体或其片段包含如SEQ ID NO:86所示的重链恒定区和/或如SEQ ID NO:87所示的轻链恒定区,或者与所示的重链恒定区或轻链恒定区具有至少75%同一性的氨基酸序列。

[0051] 另一方面,本发明还提供一种核酸分子,其编码本发明任意抗体或其片段或者编码所述抗体或其片段中包含的重链CDR、轻链CDR、重链可变区、轻链可变区、重链或轻链。

[0052] 根据本发明的具体实施方式,所述核酸分子编码本发明所述的抗体或其片段中的重链可变区或轻链可变区,例如,所述核酸分子包含如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和SEQ ID NO:77中任一个所示的核苷酸序列。

[0053] 还一方面,本发明提供一种载体,其包含本发明的核酸分子。所述载体可以为真核表达载体、原核表达载体、人工染色体及噬菌体载体等。

[0054] 本发明的载体或核酸分子可以用于转化或转染宿主细胞或以任何方式进入宿主细胞内,用于保存或表达抗体等目的。因此,另一方面,本发明提供一种宿主细胞,所述宿主细胞包含本发明的核酸分子和/或载体,或者所述宿主细胞被本发明的核酸分子和/或载体转化或转染。宿主细胞可以是任何原核或真核细胞,例如细菌或昆虫、真菌、植物或动物细胞。

[0055] 基于本发明的公开内容,本发明提供的抗体或其片段、核酸分子、载体和/或宿主细胞可以通过使用本领域已知的任何常规技术方法获得。例如,关于抗体,可以先由本发明

提供的核酸分子获得所述抗体的重链可变区和/或轻链可变区,或者获得所述抗体的重链和/或轻链,然后与所述抗体的任选其他结构域组装成抗体;或者,在允许本发明提供的宿主细胞表达所述抗体的重链可变区和/或轻链可变区或者所述抗体的重链和/或轻链以组装成所述抗体的情况下,培养所述宿主细胞。任选地,所述方法还包括回收产生的抗体的步骤。

[0056] 本发明提供的抗体或其片段还可与其他部分结合,例如细胞表面受体、小分子化合物如氨基酸和糖类、小分子聚合物或对本发明所述抗体进行修饰的任何其它部分,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,本发明提供一种缀合物或融合蛋白,其包含本发明提供的抗体或其片段。例如,该缀合物或融合蛋白可以是包含本发明所述抗体或其片段的双特异性抗体。

[0057] 本发明提供的抗体或其片段、核酸分子、载体、宿主细胞、缀合物或融合蛋白等可以被包含在药物组合物中,更特别地被包含在药物制剂中,从而根据实际需要用于各种目的。因此,在又一方面,本发明还提供一种药物组合物,所述药物组合物包含本发明所述的抗体或其片段、核酸分子、载体、宿主细胞、缀合物和/或融合蛋白,以及可选的药学上可接受的辅料。

[0058] 出于任何使用目的,本发明还提供一种试剂盒,所述试剂盒包括本发明的抗体分子或其片段、核酸分子、载体、宿主细胞、缀合物、融合蛋白和/或药物组合物。

[0059] 基于与 $\alpha$ -溶血素结合并抑制其溶血和损伤组织细胞的能力,本发明的抗体或其片段可以单独或者与其他抗菌药物合用于治疗或改善由 $\alpha$ -溶血素或产生 $\alpha$ -溶血素的微生物感染或者由其感染所导致的其他疾病或症状。因此,本发明还提供上述主题的相关应用。

[0060] 具体而言,再一方面,本发明提供本发明所述抗体或其片段、核酸分子、载体、宿主细胞、缀合物、融合蛋白和/或药物组合物在制备药物中的用途,所述药物用于预防或治疗由 $\alpha$ -溶血素或产生 $\alpha$ -溶血素的微生物导致的感染及并发症。

[0061] 并且,本发明提供所述抗体或其片段、核酸分子、载体、宿主细胞、缀合物、融合蛋白和/或药物组合物与其他抗菌药物或抗 $\alpha$ -溶血素抗体的组合在制备药物中的用途,所述药物用于预防或治疗由 $\alpha$ -溶血素或产生 $\alpha$ -溶血素的微生物导致的感染及并发症。

[0062] 另外,本发明提供一种预防或治疗由 $\alpha$ -溶血素或产生 $\alpha$ -溶血素的微生物导致的感染及并发症的方法,所述方法包括给有此需要的受试者施用所述抗体或其片段、核酸分子、载体、宿主细胞、缀合物、融合蛋白和/或药物组合物,以及任选的抗菌药物。该任选的抗菌药物可以是与本发明抗体或其片段、核酸分子、载体、宿主细胞、缀合物、融合蛋白和/或药物组合物联合施用的药物。二者的联合施用可以采取任意形式进行,包括同时、连续或间隔一段时间进行。

[0063] 在本发明中,产生 $\alpha$ -溶血素的微生物优选为金黄色葡萄球菌,包括耐甲氧西林金黄色葡萄球菌。

[0064] 在本发明中,由 $\alpha$ -溶血素或产生 $\alpha$ -溶血素的微生物导致的感染可为选自上呼吸道感染、肺炎、重症肺炎、腹腔感染、皮下及软组织感染、菌血症及各种脏器的感染中的一种或多种;所述并发症可为选自急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、脓毒症以及机体炎症因子升高中的一种或多种。

[0065] 在本发明中,其他抗菌药物为可用于治疗和预防金黄色葡萄球菌、例如耐甲氧西

林金黄色葡萄球菌感染的药物(包括化学药物、生物制剂和中药),优选抗生素,例如 $\beta$ -内酰胺类抗生素。抗生素可以为美国感染病学会(IDSA, Infectious Diseases Society of America)或者中国中华医学会颁布的指南/治疗策略中所列的可用于治疗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染的药物,优选万古霉素、去甲万古霉素、替考拉宁、利奈唑胺、达托霉素、头孢吡普、夫西地酸、头孢洛林。

[0066] 本发明还提供一种诊断由 $\alpha$ -溶血素或产生 $\alpha$ -溶血素的微生物导致的感染的方法,所述方法包括使所述抗体或其片段、核酸分子、载体、宿主细胞、缀合物、融合蛋白和/或药物组合物与来自受试者的样品相接触。

[0067] 相对于现有技术,本发明通过大肠杆菌原核表达获得金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素( $\alpha$ -Toxin)以及不具有毒力的金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素突变蛋白( $\alpha$ -Toxin H35L)。利用 $\alpha$ -Toxin H35L成功免疫小鼠后取脾细胞,利用杂交瘤技术建立抗体库,筛选获得与 $\alpha$ -溶血素( $\alpha$ -Toxin)具有高亲和力并且具有生物学活性的 $\alpha$ -溶血素单克隆抗体,进一步将其人源化后获得先导抗体分子(IgG1亚型)。

[0068] 具体而言,本发明利用 $\alpha$ -Toxin H35L成功免疫小鼠后取脾细胞,利用杂交瘤技术建立抗体库,筛选获得与 $\alpha$ -溶血素( $\alpha$ -Toxin)具有高亲和力并且具有生物学活性的 $\alpha$ -溶血素单克隆抗体。共获得16个先导抗体分子,不仅和 $\alpha$ -溶血素具有高亲和力,而且具有阻断 $\alpha$ -溶血素溶血的活性。特别是在抗原选择与抗体筛选上,本发明采取了弱毒免疫、强毒筛选的策略。

[0069] 基于鼠源先导抗体分子进行重组表达人鼠亲和抗体及人源化抗体,最终获得具有与鼠源抗体相似生物学活性的人源化抗体分子。

[0070] 体外药效学研究表明,本发明的人源化抗体能够成剂量依赖性阻断 $\alpha$ -溶血素对兔红细胞的溶血效应、阻断 $\alpha$ -溶血素对肺上皮细胞的损伤作用。此外,本发明还利用小鼠 $\alpha$ -溶血素脓毒症模型、MRSA菌血症模型和MRSA肺部感染模型对先导抗体分子进行了动物体内药效学评价。研究结果表明,本发明的人源化抗体对小鼠 $\alpha$ -溶血素脓毒症模型具有显著的保护作用;能够显著延长小鼠MRSA菌血症模型的生存时间;能够显著降低小鼠MRSA肺部感染模型组织载菌量。而且,本发明的人源化抗体与常用抗菌药万古霉素、利奈唑胺等的联合应用,在小鼠 $\alpha$ -溶血素脓毒症模型、MRSA菌血症模型和MRSA肺部感染模型中表现出显著的协同作用。

[0071] 并且,对本发明的抗体按照20mg/kg剂量在食蟹猴体内开展了单次给药的药代动力学研究(N=3),结果表明基本的药代动力学参数符合成药性标准(Table 1),体内消除半衰期( $T_{1/2}$ )为 $137 \pm 36.9$ h,血浆清除率(CL)为 $0.501 \pm 0.222$ ml/h/kg。此外,在小鼠体内开展了本发明的抗体急性毒性试验研究(N=10),结果表明最高24小时内给予125mg/kg剂量时,未出现小鼠死亡,连续观察14天未见动物出现任何不适现象,处死动物取主要脏器(心、肝、脾、肺、肾、脑)大体观察未见异常;食蟹猴单次给药本发明的抗体10mg/kg剂量,未出现动物死亡,连续观察28天未见动物出现任何不适现象。急性毒性试验研究表明本发明的抗体安全性好。

[0072] 本发明的抗体可以有效中和毒素,阻断其对患者组织细胞的破坏,同时提高患者免疫力,由此减轻临床金黄色葡萄球菌感染组织损伤、促进患者体内感染菌更快清除、预防或减轻脓毒症。在该抗体的作用下,患者可以更快地由静脉输液治疗转为口服治疗、治疗疗

程缩短;同时,本发明的抗体具有更好的临床疗效和耐受性,是对现有抗生素疗法的有利补充。

### 附图说明

[0073] 以下,结合附图来详细说明本发明的实施方案,其中:

[0074] 图1示出融合His标签的金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素( $\alpha$ -Toxin)蛋白的重组表达质粒的构建。

[0075] 图2示出融合His标签的金黄色葡萄球菌突变 $\alpha$ -溶血素(H35L $\alpha$ -Toxin)蛋白的重组表达质粒的构建。

[0076] 图3示出重组表达的金黄色葡萄球菌突变 $\alpha$ -溶血素及其突变体H35L $\alpha$ -Toxin的10%SDS-PAGE电泳结果,其中图3A为 $\alpha$ -Toxin,图3B为H35L $\alpha$ -Toxin,上样量为10 $\mu$ g。

[0077] 图4示出金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素及其突变体(H35L $\alpha$ -Toxin)对绵羊血平板的溶血作用。

[0078] 图5示出金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素及其突变体(H35L $\alpha$ -Toxin)对兔血的溶血作用,其中图5A为 $\alpha$ -Toxin,图5B为H35L $\alpha$ -Toxin。

[0079] 图6示出杂交瘤细胞株筛选过程中的检测结果,其中图6A为不同细胞株上清液中抗体与 $\alpha$ -溶血素结合的ELISA检测结果,图6B分别为不同细胞株上清液中抗体对 $\alpha$ -溶血素的抑制结果。

[0080] 图7示出本发明的抗体与 $\alpha$ -溶血素结合的ELISA检测结果,其中图7A至图7D分别示出筛选到的抗体78D4、16H4、78F4和98G9对 $\alpha$ -溶血素的结合。

[0081] 图8示出本发明的抗体 $\alpha$ -溶血素的Octect结合和解离曲线,其中图8A至图8D分别示出筛选到的78D4、16H4、78F4和98G9人源化版本抗体对 $\alpha$ -溶血素的结合。

[0082] 图9示出本发明的抗体抗 $\alpha$ -溶血素溶血活性的作用,其中图9A至9C分别示出不同抗体量时的结果。

[0083] 图10示出本发明的抗体在 $\alpha$ -溶血素导致的脓毒症动物模型中的治疗作用。

[0084] 图11示出本发明的抗体在耐甲氧西林金黄色葡萄球菌导致的菌血症动物模型中的治疗作用。

[0085] 图12示出本发明的抗体在耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的肺炎动物模型中的治疗作用。

[0086] 图13示出本发明的抗体在食蟹猴体内单次给药后的药代动力学研究结果。

### 具体实施方式

[0087] 以下参照具体的实施例来说明本发明。本领域技术人员能够理解,这些实施例仅用于说明本发明,其不以任何方式限制本发明的范围。

[0088] 下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的药材原料、试剂材料等,如无特殊说明,均为市售购买产品。

[0089] 本文中采用已知抗体作为对照,其中:

[0090] Aridis制药公司的全人源抗体R-301(Salvecin®),简称为AR(参见US9249215B2),重链可变区示于SEQ ID NO:82,轻链可变区示于SEQ ID NO:83。

[0091] Astrazeneca 制药公司的人源化抗体 MEDI 4893, 简称为 AZ (参见 US20140072577A1), 重链可变区示于 SEQ ID NO:84, 轻链可变区示于 SEQ ID NO:85。

[0092] 本发明提供的抗体具有如 SEQ ID NO:86 所示的重链恒定区和 SEQ ID NO:87 所示的轻链恒定区。

[0093] 实施例1融合 His 标签的金黄色葡萄球菌  $\alpha$ -溶血素 ( $\alpha$ -Toxin) 的重组表达

[0094] 以金黄色葡萄球菌  $\alpha$ -溶血素氨基酸序列为目的序列, 人工合成相应的碱基序列, 并利用酶切位点 NdeI 和 XhoI 将其克隆至含 His 标签的 Pet-21a 质粒中。其中该金黄色葡萄球菌  $\alpha$ -溶血素氨基酸序列如 SEQ ID NO:78 所示, 相应的碱基序列如 SEQ ID NO:79 所示, 重组质粒的构建见图1。

[0095] 将获得的重组质粒转化至感受态细胞 BL21 (DE3) pLysS 中, 于次日挑取单菌落接种至含 100 $\mu$ g/ml 氨苄西林的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。过夜培养的菌液按 1:100 体积比接种至含 100 $\mu$ g/ml 氨苄西林的 LB 液体培养基中, 200rpm 于 37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 OD<sub>600</sub> 约为 0.6~0.8, 向菌液中加入 IPTG 至终浓度为 0.1mM, 于 16 $^{\circ}$ C 诱导 16-18h。取诱导后菌液, 8,000rpm 离心 3min 收集菌体, -80 $^{\circ}$ C 保存。

[0096] 实施例2融合 His 标签的金黄色葡萄球菌  $\alpha$ -溶血素突变体 (H35La-Toxin) 的重组表达

[0097] 基于金黄色葡萄球菌  $\alpha$ -溶血素氨基酸序列, 将 35 位组氨酸 (His) 突变为亮氨酸 (Leu), 得到突变后的氨基酸序列, 人工合成相应的碱基序列, 并利用酶切位点 NdeI 和 XhoI 将其克隆至含 His 标签的 Pet-21a 质粒中。其中该金黄色葡萄球菌突变  $\alpha$ -溶血素 (H35La-Toxin) 氨基酸序列如 SEQ ID NO:80 所示, 相应的碱基序列如 SEQ ID NO:81 所示, 重组质粒的构建见图2。

[0098] 将获得的重组质粒转化至感受态细胞 BL21 (DE3) pLysS 中, 于次日挑取单菌落接种至含 100 $\mu$ g/ml 氨苄西林的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。过夜培养的菌液按 1:100 体积比接种至含 100 $\mu$ g/ml 氨苄西林的 LB 液体培养基中, 200rpm 于 37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 OD<sub>600</sub> 约为 0.6~0.8, 向该菌液加入 IPTG 至终浓度为 0.25mM, 于 25 $^{\circ}$ C 诱导 4.5h。取诱导后菌液, 8,000rpm 离心 3min 收集菌体, -80 $^{\circ}$ C 保存。

[0099] 实施例3金黄色葡萄球菌  $\alpha$ -溶血素 ( $\alpha$ -Toxin) 及其突变体 (H35La-toxin) 的纯化

[0100] 将诱导表达金黄色葡萄球菌  $\alpha$ -溶血素及其突变体的大肠杆菌分别用超声破碎仪破碎, 180W 工作 3s 间歇 3s, 时间 7-9min; 13,000rpm 离心 30min, 收集上清液, 用 0.22 $\mu$ m 滤器过滤除菌。

