



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 117964751 A

(43) 申请公布日 2024. 05. 03

(21) 申请号 202410029937.5

A61K 39/395 (2006.01)

(22) 申请日 2019.03.13

A61P 31/04 (2006.01)

(30) 优先权数据

G01N 33/569 (2006.01)

18161521.2 2018.03.13 EP

(62) 分案原申请数据

201980018808.3 2019.03.13

(71) 申请人 斯米维特公司

地址 荷兰维伊肯

(72) 发明人 A·J·德·斯米特 M·M·哈姆森

(74) 专利代理机构 北京律诚同业知识产权代理有限公司 11006

专利代理师 徐金国 吴启超

(51) Int. Cl.

C07K 16/12 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

权利要求书2页 说明书66页

序列表(电子公布) 附图8页

(54) 发明名称

与破伤风神经毒素结合的单域抗体

(57) 摘要

本发明涉及能够与破伤风神经毒素结合的单结构域抗体(SDA)。本发明进一步涉及多肽构建体,所述多肽构建体包含这种SDA以及能够与血清蛋白结合、优选与血清白蛋白或免疫球蛋白结合的SDA。本发明还涉及编码此类SDA或多肽构建体的核酸、包含此类SDA或多肽构建体的药物组合物、其医学用途及其在破伤风治疗中的用途。

1. 一种能够与破伤风神经毒素 (TeNT) 结合的单结构域抗体 (SDA), 其特征在于, 所述 SDA 与 SEQ ID NO: 20 具有 100% 的总氨基酸序列同一性。

2. 一种多肽构建体, 所述多肽构建体包含至少一种能够与 TeNT 结合的 SDA 和至少一种能够与血清蛋白结合的 SDA, 其中所述多肽构建体具有选自 SEQ ID NO: 45、49、66、70、72、77 和 78 组成的组的氨基酸序列。

3. 根据权利要求 2 所述的多肽构建体, 其特征在于, 所述血清蛋白是血清白蛋白或免疫球蛋白。

4. 一种药物组合物, 所述药物组合物包含至少一种根据权利要求 1 所述的 SDA 和/或至少一种根据权利要求 2 至 3 中任一项所述的多肽构建体, 以及药学上可接受的载体。

5. 根据权利要求 4 所述的药物组合物, 其特征在于, 所述组合物包含至少两种根据权利要求 1 所述的能够与 TeNT 结合的 SDA 和/或至少一种根据权利要求 2 至 3 中任一项所述的多肽构建体。

6. 用作药物的根据权利要求 1 所述的 SDA 或根据权利要求 2 至 3 中任一项所述的多肽构建体。

7. 用于预防或治疗破伤风梭状芽孢杆菌 (*Clostridium tetani*) 疾病/症状的根据权利要求 1 所述的 SDA、根据权利要求 2 至 3 中任一项所述的多肽构建体或根据权利要求 4 或 5 所述的药物组合物。

8. 一种 DNA 片段, 所述 DNA 片段编码根据权利要求 1 所述的 SDA 或根据权利要求 2 至 3 中任一项所述的多肽构建体。

9. 一种核酸, 所述核酸包含根据权利要求 8 所述的 DNA 片段, 其特征在于, 根据权利要求 8 所述的 DNA 片段可操作地连接至启动子和任选的其他调控元件。

10. 一种宿主细胞, 所述宿主细胞包含根据权利要求 9 所述的核酸。

11. 一种产生根据权利要求 1 所述的 SDA 或根据权利要求 2 至 3 中任一项所述的多肽构建体的方法, 其特征在于, 所述方法包括以下步骤: a) 在允许所述 SDA 或多肽构建体表达的条件下培养根据权利要求 10 所述的宿主细胞; 和任选地 b) 从所述宿主细胞和所述培养基中的至少一种回收所述 SDA 或多肽构建体。

12. 一种诊断试剂盒, 所述诊断试剂盒包含至少一种根据权利要求 1 所述的能够结合 TeNT 的 SDA。

13. 一种能够与破伤风神经毒素 (TeNT) 结合的单结构域抗体 (SDA), 其特征在于, 所述 SDA 与选自 SEQ ID NO: 20、13、14、15、16、17、18、19、21、22、23、24、25 和 26 组成的组的序列具有 90% 的总氨基酸序列同一性, 条件是 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列同一性至少为 95%;

或一种能够与血清蛋白结合的单结构域抗体 (SDA), 其中所述 SDA 与选自 SEQ ID NO: 40、37、38、39、41、42、30、27、28、29、31、32、33 和 34 组成的组的序列具有至少 90% 的总氨基酸序列同一性,

或能够与破伤风神经毒素 (TeNT) 结合, 其中所述 SDA 与选自 SEQ ID NO: 17、13、14、15、16、18、19、20、21、22、23、24、25 和 26 组成的组的序列具有至少 90% 的总氨基酸序列同一性,

条件是 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列同一性至少为 95%。

14. 一种多肽构建体,所述多肽构建体包含至少一种能够与TeNT结合的SDA和至少一种能够与血清蛋白结合的SDA,其中所述多肽构建体具有选自由SEQ ID NOs:51、47、48、52、53、61、62、49、50、77和78组成的组的氨基酸序列,或其中所述多肽构建体具有选自由SEQ ID NOs:70、66、45、49、72、77、78、46、47、51、53、67、71、73、43、48、52、53、65、68和72组成的组的氨基酸序列;

或一种多肽构建体,所述多肽构建体包含至少一种SDA,其中所述SDA与选自由SEQ ID NO:40、37、38、39、41、42、30、27、28、29、31、32、33、34、17、13、14、15、16、18、19、20、21、22、23、24、25和26组成的组的序列具有至少95%的总氨基酸序列同一性。

与破伤风神经毒素结合的单域抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及能够与破伤风神经毒素结合的单结构域抗体(SDA)、包含此类SDA的多肽构建体、包含此类SDA和/或多肽构建体的组合物并且涉及编码此类SDA和/或多肽构建体的DNA片段。此外,本发明涉及包含此类DNA片段的宿主细胞,产生此类SDA和/或多肽构建体的方法,以及此类SDA和/或多肽构建体和/或组合物在破伤风梭状芽孢杆菌感染疾病治疗或预防中的用途。

背景技术

[0002] 破伤风是由破伤风梭状芽孢杆菌引起的一种疾病,大约在3000年前在埃及被首次描述。

[0003] 破伤风毒血症是由特定的神经毒素;破伤风梭状芽孢杆菌产生的破伤风神经毒素(TeNT)引起的。包括人类在内的几乎所有哺乳动物都是易感的。在所有物种中,尤其人类、马和羔羊是最敏感的。犬和猫的抵抗力相对较高。破伤风在世界范围内被发现,但是破伤风梭菌在土壤中的出现和破伤风在人类、马和羔羊中的发病率都在各洲的温暖地区更高。在大多数情况下,破伤风梭菌通过伤口来引入组织中。破伤风通常会伴随着深的贯通性伤口而发生,在这些伤口中,厌氧细菌的生长得到促进。然而,在羔羊中,并且有时在其他物种中,破伤风也可能伴随着牲畜去尾或阉割而发生。

[0004] 破伤风神经毒素是一种锌结合蛋白酶,所述蛋白酶可切割突触泡蛋白(一种与囊泡有关的膜蛋白)。这种蛋白的切割导致神经递质释放的抑制。毒素在感染区域被运动神经吸收,并沿神经束逆行至脊髓,在此引起破伤风加剧。

[0005] TeNT被合成为一条150kDa的单多肽链。这种多肽被切割成100kDa的重链(H)和50kDa的轻链(L),它们通过二硫键结合在一起并形成活性毒素。用木瓜蛋白酶消化全毒素会产生由TeNT轻链和TeNT重链的氨基末端半部(H_N)组成的片段B,和包含重链的羧基末端半部的片段C(H_C 或TTC)。活体外实验已经表明, H_C 负责通过神经节苷脂结合神经元,而 H_N 片段在内化和膜易位方面起作用。

[0006] 接种破伤风梭菌后,潜伏期(从感染到首次出现症状的时间)可以短至24小时,也可以长达数月。这个间隔反映了毒素必须在神经系统内传播的距离,并且可能与释放的毒素量有关。发病期是从首次出现症状到开始痉挛性麻痹的时间。潜伏期通常平均为10-14天。首先可以观察到通常涉及咬肌和颈部肌肉、后肢和感染伤口区域的局部僵硬;约1天后,全身僵硬变得明显,并出现强直性痉挛和感觉过敏。由于猫和犬对破伤风毒素的抵抗力较高,因此它们的潜伏期通常很长,并且经常会出现局部破伤风;但是,在这些物种中确实出现了全身化破伤风。破伤风神经毒素(和相关的肉毒杆菌神经毒素)的全面描述可参见BOTULINUM AND TETANUS NEUROTOXINS, ISBN 978-1-4757-9544-8, ©1993Springer Science&Business Media New York。最初由纽约Plenum Press于1993年出版。有关破伤风、其病因和影响以及治疗方法的综述,例如可以在Farrar, J. J. 等人, J. Neurol Neurosurg Psychiatry 69:292-301(2000)中找到。

[0007] 用马破伤风抗毒素进行被动免疫可缩短病程,并可降低破伤风的严重程度。马抗血清(Fab)是从经免疫的马中收集的血清池来制备的,并且在人中的半衰期为12-20小时(Flanagan RJ, Jones AL. *Drug Saf.* 2004; 27 (14) :1115-33)。在整个发展中国家使用的马(或牛)形式会引起偶然的过敏反应,但比人类供体血清便宜得多且易于生产。

[0008] 破伤风疾病的治疗包括通过感染部位的处理(例如冲洗、引流和清创)来施用抗生素或甲硝唑,抗毒素的施用和支持性护理(例如,肌肉松弛剂、镇静剂、水合作用等)。用含有从主动免疫的绵羊或马中获得的免疫球蛋白(例如纯化的和片段化的)的制剂进行的被动免疫可为未免疫的动物和人类提供有效的保护。破伤风抗毒素(例如以SDA或免疫血清的形式)可用于至少三种不同的情况:作为术前标准程序的一部分,用于受伤但尚未患病的动物;第三,在动物患有破伤风时的治疗性情况下。根据预防性治疗或治疗性治疗,使用的抗毒素剂量有所不同,后者的剂量取决于物种,高出2到20倍。在破伤风的情况下,可能需要每日治疗。

[0009] 迄今为止,施用在马和人类志愿者中培育的抗血清是治疗急性破伤风疾病的唯一方法。原则上,纯化的抗体及其工程变体(例如抗原结合片段(Fab)和单链可变片段(scFv))可以提供可能的替代方法。避免动物和人类供体的体外产生的破伤风抗毒素SDA尚未以人类或兽医学用药形式在市场上买到。Nathan Scott等人在*Molecular Immunology* 47:1931-1941 (2010)中描述了抗破伤风毒素单链可变片段的实例。

[0010] 然而,尽管有用,但普通抗体及其工程变体Fab和scFv具有若干限制。此类限制的实例是低溶解度、低稳定性和高成本以及动物使用(Doshi, R.等人, *Scientific Reports* 4: 6760DOI; 10.1030/srep06760)。此类常规抗体及其片段具有相对大的分子量:常规抗体的平均MW为约160kDa, Fab的MW为65kDa,并且甚至相对较小的scFv的MW为28kDa。

[0011] 最重要的是,存在生产可行性差的问题:较大蛋白质的生产有时会出现问题,并且无论如何都是昂贵的。

[0012] 天然存在于骆驼科动物和某些鲨鱼物种中的同二聚体、仅重链抗体(HCAb)的单体、高变、抗原结合区没有普通抗体及其工程变体Fab和scFv的许多缺点。出于清楚的原因,这种源自天然不含轻链的重链分子的可变结构域在衍生自骆驼科动物时也称为VHH,而在衍生自鲨鱼时又称为V_{NAR},以区别于四链免疫球蛋白的传统VH。为了方便起见,抗TeNT VHH在本文中将进一步称为单结构域抗体(SDA)。

[0013] 涉及没有轻链的重链抗体的结构、组成、制备和用途及其分离的抗原结合片段的早期专利族是包含EP 0656946的专利族。Hamers-Casterman, C.等人, *Nature* 363:446-448 (1993)也描述了此类单结构域分子。它们可以来自骆驼科物种,例如骆驼、美洲驼、独峰驼、羊驼和原驼。与常规抗体及其片段相比,SDA的分子大小最小(约15kDa)。SDA还非常稳健、对变性/热降解具有高度抵抗力、具有高水溶性,并且通常使用标准微生物表达系统来高度地和功能性地表达。此外,SDA还具有出色的身体分布和组织渗透性。这使它们对临床用途具有吸引力。

[0014] 能够与破伤风类毒素结合的SDA的实例描述于Arbabi Ghahroudi (M. Arbabi Ghahroudi, A. Desmyter, L. Wyns, R. Hamers, S. Muyldermans. *Selection and identification of singledomain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies*. *FEBS Letters* 414(1997) 521-526)。WO 96/34103公开了能够与破伤风类毒素

结合的SDA。小鼠研究表明,在2至4天后,以低毒素剂量施用SDA可使大约40-50%的经治疗小鼠存活。这些结果也在Arbabi Ghahroudi等人,FEBS LETTERS(1997),414,521-526中报道。Rossotti等人(MABS,DOI:10.1080/19420862.2015.1068491)描述了SDA与破伤风毒素的结合。

[0015] 对于梭菌神经毒素所发现的一个特殊问题是其极高的毒性。浓度低至0.1-2.5ng/kg的TeNT已经在人类中具有毒性,并且浓度低至0.1-5ng/kg的TeNT已经在其他动物中具有毒性。在马中,致死剂量为例如0.1至0.3ng/kg。这意味着一旦发生了破伤风梭状芽孢杆菌感染,只有能够与TeNT结合并随后阻止神经元吸收的高亲和力抗体,才能够将游离TeNT的水平降低到可以抑制甚至避免破伤风的致命症状的水平。

[0016] 生物分子相互作用的直接测量在生物治疗药物的发现和开发中起着重要作用。有关生物分子复合物形成速率和复合物稳定性的准确信息是药物-靶标相互作用的关键组成部分。相互作用的亲和力直接影响生物药物起作用的剂量。抗体对抗原的亲和力可以使用任何合适的方法通过实验确定,参见,例如,Berzofsky等人,“Antibody-Antigen Interactions,”Fundamental Immunology,Paul,W.E.编,Raven Press:New York,N.Y.(1984);Kuby,Janis Immunology,W.H.Freeman and Company:New York,N.Y.(1992);和本文所述的方法,Lad,L.等人,Journal of Biomolecular Screening 2015,Vol.20(4)498-507,Yang,D.等人,doi:10.3791/55659)。如果特定抗体-靶标蛋白相互作用的测量亲和力在不同条件(例如,盐浓度、pH)下测量,这种亲和力可变化。因此,在多聚体SDA的情况下,亲和力或亲合力的测量(例如, K_D 、 k_a 、 k_{dis})优选地用抗体和抗原的标准化溶液以及标准化缓冲液进行。

[0017] 但是到目前为止,抗TeNT SDA的KD确实超过了1-10nM,甚至超过了35nM,表明亲和力较低。这个情况可以在Rossotti等人(2015,mAbs,7:5,820-828,DOI:10.1080/19420862.2015.1068491)和上文提到的Arbabi Ghahroudi中发现。

发明内容

[0018] 一方面,本发明涉及能够与破伤风神经毒素(TeNT)结合的单结构域抗体(SDA),其中所述SDA与选自SEQ ID NO:17、13、14、15、16、18、19、20、21、22、23、24、25和26的序列具有至少70%的总氨基酸序列同一性,条件是CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列同一性至少为75%。

[0019] 在一个优选的实施方案中,SDA与选自SEQ ID NO:17、13、14、15、16、18、19、20、21、22、23、24、25和26的序列具有至少71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或优选100%的总氨基酸序列同一性,条件是CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列同一性至少为75%。

[0020] 替代地,或与先前的实施方案结合,在另一个优选的实施方案中,CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列同一性至少为76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或优选100%。

[0021] 在另一方面,本发明涉及一种多肽构建体,所述多肽构建体包含至少一种根据本发明的能够与TeNT结合的SDA和至少一种能够与血清蛋白结合的SDA。优选地,血清蛋白是血清白蛋白或免疫球蛋白。更优选地,免疫球蛋白是免疫球蛋白G(IgG)。在一个优选的实施

方案中,能够与血清白蛋白结合的SDA与选自SEQ ID NO:40、37、38、39、41和421的序列具有至少70%的总氨基酸序列同一性,条件是CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列同一性至少为75%。在一个优选的实施方案中,能够与免疫球蛋白结合的SDA与选自SEQ ID NO:30、27、28、29、31、32、33和34的序列具有至少70%的总氨基酸序列同一性,条件是CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列同一性至少为75%。

[0022] 在一个优选的实施方案中,多肽构建体包含至少两种能够与TeNT结合的SDA,其中至少两种能够与TeNT结合的SDA中的每一个与选自选择A;SEQ ID NO:24,或选择B;SEQ ID NO:25,或选择C;SEQ ID NO:20,或选择D;SEQ ID NO:17或19或选择E;SEQ ID NO:22、15、23或14的序列具有至少70%的总氨基酸序列同一性,条件是至少两种SDA不包含来自相同选择的序列,并且条件是CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列同一性至少为75%。

[0023] 在另一方面,本发明涉及药物组合物,所述药物组合物包含至少一种根据本发明的能够与TeNT结合的SDA和/或至少一种根据本发明的多肽构建体,以及药学上可接受的载体。优选地,该组合物包含至少两种根据本发明的能够与TeNT结合的SDA和/或至少一种根据本发明的多肽构建体。

[0024] 在另一方面,本发明涉及用作药物的一种根据本发明的能够与TeNT结合的SDA或根据本发明的多肽构建体。

[0025] 在另一方面,本发明涉及一种根据本发明的能够与TeNT结合的SDA、根据本发明的多肽构建体或根据本发明的药物组合物,其用于预防或治疗破伤风梭状芽孢杆菌疾病/症状。

[0026] 在另一方面,本发明涉及编码根据本发明的能够与TeNT结合的SDA或根据本发明的多肽构建体的DNA片段。

[0027] 在另一方面,本发明涉及包含根据本发明的DNA片段的核酸,其中所述DNA片段可操作地连接至启动子和任选的其他调控元件。

[0028] 在另一个方面,本发明涉及包含根据本发明的核酸的宿主细胞。

[0029] 在另一方面,本发明涉及生产根据本发明的SDA或根据本发明的多肽构建体的方法,其中所述方法包括以下步骤:a)在允许SDA或多肽构建体表达的条件下,培养根据本发明的宿主细胞;和任选地b)从宿主细胞和培养基中的至少一种回收SDA或多肽构建体。

[0030] 在一方面,本发明涉及诊断试剂盒,所述诊断试剂盒包含至少一种根据本发明的能够与TeNT结合的SDA。

[0031]

[0032] 令人惊讶地,现在发现可以获得具有明显低于已知抗TeNT SDA的 K_D 并具有体内破伤风毒素中和活性的抗TeNT SDA。此类新颖的抗TeNT SDA具有以下优点:它们能够以极高的亲和力结合TeNT。这将游离和结合的TeNT分子之间的平衡极远地转移到结合的TeNT分子上,从而充分抑制了破伤风梭状芽孢杆菌感染后破伤风的致命症状。

[0033] 现在已经鉴定出几组抗TeNT SDA,其 K_D 值低于1nM。图1显示了SDA的七个组或组成员的实例(组A、B、C、D,以及组E、F和G中的每个组的一个成员)的序列。三个阴影区域表示高变区或互补决定区(CDR)的位置。从图1可以看出,各个SDA之间确实存在一些自然变化。这些变异可能是由于整个序列中的一个或多个氨基酸差异,或者是由于所述序列中的一个或多个氨基酸的缺失、取代、插入、倒置或添加。基本上不改变生物学和免疫学活性的氨基酸

取代已例如由Neurath等人在“The Proteins”Academic Press New York(1979)中描述。相关氨基酸之间的氨基酸置换或进化中经常发生的置换尤其是Ser/Ala、Ser/Gly、Asp/Gly、Asp/Asn、Ile/Val(参见Dayhof, M.D., Atlas of protein sequence and structure, Nat. Biomed. Res. Found., Washington D.C., 1978, 第5卷, 增刊3)。其他氨基酸取代包括Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Thr/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Leu/Ile、Leu/Val及Ala/Glu。根据这些信息, Lipman和Pearson开发了一种用于快速和灵敏蛋白质比较(Science 227, 1435-1441, 1985), 并确定同源蛋白质之间的功能相似性的方法。本发明的示例性实施方案的氨基酸取代以及具有缺失和/或插入的变体在本发明的范围内, 只要所得蛋白质的抗原或免疫原性性质基本上不受影响。

[0034] 这解释了为什么根据本发明的SDA可以具有约70%的总氨基酸序列同一性水平, 同时在蛋白质仍具有 $<1\text{nM}$ 的 K_D 值的意义上仍代表相同蛋白质的情况。仍提供具有 $<1\text{nM}$ 的 K_D 值的SDA的根据本发明的一定SDA的氨基酸序列的那些变化被认为是“基本上不影响所述蛋白质的抗原性或免疫原性性质”。

[0035] 在第一方面, 本发明涉及能够与破伤风神经毒素(TeNT)结合的抗原结合蛋白, 优选单结构域抗体(SDA), 其中所述抗原结合结构域与选自SEQ ID NO: 17、13、14、15、16、18、19、20、21、22、23、24、25和26的序列的总氨基酸序列同一性至少为70%, 条件是CDR1、CDR2和CDR3区的氨基酸序列同一性至少为75%。

[0036] 换句话说, 在这个方面, 本发明涉及与破伤风神经毒素(TeNT)特异性结合的抗原结合蛋白。优选地, 抗原结合蛋白包含氨基酸序列, 所述氨基酸序列包含以FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4顺序可操作地连接的4个框架区FR1至FR4和3个互补决定区CDR1至CDR3。优选地, CDR1具有选自自由如图1所示VHH序列SEQ ID NO: 13-26的CDR1序列组成的组的氨基酸序列、或在一个或两个氨基酸残基上不同于CDR1的氨基酸序列; b) CDR2具有选自自由如图1所示VHH序列SEQ ID NO: 13-26的CDR2序列组成的组的氨基酸序列、或在一个、两个、三个或四个氨基酸残基上不同于CDR2的氨基酸序列; 并且, c) CDR3具有选自自由如图1所示VHH序列SEQ ID NO: 13-26的CDR3序列组成的组的氨基酸序列、或在一个、两个、三个、四个或五个氨基酸残基上不同于CDR3的氨基酸序列; 并且, 其中每个框架区与如图1所示SEQ ID NO: 13-26中的任一个的框架氨基酸序列具有至少50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100%氨基酸同一性。优选地, CDR1、CDR2和CDR3来自相同的SEQ ID NO。更优选地, 框架区与互补决定区来自相同的SEQ ID NO。

[0037] 如本文所用, 一定百分比的总氨基酸序列同一性水平, 例如约70%, 意指整个抗原结合蛋白, 换句话说: 当两个序列在其整个长度FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4上比对时的氨基酸序列同一性水平约为70%。因此, 在这种情况下“总体”用于包括CDR 1-3。“序列同一性”或“同一性”在本文中定义为通过比较序列确定的两个或更多个氨基酸(多肽或蛋白质)序列或两个或更多个核酸(多核苷酸)序列之间的关系。在本领域中, 根据具体情况, “同一性”还意指氨基酸或核酸序列之间的序列相关性程度, 如通过这类序列串之间的匹配来确定。两个氨基酸序列之间的“相似性”通过将一个多肽的氨基酸序列和其保守氨基酸取代物与第二多肽的序列进行比较来确定。“同一性”和“相似性”可通过已知方法来容易地计算。术语“序列同一性”或“序列相似性”是指两个(多)肽或两个核苷酸序列, 当优选在(至少在比较中最短的序列的)整个长度上并且例如通过使用默认参数的程序ClustalW(1.83)、

GAP或BESTFIT最大化匹配的数量并且最小化空位的数量来最佳比对时,至少共有一定百分比的序列同一性,如本文其他地方所定义。GAP使用Needleman和Wunsch全局比对算法在两个序列的整个长度上进行比对,从而最大程度地增加了匹配数并使空位数最小。通常,会使用GAP默认参数,并且在ClustalW(1.83)中,使用blosum矩阵和默认设置,空位产生罚分=50(空位开放罚分:10;间隙延伸罚分:0.05)。序列比对和百分比序列同一性的分数可以使用计算机程序确定,例如GCG Wisconsin软件包,版本10.3(可从Accelrys Inc., 9685Scranton Road, San Diego, CA 92121-3752USA获得),或使用开源软件,例如程序“needle”(使用全局Needleman Wunsch算法)或“water”(使用局部Smith Waterman算法)在(核苷酸)/8(蛋白质)和空位延伸罚分=3(核苷酸)/2(蛋白质)中确定。对于核苷酸,使用的默认评分矩阵是nws gapdna,并且对于蛋白质,使用的默认评分矩阵是Blosum62(Henikoff& Henikoff, 1992, PNAS 89, 915-919)。用于比对本发明的蛋白质序列的优选的多重比对程序为EmbossWIN 2.10.0版,使用与上述GAP相同的参数,或使用默认设置(对于“needle”和“water”以及蛋白质和DNA比对,默认的空位开放罚分是10.0,并且默认的空位延伸罚分是0.5;对于蛋白质,默认评分矩阵是Blossum62,并且对于DNA,默认评分矩阵是DNAPull)。当序列的总体长度基本不同时,首选局部比对,例如使用Smith Smith Waterman算法的那些比对。或者,可以使用诸如FASTA、BLAST等算法对公共数据库进行搜索来确定相似度或同一性百分比。

[0038] 重排的抗体可变结构域的比对可能需要在CDR区末端引入大量的空位。特别是CDR3区域有时需要此类长的空位延伸。不希望受到任何理论的束缚,这可能是由于形成CDR3的VDJ重组的特定分子过程所致。因此,用于DNA或蛋白质比对的标准软件程序可能无法正确比对重排的SDA域。程序IMGT/V-QUEST (Brochet, X. et al., Nucl. Acids Res. 36, W503-508 (2008) 被特别开发用于抗体可变域(包括SDA)的序列分析,包括比对,并且因此是确定比对的优选程序。可以从Internet上访问它,网址为www.imgt.org/IMGT_vquest/vquest (日期为2018年1月9日的IMGT/V-QUEST程序版本:3.4.9-日期为2018年2月14日的AMGT/V-QUEST参考目录发布:201807-3)。这导致根据IMGT编号系统对SDA进行比对,并识别出三个CDR和四个FR区。所述程序还具有用于识别异常插入和缺失的选项。随后,可以确定CDR和FR的序列同一性。

[0039] 任选地,在确定氨基酸相似性的程度时,技术人员还可以考虑所谓的“保守”氨基酸取代,这对技术人员而言是显而易见的。保守氨基酸取代意指具有相似侧链的残基的可互换性。举例来说,一组具有脂族侧链的氨基酸是甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、和异亮氨酸;一组具有脂族羟基侧链的氨基酸是丝氨酸和苏氨酸;一组具有含有酰胺侧链的氨基酸是天冬酰胺和谷氨酰胺;一组具有芳族侧链的氨基酸是苯丙氨酸、酪氨酸、和色氨酸;一组具有碱性侧链的氨基酸是赖氨酸、精氨酸、和组氨酸;并且一组具有含硫侧链的氨基酸是半胱氨酸和甲硫氨酸。优选保守氨基酸取代组为:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸、和天冬酰胺-谷氨酰胺。本文公开的氨基酸序列的取代变体是其中公开的序列中的至少一个残基已被去除并且在其位置插入了不同残基的那些。优选地,氨基酸变化是保守的。每种天然氨基酸的优选保守取代如下:Ala至Ser; Arg至Lys; Asn至Gln或His; Asp至Glu; Cys至Ser或Ala; Gln至Asn; Glu至Asp; Gly至Pro; His至Asn或Gln; Ile至Leu或Val; Leu至Ile或Val; Lys至Arg; Gln或Glu; Met至Leu或Ile; Phe至Met, Leu或

Tyr;Ser至Thr;Thr至Ser;Trp至Tyr;Tyr至Trp或Phe;和Vai至He或Leu。

[0040] 根据本发明的优选的SDA在位置50a-50d处包含氨基酸序列VEDG。它位于FR2区域的中间,与残基Arg 50(Kabat位置45)相邻,在SDA文献中经常提到这是SDA最典型的氨基酸取代。常规的SDA通常在IMGT位置50处包含Leu,其与VL结构域疏水接触。SDA最常在IMGT位置50处有Arg。这种取代使得以前的VL界面更具亲水性。VEDG的插入使FR2区更具亲水性,并降低了其等电点,从而增加了其溶解度并减少了聚集的机会。

[0041] 在一个优选的实施方案中,根据本发明的抗原结合蛋白包含一个或多个单一结合结构域,其中单一结合结构域不包含轻链,并且其中单一结合结构域包括完整的抗原结合能力。优选地,本发明的抗原结合蛋白选自包含重链且不含轻链的抗体、其片段、亲和体(Nord等人(1997)Nature Biotechnology 15:772-777)、单结构域抗体及其片段。根据本发明的抗原结合蛋白的实例是衍生自天然不含轻链的骆驼或鲨鱼仅重链抗体的SDA和亲和体。优选地,抗原结合蛋白是仅包含重链并且天然不含轻链的抗体或其抗体片段,例如VHH(源自骆驼科动物)或V_{NAR}(源自鲨鱼)。替代地,(并且也是优选地)本发明的抗原结合蛋白可以衍生自天然不含轻链的抗体或其片段,例如通过修饰,例如突变。可通过对骆驼科动物(例如美洲驼、骆驼、单峰骆驼、双峰骆驼、羊驼、骆马和原驼)或鲨鱼进行免疫来获得天然不含轻链的抗体。这些抗体仅包含重链而不含轻链。这些单结构域重链抗体的优势在于它们异常稳定、体积小、并且容易在宿主生物(如酿酒酵母)中生产。

[0042] 因此,本发明的抗原结合蛋白优选包含免疫球蛋白衍生的可变结构域,其在单个多肽链中包含靶分子上表位的完整抗原结合位点。此类抗原结合蛋白具体包括但不限于:

[0043] 1) 从骆驼科和鲨鱼中获得的抗体,它们仅由重链组成,而天然不含轻链;

[0044] 2) 在1)中定义的抗体的可变结构域,通常称为VHH结构域或V_{NAR}片段,在本文中统称为单结构域抗体(SDA);

[0045] 3) 工程化形式的1)中定义的抗体或2)中的结构域,例如“骆驼科化”或“(骆驼化)”抗体,其中骆驼科动物(或鲨鱼)VHH域的框架序列移植有从其他来源获得的CDR;

[0046] 4) 工程化形式的免疫球蛋白样可变域,其中如WO 04/108749中所述,其中将来自各种免疫球蛋白样分子的框架序列与对给定靶分子具有特异性的CDR组合。

[0047] 在本发明的优选的抗原结合蛋白中,包含完整抗原结合能力的可变域的单多肽链优选具有可以被认为由四个框架区域或“FR”组成的氨基酸序列和结构,在本领域中并且在本文中分别称为“框架区域1”或“FR1”;“框架区域2”或“FR2”;“框架区域3”或“FR3”;及“框架区域4”或“FR4”;所述框架区域被三个互补决定区或“CDR”间断,在本领域中分别称为“互补决定区1”或“CDR1”;“互补决定区2”或“CDR2”;及“互补决定区3”或“CDR3”。这些框架区和互补决定区优选以FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4的顺序(从氨基末端到羧基末端)可操作地连接。

[0048] 具有完整抗原结合能力的可变域中的氨基酸残基总数可以在110-135范围内,并且优选在115-129范围内。然而,根据本发明的具有完整抗原结合能力的可变结构域对其长度和/或大小没有特别限制,因为所述结构域满足本文概述的其他功能要求和/或适用于本文所述的目的。具有完整抗原结合能力的可变结构域的氨基酸残基根据Kabat等人(Sequences of Proteins of Immunological Interest(第5版),NIH Publication No.91-3242,U.S.Department of Health and Human Services,Public Health Service,

National Institutes of Health(1991))给出的VH结构域的通用编号进行编号,所述通用编号由Riechmann和Muyldermans(1999,J.Immunol.Methods 231(1-2):25-38,例如参见所述参考文献的图2)和Harmsen等人(2000,Molecular Immunology 37:579-590,例如参见所述参考文献的图1)应用于来自骆驼科动物的VHH域。

[0049] 在这方面,应注意的是如本领域中对于VH结构域和VHH结构域所公知的,每个CDR中的氨基酸残基总数可以变化,并且可能不对应于Kabat编号指示的氨基酸残基的总数。然而,基于框架区域的保守氨基酸,技术人员将能够根据Kabat定义对那些具有完整抗原结合的可变结构域将相应的框架和互补决定区进行比对。分别在图1至图3中所示的结合TeNT、免疫球蛋白和血清白蛋白的VHH的氨基酸序列中的互补决定区的定义中给出了其实例。也可以类似的方式应用于来自骆驼科动物的VHH结构域和具有完整抗原结合能力的可变结构域的对VH结构域的氨基酸残基进行编号的替代方法是Chothia等人(Nature 342,877-883(1989))描述的方法、所谓的“AbM定义”和所谓的“contact定义”或IMGT编号系统(Lefranc等人,1999,Nucl.Acids Res.27:209-212)。

[0050] 已知三个高变区或互补决定区(CDR1、2和3)是在实际确定SDA的特异性和结合特性中起主要作用的区域。

[0051] 注意,图1所示的各个组中的CDR1区域和CDR2区域中的氨基酸序列变化相对较低,即低于各种SDA中与CDR不相关的部分的氨基酸序列变化。CDR1区域平均包含8或9个氨基酸,并且组内的变异仅涉及1或2个氨基酸,即约25%。CDR2区显示出大致相同的变异水平。可以认为这种区域的同一性水平不会低于75%。在大多数情况下,同一性水平会更高,即76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或甚至100。还应注意的是,CDR3区(通常被认为是结合中最重要的区域)的氨基酸序列变异低于各种SDA的非CDR相关部分的氨基酸序列变异。仅作为实例:到目前为止所识别并且在图1中所示的SDA A组的四个成员之间的CDR3区的同一性水平约为95%。B组三个成员之间的那个区域的同一性水平约为92%,并且在C组中为94%。D组的两个SDA具有约75%的CDR3同一性水平。至于CDR1和CDR2区域,可以认为这种区域的同一性水平不会低于75%。在大多数情况下,同一性水平会更高,即至少76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或甚至100%。

