

# (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局

(43) 国际公布日  
2021年1月28日 (28.01.2021)



(10) 国际公布号  
**WO 2021/013065 A1**

- (51) 国际专利分类号:  
C07K 16/22 (2006.01) A61P 27/02 (2006.01)  
A61K 39/395 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2020/102560
- (22) 国际申请日: 2020年7月17日 (17.07.2020)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:  
201910657311.8 2019年7月19日 (19.07.2019) CN
- (71) 申请人: 神州细胞工程有限公司(SINOCELLTECH LTD) [CN/CN]; 中国北京市经济技术开发区科创七街31号, Beijing 100176 (CN)。
- (72) 发明人: 谢良志(XIE, Liangzhi); 中国北京市经济技术开发区科创七街31号, Beijing 100176 (CN)。孙春昀(SUN, Chunyun); 中国北京市经济技术开发区科创七街31号, Beijing 100176 (CN)。赵俊(ZHAO, Jun); 中国北京市经济技术开发区科创七街31号, Beijing 100176 (CN)。孔德生(KONG, Desheng); 中国北京市经济技术开发区科创七街31号, Beijing 100176 (CN)。
- (74) 代理人: 北京市金杜律师事务所(KING & WOOD MALLESONS); 中国北京市朝阳区东三环中路1号环球金融中心办公楼东楼20层, Beijing 100020 (CN)。
- (81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,

(54) Title: HUMANIZED ANTI-VEGF FAB ANTIBODY FRAGMENT AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 人源化抗VEGF Fab抗体片段及其用途

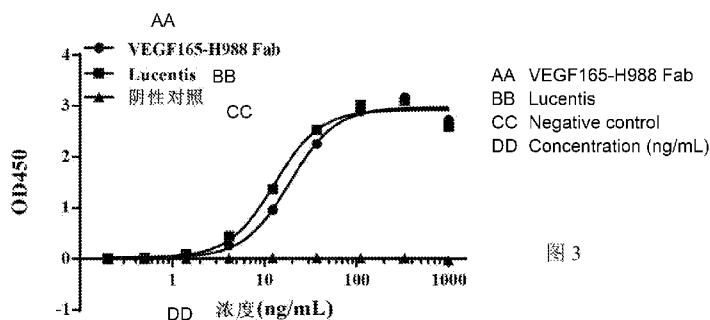


图3

(57) Abstract: The present invention relates to the field of tumor immunotherapy, and relates to a humanized anti-VEGF Fab antibody fragment. Disclosed in the present invention are a nucleic acid sequence encoding the antibody fragment (comprising heavy/light chain variable regions), a vector containing the nucleic acid sequence, a pharmaceutical composition, and a kit. The anti-VEGF Fab antibody fragment disclosed in the present invention can be specifically bound to VEGF with high affinity, can block VEGF from binding to a receptor VEGFR2, and can also neutralize the proliferation effect of VEGF on HUVEC cells. Compared with the full-length structure, the antibody of the Fab fragment has stronger penetrability, and lower toxic and side effects such as gastrointestinal perforation, hypertension, and hemorrhage and cannot excite the complement cascade reaction, thereby reducing the risk of initiating intraocular inflammation and autoimmune inflammatory response. The antibody can be used to clinically treat various ocular diseases characterized by choroidal neovascularization, comprising but not limited to age-related macular degeneration (AMD), diabetic macular edema (DME), retinal edema, degenerative myopia, and choroidal neovascularization (CNV).

RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

**本国际公布:**

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

---

**(57) 摘要:** 本发明属于肿瘤免疫治疗领域, 涉及人源化抗VEGF Fab抗体片段。本发明公开编码所述抗体片段的核酸序列(包括重/轻链可变区)、含有所述核酸序列的载体、药物组合物和试剂盒。本发明公开的抗VEGF Fab抗体片段可以以高亲和力特异性结合VEGF, 阻断VEGF与受体VEGFR2结合, 还能中和VEGF对HUVEC细胞的增殖作用。相比于全长结构, Fab片段的抗体具有更强的穿透性, 和更低的胃肠道穿孔、高血压和出血等毒副作用且不能激发补体级联反应, 从而降低引发眼内炎和自身免疫炎症反应的风险, 可用于临床治疗多种以脉络膜新生血管为特征的眼病, 包括但不限于年龄相关性老年黄斑变性(AMD)、糖尿病性黄斑水肿(DME)、视网膜水肿、退行性近视、脉络膜新生血管(CNV)。