[0101] 室温下将 Ni 柱与经过滤的上清液于旋转混合仪上混合 1h, 将 Ni 柱装载到填料柱中。用 5 倍柱床体积的 BD 液 (含咪唑浓度 30mM) 洗脱与 Ni 柱非特异性结合的蛋白, 洗至蛋白显色液不变色, 然后用 5 倍柱床体积的 BB 液 (含咪唑浓度 300mM) 洗脱目的蛋白。然后使用 10KD 的浓缩管将含目的蛋白的洗脱液浓缩置换, 溶剂为 PBS。得到的蛋白的电泳结果见图3。

[0102] 实施例4金黄色葡萄球菌  $\alpha$ -溶血素 ( $\alpha$ -Toxin) 及其突变体 (H35La-toxin) 生物学活性检测 (体外溶血实验及小鼠体内毒性作用)

[0103] 分别滴加 10 $\mu$ l 不同浓度 (5 $\mu$ g/ml, 0.5 $\mu$ g/ml, 0.05 $\mu$ g/ml) 的金黄色葡萄球菌  $\alpha$ -溶血素及其突变体至绵羊血平板 (上海科玛嘉微生物技术有限公司) 表面, 并将血平板置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 24h, 滴加  $\alpha$ -溶血素周围可见明显的溶血环, 并且溶血环直径大小与其浓度呈

相关性；而 $\alpha$ -溶血素突变体周围未见溶血环。实验结果见图4。

[0104] 向96孔板中每孔加入5%兔红细胞75 $\mu$ l (Bio-channel Biotechnology) 和不同质量的金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素或其突变体, 并加入PBS缓冲液至终体积150 $\mu$ l。37 $^{\circ}$ C培养箱中孵育1h, 将96孔板3000rpm离心3min。取100 $\mu$ l上清液通过用酶标仪检405nm处吸光度值(OD<sub>405</sub>)评价其溶血活性。结果表明 $\alpha$ -溶血素对兔红细胞的溶血活性呈剂量依赖性, 而 $\alpha$ -溶血素突变体没有溶血活性。实验结果见图5。

[0105] 通过尾静脉注射给予C57小鼠不同剂量的金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素或其突变体, 发现按照实施例1、实施例2和实施例3描述方法重组表达的金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素对C57小鼠的最低致死剂量为3 $\mu$ g/只; 最高注射 $\alpha$ -溶血素突变体200 $\mu$ g/只, 小鼠未发生任何不适反应。

[0106] 实施例5金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素突变体(H35L $\alpha$ -Toxin)对Balb/c小鼠的免疫

[0107] 将 $\alpha$ -溶血素或 $\alpha$ -溶血素突变体用PBS稀释至不同浓度, 尾静脉注射C57小鼠。比较了二者对C57小鼠的毒性作用, 以选择出适合后续免疫动物免疫原及其用量。结果见表1。

[0108] 表1. 不同剂量的 $\alpha$ -溶血素和 $\alpha$ -溶血素突变体对小鼠的毒性作用

蛋白	剂量	小鼠状态
[0109] WT $\alpha$ -toxin	50 $\mu$ g/只小鼠 (2.5mg/kg)	瞬间死亡
	10 $\mu$ g/只小鼠 (0.5mg/kg)	瞬间死亡
	3 $\mu$ g/只小鼠 (0.15mg/kg)	30min 内死亡
[0110]	1 $\mu$ g/只小鼠 (0.05mg/kg)	出现颤抖、烦躁等不适反应, 存活, 16h (过夜) 后恢复正常
	0.1 $\mu$ g/只小鼠 (0.005 mg/kg)	未出现明显不适反应
H35L $\alpha$ -toxin	200 $\mu$ g/只小鼠 (10mg/kg)	未出现明显不适反应
无关蛋白 BSA	200 $\mu$ g/只小鼠 (10mg/kg)	未出现明显不适反应

[0111] 实施例6金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素突变体(H35L $\alpha$ -Toxin)对Balb/c小鼠的免疫

[0112] 参考Antibodies a Laboratory Manual, Second Edition (Edward A. Greenfield 2012), 以14天为间隔共计42天的过程免疫8周龄Balb/c小鼠。

[0113] 将金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素突变体在完全或不完全弗氏佐剂中乳化, 将其以单侧的方式注射于小鼠颈背部、尾根部、腹股沟3处皮下组织和腹膜腔内。在免疫第35天尾静脉采血, 用ELISA方法检测抗体滴度后, 取免疫小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞融合。

[0114] 实施例7杂交瘤细胞株的筛选、鉴定及抗体序列测定

[0115] 取金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素突变体(H35L $\alpha$ -Toxin)免疫的Balb/c小鼠的脾脏细胞, 与骨髓瘤细胞P3X63Ag8.653使用PEG或者电融合方法进行融合。将融合后的杂交瘤细胞接种于30块384孔板中, 24小时后加入含HAT培养基和含HT培养基, 筛选杂交瘤细胞。于384孔板中培养10-14天后, 取细胞上清与 $\alpha$ -Toxin进行ELISA实验, 筛选能够分泌和 $\alpha$ -溶血素特

异性结合的抗体的杂交瘤母克隆(见图6A)。随后,按ELISA OD值从高到低排序,每块板挑选了94个孔转至96孔板培养,(其中第30号板ELISA检测阳性较差一些,未选孔转板),共转板29块96孔板。

[0116] 生理条件下, $\alpha$ -溶血素的存在会导致红细胞的裂解,裂解物的释放会导致溶液上清颜色发生变化。而细胞分泌上清中的抗 $\alpha$ -溶血素抗体可以抑制 $\alpha$ -溶血素对红细胞的裂解。通过检测上清吸光值,可以检测 $\alpha$ -溶血素对细胞的裂解程度,以及抗体对 $\alpha$ -溶血素的抑制。

[0117] 对转板后的96孔板培养上清进行溶血实验检测,步骤如下:将WT- $\alpha$ -toxin溶血素稀释至5 $\mu$ g/mL浓度母液,取25 $\mu$ L与等体积细胞培养上清混合后,加入至含5%兔红细胞(PBS稀释至75 $\mu$ L)96孔板中,放置于37 $^{\circ}$ C培养箱中孵育1h。将96孔板离心机离心3000rpm,3min。取75 $\mu$ L上清液加入到新的96孔板中,用酶标仪测OD405和OD450吸光度值。部分结果见图6B。

[0118] 将筛选到的分泌抗 $\alpha$ -溶血素抗体的杂交瘤母克隆采用有限稀释法加入铺有饲养细胞的96孔板中,第2-3天后显微镜下观察并标记单克隆细胞,第7天后通过ELISA实验筛选能够分泌抗 $\alpha$ -溶血素单克隆抗体的单克隆杂交瘤细胞。

[0119] 将分泌抗 $\alpha$ -溶血素单克隆抗体的单克隆杂交瘤细胞扩大培养后,按照RNAfast200试剂盒(上海飞捷生物技术有限公司)说明书步骤提取细胞总RNA;利用5 $\times$ PrimeScript RT Master Mix(Takara)将杂交瘤细胞总RNA反转录成cDNA;使用简并引物(Anke Krebber,1997)和Extaq PCR试剂(Takara)扩增抗体轻链可变区IgVL( $\kappa$ )和重链可变区V<sub>H</sub>序列。利用PCR clean-up Gel extraction试剂盒(Macherey-Nagel公司)纯化PCR扩增产物;按照pClone007Simple Vector Kit试剂盒(擎科生物科技有限公司)说明书将扩增PCR产物连接至T载体并转化大肠杆菌感受态细胞,菌株扩增、抽提质粒后进行DNA测序获得单克隆抗体可变区序列。

[0120] 获取鼠源抗体可变区序列并分析如下:

[0121] >98G9鼠源抗体

[0122] 重链可变区:

[0123] DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSAASGFTFSTFGMHWRQAPEKGLEWVAYISGGSSSTIYYADTVKGRF  
TISRDNPKNTLFLQMTSLRSEDAMYYCASGYPYGLDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO:44)

[0124] 轻链可变区:

[0125] DIDMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINWYLSWFQQKPKGSPKTLIYRGNRLVDGVPSRFSGSGSG  
QDYSLTISSEYEDMGIYYCLQYDEFPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO:46)

[0126] 按照不同方法,对98G9鼠源抗体的重链和轻链CDR进行定义,见表2。

[0127] 表2. 98G9鼠源抗体的CDR序列

方法	重链 CDR1	重链 CDR2	重链 CDR3
[0128] Chothia	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 7
AbM	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 7

	Kabat	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 7
	组合	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 7
	方法	轻链 CDR1	轻链 CDR2	轻链 CDR3
[0129]	Chothia	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10
	AbM	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10
	Kabat	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10
	组合	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10

[0130] >78F4鼠源抗体

[0131] 重链可变区:

[0132] QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYSFTSYWMNWVKQRPGQGLEWIGMIHPSDSETRLSQKFKDKA  
TLTVDKSSSTAYMQLSSPTSEDSAVYYCTRFDWDAMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO:52)

[0133] 轻链可变区:

[0134] DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIFSYLAWYQQKQKSPQLLVNTRSLAEGVPSRFSGSGSG  
TQFSLKINSLQPEDFGTYQCQHHYGTPTWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:54)

[0135] 按照不同方法,对78F4鼠源抗体的重链和轻链CDR进行定义,见表3。

[0136] 表3. 78F4鼠源抗体的CDR序列

[0137]	方法	重链CDR1	重链CDR2	重链CDR3
	Chothia	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:18
	AbM	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:18
	Kabat	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:18
	组合	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:18
	方法	轻链CDR1	轻链CDR2	轻链CDR3
	Chothia	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:21
	AbM	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:21
	Kabat	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:21
	组合	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:21

[0138] >78D4鼠源抗体

[0139] 重链可变区:

[0140] EVHLQQSGPELMKPGASVKISCKTSGYTFSEYTMHWVKQSHGKSLEWIGSINPNNGGTTYNQKFKGKA  
TLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYNCARTRDYDNDGGLFAYWGQGLVTVSA (SEQ ID NO:60)

[0141] 轻链可变区:

[0142] DVQITQSPSYLAASPGETITINCRASKNISKYLAWYQEKPGKTNKLLIYSGSTLQSGIPSRFSGNRS  
TDFTLTISSLEPEDFAMYYCQHHYEPFTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:62)

[0143] 按照不同方法,对78D4鼠源抗体的重链和轻链CDR进行定义,见表4。

[0144] 表4. 78D4鼠源抗体的CDR序列

[0145]	方法	重链CDR1	重链CDR2	重链CDR3
	Chothia	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:25	SEQ ID NO:29

AbM	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:26	SEQ ID NO:29
Kabat	SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:29
组合	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:29
方法	轻链CDR1	轻链CDR2	轻链CDR3
Chothia	SEQ ID NO:30	SEQ ID NO:32	SEQ ID NO:33
AbM	SEQ ID NO:30	SEQ ID NO:32	SEQ ID NO:33
Kabat	SEQ ID NO:30	SEQ ID NO:32	SEQ ID NO:33
组合	SEQ ID NO:30	SEQ ID NO:32	SEQ ID NO:33

[0146] >16H4鼠源抗体

[0147] 重链可变区:

[0148] EVQLQQSGAELVKPGASVTLSTVSGFNKDTYMHVVKQRPEQGLEWIGKIDPASGNTKYDPQFQGKA  
TITADTSSNTAYLHLSLTSSEDSAVYFCASPYGNDYAMNYWGQGTSTVSS (SEQ ID NO:68)

[0149] 轻链可变区:

[0150] DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASEKIYSFLAWYQQKQEKSPQLLVYNAETLAEGVPSRFSGTGSG  
IQFSLKIISLPEDFGIYYCQHHYGTPTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:70)

[0151] 按照不同方法,对16H4鼠源抗体的重链和轻链CDR进行定义,见表5。

[0152] 表5. 16H4鼠源抗体的CDR序列

[0153]

方法	重链CDR1	重链CDR2	重链CDR3
Chothia	SEQ ID NO:34	SEQ ID NO:37	SEQ ID NO:40
AbM	SEQ ID NO:35	SEQ ID NO:38	SEQ ID NO:40
Kabat	SEQ ID NO:36	SEQ ID NO:39	SEQ ID NO:40
组合	SEQ ID NO:35	SEQ ID NO:39	SEQ ID NO:40
方法	轻链CDR1	轻链CDR2	轻链CDR3
Chothia	SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:42	SEQ ID NO:43
AbM	SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:42	SEQ ID NO:43
Kabat	SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:42	SEQ ID NO:43
组合	SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:42	SEQ ID NO:43

[0154] 实施例8本发明抗体与 $\alpha$ -溶血素( $\alpha$ -Toxin)的结合

[0155] 将 $\alpha$ -溶血素用PBS缓冲液稀释至1 $\mu$ g/ml,每孔100 $\mu$ l包被于96孔板(Microwell 96F 167008, Thermo) 4 $^{\circ}$ C孵育过夜;次日取出96孔板,用PBST(含0.5% PBS)洗板,每次浸润1min后彻底甩干残余水分。样品孔中分别加入200 $\mu$ l的含5% BSA PBST,置于37 $^{\circ}$ C封闭1h;然后用PBST洗板,并甩干孔中水分。

[0156] 分别向96孔板中加入倍比稀释不同浓度的重组表达的抗 $\alpha$ -溶血素单克隆抗体100 $\mu$ l(抗体浓度参见图7横坐标),4 $^{\circ}$ C孵育过夜。取出96孔板后用PBST洗板,然后每孔加入抗小鼠IgG二抗(IH-0031,北京鼎国昌盛生物技术)100 $\mu$ l,并置于37 $^{\circ}$ C孵育1h。再用PBST洗5次,每孔加入100 $\mu$ l Substrate Solution(Invitrogen),于37 $^{\circ}$ C孵育10min;每孔加入2N硫酸50 $\mu$ l终止反应后于酶标仪(Multiskcin FC, Thermo) 450nm波长处检测吸光度。

[0157] 结果见图7。

[0158] 实施例9本发明嵌合抗体和人源化抗体的获得

[0159] 首先将鼠源抗体的完整轻、重链可变区和人轻、重链恒定区组合,得到嵌合抗体形式作为对照。得到的嵌合抗体命名为“鼠源抗体简称-xi”。

[0160] 在对鼠源抗体重链序列进行综合分析,确定抗体与抗原结合的抗原互补决定簇(CDR)区域及支撑抗体保守三维构象的框架区(framework)后,通过分析搜索已知人源抗体序列,选择与鼠源抗体最为相似接近的人源抗体重链序列,如IGHV1-3\*01,选择其抗体框架区序列作为模板。将鼠源抗体重链CDR嵌入到人源抗体框架区,生成人源化抗体重链序列(重链版本0)。随后,对可能参与抗原抗体结合的鼠源框架区个别氨基酸位点进行回复,生成人源化抗体重链序列(版本1,2,3……)。同样过程,生成人源化抗体轻链序列(版本0,1,2……)。将设计合成的人源化抗体轻重链共转染293细胞,重组表达人源化抗体(版本命名方式例如:重链版本0+轻链版本0共表达,即为H0L0,可进一步缩写为00版本)。实验证明,纯化后的人源化抗体与鼠源母本抗体表现出一致的特异性结合 $\alpha$ -溶血素蛋白活性。

[0161] 采用Octect仪器对最终获得的人源化抗体版本和嵌合抗体xi版本做抗原结合力的对比,图8为部分抗体的测定结果。由抗体与抗原结合的结合和解离阶段的曲线看,特定人源化抗体版本在抗原抗体的结合、解离阶段表现出和对照抗体(包括本发明的嵌合抗体或AZ、AR抗体)类似或更加性质。

[0162] 筛选得到具有以下人源化抗体。

[0163] >人源化抗体98G9-02(98G9-H0L2)

[0164] 重链可变区(H0):