[0052] CDR1、2和3区域的氨基酸序列同一性至少为75%的前提条件意味着,落入本发明范围内的抗原结合蛋白具有与选自SEQ ID NO:13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25和26的氨基酸序列内的CDR1、2和3区域中的任一个具有至少75%氨基酸序列同一性的CDR1、2和3区域。

[0053] 优选地,能够结合TeNT的抗原结合蛋白与选自SEQ ID NO:13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25和26的序列具有超过70%的总体序列同一性,例如按优先顺序至少71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或甚至100%。

[0054] 替代地或与先前的实施方案结合,在优选的实施方案中,CDR1、CDR2和CDR3区的序列同一性按优先顺序至少为76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或甚至100%。这些序列同一性可以彼此独立地确定。

[0055] 因此,这种实施方案的优选形式涉及根据本发明的抗原结合蛋白,其中所述抗原

结合蛋白与选自SEQ ID NO:13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25和26的序列具有至少为71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或优选100%的总氨基酸序列同一性,条件是CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列同一性至少为75%。因此,这种实施方案的更优选形式涉及根据本发明的抗原结合蛋白,其中所述抗原结合蛋白与选自SEQ ID NO:13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25和26的序列具有至少为71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或甚至100%的总氨基酸序列同一性,条件是CDR1、CDR2和CDR3区的氨基酸序列同一性至少为76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或甚至100%。

[0056] 可以结合至诸如TeNT的特异性抗原、对所述抗原具有亲和力、能够与所述抗原结合和/或对所述抗原具有特异性的本发明的抗原结合蛋白可以被认为“对抗”或“针对”所述抗原(例如TeNT)。术语“特异性”是指特定抗原结合蛋白分子可结合的不同类型抗原或抗原性决定簇的数目。抗原结合蛋白的特异性可基于亲和力和/或亲合力来确定。由抗原与抗原结合蛋白的解离的平衡常数(K_D)来表示的亲和力是抗原决定簇和抗原结合蛋白上的抗原结合位点之间的结合强度的量度。替代地,亲和力还可以表示为亲和常数(K_A),其为 $1/K_D$ 。亲和力可以以本身已知的方式确定,取决于抗原结合蛋白和所关注抗原的特定组合。亲合力在本文中应理解是指较大的结合剂复合物与具有多个结合位点之靶分子结合的强度,即多价结合的结合强度。亲合力与抗原决定簇及其在抗原结合分子上的抗原结合位点之间的亲和力以及在抗原结合分子上存在的结合位点的数目有关。另一方面,亲和力是指简单的单价受体配体系统。

[0057] 通常,能够与TeNT结合的本发明的抗原结合蛋白将以约 10^{-5} 至 10^{-12} M或更少,优选 10^{-7} 至 10^{-12} M或更少,更优选 10^{-8} 至 10^{-12} M或更少的解离常数(K_D),且/或以至少 10^{-7} M,优选至少 10^{-8} M,更优选至少 10^{-9} M,例如至少 10^{-10} 、 10^{-11} 、 10^{-12} M或更多的结合亲和力结合TeNT。大于 10^{-4} M(即,小于100 μ M)的任何 K_D 值通常被认为指示非特异性结合。优选地,本发明的多肽以小于500nM、优选地小于200nM、更优选地小于10nM,诸如小于500pM的亲和力结合至TeNT。抗原结合蛋白与抗原或抗原决定簇的特异性结合可以本身已知的任何合适方式来确定,包括例如Scatchard分析和/或竞争结合测定,诸如放射免疫测定(RIA)、酶免疫测定(EIA)和夹层竞争测定,和其在本身领域中本身已知的不同变体。

[0058] 破伤风类毒素是TeNT的减毒形式,例如甲醛处理的TeNT。能够与细菌毒素例如TeNT结合的本发明优选的抗原结合蛋白也能够与破伤风类毒素结合。类毒素结合能力是有利的,因为它允许评估根据本发明的抗原结合蛋白而无需使用TeNT。

[0059] 以上,已经解决了SDA相对于经典抗体的优点,例如结合特性、对变性/热降解的抗性、水溶性、身体分布和组织渗透性。

[0060] 但是,SDA片段的一个缺点是一旦施用至人体,其血清半衰期相对较短;它们从血液中的清除率很高。单价VHH的典型半衰期约为2小时,清除需要1天(Harmsen, M.M.等人, Vaccine 23:4926-4934(2005)),这种缺点是由于它们相对小的分子量。仅作为经验法则:最小分子量为50-60kDa,更优选为60-70kDa的分子将具有明显更长的半衰期。

[0061] 这种缺点可以例如通过连续静脉内施用SDA片段来克服。从动物福利、实用性的角度以及从经济的角度来看,这种方法均不是优选的方法。因此,已经尝试并发现了其他方法

来克服这一问题。

[0062] 降低清除率的一种广泛使用的方法是直接偶联至具有固有的较长血清半衰期的第二种分子。一种此类方法是通过聚乙二醇 (PEG) 的化学连接来增加蛋白质的流体动力学尺寸,聚乙二醇可以产生在人类中终末半衰期长达14天的药物。另一种方法是将治疗性蛋白质作为具有较长血清半衰期的天然蛋白质的遗传融合物来表达;67kDa血清白蛋白 (SA) 或抗体的Fc部分在其天然二聚体形式下会额外增加60-70kDa,具体取决于糖基化作用。这提供了在人类中具有几天终末半衰期的化合物。

[0063] 在本发明中,选择了另一种方法。在本发明中提供并在下面更详细讨论的解决方案涉及至少一种根据本发明的能够与TeNT结合的SDA通过接头与针对另一种(非-TeNT)蛋白的至少另一种SDA连接的组合。如本文所用,所述不是TeNT蛋白的另一种蛋白是存在于人或动物体内,优选存在于血液中的蛋白,优选血清蛋白。此类蛋白质的实例将在下面给出,其中对该概念进行了更详细的解释。

[0064] 这种组合的实例是包含根据本发明的能够与TeNT结合的SDA、接头和针对另一种(非TeNT)蛋白的SDA的组合。

[0065] 不用说,例如包含通过接头连接的两个或更多个能够与TeNT结合的SDA,并且还通过接头与例如针对另一种(非TeNT)蛋白,优选血清蛋白的至少一种SDA连接的组合甚至可以更有效地中和TeNT。优选地,能够与TeNT结合的两个或更多个SDA将针对TeNT的不同表位。

[0066] 如本文所用,至少一种能够与TeNT结合的SDA、至少一个接头和针对另一种(非TeNT)蛋白的至少一种其他SDA的任何此类组合还被称为多肽构建体。下文的实施例部分提供了此类多肽构建体的充分实例。

[0067] 接头的概念将在下面更详细地讨论。基本上,接头的功能是连接SDA。接头是相对短的肽,其采用非结构化的、柔性的构型。原则上,接头肽不应或尽可能少地干扰其连接的结构域的组装和结合活性。

[0068] 对于包含一个能够与TeNT表位结合的SDA、一个接头和一个能够与另一种蛋白质结合的第二SDA的多肽构建体,根据本发明的多肽构建体将例如具有约 $2 \times 15\text{kDa}$ 的大小。例如,对于包含一个能够与第一TeNT表位结合的SDA、能够与第二TeNT表位结合的第二SDA以及能够与另一种蛋白质结合的第三SDA的多肽构建体,其具有约 $3 \times 15\text{kDa}$ 的大小。

[0069] 此类多肽构建体的优点在于,它们相对较短的长度使得可以容易地化学合成它或以经济上可行的方式在合适的表达系统中表达编码该多肽构建体的DNA片段。

[0070] 可以说,此类多肽构建体原则上仍将具有相对较短的半衰期(其分子量仍低于50-60kDa,或低于60-70kDa),但它们与上述单体构建体的显著区别在于当施用至身体时,它们通过其“能够结合另一种蛋白质的SDA”与所述另一种蛋白质结合,从而导致分子的大小比原本的多肽构建体大得多。所得的结合的多肽构建体将具有明显超过60kDa的分子量。

[0071] 这种方法的优点在于可以容易地生产多肽构建体(参见上文),并且同时解决了小分子半衰期短的问题:一旦施用,将形成克服这种问题的大分子。

[0072] 所述另一种(非TeNT)蛋白优选为血清蛋白,以便能够与所述另一种(非TeNT)蛋白结合的SDA在肠胃外施用后容易与该蛋白紧密接触。

[0073] 因此,在一个实施方案中,本发明涉及本发明的抗原结合蛋白的一种特定形式:多

价抗原结合蛋白。多价抗原结合蛋白包含至少一种如上文所定义的能够与TeNT结合的抗原结合蛋白和至少一种能够与血清蛋白结合的抗原结合蛋白的氨基酸序列。至少两个抗原结合蛋白的氨基酸序列通常头对尾融合,即,最N端序列的C端与第二序列的N端融合等。至少两个抗原结合蛋白的氨基酸序列可以直接连接或通过接头或间隔子融合。本发明的多价抗原结合蛋白可以通过表达编码多价蛋白的核苷酸序列来产生,其中两个或更多个抗原结合蛋白的编码序列在同一阅读框中可操作地连接在一起。技术人员将知道如何可操作地融合蛋白质编码序列。

[0074] 因此,在另一方面,本发明涉及一种多肽构建体(或融合蛋白),其包含至少一种根据本发明的能够与TeNT结合的抗原结合蛋白和至少一种能够与血清蛋白结合的抗原结合蛋白。优选通过遗传融合将两个或更多个氨基酸序列连接在一起,其中通过本领域本身已知的方式将编码各个氨基酸序列的核苷酸序列可操作地在框架内连接在一起。氨基酸序列可以直接连接或任选地通过间隔子或接头氨基酸序列连接。

[0075] 此外,这种血清蛋白优选为相对较大的蛋白:在多肽构建体与血清蛋白结合后形成的产物的大小应优选超过60kDa,以提供更长的半衰期。大血清蛋白的实例是血清白蛋白和血清免疫球蛋白(Ig),例如免疫球蛋白G(IgG)。

[0076] 因此,本发明这种实施方案的优选形式涉及一种多肽构建体,其包含至少一种根据本发明的能够与TeNT结合的抗原结合蛋白和至少一种能够与血清蛋白结合的抗原结合蛋白,其中所述血清蛋白是血清白蛋白,优选马、猪、猫或犬血清白蛋白。

[0077] 在优选的实施方案中,包含至少一种根据本发明的能够与血清蛋白结合的SDA和至少一种能够与TeNT结合的SDA的多肽构建体具有与线性表位结合的至少一种SDA和与构型表位结合的至少第二SDA。更优选地,所述构建体具有一个与线性表位结合的SDA和两个与构型表位结合的SDA。

[0078] 因此,高度优选的实施方案涉及多肽构建体,所述多肽构建体包含至少一种能够与血清蛋白结合的抗原结合蛋白,优选为SDA,以及至少能够与细菌毒素结合的第一抗原结合蛋白和第二抗原结合蛋白,优选梭菌毒素,更优选破伤风梭菌、肉毒梭菌或难辨梭菌毒素,最优选为TeNT,其中第一毒素结合蛋白结合线性表位,更优选其中第一毒素结合蛋白结合线性表位,并且第二毒素结合蛋白结合构型表位。

[0079] 另一个高度优选的实施方案涉及多肽构建体,所述多肽构建体包含至少能够与细菌毒素结合的第一抗原结合蛋白和第二抗原结合蛋白,优选分别为SDA,所述细菌毒素优选为梭菌毒素,更优选破伤风梭菌、肉毒梭菌或难辨梭菌毒素,最优选为TeNT,其中第一毒素与蛋白结合线性表位结合,更优选其中第一毒素与蛋白结合线性表位结合,并且第二毒素结合蛋白结合构型表位。

[0080] 血清白蛋白以相对较高的浓度存在于体内。这意味着根据本发明的包含至少一种能够与血清白蛋白结合的抗原结合蛋白的多肽构建体,一旦施用于人体,将通过与血清白蛋白的结合而容易地形成大产物。然而,对于能够与血清白蛋白结合的抗原结合蛋白,例如低于1微摩尔的低 K_D 值是优选的。本发明提供了能够与血清白蛋白结合的抗原结合蛋白。此类抗原结合蛋白及其序列的六个实例在图3中提供。三个阴影区域表示高变区或互补决定区(CDR)的位置。如表28所示,本发明确实提供了以低 K_D (0.5-300nM)结合血清白蛋白的SDA。

[0081] 实例部分中的表18和图6显示了各种多肽构建体在猪中的半衰期结果,其中将根据本发明的能够与TeNT结合的SDA与根据本发明的能够与血清白蛋白结合的SDA偶联。从表中可以立即看出,此类多肽构建体具有介于100到150小时之间的令人惊讶的高平均半衰期。其他白蛋白半衰期延长的单结构域抗体也报道了相似的半衰期(117小时)(Hoefman等人,2015)。实施例部分(实施例23)中的表33显示了令人惊讶的发现:当将其中根据本发明的能够与TeNT结合的SDA与根据本发明的能够结合血清白蛋白的SDA偶联的多肽构建体施用给马时,其平均半衰期在396至609小时之间。根据本发明的包含至少一种根据本发明的能够与TeNT结合的SDA和至少一种根据本发明的能够与血清蛋白结合的SDA(例如SVA12)的优选多肽构建体具有至少200小时、优选至少250小时、更优选至少300小时、甚至更优选至少350小时、甚至更优选至少375小时、甚至更优选至少380小时、甚至更多优选至少390小时、甚至更优选至少395小时、甚至更优选至少450小时、甚至更优选至少475小时、还更优选至少500小时、甚至更优选至少550小时、最优选至少600小时的平均半衰期;其中半衰期优选是马的半衰期,更优选如实施例23所确定。

[0082] 更令人惊讶地,本发明提供的SDA显示出很大程度的跨物种结合。跨物种结合被理解为与一种以上物种的血清白蛋白结合。表6中提供了根据本发明的能够结合血清白蛋白的SDA的六个实例及其序列,并在下面进行了讨论。

[0083] 具有跨物种结合,即能够与一种以上动物物种的血清白蛋白结合的SDA的明显优势所具有的优点是它们可以用于根据本发明的可以用于一种以上动物物种的多肽构建体中。

[0084] 因此,另一方面,本发明涉及一种特异性结合血清白蛋白的抗原结合蛋白,其中所述抗原结合蛋白优选包含氨基酸序列,所述氨基酸序列包含以FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4的顺序可操作地连接的4个框架区FR1至FR4和3个互补决定区CDR1至CDR3。优选地,CDR1具有选自自由如图2所示VHH序列SEQ ID NO:37-42的CDR1序列组成的组的氨基酸序列、或在一个或两个氨基酸残基上不同于CDR1的氨基酸序列;b) CDR2具有选自自由如图2所示VHH序列SEQ ID NO:37-42的CDR2序列组成的组的氨基酸序列、或在一个、两个、三个或四个氨基酸残基上不同于CDR2的氨基酸序列;并且,c) CDR3具有选自自由如图2所示VHH序列SEQ ID NO:37-42的CDR3序列组成的组的氨基酸序列、或在一个、两个、三个、四个或五个氨基酸残基上不同于CDR3的氨基酸序列;并且,其中每个框架区与如图2所示SEQ ID NO:37-42中的任一个的框架氨基酸序列具有至少50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100%氨基酸同一性。优选地,CDR1、CDR2和CDR3来自相同的SEQ ID NO。更优选地,框架区与互补决定区来自相同的SEQ ID NO。换句话说,在这种方面,本发明涉及能够与血清白蛋白结合的抗原结合蛋白,优选SDA,其中这种抗原结合蛋白与选自SEQ ID NO:40、37、38、39、41或42的序列的总氨基酸序列同一性至少为70%,条件是CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列同一性至少为75%。优选地,抗原结合蛋白能够与马、猪、猫或犬血清白蛋白结合。

[0085] 优选地,根据本发明的能够与血清白蛋白结合的抗原结合蛋白与选自SEQ ID NO:37、38、39、40、41和42的序列具有超过70%的总体序列同一性,例如按优先顺序至少71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或甚至100%。优选地,CDR1、CDR2和CDR3区域的同一性水平为至少75%。

[0086] 替代地或与先前的实施方案结合,在一个优选的实施方案中,CDR1、CDR2和CDR3区

的序列同一性按优先顺序至少为76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或甚至100%。这些序列同一性可以彼此独立地确定。

[0087] 因此,这种实施方案的优选形式涉及根据本发明的能够与血清白蛋白结合的抗原结合蛋白,所述抗原结合蛋白与选自SEQ ID NO:37、38、39、40、41和42的序列的总氨基酸序列同一性至少为71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或优选100%,条件是CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列同一性至少为75%。因此,这种实施方案的更优选形式涉及根据本发明的能够与血清白蛋白结合的抗原结合蛋白,其中这种抗原结合蛋白与选自SEQ ID NO:37、38、39、40、41和42的序列的总氨基酸序列同一性至少为71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或甚至100%,条件是CDR1、CDR2和CDR3区的氨基酸序列同一性至少为76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或甚至100%。

[0088] 如上所述,能够与一种以上动物物种的血清白蛋白结合的抗原结合蛋白的明显优势是它们可以用于根据本发明的可以用于一种以上动物物种的多肽构建体中。本发明提供了几种显示这种跨物种结合的能够与血清白蛋白结合的抗原结合蛋白。如表6所示,尤其是SVA12L (SEQ ID NO:40) 和SVA06L (SEQ ID NO:39) 从与犬、马、猫和猪的血清白蛋白结合的含义上讲,提供了强大的跨物种结合。如表6和28所示,尤其是SVA16L (SEQ ID NO:37) 从与犬、马和猫的血清白蛋白结合的含义上讲,提供了强大的跨物种结合。

[0089] 因此,这种实施方案的更优选形式涉及根据本发明的能够与血清白蛋白结合的抗原结合蛋白,所述抗原结合蛋白与选自SEQ ID NO:37、39和40的序列的总氨基酸序列同一性至少为71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%,条件是CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列同一性至少为75%,优选至少为76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%。

[0090] 因此,本发明实施方案的更优选形式涉及一种多肽构建体(或融合蛋白),其包含至少一种根据本发明的能够与TeNT结合的抗原结合蛋白和至少一种能够与TeNT结合的抗原结合蛋白,其中所述至少一种能够与血清白蛋白结合的抗原结合蛋白优选是如上所述的根据本发明的抗原结合蛋白。

[0091] 本发明的实施方案的另一优选形式涉及多肽构建体(或融合蛋白),其包含至少一种根据本发明的能够与TeNT结合的抗原结合蛋白和至少一种能够与血清蛋白结合的抗原结合蛋白,其中所述血清蛋白是免疫球蛋白。

[0092] 这种实施方案的更优选形式涉及根据本发明的多肽构建体,其包含至少一种能够与TeNT结合的抗原结合蛋白和至少一种能够与血清蛋白结合的抗原结合蛋白,其中所述血清蛋白是IgG免疫球蛋白,优选马、猪、小鼠、豚鼠、人、牛、猫或犬。

[0093] 免疫球蛋白(如血清白蛋白)以相对较高的浓度存在于体内。这意味着根据本发明的包含至少一种能够与免疫球蛋白结合的抗原结合蛋白的多肽构建体,一旦施用于人体,将通过与血清免疫球蛋白的结合而容易地形成大产物。然而,同样对于能够与免疫球蛋白结合的抗原结合蛋白,例如低于 $1\mu\text{M}$ 的低 K_D 值将是优选的。

[0094] 本发明提供了以合适的 K_D 与Ig结合的抗原结合蛋白。图2提供了以低 K_D 结合免疫球

蛋白的根据本发明的抗原结合蛋白的八个实例及其序列。三个阴影区域表示高变区或互补决定区 (CDR) 的位置。

[0095] 因此,另一方面,本发明涉及特异性结合免疫球蛋白 (Ig) 的抗原结合蛋白,其中所述抗原结合蛋白优选包含氨基酸序列,所述氨基酸序列包含以FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4的顺序可操作地连接的4个框架区FR1至FR4和3个互补决定区CDR1至CDR3。优选地,CDR1具有选自自由如图3所示VHH序列SEQ ID NO:27-34的CDR1序列组成的组的氨基酸序列、或在一个或两个氨基酸残基上不同于CDR1的氨基酸序列;b) CDR2具有选自自由如图3所示VHH序列SEQ ID NO:27-34的CDR2序列组成的组的氨基酸序列、或在一个、两个、三个或四个氨基酸残基上不同于CDR2的氨基酸序列;并且,c) CDR3具有选自自由如图3所示VHH序列SEQ ID NO:27-34的CDR3序列组成的组的氨基酸序列、或在一个、两个、三个、四个或五个氨基酸残基上不同于CDR3的氨基酸序列;并且,其中每个框架区与如图3所示SEQ ID NO:27-34中的任一个的框架氨基酸序列具有至少50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100%氨基酸同一性。优选地,CDR1、CDR2和CDR3来自相同的SEQ ID NO。更优选地,框架区与互补决定区来自相同的SEQ ID NO。换句话说,在这种方面,本发明涉及能够与免疫球蛋白 (Ig) 结合的抗原结合蛋白,优选单结构域抗体 (SDA),其中这种抗原结合蛋白与选自SEQ ID NO:30、27、28、29、31、32、33或34的序列的总氨基酸序列同一性至少为70%,条件是CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列同一性至少为75%。

[0096] 优选地,能够与Ig结合的抗原结合蛋白与选自SEQ ID NO:27、28、29、30、31、32、33和34的序列具有超过70%的总体序列同一性,例如按优先顺序至少71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或甚至100%。优选地,CDR1、CDR2和CDR3区的序列同一性至少为75%。

[0097] 因此,这种实施方案的优选形式涉及根据本发明的能够与Ig结合的抗原结合蛋白,所述抗原结合蛋白与选自SEQ ID NO:27、28、29、30、31、32、33和34的序列的总氨基酸序列同一性至少为71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%,条件是CDR1、CDR2和CDR3区的氨基酸序列同一性至少为75%。

[0098] 更优选地,能够与Ig结合的SDA与选自SEQ ID NO:27、28、29、30、31、32、33或34的序列具有超过70%的总体同源性水平,例如按优先顺序71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或甚至100%,其中优选CDR1、CDR2和CDR3区域的同一性水平按优先顺序为76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99甚至100%。

[0099] 因此,这种实施方案的更优选形式涉及根据本发明的能够与Ig结合的抗原结合蛋白,所述抗原结合蛋白与选自SEQ ID NO:27、28、29、30、31、32、33和34的序列的总氨基酸序列同一性至少为71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%,条件是CDR1、CDR2和CDR3区的氨基酸序列同一性至少为76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99,或优选100%。

[0100] 根据表7,SVG 23对犬科动物具有特异性,而SVG03对马科动物具有特异性。

[0101] 更令人惊讶的是,本发明提供了能够与Ig结合的SDA,其显示出很大程度的跨物种

结合。从表7中还可以看出,就它们与例如猫科动物、犬科、马科、人类和猪的Ig (Fab片段) 结合的意义而言,特别是SVG06和SVG 13提供了非常强的跨物种结合。同样根据表7,特别是SVG24在结合犬和马的Ig (Fc片段) 的意义上提供了非常强的跨物种结合。

[0102] 因此,这种实施方案的甚至更优选的形式涉及根据本发明的能够与Ig结合的抗原结合蛋白,所述抗原结合蛋白与选自SEQ ID NO:27、30、31、32和33的序列的总氨基酸序列同一性至少为71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%,条件是CDR1、CDR2和CDR3区的氨基酸序列同一性至少为75%。

[0103] 这种实施方案的一个甚至更优选的形式涉及一种根据本发明的能够与Ig结合的抗原结合蛋白,所述抗原结合蛋白与选自SEQ ID NO:27、30、31、32和33的序列的总氨基酸序列同一性至少为71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或优选100%,条件是CDR1、CDR2和CDR3区的氨基酸序列同一性至少为76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或优选100%。

[0104] 因此,本发明实施方案的另一个更优选的形式涉及多肽构建体(或融合蛋白),其包含至少一种根据本发明的能够与TeNT结合的抗原结合蛋白和至少一种能够与血清蛋白结合的抗原结合蛋白,其中所述血清蛋白是Ig,其中所述至少一种能够与Ig结合的抗原结合蛋白优选是上述根据本发明的抗原结合蛋白。

[0105] 应当注意,一般而言,根据本发明的多肽构建体中各种抗原结合蛋白的顺序(它们相对于多肽构建体的N端和C端的位置)可以变化。这是由于以下事实:铰链采用了非结构化且具有柔性的构型;它们的主要功能是连接各种抗原结合蛋白。

[0106] 如上所述,在一个方面,本发明涉及一种多肽构建体(或融合蛋白),其包含至少一种根据本发明的能够与TeNT结合的抗原结合蛋白和至少一种能够与血清蛋白结合的抗原结合蛋白。甚至更令人惊讶地,对于包含两个或更多个能够与TeNT结合的SDA的根据本发明的多肽构建体而言,发现出乎意料的协同作用。在小鼠毒素中和试验中,二价构建体提供比如两个单价构建体的混合物更高的与TeNT结合的水平。当多肽构建体包含与TeNT的不同表位结合的两个或更多个能够与TeNT结合的SDA时,这种效果甚至更加显著。这种情况从表15可以看出,其中显示了根据本发明能够与TeNT结合的各种SDA的表位结合特性的概述。

[0107] 从表12可以立即清楚地看出,能够结合TeNT的五个不同的选择SDA被鉴定出来:选择A;SVT02,选择B;SVT03,选择C;SVT15,选择D;SVT06/08和选择E;SVT13/16/22/34。

[0108] 例如,发现包含两个SDA:(i)能够与TeNT结合并具有SEQ ID NO:17氨基酸序列的SDA和(ii)能够与TeNT结合并具有SEQ ID NO:15氨基酸序列的SDA的多肽构建体提供强协同作用。这种构建体的TeNT中和能力明显强于单个SVT-06和SVT-16SDA的能力(参见表19和20,实施例17)。

[0109] 因此,在一个甚至更优选的实施方案中,根据本发明的多肽构建体包含至少两种根据本发明的能够与TeNT结合的抗原结合蛋白。优选地,至少两种能够与TeNT结合的抗原结合蛋白中的每一个与选自选择A;SEQ ID NO:24,或选择B;SEQ ID NO:25,或选择C;SEQ ID NO:20,或选择D;SEQ ID NO:17或19或选择E;SEQ ID NO:22、15、23或14的序列具有至少70%的总氨基酸序列同一性,条件是至少两个SDA不包含来自相同选择的序列,并且条件是

CDR1、CDR2和CDR3区的氨基酸序列同一性至少为75%。因此,换句话说,至少两个能够与TeNT结合的抗原结合蛋白中的每一个与选自以下的序列的总氨基酸序列同一性至少为70%:

[0110] (i)SEQ ID NO:24;

[0111] (ii)SEQ ID NO:25;

[0112] (iii)SEQ ID NO:20;

[0113] (iv)SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:19;和

[0114] (v)SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:14;

[0115] 条件是CDR1、CDR2和CDR3区的氨基酸序列同一性至少为75%。

[0116] 根据本发明的多肽构建体优选包含2、3或4个根据本发明的能够与TeNT结合的抗原结合蛋白,更优选地2或3个,最优选地2个能够与TeNT结合的抗原结合蛋白。在一个优选的实施方案中,根据本发明的多肽构建体包含两个能够与TeNT结合并且与以下序列具有至少70%的总氨基酸序列同一性的抗原结合蛋白:

[0117] (i)SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:17;

[0118] (ii)SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:17;

[0119] (iii)SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:17;

[0120] (iv)SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:24;或

[0121] (v)SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:20;

[0122] 条件是CDR1、CDR2和CDR3区的氨基酸序列同一性至少为75%。

[0123] 根据本发明的多肽构建体,优选包含一种能够与血清蛋白结合的抗原结合蛋白。

[0124] 仅作为实例:根据本发明的这种多肽构建体可以例如包含:能够与TeNT结合的SDA,所述SDA与选择C;SEQ ID NO:20具有至少70%的总氨基酸序列同一性,条件是CDR1、CDR2和CDR3区域的氨基酸序列同一性至少为75%;和能够与TeNT结合的SDA,所述SDA与选择D;SEQ ID NO:17具有至少70%的总氨基酸序列同一性,条件是CDR1、CDR2和CDR3区的氨基酸序列同一性至少为75%。

[0125] 优选地,能够与此类构建体的TeNT结合的抗原结合蛋白与选自选择A;SEQ ID NO:24,或选择B;SEQ ID NO:25,或选择C;SEQ ID NO:20,或选择D;SEQ ID NO:17或19或选择E;SEQ ID NO:22、15、23或14的序列的总氨基酸序列同一性至少为71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或优选100%。

[0126] 更优选地,此类构建体的抗原结合蛋白与选自选择A;SEQ ID NO:24,或选择B;SEQ ID NO:25,或选择C;SEQ ID NO:20,或选择D;SEQ ID NO:17或19或选择E;SEQ ID NO:22、15、23或14的序列的总氨基酸序列同一性至少为71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或优选100%,并且CDR1、CDR2和CDR3区的氨基酸序列同一性至少为76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99,或优选100%。

[0127] 在一个更优选的实施方案中,根据本发明的多肽构建体包含具有如SEQ ID NO:15所示的序列的抗原结合蛋白、具有如SEQ ID NO:17和具有SEQ ID NO:40所示的序列的抗原结合蛋白。更优选地,多肽构建体以特定顺序N端-SEQ ID NO:17-SEQ ID NO:15-SEQ ID NO:40-C端包含具有如SEQ ID NO:17所示序列的SDA(SVT-06)、具有如SEQ ID NO:15所示序

列的SDA (SVT16)和具有如SEQ ID NO:40所示序列的SDA(SVA12)。甚至更优选地,多肽构建体具有如SEQ ID NO:51、77或78,优选51所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:51、77或78,优选51具有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或优选100%序列同一性,其中CDR1、CDR2和CDR3区的序列同一性至少为75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或优选100%。多肽构建体可以例如通过缺失His6标签和/或改变或替换如SEQ ID NO:51、77或78,优选51所示的接头序列来改变。

[0128] 在高度优选实施方案中,多肽构建体具有如SEQ ID NO:51所示氨基酸序列,或与SEQ ID NO:51具有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%,优选80%,更优选90%,甚至更优选95%,甚至更优选98%,最优选100%序列同一性,其中CDR1、CDR2和CDR3区的序列同一性至少为75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%,优选80%,更优选90%,甚至更优选95%,甚至更优选98%,最优选100%。多肽构建体可以例如通过缺失His6标签和/或改变或替换如SEQ ID NO:51所示的接头序列来改变。

[0129] 在高度优选实施方案中,多肽构建体具有如SEQ ID NO:77所示氨基酸序列,或与SEQ ID NO:77具有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%,优选80%,更优选90%,甚至更优选95%,甚至更优选98%,最优选100%序列同一性,其中CDR1、CDR2和CDR3区的序列同一性至少为75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%,优选为80%,更优选为90%,甚至更优选为95%,甚至更优选为98%,最优选为100%。多肽构建体可以例如通过缺失His6标签和/或改变或替换如SEQ ID NO:77所示的接头序列来改变。

[0130] 在高度优选实施方案中,多肽构建体具有如SEQ ID NO:78所示氨基酸序列,或与SEQ ID NO:78具有至少70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%,优选80%,更优选90%,甚至更优选95%,甚至更优选98%,最优选100%序列同一性,其中CDR1、CDR2和CDR3区的序列同一性至少为75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%,优选80%,更优选90%,甚至更优选95%,甚至更优选98%,最优选100%。多肽构建体可以例如通过缺失His6标签和/或改变或替换如SEQ ID NO:78所示的接头序列来改变。

[0131] 在最优选的形式中,根据本发明的多肽构建体具有如SEQ ID NO:51、47、48、52、53、61、62、49、50、77或78所示,优选如SEQ ID NO:51、47、48、52、53、61、62、49、77或78所示,更优选如SEQ ID NO:51、47、48、52、53、61、62或49所示,最优选如SEQ ID NO:51所示的序列,其中CDR1、CDR2和CDR3区的序列同一性至少为75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或优选100%。

[0132] 还令人惊奇地注意到,当混合在一起时,根据本发明的不同SDA的组合在小鼠破伤风毒素中和试验(TNT)中显示出更强的毒素中和作用。这在“实施例”部分的表21-23中显示。表21和24显示了测试的各种组合。表24显示,单个SDA SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6在一定稀释度下可为小鼠提供50%的保护,而SDA SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6和SVT15-3FW4M-GS2-SVG13M4-H6在相同稀释度下在小鼠中提供100%的保

护。

[0133] 如上所述,根据本发明的多肽构建体中的各种SDA优选通过接头肽彼此连接。接头肽是通常用于物理连接多肽结构域的氨基酸序列。

[0134] 此类接头可以是技术人员已知的任何接头。例如,接头可以是具有1至100个原子的长度的生物相容性聚合物。这可以例如是存在有聚赖氨酸、聚甘氨酸、聚谷氨酸、聚异亮氨酸、聚丝氨酸或聚精氨酸残基或其组合的聚合物。大多数接头肽由一种或多种氨基酸甘氨酸和丝氨酸的重复模块组成。仅作为实例:此类接头可能例如具有以下序列: $\text{Gly}_4\text{-Ser-Gly}_3\text{-Ser}$ 或 $(\text{Gly}_4\text{-Ser})_n$,其中n为2、3、4、5或6,优选为4、5或6。