## 人源化抗 VEGF Fab 抗体片段及其用途

### 技术领域

5 本发明属于肿瘤免疫治疗领域，具体地涉及人源化抗 VEGF Fab 抗体片段。

### 背景技术

血管系统的发育是许多生理和病理过程的基础。血管内皮生长因子 (Vascular endothelial growth factor, VEGF) 是一组具有重要促血管生成活性的生长因子，具有促进内皮细胞有丝分裂和抗细胞凋亡，增加血管通透性，促进细胞迁移等作用。人 *VEGF* 基因定位在 6p21.3 染色体上，属于 *VEGF/PDGF* 超基因家族，编码的 VEGF 由二硫键连接组成二聚体。在人体，VEGF 家族包括多个具有不同功能的成员：VEGFA (VEGF，具有多种不同的剪切形式)、VEGFB、VEGFC、VEGFD、VEGFE、VEGFF 和胎盘生长因子 (Placenta growth factor, PIGF)。最近，将内分泌源性内皮生长因子 (Endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor, EG-VEGF) 也纳入该家族中 (Samson M et al., J Clin Endocrinol Metab. 2004; 89(8):4078-4088)。VEGF 广泛分布于人体组织器官，其中眼部的视网膜色素上皮细胞、血管内皮细胞、神经细胞等均可表达 (Goel H L et al., Nat Rev Cancer. 2013; 13(12): 871)。VEGF 受体有三种类型：VEGFR1、VEGFR2 和 VEGFR3。VEGF 与受体胞外结构域结合触发受体二聚化，促进胞内结构域中酪氨酸残基自磷酸化，从而激活下游促进细胞增殖、迁移、抗凋亡和提高血管通透性的信号。VEGFR1 和 VEGFR2 主要表达在血管内皮细胞，而 VEGFR3 主要表达在淋巴管内皮细胞。

25 目前已证实 VEGF 在调节正常和病理性血管生成的过程中起着重要的作用 (Melincovici C S et al., Rom J Morphol Embryol. 2018; 59(2): 455-467)。VEGF 在多种可引起恶性腹水的肿瘤种过表达，并且肿瘤内 VEGF 的表达量同肿瘤细胞的迁移能力具有相关性。胃肠癌、卵巢癌、乳腺癌和肺癌等实体瘤病人体内 VEGF 的浓度和疾病分期呈正相关，并具有较低的存活率 (Sebastian, K et al., Oncologist. 2009; 14(12): 1242-1251)。眼后段疾病中多种病变例如年龄相关性老年黄斑变性 (AMD)、糖尿病性黄斑水肿 (DME)、视网膜水肿、退行性近视、脉络膜新生血管 (CNV) 等的发展也同 VEGF 表达水平密切相关 (Patel J R et al., Curr opin ophthalmol. 2016; 27(5): 387-392; Tan G S et al., Lancet Diabetes Endo. 2017; 5(2): 143-155; Mitchell P

et al., Lancet. 2018; 392(10153): 1147-1159)。

VEGF 的单克隆抗体药物通过抑制 VEGF 与内皮细胞表面受体 VEGFR2 和 VEGFR1 的相互作用，阻断下游信号通路转导，抑制内皮细胞扩增和新生血管生成。FDA 批准用于治疗眼科疾病的靶向 VEGF 的抗体药物有 Lucentis (雷珠单抗, 2006 年批准), EYLEA (阿柏西普, 2004 年批准), 在中国上市的还有 Conbercept (康柏西普)。Lucentis 是一种人源性 VEGFA 抗体 Fab 片段, 能结合所有活性形式的 VEGFA 和抑制其与 VEGFR1 及 VEGFR2 的结合, 从而抑制血管内皮细胞的增殖迁移及降低血管的通透性, 抑制脉络膜新生血管的形成。相比于全长结构, Fab 片段的抗体更易于透过视网膜达视网膜下间隙, 到达靶组织与 VEGF 紧密结合, 从而抑制脉络膜新生血管的生成。通过血液循环渗透到全身系统中的 Fab 片段抗体仅 0.09 天或约 2 小时即被清除, 可最大程度降低对正常 VEGF 的生理功能的影响, 降低胃肠道穿孔、高血压和出血等毒副作用 (Ferrara, N et al., Retina. 2006; 26(8): 859-870; Van Wijngaarden et al., Clin Exp Optom. 2008; 91(5): 427-437)。研究表明 AMD 同补体效应引起的炎性反应具有一定关系, Fab 抗体片段不含 Fc 片段, 不能激发补体级联反应, 从而可降低引发眼内炎和自身免疫炎症反应的风险 (Ferrara, N et al., Retina. 2006; 26(8): 859-870)。Lucentis 已获批用于治疗湿性 AMD、CNV、DME 和视网膜水肿。贝伐珠单抗 (贝伐单抗) 是被 FDA 批准用于治疗转移性结肠癌、非小细胞肺癌等实体瘤的重组人单抗药, 目前作为批准范围外用用于治疗 AMD。阿柏西普和康柏西普为人源化重组融合蛋白, 包含 VEGFR 上与配体结合的特定结构域, 可与 VEGF 特异性高亲和力结合, 阻断 VEGF 与受体的结合。相比贝伐珠单抗和 Lucentis, 阿柏西普对 VEGF165 具有更高的亲和力, 在治疗 DME 上显现更优的疗效。阿柏西普已获批用于治疗湿性 AMD、分支视网膜静脉阻塞、视网膜中央静脉阻塞、CNV、DME 和糖尿病性视网膜病变。康柏西普在中国已获批用于治疗湿性 AMD。