[0165] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISGGSSTIYYADTVKGRF  
TISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASGYPGLDYWGQGTLLVTVSS(SEQ ID NO:48)

[0166] 轻链可变区(L2):

[0167] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDINWYLSWVQKPKGKAPKTLIYRGNRLVDGVPSRFSGSGSG  
QDYTFTISSLPEDMATYYCLQYDEFPFTFGQGTKVEIK(SEQ ID NO:76)

[0168] >人源化抗体98G9-03(98G9-H0L3)

[0169] 重链可变区(H0):

[0170] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISGGSSTIYYADTVKGRF  
TISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASGYPGLDYWGQGTLLVTVSS(SEQ ID NO:48)

[0171] 轻链可变区(L3):

[0172] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDINWYLSWVQKPKGKAPKTLIYRGNRLVEGVPSRFSGSGSG  
QDYTFTISSLPEDMATYYCLQYDEFPFTFGQGTKVEIK(SEQ ID NO:50)

[0173] >人源化抗体78F4-00(78F4-H0L0)

[0174] 重链可变区(H0):

[0175] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTSYWMNWVRQAPGQGLEWGMGIHPSDSETRLSQKFKDRV  
TMRDSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARFDWDRAMDYWGQGTLLVTVSS(SEQ ID NO:56)

[0176] 轻链可变区(L0):

[0177] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASENIFSYLAWYQKPKGKAPKLLIYNTRSLAEGVPSRFSGSGSG  
TDFTLTISSLPEDFATYYCQHHYGPWTFGQGTKLEIK(SEQ ID NO:58)

[0178] >人源化抗体78D4-33(78D4-H3L3)

[0179] 重链可变区(H3):

[0180] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKTSGYTFSEYTMHWVRQAPGQRLEWMGSINPNQGGTTYNQKFKGRV  
TITVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARTRDYDNDGGLFAYWGQGLTLTVSS (SEQ ID NO:64)

[0181] 轻链可变区 (L3) :

[0182] DVQITQSPSFLSASVGDRTITCRASKNILKYLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSRSG  
TEFTLTISLQPEDFATYYCQQHYEYPFTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:66)

[0183] >人源化抗体16H4-11 (16H4-H1L1)

[0184] 重链可变区 (H1) :

[0185] EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNKDTYMHVWVQQAPGKGLEWMGKIDPASGNTKYDPQFQGRV  
TITADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCATPYGNDYAMNYWGQGLTLTVSS (SEQ ID NO:72)

[0186] 轻链可变区 (L1) :

[0187] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASEKIYSFLAWYQQKPGKAPKLLLYNAETLAEGVPSRFSGSGSG  
IDFTLTISLQPEDFATYYCQHHYGTPTYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:74)

[0188] 人源化抗体的重链和轻链CDR见表6。

[0189] 表6. 人源化抗体的CDR序列

[0190]	98G9 H0L2	重链 CDR1	重链 CDR2	重链 CDR3	
		SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 7	
		轻链 CDR1	轻链 CDR2	轻链 CDR3	
[0191]		SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10	
	98G9 H0L3	重链 CDR1	重链 CDR2	重链 CDR3	
			SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 7
		轻链 CDR1	轻链 CDR2	轻链 CDR3	
		SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 10	
	78F4 H0L0	重链 CDR1	重链 CDR2	重链 CDR3	
			SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18
		轻链 CDR1	轻链 CDR2	轻链 CDR3	
			SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21
	78D4 H3L3	重链 CDR1	重链 CDR2	重链 CDR3	
			SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 29
		轻链 CDR1	轻链 CDR2	轻链 CDR3	
		SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 32	SEQ ID NO: 33	
16H4 H1L1	重链 CDR1	重链 CDR2	重链 CDR3		
		SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 40	
	轻链 CDR1	轻链 CDR2	轻链 CDR3		
		SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 43	

[0192] 实施例10本发明抗体抗 $\alpha$ -溶血素( $\alpha$ -Toxin)的溶血活性的检测

[0193] 向96孔板中每孔加入5%兔红细胞75 $\mu$ l(Bio-channel Biotechnology)、12.5ng金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素和不同质量的抗 $\alpha$ -溶血素抗体(12.5ng、25ng、50ng),并加入PBS缓冲液至终体积150 $\mu$ l。37 $^{\circ}$ C培养箱中孵育1h,将96孔板3000rpm离心3min。取100 $\mu$ l上清液通过酶标仪检测405nm处吸光度值( $OD_{405}$ )评价其溶血活性。

[0194] 实验结果表明,本发明的嵌合抗体和人源化抗体具有明显的抗 $\alpha$ -溶血素溶血活性,并且具有剂量依赖性,部分抗体活性与对照抗体AR和AZ相当。结果见图9。

[0195] 实施例11本发明抗体与 $\alpha$ -溶血素( $\alpha$ -Toxin)的结合动力学( $K_{on}$ ,  $K_{off}$ )和亲和力常数 $K_D$ 的检测

[0196] 采用GE公司BIAcore仪器S200测定抗体抗原相互作用力。

[0197] 参考GE公司Human antibody capture kit商品试剂盒(货号BR-1008-39, Lot10261753)操作说明,首先在传感芯片CM5分析通道和对照样品通道都饱和偶联最大量anti-human Fc抗体,然后在分析通道流过7.5 $\mu$ g/ml待测抗体,使抗体均匀分布,最后在分析通道和样品通道一起流过梯度稀释的抗原样品(起始浓度20nM,1:3稀释8个浓度点,并且设定0.741nm浓度点重复),测定抗体抗原结合后发生的光反应值。随后,经仪器软件拟合(1:1)分析,最终得到抗体的结合常数 $K_{on}$ 和解离常数 $K_{off}$ ,以及亲和力常数 $K_D$ 。

[0198] 结果见表7。

[0199] 表7. 本发明抗体与抗原的结合动力学和亲和力常数

[0200]

抗体	$k_a$ (1/MS)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (M)	$R_{max}$ (RU)	$\chi^2$ (RU <sup>2</sup> )
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-HOL2	7.76E+05	5.24E-04	6.74E-10	18.9	0.0677
98G9-HOL3	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

[0201] 实施例12 $\alpha$ -溶血素( $\alpha$ -Toxin)导致的脓毒症动物模型复制以及本发明抗体的治疗作用检测

[0202] 将C57BL/6J小鼠根据体重随机分为模型对照组和单克隆抗体药物治疗组。实验前30min,治疗组尾静脉注射抗 $\alpha$ -溶血素单克隆抗体(6 $\mu$ g/只),对照组小鼠注射相同剂量的PBS,然后所有小鼠均尾静脉注射 $\alpha$ -溶血素(3 $\mu$ g/只)建立脓毒症感染小鼠模型,观察记录实验动物生存时间,结果见图10。

[0203] 实施例13耐甲氧西林金黄色葡萄球菌导致的菌血症动物模型复制以及本发明抗体的治疗作用检测

[0204] 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌USA300在TSB固体培养基平板上活化2代,接种至TSB液体培养基中过夜培养,12,000rpm离心收集菌体,并重悬于生理盐水中备用。

[0205] C57BL/6J小鼠尾静脉感染USA300  $6 \times 10^7$ CFU/只,并根据体重随机分为模型对照组(Control)、不同抗 $\alpha$ -溶血素单克隆抗体药物治疗组。感染2h后经尾静脉注射,各组单克隆抗体治疗组给予15mg/kg剂量的相应抗体,对照组注射相同剂量的PBS,观察记录各组小

鼠生存时间,结果见图11。

[0206] 实施例14耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的肺炎动物模型复制以及本发明抗体的治疗作用检测

[0207] 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌USA300在TSB固体培养基平板上活化2代,接种至TSB液体培养基中过夜培养,12,000rpm离心收集菌体,并重悬于生理盐水中备用。

[0208] C57BL/6J小鼠经气管感染USA300  $1.8 \times 10^8$ CFU/只,并根据体重随机分为模型对照组、单克隆抗体药物治疗组、万古霉素治疗组、万古霉素+单克隆抗体治疗组。感染2h后经尾静脉注射,各组动物给予相应药物治疗,单克隆抗体给药剂量为15mg/kg,万古霉素给药剂量为1.25mg/kg,对照组注射相同剂量的PBS。感染24h后处死动物,取肺组织匀浆,称重、匀浆、涂布于TSB固体培养基上检测组织载菌量,实验结果表明本发明中抗 $\alpha$ -溶血素抗体能够增强万古霉素治疗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的肺炎感染的药效学作用。

[0209] 结果见图12。

[0210] 实施例15本发明抗体的急性毒性研究

[0211] 在小鼠和食蟹猴体内开展了本发明78D4 H3L3抗体分子的急性毒性试验研究(小鼠实验N=10,食蟹猴实验N=3)。

[0212] C57BL/6小鼠(18-20g),雌雄各半,每只小鼠经尾静脉24小时内注射125mg/kg的78D4 H3L3抗体分子。结果表明,最高24小时内给予125mg/kg剂量时,未出现小鼠死亡,连续观察14天未见动物出现任何不适现象,处死动物取主要脏器(心、肝、脾、肺、肾、脑)大体观察未见异常。

[0213] 每只雄性食蟹猴动物,经四肢静脉滴注给予78D4 H3L3抗体分子10mg/kg,单次给药。结果表明,78D4 H3L3抗体分子10mg/kg剂量时,未出现动物死亡,连续观察28天未见动物出现任何不适现象。

[0214] 急性毒性试验研究表明78D4 H3L3抗体分子安全性好。

[0215] 实施例16本发明抗体的药代动力学研究

[0216] 78D4 H3L3抗体分子按照10mg/kg剂量在食蟹猴体内开展了单次给药的药代动力学研究(N=3)。

[0217] 食蟹猴,雄性,每只动物经四肢静脉滴注给予78D4 H3L3抗体分子10mg/kg,单次给药。于给药前0h(pre-dose,0h),给药开始后0.25h(15min)、0.5h(拔针点)、4h、24h(D2)、48h(D3)、96h(D5)、168h(D8)、336h(D15)、504h(D22)、672h(D29)进行采血。采血部位为动物四肢外周静脉(非给药肢)或腹股沟静脉取血。采血量为约1mL全血/只/时间点。采用ELISA法测定食蟹猴血清中抗体浓度;采用非房室模型分析的方法,通过WinNonlin Phoenix(v6.4, Pharsight公司)软件计算AUClast、CL、T1/2等药代动力学参数。

[0218] 采用ELISA法测定食蟹猴血清中78D4 H3L3抗体浓度,血清药物浓度个体图见图13,药代动力学参数汇总见表8,各动物给药后均可见药物暴露。

[0219] 表8.抗体78D4 H3L3的药代动力学结果

		动物 ID						
		111	112	113	N	平均值	SD	CV%
参数	单位	估值						
AUC <sub>INF_obs</sub>	h*ng/mL	26900000	44700000	64300000	3	45300000	18700000	41.3
AUC <sub>last</sub>	h*ng/mL	26800000	43200000	60700000	3	43600000	17000000	38.9
C <sub>0</sub>	ng/mL	431000	387000	592000	3	470000	108000	22.9
Cl <sub>obs</sub>	mL/h/kg	0.744	0.447	0.311	3	0.501	0.222	44.2
MRT <sub>last</sub>	h	83.8	160	170	3	138	47.1	34.2
T <sub>1/2z</sub>	h	99.2	140	173	3	137	36.9	26.9
V <sub>z_obs</sub>	mL/kg	107	90.4	77.6	3	91.5	14.5	15.8

[0221] 以上对本发明具体实施方式的描述并不限制本发明,本领域技术人员可以根据本发明作出各种改变或变形,只要不脱离本发明的精神,均应属于本发明所附权利要求的范围。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 迈威(上海)生物科技有限公司
- [0003] 上海普铭生物科技有限公司
- [0004] <120> 抗 $\alpha$ -溶血素的抗体及其应用
- [0005] <130> LC19110042
- [0006] <160> 87
- [0007] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0008] <210> 1
- [0009] <211> 7
- [0010] <212> PRT
- [0011] <213> 人工(artificial)
- [0012] <220>
- [0013] <221> PEPTIDE
- [0014] <222> ()..()
- [0015] <223> 重链,CDR1
- [0016] <400> 1
- [0017] Gly Phe Thr Phe Ser Thr Phe
- [0018] 1 5
- [0019] <210> 2
- [0020] <211> 10
- [0021] <212> PRT
- [0022] <213> 人工(artificial)
- [0023] <220>
- [0024] <221> PEPTIDE
- [0025] <222> ()..()
- [0026] <223> 重链,CDR1
- [0027] <400> 2
- [0028] Gly Phe Thr Phe Ser Thr Phe Gly Met His
- [0029] 1 5 10
- [0030] <210> 3
- [0031] <211> 5
- [0032] <212> PRT
- [0033] <213> 人工(artificial)
- [0034] <220>
- [0035] <221> PEPTIDE
- [0036] <222> ()..()
- [0037] <223> 重链,CDR1
- [0038] <400> 3

[0039] Thr Phe Gly Met His  
 [0040] 1 5  
 [0041] <210> 4  
 [0042] <211> 6  
 [0043] <212> PRT  
 [0044] <213> 人工(artificial)  
 [0045] <220>  
 [0046] <221> PEPTIDE  
 [0047] <222> ()..()  
 [0048] <223> 重链,CDR2  
 [0049] <400> 4  
 [0050] Ser Gly Gly Ser Ser Thr  
 [0051] 1 5  
 [0052] <210> 5  
 [0053] <211> 10  
 [0054] <212> PRT  
 [0055] <213> 人工(artificial)  
 [0056] <220>  
 [0057] <221> PEPTIDE  
 [0058] <222> ()..()  
 [0059] <223> 重链,CDR2  
 [0060] <400> 5  
 [0061] Tyr Ile Ser Gly Gly Ser Ser Thr Ile Tyr  
 [0062] 1 5 10  
 [0063] <210> 6  
 [0064] <211> 17  
 [0065] <212> PRT  
 [0066] <213> 人工(artificial)  
 [0067] <220>  
 [0068] <221> PEPTIDE  
 [0069] <222> ()..()  
 [0070] <223> 重链,CDR2  
 [0071] <400> 6  
 [0072] Tyr Ile Ser Gly Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys  
 [0073] 1 5 10 15  
 [0074] Gly  
 [0075] <210> 7  
 [0076] <211> 8  
 [0077] <212> PRT

[0078] <213> 人工(artificial)  
[0079] <220>  
[0080] <221> PEPTIDE  
[0081] <222> ()..()  
[0082] <223> 重链,CDR3  
[0083] <400> 7  
[0084] Gly Tyr Pro Tyr Gly Leu Asp Tyr  
[0085] 1 5  
[0086] <210> 8  
[0087] <211> 11  
[0088] <212> PRT  
[0089] <213> 人工(artificial)  
[0090] <220>  
[0091] <221> PEPTIDE  
[0092] <222> ()..()  
[0093] <223> 轻链,CDR1  
[0094] <400> 8  
[0095] Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Trp Tyr Leu Ser  
[0096] 1 5 10  
[0097] <210> 9  
[0098] <211> 7  
[0099] <212> PRT  
[0100] <213> 人工(artificial)  
[0101] <220>  
[0102] <221> PEPTIDE  
[0103] <222> ()..()  
[0104] <223> 轻链,CDR2  
[0105] <400> 9  
[0106] Arg Gly Asn Arg Leu Val Asp  
[0107] 1 5  
[0108] <210> 10  
[0109] <211> 9  
[0110] <212> PRT  
[0111] <213> 人工(artificial)  
[0112] <220>  
[0113] <221> PEPTIDE  
[0114] <222> ()..()  
[0115] <223> 轻链,CDR3  
[0116] <400> 10