[0135] 优选地,使用由氨基酸序列 $(\text{Gly})_4\text{-Ser}$ 的三个连续重复组成的15个氨基酸 $(\text{G}_4\text{S})_3$ 接头。这种接头最初用于生产单链Fv[27],但也经常用于VHHs的融合[28]。它是一种灵活的接头,可促进与不同抗原位点的独立结合。这种接头肽在本领域已被充分表征(例如,在抗体单链Fv(scFv)结构域的背景下),并已显示出其具有非结构化的柔性构型。另外,这种接头肽不干扰其连接的结构域的组装和结合活性。(Freund, C.等人,FEBS 320:97(1993))。在EP2655624中提供了合适的铰链的其他实例。

[0136] 用于蛋白质结构域融合的其他更刚性的接头也是已知的。Huston JS等人,Proc Natl Acad Sci.1988;85:5879-83,[28]Mukherjee J等人,PLoS ONE.2012;7:e29941,[29]Sepulveda J等人,Infect Immun.2010;78:756-63,[30]Vance DJ等人,J Biol Chem.2013;288:36538-47,[31]Klein JS等人,Protein Eng Des Sei.2014;27:325-30,Trinh R等人,Mol Immunol.2004;40:717-22。

[0137] 实施例部分(见下文)提供了本发明中使用的接头的实例。

[0138] 在另一方面,本发明涉及编码根据本发明的抗原结合蛋白或编码根据本发明的多肽构建体的DNA片段。此类DNA片段包含编码SDA或多肽构建体的遗传信息。

[0139] 在另一方面,本发明涉及一种核酸,其包含编码如上文所定义的根据本发明的抗原结合蛋白或根据本发明的多肽构建体的DNA片段。根据本发明的优选核酸是核酸构建体,例如质粒,其中DNA片段可操作地连接至启动子和任选地其他调节元件,例如终止子、增强子、聚腺苷酸化信号、分泌信号序列等等。此类核酸构建体特别适用于使用重组技术生产本发明的抗原结合蛋白或多肽构建体,其中编码所关注抗原结合蛋白的核苷酸序列(DNA片段)在合适的宿主细胞中表达,例如描述于Ausubel等人,“Current Protocols in Molecular Biology”,Greene Publishing and Wiley Interscience,New York(1987)以及Sambrook和Russell(2001)“Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第3版),Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor Laboratory Press,New York)。如本文所用,术语“可操作地连接”是指多核苷酸元件以功能关系连接。当核酸置于与另一个核酸序列的功能关系中时,所述核酸被“可操作地连接”。例如,如果启动子或增强子影响编码序列的转录,那么它可操作地连接至编码序列。可操作地连接意指所连接的DNA序列通常是连续的,并且当需要接合两个蛋白质编码区域时是连续的并且处于阅读框架中。

[0140] 合适的启动子是在宿主细胞中被识别并在该宿主细胞中驱动其控制的遗传信息表达的启动子。合适的启动子/宿主细胞组合在本领域已知已经有数十年了。

[0141] 可以将此类核酸插入合适的宿主细胞中,从而在合适的启动子的控制下表达抗原结合蛋白或多肽构建体。

[0142] 可以在原核和真核宿主细胞中表达包含编码根据本发明的任何SDA或根据本发明的任何多肽构建体的核酸的DNA片段。几十年来,所有这些宿主细胞中的表达系统是本领域已知的。

[0143] 描述大量表达系统的经典教科书是“Production of Recombinant Proteins: Novel Microbial and Eukaryotic Expression Systems”Gerd Gellissen(编) ISBN:978-3-527-31036-4,2004年12月,出版商Wiley-Blackwell。

[0144] “Opportunities and challenges for the baculovirus expression system”, (Monique M.van Oers, Journal of Invertebrate Pathology, 第107卷,增刊,2011年7月,第S3-页S15)中给出了昆虫细胞中异源蛋白表达方法的概述。在EP0698097中提出了在较低的真核宿主如霉菌和酵母中表达骆驼科SDA的具体方法。另外,实施例部分,更具体地实施例6和14(见下文)提供了SDA在酵母中表达的详细实例。

[0145] 因此,在另一方面,本发明涉及包含如上定义的核酸的宿主细胞。优选地,宿主细胞是用于产生根据本发明的抗原结合蛋白或根据本发明的多肽构建体的宿主细胞。

[0146] 宿主细胞可以是能够产生本发明的抗原结合蛋白的任何宿主细胞,包括例如原核宿主细胞,例如大肠杆菌,或(培养的)哺乳动物、植物、昆虫、真菌或酵母宿主细胞,包括例如CHO细胞、BHK细胞、人细胞系(包括HeLa、COS和PER.C6)、Sf9细胞和Sf+细胞。然而,用于产生本发明的抗原结合蛋白的优选的宿主细胞是真核微生物如酵母和丝状真菌的细胞。优选的酵母宿主细胞例如包括酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*),巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*),多形汉逊酵母(*Hansenula polymorpha*),安氏毕赤酵母(*Pichia angusta*)和乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)。产生本发明的抗原结合蛋白的优选菌株、构建体和发酵条件由van de Laar等人,(2007, *Biotechnology and Bioengineering*, 第96卷,第3期:483-494)描述。例如,抗原结合蛋白的生产可以在标准生物反应器中以10至10,000升的工作体积进行。

[0147] 在另一方面,本发明涉及产生根据本发明的抗原结合蛋白或根据本发明的多肽构建体的方法,其中所述方法包括以下步骤:a)在允许表达抗原结合蛋白或多肽构建体的条件下,培养包含根据本发明的抗原结合蛋白或根据本发明的多肽构建体的宿主细胞;和任选地b)从宿主细胞和培养基中的至少一种中回收、收获或纯化抗原结合蛋白或多肽构建体。合适的条件可以包括使用合适的培养基、合适的食物和/或合适的营养物的存在、合适的温度,以及任选地合适的诱导因子或化合物的存在(例如,当本发明的核苷酸序列在诱导型启动子的控制下);所有这些可以由技术人员选择。在此类条件下,本发明的氨基酸序列可以以组成性方式、瞬时方式或仅在适当诱导时表达。然后可以使用本身已知的蛋白质分离和/或纯化技术从宿主细胞/宿主生物和/或从其中培养所述宿主细胞或宿主生物的培养基中分离出本发明的抗原结合蛋白,例如(制备)色谱和/或电泳技术、差异沉淀技术、亲和力技术(例如,使用与本发明氨基酸序列融合的特异性、可裂解的氨基酸序列)和/或制备性免疫技术(即,使用针对待分离的抗原结合蛋白的抗体)。在一个实施方案中,将产生并任选回收的抗原结合蛋白或多肽构建体进一步与药学上可接受的载体混合。

[0148] 在另一方面,本发明涉及药物组合物,其包含至少一种根据本发明的能够与TeNT结合的抗原结合蛋白和/或至少一种根据本发明的包括至少一种根据本发明的能够与TeNT结合的抗原结合蛋白的多肽构建体和药学上可接受的载体。在另一个优选的实施方案中,

药物组合物包含至少两种根据本发明的能够与TeNT结合的抗原结合蛋白和/或至少一种根据本发明的包括至少两种根据本发明的能够与TeNT结合的抗原结合蛋白的多肽构建体。

[0149] 本文所用的药学上可接受的载体可以是简单的,例如无菌水、生理盐溶液或缓冲液,例如在生理离子强度和/或摩尔渗透压浓度下的缓冲水溶液(例如PBS)。

[0150] 药物的配制、施用方式和药学上可接受的赋形剂的使用是本领域已知和惯用的,例如在Remington;The Science and Practice of Pharmacy,第21版2005,University of Sciences in Philadelphia中有描述。尽管可以设想其他施用途径,例如粘膜施用或真皮内和/或皮内施用,例如通过注射,但是优选将本发明的药物组合物和药物配制成适合于静脉内或皮下或肌内施用。

[0151] 此类组合物以及根据本发明的抗原结合蛋白和/或根据本发明的多肽构建体可以成功地用于治疗或预防破伤风梭状芽孢杆菌感染后的临床疾病。

[0152] 因此,在另一方面,本发明涉及用作药物的根据本发明的抗原结合蛋白或根据本发明的多肽构建体。

[0153] 在另一方面,本发明涉及根据本发明的抗原结合蛋白和/或根据本发明的多肽构建体和/或根据本发明的药物组合物,其用于预防或治疗破伤风梭状芽孢杆菌感染后的疾病。换句话说,在这个方面,本发明涉及根据本发明的抗原结合蛋白和/或根据本发明的多肽构建体在制备用于预防或治疗破伤风梭状芽孢杆菌感染后的疾病的药物中的用途。或者,在这个方面,本发明涉及预防或治疗破伤风梭状芽孢杆菌感染后的疾病的方法,其中给有需要的受试者施用治疗上足够量的根据本发明的抗原结合蛋白和/或本发明的多肽构建体。因此,在这个方面,根据本发明的抗原结合蛋白、多肽构建体和/或药物组合物用于预防破伤风或治疗破伤风。

[0154] 如本文所用,术语“治疗(treat)”、“治疗(treatment)”或“治疗(treating)”是指将本发明的抗原结合蛋白、多肽构建体和/或药物组合物应用或施用至患有破伤风的受试者,其中所述对象用于治愈、部分或完全逆转、减轻、改善、抑制、延迟、遏制、减慢或停止破伤风或与破伤风有关的症状的进展或严重程度。术语“治疗”包括减少或缓解破伤风的至少一种不利影响或症状。如果一种或多种症状或临床标志减少,则治疗大体为“有效”。或者,如果破伤风的进展减少或停止,则治疗为“有效”。也就是说,“治疗”不仅包括症状或标志的改善,而且包括在不存在治疗的情况下预期发生的症状的进展或恶化得以停止或至少减缓。有益的或所需的临床结果包括但不限于症状的减轻、疾病程度的减小、疾病状态的稳定(即不恶化)、疾病进程的延缓或减慢、疾病状态的改善或缓和,以及缓解(无论是部分缓解或是全部缓解),无论是可检测或是不可检测。术语破伤风的“治疗”还包括提供破伤风的症状或副作用的减轻(包括姑息疗法)。如本文所用,术语“预防(prevent)”、“预防(prevention)”或“预防性(preventative)”(也称为预防性(prophylactic))是指将根据本发明的抗原结合蛋白、多肽构建体和/或药物组合物应用或施用至处于患上破伤风的风险中的受试者,目的是预防将来的破伤风疾病的发作,减轻、缓解、减缓、抑制其发展,减少其严重程度和/或降低其一种或多种症状或特征的发生。因此,可以将本发明的抗原结合蛋白、多肽构建体或药物组合物施用至不显示破伤风迹象的受试者和/或仅显示破伤风早期迹象的受试者,优选地是为了降低发生与破伤风相关的病状的风险。

[0155] 在一个实施方案中,受试者是动物,包括人,优选哺乳动物,更优选非人类哺乳动

物,甚至更优选马、犬、猫、猪或反刍动物牛科的成员(例如牛、山羊)。根据本发明的优选的受试者是例如野马(*Equus ferus*),非洲野驴(*Equus africanus*),家犬(*Canis familiaris*),家猫(*Felis catus*),家猪(*Sus scrofa domesticus*),黄牛(*Bos taurus*),绵羊(*Ovis aries*)和家山羊(*Capra aegagrus hircus*),最优选野马。

[0156] 用本发明的针对TeNT的抗原结合蛋白或多肽构建体的被动免疫可用于至少3种不同的情况。例如,在作为手术前标准程序一部分的预防性情况下,或在受伤并且可能感染破伤风梭状芽孢杆菌但尚未患病的受试者中。第三,在治疗方案中,当受试者患有破伤风时。根据预防性治疗或治疗性治疗,剂量有所不同,例如后者的剂量取决于物种,高出2到20倍。少量抗毒素剂量(例如1000IU)也可以在伤口部位周围局部施用。可以采用几种施用途径,例如肌内、皮下、静脉内、硬膜外、蛛网膜下或鞘内途径。能够以以下方式利用能够有效中和破伤风毒素的根据本发明的抗原结合蛋白和/或根据本发明的多肽构建体。待施用制剂应优选导致至少0.01-0.1IU/ml的血液浓度。因此,剂量优选基于体重/血容量。

[0157] 仅作为一个实例:在确定的人类病例中,患者应静脉内或肌肉内接受500-1000IU/kg。对于SDA SVT06-SVT16-SVA12(SEQ ID NO.:51)这将导致最大剂量为0.5-1mg/kg。对于小动物(猫和犬)已确定的病例,经典马抗毒素产品的剂量是静脉内给予100-1000IU/kg。对于SDA SVT06-SVT16-SVA12,这将导致最大剂量为0.1-1mg/kg。与较小的动物相比,较大的动物接受按比例较小的剂量。例如,作为术前治疗方法,马可肌肉内或皮下接受7500-11000IU,高至100kg的马驹通过任一种途径接受3000-4000IU。作为预防措施,受伤的马(不患有破伤风)可以通过肌肉内或皮下接受15000-20000IU,高至100kg的马驹通过任一种途径接受6500-8000IU。患有破伤风的马应该通过一种途径(如果制剂允许的话)或通过多种途径的组合至少接受50000-60000IU。

[0158] 在临床情况下,根据所见效果,每天可以重复进行破伤风治疗。

[0159] 所有推荐剂量通常可提供至少3周的被动保护。再次,仅作为实例:构建体SVT06-SVT16-SVA12(SEQ ID NO.:51)的半衰期显示为使得在向猪施用0.3mg/kg后21天后,仍可检测到血清水平为0.1微克/毫升(等于大于0.1IU(实施例17,表25)),如在实施例16,图6中所见。当将相同的构建体SVT06-SVT16-SVA12(SEQ ID NO.:51)施用(0.17mg/kg,肌内)至马时,在21天后血清水平为0.4-0.6微克/毫升(实施例23),具有完全保护性的水平。

[0160] 抗毒素的量(也称为“效力”或“中和能力”)以国际单位(IU)给出。破伤风类毒素全球标准化的第一个里程碑是1928年制定了马源性破伤风抗毒素国际标准,该标准于1969年被替换(WHO Expert Committee on Biological Standardization.Twenty-second report.Geneva,World Health Organization,1970(WHO Technical Report Series,第444期)。这种制剂的可用性和使用使类毒素得以在人类中产生破伤风抗毒素的能力方面进行评估,并允许以国际单位(IU)来定义抗毒素的保护单元。中和能力例如可以如实施例17(“SDA在小鼠模型中破伤风毒素中和能力的分析”)中所示确定。

[0161] 商业上推荐的物种抗毒素剂量有所不同,并且主要基于经验数据。可以采用几种施用途径,例如肌内、皮下、静脉内、硬膜外、蛛网膜下或鞘内途径。能够以相同的方式使用根据本发明的能够与TeNT结合并且能够有效地中和破伤风毒素的抗原结合蛋白。一剂抗毒素应优选导致血液浓度至少为0.01-0.1IU/ml。在确定的人类病例中,优选静脉内或肌肉内施用500-1000IU/kg马抗毒素。根据所用制剂的不同,可以肌肉内注射多达5000-8000IU的人

类抗破伤风免疫球蛋白。对于小动物(例如猫和犬)的确定病例,经典马抗毒素产品的优选剂量是静脉内给予100-1000单位/kg。与较小的动物相比,较大的动物接受按比例较小的剂量。例如,作为术前治疗方法,马可肌肉内或皮下接受7500-8500IU,高至100kg的马驹通过任一种途径接受3000-4000IU。作为预防措施,受伤的马(不患有破伤风)可以通过肌肉内或皮下接受15000-17000IU,高至100kg的马驹通过任一种途径接受6500-8000IU。患有破伤风的马优选通过任何途径(如果制剂允许的话)或通过几种途径的组合施用至少50000IU。在临床情况下,根据所见效果,每天可以重复进行破伤风治疗。所有推荐剂量通常可提供长达1-3周的被动保护,具体取决于物种和所提供的治疗方法。除被动免疫外,应优选对受试者进行主动接种,即所谓的被动主动免疫。这提供了短期免疫力(被动)和长期体液免疫力(主动)。当第一免疫力下降时,第二免疫力出现,并且因此避免了无保护窗口。主动免疫可以通过配制的破伤风类毒素来完成。此类基于破伤风的类毒素疫苗是可商购的。基于类毒素的疫苗可以与基于SDA的抗毒素同时给予,并且优选在21天内重复使用。

[0162] 在另一方面,本发明涉及用于检测例如体液中的TeNT或抗TeNT抗体的诊断测试。旨在体外检测例如人或动物的血液中的毒素或抗TeNT抗体的此类诊断测试目前相当复杂且耗时。这与以下事实有关:即使血液中非常低的TeNT水平也具有高毒性,因此此类测试必须非常灵敏。现在,本发明提供了对TeNT表现出非常高的亲和力(即低 K_D 值)的抗原结合蛋白。根据定义,基于此类抗原结合蛋白的诊断测试非常灵敏,因此此类抗原结合蛋白非常适合用于诊断测试。

[0163] 仅作为此类测试的一个实例:在本领域中数十年来众所周知的经典夹层ELISA测试中,可以将96孔板或微孔板、侧向流动装置的载体材料甚至芯片涂布一种或多种根据本发明的抗原结合蛋白。再次;仅作为实例:SDA SVT06可用于涂布步骤。由于其出色的亲和特性,SDA SVT06会强烈结合甚至微量的TeNT(如果存在)。在第二步中,可以将要筛查是否存在TeNT的体液添加到孔中。如果存在TeNT,它将与SDA SVT06结合。在洗涤步骤之后,例如可以将缀合的SDA SVT15添加至孔中。如果TeNT存在于体液中并因此与SDA SVT06结合,则缀合的SDA SVT15可以与结合的TeNT的另一个表位结合,并且在随后的显色步骤中,将发生显色反应,从而表明甚至存在微量的TeNT。

[0164] 同样,根据本发明的能够与TeNT结合的抗原结合蛋白适用于检测体液中针对TeNT的抗体的测试。在此类测试中,可以将要测试的体液与少量毒素混合。如果存在抗TeNT抗体,它们将结合毒素。此后(优选在去除抗体-TeNT复合物之后),可以对体液进行上述的夹层ELISA,以查看是否仍然存在任何毒素。如果存在,这表明体液中不存在抗TeNT抗体。

[0165] 同样地,根据本发明的能够与TeNT结合的SDA适用于如下测试,其中将TeNT L链的蛋白水解切割活性用于检测TeNT,所述TeNT是利用与TeNT H链结合的受体来捕获的。当前,正在开发此类结合和裂解(BINACLE)测定法(Behrendsdorf-Nicol等人,2015,ALTEX 32, 137-142)。上述单价VHH可以在此类测定中用作结合结构域。对于这种应用,多价与TeNT结合的SDA SVT06-SVT16-SVA12是甚至更优选的,因为它显示出更高的亲和力并结合两个单独的TeNT抗原位点,这增加了它仅结合活性TeNT形式的机会。

[0166] 因此,本发明的另一个实施方案涉及诊断试剂盒,其包含根据本发明的能够与TeNT结合的抗原结合蛋白。此类诊断试剂盒可以例如进一步包括96孔板、微孔板或芯片,所述板或芯片预涂有一种或多种根据本发明的能够与TeNT结合的抗原结合蛋白。另外或替代

地,它可以例如包含呈缀合形式的一种或多种根据本发明的能够与TeNT结合的抗原结合蛋白。此类诊断试剂盒可以进一步包括用于执行诊断测试的说明书。

[0167] 本发明还涉及用于检测加工肉例如磨碎的牛肉中特定种类白蛋白的诊断试剂盒。旨在检测例如香肠中的碎肉中的马白蛋白的此类诊断试剂盒目前相当复杂且耗时。现在,本发明提供了对马白蛋白具有高结合能力的抗原结合蛋白。因此,本发明提供检测白蛋白的方法,所述方法包含以下步骤:

[0168] i) 提供一种能够与血清白蛋白结合的SDA,优选与选自SEQ ID NO:40、37、38、39、41和42的序列具有至少70%的总氨基酸序列同一性,条件是CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列同一性至少为75%;

[0169] ii) 使步骤i)的SDA与测试样品接触;和

[0170] iii) 检测步骤i)的SDA与步骤ii)样品中存在的白蛋白之间可能的结合。

[0171] 步骤i)的SDA的特征和定义如本文其他地方所述。步骤ii)的样品优选为包含加工肉的样品,更优选为怀疑包含来自一个以上物种的肉的加工肉。被检测的白蛋白优选是马白蛋白。步骤iii)中的检测可以使用本领域已知的任何方法进行,例如ELISA、表面等离子共振或等温滴定量热法。所述方法优选是体外方法。因此,本发明还涉及步骤i)的SDA在检测白蛋白中的用途。

[0172] 仅作为此类测试的一个实例:在本领域中数十年来众所周知的经典夹层ELISA测试中,可以将96孔板或微孔板、传感器或例如微芯片涂布一种或多种根据本发明的抗原结合蛋白。再次;仅作为实例:SDA SVA12或SVA16可以用于涂布步骤。由于其非常高的结合特性,这些SDA可以捕获甚至微量的白蛋白(如果存在)。在第二步骤中,可以将溶解在待筛选白蛋白存在的流体中的磨碎的肉添加到孔中。如果存在白蛋白,它将与例如SDA SVA12或SVA16结合。洗涤步骤后,可以将缀合的SDA SVA06或SVA07添加到孔中。如果白蛋白存在于体液中并因此与SDA SVA12或SVA16结合,则缀合的SDA SVA06或SVA07会与白蛋白的另一个表位结合,并且在随后的显色步骤中会发生显色反应,从而表明甚至存在微量的白蛋白。

[0173] 本发明还涉及用于确定例如马单克隆抗体的亲和力表征的生物传感器平台。此类平台可以使用例如SDA SVG24L将马Ig捕获到传感器或微芯片上,然后可以分析与靶蛋白的相互作用。

[0174] 高度优选使用低SDA浓度。为此,还优选与毒素快速缔合,甚至更优选地延迟毒素的解离,以防止其发挥其活性,并且可以在(中毒)的动物中长时间循环(参见实施例16和22)。

[0175] 表1.本文所用的各种SDA、引物等和构建体的名称与它们在序列表中的SEQ ID NO之间的关系。当提供两个SEQ ID NO时,括号中的数字是编码另一个SEQ ID NO的多肽的多核苷酸。

[0176]

名称	质粒	SEQ ID NO
BOLI192		1
LAM07		2
LAM08		3
BOLI401		4
SacI-BstEII		5
MPE25		6
MPE26		7
RevSeq		8
BOLI166		9
BOLI188		10
pUR4585A		11
pUR4585G		12
SVT20		13
SVT34		14
SVT16		15
SVT25		16
SVT06		17
SVT31		18
SVT08		19
SVT15		20
SVT29		21
SVT13		22
SVT22		23
SVT02		24
SVT03		25
SVT05		26
SVG 13		27
SVG 18		28
SVG 19		29
SVG06		30
SVG23		31
SVG24		32
SVG03		33
SVG07		34
sdAb-31		35
sdAb-32		36
SVA16		37
SVA04		38
SVA06		39
SVA12		40
SVA02		41
SVA07		42
SVT02-GS2-SVG06M4-H6	pRL482	43
SVT06-GS2-SVG06M4-H6	pRL483	44
SVT15-3FW4M-GS2-SVG6M4-H6	pRL484	45
SVT16-L123Q-GS2-SVG06M4-H6	pRL485	46
SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVG-06M4-H6	pRL486	47
SVT02-GS3-SVT06-GS2-SVG06M4-H6	pRL487	48
SVT06-GS3-SVT15-3FW4M-GS2-SVG06M4-H6	pRL488	49
SVT06-GS2-SVA12M2-H6	pRL489	50
SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6*	pRL490	51
SVT06-GS3-SVT02-GS2-SVG06M4-H6	pRL491	52

[0177]	SVT02-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVG06M4-H6	pRL492	53
	SVT02-GS2-SVA12M2-H6	pRL493	(54) 65
	SVT15-3FW4M-GS2-SVA12M2-H6	pRL494	(55) 66
	SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6	pRL495	(56) 67
	SVT02-GS2-SVG13M4-H6	pRL496	(57) 68
	SVT06-GS2-SVG13M4-H6	pRL497	(58) 69
	SVT15-3FW4M-GS2-SVG13M4-H6	pRL498	(59) 70
	SVT16-L123Q-GS2-SVG13M4-H6	pRL499	(60) 71
	SVT02-SVT15-3FW4M-GS2-SVG13M4-H6	pRL500	(61) 72
	SVT06-SVT16-L123Q-GS2-SVG13M4-H6	pRL501	(62) 73
	SVT08-GS2-SVG13M4-H6	pRL502	(63) 74
	VH2B 引物		64
	SVT06-GS3-SVT15-3FW4M-GS2-SVA12M2-H6	pRL505	(75) 77
	SVT15-3FW4M-GS3-SVT06-GS2-SVG13M5-H6	pRL506	(76) 78

[0178] *也缩写为SVT06-SVT16-SVA12。

[0179] 在此文件中并且在其权利要求中,动词“包含”和其变形以其非限制性含义使用以便意指包括词语之后的项目,但是不排除未特别提到的项目。另外,以不定冠词“一(个) (a/an)”来提到某一要素不排除存在一个以上要素的可能性,除非上下文明确要求仅存在一个要素。因此,不定冠词“一(个) (a/an)”通常表示“至少一个”。

[0180] 当与数字值结合使用时(例如,大约10),词语“大约”或“近似”优选地是指该值可以是给定值(10)加上或减去该值的0.1%。

[0181] 在本说明书中叙述的所有专利和参考文献全部通过引用并入本文。

[0182] 除非另有说明,否则本发明的实施将采用分子生物学、病毒学、微生物学或生物化学的标准常规方法。这类技术描述于Sambrook等人(1989)Molecular Cloning, A Laboratory Manual(第2版),Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor Laboratory Press;Sambrook和Russell(2001)Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第三版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,NY;Ausubel等人(1994)Current Protocols in Molecular Biology,Current Protocols,USA的第1卷和第2卷;和Brown(1998)Molecular Biology LabFax,Second Edition,Academic Press(UK)的第I卷和第II卷;Oligonucleotide Synthesis(N.Gait编);Nucleic Acid Hybridization(Hames和Higgins编)。

[0183] 仅出于说明目的提供以下实施例,并且不意图以任何方式限制本发明的范围。

[0184] 附图描述

[0185] 图1-随后由酵母产生的经分离的TeNT结合SDA(SVT克隆)的序列。根据IMGT系统对SDA进行比对和编号。破折号表示为序列比对引入的空位。不同的互补决定区(CDR)和框架区(FR)的定义也根据IMGT系统。三个CDR区域以灰色背景指示。在FR2中插入额外的位置50a至50d,以适应在SVT06、SVT08和SVT31的这种区域中4个氨基酸的异常插入。还在CDR2中引入了其他残基以适应SVT05的长CDR2。在SVT16和SVT25的IMGT位置60处引入了另一个空位,以使这些SDA的残基62和63与SVT20和SVT34中的相同残基对齐。对于每个SDA,都将SDA分类至亚家族,并分类至CDR3组[52]

[0186] 图2-随后由酵母产生的经分离的IgG结合SDA(SVG克隆),以及两个参考SDA(sdAb-31和sdAb-32)的序列。根据IMGT系统对SDA进行比对和编号。破折号表示为序列比对引入的空位。不同的互补决定区(CDR)和框架区(FR)的定义也根据IMGT系统。三个CDR区域以灰色

背景指示。对于每个SDA,都将SDA分类至亚家族,并分类至CDR3组[52]。

[0187] 图3-随后由酵母产生的经分离的A1b结合SDA (SVA克隆)的序列。根据IMGT系统对SDA进行比对和编号。破折号表示为序列比对引入的空位。不同的互补决定区(CDR)和框架区(FR)的定义也根据IMGT系统。三个CDR区域以灰色背景指示。对于每个SDA,都将SDA分类至亚家族,并分类至CDR3组[52]。

[0188] 图4-SVT SDA与TeNT结合的蛋白质印迹分析。将通过还原SDS-PAGE分离的TeNT印迹条与上面所示的生物素化VHH一起孵育。指示了相关分子量标记的位置。预计TeNT重链将以约100kDa迁移,轻链将以约50kDa迁移。

[0189] 图5A-单体和多聚体SDA的SDS PAGE分析。加载的SDA显示在每个泳道上方。在多聚体SDA的情况下,还指示了编码SDA的pRL质粒。每个图右侧的箭头表示单体SDA和多聚体SDA的位置。标记蛋白的分子量在右侧显示。图A,含有SVG06的多聚体SDA和三个参考单体SDA。

[0190] 图5B-图B,包含SVA12或SVG13的多聚体SDA及其相应的单体SDA。在单体和多聚体SDA中,此凝胶中的TeNT结合SDA的顺序始终为SVT02、SVT16、SVT06和SVT15-3FW4M。

[0191] 图6A-注射(肌内)至仔猪中的多聚体SDA的血清半衰期。在0小时的时间注射SDA,并在1、2、4、8、11、14、21和28天收集血清。通过ELISA测量血清样品中存在的SDA的量。给出了6头仔猪的平均值和标准偏差(图A-D)。图A:SVT06-GS2-SVA12M2-H6(0.2mg/kg)。

[0192] 图6B-图B:SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6(0.3mg/kg)。

[0193] 图6C-图C:SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6(0.5mg/kg)。

[0194] 图6D-图D:SVT16-L123Q-GS2-SVG13M4-H6(0.5mg/kg)。用24至96小时(预计48小时)或96至504小时(预计96小时)的数据对血清半衰期进行了曲线拟合。

实施例

[0195] 1.美洲驼免疫和噬菌体展示文库的产生

[0196] 以相同的方式免疫美洲驼(Lama glama)(no.9236和9237)。在初次免疫(DPI)后0、21和42天,在每只美洲驼的右大腿肌肉内注射市售的破伤风疫苗(即用型,基于破伤风类毒素)1毫升,无需进一步添加佐剂。制备了0.5mg chropure马IgG(Jackson Immunoresearch Laboratories,West Grove,PA)、0.5mg chropure犬IgG(Jackson Immunoresearch Laboratories)、0.5mg马A1b(Rockland Immunochemicals,Limerick,PA)、0.5mg犬A1b(Molecular Innovations,Novi,MI)和8μg重组破伤风毒素片段C(rTTC;Reagent Proteins, San Diego,CA)的靶抗原混合物。体外实验[5]表明,片段C(也称为Hc或TTC)负责破伤风毒素与神经元的结合。用Stimune佐剂(Thermofisher Scientific,Lelystad,the Netherlands)将抗原混合物乳化,并在0和21DPI肌肉内注射到每个美洲驼的左大腿。将以IMS1312佐剂(Seppic,France)辅助的相同抗原混合物在42DPI肌肉内注射至每个美洲驼的左大腿。在28和49DPI处采集肝素化血样(150ml),立即分离出外周血淋巴细胞(PBL)。在0、28和49DPI采集用于血清制备的血样。

[0197] 使用RNeasy Maxi试剂盒(Qiagen)从PBL中提取总RNA,并使用dT18引物和Superscript III逆转录酶(Invitrogen,Carlsbad,CA)将所述总RNA用于制备cDNA。使用引物BOLI192(AACAGTTAAG CTTCGCTTG CGGCCGCTAC TTCATTTCGTT CCTGAGGAGA CGGT,SEQ ID NO:1)、lam07(AACAGTTAAG CTTCGCTTG CGGCCGCGGA GCTGGGGTCT TCGCTGTGGT GCG,SEQ ID

NO:2)、以及引物1am08 (AACAGTTAAG CTTCCGCTTG CGGCCGCTGG TTGTGGTTTT GGTGTCTTGG GTT, SEQ ID NO:3) 和BOLI401 (AACAGTTAAG CTTCCGCTTG CGGCCGCTGG TTGTGGTTGT GGTATCTTGG GTT, SEQ ID NO:4) 的混合物来执行对于SDA具有特异性的三个PCR,所有三种物质与引物VH2B (SEQ ID NO:64) 组合[45]。所得的PCR片段用PstI和NotI消化,并插入噬菌体展示质粒pRL144[19]。这些连接用于通过电穿孔转化大肠杆菌TG1细胞 (Lucigen, Middleton, WI, USA), 产生十二个文库 (称为pAL808至pAL819)。

[0198] 2. 酵母生产cAb-TT2单域抗体

[0199] 在面包酵母中产生了与破伤风全毒素但不与rTTC结合的单域抗体 (SDA) cAb-TT2 [46], 用于TeNT结合SDA的随后噬菌体展示选择。产生编码这种SDA作为酵母转化酶信号序列和5' -前导序列的融合体的合成基因, 所述基因呈SacI-BstEII片段形式。将其插入质粒pRL188中, 从而产生与美洲驼长铰链区相连的SDA, 其中含有一个半胱氨酸和一个his6标签[2]。这种表达形式特别适合于将SDA固定在固体表面上[3]。cAb-TT2SDA在面包酵母菌株SU51中以150ml规模生产, 并通过固定金属亲和色谱法 (IMAC) 纯化, 并且分离的SDA的一部分如前所述被生物素化[3]。

[0200] 3. TeNT结合SDA的噬菌体展示选择

[0201] 以下试剂用于噬菌体展示选择。在前面的实例中描述了酵母生产的cAb-TT2。破伤风毒素中和mAb TT10[47,48]是从美国国家生物标准和控制研究所 (National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC; Potters Bar, United Kingdom) 购买的。真实的破伤风全毒素 (TeNT) 购自List Biological Laboratories (Campbell, CA), rTTC在实施例1中进行了描述。

[0202] 使用辅助噬菌体VCSM13将十二个文库用于噬菌体拯救, 并如先前所述进行噬菌体展示选择[49]。但是, 使用的程序已通过以下方式进行了修改:

- [0203] • 96孔ELISA板用于选择而不是免疫管[50]
- [0204] • 每个淘选中使用的噬菌体量较低, 约为 10^{10} 转导单位 (TU)
- [0205] • 胰蛋白酶用于洗脱噬菌体[74]
- [0206] • 合并三种同种型 (铰链引物) 的噬菌体文库。

[0207] 此外, 通过同时噬菌体ELISA进行选择, 以监测不同的淘选程序并决定应进一步使用哪些淘选测试。

[0208] 在与直接涂布的TeNT或rTTC结合的SDA的两轮噬菌体展示选择中筛选噬菌体展示文库。

[0209] 此外, 对用cAb-TT2 SDA或mAb TT10捕获的TeNT进行选择。有时, 与第一轮相比, 第二轮噬菌体展示使用了不同的抗原。

[0210] 如先前所述[19], 采用ELISA来检测十倍稀释的大肠杆菌培养上清液中存在的可溶性SDA与直接涂布抗原的结合, 所述过程使用小鼠mAb抗myc标签PO缀合物进行SDA检测。但是, 使用PBS缓冲液以 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度涂布TeNT和rTTC, 而在50mM碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液 (pH 9.6) 中以 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度涂布cAb-TT2。仅报道了最终也在酵母中表达的SDA克隆的吸光度值。

[0211] 为了鉴定单个TeNT结合物, 用来自第二轮淘选的单个克隆接种了八个96孔板, 并如前所述诱导在96孔板中产生可溶性SDA[49]。ELISA中使用了不同的抗原和含有可溶性

SDA的大肠杆菌上清液的10倍稀释液。在ELISA中,在直接涂布的TeNT和rTTC上、在cAb-TT2捕获的TeNT上筛选所有克隆。

[0212] 此外,所有克隆均在GT1b-TeNT结合抑制ELISA中进行筛选,以检测抑制毒素-受体相互作用的SDA。TeNT-GT1b抑制ELISA最适用于比较不同SDA的毒素结合和神经元结合阻断能力,因为它不依赖于例如生物素化效率、表位标签的可及性以及由于涂布程序而引起的变性。

[0213] 根据[8]进行了GT1b-TeNT抑制ELISA。通过在室温(RT)下过夜孵育,在96孔聚苯乙烯板上以100 μ l/孔涂布甲醇中的10 μ g/ml来自牛脑的GT1b神经节苷脂(Sigma Aldrich, St Louis, MO)。在过夜温育过程中,甲醇完全蒸发。在用PBS手动洗涤板后,所有随后的孵育均在含有0.5% BSA和0.05% Tween-20的PBS中于室温进行1小时。在单独的96孔聚苯乙烯ELISA板中,1 μ g/ml TeNT(List Biological Laboratories)与SDA、大肠杆菌培养上清液或mAb以100 μ l/孔预孵育,并在室温孵育1小时。然后将90 μ l这些样品转移到涂有GT1b的板上,并在室温下孵育1小时。然后将板与100 μ l/孔的49DPI的1000倍稀释的美洲驼9237血清一起孵育。用山羊抗美洲驼IgG-P0缀合物(Bethyl Laboratories, Montgomery, TX)检测到结合的美洲驼IgG。结合的P0通过用TMB染色来检测。用硫酸终止反应,并使用分光光度计测量450nm处的吸光度。

[0214] 为了确定SDA(通过划线、挑出单菌落而纯化)的序列,使用引物MPE25(TTTCTGTATGGGGTTTTGCTA, SEQ ID NO:6)和MPE26(GGATAACAATTCACACAGGA, SEQ ID NO:7)通过PCR获得用于序列分析的DNA片段。使用BigDye Terminator v 1.1循环测序试剂盒和自动ABI3130 DNA测序仪(Applied Biosystems, Nieuwerkerk a/d IJssel, The Netherlands)进行序列分析。纯化的PCR片段与引物MPE25和RevSeq(TCACACAGGAAACAGCTATGAC, SEQ ID NO:8)作为模板。从两个反应确定所有序列。所有序列的解释都是基于翻译后的SDA序列进行的。用于SDA克隆的PstI位点与成熟SDA的氨基酸4和5重叠。因此,由使用的噬菌体展示载体编码的序列QVQ(氨基酸1-3)被附加到SDA N端。根据以序列VTVSS终止的成熟SDA编码区域的IMGT编号系统[51]对SDA进行比对。如前所述,SDA被分为亚家族[52]。亚家族C表示类似于常规的SDA,缺乏SDA典型的FR2残基。此类SDA通常以较低的水平生成。被称为亚家族1、2和3的SDA表示三个真正的SDA亚家族。亚家族X表示无法分类的SDA。基于具有相同的CDR3长度和CDR3中至少65%的序列同一性,SDA也分为CDR3组。还检查SDA序列中是否存在潜在的N-糖基化位点(Asn-X-Ser/Thr,其中X是除Pro以外的任何氨基酸)。选择用于酵母表达的克隆缺乏此类N-糖基化位点。

[0215] 表2显示了十四个与TeNT结合的SDA克隆,它们以“SVT”开头,后跟一个数字。分别在cAb-TT2或mAb TT10捕获的TeNT上选择的两种SDA SVT02和SVT03确实与cAb-TT2捕获的TeNT结合,但不与直接涂布的TeNT或rTTC结合,并且不抑制GT1b-TeNT的相互作用,因为测得的吸光度与不包含SDA的大肠杆菌培养上清液观察到的吸光度相当(表2)。这些SDA可能与TeNT表位结合,所述表位的构型受被动吸附到聚苯乙烯中的影响,导致与之前对于其他抗原观察到的抗原性相比,抗原性降低[3, 53]。另外十二个SDA确实与直接涂布的和捕获的TeNT结合,与直接涂布的rTTC结合并且确实抑制了TeNT-GT1b的相互作用,其中11个SDA在直接涂布的TeNT或rTTC上选择(表2)。三种SDA,SVT05、SVT06和SVT08仅显示GT1b-TeNT相互作用的部分抑制作用,因为吸光度值从无SDA的样品中的约1.3降低至0.72-0.99。

[0216] 14个SVT SDA的序列形成七个CDR3组,用字母A到G表示(图1)。来自相同CDR3组的克隆在ELISA中通常表现相似(表2)。来自CDR3组A、B、C、D和G的十二个克隆均抑制GT1b-TeNT相互作用,并与直接涂布的TeNT和rTTC以及与cAb-TT2捕获的TeNT结合。形成CDR3组E和F的SVT02和SVT03克隆虽然抑制了cAb-TT2捕获的TeNT,却不抑制GT1b-TeNT相互作用,也不与直接涂布的TeNT或rTTC结合。对于按照CDR3组讨论的各种SDA都观察到了几个显著的序列特征。

[0217] 来自CDR3组A的四个SDA克隆和形成CDR3组C的两个SDA克隆在IMGT位置123处含有Leu,这与酵母中较低的生产水平有关[11]。来自CDR3组C的两个SDA克隆也具有Lys120和Ile122,这是编码FR4的J7片段的典型特征,与酵母中SDA产生水平降低相关[11]。这表明这些SDA通过突变K120Q、I122T和L123Q更高地产生。

[0218] 来自CDR3组B的所有三个SDA克隆在位置50a-50d处都含有异常插入的氨基酸序列VEDG。它位于FR2区域的中间,与残基Arg 50(Kabat位置45)相邻,在SDA文献中经常提到这是SDA最典型的氨基酸取代。常规的SDA通常在IMGT位置50处包含Leu,其与VL结构域疏水接触。SDA最常在IMGT位置50处有Arg。这种取代使以前的VL界面更具亲水性[1]。VEDG插入的亲水性残基D(Asp)和E(Glu)的插入最有可能也使FR2区更具亲水性。部分由于这些酸性残基,这些克隆的预测等电点(IEP)较低。SDA经常观察到较低的IEP,并与SDA的溶解度增加有关[54]。还值得注意的是,CDR2和CDR3区很长。在SDA中,很长的CDR3很普遍[1,52]。长的CDR2较不常见,大概是由于体细胞超突变引起的[55]。

[0219] 形成CDR3组D的SVT13和SVT22克隆在IMGT位置55处具有Cys,而CDR3中的Cys最有可能形成亚家族3SDA典型的附加二硫键[52]。尽管CDR3序列显然是同源的,但SVT13和SVT22高度多样,并显示32个氨基酸差异。

[0220] 来自CDR3组G的单个克隆SVT05具有17个残基的非常长的CDR2(请参见上面有关CDR3组B的讨论)和较低的IEP。

[0221] 4. IgG结合SDA的噬菌体展示选择

[0222] 基本上如先前实施例所述,使用来自犬或马的直接涂布的IgG来完成IgG结合SDA的噬菌体展示选择。为了选择与犬和马IgG都结合的SDA,第二轮淘选不仅在相同物种起源的IgG上进行,而且在其他物种的IgG上进行。

[0223] 为了鉴定单个IgG结合物,用来自第二轮淘选的单个克隆接种六个96孔板,并诱导在96孔板中产生可溶性SDA[49]。如先前所述[19],在ELISA中,筛选所有克隆与不同物种的直接涂布的IgG以及Fab和Fc片段的结合。马和犬IgG抗原在实施例1中描述。马IgG Fc购自Fitzgerald Industries(Tompkinsville,KY),犬Fab购自Rockland Immunochemicals。

[0224] 仅报道了最终也在酵母中表达的SDA克隆的吸光度值。为此,优先选择与犬和马,优选甚至更多物种的各自抗原结合的IgG结合克隆。此外,优先选择与Fab片段结合的克隆。这些SDA最适合治疗应用,因为Fab结合SDA预期不会干扰与IgG半衰期有关的新生Fc(Brambell)受体的结合,并且因为多物种识别使得异型IgG变异不太可能导致无法识别特定个体动物中的IgG。

[0225] 表3显示了八个以“SVG”开头,后跟一个数字的IgG结合SDA克隆。使用不含SDA的大肠杆菌培养上清液,对于马IgG的背景吸光度值为0.26,大大高于其他IgG样品。这可能表明马IgG与所用的过氧化物酶缀合物结合。ELISA中不同SDA之间的最大吸光度也是高度可变

的,大概是因为用于涂布的抗原不是纯蛋白,而是具有不同同种型和不同可变域的不同IgG的混合物。SDA SVG03和SVG24与马的Fc片段结合,但不与犬或马的Fab片段结合。SDA SVG23仅与犬IgG结合。由于它不与犬Fab结合,因此推测它可以与犬Fc结合。SVG03与马的IgG结合,但不与犬、人、猪、牛或豚鼠的IgG结合。SVG24与犬、马和猪IgG结合,但不与人、牛和豚鼠IgG结合。因此,三个Fc特异性SDA也具有物种特异性。SDA SVG06、SVG07、SVG13、SVG18和SVG19与犬和马的Fab片段结合,但不与马Fc片段结合。它们与所有上述六个物种的IgG结合。因此,五个Fab特异性SDA也具有更广泛的物种特异性。

[0226] 如先前实例中所述进行序列分析。选择用于酵母生产的八个克隆(图2)都属于不同的CDR3组。所有三个SDA与犬和马IgG的Fab片段以及所有测试的六个物种的IgG结合。所有三个SDA和SVG06都是类似于常规的SDA(亚家族C)。它们都没有用Trp118(根据Kabat编号方案,残基103)取代亲水残基(通常为Lys),而这种取代通常在此类SDA中观察到[56]。此外,SVG13在120位具有Lys,在123位具有Leu,而SVG06在120位具有Glu突变,并且在123位具有Leu,这都是FR4中J7片段使用的典型特征,与酵母中SDA产生水平降低有关[11]。

[0227] 大多数SDA与人类VH3家族VH相似。但是,SVG07与人类VH4家族VH更相似。早期已经观察到此类SDA[57]。作为参考,从骆驼中分离出的两个VH4家族SDA(sdAb-31和sdAb-32)包含在SDA比对中(图2)。SVG07的FR1、FR2和FR3的氨基酸序列与sdAb31和/或sdAb32的氨基酸序列相同,并且在IMGT位置9、14、16、17、18、20、22、24、25、39、42、45、53、54、68、69、71、74、77、82、83、86、87、92、94和95处与其他SDA不同。

[0228] 5. A1b结合SDA的噬菌体展示选择

[0229] 基本上如先前实施例所述,使用实施例1中所述的来自犬或马的直接涂布的A1b,进行A1b结合SDA的噬菌体展示选择。为了选择与犬和马A1b都结合的SDA,第二轮淘选不仅在相同物种起源的A1b上进行,而且在其他物种的A1b上进行。

[0230] 为了鉴定单个A1b结合物,用来自第二轮淘选的单克隆接种两个96孔板,并诱导在96孔板中产生可溶性SDA[49]。如先前所述[19],在ELISA中,筛选所有克隆与犬、马和人的直接涂布的A1b的结合。人类A1b来自一家商业供应商(Jackson ImmunoResearch Laboratories)。

[0231] 仅显示了最终也在酵母中表达的SDA克隆的吸光度值。为此目的,优先选择与犬和马的各自抗原结合的A1b结合克隆。表4显示了六个以“SVA”开头,后跟一个数字的A1b结合克隆。没有一个SDA与人类A1b结合。所有SDA都与马A1b结合。SDA SVA07不与犬A1b结合,而SDA SVA02、SVA04、SVA06、SVA12和SVA16确实与犬A1b结合。因此,获得了与犬和马A1b结合的五SDA。

[0232] 如先前实施例所述进行序列分析。选择用于产生酵母的六个克隆(图3)都属于不同的CDR3组。它们都是亚家族1的真正SDA[52]。它们都缺乏特殊的蛋白质序列特征,例如长插入或与酵母中SDA产生减少相关的FR4残基[11]。

[0233] 6. 通过噬菌体展示来分离的新型SDA的酵母生产

[0234] 通过分泌型酵母表达产生了十四个SVT SDA(表2)、八个SVG SDA(表3)和六个SVA SDA(表4)。为此目的,通过PCR从噬菌体展示质粒(实施例3-5)扩增SDA编码区,并用PstI和BstEII切割,以与类似切割的pUR4585质粒连接。pUR4585是一种酵母-大肠杆菌穿梭载体,适用于表达与C-myc和his6标签C末端融合的SDA。通过后缀“L”表示以此方式生成的SDA。编

码此类SDA的衍生自pUR4585的质粒由SDA名称和除后缀“L”外的前缀“p”来指示。此外,还产生了三个突变SVT SDA,它们在FR4区具有突变以增加酵母的生产水平(请参见实施例3和[11]):

[0235] • SDA SVT15L-3FW4M是SVT15L的衍生物,包含突变K120Q、I122T和L123Q

[0236] • SDA SVT20L-L123Q是包含突变L123Q的SVT20L的衍生物

[0237] • SDA SVT34L-L123Q是包含突变L123Q的SVT34L的衍生物

[0238] 通过产生包含这些突变的合成的PstI-BstEII片段并随后插入质粒pUR4585中来引入这些突变。用于亚克隆的BstEII位点在FR4中高度保守,但在某些SDA中缺乏。SVT16、SVT20、SVT25和SVT34就是这种情况。因此,通过产生合成的PstI-BstEII片段并将其随后插入pUR4585,将这种位点静默地引入到这四个真实的SDA以及SVT20L-L123Q和SVT34L-L123Q中。如实施例3所述对所有酵母表达质粒进行序列验证,但是使用纯化的质粒DNA与引物BOLI166(ATGATGCTTTTGCAAGCCTTC,SEQ ID NO:9)和BOLI188(TTCAGATCCTCTTCTGAGATGAG,SEQ ID NO:10)一起作为模板。编码SVT29的pUR4585衍生质粒在PstI位点后的位置60处编码静默的A至G突变(CCTGTCGAGCCTACG(SEQ ID NO:11)突变为CCTGTCGGGCCTACG(SEQ ID NO:12)),这个突变被忽略,因为它保持静默。

[0239] 通过选择营养缺陷型Ieu2标记,将pUR4585衍生的质粒导入酿酒酵母W303-1a菌株(ATCC编号208352;MATa,ade2-1,ura3-1,his3-11,trp1-1,leu2-3,Ieu2-112,can1-100)。质粒pSVT13L、pSVT15L、pSVT20L和pSVT34L也被引入到菌株SU51中,该菌株更常用于SDA生产[19,58]。如先前所述[19,58],进行了用于生产SDA的酵母培养以及通过IMAC从耗尽培养上清液中纯化SDA。浓缩纯化的SDA,并使用Amicon Ultra 3-kDa分子量截止离心浓缩装置(Millipore,Bedford,MA)来缓冲液交换为磷酸盐缓冲液(PBS)。使用Biorad(Hercules,CA)蛋白测定法和牛IgG标准液测定SDA浓度。从这些储备中,样品用碘基-NHS-LC-生物素(Pierce,Rockford,IL)进行生物素化,蛋白质与生物素的重量比为5。小鼠mAb、马和犬A1b和IgG和TeNT以类似方式进行生物素化。

[0240] 基于纯化的SDA的产量,还确定了每升培养体积的酵母分泌的SDA生产水平(表5)。SDA主要在面包酵母菌株W303-1a中产生,但是,为了比较酵母的生产水平,SU51菌株中也产生了四个SVT SDA[58]。取决于SDA的性质,使用菌株SU51的生产水平的增加为2.5倍至13.6倍各不相同。与野生型SDA相比,含有各种FR4突变的突变SDA的产量高2.6倍至5.2倍(表5),与早期发现一致[11]。

[0241] SVG07L的低生产水平为0.15mg/L可能与这种SDA与人VH4基因家族SDA相似有关。早些时候有人提出,类似于常规的SDA(表5中的亚家族C)生产水平低[61]。但是,以至少1.59mg/L的合理高水平生产了三种类似于常规的SDA,SVG06L、SVG13L和SVG19L(表5)。

[0242] 7.酵母生产的SVA SDA的抗原结合

[0243] 在ELISA中,通过将抗原涂布到板上并主要使用未标记的SDA(使用myc标签进行SDA检测)检测SVA SDA与不同物种的A1b的结合。ELISA基本上如实施例3所描述来执行。纯化的血清白蛋白以5 μ g/ml的浓度涂布。马和犬A1b来源在实施例1中描述。牛A1b和鸡卵清蛋白来自Sigma Aldrich,人白蛋白来自Jackson ImmunoResearch Laboratories,并且小鼠、绵羊和猪白蛋白来自Antibodies Online(Beijing,CN)。从500倍稀释的正常猫血清(Agrisera Antibodies,Vännäs,Sweden)在涂布有1000倍稀释的免疫亲和吸附的山羊抗猫

Alb IgG (Antibodies Online) 的板上捕获猫白蛋白。然后在十二个孔中,以 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ SDA浓度开始,将板与两倍SDA稀释系列一起孵育。使用 $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 的抗myc克隆9E10 mAb过氧化物酶缀合物 (Roche Applied Science) 检测SDA。使用Excel®电子表格模板 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) 评估吸光度数据,以计算最大的A450值。将四参数对数曲线拟合到吸光度和SDA浓度,以內插有效浓度 (EC),从而在每个ELISA中每个SDA的吸光度值为0.2。

[0244] 没有抗原涂布、没有SDA或具有非特异性SDA (SVT06L) 的阴性对照都导致吸光度值低于0.15 (表6)。大于0.15的吸光度值被认为指示Alb结合。克隆SVA12L和SVA16L以高(>1)吸光度值与马和犬Alb结合。SVA12L还以较高的吸光度值结合猪Alb,并且以较低的吸光度值结合猫Alb。用涂布的多克隆抗体从正常血清中捕获猫Alb。因此,与其他物种的Alb相比,观察到的较低的吸光度值不一定表示与猫Alb的结合效率较低。实际上,在实施例18 (表28) 中,显示了SVA12L和SVA06L以非常相似的亲和力与猫科动物Alb (可商购) 结合。此外, (实施例18) 表明, SVA12L和SVA06L以相似的亲和力与马和犬Alb结合。竞争测定 (ELISA) 显示SVA06L和SVA12L识别不同的表位 (数据未显示)。

[0245] 在ELISA中, SVA12L和SVA16L均滴定至约 $10\text{ng}/\text{ml}$ 的低SDA浓度。SVA02L、SVA04L、SVA06L和SVA07L也与几种Alb种类结合,但通常比SVA12L和SVA16L具有较低的吸光度值和较高的SDA效价。SVA02L和SVA06L也与小鼠Alb结合。

[0246] 没有一个SDA与人、绵羊、牛或鸡Alb结合。酵母产生的SVA SDA的ELISA结合与在大肠杆菌中产生的相应SDA的结合一致 (实施例5; 表4), 但有一个明显的例外: 克隆SVA04L不结合犬Alb, 而其大肠杆菌产生的对应物以1.533的高吸光度值结合犬Alb。这可能是由于大肠杆菌产生的克隆不是单克隆的, 而是代表产生不同SDA的两个克隆的混合物。由于酵母生产的SDA是克隆的, 并且作为SDA稀释系列而不是单孔进行更精细的测试, 因此基于酵母生产的SDA的结果更加可靠。

[0247] 选择克隆SVA12L来开发多聚体SDA (请参见实施例14、15、16、17和18), 因为它既与马、犬、猪和猫Alb结合, 又可以在酵母中有效生产 ($3.85\text{mg}/\text{L}$, 使用菌株W303-1a), SVA12L在ELISA中不与小鼠Alb结合, 因此不太可能赋予小鼠半衰期延长 (实施例17)。SVA06L是适合小鼠SDA半衰期延长的候选物。

[0248] 8. 酵母生产的SVG SDA的抗原结合

[0249] 以与先前实施例中所述类似的方式分析了八个酵母产生的SVG SDA与不同物种起源的IgG以及某些物种的抗体片段Fab、 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 和Fc的结合。实施例4描述了几种IgG及其片段的来源。小鼠、猫、绵羊、牛和豚鼠的伽玛球蛋白 (GG) 以及马的 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 片段均从Jackson ImmunoResearch Laboratories获得。犬Fc片段获自Rockland Immunochemicals。表7中描述结果。三种ELISA包含相对较高的背景, 大概是由于小鼠抗myc mAb PO-缀合物与涂布抗原的交叉反应所致 (表7中的脚注b)。因此, 将这些ELISA中的吸光度值减去背景值 (表7中的脚注b)。认为减去背景的吸光度值大于0.2表示抗原结合。

[0250] 酵母产生的SVG SDA的ELISA结合与在大肠杆菌中产生的相应SDA的结合 (实施例4) 一致, 除了两个例外。首先, 酵母产生的SDA SVG07L仅与犬IgG结合, 而相应的大肠杆菌产生的SDA与所有物种的IgG结合。可能部分地由为结合选择的 $\text{A450}=0.2$ 的任意截止值太高来解释。其次, 酵母生产的克隆SVG24L不与猪IgG结合, 而其大肠杆菌生产的对应物则结合。

再次可能是由于为结合选择的 $A_{450}=0.2$ 的任意截止值太高。替代地,大肠杆菌产生的克隆的这种结合也可能是由于这些克隆不是单克隆的。对于酵母产生的SDA,这种假象不太可能。因此,酵母产生的SDA的ELISA结合数据更加可靠。

[0251] 当将大于0.2的减去背景的吸光度值作为抗原结合的指标时,SDA SVG06L和SVG13L与分析的所有物种的Fab片段和IgG结合,鸡除外。SVG13的鸡IgG的吸光度值为0.164,可能表示与鸡IgG结合,因为在此ELISA中,大多数其他SDA的吸光度值均低于0.08。SDA SVG19L显示出与SDA SVG13L相当的序列相似性(实施例4),并显示出与SVG13L相似的结合模式,但不以高于背景的0.2吸光度值与小鼠、绵羊和猪IgG结合。SVG03L对马Fc具有特异性,而SVG23L对犬Fc片段具有特异性。SVG24L主要识别马和犬Fc。

[0252] SDA SVG13L最适合多聚体SDA的开发,因为它与所分析的所有物种的Fab和IgG结合,并且在酵母菌中良好产生(未优化)(1.6mg/L)。

[0253] SDA SVG06L也适合开发多聚体SDA,因为它与除鸡以外的所有已分析物种的Fab和IgG结合,并且在酵母菌中的产量也很高(未经优化)(1.8mg/L)。

[0254] 9. IgG结合SDA的物种特异性

[0255] 将ELISA中较早分离的四种猪IgG结合的SDA(VI克隆)与来自各种物种的IgG的结合[19]与SDA SVG13L进行了比较,后者与大多数物种的IgG反应。ELISA如实施例8所描述来进行。结果(表8)显示SDA VI-4L、VI-8L、VI-11L和VI-14L不与牛、猫、犬、小鼠和人IgG结合。它们确实与绵羊IgG结合,可能因为最大吸光度略高于没有SDA的背景。SDA VI-11L另外与马IgG结合。但是,在所有情况下,SVG13L在除猪IgG之外的所有物种的IgG上产生的吸光度值都高得多。相反,对于猪IgG,所有VI克隆的吸光度值均高于SVG13L。

[0256] 10. 酵母生产的SVT SDA的抗原结合

[0257] 以与SVA和SVG SDA所述相似的方式,在ELISA中分析了几种酵母产生的SDA和6种抗TeNT mAb的抗原结合。抗TeNT mAb从不同的供应商处获得。表9描述了它们的来源以及供应商提供的有关小鼠生物测定中TeNT中和或蛋白质印迹中抗原结合的信息。这些mAb的一部分如实施例6所描述来生物素化。

[0258] 分析了未标记的SDA或mAb与直接涂布的TeNT、rTTC或没有抗原涂布的聚苯乙烯板以及通过被动吸附的cAb-TT2 SDA捕获的TeNT的结合。参见实施例1和3中的此类抗原涂布程序。然后将这些板与一系列稀释的未标记SDA或mAb孵育,并按照实施例7中所描述进一步处理,但是使用2000倍稀释的兔抗小鼠免疫球蛋白P0缀合物(Dako, Glostrup, Denmark)检测小鼠mAb,而无需在rTTC涂布的板上滴定SDA。此外,使用用于检测SDA的 $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉亲和素-P0缀合物(Jackson ImmunoResearch Laboratories)以相似的方式分析了生物素化的SDA或mAb与直接涂布的TeNT和cAb-TT2捕获的TeNT的结合。最后,如实施例3中所述,从 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ SDA或 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ mAb开始,在11个孔中,使用SDA或mAb的两倍稀释系列,分析了未标记的SDA或mAb的GT1b-TeNT相互作用抑制。

[0259] 表10中描述结果。没有特异的TeNT抗原涂布的板上的吸光度值低于0.07。同样在具有对照SDA SVA12L的ELISA中-除了GT1b-TeNT抑制ELISA-吸光度值最多为0.155(直接涂布的TeNT和生物素化的SDA或mAb)或0.072(其他ELISA)。因此,高于0.2的吸光度值指示抗原结合。直接涂布的TeNT或捕获的TeNT上具有生物素化SDA或mAb的ELISA通常与使用未标记的SDA或mAb的相似ELISA一致。在未标记的对应物为阳性的ELISA中,没有生物素化的SDA

或mAb为阴性。这表明生物素化永远不会消除抗原结合。通常,生物素化的SDA在捕获的TeNT上的吸光度值稍高(例如,三个CDR3 B组SDA SVT06L、SVT08L和SVT31L)。值得注意的例外是mAb B417M和11n185,当进行生物素化时,通常会产生较低的吸光度值和>50倍的EC,这表明生物素化效果较差或影响这些mAb的抗原结合。如果是mAb B417M,则存在0.5% HSA作为稳定剂可能会降低其生物素化效率。

[0260] 通常,酵母产生的SVT SDA的ELISA结合与其大肠杆菌产生的对应物的ELISA结合一致(实施例3;表2)。如前面实施例3所述,除了SVT02L和SVT03L,所有SDA都结合到rTTC。如前所述,未能检测到SVT02和SVT03与rTTC的结合可能是由于rTTC的直接涂布,因为这些SDA在确实结合捕获的TeNT的同时也无法结合直接涂布的TeNT。此外,如先前观察到的,三个CDR3 B组SDA SVT06L、SVT08L和SVT31L以及SVT05L仅部分抑制TeNT-GT1b相互作用,最小吸光度值约为0.5,且EC值相对较高。此外,如前所述,SDA SVT03L不会抑制TeNT-GT1b的相互作用。但是,酵母生产的克隆SVT02L也显示出部分TeNT-GT1b抑制,EC值>1000ng/ml,而其大肠杆菌生产的对应物则没有任何抑制作用。这种差异可能仅是由于在大肠杆菌生产的SDA的情况下使用了太低的SDA浓度,在未知SDA浓度的十倍大肠杆菌上清液稀释液中使用。观察到的仅在所分析的最高SDA浓度下观察到的生物素化酵母产生的SVT03L与直接涂布的TeNT的结合也没有较早地观察到,并且可以类似地用所使用的较高SDA浓度来解释(参见实施例11)。

[0261] 在使用生物素化SDA的ELISA和GT1b-TeNT抑制ELISA中,SVT15L、SVT20L和SVT34L的三个突变SDA具有与野生型对应物相似的最大吸光度值和EC值。这表明为了增加抗原结合而引入的框架4突变不影响TeNT结合。在此,将EC值确定为与TeNT-GT1b抑制的50%抑制相对应的吸光度值(IC_{50})。 IC_{50} 值从34到986ng/ml不等。与来自CDR3组A、C和D的克隆(34-133ng/ml)相比,来自CDR3组B的克隆显示更高的 IC_{50} 值(317-986ng/ml)。来自同一CDR3组的克隆的 IC_{50} 值差异最大为4倍。

[0262] 分析中包括六个mAb。选择mAb 11n185是因为它结合了TeNT轻链。选择了另外五种mAb,因为它们在小鼠生物测定中可以中和TeNT。mAb在不同的ELISA中结合如下:

[0263] 1. 与捕获的TeNT相比,mAb 14F5和6F55与直接涂布的TeNT的结合效率较低,类似于SVT02L和SVT03L。

[0264] 2. ELISA中只有mAb 6E7和6F57抑制TeNT-GT1b相互作用。它们的 IC_{50} 远远高于大多数SDA的 IC_{50} 。

[0265] 3. 大多数SDA与rTTC结合,但六个mAb中只有两个与rTTC结合。这表明三个mAb对TeNT的中和不是基于对TeNT-GT1b相互作用的抑制。

[0266] 11. SDA的特征是与TeNT片段C结合(rTTC结合)。

[0267] 两个SDA(SVT02L和SVT03L)不与直接涂布的TeNT结合,因此就颗粒特异性而言,它们与TeNT直接涂布的片段C(rTTC)(也称为Hc或TTC)的结合尚无定论,因为被动吸附可能会消除抗原结合(实施例10)。因此,以与实施例10中所述类似的方式分析了这些SDA与mAb 6E7捕获的rTTC的结合。用TeNT(0.75 μ g/ml)涂布96孔板的6个孔,并用mAb 6E7(1 μ g/ml)涂布18个孔。随后将6个mAb 6E7涂布的孔与2 μ g/ml rTTC孵育,再将另外6个孔与0.75ng/ml TeNT孵育,而将其余六个用mAb 6E7涂布的孔与ELISA缓冲液(阴性对照)孵育。随后,在四个孔中将六个SDA与以2 μ g/ml SDA浓度涂布的不同抗原一起孵育。通过与抗myc mAb P0缀合

物孵育来检测结合的SDA。

[0268] 结果(表11)显示:

[0269] • 阴性对照SVA12L和没有捕获抗原的mAb 6E7涂布为阴性的(吸光度 <0.07)。

[0270] • 用SVT16L(高吸光度)和SVT15-3FW4M(低吸光度)检测到,用mAb 6E7捕获TeNT或rTTC或直接涂布TeNT为成功的。

[0271] • SVT02L和SVT03L结合到捕获的TeNT时起作用。

[0272] • SVT03L确实与直接涂布的TeNT结合,尽管A450的水平低于捕获的TeNT,而SVT02L根本不结合直接涂布的TeNT。

[0273] • SVT02L和SVT03L不与用mAb 6E7捕获的rTTC结合。由于它们识别mAb 6E7以外的另一个抗原性位点(实施例13),这不是由于使用mAb 6E7进行捕获。

[0274] 因此,SVT02L和SVT03L结合了另一个rTTC中不存在的TeNT部分。这种观察结果与这些SDA不能抑制TeNT-GT1b相互作用有关(实施例10)。

[0275] 12. TeNT与SVT SDA结合的蛋白质印迹分析

[0276] 如先前所做的[19],每凝胶使用 $2.5\mu\text{g}$ 真实TeNT,并使用 $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 生物素化的SDA(实施例6)和 $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉亲和素P0缀合物(Jackson ImmunoResearch Laboratories)用于免疫印迹,通过蛋白质印迹分析SVT克隆与TeNT轻链或重链的结合(图4)。SDA SVA12L用作阴性对照。在蛋白质印迹法中,大多数SDA均未显示与轻链或重链的结合。这可能是由于那些SDA识别构型表位。但是,SDA SVT06和SVT08结合了约100kDa的多肽,所述多肽必须代表TeNT重链。这些克隆属于相同的CDR3组(B组),并识别相同的抗原位点(表12)。两个SDA都与rTTC结合(表2和10),rTTC来源于重链。因此,在蛋白质印迹中SDA SVT06和SVT08与TeNT重链的结合与先前的观察一致。

[0277] 13. SDA(SVT)鉴定破伤风毒素抗原

[0278] 通过使用生物素化的SDA和mAb的阻断/竞争ELISA对SVT SDA和六个抗TeNT mAb的抗原位点进行定位。如果可能,每个CDR3组的两个代表都用于此目的。主要根据其在TeNT-GT1b相互作用中的 IC_{50} 值选择SDA。但是,SVT29L的酵母产量仅为 $0.07\text{mg}/\text{L}$,因此被SVT15L-3FW4M取代。使用与先前实施例中所述类似的ELISA程序进行竞争/阻断ELISA,但是使用 $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ TeNT直接涂布。使用经过生物素化处理的SDA或mAb浓度,其吸光度值几乎达到最大,并用 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 的各种未标记SDA或mAb竞争/阻断这种SDA或mAb。首先将TeNT涂布的板与未标记的SDA或mAb以 $90\mu\text{l}/\text{孔}$ 孵育30分钟(阻断步骤)。然后加入 $10\mu\text{l}$ $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 生物素化的SDA或mAb,并再孵育30分钟(竞争步骤)。在生物素化SVT02和SVT04的情况下,TeNT被cAb-TT2捕获,因为这些SDA仅与捕获的TeNT结合,而不与直接涂布的TeNT结合。在所有其他情况下,均使用直接涂布的抗原。包括没有抗原涂布的对照和没有生物素化的SDA的对照。然后计算出由于竞争性/阻断性SDA而引起的抗原结合的抑制百分数为 $100-100*([具有竞争性SDA或mAb的A450]-[无Ag涂布的A450])/([无竞争性SDA或mAb的A450]-[没有Ag涂布的A450])$ 。所有SDA和mAb至少阻断其生物素化对应物的结合至少75%,表明该测定有效。