[0117] Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Phe Thr  
 [0118] 1 5  
 [0119] <210> 11  
 [0120] <211> 7  
 [0121] <212> PRT  
 [0122] <213> 人工(artificial)  
 [0123] <220>  
 [0124] <221> PEPTIDE  
 [0125] <222> ()..()  
 [0126] <223> 轻链,CDR2  
 [0127] <400> 11  
 [0128] Arg Gly Asn Arg Leu Val Glu  
 [0129] 1 5  
 [0130] <210> 12  
 [0131] <211> 7  
 [0132] <212> PRT  
 [0133] <213> 人工(artificial)  
 [0134] <220>  
 [0135] <221> PEPTIDE  
 [0136] <222> ()..()  
 [0137] <223> 重链,CDR1  
 [0138] <400> 12  
 [0139] Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr  
 [0140] 1 5  
 [0141] <210> 13  
 [0142] <211> 10  
 [0143] <212> PRT  
 [0144] <213> 人工(artificial)  
 [0145] <220>  
 [0146] <221> PEPTIDE  
 [0147] <222> ()..()  
 [0148] <223> 重链,CDR1  
 [0149] <400> 13  
 [0150] Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Met Asn  
 [0151] 1 5 10  
 [0152] <210> 14  
 [0153] <211> 5  
 [0154] <212> PRT  
 [0155] <213> 人工(artificial)

[0156] <220>  
[0157] <221> PEPTIDE  
[0158] <222> ()..()  
[0159] <223> 重链,CDR1  
[0160] <400> 14  
[0161] Ser Tyr Trp Met Asn  
[0162] 1 5  
[0163] <210> 15  
[0164] <211> 6  
[0165] <212> PRT  
[0166] <213> 人工(artificial)  
[0167] <220>  
[0168] <221> PEPTIDE  
[0169] <222> ()..()  
[0170] <223> 重链,CDR2  
[0171] <400> 15  
[0172] His Pro Ser Asp Ser Glu  
[0173] 1 5  
[0174] <210> 16  
[0175] <211> 10  
[0176] <212> PRT  
[0177] <213> 人工(artificial)  
[0178] <220>  
[0179] <221> PEPTIDE  
[0180] <222> ()..()  
[0181] <223> 重链,CDR2  
[0182] <400> 16  
[0183] Met Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Arg  
[0184] 1 5 10  
[0185] <210> 17  
[0186] <211> 17  
[0187] <212> PRT  
[0188] <213> 人工(artificial)  
[0189] <220>  
[0190] <221> PEPTIDE  
[0191] <222> ()..()  
[0192] <223> 重链,CDR2  
[0193] <400> 17  
[0194] Met Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Arg Leu Ser Gln Lys Phe Lys

[0195]	1	5	10	15
[0196]	Asp			
[0197]	<210> 18			
[0198]	<211> 9			
[0199]	<212> PRT			
[0200]	<213> 人工(artificial)			
[0201]	<220>			
[0202]	<221> PEPTIDE			
[0203]	<222> ()..()			
[0204]	<223> 重链,CDR3			
[0205]	<400> 18			
[0206]	Phe Asp Trp Asp Arg Ala Met Asp Tyr			
[0207]	1	5		
[0208]	<210> 19			
[0209]	<211> 11			
[0210]	<212> PRT			
[0211]	<213> 人工(artificial)			
[0212]	<220>			
[0213]	<221> PEPTIDE			
[0214]	<222> ()..()			
[0215]	<223> 轻链,CDR1			
[0216]	<400> 19			
[0217]	Arg Ala Ser Glu Asn Ile Phe Ser Tyr Leu Ala			
[0218]	1	5	10	
[0219]	<210> 20			
[0220]	<211> 7			
[0221]	<212> PRT			
[0222]	<213> 人工(artificial)			
[0223]	<220>			
[0224]	<221> PEPTIDE			
[0225]	<222> ()..()			
[0226]	<223> 轻链,CDR2			
[0227]	<400> 20			
[0228]	Asn Thr Arg Ser Leu Ala Glu			
[0229]	1	5		
[0230]	<210> 21			
[0231]	<211> 9			
[0232]	<212> PRT			
[0233]	<213> 人工(artificial)			

[0234] <220>  
 [0235] <221> PEPTIDE  
 [0236] <222> ()..()  
 [0237] <223> 轻链,CDR3  
 [0238] <400> 21  
 [0239] Gln His His Tyr Gly Thr Pro Trp Thr  
 [0240] 1 5  
 [0241] <210> 22  
 [0242] <211> 7  
 [0243] <212> PRT  
 [0244] <213> 人工(artificial)  
 [0245] <220>  
 [0246] <221> PEPTIDE  
 [0247] <222> ()..()  
 [0248] <223> 重链,CDR1  
 [0249] <400> 22  
 [0250] Gly Tyr Thr Phe Ser Glu Tyr  
 [0251] 1 5  
 [0252] <210> 23  
 [0253] <211> 10  
 [0254] <212> PRT  
 [0255] <213> 人工(artificial)  
 [0256] <220>  
 [0257] <221> PEPTIDE  
 [0258] <222> ()..()  
 [0259] <223> 重链,CDR1  
 [0260] <400> 23  
 [0261] Gly Tyr Thr Phe Ser Glu Tyr Thr Met His  
 [0262] 1 5 10  
 [0263] <210> 24  
 [0264] <211> 5  
 [0265] <212> PRT  
 [0266] <213> 人工(artificial)  
 [0267] <220>  
 [0268] <221> PEPTIDE  
 [0269] <222> ()..()  
 [0270] <223> 重链,CDR1  
 [0271] <400> 24  
 [0272] Glu Tyr Thr Met His





[0351] Arg Ala Ser Lys Asn Ile Leu Lys Tyr Leu Ala  
 [0352] 1 5 10  
 [0353] <210> 32  
 [0354] <211> 7  
 [0355] <212> PRT  
 [0356] <213> 人工(artificial)  
 [0357] <220>  
 [0358] <221> PEPTIDE  
 [0359] <222> ()..()  
 [0360] <223> 轻链,CDR2  
 [0361] <400> 32  
 [0362] Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser  
 [0363] 1 5  
 [0364] <210> 33  
 [0365] <211> 9  
 [0366] <212> PRT  
 [0367] <213> 人工(artificial)  
 [0368] <220>  
 [0369] <221> PEPTIDE  
 [0370] <222> ()..()  
 [0371] <223> 轻链,CDR3  
 [0372] <400> 33  
 [0373] Gln Gln His Tyr Glu Tyr Pro Phe Thr  
 [0374] 1 5  
 [0375] <210> 34  
 [0376] <211> 7  
 [0377] <212> PRT  
 [0378] <213> 人工(artificial)  
 [0379] <220>  
 [0380] <221> PEPTIDE  
 [0381] <222> ()..()  
 [0382] <223> 重链,CDR1  
 [0383] <400> 34  
 [0384] Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr  
 [0385] 1 5  
 [0386] <210> 35  
 [0387] <211> 10  
 [0388] <212> PRT  
 [0389] <213> 人工(artificial)

[0390] <220>  
[0391] <221> PEPTIDE  
[0392] <222> ()..()  
[0393] <223> 重链,CDR1  
[0394] <400> 35  
[0395] Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Met His  
[0396] 1 5 10  
[0397] <210> 36  
[0398] <211> 5  
[0399] <212> PRT  
[0400] <213> 人工(artificial)  
[0401] <220>  
[0402] <221> PEPTIDE  
[0403] <222> ()..()  
[0404] <223> 重链,CDR1  
[0405] <400> 36  
[0406] Asp Thr Tyr Met His  
[0407] 1 5  
[0408] <210> 37  
[0409] <211> 6  
[0410] <212> PRT  
[0411] <213> 人工(artificial)  
[0412] <220>  
[0413] <221> PEPTIDE  
[0414] <222> ()..()  
[0415] <223> 重链,CDR2  
[0416] <400> 37  
[0417] Asp Pro Ala Ser Gly Asn  
[0418] 1 5  
[0419] <210> 38  
[0420] <211> 10  
[0421] <212> PRT  
[0422] <213> 人工(artificial)  
[0423] <220>  
[0424] <221> PEPTIDE  
[0425] <222> ()..()  
[0426] <223> 重链,CDR2  
[0427] <400> 38  
[0428] Lys Ile Asp Pro Ala Ser Gly Asn Thr Lys

[0429]	1	5	10
[0430]	<210> 39		
[0431]	<211> 17		
[0432]	<212> PRT		
[0433]	<213> 人工(artificial)		
[0434]	<220>		
[0435]	<221> PEPTIDE		
[0436]	<222> ()..()		
[0437]	<223> 重链,CDR2		
[0438]	<400> 39		
[0439]	Lys Ile Asp Pro Ala Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Gln Phe Gln		
[0440]	1	5	10 15
[0441]	Gly		
[0442]	<210> 40		
[0443]	<211> 10		
[0444]	<212> PRT		
[0445]	<213> 人工(artificial)		
[0446]	<220>		
[0447]	<221> PEPTIDE		
[0448]	<222> ()..()		
[0449]	<223> 重链,CDR3		
[0450]	<400> 40		
[0451]	Pro Tyr Gly Asn Asp Tyr Ala Met Asn Tyr		
[0452]	1	5	10
[0453]	<210> 41		
[0454]	<211> 11		
[0455]	<212> PRT		
[0456]	<213> 人工(artificial)		
[0457]	<220>		
[0458]	<221> PEPTIDE		
[0459]	<222> ()..()		
[0460]	<223> 轻链,CDR1		
[0461]	<400> 41		
[0462]	Arg Ala Ser Glu Lys Ile Tyr Ser Phe Leu Ala		
[0463]	1	5	10
[0464]	<210> 42		
[0465]	<211> 7		
[0466]	<212> PRT		
[0467]	<213> 人工(artificial)		

[0468] <220>  
 [0469] <221> PEPTIDE  
 [0470] <222> ()..()  
 [0471] <223> 轻链,CDR2  
 [0472] <400> 42  
 [0473] Asn Ala Glu Thr Leu Ala Glu  
 [0474] 1 5  
 [0475] <210> 43  
 [0476] <211> 9  
 [0477] <212> PRT  
 [0478] <213> 人工(artificial)  
 [0479] <220>  
 [0480] <221> PEPTIDE  
 [0481] <222> ()..()  
 [0482] <223> 轻链,CDR3  
 [0483] <400> 43  
 [0484] Gln His His Tyr Gly Thr Pro Tyr Thr  
 [0485] 1 5  
 [0486] <210> 44  
 [0487] <211> 117  
 [0488] <212> PRT  
 [0489] <213> 人工(artificial)  
 [0490] <220>  
 [0491] <221> PEPTIDE  
 [0492] <222> ()..()  
 [0493] <223> 重链可变区  
 [0494] <400> 44  
 [0495] Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 [0496] 1 5 10 15  
 [0497] Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Phe  
 [0498] 20 25 30  
 [0499] Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 [0500] 35 40 45  
 [0501] Ala Tyr Ile Ser Gly Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val  
 [0502] 50 55 60  
 [0503] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Pro Lys Asn Thr Leu Phe  
 [0504] 65 70 75 80  
 [0505] Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 [0506] 85 90 95

[0507] Ala Ser Gly Tyr Pro Tyr Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser  
 [0508] 100 105 110  
 [0509] Val Thr Val Ser Ser  
 [0510] 115  
 [0511] <210> 45  
 [0512] <211> 351  
 [0513] <212> DNA  
 [0514] <213> 人工(artificial)  
 [0515] <220>  
 [0516] <221> gene  
 [0517] <222> ()..()  
 [0518] <223> 重链可变区  
 [0519] <400> 45  
 [0520] gatgtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc ccggaaactc 60  
 [0521] tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt acctttggaa tgcactgggt tcgtcagget 120  
 [0522] ccagagaagg ggctggagtg ggtcgcatac attagtgggt gcagtagtac catctactat 180  
 [0523] gcagacacag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atcccaagaa caccctgttc 240  
 [0524] ctgcaaatga ccagtctaag gtctgaggac acggccatgt attactgtgc aagcggctac 300  
 [0525] ccctatggtt tggactactg gggccaagga acctcagtca ccgtctcctc a 351  
 [0526] <210> 46  
 [0527] <211> 107  
 [0528] <212> PRT  
 [0529] <213> 人工(artificial)  
 [0530] <220>  
 [0531] <221> PEPTIDE  
 [0532] <222> ()..()  
 [0533] <223> 轻链可变区  
 [0534] <400> 46  
 [0535] Asp Ile Asp Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly  
 [0536] 1 5 10 15  
 [0537] Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Trp Tyr  
 [0538] 20 25 30  
 [0539] Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile  
 [0540] 35 40 45  
 [0541] Tyr Arg Gly Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 [0542] 50 55 60  
 [0543] Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr  
 [0544] 65 70 75 80  
 [0545] Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Phe

[0546]		85		90		95
[0547]	Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys					
[0548]		100		105		
[0549]	<210> 47					
[0550]	<211> 321					
[0551]	<212> DNA					
[0552]	<213> 人工(artificial)					
[0553]	<220>					
[0554]	<221> gene					
[0555]	<222> ()..()					
[0556]	<223> 轻链可变区					
[0557]	<400> 47					
[0558]	gacatcgaca tgaccagtc tccatcttcc atgtatgcat ctctaggaga gagagtcaact	60				
[0559]	atcacttgca aggcgagtca ggacattaat tggatatttaa gttggttcca gcagaaacca	120				
[0560]	gggaaatctc ctaagaccct gatctatcgt ggaaacagat tggtagatgg ggtcccatca	180				
[0561]	aggttcagtg gcagtggatc tgggcaagat tattctctca ccatcagcag cctggagtat	240				
[0562]	gaagatatgg gaatttatta ttgtctacag tatgatgagt ttccattcac gttcggctcg	300				
[0563]	gggacaaagt tggaaataaa a	321				
[0564]	<210> 48					
[0565]	<211> 117					
[0566]	<212> PRT					
[0567]	<213> 人工(artificial)					
[0568]	<220>					
[0569]	<221> PEPTIDE					
[0570]	<222> ()..()					
[0571]	<223> 重链可变区					
[0572]	<400> 48					
[0573]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly					
[0574]	1	5		10		15
[0575]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Phe					
[0576]		20		25		30
[0577]	Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val					
[0578]		35		40		45
[0579]	Ser Tyr Ile Ser Gly Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val					
[0580]		50		55		60
[0581]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr					
[0582]	65		70		75	80
[0583]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys					
[0584]		85		90		95

[0585] Ala Ser Gly Tyr Pro Tyr Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 [0586]                   100                   105                   110  
 [0587] Val Thr Val Ser Ser  
 [0588]                   115  
 [0589] <210> 49  
 [0590] <211> 351  
 [0591] <212> DNA  
 [0592] <213> 人工(artificial)  
 [0593] <220>  
 [0594] <221> gene  
 [0595] <222> ()..()  
 [0596] <223> 重链可变区  
 [0597] <400> 49  
 [0598] gaggtgcagc tgggtggagag cgggggggga ctggtgcagc caggaggaag cctgagactg 60  
 [0599] agctgtgccg caagcggggtt cacatthtagt acctttggaa tgcactgggt gaggcaggcc 120  
 [0600] cccggcaaag ggctggagtg ggtgtcttat atttccggcg gaagtagcac catatactac 180  
 [0601] gctgatacag tgaagggcag attcaccata agcagggaca acgccaagaa cagcctgtac 240  
 [0602] ctgcagatga acagcctgag agccgaagac accgctgtgt actactgcgc cagcggctac 300  
 [0603] ccctacggcc tggattactg gggacaagga aacttggtga ccgtgagcag c 351  
 [0604] <210> 50  
 [0605] <211> 107  
 [0606] <212> PRT  
 [0607] <213> 人工(artificial)  
 [0608] <220>  
 [0609] <221> PEPTIDE  
 [0610] <222> ()..()  
 [0611] <223> 轻链可变区  
 [0612] <400> 50  
 [0613] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 [0614] 1                   5                   10                   15  
 [0615] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Trp Tyr  
 [0616]                   20                   25                   30  
 [0617] Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr Leu Ile  
 [0618]                   35                   40                   45  
 [0619] Tyr Arg Gly Asn Arg Leu Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 [0620]                   50                   55                   60  
 [0621] Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 [0622] 65                   70                   75                   80  
 [0623] Glu Asp Met Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Phe