[0279] 鉴定出至少五个由字母A-E表示的独立抗原位点(表12和13)。不出所料,来自同一CDR3组的SDA始终是同一抗原性位点的一部分。SVT02L、mAb 14F5和mAb 6F55形成抗原位点A。这三个SDA或mAb在其他ELISA中也显示出其他类似特征。最值得注意的是,与直接涂布的TeNT相比,它们与捕获的TeNT的结合更有效。这表明它们的结合高度依赖于正确的TeNT三

级构型。SVT03L是形成抗原位点B的单个SDA。SVT15L及其突变体衍生物SVT15L-3FW4M形成抗原位点C。SVT06L、SVT08L、mAb 6E7和mAb 6F57形成抗原位点D。预期这些SDA不太依赖于抗原性位点的正确构型,因为它们在蛋白质印迹法中也与TeNT结合(实施例12)。

[0280] 与这种概念一致,对于这四个SDA或mAb,不会发生来自其他抗原位点的克隆的部分竞争。代表两个CDR3组的SDA SVT13、SVT16、SVT22和SVT34形成抗原位点E。

[0281] SVT克隆的结果总结于表12中。通常,结果与关于SDA的Ag特异性和TeNT抗原结构的一般观点一致:

[0282] • 同一CDR3组的SDA属于同一抗原位点。

[0283] • 相同抗原位点的SDA或mAb显示相似的抗原结合特异性:

[0284] -抗原位点A的SDA或mAb结合具有构型敏感性的表位,因为它们在直接涂布TeNT后显示出降低的结合力。

[0285] -抗原位点D的SDA在蛋白质印迹中结合TeNT Hc。

[0286] -抗原位点C、D和E的SDA和mAb均抑制TeNT-GT1b相互作用,而抗原位点A和B的SDA或mAb没有抑制作用。

[0287] • 抑制TeNT-GT1b相互作用的SDA或mAb均与rTTC结合。

[0288] 值得注意的是,克隆SVT02现在显示与两个mAb结合相同的抗原性位点,在小鼠生物测定中,所述两个mAb据报道可中和TeNT。这强烈表明SVT02也可以中和TeNT,尽管它不抑制TeNT-GT1b的相互作用。较早之前已经描述了不抑制GT1b相互作用的TeNT中和mAb[68]。类似地,克隆SVT06和SVT08可能中和TeNT(实施例17),因为它们与两个中和mAb竞争。克隆SVT06最适合后续研究,因为它的产量更高。来自抗原位点C和E的SDA不与任何中和单克隆抗体竞争。但是,这些SDA确实会抑制TeNT-GT1b的相互作用。因此,它们可能会中和TeNT,只有在体内试验中才能证明(实施例17)。因此,建议使用SDA SVT02L、SVT06L、SVT15L-3FW4M和SVT16L构建多聚体SDA(表13)。

[0289] 14. 酵母生产多聚体SDA

[0290] 通过在酵母菌株SU50[70]中使用质粒pRL44[69]制备稳定的MIRY整合体[75]来生产多聚体SDA,以提高SDA的生产水平。与基于2微米的质粒相比,此类MIRY整合体平均使SDA的生产水平提高了五倍。产生了十二个编码多聚体SDA的质粒(表14),其由TeNT结合SVT-SDA与A1b结合SVA12 SDA(5个质粒)、IgG结合SVG06 SDA(2个质粒)或IgG结合SVG13 SDA(5个质粒)的融合体组成。这些多聚体SDA的构成要素如下:

[0291] GS3: $(G_4S)_3$ 接头,先前已描述[27]

[0292] GS2: 源自pRL144质粒的 $(G_4S)_2$ 接头[19]

[0293] H6: his6标签,双终止密码子和HindIII位点,如在pRL188中[2]

[0294] SVG06M4: SVG06具有四个突变:Q1E、Q5V、E120Q、L123Q

[0295] SVG13M4: SVG13具有四个突变:Q1E、Q5V、K120Q、L123Q

[0296] SVA12M2: SVA12具有两个突变:Q1E、Q5V

[0297] SVT15-3FW4M: 没有内部SacI位点和3个突变的SVT15:K120Q、I122T、L123Q SVT16-L123Q: 具有静默恢复的BstEII位点和L123Q突变的SVT16

[0298] 产生合成的SacI-HindIII片段,随后使用SacI和HindIII位点亚克隆到质粒pRL44[69]中,得到质粒pRL482至pRL501(表14)。

[0299] 通过电穿孔[71]用Hpa1线性化质粒pRL482至pRL501转化面包酵母菌株SU50 (MATa; cir^o; leu2-3, -112; his4-519; can1; [70]), 并选择leu⁺营养缺陷型。在摇瓶中诱导单个菌落纯化的转化子以0.5L规模表达SDA, 并通过IMAC从耗尽培养上清液中纯化SDA [58]。随后将SDA通过阳离子交换色谱在SP琼脂糖柱上进一步纯化, 如前所述[44], 但稍有改动。SP琼脂糖Fast Flow (GE Healthcare, Piscataway, NJ) 和25mM乙酸钠pH 4.7缓冲液用于SDA与色谱柱的结合。在结合缓冲液中以0.1、0.2、0.4、0.6、0.8和1M NaCl的逐步梯度洗脱结合的SDA。结合的SDA通常在0.4至0.8M NaCl之间洗脱(表14)。将其浓缩, 并使用3kDa分子量截留离心浓缩装置来缓冲液交换为PBS。使用二喹啉甲酸测定法(BCA, Pierce目录号23212)和牛血清白蛋白标准品(Thermo Scientific, Rockford, IL)测定SDA浓度。基于纯化的SDA产量, 计算酵母中多聚体SDA的生产水平(表14)。

[0300] 通过使用带有MOPS运行缓冲液(Invitrogen)的NuPage Novex 4%-12% Bis-Tris凝胶还原SDS PAGE并用Gelcode Blue试剂(Thermo Scientific)染色, 分析单体和多聚体SDA。与多聚体SDA相反, 单体SDA除his6标签外还包含myc标签。含有myc标签的单体SDA产生了另一个分子, 其分子量提高了约2kDa, 这是大多数缺少myc标签的多聚体SDA所没有观察到的(图5A和B)。这种另外的分子大概代表了部分O-糖基化, 其取决于myc标签的存在。此类分子先前已被观察到[44]。除了这种推测的O-糖基化的变体之外, SVT15-3FW4M SDA产生的分子质量低约2kDa, 可能代表降解的SDA(图5B)。

[0301] 对两个包含SVG06M4的多聚体SDA的SDS PAGE分析(图5A)显示, 在SDA2位置出现了一条双带, 而在包含SVA12M2或SVG13M4 SDA的多聚体SDA中未观察到(图5B)。由于此SDA始终位于多聚体SDA的C端, 因此很可能在SVG06M4的C端降解。这可能是由于在多聚体SDA中的SVG06M4的C端引入了突变E120Q和L123Q。这将意味着在此类SDA中丢失his6标签。由于SDA最初是通过IMAC纯化的, 这意味着这种降解在IMAC纯化后发生。

[0302] 所有含SVG13M4以及所有含SVA12M2的多聚体SDA均迁移至基于其预测分子量的预期位置(图5B)。单体SVG13L SDA的迁移速度略快于SVA12L SDA, 这与SVA12L的分子量低约1kDa一致。当比较由两个(SDA2)或三个(SDA3)SDA域组成的包含SVG13L和SVA12L的多聚体SDA的时, 也可以看到这种模式。

[0303] 15. 多聚体SDA的双特异性或二价抗原结合

[0304] 在ELISA中评估了多种多聚体酵母产生的SDA的几种靶抗原结合能力。形成这些多聚体SDA构件的单价SDA的对照也包括在内。ELISA基本上如先前实施例所述进行。进行了七种不同类型的ELISA(表15和16)。GT1b-TeNT抑制ELISA先前在实施例3和10中进行了描述。另外三个ELISA用于测量单价SDA与被动吸附的TeNT (0.75μg/ml), Alb (5μg/ml) 或IgG (5μg/ml) 的结合, 其中抗his标签mAb和多克隆抗SDA血清用于SDA检测。为了测量与TeNT和IgG或Alb或二价TeNT的双特异性结合, 结合TeNT和马Alb也使用磺基-NHS-LC-生物素(Pierce, Rockford, IL)进行生物素化, 蛋白质与生物素的重量比为5, 如先前所述[72]。它们被用于三种ELISA中, 用于测量:

[0305] -与涂布的犬IgG或Alb (5μg/ml) 和生物素化的TeNT (0.25μg/ml) 的双特异性结合

[0306] -与用被动吸附的cAb-TT2 (1μg/ml) 捕获的TeNT (0.75μg/ml) 和生物素化的马Alb (1μg/ml) 的双特异性结合

[0307] -与涂布的TeNT (0.75μg/ml) 和生物素化的TeNT (0.25μg/ml) 的二价结合。

[0308] 在4℃下,用溶解在PBS (TeNT) 或50mM NaHCO₃ pH 9.2 (所有其他抗原) 中的所需抗原以100μl/孔涂布聚苯乙烯96孔板过夜。在室温下,使用ELISA缓冲液(1%脱脂牛奶;0.05%Tween-20;0.5M NaCl;2.7mM KCl;2.8mM KH₂PO₄;8.1mM Na₂HPO₄;pH 7.4)洗涤板1小时后,完成所有随后的孵育。随后将cAb-TT2涂布的板与ELISA缓冲液中的TeNT孵育。然后在十二个孔中,以1μg/ml SDA浓度开始,将板与两倍SDA稀释系列一起孵育。在某些ELISA中,使用1000倍稀释的抗his6克隆BMG-his-1mAb P0缀合物(hisP0;Roche Applied Science)或10,000倍稀释的山羊抗美洲驼Ig P0缀合物(GALP0;Bethyl Laboratories)直接检测结合的SDA。在其他ELISA中,将具有结合的SDA的板与生物素化的TeNT或生物素化的马A1b一起孵育。然后用0.5μg/ml的链霉亲和素P0缀合物(StrepP0;Jackson ImmunoResearch Laboratories)检测生物素化的抗原。然后通过用3,3',5,5'四甲基联苯胺染色检测结合的P0。通过加入0.5M硫酸(每孔50μl)终止反应后,使用分光光度计测量450nm处的吸光度。使用Excel®电子表格模板(Microsoft Corporation,Redmond,USA)评估吸光度数据。这用于计算最大A450值。使用适当的计算机软件,将四参数对数曲线拟合到吸光度和SDA浓度。这种曲线用于内插有效浓度(EC),从而在每个ELISA中获得每个SDA的特定吸光度值。用于插值SDA浓度的准确吸光度值(参见表14)在不同的ELISA之间有所不同,这取决于不存在SDA时的背景吸光度值和在不同SDA下观察到的最大吸光度值。

[0309] 各种ELISA的结果均以达到的最大吸光度(TeNT-GT1b抑制ELISA的最小吸光度;表15)和SDA的有效浓度(表16)表示。从这些ELISA可以得出以下结论:

[0310] -GT1b-TeNT抑制ELISA显示,所有包含SDA的SVT02以及单体SVA和SVG SDA均不抑制,而所有其他单体和多聚体SDA均抑制。这与先前关于单体SDA SVT06L、SVT15L和SVT16L的观察结果一致(实施例10)。

[0311] -如预期的那样,使用TeNT和生物素-TeNT的ELISA在多聚体SDA中的最大吸光度值较高为1.63和1.72,但在某些双特异性多聚体SDA中的吸光度值较低为1.12,在某些单体SDA情况下的吸光度值稍微增加为0.35,这是未预期的。背景吸光度约为0.14。牛奶中存在的IgG或A1b用作阻断剂可能会造成桥接。然而,这些结果表明两个二价和双特异性SDA的二价TeNT结合。

[0312] -如前所述,包含SVT02 SDA域的多聚体SDA永远不会与直接涂布的TeNT结合。

[0313] -在使用cAb-TT2捕获的TeNT和生物素化的马A1b进行的ELISA中,单体SVA12LSDA不结合,并且所有包含SVA12 SDA的多聚体SDA均结合,包括不与直接涂布的TeNT结合的SVT02-GS2-SVA12M2-H6。

[0314] -SVT15-3FW4M SDA和SVT15-3FW4M-GS2-SVG06M4-H6 SDA似乎无法有效地被抗his6 mAb P0缀合物识别,但可以用GALP0或GT1b-TeNT抑制ELISA很好地检测到。这与在SDS-PAGE中也观察到的his6标签的C端蛋白水解降解一致(实施例14)。

[0315] -SVT02-GS2-SVG06M4-H6(实施例14)在SDS-PAGE中显示降解,这可能表明大多数SDA分子都失去了his6标签,这可以解释使用用于SDA检测的抗his6 mAb在ELISA中对于犬IgG的低吸光度值。对于此特定的双特异性SDA,无法通过使用GALP0或在GT1b-TeNT抑制ELISA中证明与TeNT的结合来证实,因为SVT02既不与直接涂布的TeNT结合也不在GT1b-TeNT ELISA中抑制。

[0316] -所有的多聚体SDA,包括SVT02-GS2-SVG06M4-H6和SVT15-3FW4M-GS2-SVG06M4-H6

均与TeNT和A1b或IgG结合,如使用犬IgG或犬A1b涂布和生物素化的TeNT的ELISA所示。单体SDA在这些ELISA中不显示结合。

[0317] -STV02-GS2-SVG13M4-H6在犬IgG上的最大吸光度值为0.18,远低于其他包含SVG13M4的多聚体SDA,但与单体SVG13L的0.16相当,并且明显高于非特异性单体SVT-SDA所观察到的背景值0.05-0.06。这表明STV02-GS2-SVG13M4-H6结合犬IgG。使用结合到涂有犬IgG的板上的用于STV02-GS2-SVG13M4-H6检测的生物素化的TeNT,吸光度值较高,可以证实这一点。

[0318] 综上所述,所有多聚体SDA均显示与TeNT和IgG或A1b的双特异性结合,但某些SDA在特异性ELISA中未显示强结合,因为它们不与直接涂布的TeNT(包含SVT02的SDA)结合,或者不抑制GT1b-TeNT相互作用(包含SDA的SVT02)或它们丢失了C末端的组氨酸标签(SVT02-GS2-SVG06M4-H6和SVT15-3FW4M-GS2-SVG06M4-H6)。

[0319] 为了确认多聚体SDA的双特异性/二价性质,使用了第二种完全不同的测定系统。生物层干涉术(BLI)被用作测量TeNT(全毒素)、白蛋白(马)和几个SDA之间的相互作用的分析技术。BLI是一种光学技术,可以分析从两个表面反射的光波的干涉图样。结合到生物传感器的分子数目的变化会导致干扰波长模式的光谱偏移,该波长偏移被测量(实时)并以纳米(nm)偏移的形式报告。Octet®平台提供了获取有关SDA和靶抗原之间生物分子复合物形成速率的准确信息的方法。Octet Red96仪器(ForteBio)配备了链霉亲和素(SAX)生物传感器。为了进行测量,将10μg/ml的生物素化TeNT(bio-T,表17a)或生物素化的马白蛋白(bio-Ah,表17b)(称为配体)与SAX传感器耦合10分钟。然后将传感器(装有相应的靶抗原)转移到含有100nM的特定SDA(单体或多聚体)的溶液中,并测量相互作用是否持续4分钟。在下一步中,将现已与单体或多聚体SDA结合的传感器转移至溶液中,并使其与第二种分析物反应5分钟,后者与未标记的毒素(TeNT,100nM)或马白蛋白(Ah,100nM)。再次监测传感器和分析物之间的相互作用(纳米位移)。

[0320] 分析结果,下表17a和17b显示了不同SDA(单体和多聚体)的结果。

[0321] 从结果可以得出以下结论:

[0322] -SDA SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6表现出与两个TeNT-TeNT分子的二价结合。

[0323] -SDA SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6和SVT06-GS2-SVA12M2-H6在两种不同的测试设置中显示出与TeNT和马白蛋白的双特异性结合。

[0324] -SVT16-L123Q-GS2-SVG13M4-H6和SVT16L能够与TeNT结合。

[0325] -SVT 16-L123Q-GS2-SVG13M4-H6和SVG13L如预期不能与马白蛋白相互作用。

[0326] 16. 猪中多聚体SDA血清半衰期的分析

[0327] 用单体和多聚体SDA进行的几种体外测定(实施例4、5、7、8、9、15和18)已经证明这些SDA可以结合几种物种(例如马、犬、猫和猪)的血液成分。为了评估某些SDA的体内血清半衰期延长特性,进行了动物实验。动物实验是在猪中进行的,这是真正的跨物种实验,因为SDA仅通过使用马和犬蛋白产生。为了这个目的,使用了由12只雄性和12只雌性组成的24只约6周龄的仔猪。在多聚体SDA接种前10天对它们进行称重,并将其分为4组,每组6只仔猪,其性别均等、优选平均体重相等、优选按照母猪来源将仔猪均等分布。组(表18)由编码肌肉注射的双特异性SDA(pRL489、pRL490、pRL495和pRL499)的质粒名称表示。pRL489组的三只

仔猪,两只雄性和一只雌性,还接受了第二个由质粒pRL276编码的双特异性SDA,称为M8ggsVI4q6e[44]。这种双特异性SDA含有与SDA2 K609ggsVI-4q6e相同的IgG结合SDA结构域,后者早先用于测量半衰期[19],但是也含有对口蹄疫病毒(FMDV)抗原具有特异性的不同的融合SDA结构域。

[0328] 在接种SDA的前一天(第-1天)称重仔猪。基于这些体重,计算了多聚体SDA的剂量(表18)。每组剂量从0.2、0.3mg/kg增加到0.5mg/kg。在PBS中稀释的过滤器灭菌的SDA以约5ml在单个部位肌肉内注射到大腿后部。在刚接种SDA之前以及接种SDA之后的1、2、4、8、11、14、21和28天时,从颈静脉收集用于血清制备的血样。为了补偿动物生长的血清半衰期,还在实验结束时在第28天确定仔猪的体重。

[0329] 血清中的SDA水平是通过ELISA使用TeNT全毒素或FMDV和抗标签mAb PO-缀合物测定的。为此,在4℃下以100μg/孔用PBS中2μg/ml的TeNT全毒素或溶于涂布缓冲液(50mM NaHCO₃ pH 9.2缓冲液)中的对FMDV 01 manisa[2]具有特异性的SDA M23F涂布96孔聚苯乙烯板过夜。在RT下,用缓冲液洗涤板1小时后,进行所有随后的孵育。随后将M23F涂布的板与ELISA缓冲液中的FMDV 01 Manisa的5μg/ml 146S孵育。然后在八个孔中,以两个系列和五倍稀释的仔猪血清中的1μg/ml和0.1ng/ml SDA标准品开始,用两倍的SDA稀释系列将板进行孵育。将接种有包含SVT06或SVT16的多聚体SDA的仔猪血清在涂有TeNT的板上孵育,而将来自接种M8ggsVI4q6e的仔猪的血清在FMDV涂板上孵育。随后将涂有TeNT的板与抗-his6 mAb-PO缀合物一起孵育,并将涂有FMDV的板与抗myc mAb-PO缀合物一起孵育。然后通过用3,3',5,5'四甲基联苯胺染色检测结合的PO。加入0.5M硫酸使反应停止后,使用分光光度计测定450nm处的吸光度。将四参数对数曲线拟合至标准品的吸光度和SDA浓度。这种曲线用于内插SDA浓度,从而在每种ELISA中获得每种血清样品的特定吸光度值。将计算出的血清SDA浓度导出到Excel®电子表格模板(Microsoft Corporation,Redmond,USA)。

[0330] 在血清收集的4周期间,仔猪的重量从约10kg增加到约25kg。我们通过以下方法补偿了血清半衰期测量中的体重增加。对于每头仔猪,我们假定每小时的体重增加取决于初始体重,并符合公式 $BW(t) = BW(0) * T^t$,可以重写为 $T = 10^{(\log_{10}(BW(t)/BW(0))/t)}$,其中t是以小时为单位的时间,其中BW(t)是时间t的体重,BW(0)是时间0的体重,T是每小时的体重增加百分比。

[0331] 这允许从第-1天和第28天的仔猪体重计算因子T。然后,在第-1天和第28天之间的中间时间点,我们通过将测得的VHH浓度乘以 T^t 来补偿体重增加。

[0332] 根据以下公式计算终末血清半衰期:

[0333] $SDA(t) = SDA(0) * (0.5^{(t/T_{1/2\beta})})$,其中t是以小时为单位的时间,其中SDA(0)是补偿体重增加的半衰期计算所使用的第一个时间点的SDA浓度,SDA(t)是时间t的SDA浓度, $T_{1/2\beta}$ 是终末半衰期。

[0334] 由于第28天样品的吸光度值较低(通常小于背景吸光度值的3倍),因此SDA含量较低,因此从分析中忽略了这些数据。计算从第4天到第21天的样品的血清半衰期。Microsoft Excel的Solver函数用于根据上述公式为每个仔猪拟合SDA浓度随时间的变化。然后计算 $T_{1/2\beta}$ 的平均值和标准偏差。

[0335] 根据[73]中的参考文献,静脉内注射的IgG在人体内的生物分布量为60ml/kg体重。因此,由于大多数SDA最初是在血液中,因此血液中SDA的初始(第1-2天)浓度预计稍低

于注射剂量的 $1/0.06=16.67$ 倍。这非常适合初始SDA浓度高于 2mg/L 的三个A1b结合SDA和对照SDA M8ggsVI-4q6e(图6),但对于SVT 16-L123Q-GS2-SVG13M4-H6则要低得多,这与其低半衰期一致。

[0336] 计算从第4天(96小时)开始的SDA的 $T_{1/2\beta}$,包括体重补偿,这些总结于表18中。M8ggsVI-4q6e的 $T_{1/2\beta}$ 小于较早测量的K609ggsVI-4q6e的 $T_{1/2\beta}$ [19]。这可能是由于融合不同的SDA或两次动物实验之间存在差异。

[0337] 所有三个结合A1b的多聚体SDA均显示 $T_{1/2\beta}$ 值介于111到135小时之间,标准偏差较低。这高于阳性对照SDA M8ggsVI-4q6e的82小时的 $T_{1/2\beta}$ 。所有这三个多聚体SDA均包含与SVT06、SVT16-L123Q融合或与这两个SVT SDA域融合成多聚体SDA的A1b结合SDA结构域SVA12M2。显然,由SVA12M2驱动的半衰期不受与之融合的特定SVT SDA的影响,也不受与之融合的SDA数量的影响。

[0338] 含有针对IgG的SVG 13SDA的SVT16-L123Q-GS2-SVG13M4-H6的 $T_{1/2\beta}$ 仅20小时。与不结合血清蛋白并具有1.8小时 $T_{1/2\beta}$ [19]的对照单体SDA K609ggsK812相比, $T_{1/2\beta}$ 明显增加,表明确实发生了半衰期延长。不过,这比A1b结合多聚体SDA的 $T_{1/2\beta}$ 低很多。与猫、马、犬和人IgG相比,ELISA中SVG13L与猪IgG的结合导致猪IgG的最大吸光度值降低和EC值降低(表8)。这表明SVG13L与猪IgG以外的其他IgG的结合具有更高的亲和力,因此导致这些物种中血清半衰期更长。

[0339] SVA12L对马、犬和猫白蛋白的亲和力在 $10\text{-}270\text{nM}$ 之间变化,并且对于猪白蛋白为约 159nM (实施例18)。因此,当包括在多聚体SDA中时,SVA12在马、犬和猫体内的血清半衰期会达到相似甚至更好的水平。

[0340] 阳性对照M8ggsVI-4q6e包含SDA域VI-4,也包含在VI-4L中(实施例9)。SDA VI-4L、VI8L、VI11L和VI14L与猪IgG的亲和力(K_D)为 $1\text{-}33\text{nM}$ [19,44]。与SDA VI4L、VI8L、VI11L和VI14L对于猪IgG所表现出的EC值相比,SDA SVG13对于马、犬和猫IgG具有相当的EC值(表8)。因此,可以预期在马、犬和猫科动物体内,SVG13的血清半衰期相似。

[0341] 17. SDA对小鼠模型中破伤风毒素中和能力的分析

[0342] 使用基于单体和多聚体SVT的SDA进行的体外测定(实施例3、10、11、12、13、15和18)表明,这些SDA在几种实验测试设置中可以有效结合破伤风全毒素。为了评估其中一些SDA的体内特征,进行了一项动物实验以评估其破伤风毒素中和能力。使用小鼠毒素中和测试测试了六个候选SDA样品(参见表19)的抗破伤风毒素效力。在小鼠毒素中和试验(TNT)中评估了一个单体SDA(SVT03L),四个双特异性SDA(SVT02-GS2-SVG13M4-H6,SVT06-GS2-SVG13M4-H6,SVT153FW4M-GS2-SVG13M4-H6,SVT16L123Q-GS2-SVG13M4-H6)和一个双特异性(用于白蛋白和破伤风)和二价(对于破伤风毒素)SDA(SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6)。按照类似于在关于破伤风抗毒素的European Pharmacopoeia专论0091中所述的方法进行。使用比Ph Eur专论0091中描述的方法更高的灵敏度水平进行测定,从而可以检测到少量的毒素中和抗体,以便准确确定SDA的中和终点。进行的测定的破伤风毒素(NIBSC:AWX 4664,稀释为 $1/100$)剂量水平为 $L_p/200$ 。在每项研究中均包括了参考破伤风抗毒素TE3(在第一稀释液中预先稀释了 $1/400$ 至 0.025IU/ml)(一组,4只小鼠),可以确定每个测试样品的效力。每次将固定体积的 0.35ml 毒素与 2.15ml 预稀释的SDA测试样品混合,并静置30分钟,然后再注入小鼠(皮下注射 0.5ml 至左大腿)。将每个预稀释的样品用缓冲液连续

稀释以产生两倍或四倍的稀释系列。每个SDA稀释液具有 $n=4$ 只小鼠。观察动物的破伤风轻瘫症状96小时。在每种测定中,将参考TE3用缓冲液稀释(两倍或四倍)。在每项研究(1、2和3)中,使用16-20g、5-6周龄的雌性NIH小鼠。总共进行了3次连续研究。

[0343] 在研究1中,对SDA样品进行稀释,以使对于所有候选物,测定混合物中各SDA的起始浓度均为1000nM,但SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6除外,其中混合物中的量为100nM。然后将每个候选物连续稀释以产生总共5或6个稀释度的两倍稀释系列(请参阅表19)。将每种稀释液与固定量的破伤风毒素混合,静置30分钟,然后再注射入小鼠(皮下注射0.5ml至左大腿)。每个稀释组具有 $n=4$ 只小鼠。观察动物的破伤风轻瘫症状96小时。各稀释度下受保护的小鼠的比例在表19中示出。

[0344] 对于SDA SVT02-GS2-SVG13M4-H6、SVT03L和SVT16-L123Q-GS2-SVG13M4-H6,在1000nM水平下没有发现体内破伤风毒素中和作用。

[0345] SDA SVT06-GS2-SVG13M4-H6和SVT15-3FW4M-GS2-SVG13M4-H6都提供了1000nM和500nM浓度的保护。在此体内模型中进行测试时,两个SDA都能有效中和破伤风毒素。

[0346] SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6 SDA在所有6种稀释液中均提供了全面保护。尽管以低10倍的浓度提供,但这种二价(即对TeNT)SDA比所有其他双特异性SDA更有效。此外,与两个融合的SVT SDA(SVT06-GS3-SVT16-L123Q)融合的SVA12LSDA(在体外)不与小鼠白蛋白结合。因此,在给定的30分钟孵育时间内,这种多聚体SDA非常有效地中和了破伤风毒素。

[0347] 根据参考抗毒素TE3在终点(稀释步骤2和3之间的中途)的浓度(在第一个稀释液中预先稀释1/400至0.025IU/ml),每个测试样品的效力可以1IU/ml为单位来表示。请注意,在未获得终点的情况下,效力表示为<(如果在所有稀释度下均为0%保护)或>(如果在所有稀释度下均为100%保护)。资料示於表20中。

[0348] 在测定混合物中,参考抗毒素的终点在稀释2和3之间的中间为 $=1.3\text{ml}$ (测定混合物中0.0325IU)。对于未知样品,在终点,测定混合物中有0.0325IU $=2.15\text{ml}$ 中的0.0325IU,其 $=0.01511\text{IU/ml}$ 。然后可以将这种值乘以相关SDA的相应总稀释系数。

[0349] 在所有测试样品中,三价SDA SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6具有最高的效力(低于3.1nM时的保护作用)。它是三价SDA,在三个连接的SDA中具有一个SDA(SVA12)可与多种物种的白蛋白结合。其他两个SDA(SVT06和SVT16)以高亲和力(低 K_D 值)结合到破伤风毒素并且各自结合到不同的域(实施例13、15、18)。

[0350] 随后,必须执行另一个TNT(研究2),以确定SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6的保护终点。另外,在文献[7,42]中描述了混合针对不同表位的小鼠单克隆抗体可以提供针对破伤风毒素中和水平的协同作用。对于可中和破伤风毒素的scFv,也观察到了类似的效果[67]。其他人[24]已经发表,与单体形式相比,二价抗破伤风毒素纳米抗体没有导致明显的功效改善。因此,除了第二项测试之外,还评估了这些不同的多聚体SDA在溶液中混合在一起时是否比单项测试时显示出更强的毒素中和效果(协同效应),关于测试方案请参见表21。测定如上所述执行。

[0351] 表22a、22b和23显示了第二次小鼠毒素中和测试的结果。参考抗毒素的终点与研究1中的终点相同,在测定混合物中在稀释液2和稀释液3之间的中间 $=1.3\text{ml}$ (测定混合物中为0.0325IU)。因此,对于第7组(单一SDA),可以遵循相同的效力计算(基于第一次稀释的

相关浓度),如研究1所示。对于SDA组合,由于每种SDA的相对贡献是未知的,因此无法提供每种SDA在混合物中的效力估算值。但是,混合物的效力可以描述为SDA混合物提供100%保护的最低浓度(nM)(表22b)。

[0352] 与将SVT06-GS2-SVG13M4-H6作为单分子进行测试(500nM)相比,当多聚体SDA SVT15-3FW4M-GS2-SVG13M4-H6和SVT16-L123Q-GS2-SVG13M4-H6与SVT06-GS2-SVG13M4-H6以62.5nM(1组和3组)混合时,提供了至少高>125倍的保护水平,两个SDA的最终浓度总共为3.91nM。因此,明确证明了这些SDA之间有很强的协同作用(见表21a+21b)。

[0353] 第5组的小鼠未受到保护,这表明在这种混合物中以及在相关SDA的这些浓度下,对SVT15-3FW4M-GS2-SVG13M4-H6和SVT16-L123Q-GS2-SVG13M4-H6均未发现协同作用。

[0354] SDA SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6再次在所有稀释度下提供了全面保护。发现完全保护的最终稀释液的SDA量等于0.2nM(表23)。因此,这种SDA的效力>14781U/mg。

[0355] 从研究2的数据中,不能排除SDA SVT02-GS2-SVG13M4-H6和SVT03L是否可以产生协同作用,因为最终稀释液中存在混合物中单独其他SDA的协同作用。与SVT06-GS2-SVG13M4-H6混合使用时,单个SDA SVT15-3FW4M-GS2-SVG13M4-H6和SVT16-L123Q-GS2-SVG13M4-H6在第2组和第4组中的最终浓度比相同SDA在第1组和第3组中的最终浓度低2倍。在最低浓度下(最终稀释步骤中为0.97nM),发现完全保护。

[0356] 随后进行了第三项研究,以确定候选SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6的效力终点(请参见下表24)。在这项研究中,决定每步进行4倍稀释。此外,为了调查单个多聚体SDA SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6是否比两个SDA SVT06-GS2-SVG13M4-H6和SVT16-L123Q-GS2-SVG13M4-H6分子以同样方式混合并稀释更有效,也包括这个组。

[0357] 为了研究SVT15-3FW4M-GS2-SVG13M4-H6是否可以进一步提高单个SDA SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6的效力,在单独的组中也测试了两者的混合物。

[0358] 在研究3中,参考抗毒素(TE-3)的终点与在研究1和研究2中获得的终点略有不同,只有75%的动物受到稀释2的保护(表24)。使用Spearman-Kärber方法计算50%的保护剂量,测定混合物中终点处的抗毒素浓度为0.034IU(在阶段1和2中,在测定混合物中,参考终点在稀释液2和3之间的中间=0.0325IU)。

[0359] 对于单独测试的SDA SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6,终点是稀释液1(50%动物受保护),稀释液1在测定混合物中的含量为0.034IU(=2.15ml测试样品中的0.034IU和0.01581IU/ml)。如表25所示,可以通过将样品的总稀释系数乘以终点处的抗毒素浓度来计算中和滴度。

[0360] 再次证实了SDASVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6具有很高的破伤风毒素中和能力。从这种特定测定的结果计算出这种特定多聚体SDA母料的效力为11,474IU/ml,相当于每mg蛋白超过1500IU。在另一种具有从0.2nM开始的较小稀释步骤的测定中,可以更精确地确定此SDA的中和能力。

[0361] 值得注意的是,SVA12L不与小鼠A1b结合,因此在将其施用于小鼠后,不太可能在小鼠中提供半衰期延长,并且有助于所测量的效力(实施例7)。

[0362] 在总SDA的0.4nM处可提供完全保护证明了结合SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6和SVT15-3FW4M-GS2-SVG13M4-H6的协同作用。

[0363] 在这种测定法中未见到候选SVT06-GS2-SVG13M4-H6和SVT16-L123Q-GS2-SVG13M4-H6组合的保护作用。因此,根据上面显示的结果,可以得出结论,提供全面保护所需的SDA对的总浓度应在0.4-4nM范围内,导致混合物中单个SDA的量为0.2-2nM或更低。

[0364] 因此,进行的三项研究表明,单一的二价和双特异性多聚体SDA SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6提供了针对极强力破伤风毒素的极高保护水平。此外,它比在将两个单一的双特异性SDA SVT06-GS2-SVG13M4-H6和SVT16-L123Q-GS2-SVG13M4-H6混合后表现出的强大的协同作用更优越。SVG13L SDA已显示与小鼠IgG结合(实施例8),在将混合物施用于小鼠后,可能会增强这些双特异性SDA的效力。二价双特异性SDA SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6具有比混合物显示的超强力破伤风毒素中和特性更强的单分子作用,这是一个显著的特征。

[0365] 18. 不同SDA对TeNT、白蛋白和免疫球蛋白的亲合力测定

[0366] 测试了几种SDA的靶标(不同物种的TeNT、白蛋白和免疫球蛋白)结合特性。破伤风毒素的结合特性对于每个SVT SDA在体内中和破伤风毒素的能力都很重要(实施例17)。一旦与SVT SDA融合在一起,SVA和SVG SDA就可以延长SVT SDA的终末血清半衰期。因此,对于SVA和SVG SDA,与不同血液成分的结合特性[19,22,23,25]非常重要。为了兽医的目的,另外重要的是解决这些血液成分之间的物种差异。对于某些跨物种疾病靶标(例如破伤风),最好在多个物种中使用单个SDA进行治疗,而不是为每个物种开发单独的治疗性SDA。

[0367] 在这里,生物层干涉术(BLI)技术被用于测量TeNT、不同物种的白蛋白和不同物种的免疫球蛋白与几种单体和多聚体SDA之间的相互作用。BLI是一种光学分析技术,用于分析光波之间的干涉图样。结合到生物传感器(涂有配体)的分子(分析物)数量的变化会导致实时测量的干涉波长模式(=信号)的光谱位移(nm位移)。K_D是亲和常数或平衡解离常数,它是配体与被分析物结合的紧密程度的度量。它代表缔合速率与解离速率之比,可以使用k_a和k_{dis}计算。K_D以摩尔单位(M)表示。K_D对应于平衡时占据50%配体结合位点的分析物浓度,或者具有结合分析物的配体分子数量等于未结合分析物的配体分子数量时的浓度。K_D与亲和力之间存在反比关系,亲和常数越小表示相互作用越紧密,或者分析物对配体的亲和力越大。

[0368] 为了测量靶标与SDA之间的相互作用,Octet Red96仪器(Pall Life Sciences)配备了链霉亲和素(SA/SAX),Anti-Penta-HI(HIS1K)或Ni-NTA(NTA)Dip及Read™生物传感器(FortéBio)。

[0369] 为了确定SDA对破伤风毒素的结合亲和力,将2μg/ml的生物素化(参见实施例3)的TeNT与SA传感器偶联。在100nM至1.56nM的两倍稀释系列(SVT02-GS2-SVG13M4-H6,SVT03L,SVT15-3FW4M-GS2-SVG13M4-H6和SVT16L123Q-GS2-SVG13M4-H6)或10nM至0.156nM的两倍稀释系列(SVT06-GS2-SVG13M4-H6,SVT06-GS2-SVA12M2-H6和SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6)中,将SDA在含有0.02% Tween 20(ACROS ORGANICS,CAT#233362500)(PBSTween)的PBS缓冲液(PBS10X Fischer science,cat BP399-1和WFI,Hyclone,cat#SH3022110)中稀释。将SDA稀释系列与TeNT偶联传感器一起孵育5分钟(起始浓度为100nM)或10分钟(起始浓度为10nM),然后在PBS-Tween中进行解离步骤另外10分钟(SVT02-GS2-SVG13M4-H6,SVT03L,SVT15-3FW4M-GS2-SVG13M4-H6和SVT16L123Q-GS2-SVG13M4-H6)或60分钟(SVT06-GS2-SVG13M4-H6,SVT06-GS2-SVA12M2-H6和SVT06-GS3-SVT16-L123Q-

SVA1212M2-H6)。

[0370] 为了确定SDA SVT06L、SVT15L和SVT16L与破伤风毒素的结合亲和力,将5 μ g/ml的生物素化SDA与SA传感器偶联,并且破伤风毒素以75nM至4.69nM的两倍稀释系列与SDA-耦合传感器一起孵育5分钟,然后在PBS-Tween中解离另外30分钟。

[0371] 然后将结果采用ForteBio数据分析软件来分析,以确定亲和常数(K_D ,即 k_{diss}/k_a)。表27显示了几种纯化的SDA的亲和力数据。

[0372] 双特异性和单体SDA (SVT02-GS2-SVG13M4-H6, SVT06-GS2-SVG13M4-H6, SVT06-GS2-SVA12M2-H6, SVT15-3FW4M-GS2-SVG13M4-H6, SVT06L, SVT15L, SVT16L, SVT16L123Q-GS2-SVA12M2-H6, SVT16L123Q-GS2-SVG13M4-H6) 以亚纳摩尔至皮摩尔亲和力与TeNT结合。对于TeNT中和能力,这是关键特性。在中毒动物中常见的低毒素浓度下,基于SVT的SDA的快速缔合和强烈延迟的解离以快速、持久的方式阻止毒素发挥其活性。

[0373] 破伤风毒素和SDA复合物的稳定性尤其重要,因为它将阻止例如神经元中毒素的吸收。发现SDA SVT03L、SVT15-3FW4M-GS2-SVG13M4-H6、SVT06-GS3-SVT15-3FW4M-GS2-SVG06M4-H6和SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6的解离值(K_{dis})非常低。

[0374] 对于这些片段C结合SDA中的四分之三,SVT06-GS2-SVG13M4-H6、SVT15-3FW4M-GS2-SVG13M4-H6和SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6,在体内TNT中,作为单一SDA (以<4 μ g/ml和<30ng/ml的水平) 和混合在一起 (以<30ng/ml的水平,参见实施例17) 来测试时,展现优异的毒素中和特性。

[0375] 包含两个SVT域的三个SDA,SVT06-GS3-SVT02-GS2-SVG06M4-H6、SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6和SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6的TeNT亲合力(K_D) 在皮摩尔范围内。对于SDA SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6,测得的亲合力为13皮摩尔,并且这种SDA在体内毒素中和模型中显示出优异的破伤风毒素中和性能(实施例17)。

[0376] 这种SDA的亲和力(较低的 K_D 值)比仅包含一个对应的TeNT结合SDA域(SVT06或SVT16)的可比单体SDA或多聚体VHH的亲和力高约十倍,这表明SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6中同时存在两个SDA域能够同时进行抗原结合。

[0377] 为了确定SDA对血清白蛋白的结合亲和力,进行了几种测定。首先将1.0 (SVA06L) 或1.5 (SVA12L, SVA16L) 微克/毫升的SDA偶联至Ni-NTA传感器(加载时间15分钟)。对于SVA06L,以76.9nM到4.81nM(马、犬或猫的白蛋白)的两倍稀释系列添加马、犬或猫白蛋白作为分析物。对于SVA12L,使用了307.7nM至19.2nM(马或犬白蛋白) 或615.4nM至38.5nM(猫白蛋白)的两倍稀释系列。对于SVA16L,使用从100nM到3.1nM的两倍稀释系列(马、犬和猫白蛋白)。使白蛋白在SDA (SVA06L和SVA12L) 涂布的传感器上反应1分钟,然后在PBSTween中解离另外2分钟,对于SVA16L,间隔分别为3分钟和5分钟。

[0378] 为了确定SVA12L对猪白蛋白的亲和力,使用了250至15.6nM的两倍稀释系列,这里使用了一分钟的缔合和解离步骤。

[0379] 然后使用ForteBio数据分析软件分析结果。表28显示了经过测试的SDA的数据。

[0380] 还测试了几种与马或犬免疫球蛋白Fc部分结合的SDA的结合特性。首先,为了确定SDA SVG03L、SVG23L和SVG24L与马IgG (Fc) (Fitzgerald, cat#31C-CH0804) 结合时的亲和力,使用0.5 μ g/ml的SDA与NTA传感器偶联的设置。侦查分析表明SVG23L不结合所用的马Fc

蛋白。对于SDA SVG03L, 马IgG (Fc) 在PBSTween中以50nM到3.13nM的两倍稀释系列稀释。对于SDA SVG24L, 将马IgG (Fc) 在PBSTween中以100nM至6.25nM的两倍稀释系列稀释。Fc稀释系列与SDA偶联传感器孵育3分钟(缔合阶段), 然后在PBSTween中解离10分钟。

[0381] 为了确定与SDA SVG03L、SVG23L和SVG24L犬IgG (Fc) (Rockland, cat#004-0103) 结合时的亲和力, 使用的设置是将1 μ g/ml的SDA与NTA传感器偶联。侦查分析表明SVG03L不结合所用的犬Fc蛋白。对于SDA SVG23L, 将犬IgG (Fc) 在PBSTween中以40nM至2.5nM的两倍稀释系列稀释。对于SDA SVG24L, 将犬IgG (Fc) 在PBSTween中以从400nM到18.80nM的两倍稀释系列进行稀释。Fc稀释系列与SDA耦合传感器孵育70-100秒(缔合阶段), 然后在PBSTween中解离5分钟。

[0382] 然后使用FortéBio数据分析软件分析结果。表35显示了针对马或犬免疫球蛋白的Fc部分的测试的SDA的数据。

[0383] 由于白蛋白和免疫球蛋白是丰富的血清蛋白, SDA对白蛋白或免疫球蛋白的亲和力不需要很高, 以使大多数SDA分子结合这些靶标。与这种观点一致, 已经观察到, 使用基因改造的细菌白蛋白结合域的蛋白质治疗剂的血清半衰期延长大部分不取决于对白蛋白的亲和力。如果 K_D 值低于100nM(结合亲和力增加), 则血清半衰期不受亲和力影响。只有当 K_D 值接近1 μ M时, 血清半衰期才略有降低[36, 37]。

[0384] 对于SDA SVA06L、SVA12L和SVA16L, 猪、马、犬或猫来源的白蛋白的亲和力在1-275nM之间变化, 且均低于1000nM。对于多聚体SDA SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6, 在年轻猪中血清半衰期估计约为110-145小时。施用后21天, SDA SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6 (0.3mg/kg)、SVT06-GS2-SVA12M2-H6 (0.2mg/kg) 和SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6 (0.5mg/kg) 在猪血清中仍可检测到。因此, 对于SDA SVA12L, 给定的剂量、与之融合的SDA的量和SDA的类型不会显著影响猪的半衰期。由于所有的SVA SDA都是用马和犬白蛋白生成的, 因此在马、犬和猫中这些SDA的半衰期相似。

[0385] 对于SDA SVG03L、SVG23L和SVG24L, 与马或犬来源的免疫球蛋白的Fc部分的亲和常数 K_D 在0.1-4nM之间变化, 且均低于10nM。这些结合物的使用可能有益于干扰不同的免疫学过程(补体途径的激活、I型超敏反应、过敏、特异性)。

[0386] 19. 针对TeNT的其他多聚体SDA的构建和生产

[0387] 通过在酵母菌株SU50[70]中使用质粒pRL44[69]制备稳定的MIRY整合体[75]来生产另外两种多聚体SDA (SVT06-GS3-SVT15-3FW4M-GS2-SVA12M2-H6和SVT15-3FW4M-GS3-SVT06-GS2-SVG13M5-H6)。这些多聚体SDA的构成要素如下:

[0388] GS3: $(G_4S)_3$ 接头, 先前已描述[27]

[0389] GS2: 源自pRL144质粒的 $(G_4S)_2$ 接头[19]

[0390] H6: his6标签, 双终止密码子和HindIII位点, 如在pRL188中[2]

[0391] SVG13M5: SVG13具有五个突变: Q1E、Q5V、W118R、K120Q、L123Q

[0392] SVA12M2: SVA12具有两个突变: Q1E、Q5V

[0393] SVT15-3FW4M: 没有内部SacI位点和3个突变的SVT15: K120Q、I122T、L123Q

[0394] SVT16-L123Q: 具有静默恢复的BstEII位点和L123Q突变的SVT16

[0395] 产生合成的SacI-HindIII片段, 随后使用SacI和HindIII位点亚克隆到质粒pRL44[69]中, 得到质粒pRL505和pRL506(表34)。

[0396] 通过电穿孔[71]用Hpa1线性化质粒pRL505和pRL506转化面包酵母菌株SU50 (MATa; cir^o; leu2-3, -112; his4-519; can1; [70]), 并选择leu⁺营养缺陷型。诱导单个菌落纯化的转化子以0.5L规模表达SDA, 并通过IMAC从耗尽培养上清液中纯化SDA[58]。随后将SDA通过阳离子交换色谱在SP琼脂糖柱上进一步纯化, 如前所述[44], 但稍有改动。SP琼脂糖Fast Flow(GE Healthcare, Piscataway, NJ) 和25mM乙酸钠pH 4.7缓冲液用于SDA与色谱柱的结合。在结合缓冲液中以0.1、0.2、0.4、0.6、0.8和1M NaCl的逐步梯度洗脱结合的SDA。结合的SDA通常在0.4至0.6M NaCl之间洗脱(表34)。将其浓缩, 并使用3kDa分子量截留离心浓缩装置来缓冲液交换为PBS。使用二喹啉甲酸测定法(BCA, Pierce目录号23212)和牛血清白蛋白标准品(Thermo Scientific, Rockford, IL) 测定SDA浓度。基于纯化的SDA产量, 计算酵母中多聚体SDA的生产水平(表34)。

[0397] 通过使用带有MOPS运行缓冲液(Invitrogen)的NuPage Novex 4%-12%Bis-Tris凝胶还原SDS PAGE并用Gelcode Blue试剂(Thermo Scientific)染色来分析多聚体SDA。两种多聚体SDA均基于其预测的分子质量在预期的位置迁移。从储备中对样品进行生物素化处理(磺基-NHS-LC-生物素, Pierce, 目录号21335, 批号0E185235A), 蛋白质与生物素的重量比合适。

[0398] 20. 几种SDA与TeNT的进一步结合特征

[0399] 当使用配备链霉亲和素(SA)生物传感器的Octet Red96仪器(Pall Life Sciences)时, 与cAb-TT1和cAb-TT2相比, 进行了进一步的测定, 以研究SDA的选择结合[46]。为此, 评估了SDA SVT06L、SVT15L和SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6、cAb-TT1和cAb-TT2与破伤风毒素的结合亲和力。

[0400] 为了确定与破伤风毒素的结合亲和力, 将生物素化的SDA与SA传感器偶联(参见实施例18)。制备了两倍稀释的破伤风毒素稀释液系列, 有关测定的详细信息, 请参见表29。在进一步优化分析后, 将SDA与破伤风毒素的不同稀释度进行孵育, 然后进行缔合步骤(2-8分钟), 然后在PBS-Tween中进行解离步骤(2-10分钟)。然后使用ForteBio数据分析软件分析结果以确定亲和力常数(K_D), 表29显示了每个SDA的亲和力数据。

[0401] 在此测试设置中重复了SVT06L、SVT15L和SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6的早期测试结果(请参见表27), 并确认了对破伤风毒素的高亲和力。对于cAb-TT1和cAb-TT2, 证实了较低的亲和力。尤其是cAb-TT1和cAb-TT2的快速解离都非常明显。然而, 这与来自小鼠毒素中和测试的结果一致, 如W096/34103中所述, 其中在施用4 μ g cAb-TT2后, 75%的小鼠在4天后死亡。相比之下, SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6在几个连续执行的TNT中以低纳克水平(20-30ng/ml)使用时, 可保护小鼠免受5倍高致死剂量的破伤风毒素的伤害。

[0402] 为了确定与破伤风毒素结合时2个其他多聚体SDA(SVT06-GS3-SVT15-3FW4M-GS2-SVA12M2-H6和SVT15-3FW4M-GS3-SVT06-GS2-SVG13M5-H6)的亲和力, 使用设置为4 μ g/ml生物素化的TeNT被耦合到SA传感器。将SDA(包括SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6)在含有0.02% Tween 20(PBSTween)的PBS缓冲液中以10nM至0.62nM的两倍稀释系列来稀释。将SDA稀释系列与TeNT偶联的传感器孵育3分钟(缔合阶段), 然后在PBS-Tween中解离15分钟。然后使用ForteBio数据分析软件分析结果, 以确定每个SDA的亲和常数(K_D)。

[0403] 从这项研究中, 双特异性(与破伤风毒素和白蛋白或IgG结合)和二价(对于破伤风

毒素) SDA与亚纳摩尔至皮摩尔的亲合力与TeNT结合,请参见表30。基于实施例17中提供的结果,预计这些SDA(SVT06-GS3-SVT15-3FW4M-GS2-SVA12M2-H6和SVT15-3FW4M-GS3-SVT06-GS2-SVG13M5-H6)将以低纳克水平有效体内中和破伤风毒素。

[0404] 21.几种多聚体SDA对马、人或犬白蛋白的进一步结合特性

[0405] 为了确定选择的二价和双特异性(多聚体)SDA对马、犬和人血清白蛋白的结合亲合力,进行了另外的测定。

[0406] 确定3个多聚体SDA的亲合力(SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6、SVT06-GS3-SVT15-3FW4M-GS2-SVA12M2-H6和SVT15-3FW4M-GS3-SVT06-GS2-SVG13M5-H6)当与马白蛋白结合时的亲合力,优化后使用的设置是将2.5微克/毫升生物素化(磺基-NHS-LC-生物素,Pierce,目录号21335,批号OE185235A,以蛋白与生物素的适当重量比)马或5.0微克人白蛋白与SA传感器偶联。进一步优化后,将这些SDA中的两个(SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6、SVT06-GS3-SVT15-3FW4M-GS2-SVA12M2-H6)以从10nM到0.62nM的两倍稀释系列在含有0.02%Tween 20(PBSTween)的PBS缓冲液中稀释。将SDA稀释系列与马白蛋白偶联的传感器孵育6-10分钟(缔合阶段),然后在PBS-Tween中再解离10分钟。对于SVT 15-3FW4M-GS3-SVT06-GS2-SVG13M5-H6,选择100nM的浓度。

[0407] 评估了单体SDA SVA12L和所有3种多聚体SDA在100nM浓度下与人白蛋白的亲合结合特性。

[0408] 确定3个多聚体SDA(SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6、SVT06-GS3-SVT15-3FW4M-GS2-SVA12M2-H6和SVT15-3FW4M-GS3-SVT06-GS2-SVG13M5-H6)当结合犬白蛋白时的亲合力,在优化后使用的设置是将1.25微克/毫升生物素化的多聚体SDA(参见实施例19)偶联至SA传感器。将犬白蛋白在含有0.02%Tween20(PBSTween)的PBS缓冲液中以500nM至16nM的两倍稀释系列进行稀释。将白蛋白稀释系列与各自的SDA偶联传感器孵育4-5分钟(缔合阶段),然后在PBS-Tween中解离另外5-10分钟。

[0409] 然后使用ForteBio数据分析软件分析结果。表31a和表31b显示了经过测试的SDA的数据。如所预期的,没有发现任何单体或多聚体SDA与人白蛋白结合。发现多聚体SDA_SVT15-3FW4M-GS3-SVT06-GS2-SVG13M5-H6不与马、人或犬白蛋白结合。

[0410] 对于多聚体SDA SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6和SVT06-GS3-SVT15-3FW4M-GS2-SVA12M2-H6,对马或犬来源白蛋白的亲合常数KD分别在0.5-1.5nM和250-400nM之间变化。对于多聚体SDA SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6,在猪中发现血清半衰期约为110-145小时(4.5-6天)(参见实施例16),而在在马中发现血清半衰期约为510小时(21.25天)(请参阅实施例23)。根据亲合力数据,可以预期在猪和马中SVT06-GS3-SVT15-3FW4M-GS2-SVA12M2-H6的半衰期相似。

[0411] 22.由另一种方法(Creoptix WAVE系统)确定的几个SDA对TeNT的亲合力。

[0412] 对于多个SDA,通过Octet Red96仪器测定,与目标TeNT的亲合常数在pM范围内。为了证实这些发现,使用了另一种技术,即Creoptix™传感器专有的光栅耦合干涉术(GCI)方法[76]。GCI是一种基于波导干涉测量法的方法,用于监测和表征分子相互作用并确定动力学速率、亲合常数和相互作用分析物的浓度。像其他无光学标签的方法(例如表面等离子共振(SPR))一样,波导干涉测量技术可以检测由于相互作用分子复合物形成而使传感器表面附近的渐逝场内的折射率发生变化。两种非常敏感的方法(即干涉测量法和平面光波导

传感)的组合导致检测限非常低。

[0413] 在30℃下,使用Creoptix WAVE仪器(Creoptix AG,Waedenswil,Switzerland)对几种以TeNT为靶标的单体和多聚体SDA进行了亲和力(KD)实验。遵循WAVE控制软件中用于调节芯片(4PCP-S)、固定蛋白质和进行动力学实验的协议。使用标准化学品。

[0414] 通过相关通道,以10微升/分钟的注射速度和120s的注射时间将生物素化的破伤风毒素(10微克/毫升)固定在PCH-链霉亲和素芯片上。所有实验均使用含有0.02% Tween20 (PBSTween)作为运行缓冲液的PBS缓冲液进行。在五个浓度(100 -1.2nM,3倍稀释步骤)下,对几种SDA(单体和多聚体)的结合特性进行了评估。评估的SDA的缔合阶段为4分钟。对于SVT 03L、SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6和SVT15-3FW4M-GS3-SVT06-GS2-SVG13M5-H6,解离时间为6000秒。对于SVT06-SVT16-L123Q-GS2-SVG13M4-H6和SVT15-3FW4M-GS2-SVG13M4-H6,解离持续时间分别设置为1000秒和12000秒。然后使用Creoptix数据分析软件分析结果以确定亲和常数(K_D),结果显示在表32中。

[0415] 结果证实了涉及每个测试的SDA的缓慢解离和快速缔合的较早发现。测试的SDA的 K_D 在1.0-25 μ M之间变化。

[0416] 23. 分析马中多聚体SDA的血清半衰期。

[0417] 对于SDA SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6,血清半衰期的测定也在马中进行。自SDA以来,相关目标物种仅通过使用马和犬白蛋白产生。为此,使用了三个4.5-6.5岁的小马(雌性)。在肌肉接种之前将它们称重。根据体重计算每只动物所需的多聚体SDA量(剂量为0.17mg/kg)。将溶于PBS的经过滤器灭菌的SDA单个部位肌肉内注射到后大腿,注射量约为2.5ml。在接种SDA之前和之后的1、2、4、7、10、13、17和21天立即从颈静脉收集用于血清制备的血样。

[0418] 使用TeNT全毒素和抗标签mAb PO-缀合物通过ELISA测定血清中的SDA水平。为了这个目的,在4℃下,将溶解在涂布缓冲液(50mM NaHCO₃ pH 9.2缓冲液)中的PBS中的2 μ g/ml的TeNT全毒素以100 μ l/孔涂布96孔聚苯乙烯板过夜。在室温下,用ELISA缓冲液(1%脱脂牛奶;0.05% Tween-20;0.5M NaCl;2.7mM KCl;2.8mM KH₂PO₄;8.1mM Na₂HPO₄;pH 7.4,100 μ l/孔)洗涤板1小时后,进行所有随后的孵育。将TeNT涂布的板在每列八个孔中以两倍稀释系列孵育,以1微克/毫升和0.1微克/毫升的SDA标准液开始,在第3列中加入1微克/毫升SDA的空血清,在第4至12列中收集九个动物血清。首先将血清稀释五倍,然后再在八个孔中稀释两倍。洗涤后,将涂有TeNT的板与抗his6mAb-PO缀合物(1/1000,Roche,目录号11965085001)一起孵育。然后通过用3,3',5,5'四甲基联苯胺染色来检测结合的PO(Surmodics;目录号TMBW-1000-01)。加入0.5M硫酸使反应停止后,使用分光光度计测定450nm处的吸光度。使用合适的商业软件程序评估吸光度数据。将四参数对数曲线拟合至标准品的吸光度和SDA浓度。这种曲线用于内插SDA浓度,从而在每种ELISA中获得每种血清样品的特定吸光度值。将计算出的血清SDA浓度导出到Excel®电子表格模板(Microsoft Corporation,Redmond,USA)。

[0419] 根据以下公式计算终末血清半衰期:

[0420] $SDA(t) = SDA(0) * (0.5^{-(t/T_{1/2\beta})})$,其中t是以小时为单位的时间,其中SDA(0)是补偿体重增加的半衰期计算所使用的第一个时间点的SDA浓度,SDA(t)是时间t的SDA浓度, $T_{1/2\beta}$ 是终末半衰期。

[0421] 从第2天到第21天的样品中检索到的数据计算血清半衰期。根据上述公式,使用Microsoft Excel的Solver函数根据时间对每个动物拟合SDA浓度。然后计算T1/2 β 的平均值和标准偏差(参见表33)。

[0422] 接种了(马)白蛋白结合双价和双特异性多聚体SDASVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6的动物的平均T1/2 β 为510小时。这种多聚体SDA包含与白蛋白结合的SDA结构域SVA12M2,其与SVT06和SVT16-L123QSDA结构域连接成多聚体SDA。施用SDA后21天,三只动物的血清水平为0.4-0.6微克/毫升,因此,根据实施例17中显示的数据,所有动物均已预防破伤风的水平远高于所需的最低水平(0.1IU/ml)。如预期的那样,在马中计算出的SDA SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6的血清半衰期超过了为猪测量和计算的血清半衰期。这支持了预测犬可以预期类似的较长血清半衰期的计算。

[0423] 表2. 大肠杆菌产生的结合TeNT的SDA的噬菌体展示选择和ELISA中的结合。

	噬菌体展示选择条件					ELISA 中的 450 nm 下的吸光度				
	第一轮抗原 SDA 浓度(μ g/ml)	抗原	第二轮抗原 浓度(μ g/ml)	抗原	IEP ^c	CDR3 组	GT1b- TeNT 抑制	直接涂布 的 TeNT	cAb-TT2 捕获 的 TeNT	直接 涂布 rTTC
[0424]	无	NA ^a	NA	NA	NA	NA	1.302	0.053	0.058	0.054
	无	NA	NA	NA	NA	NA	1.257	0.056	0.059	0.054
	SVT20	0.1	TeNT	1	TeNT	9.5	A	0.132	1.076	0.685
	SVT34	0.1	TeNT	1	rTTC	9.4	A	0.117	1.433	0.483
	SVT16	1	rTTC	1	TeNT	8.9	A	0.120	1.039	0.736
	SVT25	0.1	TeNT	1	rTTC	9.2	A	0.139	1.135	0.427
	SVT06	1	TeNT	0.1	TeNT	4.7	B	0.720	1.037	0.683
	SVT31	1	rTTC	1	rTTC	5.0	B	0.105	1.379	1.095
	SVT08	0.1	TeNT	0.1	TeNT	5.0	B	0.746	1.067	0.510
	SVT15	1	TeNT	1	rTTC	7.0	C	0.190	1.026	0.680
	SVT29	1	TeNT	1	TeNT	7.1	C	0.152	1.282	0.868
	SVT13	0.1/1 ^c	cAb-TT2-TeNT	1/1	cAb-TT2-TeNT	7.8	D	0.196	0.762	0.165
	SVT22	1	rTTC	1	TeNT	7.8	D	0.137	1.082	0.299
	SVT02	1/1 ^b	cAb-TT2-TeNT ^d mAbTT10-TeNT ^d	1/1	cAb-TT2-TeNT mAb	9.5	E	1.338	0.078	0.511
	SVT03	1/1	1/1	TT10-TeNT	8.7	F	1.286	0.091	0.534	0.061
	SVT05	1	rTTC	0.1	TeNT	5.0	G	0.985	1.037	0.548

[0425] ^aNA, 不适用

[0426] ^b1/1表示捕获抗体和TeNT的使用量均为1 μ g/ml

[0427] ^c0.1/1表示捕获抗体的使用量为0.1 μ g/ml, TeNT的使用量为1 μ g/ml

[0428] ^d用直接涂布的cAb-TT2或mAb TT10捕获TeNT。

[0429] ^e使用web.expasy.org/compute_pi/根据在IMGT残基128处终止的成熟SDA序列进行预测,结果为平均分辨率。

表 3. 大肠杆菌产生的 IgG 结合 SDA 的噬菌体展示选择历史和 ELISA 中的结合。

SDA	噬菌体展示选择条件					ELISA 中的 450 nm 下的吸光度									
	第一轮抗原		第二轮抗原												
	浓度	IgG	浓度	IgG											
	($\mu\text{g}/\text{ml}$)	来源	($\mu\text{g}/\text{ml}$)	来源		犬 IgG	马 IgG	人 IgG	猪 IgG	豚鼠 IgG	牛 IgG	马 Fc	马 Fab	犬 Fab	无
[0430]	无	NA ^a	NA	NA	NA	0.062	0.255	0.074	0.073	0.062	0.060	0.065	0.055	0.054	0.060
	无	NA	NA	NA	NA	0.068	0.261	0.074	0.072	0.082	0.073	0.067	0.053	0.057	0.053
	SVG 13	1	马	1	马	0.693	0.436	0.524	0.195	0.579	0.272	0.097	0.222	0.590	0.051
	SVG 18	1	犬	1	马	1.003	0.478	0.096	0.097	0.174	0.124	0.072	0.320	1.365	0.050
	SVG 19	1	马	1	犬	1.018	0.681	0.309	0.146	0.435	0.453	0.079	0.472	1.223	0.069
	SVG06	1	马	1	犬	0.277	0.325	0.365	0.131	0.204	0.172	0.073	0.089	0.178	0.059
	SVG23	1	犬	1	犬	1.735	0.260	0.073	0.092	0.068	0.062	0.072	0.056	0.061	0.090
	SVG24	1	马	1	犬	1.741	0.765	0.084	0.341	0.068	0.075	1.669	0.060	0.074	0.063
	SVG03	1	马	1	马	0.070	1.102	0.076	0.075	0.063	0.061	0.476	0.057	0.054	0.051
	SVG07	1	马	1	犬	0.479	0.401	0.170	0.103	0.249	0.121	0.099	0.152	0.454	0.060

[0431] ^aNA, 不适用

[0432] 表4. 大肠杆菌产生的A1b结合SDA的噬菌体展示选择历史和ELISA中的结合。

		噬菌体展示选择条件							
		第一轮抗原		第二轮抗原		ELISA 中的 450 nm 下的吸光度			
SDA		浓度 (μg/ml)	Alb 来 源	浓度 (μg/ml)	Alb 来 源				
						马	犬	人	无
[0433]	无	NA ^a	NA	NA	NA	0.087	0.115	0.083	0.135
	无	NA	NA	NA	NA	0.064	0.081	0.057	0.080
	SVA16	1	马	1	犬	2.110	2.020	0.083	0.064
	SVA04	1	犬	1	马	2.013	1.533	0.085	0.151
[0434]	SVA06	1	马	1	犬	1.655	1.987	0.067	0.108
	SVA12	1	犬	1	马	1.999	1.775	0.057	0.058
	SVA02	1	犬	1	犬	1.904	1.873	0.065	0.066
	SVA07	1	马	1	马	1.455	0.059	0.062	0.060

[0435] ^aNA, 不适用

[0436] 表5. SDA的酵母生产。

SDA	酵母菌株 SDA 亚家族(根据 [52] 的指定)	ml ^c	总 SDA 产量(mg)	生产水平 (mg/L)	SU51/W303-1a 突变体/野生型生的生产水平的 产水平的比例	
					比例	
SVT02L	W303-1a 1	500	0.868	1.74	ND	ND
SVT03L	W303-1a 1	500	0.222	0.44	ND	ND
SVT05L	W303-1a X	500	0.076	0.15	ND	ND
SVT06L	W303-1a X	500	2.208	4.42	ND	ND
SVT08L	W303-1a X	500	1.024	2.05	ND	ND
SVT13L	W303-1a 3	500	1.276	2.55	ND	ND
SVT15L	W303-1a 1	500	0.202	0.40	ND	ND
SVT15L	W303-1a 1	50	0.016	0.32	ND	ND
SVT15L-3FW4M	W303-1a 1	50	0.093	1.87	ND	5.2
SVT16L	W303-1a 1	500	1.043	2.09	ND	ND
SVT20L	W303-1a 1	50	0.022	0.43	ND	ND
SVT20L	W303-1a 1	500	0.126	0.25	ND	ND
SVT20L-L123Q	W303-1a 1	50	0.061	1.22	ND	3.6
SVT22L	W303-1a 3	500	0.310	0.62	ND	ND
SVT25L	W303-1a 1	500	0.023	0.05	ND	ND
SVT29L	W303-1a 1	500	0.037	0.07	ND	ND
SVT31L	W303-1a X	500	0.177	0.35	ND	ND
SVT34L	W303-1a 1	500	0.218	0.44	ND	ND
SVT34L	W303-1a 1	50	0.037	0.73	ND	ND
SVT34L-L123Q	W303-1a 1	50	0.076	1.52	ND	2.6
SVG03L	W303-1a 1	50	0.015	0.29	ND	ND
SVG06L	W303-1a C	50	0.090	1.81	ND	ND
SVG07L	W303-1a C	50	0.007	0.15	ND	ND
SVG13L	W303-1a C	50	0.079	1.59	ND	ND
SVG18L	W303-1a C	50	0.015	0.30	ND	ND
SVG19L	W303-1a C	50	0.082	1.65	ND	ND
SVG23L	W303-1a 1	50	0.021	0.41	ND	ND
SVG24L	W303-1a 1	50	0.049	0.99	ND	ND
SVA02L	W303-1a 1	50	0.011	0.22	ND	ND
SVA04L	W303-1a 1	50	0.009	0.18	ND	ND
SVA06L	W303-1a 1	50	0.011	0.21	ND	ND
SVA07L	W303-1a 1	50	0.141	2.82	ND	ND
SVA12L	W303-1a 1	50	0.192	3.85	ND	ND
SVA16L	W303-1a 1	50	0.037	0.73	ND	ND
SVT13L	SU51 3	50	0.320	6.39	2.5	ND
SVT15L	SU51 1	50	0.047	0.94	2.6	ND
SVT20L	SU51 1	50	0.190	3.79	11.1	ND
SVT34L	SU51 1	50	0.397	7.93	13.6	ND