[0624]		85		90		95
[0625]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys					
[0626]		100		105		
[0627]	<210> 51					
[0628]	<211> 321					
[0629]	<212> DNA					
[0630]	<213> 人工(artificial)					
[0631]	<220>					
[0632]	<221> gene					
[0633]	<222> ()..()					
[0634]	<223> 轻链可变区					
[0635]	<400> 51					
[0636]	gacattcaga tgaccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtagggaga cagagtgacc	60				
[0637]	ataacctgca aagccagcca agacatcaac tggatatctgt cctggtttca gcagaagccc	120				
[0638]	ggcaaagccc caaaaacct catctaccgg ggaacagac tggtaggaagg ggtgccagc	180				
[0639]	agatttagcg gaagcggcag cggccaggac tacaccttca ccatatcaag cctgcagccc	240				
[0640]	gaagacatgg ccacctacta ctgcctgcag tacgacgaat ttccatttac cttcggacag	300				
[0641]	ggaaccaaag tcgagatcaa a	321				
[0642]	<210> 52					
[0643]	<211> 118					
[0644]	<212> PRT					
[0645]	<213> 人工(artificial)					
[0646]	<220>					
[0647]	<221> PEPTIDE					
[0648]	<222> ()..()					
[0649]	<223> 重链可变区					
[0650]	<400> 52					
[0651]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala					
[0652]	1	5		10		15
[0653]	Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr					
[0654]		20		25		30
[0655]	Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile					
[0656]		35		40		45
[0657]	Gly Met Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Arg Leu Ser Gln Lys Phe					
[0658]		50		55		60
[0659]	Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr					
[0660]	65	70		75		80
[0661]	Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys					
[0662]		85		90		95

[0663] Thr Arg Phe Asp Trp Asp Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 [0664]                   100                   105                   110  
 [0665] Ser Val Thr Val Ser Ser  
 [0666]                   115  
 [0667] <210> 53  
 [0668] <211> 354  
 [0669] <212> DNA  
 [0670] <213> 人工(artificial)  
 [0671] <220>  
 [0672] <221> gene  
 [0673] <222> ()..()  
 [0674] <223> 重链可变区  
 [0675] <400> 53  
 [0676] caggtccaac tgcagcagcc tggggctgag ctggtgagge ctggagcttc agtgaagctg 60  
 [0677] tcttgcaagg cttctggcta ctccttcacc agctactgga tgaactgggt gaagcagagg 120  
 [0678] cctggacaag gccttgagtg gattggcatg attcattcctt ccgatagtga aactaggtta 180  
 [0679] agtcagaagt tcaaggacaa ggccacattg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240  
 [0680] atgcaactca gcagccccgac atctgaggac tctgcggtct attactgtac aagattcgac 300  
 [0681] tgggaccggg ctatggacta ctgggggtcaa ggaacctcag tcaccgtctc ctca 354  
 [0682] <210> 54  
 [0683] <211> 107  
 [0684] <212> PRT  
 [0685] <213> 人工(artificial)  
 [0686] <220>  
 [0687] <221> PEPTIDE  
 [0688] <222> ()..()  
 [0689] <223> 轻链可变区  
 [0690] <400> 54  
 [0691] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 [0692] 1                   5                   10                   15  
 [0693] Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Phe Ser Tyr  
 [0694]                   20                   25                   30  
 [0695] Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val  
 [0696]                   35                   40                   45  
 [0697] Tyr Asn Thr Arg Ser Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 [0698]                   50                   55                   60  
 [0699] Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro  
 [0700] 65                   70                   75                   80  
 [0701] Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Trp

[0702]		85		90		95
[0703]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys					
[0704]		100		105		
[0705]	<210> 55					
[0706]	<211> 321					
[0707]	<212> DNA					
[0708]	<213> 人工(artificial)					
[0709]	<220>					
[0710]	<221> gene					
[0711]	<222> ()..()					
[0712]	<223> 轻链可变区					
[0713]	<400> 55					
[0714]	gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcat ctgtgggaga aactgtcacc				60	
[0715]	atcacatgtc gagcaagtga gaatattttc agttatntag catggtatca acagaaacag				120	
[0716]	ggaaaatctc ctcagctcct ggtctataat acaagatcct tagcagaagg tgtgccatca				180	
[0717]	aggttcagtg gcagtgatc aggcacacag ttttctctga agatcaacag cctgcagcct				240	
[0718]	gaagatcttg ggacttatta ctgtcaacat cattatggta ctccgtggac gttcggtgga				300	
[0719]	ggcaccaagc tggaaatcaa a				321	
[0720]	<210> 56					
[0721]	<211> 118					
[0722]	<212> PRT					
[0723]	<213> 人工(artificial)					
[0724]	<220>					
[0725]	<221> PEPTIDE					
[0726]	<222> ()..()					
[0727]	<223> 重链可变区					
[0728]	<400> 56					
[0729]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala					
[0730]	1	5		10		15
[0731]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr					
[0732]		20		25		30
[0733]	Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met					
[0734]		35		40		45
[0735]	Gly Met Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Arg Leu Ser Gln Lys Phe					
[0736]		50		55		60
[0737]	Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr					
[0738]	65	70		75		80
[0739]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys					
[0740]		85		90		95

[0741] Ala Arg Phe Asp Trp Asp Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 [0742]                   100                   105                   110  
 [0743] Leu Val Thr Val Ser Ser  
 [0744]                   115  
 [0745] <210> 57  
 [0746] <211> 354  
 [0747] <212> DNA  
 [0748] <213> 人工(artificial)  
 [0749] <220>  
 [0750] <221> gene  
 [0751] <222> ()..()  
 [0752] <223> 重链可变区  
 [0753] <400> 57  
 [0754] caggtccaac tcgtccaaag cggcgcagaa gtcaaaaagc cggcgcacatc agtcaaagtt 60  
 [0755] agctgcaagg ccagcggcta cagcttcaca tcatactgga tgaactgggt gggcaagcc 120  
 [0756] cccggccaag gtctcgaatg gatgggaatg atccaccca gcgacagcga gaccaggctg 180  
 [0757] agccagaaat ttaaagacag agtcaccatg accagagaca cctccacctc aaccgtctat 240  
 [0758] atggaactga gcagcctcag aagcaggagac accgccgtgt attactgcgc ccggttcgac 300  
 [0759] tgggacagag ccatggacta ctggggccaa ggcaccctcg ttaccgtgag cagc 354  
 [0760] <210> 58  
 [0761] <211> 107  
 [0762] <212> PRT  
 [0763] <213> 人工(artificial)  
 [0764] <220>  
 [0765] <221> PEPTIDE  
 [0766] <222> ()..()  
 [0767] <223> 轻链可变区  
 [0768] <400> 58  
 [0769] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 [0770] 1                   5                   10                   15  
 [0771] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Phe Ser Tyr  
 [0772]                   20                   25                   30  
 [0773] Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 [0774]                   35                   40                   45  
 [0775] Tyr Asn Thr Arg Ser Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 [0776]                   50                   55                   60  
 [0777] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 [0778] 65                   70                   75                   80  
 [0779] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Trp

[0780]		85		90		95
[0781]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys					
[0782]		100		105		
[0783]	<210> 59					
[0784]	<211> 321					
[0785]	<212> DNA					
[0786]	<213> 人工(artificial)					
[0787]	<220>					
[0788]	<221> gene					
[0789]	<222> ()..()					
[0790]	<223> 轻链可变区					
[0791]	<400> 59					
[0792]	gacattcaga tgaccagag cccagcagc ctgagcgcca gcggtgggaga cagagtgacc	60				
[0793]	ataacctgca gagccagcga gaacatattc tcatacctcg cctggtacca gcagaaacc	120				
[0794]	ggcaaagccc caaaactgct catctacaac acaagaagcc tggctgaagg agtgcccagc	180				
[0795]	agattcagcg ggtcaggcag cggcaccgac ttcaccctga ccatcagcag cctgcaacca	240				
[0796]	gaagacttcg ccacctacta ctgccaacac cactacggca cccctggac cttcggacaa	300				
[0797]	ggcaccaaac tcgagatcaa a	321				
[0798]	<210> 60					
[0799]	<211> 122					
[0800]	<212> PRT					
[0801]	<213> 人工(artificial)					
[0802]	<220>					
[0803]	<221> PEPTIDE					
[0804]	<222> ()..()					
[0805]	<223> 重链可变区					
[0806]	<400> 60					
[0807]	Glu Val His Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala					
[0808]	1	5		10		15
[0809]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Glu Tyr					
[0810]		20		25		30
[0811]	Thr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile					
[0812]		35		40		45
[0813]	Gly Ser Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe					
[0814]		50		55		60
[0815]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr					
[0816]	65	70		75		80
[0817]	Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Asn Cys					
[0818]		85		90		95

[0819]	Ala Arg Thr Arg Asp Tyr Asp Asn Asp Gly Gly Leu Phe Ala Tyr Trp
[0820]	100                    105                    110
[0821]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
[0822]	115                    120
[0823]	<210> 61
[0824]	<211> 366
[0825]	<212> DNA
[0826]	<213> 人工(artificial)
[0827]	<220>
[0828]	<221> gene
[0829]	<222> ()..()
[0830]	<223> 重链可变区
[0831]	<400> 61
[0832]	gaggtccacc tgcaacagtc tggacctgag ctgatgaagc ctggggcttc agtgaagata 60
[0833]	tcttgcaaga cttctggata cacattcagt gaatacacca tgcactgggt gaagcagagc 120
[0834]	catggaaaga gccttgagtg gattggaagt attaatccta acaatgggtg tactacctac 180
[0835]	aaccagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgtagaca agtcctccag cacagcctac 240
[0836]	atggagctcc gcagcctgac atctgaggat tctgcagtct ataactgtgc aagaactagg 300
[0837]	gactatgata acgacggggg tctttttgct tactggggcc aagggactct ggtcactgtc 360
[0838]	tctgca 366
[0839]	<210> 62
[0840]	<211> 107
[0841]	<212> PRT
[0842]	<213> 人工(artificial)
[0843]	<220>
[0844]	<221> PEPTIDE
[0845]	<222> ()..()
[0846]	<223> 轻链可变区
[0847]	<400> 62
[0848]	Asp Val Gln Ile Thr Gln Ser Pro Ser Tyr Leu Ala Ala Ser Pro Gly
[0849]	1                    5                    10                    15
[0850]	Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Asn Ile Ser Lys Tyr
[0851]	20                    25                    30
[0852]	Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Thr Asn Lys Leu Leu Ile
[0853]	35                    40                    45
[0854]	Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[0855]	50                    55                    60
[0856]	Asn Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
[0857]	65                    70                    75                    80

[0858] Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Glu Tyr Pro Phe  
 [0859] 85 90 95  
 [0860] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 [0861] 100 105  
 [0862] <210> 63  
 [0863] <211> 321  
 [0864] <212> DNA  
 [0865] <213> 人工(artificial)  
 [0866] <220>  
 [0867] <221> gene  
 [0868] <222> ()..()  
 [0869] <223> 轻链可变区  
 [0870] <400> 63  
 [0871] gatgtccaga taaccagtc tccatcttat cttgctgeat ctctggaga aaccattact 60  
 [0872] attaattgca gggcaagtaa gaacattagc aatatatttag cctggatatca agagaaacct 120  
 [0873] gggaaaacta ataagcttct tatctactct ggatccactt tgcaatctgg aattccatca 180  
 [0874] aggttcagtg gcaatagatc tggtagacat ttcactctca ccatcagtag cctggagcct 240  
 [0875] gaagattttg caatgtatta ctgtcaacaa cattatgaat acccgttcac gttcggaggg 300  
 [0876] gggaccaagc tggaaataaa a 321  
 [0877] <210> 64  
 [0878] <211> 122  
 [0879] <212> PRT  
 [0880] <213> 人工(artificial)  
 [0881] <220>  
 [0882] <221> PEPTIDE  
 [0883] <222> ()..()  
 [0884] <223> 重链可变区  
 [0885] <400> 64  
 [0886] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 [0887] 1 5 10 15  
 [0888] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Glu Tyr  
 [0889] 20 25 30  
 [0890] Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met  
 [0891] 35 40 45  
 [0892] Gly Ser Ile Asn Pro Asn Gln Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe  
 [0893] 50 55 60  
 [0894] Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr  
 [0895] 65 70 75 80  
 [0896] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys



[0936]	65	70	75	80
[0937]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Glu Tyr Pro Phe			
[0938]		85	90	95
[0939]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
[0940]		100	105	
[0941]	<210> 67			
[0942]	<211> 321			
[0943]	<212> DNA			
[0944]	<213> 人工(artificial)			
[0945]	<220>			
[0946]	<221> gene			
[0947]	<222> ()..()			
[0948]	<223> 轻链可变区			
[0949]	<400> 67			
[0950]	gacgtgcaga ttacccaaag ccccagcttc ctgtccgcca gcgtggggcga cagagtgaca	60		
[0951]	attacatgca gagccagcaa gaacatactg aagtacctgg catggtacca acaaaaaccc	120		
[0952]	ggcaaggccc ccaaactgct catctactcc ggcagtaccc tgcagagcgg cgtgccccagc	180		
[0953]	agattcagcg gaagcagaag cggcaccgag ttcactctga ccatcagcag cctccaacca	240		
[0954]	gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag cactacgaat accccttcac cttcggccag	300		
[0955]	ggcaccaagc tggagatcaa a	321		
[0956]	<210> 68			
[0957]	<211> 119			
[0958]	<212> PRT			
[0959]	<213> 人工(artificial)			
[0960]	<220>			
[0961]	<221> PEPTIDE			
[0962]	<222> ()..()			
[0963]	<223> 重链可变区			
[0964]	<400> 68			
[0965]	Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala			
[0966]	1	5	10	15
[0967]	Ser Val Thr Leu Ser Cys Thr Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr			
[0968]		20	25	30
[0969]	Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile			
[0970]		35	40	45
[0971]	Gly Lys Ile Asp Pro Ala Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Gln Phe			
[0972]		50	55	60
[0973]	Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr			
[0974]	65	70	75	80

[0975] Leu His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys  
 [0976]                               85                               90                               95  
 [0977] Ala Ser Pro Tyr Gly Asn Asp Tyr Ala Met Asn Tyr Trp Gly Gln Gly  
 [0978]                               100                               105                               110  
 [0979] Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 [0980]                               115  
 [0981] <210> 69  
 [0982] <211> 357  
 [0983] <212> DNA  
 [0984] <213> 人工(artificial)  
 [0985] <220>  
 [0986] <221> gene  
 [0987] <222> ()..()  
 [0988] <223> 重链可变区  
 [0989] <400> 69  
 [0990] gaggttcagc tgcagcagtc tggggcagaa cttgtgaagc caggggcctc agtcacgttg 60  
 [0991] tcctgcacag tttctggctt caacattaaa gacacctata tgcactgggt gaaacagagg 120  
 [0992] cctgaacagg gcctggagtg gattggaaag attgatcctg cgagtggtaa tactaaatat 180  
 [0993] gaccgcagc tccagggcaa ggccactata acagcagaca catcctccaa cacagcctac 240  
 [0994] ctgcacctca gcagcctgac atctgaggac agtgccgtct atttctgtgc tagcccctat 300  
 [0995] ggtaacgact atgctatgaa ctactgggga caaggaacct cagtcaccgt ctctca 357  
 [0996] <210> 70  
 [0997] <211> 107  
 [0998] <212> PRT  
 [0999] <213> 人工(artificial)  
 [1000] <220>  
 [1001] <221> PEPTIDE  
 [1002] <222> ()..()  
 [1003] <223> 轻链可变区  
 [1004] <400> 70  
 [1005] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 [1006] 1                               5                               10                               15  
 [1007] Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Lys Ile Tyr Ser Phe  
 [1008]                               20                               25                               30  
 [1009] Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Glu Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val  
 [1010]                               35                               40                               45  
 [1011] Tyr Asn Ala Glu Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 [1012]                               50                               55                               60  
 [1013] Thr Gly Ser Gly Ile Gln Phe Ser Leu Lys Ile Ile Ser Leu Gln Pro

[1014]	65	70	75	80
[1015]	Glu Asp Phe Gly Ile Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Tyr			
[1016]		85	90	95
[1017]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
[1018]		100	105	
[1019]	<210> 71			
[1020]	<211> 321			
[1021]	<212> DNA			
[1022]	<213> 人工(artificial)			
[1023]	<220>			
[1024]	<221> gene			
[1025]	<222> ()..()			
[1026]	<223> 轻链可变区			
[1027]	<400> 71			
[1028]	gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcat ctgtgggaga aactgtcacc 60			
[1029]	atcacatgtc gagcaagtga gaaaatttac agtttttttag catggtatca gcagaaacag 120			
[1030]	gaaaaatctc ctcaactcct ggtctataat gcagaaacct tagcagaagg tgtgccatca 180			
[1031]	aggttcagtg gcaactggatc gggcatccag ttttctctga agattatcag cctgcagcct 240			
[1032]	gaagatthttg ggatttatta ctgtcaacat cattatggta ctccgtacac gttcggaggg 300			
[1033]	gggaccaagt tggaaataaa a 321			
[1034]	<210> 72			
[1035]	<211> 119			
[1036]	<212> PRT			
[1037]	<213> 人工(artificial)			
[1038]	<220>			
[1039]	<221> PEPTIDE			
[1040]	<222> ()..()			
[1041]	<223> 重链可变区			
[1042]	<400> 72			
[1043]	Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
[1044]	1	5	10	15
[1045]	Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr			
[1046]		20	25	30
[1047]	Tyr Met His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met			
[1048]		35	40	45
[1049]	Gly Lys Ile Asp Pro Ala Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Gln Phe			
[1050]		50	55	60
[1051]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr			
[1052]	65	70	75	80

[1053] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 [1054]                               85                               90                               95  
 [1055] Ala Thr Pro Tyr Gly Asn Asp Tyr Ala Met Asn Tyr Trp Gly Gln Gly  
 [1056]                               100                               105                               110  
 [1057] Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 [1058]                               115  
 [1059] <210> 73  
 [1060] <211> 357  
 [1061] <212> DNA  
 [1062] <213> 人工(artificial)  
 [1063] <220>  
 [1064] <221> gene  
 [1065] <222> ()..()  
 [1066] <223> 重链可变区  
 [1067] <400> 73  
 [1068] gaggtgcagc tgggtgcagag cggagcagag gtgaagaagc caggggccac agtgaagata 60  
 [1069] agctgtaagg tgagcggatt caacattaag gacacatata tgcactgggt gcagcaggca 120  
 [1070] cccggcaaag gactggagtg gatgggaaag atcgaccccg ccagtggcaa taccaagtac 180  
 [1071] gacccccagt tccagggccg agtgaccatc accgcagaca ccagcaccaa cacagcctac 240  
 [1072] atggagctga gcagcctccg cagcgaagac acagccgtgt actactgcgc caccacctat 300  
 [1073] ggcaacgact acgctatgaa ttactggggc cagggaacac tggtcaccgt gtccagc 357  
 [1074] <210> 74  
 [1075] <211> 107  
 [1076] <212> PRT  
 [1077] <213> 人工(artificial)  
 [1078] <220>  
 [1079] <221> PEPTIDE  
 [1080] <222> ()..()  
 [1081] <223> 轻链可变区  
 [1082] <400> 74  
 [1083] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 [1084] 1                               5                               10                               15  
 [1085] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Lys Ile Tyr Ser Phe  
 [1086]                               20                               25                               30  
 [1087] Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Leu  
 [1088]                               35                               40                               45  
 [1089] Tyr Asn Ala Glu Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 [1090]                               50                               55                               60  
 [1091] Ser Gly Ser Gly Ile Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

[1092]	65	70	75	80
[1093]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Tyr			
[1094]		85	90	95
[1095]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
[1096]		100	105	
[1097]	<210>	75		
[1098]	<211>	321		
[1099]	<212>	DNA		
[1100]	<213>	人工(artificial)		
[1101]	<220>			
[1102]	<221>	gene		
[1103]	<222>	()..()		
[1104]	<223>	轻链可变区		
[1105]	<400>	75		
[1106]	gacattcaga tgaccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtgggaga cagagtgacc	60		
[1107]	ataacctgca gagccagcga gaaaatatat agctttctgg cctggtatca gcagaagccc	120		
[1108]	ggaaaagccc caaaactgct gctgtacaac gcagaaacct tggcagaggg agtgcccagc	180		
[1109]	agattcagcg gatcaggaag cggcatcgac ttcaccctga ccatcagcag cctgcaacct	240		
[1110]	gaagacttcg ccacctacta ctgccaacac cactacggca cccatacac cttcggagga	300		
[1111]	ggcacaaagg tcgaaatcaa a	321		
[1112]	<210>	76		
[1113]	<211>	107		
[1114]	<212>	PRT		
[1115]	<213>	人工(artificial)		
[1116]	<220>			
[1117]	<221>	PEPTIDE		
[1118]	<222>	()..()		
[1119]	<223>	轻链可变区		
[1120]	<400>	76		
[1121]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
[1122]	1	5	10	15
[1123]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Trp Tyr			
[1124]		20	25	30
[1125]	Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr Leu Ile			
[1126]		35	40	45
[1127]	Tyr Arg Gly Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
[1128]		50	55	60
[1129]	Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
[1130]	65	70	75	80

[1131]	Glu Asp Met Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Phe		
[1132]		85	90 95
[1133]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
[1134]		100	105
[1135]	<210> 77		
[1136]	<211> 321		
[1137]	<212> DNA		
[1138]	<213> 人工(artificial)		
[1139]	<220>		
[1140]	<221> gene		
[1141]	<222> ()..()		
[1142]	<223> 轻链可变区		
[1143]	<400> 77		
[1144]	gacattcaga tgaccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtgggaga cagagtgacc	60	
[1145]	ataacctgca aagccagcca agacatcaac tggatatctgt cctggtttca gcagaagccc	120	
[1146]	ggcaaagccc caaaaacct catctaccgg ggaacagac tggtaggacgg agtgcccagc	180	
[1147]	agattcagcg gaagcggcag cgggcaagac tacaccttca ccatatcaag cctgcagccc	240	
[1148]	gaagacatgg ccacctacta ctgcctgcag tacgacgaat tccccctttac cttcggccaa	300	
[1149]	gggaccaagg tggagatcaa g	321	
[1150]	<210> 78		
[1151]	<211> 294		
[1152]	<212> PRT		
[1153]	<213> 金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)		
[1154]	<400> 78		
[1155]	Met Ala Asp Ser Asp Ile Asn Ile Lys Thr Gly Thr Thr Asp Ile Gly		
[1156]	1	5	10 15
[1157]	Ser Asn Thr Thr Val Lys Thr Gly Asp Leu Val Thr Tyr Asp Lys Glu		
[1158]		20	25 30
[1159]	Asn Gly Met His Lys Lys Val Phe Tyr Ser Phe Ile Asp Asp Lys Asn		
[1160]		35	40 45
[1161]	His Asn Lys Lys Leu Leu Val Ile Arg Thr Lys Gly Thr Ile Ala Gly		
[1162]		50	55 60
[1163]	Gln Tyr Arg Val Tyr Ser Glu Glu Gly Ala Asn Lys Ser Gly Leu Ala		
[1164]		65	70 75 80
[1165]	Trp Pro Ser Ala Phe Lys Val Gln Leu Gln Leu Pro Asp Asn Glu Val		
[1166]		85	90 95
[1167]	Ala Gln Ile Ser Asp Tyr Tyr Pro Arg Asn Ser Ile Asp Thr Lys Glu		
[1168]		100	105 110
[1169]	Tyr Met Ser Thr Leu Thr Tyr Gly Phe Asn Gly Asn Val Thr Gly Asp		

[1170]	115	120	125
[1171]	Asp Thr Gly Lys Ile Gly Gly Leu Ile Gly Ala Asn Val Ser Ile Gly		
[1172]	130	135	140
[1173]	His Thr Leu Lys Tyr Val Gln Pro Asp Phe Lys Thr Ile Leu Glu Ser		
[1174]	145	150	155
[1175]	Pro Thr Asp Lys Lys Val Gly Trp Lys Val Ile Phe Asn Asn Met Val		
[1176]	165	170	175
[1177]	Asn Gln Asn Trp Gly Pro Tyr Asp Arg Asp Ser Trp Asn Pro Val Tyr		
[1178]	180	185	190
[1179]	Gly Asn Gln Leu Phe Met Lys Thr Arg Asn Gly Ser Met Lys Ala Ala		
[1180]	195	200	205
[1181]	Asp Asn Phe Leu Asp Pro Asn Lys Ala Ser Ser Leu Leu Ser Ser Gly		
[1182]	210	215	220
[1183]	Phe Ser Pro Asp Phe Ala Thr Val Ile Thr Met Asp Arg Lys Ala Ser		
[1184]	225	230	235
[1185]	Lys Gln Gln Thr Asn Ile Asp Val Ile Tyr Glu Arg Val Arg Asp Asp		
[1186]	245	250	255
[1187]	Tyr Gln Leu His Trp Thr Ser Thr Asn Trp Lys Gly Thr Asn Thr Lys		
[1188]	260	265	270
[1189]	Asp Lys Trp Thr Asp Arg Ser Ser Glu Arg Tyr Lys Ile Asp Trp Glu		
[1190]	275	280	285
[1191]	Lys Glu Glu Met Thr Asn		
[1192]	290		
[1193]	<210> 79		
[1194]	<211> 891		
[1195]	<212> DNA		
[1196]	<213> 金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)		
[1197]	<400> 79		
[1198]	catatggcag acagcgacat taacattaaa accggcacca ccgatatcgg aagcaatacc 60		
[1199]	accgtaaaaa cgggagatct ggtcacctat gataaagaaa acggcatgct gaaaaagggtg 120		
[1200]	ttttatagct ttatcgacga taaaaaccac aataaaaagc tgttagtgat ccgcacccaaa 180		
[1201]	ggtacaatcg caggtcaata cagagtttat agcgaagaag gtgccaataa aagcggctctg 240		
[1202]	gcatggccga ggcatttaa agtgcagctg cagctgccgg acaatgaagt tgcacagata 300		
[1203]	agcgactatt atccacgtaa tagtattgac acaaaggaat atatgagcac cctgacctat 360		
[1204]	ggttttaacg gtaatgttac cggatgatgac accggtaaga ttgggggatt aattgggtgca 420		
[1205]	aatgtttcta ttggtcacac cctgaaatat gttcaaccgg attttaagac catcctggaa 480		
[1206]	tctccgacag ataaaaaggt ggggtggaaa gttatcttta ataatatggt taaccagaac 540		
[1207]	tggggcccgt atgatcgcca tagctggaat ccagtttatg gtaatcagct gttcatgaaa 600		
[1208]	acacgcaatg gcagcatgaa agcagcagat aactttctgg acccgaataa agcaagcagc 660		

[1209] ctgctgagca gcggtttttc accggacttt gcaaccgtta tcaccatgga tcgcaaagcc 720  
 [1210] tcaaaacagc agaccaacat tgatgttatac tacgaaagag tacgcgatga ttaccagtta 780  
 [1211] cattggacaa gcaccaattg gaaagggacc aataccaaag acaaatggac cgatagaagc 840  
 [1212] agcgaacggt ataaaattga ttgggagaaa gaagaaatga ccaatctcga g 891  
 [1213] <210> 80  
 [1214] <211> 294  
 [1215] <212> PRT  
 [1216] <213> 人工(artificial)  
 [1217] <220>  
 [1218] <221> PEPTIDE  
 [1219] <222> ()..()  
 [1220] <223> 突变 $\alpha$ -溶血素  
 [1221] <400> 80  
 [1222] Met Ala Asp Ser Asp Ile Asn Ile Lys Thr Gly Thr Thr Asp Ile Gly  
 [1223] 1 5 10 15  
 [1224] Ser Asn Thr Thr Val Lys Thr Gly Asp Leu Val Thr Tyr Asp Lys Glu  
 [1225] 20 25 30  
 [1226] Asn Gly Met Leu Lys Lys Val Phe Tyr Ser Phe Ile Asp Asp Lys Asn  
 [1227] 35 40 45  
 [1228] His Asn Lys Lys Leu Leu Val Ile Arg Thr Lys Gly Thr Ile Ala Gly  
 [1229] 50 55 60  
 [1230] Gln Tyr Arg Val Tyr Ser Glu Glu Gly Ala Asn Lys Ser Gly Leu Ala  
 [1231] 65 70 75 80  
 [1232] Trp Pro Ser Ala Phe Lys Val Gln Leu Gln Leu Pro Asp Asn Glu Val  
 [1233] 85 90 95  
 [1234] Ala Gln Ile Ser Asp Tyr Tyr Pro Arg Asn Ser Ile Asp Thr Lys Glu  
 [1235] 100 105 110  
 [1236] Tyr Met Ser Thr Leu Thr Tyr Gly Phe Asn Gly Asn Val Thr Gly Asp  
 [1237] 115 120 125  
 [1238] Asp Thr Gly Lys Ile Gly Gly Leu Ile Gly Ala Asn Val Ser Ile Gly  
 [1239] 130 135 140  
 [1240] His Thr Leu Lys Tyr Val Gln Pro Asp Phe Lys Thr Ile Leu Glu Ser  
 [1241] 145 150 155 160  
 [1242] Pro Thr Asp Lys Lys Val Gly Trp Lys Val Ile Phe Asn Asn Met Val  
 [1243] 165 170 175  
 [1244] Asn Gln Asn Trp Gly Pro Tyr Asp Arg Asp Ser Trp Asn Pro Val Tyr  
 [1245] 180 185 190  
 [1246] Gly Asn Gln Leu Phe Met Lys Thr Arg Asn Gly Ser Met Lys Ala Ala  
 [1247] 195 200 205

[1248]	Asp Asn Phe Leu Asp Pro Asn Lys Ala Ser Ser Leu Leu Ser Ser Gly
[1249]	210 215 220
[1250]	Phe Ser Pro Asp Phe Ala Thr Val Ile Thr Met Asp Arg Lys Ala Ser
[1251]	225 230 235 240
[1252]	Lys Gln Gln Thr Asn Ile Asp Val Ile Tyr Glu Arg Val Arg Asp Asp
[1253]	245 250 255
[1254]	Tyr Gln Leu His Trp Thr Ser Thr Asn Trp Lys Gly Thr Asn Thr Lys
[1255]	260 265 270
[1256]	Asp Lys Trp Thr Asp Arg Ser Ser Glu Arg Tyr Lys Ile Asp Trp Glu
[1257]	275 280 285
[1258]	Lys Glu Glu Met Thr Asn
[1259]	290
[1260]	<210> 81
[1261]	<211> 891
[1262]	<212> DNA
[1263]	<213> 人工(artificial)
[1264]	<220>
[1265]	<221> gene
[1266]	<222> ()..()
[1267]	<223> 突变 $\alpha$ -溶血素
[1268]	<400> 81
[1269]	catatggcag acagcgacat taacattaaa accggcacca ccgatatcgg aagcaatacc 60
[1270]	accgtaaaaa cgggagatct ggtcacctat gataaagaaa acggcatgct gaaaaagggtg 120
[1271]	ttttatagct ttatcgacga taaaaaccac aataaaaagc tgttagtgat ccgcacccaaa 180
[1272]	ggtacaatcg cagggtcaata cagagtttat agcgaagaag gtgccaataa aagcgggtctg 240
[1273]	gcatggccga gcgcatthta agtgcagctg cagctgccgg acaatgaagt tgcacagata 300
[1274]	agcgactatt atccacgtaa tagtattgac acaaaggaat atatgagcac cctgacctat 360
[1275]	ggttttaacg gtaatgttac cggatgatgac accgtaaga ttgggggatt aattgggtgca 420
[1276]	aatgtttcta ttggtcacac cctgaaatat gttcaaccgg attttaagac catcctggaa 480
[1277]	tctccgacag ataaaaaggt ggggtggaaa gttatcttta ataatatggt taaccagaac 540
[1278]	tggggcccgat atgatcgcga tagctggaat ccagtttatg gtaatcagct gttcatgaaa 600
[1279]	acacgcaatg gcagcatgaa agcagcagat aactttctgg acccgaataa agcaagcagc 660
[1280]	ctgctgagca gcggtttttc accggacttt gcaaccgtta tcaccatgga tcgcaaagcc 720
[1281]	tcaaaacagc agaccaacat tgatgtttatc tacgaaagag tacgcgatga ttaccagtta 780
[1282]	cattggacaa gcaccaattg gaaagggacc aataccaaag acaaatggac cgatagaagc 840
[1283]	agcgaacggt ataaaattga ttgggagaaa gaagaaatga ccaatctcga g 891
[1284]	<210> 82
[1285]	<211> 129
[1286]	<212> PRT