[0437] 表6.SVA克隆与不同抗原的ELISA结合。

SDA	来自不同物种的白蛋白									
	马	犬	小鼠	猪	猫	人	羊	牛	鸡	无
[0439]	450 nm 处的最大吸光度值									
	SVA16L	1.822	1.761	0.066	0.079	0.083	0.056	0.060	0.051	0.052
	SVA04L	0.190	0.069	0.107	0.080	0.087	0.052	0.052	0.050	0.050
	SVA06L	0.483	0.921	0.360	0.288	0.158	0.050	0.052	0.052	0.051
	SVA12L	1.950	1.674	0.057	1.371	0.202	0.056	0.054	0.055	0.051
	SVA02L	0.809	0.579	0.191	0.085	0.089	0.078	0.061	0.054	0.057
	SVA07L	0.550	0.056	0.079	0.084	0.086	0.060	0.055	0.056	0.054
[0440]	SVT06L	0.056	0.053	0.073	0.080	0.099	0.065	0.060	0.051	0.057
	没有 SDA	0.074	0.086	0.097	0.085	0.060	0.124	0.104	0.069	0.068
	导致 $A_{450nm} = 0.2$ 的 SDA 有效浓度(ng/ml) ^a									
	SVA16L	3.6	6.4	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
	SVA04L	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
	SVA06L	235	51	180	344	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
	SVA12L	3.7	9.1	>1000	21	673	>1000	>1000	>1000	>1000
	SVA02L	149	171	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
	SVA07L	238	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
	SVT06L	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
	没有 SDA	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000

[0441] ^a>1000表示在分析的最高SDA浓度下吸光度低于0.2

[0442] 表7.SVG克隆与不同抗原的ELISA结合

	纯化的 IgG 或其衍生的抗体片段						
	马	马	马	马	犬	犬	犬
	IgG ^b	Fab ₂	Fab	Fc	IgG	Fc	Fab
EC 的 A450 nm	0.4	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
SDA	450 nm 处的最大吸光度值(减去背景) ^b						
SVG03L	1.393	0.132	0.096	1.438	0.080	0.146	0.083
SVG06L	0.284	0.330	0.333	0.096	1.297	0.109	1.308
SVG07L	0.074	0.100	0.085	0.066	0.242	0.073	0.210
SVG13L	0.533	0.826	0.853	0.094	1.611	0.089	1.603
SVG18L	0.127	0.149	0.144	0.064	0.743	0.071	1.168
SVG19L	0.253	0.299	0.303	0.068	0.876	0.073	1.216
SVG23L	0.056	0.078	0.074	0.063	0.618	1.400	0.065
SVG24L	0.088	0.089	0.194	1.184	0.847	1.446	0.089
SDA	产生指示的吸光度值的 SDA 有效浓度(ng/ml) ^a						
SVG03L	16	>1000	>1000	35	>1000	>1000	>1000
SVG06L	237	184	184	>1000	12	>1000	20
SVG07L	>1000	>1000	>1000	>1000	441	>1000	818
SVG13L	45	37	44	>1000	9.7	>1000	13
SVG18L	>1000	>1000	>1000	>1000	37	>1000	29
SVG19L	212	215	305	>1000	29	>1000	26
SVG23L	>1000	>1000	>1000	>1000	252	78	>1000
SVG24L	>1000	>1000	>1000	109	50	28	>1000
	来自不同动物物种的纯化 IgG						
	小鼠	猪	猫人	羊	牛	鸡	豚鼠
对于 EC 的 A450 nm	GG	IgG	GG GG	GG ^b	IgG	GG ^b	IgG
	0.2	0.2	0.2 0.2	0.3	0.2	0.4	0.2
SDA	450 nm 处的最大吸光度值(减去背景) ^b						
SVG03L	0.093	0.105	0.088 0.193	0.180	0.083	0.079	0.114
SVG06L	0.708	0.402	1.609 1.301	0.328	0.721	0.070	1.075
SVG07L	0.073	0.103	0.116 0.164	0.114	0.108	0.074	0.137
SVG13L	1.002	0.436	1.633 1.255	0.277	0.704	0.164	1.309
SVG18L	0.075	0.100	0.233 0.142	0.131	0.101	0.470	0.146
SVG19L	0.136	0.114	0.583 0.249	0.162	0.322	0.397	0.318
SVG23L	0.068	0.089	0.071 0.121	0.101	0.077	0.064	0.076
SVG24L	0.091	0.132	0.108 0.139	0.144	0.087	0.069	0.094
SDA	产生指示的吸光度值的 SDA 有效浓度(ng/ml) ^a						
SVG03L	>1000	>1000	>1000 >1000	>1000	>1000	>1000	>1000
SVG06L	58	71	7.5 8.6	258	19	>1000	19
SVG07L	>1000	>1000	>1000 >1000	>1000	>1000	>1000	>1000
SVG13L	19	54	7.8 12	391	19	>1000	9.3
SVG18L	>1000	>1000	683 >1000	>1000	>1000	45	>1000
SVG19L	>1000	>1000	58 223	>1000	127	65	126
SVG23L	>1000	>1000	>1000 >1000	>1000	>1000	>1000	>1000
SVG24L	>1000	>1000	>1000 >1000	>1000	>1000	>1000	>1000

[0445] ^a>1000表示在分析的最高SDA浓度下吸光度低于要求值。

[0446] ^b为了补偿高背景,将各个SDA的吸光度值减去0.2(马IgG和鸡GG)或0.1(羊GG)的值。对于这三个ELISA,计算出有效浓度的吸光度值会随着这些减去的值而增加。

[0447] 表8.单价酵母产生的SDA与八种IgG的结合。

[0448]

	来自不同物种的 IgG 的最大 A450							
SDA	牛	猫	犬	马	人	小鼠	羊	猪
SVG13L	0.71	1.32	1.34	1.05	1.16	1.13	0.66	0.74
VI-4L	0.14	0.10	0.11	0.30	0.17	0.11	0.25	1.62
VI-8L	0.11	0.11	0.10	0.29	0.14	0.11	0.23	1.75
VI-11L	0.14	0.11	0.09	0.57	0.13	0.10	0.31	1.86
VI-14L	0.15	0.12	0.11	0.31	0.18	0.13	0.21	1.83
无	0.14	0.10	0.08	0.27	0.14	0.10	0.18	0.12
	来自不同物种的 IgG 的 EC _{A450=0.3} (ng/ml) ^a							
SVG13L	49	8	7	5	14	17	145	51
VI-4L	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	10
VI-8L	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	5
VI-11L	>1000	>1000	>1000	226	>1000	>1000	980	3
VI-14L	>1000	>1000	>1000	875	>1000	>1000	>1000	4
无	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000

[0449] ^a>1000表示在分析的最高SDA浓度下吸光度未达到0.3。

[0450] 表9. 针对TeNT的mAb。

			小鼠生物测定中	
			的 TeNT 中和	蛋白质印迹
[0451]	mAb	供应商	目录号	
	6E7 ^a	ThermoFisher	HYB 278-17-02	是
	14F5 ^a	ThermoFisher	HYB 278-14-02	是
	6F55 ^b	US Biological	T2962-33	是
	6F57 ^b	US Biological	T2962-35	是
	11n185 ^c	US Biological	T2962-01E	未知
	B417M	Antibodies Online	ABIN349738	是
[0452]	TT10 ^d	NIBSC	10/134	是

[0452] ^a根据制造商, mAbs 6E7和14F5结合独立的抗原位点

[0453] ^b根据制造商, mAbs 6F55和6F57结合独立的抗原位点

[0454] ^c根据制造商, mAb 11n185与TeNT轻链结合

[0455] ^d参考文献:[48, 62]。

[0456] 表10. 不同SVT克隆和mAb的抗原结合。

抗原:		TeNT	TeNT	TeNT ^a	rTTC	无	TeNT	TeNT	TeNT	TeNT	TeNT ^a	TeNT	TeNT	
		-	cAbTT2	GT1b	-	-	-	cAb-TT2	-	抗体	GT1b	-	cAb-TT2	
SDA/mAb 生物素化:		否	否	否	否	否	是	是	否	否	否	是	是	
[0457]		CDR3 最高吸光度值(对 GT1b-TeNT 抑制的最小值) ^b							得到指示的 A450 的 EC ₅₀ (ng/ml)					
SDA 或 mAb		组							0.2	0.15	0.59	0.4	0.2	
SVT16L		A	1.575	0.363	0.129	1.011	0.05	1.423	0.971	1.1	3.2	47	0.52	1.6
SVT20L		A	1.536	0.327	0.117	0.967	0.05	1.204	0.535	1.2	3.1	39	2.1	4.5
SVT20L-L123Q		A	0.857	0.098	0.096	0.265	0.06	1.328	0.698	4	>1000	38	1.4	2.8
SVT25L		A	1.559	0.362	0.106	0.936	0.05	0.985	0.302	3.6	6.4	133	43	84

[0458]	SVT34L	A	1.537	0.335	0.103	0.886	0.06	1.293	0.669	1	3.2	46	1.7	3.5
	SVT34L-L123Q	A	1.011	0.178	0.137	0.559	0.05	1.209	0.518	2	5.9	34	2	3.2
	SVT06L	B	1.392	0.409	0.481	0.543	0.06	1.507	1.204	1.7	2.6	317	0.39	0.37
	SVT08L	B	1.367	0.360	0.486	0.502	0.05	1.574	1.200	2.2	3.6	411	0.4	0.52
	SVT31L	B	1.318	0.270	0.568	0.483	0.05	1.430	1.033	2.4	4.3	986	0.98	1.5
	SVT15L	C	1.337	0.477	0.140	0.528	0.05	1.401	0.825	2.8	5.7	72	2.8	5.7
	SVT15L3FW4M	C	0.817	0.195	0.127	0.206	0.05	1.372	0.697	3.8	9.8	39	2	3.5
	SVT29L	C	1.516	0.429	0.135	0.580	0.05	1.128	0.596	2.6	6.3	114	6.9	14
	SVT13L	D	1.544	0.487	0.126	1.105	0.05	1.484	1.056	1.9	4.1	82	0.57	1.3
	SVT22L	D	1.593	0.318	0.107	0.981	0.06	1.337	0.799	2	5.4	105	1.3	2.6
	SVT02L	E	0.077	0.196	0.576	0.057	0.05	0.191	0.530	>1000	36	>1000	>1000	11
	SVT03L	F	0.104	0.304	0.903	0.053	0.05	0.233	0.493	>1000	1.9	>1000	>1000	2.8
	SVT05L	G	1.292	0.375	0.655	0.604	0.05	1.260	0.622	0.51	0.86	>1000	0.98	1.7
	SVA12L		0.071	0.056	0.711	0.057	0.05	0.155	0.072	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
	mAb B417M		1.646	1.393	0.833	0.052	0.05	0.630	0.299	3.3	<0.49	>1000	124	27
	mAb 6E7		1.832	1.375	0.420	1.794	0.06	1.656	1.566	1.2	1	1410	1.4	1.2
	mAb 14F5		0.318	1.240	0.979	0.051	0.05	0.461	1.259	81	3.2	>1000	406	8.1
	mAb 6F57		1.765	1.354	0.568	1.764	0.04	1.259	0.965	3.4	4.1	1590	24	18
	mAb 6F55		0.217	0.956	0.974	0.048	0.05	0.226	0.630	504	18	>1000	>100	134
	mAb 11n185		1.841	0.061	0.945	0.048	0.04	0.294	0.100	2.3	>1000	>1000	>100	>1000

[0459] ^a在GT1b-TeNT抑制ELISA中,不存在SDA时的最大吸光度值为0.999。

[0460] ^b对于GT1b-TeNT抑制ELISA,吸光度值低于0.7被认为是阳性。对于所有其他ELISA,认为吸光度值大于0.2表示抗原结合。

[0461] 表11.不结合直接涂布的TeNT的两个SVT克隆和三个对照SDA的rTTC结合。

	涂布: 捕获步骤:	450 nm 下的吸光度			
		TeNT 无	6E7 rTTC	6E7 无	6E7 TeNT
[0462]	SDA				
	SVA12L	0.048	0.059	0.059	0.059
	SVT02L	0.062	0.062	0.067	1.189
	SVT03L	0.331	0.061	0.070	1.325
	SVT15L-3FW4M	0.477	0.528	0.063	0.236
	SVT16L	1.269	1.377	0.063	1.131

[0463] 表12.SVT SDA和抗TeNT mAb的表位叠加(竞争/阻断)ELISA。

		生物素化 SDA 或 mAb 结合的抑制百分比 ^a																
		SVT02L	mAb 14F5	mAb 6F55	SVT03L	SVT15L	SVT15L-3FW4M	SVT06L	SVT08L	mAb 6E7	mAb 6F57	SVT13L	SVT16L	SVT22L	SVT34L	mAb B417M	mAb 11n185	抗原位点
[0464]	SDA 或 mAb ^b																	
	SVT02L	96	97	94	9	6	12	2	16	8	19	21	26	3	-16	-11	19	A
	mAb 14F5	81	78	54	28	6	16	12	22	-16	9	42	0	-28	20	35	14	A
	mAb 6F55	72	85	78	10	4	41	16	30	29	-24	39	17	10	12	33	27	A
	SVT03L	10	-8	35	97	12	10	10	10	-12	17	23	18	10	-4	0	-26	B
	SVT15L	6	7	-2	-5	96	96	1	15	6	4	2	5	2	10	5	0	C
	SVT15L-3FW4M	10	2	-4	-8	96	95	7	6	6	6	-5	3	4	3	-9	-1	C
	SVT06L	11	11	4	-3	14	12	96	97	67	53	7	-3	3	11	4	5	D
	SVT08L	7	3	1	0	6	12	95	96	66	50	5	8	6	8	0	4	D
	mAb 6E7	12	8	1	4	4	7	18	35	75	64	-3	-2	1	7	0	6	D
	mAb 6F57	4	3	-1	-3	-1	10	45	49	88	85	-4	0	7	11	1	-3	D
	SVT13L	7	5	1	1	-19	8	1	13	2	0	95	91	92	91	4	2	E
	SVT22L	4	0	-2	5	2	11	6	1	8	10	95	92	94	93	-2	3	E
	SVT16L	13	6	-3	-1	12	17	-8	2	6	2	96	95	96	95	-1	-2	E
	SVT34L	2	4	-3	0	3	14	-2	-4	10	13	93	93	94	95	-2	2	E
	mAb B417M	-220	-23	-44	7	66	-33	11	-56	66	65	6	-56	66	-43	79	-146	-
	mAb 11n185	-43	-24	-17	19	18	3	5	-4	19	16	1	-14	38	-11	15	84	-

[0465] ^a大于或等于50的值以灰色背景色表示。

[0467] ^b生物素化的SDA或mAb在行中,未标记的SDA或mAb在列中。

[0468] 表13.最适合多聚体SDA构建的SVT克隆和参考mAb的概述。

生物素化 SDA 或 mAb	CDR3 组	TeNT-GT1b 抑制作用(以 ng/ml 为单位的 IC ₅₀) ^a	rTTC 结合 ^b	在小鼠生物测定中,中和 TeNT ^c	蛋白质印迹中的结合 ^d	抗原位点	结合直接涂布的 TeNT ^e	酵母菌株 W303-1a SDA 生产水平(mg/L) ^f
SVT02L	E	>1,000	否	未知	-	A	否	1.74
mAb 14F5	-	>10,000	否	是	ND	A	减少	-
mAb 6F55	-	>10,000	否	是	ND	A	减少	-
SVT03L	F	>1,000	否	未知	-	B	减少	0.44
SVT15L	C	72	是	未知	-	C	良好	0.40
[0469] SVT15L-3FW4M	C	39	是	未知	-	C	良好	1.87
SVT06L ^g	B	317	是	未知	Hc	D	良好	4.42
SVT08L ^g	B	411	是	未知	Hc	D	良好	2.05
mAb 6E7	-	1,410	是	是	ND	D	良好	-
mAb 6F57	-	1,590	是	是	ND	D	良好	-
SVT13L	D	82	是	未知	-	E	良好	2.55
SVT22L	D	105	是	未知	-	E	良好	0.62
SVT16L	A	47	是	未知	-	E	良好	2.09
SVT34L	A	46	是	未知	-	E	良好	0.44
mAb B417M	-	>10,000	否	是	ND	-	良好	-
mAb 11n185	-	>10,000	否	未知	Lc ^e	-	良好	-

[0470] ^a来自表10。

[0471] ^b来自表10.高于0.2的吸光度值被认为是阳性结合(是)。

[0472] ^c根据制造商。

[0473] ^dHc,重链;Lc,轻链;破折号表示在蛋白质印迹中没有检测到结合;ND,不确定。

[0474] ^e降低表示与直接涂布的TeNT相比,在cAb-TT2捕获的TeNT上的最大A450值更高(表10)。

[0475] ^f来自表5,500ml野生型SDA培养物。

[0476] ^g在IMGT位置50之后插入异常的VEDG序列。

[0477] 表14.使用MIRY型转化子在酵母中生产多聚体SDA。

质粒	多聚体 SDA	IEP ^a	SPSP 琼脂糖	
			馏份中的流出物(M NaCl)	SDA 生产水平 ^b (mg/L)
pRL482	SVT02-GS2-SVG06M4-H6	9.1	0.4-0.6	11
pRL484	SVT15-3FW4M-GS2-SVG6M4-H6	6.9	0.4-0.6	2.6
pRL489	SVT06-GS2-SVA12M2-H6	5.8	0.4-0.6	11
[0478] pRL490	SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6	6.4	0.4-0.6	10
pRL493	SVT02-GS2-SVA12M2-H6	9.1	0.4-0.6	0.97
pRL494	SVT15-3FW4M-GS2-SVA12M2-H6	6.8	0.4-0.6	34
pRL495	SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6	8.6	0.4-0.6	99
pRL496	SVT02-GS2-SVG13M4-H6	8.8	0.4-0.6	17
pRL497	SVT06-GS2-SVG13M4-H6	5.5	0.6-0.8	0.93
pRL498	SVT15-3FW4M-GS2-SVG13M4-H6	6.3	0.6-0.8	41
pRL499	SVT16-L123Q-GS2-SVG13M4-H6	7.8	0.4-0.6	97
pRL501	SVT06-SVT16-L123Q-GS2-SVG13M4-H6	6.0	0.4-0.6	0.2

[0479] ^a使用web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool根据成熟的多聚体SDA序列进行预测。

[0480] ^b通过从0.5L培养物中纯化的SDA的产量计算出酵母菌株SU50的生产水平。

[0481] 表15.通过ELISA对多聚体酵母生产的SDA进行功能分析:吸光度值。

抗原 被捕获 检测抗体或生物素化抗原 PO-缀合物	质粒	SDA	lgG/Alb	TeNT		TeNT		TeNT	TeNT
			b ^a	TeNT	cAb-TT	TeN			
			TeNT	TeNT	2 Alb	lgG/Alb	T	TeNT	
			StrepP	StrepP	StrepP	b ^a	HisP	GALP	
			O	O	O	hisPO	O	O	O
			最大吸光度值(对于 GT1b-TeNT 抑制最小)						
[0482]	pSVA12L	SVA12L	0.26	0.24	0.22	1.47	0.13	0.14	0.89
	pRL489	SVT06-GS2-SVA12M2-H6	1.56	0.66	1.47	1.67	1.59	1.21	0.18
	pRL490	SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12	1.55	1.62	1.45	1.51	1.72	1.41	0.13
	pRL493	SVT02-GS2-SVA12M2-H6	1.29	0.18	1.10	1.91	0.10	0.09	0.66
	pRL494	SVT15-3FW4M-GS2-SVA12M2-H6	1.34	0.64	1.34	1.55	1.35	1.36	0.15
	pRL495	SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6	1.28	0.78	1.37	1.78	1.67	1.39	0.15
	pRL482	SVT02-GS2-SVG06M4-H6	1.00	0.14	ND ^b	0.06	0.06	0.10	0.82
	pRL484	SVT15-3FW4M-GS2-SVG06M4-H6	1.30	0.29	ND	0.07	0.37	1.23	0.12
	pRL496	SVT02-GS2-SVG13M4-H6	1.32	0.19	ND	0.18	0.06	0.09	0.77
	pRL497	SVT06-GS2-SVG13M4-H6	1.61	0.98	ND	1.18	1.44	1.20	0.22
	pRL498	SVT15-3FW4M-GS2-SVG13M4-H6	1.47	0.78	ND	1.00	1.51	1.16	0.13
	pRL499	SVT16-L123Q-GS2-SVG13M4-H6	1.50	1.12	ND	0.69	1.45	1.22	0.13
	pRL501	SVT06-SVT16-L123Q-GS2-SVG13M4-H	1.69	1.73	ND	0.78	1.62	1.37	0.13
	PSVG06L	SVG06L	0.11	0.14	ND	0.56	0.05	0.07	0.80
	pSVG13L	SVG13L	0.11	0.17	ND	0.16	0.08	0.09	0.72
	pSVT02L	SVT02L	0.10	0.16	ND	0.06	0.06	0.08	0.77
	pSVT06L	SVT06L	0.12	0.35	ND	0.05	1.44	0.32	0.27
	pSVT15L-3FW	SVT15L-3FW4M	0.14	0.20	ND	0.05	0.19	0.35	0.19
	pSVT16L	SVT16L	0.19	0.18	ND	0.06	1.56	0.44	0.18
	没有 SDA	0.09	0.15	ND	0.06	0.06	0.08	0.88	

[0483] ^a含有SVA12的SDA孔用犬A1b涂布,对于所有其他SDA孔用犬IgG涂布,则使用生物素化的马A1b

[0484] ^bND,不确定

[0485] ^c动物L9237的美洲驼血清(49dpi),按1:1000稀释(参见实施例1)

[0486] 表16.通过ELISA对多聚体酵母生产的SDA进行功能分析:SDA的有效浓度。

	抗原 被捕获 检测抗体或生物素化抗原 PO-缀合物 EC 值的 A450	lgG/Alb	TeNT	TeNT cAb-TT Alb ^b	lgG/Alb	TeN	TeNT	TeNT GT1b L9237	
		StrepP	StrepP	StrepP	HisPO	HisP	GALP	GALP	
		0.3	0.3	0.7	0.2	0.15	0.15	0.56	
质粒	SDA	有效 SDA 浓度(ng/ml)							
[0487]	pSVA12L	SVA12L	>1000 ^c	>1000	>1000	50	>100	>1000	>1000
	pRL489	SVT06-GS2-SVA12M2-H6	0.8	19	1.5	39	3.5	1.1	55
	pRL490	SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12	1.5	5.4	1.8	71	3.8	1.1	49
	pRL493	SVT02-GS2-SVA12M2-H6	14	>1000	11	13	>100	>1000	>1000
	pRL494	SVT15-3FW4M-GS2-SVA12M2-H6	11	33	3.9	76	8	2	78
	pRL495	SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6	4.3	15	2.5	34	2.9	1	45
	pRL482	SVT02-GS2-SVG06M4-H6	26.5	>1000	ND ^e	>1000	>100	>1000	>1000
	pRL484	SVT15-3FW4M-GS2-SVG06M4-H6	8.3	>1000	ND	>1000	37	4.3	131
	pRL496	SVT02-GS2-SVG13M4-H6	9.1	>1000	ND	>1000	>100	>1000	>1000
	pRL497	SVT06-GS2-SVG13M4-H6	<0.49	9.6	ND	46	3.4	2	93
	pRL498	SVT15-3FW4M-GS2-SVG13M4-H6	2.2	23	ND	63	4.9	2	77
	pRL499	SVT16-L123Q-GS2-SVG13M4-H6	2.6	13	ND	127	8	3	73
	pRL501	SVT06-SVT16-L123Q-GS2-SVG13M4-H	1.2	5.3	ND	134	11	4	35
pSVG06L	SVG06L	>1000	>1000	ND	164	>100	>1000	>1000	
[0488]	PSVG13L	SVG13L	>1000	>1000	ND	>1000	>100	>1000	>1000
	pSVT02L	SVT02L	>1000	>1000	ND	>1000	>100	>1000	>1000
	pSVT06L	SVT06L	>1000	64	ND	>1000	4.9	14	33
	pSVT15L-3FW	SVT15L-3FW4M	>1000	>1000	ND	>1000	26	6	31
	pSVT16L	SVT16L	>1000	>1000	ND	>1000	1.4	5	21
		没有 SDA	>1000	>1000	ND	>1000	>100	>1000	>1000

[0489] ^a包含SVA12的SDA孔用犬A1b涂布,而所有其他SDA孔用犬IgG涂布

[0490] ^b使用生物素化的马A1b

[0491] ^c>1000,在使用的最高SDA浓度下,未达到用于计算EC值的吸光度

[0492] ^d 1:1000稀释的动物L9237 (49dpi) 的美洲驼血清 (请参见实施例1)

[0493] ^e ND,不确定

[0494] 表17a通过对TeNT和马白蛋白的生物层干涉法进行多聚体SDA的功能分析 (已加载TeNT)

已加载的配体	第一样品分析物(SDA)	第一测试信号 ^d (nm)	第二样品分析物	第二测试信号(nm)	二价 TeN-TeNT 或双特异性 TeNT-Ah 结合
bio-T ^b	SVA12L	0.01	TeNT	0.02	否
bio-T	SVG13L	0.02	TeNT	0.03	否
bio-T	SVT16L	0.11	TeNT	0.01	否
bio-T	SVT16-GS2-SVA12M2-H6	0.19	TeNT	0.02	否
bio-T	SVT16-L123Q-GS2-SVG13M4-H6	0.18	TeNT	0.03	否
[0495] bio-T	SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6	0.32	TeNT	0.15	是
bio-T	M8ggsVI4q6e	0.02	TeNT	0.03	否
bio-T	PBST ^a	0.01	TeNT	0.03	否
bio-T	SVA12L	0.02	Ah	0.01	否
bio-T	SVG13L	0.02	Ah	0.01	否
bio-T	SVT16L	0.11	Ah	0.01	否
bio-T	SVT16-GS2-SVA12M2-H6	0.19	Ah	0.17	是
bio-T	SVT16-L123Q-GS2-SVG13M4-H6	0.18	Ah	0.00	否
bio-T	SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6	0.33	Ah	0.26	是
bio-T	M8ggsVI4q6e ^c	0.02	Ah	0.01	否
bio-T	PBST	0.01	Ah	0.01	否

[0496] ^a缓冲液,阴性对照。

[0497] ^b加载TeNT后的平均信号为2.05nm

[0498] ^c SDA阴性对照,双特异性SDA[44]

[0499] ^d由于分析物的结合而导致的干扰波长模式的位移 (nm)

[0500] 表17b通过对TeNT的生物层干涉法进行多聚体SDA的功能分析 (已加载马白蛋白)

已加载的配体	第 1 样品分析物(SDA)	第一测试信号 ^d (nm)	第二样品分析物	第二测试信号(nm)	双特异性结合 Ah-TeNT
bio-Ah ^b	SVA12L	0.08	TeNT	0.01	否
bio-Ah	SVG13L	0.01	TeNT	0.02	否
[0501] bio-Ah	SVT16L	0.02	TeNT	0.01	否
bio-Ah	SVT16-GS2-SVA12M2-H6	0.17	TeNT	0.47	是
bio-Ah	SVT16-L123Q-GS2-SVG13M4-H6	0.02	TeNT	0.02	否
bio-Ah	SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6	0.21	TeNT	0.53	是
bio-Ah	M8ggsVI4q6e ^c	0.01	TeNT	0.02	否
[0502] bio-Ah	PBST	0.00	TeNT	0.02	否

[0503] ^a缓冲液,背景对照。

[0504] ^b加载马白蛋白后的平均信号为0.78nm

[0505] ^c SDA阴性对照,双特异性SDA[44]

[0506] ^d由于分析物的结合而导致的干扰波长模式的位移 (nm)

[0507] 表18猪中多聚体SDA的血清终末半衰期

	质粒	SDA	SDA 剂量 (mg/kg)	曲线拟合区域 (小时)	$T^{1/2}\beta^c$ (小时)
[0508]	pRL489	SVT06-GS2-SVA12M2-H6	0.2	96-504	135 ± 19
	pRL490	SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6	0.3	96-504	122 ± 13
	pRL495	SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6	0.5	96-504	111 ± 13
	pRL499	SVT16-L123Q-GS2-SVG13M4-H6	0.5	24-96	21 ^b ±3.8
	pRL276	M8ggsVI-4q6e ^a	0.5	96-504	82 ± 4.5

[0509] ^a参见参考文献[19]

[0510] ^b根据假设水平已降低到96h样品的检测水平进行估计。

[0511] ^c平均值和标准偏差(包括体重增加)。

[0512] 表19. 接种的SDA、储备溶液的浓度以及在试验(研究1)结束时受保护的小鼠的比例(以百分比计)。

		测试结束时受保护的小鼠(n = 4)的比例 (%)						
SDA /参考		1 ^a	2	4	8	16	32	64
[0513]	SVT02-GS2-SVG13M4-H6	0	0	0	0	0	0	0
	SVT03L	0	0	0	0	0	0	ND ^c
	SVT06-GS2-SVG13M4-H6	100	75	0	0	0	0	0
	SVT15-3FW4M-GS2-SVG13M4-H6	100	100	0	0	25	0	0
	SVT16-L123Q-GS2-SVG13M4-H6	0	0	0	0	0	0	0
	SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6	100	100	100	100	100	100	ND
	参考抗毒素(TE3 ^b)	100	100	0	0	0	0	ND

[0514] ^a稀释系数,所有SDA在稀释1下的起始浓度为1000nM,除SDA3为100nM以外。

[0515] ^b人破伤风免疫球蛋白;它具有固定量的破伤风毒素中和能力(国际单位),此处使用101U/ml的原液,将其预先稀释1/400至0.0251U/ml。

[0516] ^c ND=不确定

[0517] 表20. SDA终点和以IU/mg为单位的效力的汇总

SDA		终点稀释系数	可提供全面保护的 SDA 浓度(nM)	效力 ^c IU/mg
[0518]	SVT02-GS2-SVG13M4-H6	<1	>1000 ^d	--
	SVT03L	<1	>1000	--
	SVT06-GS2-SVG13M4-H6	2.4 ^a	1000 ^c	1.04
	SVT15-3FW4M-GS2-SVG13M4-H6	2.8 ^b	500	1.21
	SVT16-L123Q-GS2-SVG13M4-H6	<1	>1000	--
	SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6	>32	3.1	> 93.1

[0519] ^a用于计算的Spearman-Kaerber方法(稀释1时100%,稀释2时75%,稀释3时0%)

[0520] ^b几何平均值为2(稀释数为2)和4(稀释数为3)

[0521] ^c母料原液的破伤风抗毒素效力(国际单位/毫克)

[0522] ^d在1000nM水平下无保护

[0523] ^e在测试浓度下提供全面保护

[0524] 表21. 在TNT(研究2)中以不同混合物(或单独)评估的SDA方案

[0525]	组
--------	---

SDA	1	2	3	4	5	6	7 ^b
SVT02-GS2-SVG13M4-H6		31.25		31.25			
SVT03L		31.25		31.25			
SVT06-GS2-SVG13M4-H6	62.5 ^a	31.25	62.5	31.25			
SVT15-3FW4M-GS2-SVG13M4-H6			62.5	31.25	62.5	62.5	
SVT16-L123Q-GS2-SVG13M4-H6	62.5	31.25			62.5		
SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6						6.25	6.25
每组总 nM	125	125	125	125	125	68.75	6.25

[0527] ^a起始点处混合物中每个SDA的量 (nM)

[0528] ^b仅包含单个SDA的组

[0529] 表22a. 在混合物评估测试 (研究2) 结束时受保护的小鼠比例 (以百分比计)。

组	总 nM ^a	1 ^b	2	4	8	16	32
1	125	100 ^c	100	100	100	100	100
2	125	100	100	100	100	100	100
3	125	100	100	100	100	100	100
4	125	100	100	100	100	100	100
5	125	0	0	0	0	0	0
6	68.75	100	100	100	100	100	100
7	6.25	100	100	100	100	100	100
参考 TE3 ^d		100	100	0	0	0	0

[0531] ^a稀释1

[0532] ^b经过稀释测试, 遵循两倍稀释步骤

[0533] ^c每种稀释液的小鼠总数为4

[0534] ^d预先稀释至0.025 IU/ml

[0535] 表22b. 混合SDA的终点的汇总

组	第一次稀释中的 SDA 总量(nM)	可提供全面保护的 SDA 浓度(nM)	在此浓度下的保护
1	125	≤ 3.91	是
2	125	≤ 3.91	是
3	125	≤ 3.91	是
4	125	≤ 3.91	是
5	125	> 125	否
6	68.75	≤ 2.15	是

[0537] 表23. 单个样品的终点和以IU/ml为单位的效力的汇总

组	SDA	稀释系数	终点稀释数	终点稀释系数	总稀释系数	效力 ^a IU/mg
7	SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6	23,240	> 6	> 32	743,680	> 1478

[0539] ^a破伤风抗毒素效力 (国际单位/毫克)

[0540] 表24. 在测试 (研究3) 结束时受保护的小鼠 (n=4) 的比例 (以百分比计)。

组	总 nM ^a	1 ^b	4	16	64	256	1024
SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6	1	0.2	50 ^c	0	0	0	0
SVT06-GS2-SVG13M4-H6 + SVT16-L123Q-GS2-SVG13M4-H6	2	0.4	0	0	0	0	0
SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6 + SVT15-3FW4M-GS2-SVG13M4-H6	3	0.4	100	0	0	0	0
参考 TE-3 预稀释至 0.025 IU/ml		100	75	0	0	0	0

[0542] ^a稀释1

[0543] ^b以所示起始浓度进行第一次稀释, 然后进行四倍稀释步骤

[0544] ^c每种稀释液的小鼠总数为4

[0545] 表25. 单个样品的终点和以IU/ml为单位的效力的汇总

[0546]	组	SDA	稀释系数	终点稀释数	终点稀释系数	总稀释系数	效力 ^a IU/mg
	1	SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6	726,222	1	1	726,222	1509.7

[0547] ^a根据TE-3参考的4倍稀释步骤研究3结果来计算的破伤风抗毒素效力(国际单位/毫克)。

[0548] 表26. 混合SDA的终点汇总

[0549]	组	第一次稀释的总 SDA(nM)	提供全面保护的最低浓度 (nM)	在此浓度下的保护
	2	0.4	> 0.4	否
	3	0.4	0.4-0.1	是

[0550] 表27几种纯化的单体和多聚体SDA的TeNT结合亲和力/亲合力测定

[0551]	SDA	K _d (M)	k _a (1/Ms)	k _{dis} (1/s)	R平方
	SVT02-GS2-SVG13M4-H6	9.87E-11	1.23E+06	1.21E-04	0.992
	SVT03L	<1.0E-12 ^a	5.65E+06	<1.0E-07	0.914
	SVT06-GS2-SVG13M4-H6	1.23E-10	6.7E+05	8.24E-05	0.998
	SVT06-GS2-SVA12M2-H6	1.51E-10	5.91E+05	8.90E-05	0.992
	SVT15-3FW4M-GS2-SVG13M4-H6	1.58E-11	4.29E+05	6.77E-06	0.998
	SVT06L	5.35E-10	1.17E+05	6.27E-05	0.999
	SVT15L	4.13E-10	9.36E+04	3.87E-05	0.998
	SVT16L	3.39E-10	9.16E+05	3.11E-04	0.996
	SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6	2.24E-10	8.86E+05	1.99E-04	0.998
	SVT16-L123Q-GS2-SVG13M4-H6	2.27E-10	6.65E+05	1.84E-04	0.999
	SVT06-GS3-SVT02-GS2-SVG06M4-H6 ^b	1.30E-10	3.29E+05	4.27E-05	0.998
	SVT06-GS3-SVT15-3FW4M-GS2-SVG06M4-H6 ^b	<1.0E-12 ^a	6.91E+04	<1.0E-07	0.997
	SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6 ^b	1.33E-11	9.89E+05	1.32E-05	0.998

[0552] ^aK_d未计算, 因为SDA没有在研究的时程之内与破伤风毒素解离。对于k_{dis}值, 两个SDA均选择值1.0E-07, SVT03L的K_d值估计为1.77E-14, 而SVT06-GS3-SVT15-3FW4M-GS2-SVG06M4-H6的值为1.45E-12。

[0553] ^b对于TeNT为二价的, 有利于进行亲合力测量

[0554] 表28纯化的SDA对A1b(马、猪、犬和猫)的亲和力数据

[0555]

SDA	白蛋白种类	K_D (M)	k_a (1/Ms)	k_{dis} (1/s)	R 平方
SVA12L	猪	1.59E-07	1.50E+05	2.38E-02	0.990
SVA06L	猪				
SVA16L	猪				
SVA12L	马	1.07E-08	1.01E+05	1.09E-03	0.999
SVA06L	马	1.35E-08	7.26E+05	9.77E-03	0.971
SVA16L	马	1.06E-08	2.29E+05	2.42E-03	0.999
SVA12L	犬	2.71E-07	4.59E+04	1.25E-02	0.990
SVA06L	犬	3.16E-09	7.11E+05	2.24E-03	0.998
SVA16L	犬	1.11E-08	4.35E+05	4.83E-03	0.997
SVA12L	猫	1.90E-08	3.88E+04	7.37E-04	0.999
SVA06L	猫	1.20E-09	7.29E+05	8.78E-04	0.996
SVA16L	猫	1.95E-09	1.47E+05	2.87E-04	0.976

[0556] 表29几种纯化的单体和多聚体SDA的TeNT结合亲和力/亲合力测定。

[0557]

SDA(配体)	配体加载 浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	分析物 (TeNT)浓度 (nM)	K_D (M)	k_a (1/Ms)	k_{dis} (1/s)	R 平方
SVT06L	0.6	0.94-15	2.24E-10	5.03E+05	1.13E-04	1
SVT15L	0.3	2.5-20	7.72E-10	1.11E+05	8.57E-05	0.998
SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6 ^a	0.3	2.5-20	1.10E-11	3.98E+05	4.39E-06	0.999
cAb-TT1	0.6	25-400	4.31E-08	4.91E+04	2.12E-03	0.951
cAb-TT2	0.3	0.75-12	6.01 E-09	8.41E+05	5.05E-03	0.998

[0559] ^a对于TeNT为二价的,有利于进行亲合力测量

[0560] 表30 3个多聚体SDA的TeNT结合亲和力/亲合力测定

[0561]

SDA(分析物)	配体(TeNT)加载 浓度($\mu\text{g/ml}$)	分析物(SDA) 浓度(nM)	K_D (M)	k_a (1/Ms)	k_{dis} (1/s)	R 平方
SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6 ^b	4	0.63-10	<1.0E-12	5.38E+05	<3.18E-07	0.999
SVT06-GS3-SVT15-3FW4M-GS2-SVA12M2-H6 ^b	4	0.63-10	<1.0E-12 ^a	9.40E+05	<3.2E-07	0.999
SVT15-3FW4M-GS3-SVT06-GS2-SVG13M5-H6 ^b	4	0.63-10	<1.0E-12 ^a	4.84E+05	<1.99E-07	0.999

[0562] ^a K_D 未计算,因为SDA没有在研究的时程之内与破伤风毒素解离。如果对于SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6、SVT06-GS3-SVT15-3FW4M-GS2-SVA12M2-H6和SVT15-3FW4M-GS3-SVT06-GS2-SVG13M5,对于 k_{dis} 值,分别选择值3.18E-07、3.2E-07和1.99E-07,则 K_D 值分别为5.91E-13、3.4E-13和4.1E-13。

[0563] ^b对于TeNT为二价的,有利于进行亲合力测量

[0564] 表31a多聚体SDA对马或人血清白蛋白的结合亲和力

SDA(分析物)	白蛋白种类	配体 (Alb)加载浓度 (μg/ml)	分析物 (SDA)浓度 (nM)	K _D (M)	k _a (1/Ms)	k _{dis} (1/s)	R 平方
SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6	马	2.5	0.63-10	6.46E-10	2.16E+05	1.39E-04	1
SVT06-GS3-SVT15-3FW4M-GS2-SVA12M2-H6	马	2.5	0.63-10	1.34E-09	1.1E+05	1.51E-04	1
SVT15-3FW4M-GS3-SVT06-GS2-SVG13M5-H6 ^a	马	2.5	100	没有信号			
SVA12L	人	5	100	没有信号			
SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6	人	5	100	没有信号			
SVT06-GS3-SVT15-3FW4M-GS2-SVA12M2-H6	人	5	100	没有信号			
SVT15-3FW4M-GS3-SVT06-GS2-SVG13M5-H6 ^a	人	5	100	没有信号			

[0566] ^aSVG13M5结合到例如马,或人IgG Fab片段

[0567] 表31b多聚体SDA与血清犬血清白蛋白的结合亲和力

SDA(配体)	白蛋白种类	配体 (SDA)加载浓度 (μg/ml)	分析物 (Alb)浓度 (nM)	K _D (M)	k _a (1/Ms)	k _{dis} (1/s)	R 平方
SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6	犬	1.25	16-500	2.68E-07	2.3E+04	6.20E-03	0.998
SVT06-GS3-SVT15-3FW4M-GS2-SVA12M2-H6	犬	1.25	16-500	3.75E-07	1.6E+04	6.16E-03	0.998
SVT15-3FW4M-GS3-SVT06-GS2-SVG13M5-H6 ^a	犬	1.25	16-500	没有信号			

[0569] ^aSVG13M5结合到例如犬IgG的Fab片段

[0570] 表32用Creoptix™WAVE系统评估时,多聚体SDA的TeNT结合亲和力/亲合力

SDA(分析物)	捕获的配体 (TeNT)(pg/mm ²)	分析物流量 (微升/分钟)	分析物 (SDA)浓度 (nM)	K _D (M)	k _a (1/Ms)	k _{dis} (1/s)	R-最大 (pg/mm ²)
SVT03L	252.7	54	1.2-100	1.4 E-12	4.62E+06	6.64E-06	14.5
SVT15-3FW4M-GS2-SVG13M4-H6	216.6	60	1.2-100	20.9 E-12	3.90E05	8.15E-06	30.4
SVT06-SVT16-L123Q-GS2-SVG13M5-H6 ^{a,b}	181.1	60	1.2-100	15.9 E-12	4.17E+05	6.61 E-06	37.5
SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6 ^a	239.6	54	1.2-100	8.86 E-12	1.14E+06	1.01E-05	44.7
SVT15-3FW4M-GS3-SVT06-GS2-SVG13M5-H6 ^a	176.5	60	1.2-100	22.9 E-12	1.19E+06	2.73E-05	27.6

[0572] ^a对于TeNT为二价的,有利于进行亲合力测量

[0573] ^b二价,两个SVT SDA融合在一起,中间没有连接子

[0574] 表33 SVT06-GS3-SVT16-L123Q-GS2-SVA12M2-H6 (pRL490) 在马中的终末血清半衰期 (肌肉剂量0.17mg/kg)

测得浓度(毫克/升)											曲线拟合区域 T _{1/2} ^a (小时)
动物编号	时间(小时)时间(天)	0	24	48	96	168	240	312	408	504	
2		<0.09	1.014	1.164	0.997	0.807	0.806	0.733	0.661	0.605	2-21 510±107
5		<0.10	0.519	0.736	0.664	0.483	0.549	0.488	0.486	0.395	
6		<0.09	1.08	1.32	1.21	1.04	1.01	0.795	0.708	0.593	

[0576] ^a平均值和标准偏差。

[0577] 表34.使用MIRY型转化子在酵母中的多聚体SDA的产生。

[0578]	质粒	多聚体 SDA	IEP ^a	SPSP 琼脂糖馏份 SDA 生产 中的流出物(M 水平 ^b NaCl) (mg/L)	
	pRL505	SVT06-GS3-SVT15-3FW4M-GS2-SVA12M2-H6	5.94	0.4-0.6	3.2
	pRL506	SVT15-3FW4M-GS3-SVT06-GS2-SVG13M5-H6	5.80	0.4-0.6	4.8

[0579] ^a使用web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool根据成熟的多聚体SDA序列进行预测。

[0580] ^b从0.5L培养物中纯化的SDA的产量计算出酵母菌株SU50的生产水平。

[0581] 表35几种SDA对马和犬IgG的亲合力

[0582]	SDA	IgG(Fc)种类	K _D (M)	k _a (1/Ms)	k _{dis} (1/s)	完整 R ²
	SVG03L ^a	马 Fc	4.30 E-10	1.14 E+06	4.91 E-04	0.987
	SVG23L ^a	马 Fc	没有亲合力			
	SVG24L ^a	马 Fc	3.45 E-09	1.02 E+05	3.53 E-04	0.996
	SVG03L	犬 Fc	没有亲合力			
	SVG23L	犬 Fc	2.15 E-10	2.43E+06	5.21 E-04	0.991
	SVG24L	犬 Fc	2.22 E-09	1.55E+05	3.44E-04	0.992

[0583] ^a结合Fc片段的SDA

[0584] 参考文献

[0585] [1]Hamers-Casterman C et al.Nature.1993;363:446-8.

[0586] [2]Harmsen MM et al.Vet Microbiol.2007;120:193-206.

[0587] [3]Harmsen MM et al.J Immunoassay Immunochem.2012;33:234-51.

[0588] [4]Rossetto O et al.Tetanus neurotoxin.Toxicon.2013;66:59-63.

[0589] [5]Herreros J et al.Biochem J.2000;347Pt 1:199-204.

[0590] [6]Fitzsimmons SP et al.Vaccine.2000;19:114-21.

[0591] [7]Yousefi M et al.Human vaccines&immunotherapeutics.2014;10:344-51.

[0592] [8]Scott N et al.Mollmmunol.2010;47:1931-41.

[0593] [9]Sagt CM et al.Appl Environ Microbiol.2000;66:4940-4.

[0594] [10]Liu L.J Pharm Sci.2015;104:1866-84.

[0595] [11]Gorlani A et al.Protein Eng Des Sel.2012;25:39-46.

[0596] [12]Liu JL et al.Microbial cell factories.2015;14:158.

[0597] [13]Goldman ER et al.Protein Expr Purif.2014;95:226-32.

[0598] [14]Van de Laar T et al.Biotechnol Bioeng.2007;96:483-94.

[0599] [15]Batra SK et al.Curr Opin Biotechnol.2002;13:603-8.

[0600] [16]Iznaga-Escobar N et al.Methods Find Exp Clin Pharmacol.2004;26:123-7.

[0601] [17]Kontermann RE.Curr Opin Biotechnol.2011;22:868-76.

[0602] [18]Klooster R et al.J Immunol Methods.2007;324:1-12.

[0603] [19]Harmsen MM et al.Vaccine.2005;23:4926-34.

[0604] [20]Coppieters K et al.Arthritis Rheum.2006;54:1856-66.

- [0605] [21]Holliger P et al.Nat Biotechnol.1997;15:632-6.
- [0606] [22]Holt LJ et al.Protein Eng Des Sel.2008;21:283-8.
- [0607] [23]Hutt M et al.J Biol Chem.2012;287:4462-9.
- [0608] [24]Rossotti MA et al.mAbs.2015;7:820-8.
- [0609] [25]Walker A et al.Protein Eng Des Sel.2010;23:271-8.
- [0610] [26]Terryn S et al.PLoS ONE.2014;9:e109367.
- [0611] [27]Huston JS et al.Proc Natl Acad Sci.1988;85:5879-83.
- [0612] [28]Mukherjee J et al.PLoS ONE.2012;7:e29941.
- [0613] [29]Sepulveda J et al.Infect Immun.2010;78:756-63.
- [0614] [30]Vance DJ et al.J Biol Chem.2013;288:36538-47.
- [0615] [31]Klein JS et al.Protein Eng Des Sel.2014;27:325-30.
- [0616] [32]Trinh R et al.Mol Immunol.2004;40:717-22.
- [0617] [33]Beirnaert E.Improved nanobodiesTM against tumor necrosis factor- α .2006.
- [0618] [34]W02011064382
- [0619] [35]Conrath KE et al.J Biol Chem.2001;276:7346-50.
- [0620] [36]Hopp J et al.Protein Eng Des Sel.2010;23:827-34.
- [0621] [37]Jacobs SA et al.Protein Eng Des Sel.2015;28:385-93.
- [0622] [38]Fridy PC et al.Nat Methods.2014;11:1253-60.
- [0623] [39]Chaudhury C et al.J Exp Med.2003;197:315-22.
- [0624] [40]Nagel J et al.J Immunol.1973;110:1388-95.
- [0625] [41]Mizuguchi J et al.Naturwissenschaften.1982;69:597-8.
- [0626] [42]Volk WA et al.Infect Immun.1984;45:604-9.
- [0627] [43]Harmsen MM et al.Appl Microbiol Biotechnol.2009;84:1087-94.
- [0628] [44]Harmsen MM et al.Vet Microbiol.2008;132:56-64.
- [0629] [45]Frenken LGJ et al.J Biotechnol.2000;78:11-21.
- [0630] [46]Arbabi-Ghahroudi M et al.FEBS Lett.1997;414:521-6.
- [0631] [47]Xing DK et al.Biologicals.1996;24:57-65.
- [0632] [48]Coomes L et al.Biologicals.2012;40:466-72.
- [0633] [49]McCafferty J,Johnson KS.In:Phage display of peptides and proteins.1996.p.79-111.
- [0634] [50]Lou J et al.J Immunol Methods.2001;253:233-42.
- [0635] [51]Lefranc MP,Methods Mol Biol.2004;248:27-49.
- [0636] [52]Harmsen MM et al.Mol Immunol.2000;37:579-90.
- [0637] [53]Butler JE.Methods.2000;22:4-23.
- [0638] [54]Arbabi-Ghahroudi M et al.Protein engineering,design&selection: PEDS.2009;22:59-66.
- [0639] [55]de Wildt RM et al.J Mol Biol.1999;294:701-10.
- [0640] [56]Desmyter A et al.J Biol Chem.2001;276:26285-90.

- [0641] [57]Deschacht N et al.J Immunol.2010;184:5696-704.
- [0642] [58]Van der Vaart JM in Methods Mol Biol.Totowa,NJ:Humana Press; 2002.p.359-66.
- [0643] [59]Harmsen MM et al Appl Microbiol Biotechnol.1996;46:365-70.
- [0644] [60]Harmsen MM et al.Appl Microbiol Biotechnol.2002;60:449-54.
- [0645] [61]Harmsen MM et al.Appl Microbiol Biotechnol.2007;77;13-22.
- [0646] [62]Sheppard AJ et al.Infect Immun.1984;43:710-4.
- [0647] [63]Emsley P et al.J Biol Chem.2000;275:8889-94.
- [0648] [64]Fotinou C et al.J Biol Chem 2001;276:32274-81.
- [0649] [65]Chen C,Baldwin MR,Barbieri JT.Biochemistry.2008;47:7179-86.
- [0650] [66]Chen C,Fu Z,Kim JJ,Barbieri JT,Baldwin MR.J Biol Chem.2009;284: 26569-77.
- [0651] [67]Wang H,Yu R,Fang T,Yu T,Chi X,ZhangX,et al.Toxins.2016;8.
- [0652] [68]Kenimer JG et al,Infect Immun.1983;42:942-8.
- [0653] [69]Harmsen MM et al.Vet Microbiol.2005;111:89-98.
- [0654] [70]Giuseppin ML et al.Appl Environ Microbiol.1993;59:52-9.
- [0655] [71]Becker DM,Guarente L.Methods Enzymol.1991;194:182-7.
- [0656] [72]Harmsen MM et al.Vaccine.2011;29:2682-90.
- [0657] [73]Van Oers JW,Tilders FJ.Endocrinology.1991;128:496-503.
- [0658] [74]Verheesen&Laeremans.Methods Mol Biol 2012;911:81-104.
- [0659] [75]Gorlani A et al.Methods Mol Bid.2012;911:277-86
- [0660] [76]Kozma,F.et al.Biosensors and Bioelectronics 2014,58:287-307.

图1

图2

图3

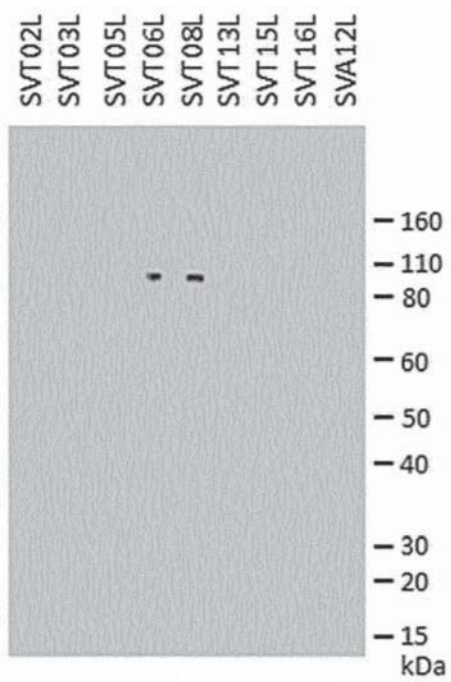


图4

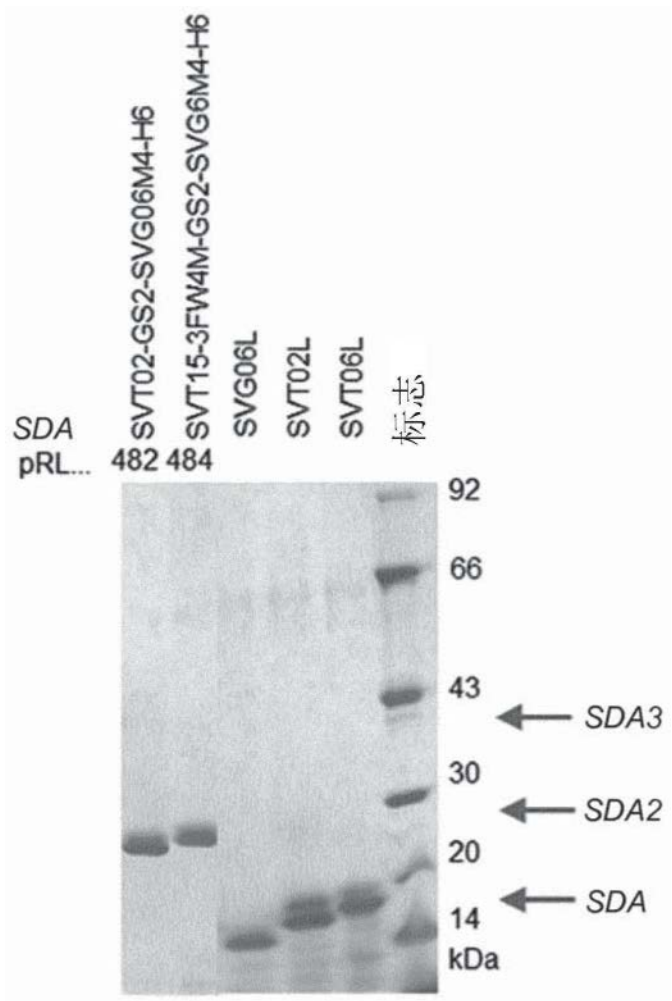


图5A

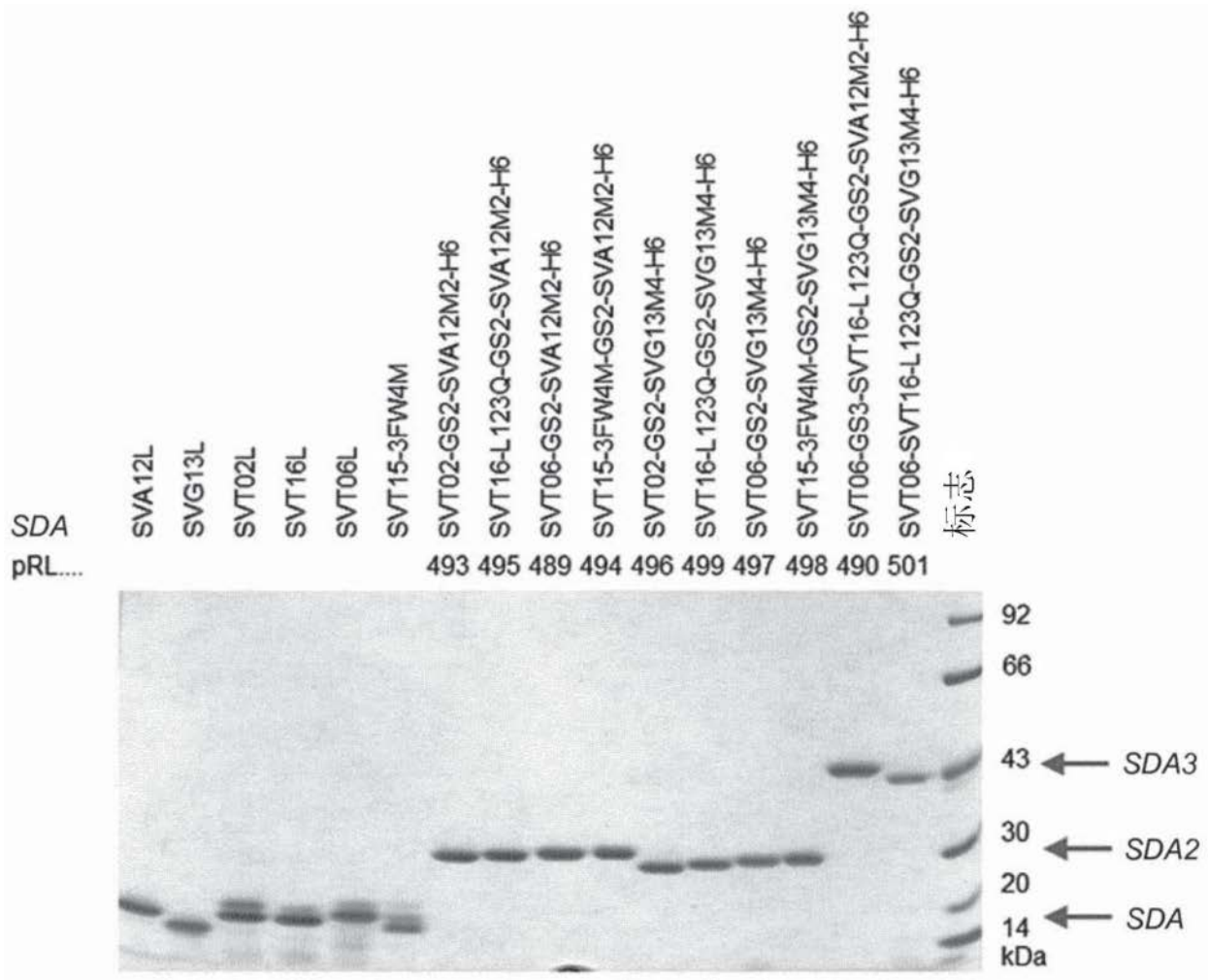


图5B

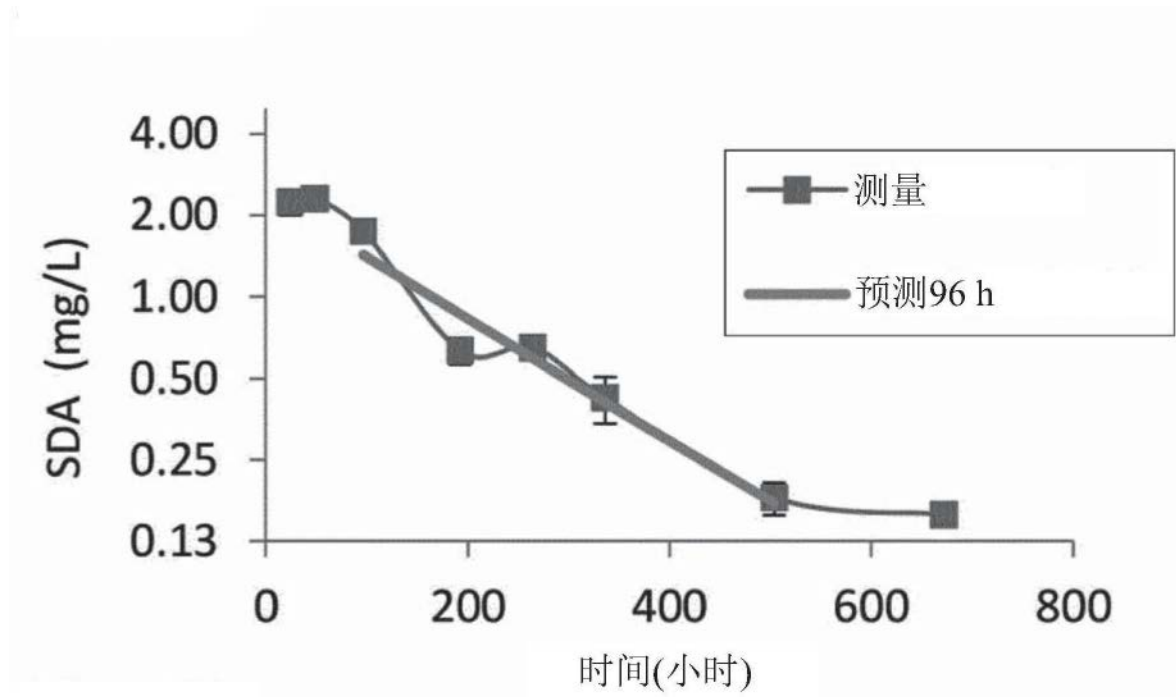


图6A

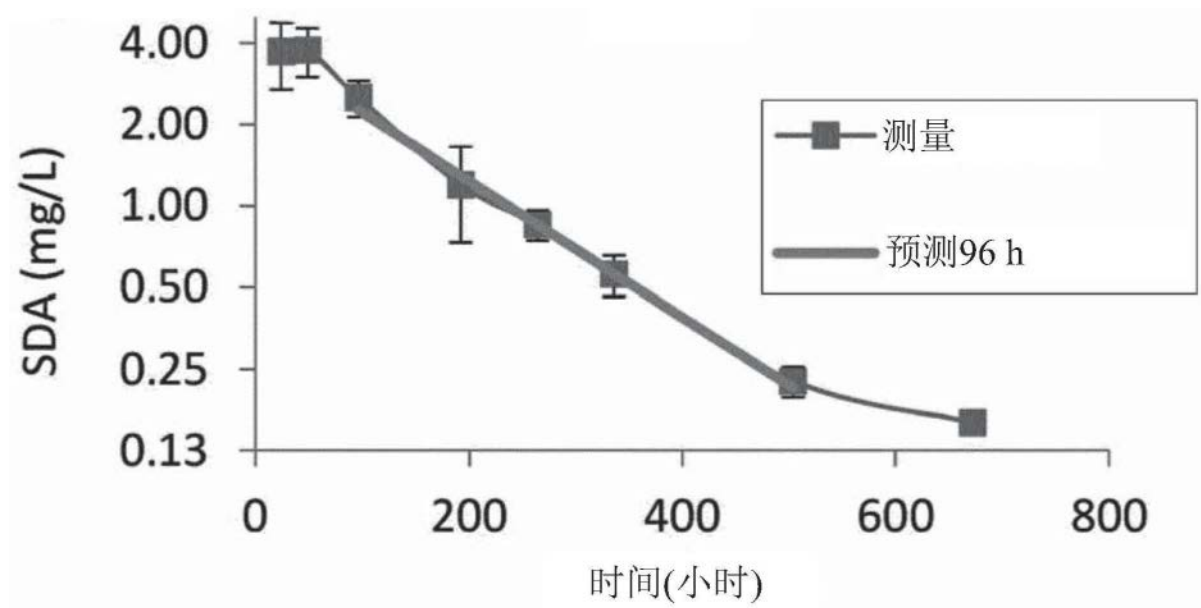


图6B

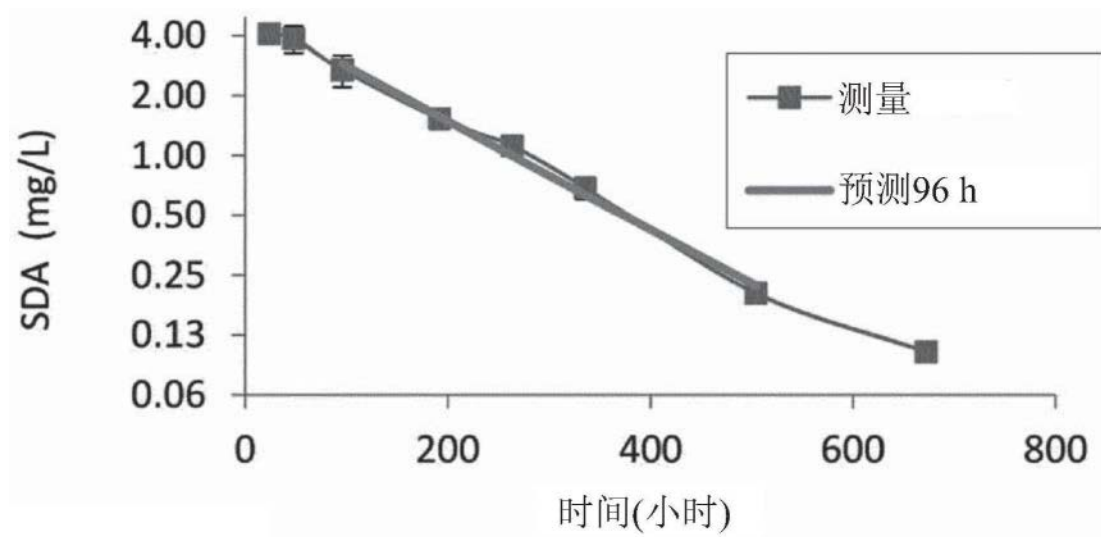


图6C

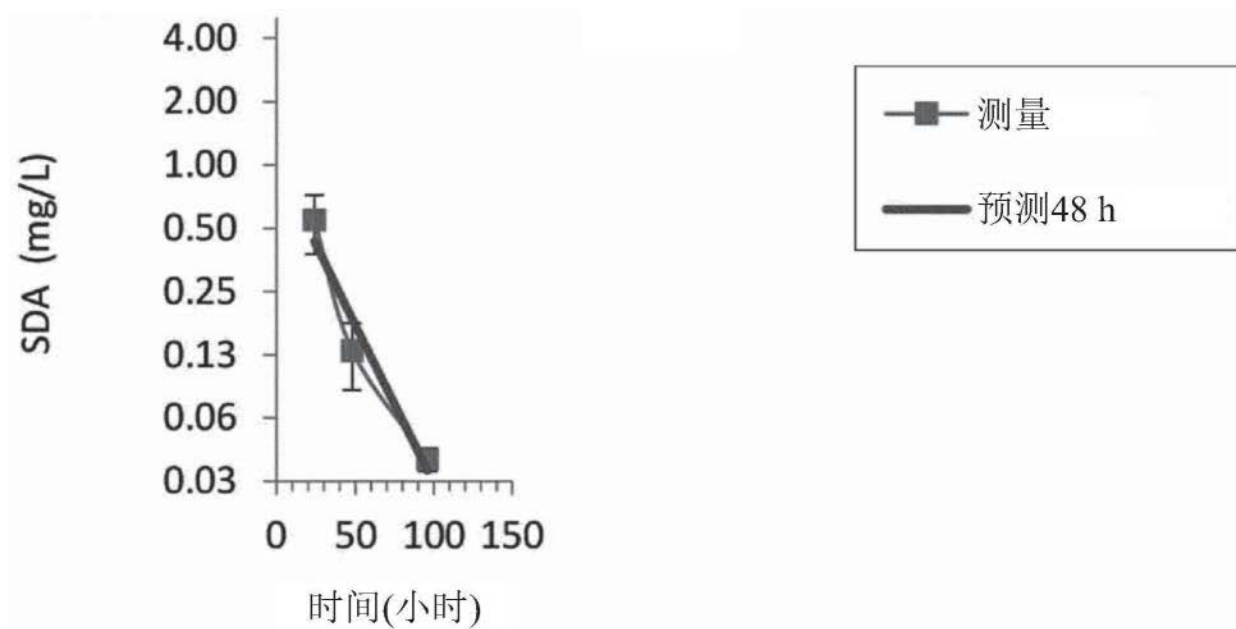


图6D