[1287] <213> 人工(artificial)  
 [1288] <220>  
 [1289] <221> PEPTIDE  
 [1290] <222> ()..()  
 [1291] <223> 重链可变区  
 [1292] <400> 82  
 [1293] Glu Val Gln Met Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
 [1294] 1 5 10 15  
 [1295] Pro Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Lys Phe Gly Thr His  
 [1296] 20 25 30  
 [1297] Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 [1298] 35 40 45  
 [1299] Gly Ile Ile His Pro Ala Asp Ser Glu Thr Lys Tyr Ser Pro Ser Phe  
 [1300] 50 55 60  
 [1301] Gln Gly Gln Val Ser Phe Ser Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr  
 [1302] 65 70 75 80  
 [1303] Leu His Trp Ser Thr Leu Arg Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 [1304] 85 90 95  
 [1305] Ala Arg Arg Ser Gly Ser Ser Ser Trp Tyr Ala Leu Asp Phe Trp Gly  
 [1306] 100 105 110  
 [1307] Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
 [1308] 115 120 125  
 [1309] Val  
 [1310] <210> 83  
 [1311] <211> 123  
 [1312] <212> PRT  
 [1313] <213> 人工(artificial)  
 [1314] <220>  
 [1315] <221> PEPTIDE  
 [1316] <222> ()..()  
 [1317] <223> 轻链可变区  
 [1318] <400> 83  
 [1319] Gln Ser Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln  
 [1320] 1 5 10 15  
 [1321] Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Gly Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn  
 [1322] 20 25 30  
 [1323] Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Phe Pro Gly Ala Ala Pro Lys Leu Leu  
 [1324] 35 40 45  
 [1325] Ile Tyr Thr Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

[1326]	50	55	60
[1327]	Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln		
[1328]	65	70	75 80
[1329]	Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu		
[1330]	85	90	95
[1331]	Asn Gly Leu Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly		
[1332]	100	105	110
[1333]	Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe		
[1334]	115	120	
[1335]	<210> 84		
[1336]	<211> 122		
[1337]	<212> PRT		
[1338]	<213> 人工(artificial)		
[1339]	<220>		
[1340]	<221> PEPTIDE		
[1341]	<222> ()..()		
[1342]	<223> 重链可变区		
[1343]	<400> 84		
[1344]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
[1345]	1 5 10 15		
[1346]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser His		
[1347]	20 25 30		
[1348]	Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
[1349]	35 40 45		
[1350]	Ser Gly Ile Gly Thr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys		
[1351]	50 55 60		
[1352]	Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu		
[1353]	65 70 75 80		
[1354]	Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala		
[1355]	85 90 95		
[1356]	Arg Asp Arg Tyr Ser Pro Thr Gly His Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp		
[1357]	100 105 110		
[1358]	Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		
[1359]	115 120		
[1360]	<210> 85		
[1361]	<211> 106		
[1362]	<212> PRT		
[1363]	<213> 人工(artificial)		
[1364]	<220>		

[1365]	<221>	PEPTIDE
[1366]	<222>	()..()
[1367]	<223>	轻链可变区
[1368]	<400>	85
[1369]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly	
[1370]	1	5 10 15
[1371]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp	
[1372]		20 25 30
[1373]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile	
[1374]		35 40 45
[1375]	Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
[1376]		50 55 60
[1377]	Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	
[1378]	65	70 75 80
[1379]	Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Lys Gln Tyr Ala Asp Tyr Trp Thr	
[1380]		85 90 95
[1381]	Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
[1382]		100 105
[1383]	<210>	86
[1384]	<211>	330
[1385]	<212>	PRT
[1386]	<213>	人工(artificial)
[1387]	<220>	
[1388]	<221>	PEPTIDE
[1389]	<222>	()..()
[1390]	<223>	重链恒定区
[1391]	<400>	86
[1392]	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys	
[1393]	1	5 10 15
[1394]	Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr	
[1395]		20 25 30
[1396]	Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser	
[1397]		35 40 45
[1398]	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser	
[1399]		50 55 60
[1400]	Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr	
[1401]	65	70 75 80
[1402]	Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys	
[1403]		85 90 95

[1404]	Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
[1405]	100                                  105                                  110
[1406]	Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
[1407]	115                                  120                                  125
[1408]	Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
[1409]	130                                  135                                  140
[1410]	Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
[1411]	145                                  150                                  155                                  160
[1412]	Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
[1413]	165                                  170                                  175
[1414]	Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
[1415]	180                                  185                                  190
[1416]	His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
[1417]	195                                  200                                  205
[1418]	Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
[1419]	210                                  215                                  220
[1420]	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
[1421]	225                                  230                                  235                                  240
[1422]	Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
[1423]	245                                  250                                  255
[1424]	Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
[1425]	260                                  265                                  270
[1426]	Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
[1427]	275                                  280                                  285
[1428]	Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
[1429]	290                                  295                                  300
[1430]	Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
[1431]	305                                  310                                  315                                  320
[1432]	Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[1433]	325                                  330
[1434]	<210> 87
[1435]	<211> 107
[1436]	<212> PRT
[1437]	<213> 人工(artificial)
[1438]	<220>
[1439]	<221> PEPTIDE
[1440]	<222> ()..()
[1441]	<223> 轻链恒定区
[1442]	<400> 87



*NdeI*-WT- $\alpha$ -toxin-*XhoI*-His.tag-stop

```

ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLVY
DKENGMHKKVFYSFIDDKNHNKLLVI
RTKGTIAGQYRVYSEEGANKSGLAWP
SAFKVQLQLPDNEVAQISDYYPNSID
TKEYMSTLTYGFNGNVTGDDTGKIGG
LIGANVSIGHTLKYVQPDFKTILESPTDK
KVGWVKVIFNNMVNQNWGPYDRDS
WNPVYGNQLFMKTRNGSMKAADNF
LDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDRK
ASKQQTNIIDVIYERVRDDYQLHWTST
NWKGTNTKDKWTDRSSERYKIDWEKE
EMTN

```

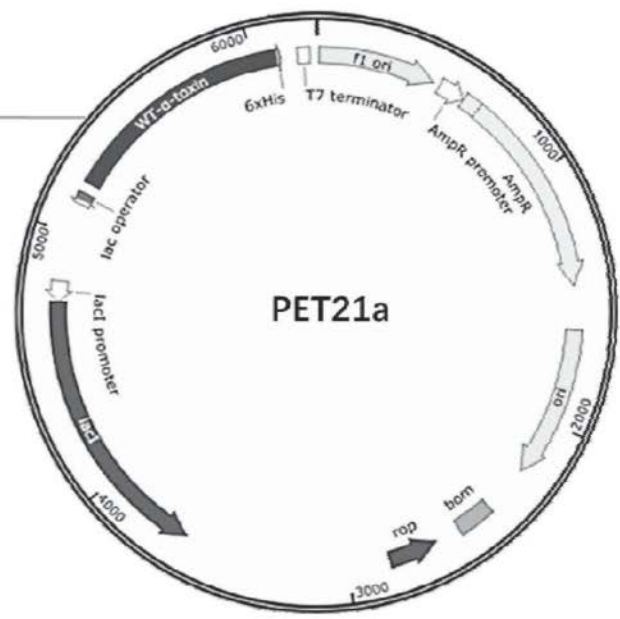


图1

```

MADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLV
TYDKENGMLKKVFYSFIDDKNHNKLL
VIRTKGTIAGQYRVYSEEGANKSGLAW
PSAFKVQLQLPDNEVAQISDYYPNSI
DTKCYMSTLTYGFNGNVTGDDTGKIG
GLIGANVSIGHTLKYVQPDFKTILESPT
DKKVGWVKVIFNNMVNQNWGPYDRD
SWNPVYGNQLFMKTRNGSMKAADNF
FLDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDRK
ASKQQTNIIDVIYERVRDDYQLHWTST
NWKGTNTKDKWTDRSSERYKIDWEKE
EMTN

```

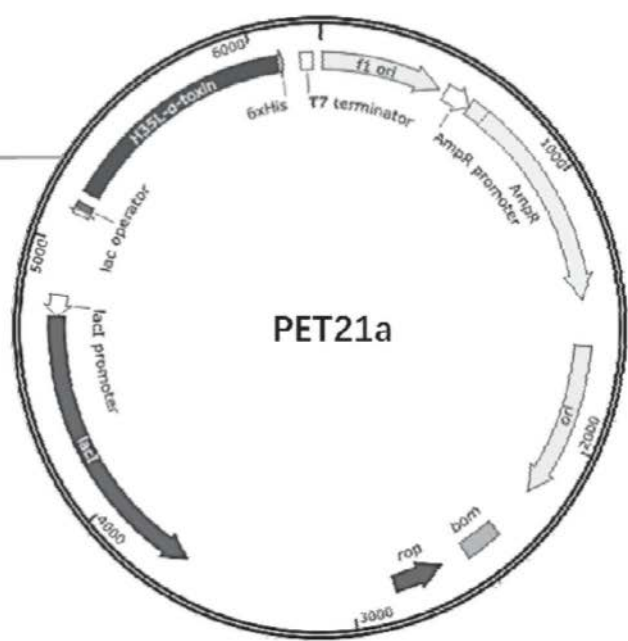


图2

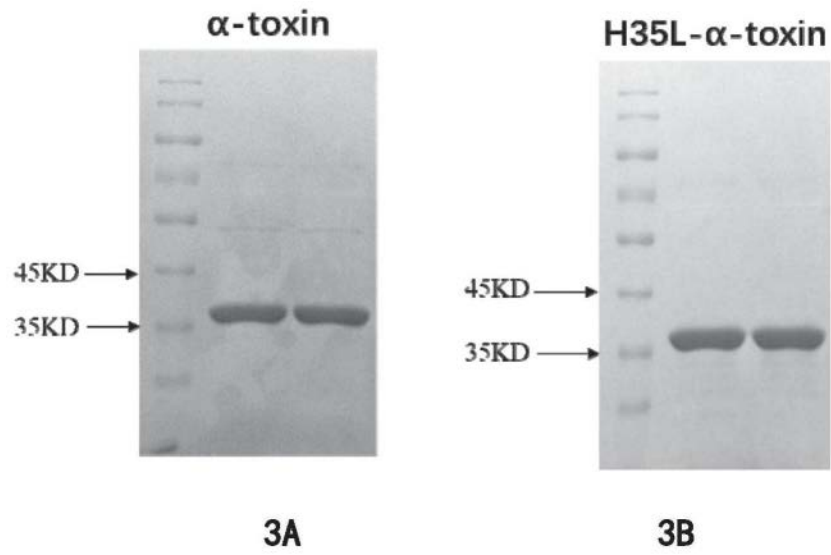


图3



图4

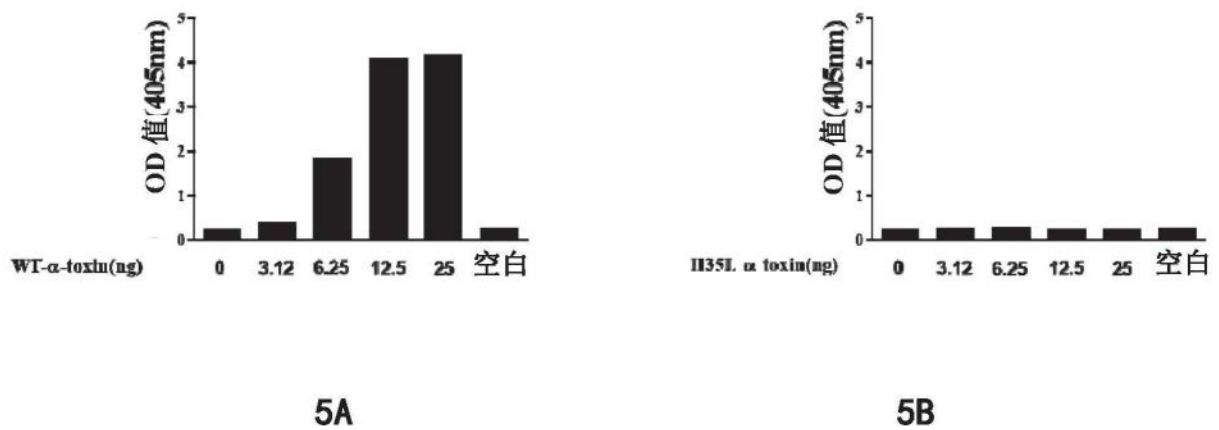


图5



6A

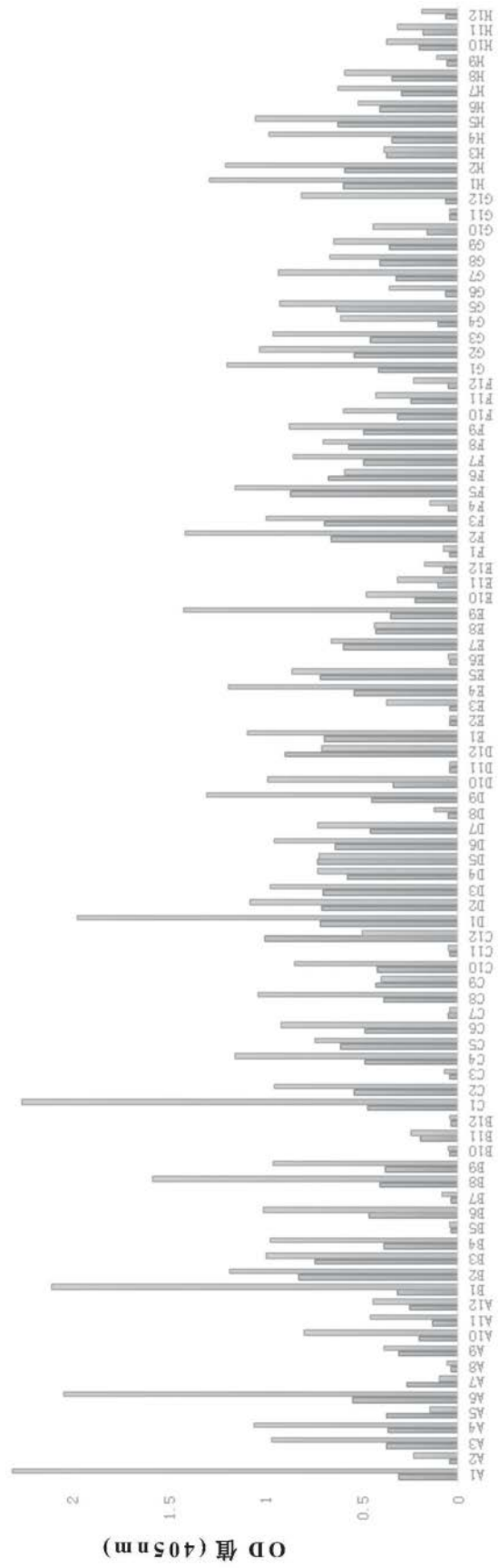
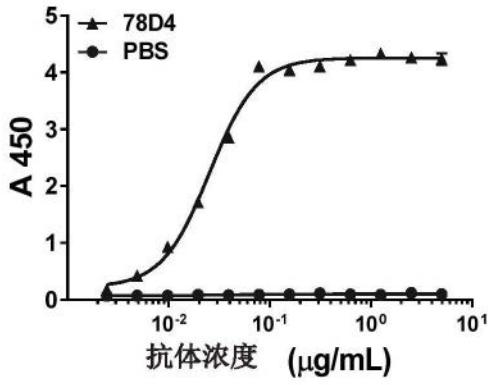
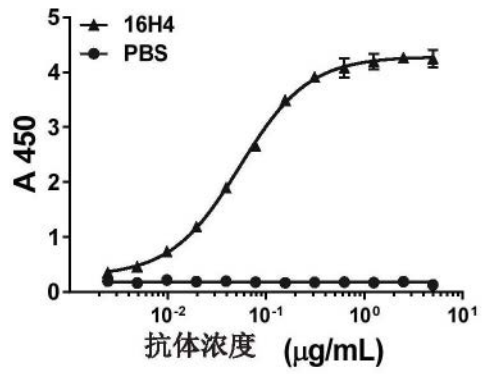


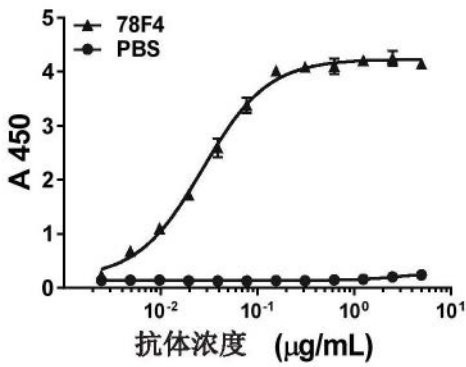
图6



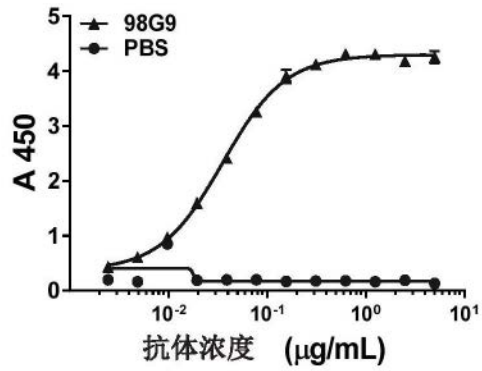
7A



7B

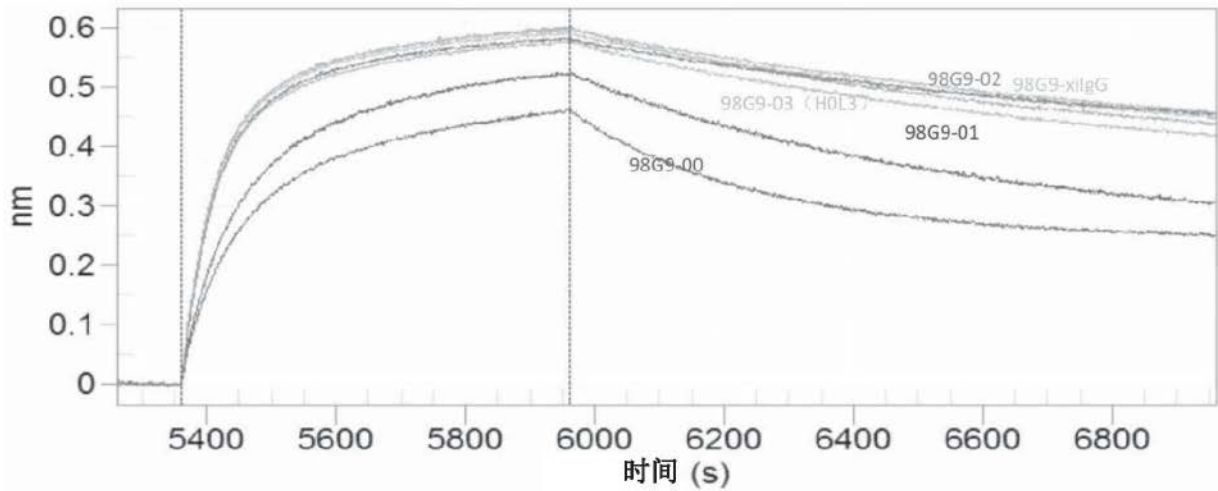


7C

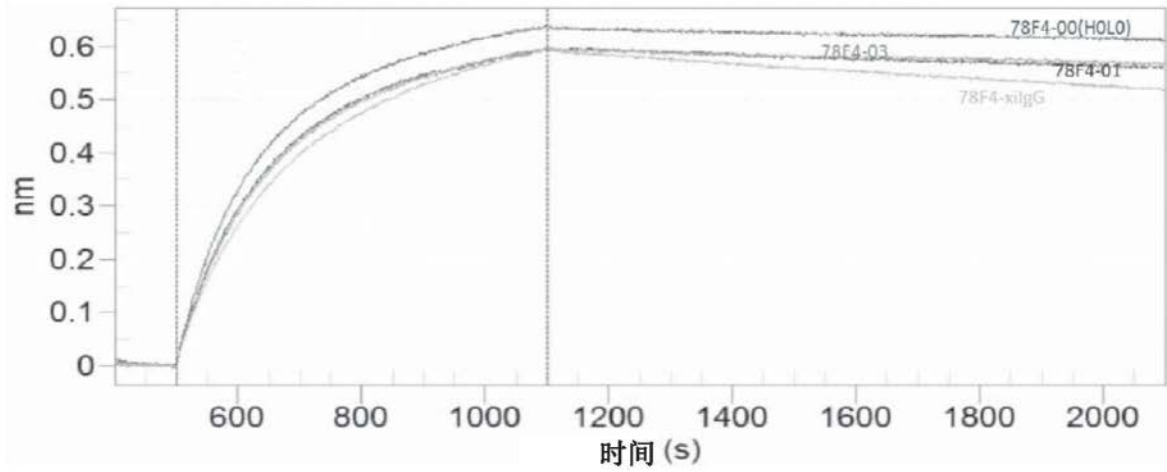


7D

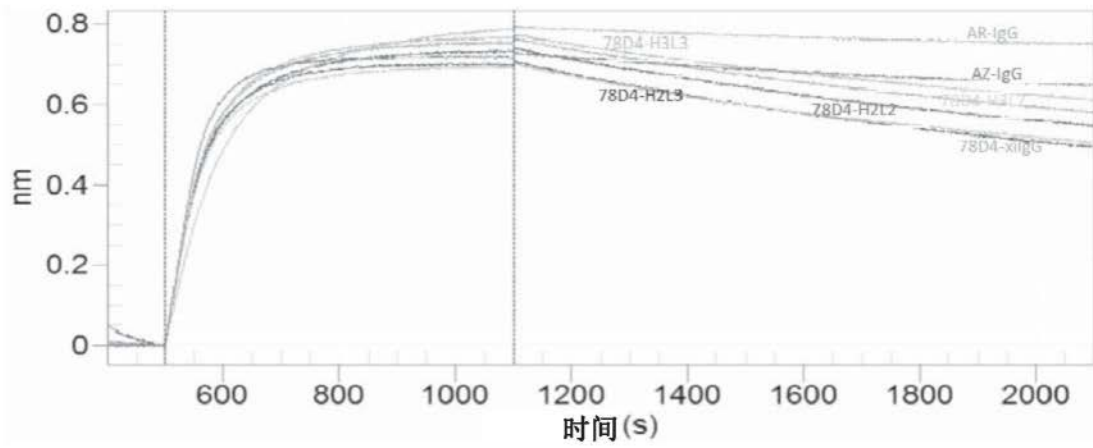
图7



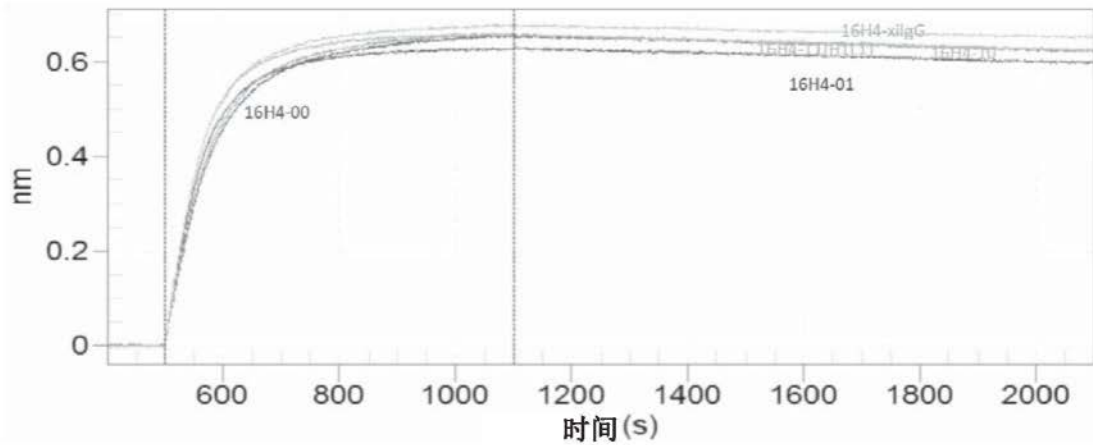
8A



8B

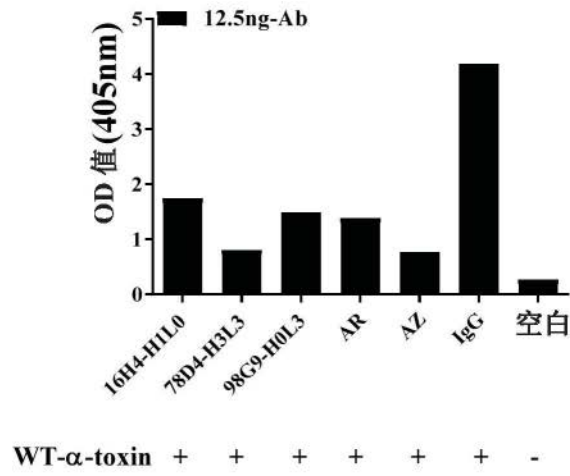


8C

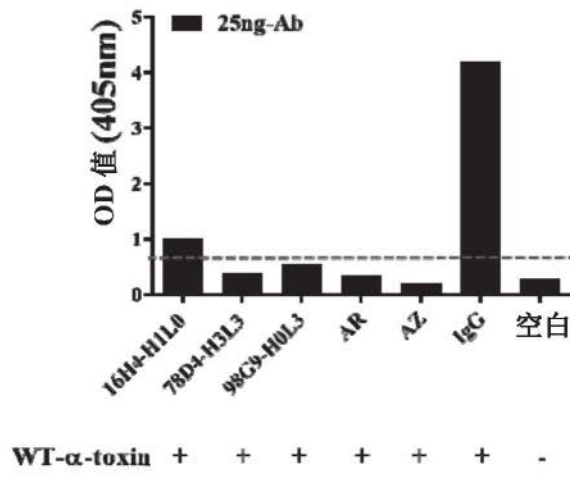


8D

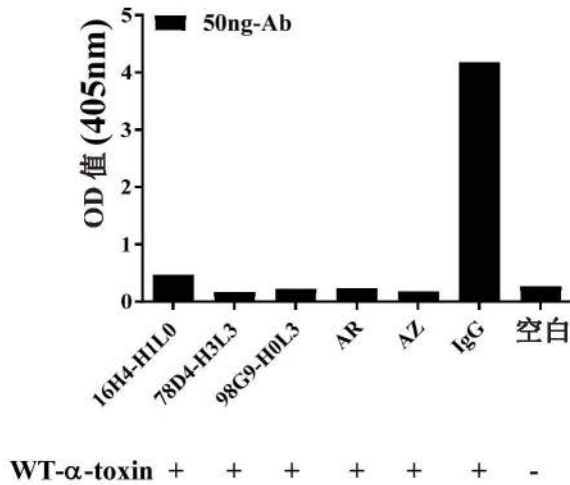
图8



9A



9B



9C

图9

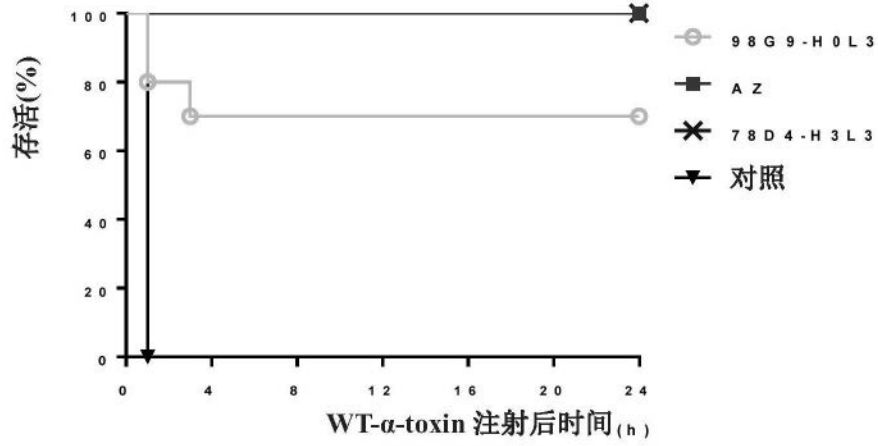


图10

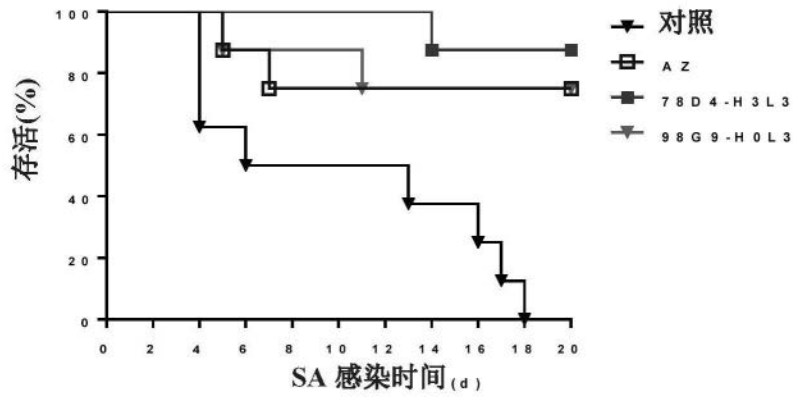


图11

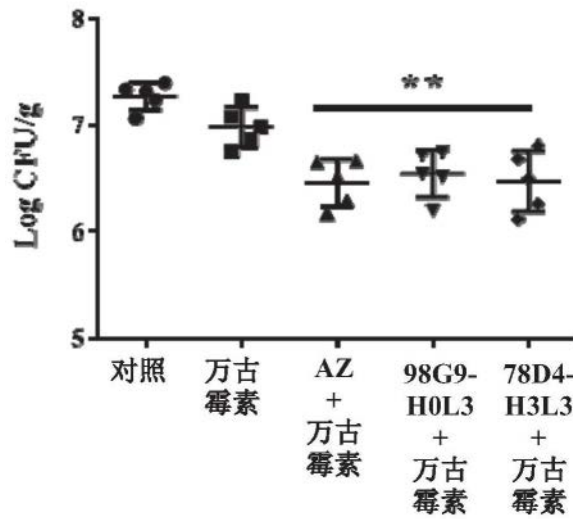


图12

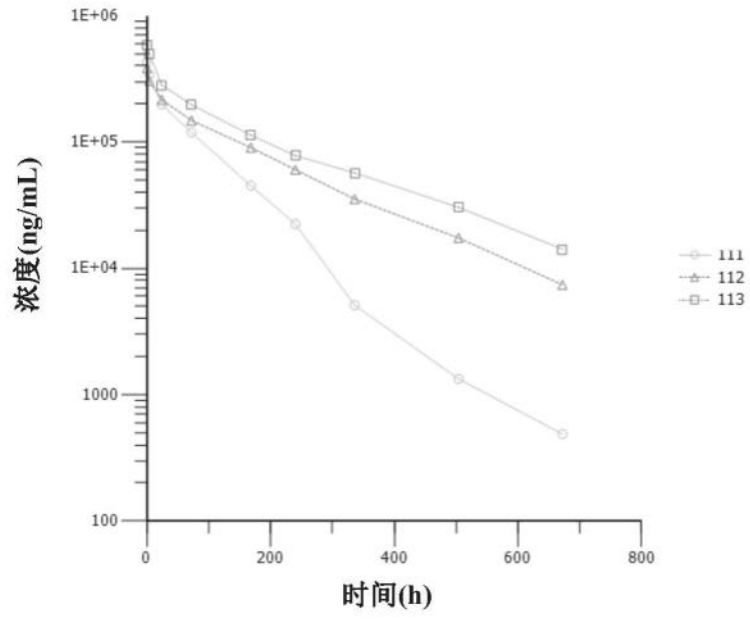


图13