由于该类药物为局部玻璃体内注射, 频繁给药极易引发眼球和眼周感染而带来损伤。因此需要在药物上进行优化, 提高药效, 降低给药频率, 给病人带来更大的治疗获益。

### 发明内容

本发明提供了新的人源化抗 VEGF Fab 抗体片段, 可用于治疗以脉络膜新生血管为特征的眼病, 包括但不限于年龄相关性老年黄斑变性 (AMD)、糖尿病性黄斑水肿 (DME)、视网膜水肿、退行性近视、脉络膜新生血管等的发生 (CNV)。

5 在一个方面，本发明提供了一种分离的抗 VEGF 抗体或其抗原结合片段，其包含具有 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列的重链 CDR1 域、具有 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列的重链 CDR2 域和具有 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列的重链 CDR3 域的重链可变区，和具有 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列的轻链 CDR1 域、具有 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列的轻链 CDR2 域和具有 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列的轻链 CDR3 域的轻链可变区。

10 在一些实施方式中，所述抗 VEGF 抗体或其抗原结合片段包含具有 SEQ ID NO: 22 所示的氨基酸序列或与 SEQ ID NO: 22 至少 90%、92%、95%、98% 或 99% 序列同一性的氨基酸序列的重链可变区，和具有 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列或与 SEQ ID NO: 23 具有至少 90%、92%、95%、98% 或 99% 序列同一性的氨基酸序列的轻链可变区。

15 在一些实施方式中，所述抗 VEGF 抗体或其抗原结合片段进一步包含重链恒定区和轻链恒定区，优选地所述重链恒定区为氨基酸序列为 SEQ ID NO: 38 的 IgG1 重链恒定区的氨基酸序列或与 SEQ ID NO: 38 具有至少 90%、92%、95%、98% 或 99% 序列同一性的氨基酸序列，和/或所述轻链恒定区为氨基酸序列为 SEQ ID NO: 39 的轻链恒定区的氨基酸序列或与 SEQ ID NO: 39 具有至少 90%、92%、95%、98% 或 99% 序列同一性的氨基酸序列。

20 在一些实施方式中，所述抗 VEGF 抗体或其抗原结合片段为人源化抗体或嵌合抗体。

25 在另一个方面，本发明提供了一种分离的抗 VEGF 抗体或其抗原结合片段，其包含具有 SEQ ID NO: 27 所示的氨基酸序列的重链 CDR1 域、具有 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列的重链 CDR2 域和具有 SEQ ID NO: 29 所示的氨基酸序列的重链 CDR3 域的重链可变区，和具有 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列的轻链 CDR1 域、具有 SEQ ID NO: 25 所示的氨基酸序列的轻链 CDR2 域和具有 SEQ ID NO: 26 所示的氨基酸序列的轻链 CDR3 域的轻链可变区。

30 在一些实施方式中，所述抗 VEGF 抗体或其抗原结合片段包含具有 SEQ ID NO: 36 所示的氨基酸序列或与 SEQ ID NO: 36 至少 90%、92%、95%、98% 或 99% 序列同一性的氨基酸序列的重链可变区，和具有 SEQ ID NO: 37 所示的氨基酸序列或与 SEQ ID NO: 37 具有至少 90%、92%、95%、98% 或 99% 序列同一性的氨基酸序列的轻链可变区。

35 在一些实施方式中，所述抗 VEGF 抗体或其抗原结合片段为 Fab 片段，所述 Fab 片段进一步包含重链恒定区 CH1 和轻链恒定区，优选地所述重链

恒定区 CH1 为氨基酸序列为 SEQ ID NO: 40 的 IgG1 重链恒定区的氨基酸序列或与 SEQ ID NO: 40 具有至少 90%、92%、95%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列，和/或所述轻链恒定区为氨基酸序列为 SEQ ID NO: 39 的轻链恒定区的氨基酸序列或与 SEQ ID NO: 39 具有至少 90%、92%、95%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列。

在一些实施方式中，所述抗 VEGF 抗体或其抗原结合片段进一步包含重链信号肽和轻链信号肽，优选地所述重链信号肽为氨基酸序列为 SEQ ID NO: 34 的氨基酸序列或与 SEQ ID NO: 34 具有至少 90%、92%、95%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列，和/或所述轻链信号肽为氨基酸序列为 SEQ ID NO: 35 的氨基酸序列或与 SEQ ID NO: 35 具有至少 90%、92%、95%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列。

在一些实施方式中，所述抗 VEGF 抗体或其抗原结合片段是 Fab 抗体片段。

在一些实施方式中，所述抗 VEGF 抗体或其抗原结合片段为 IgG 抗体，优选为 IgG1 抗体。

在一些实施方式中，所述抗 VEGF Fab 抗体片段为 IgG 抗体相关 Fab 抗体片段，优选为 IgG1 抗体相关 Fab 抗体片段。

在一些实施方式中，所述抗 VEGF 抗体或其抗原结合片段为单克隆抗体。

在一些实施方式中，所述抗 VEGF Fab 抗体片段为单克隆的。

在一些实施方式中，所述抗 VEGF 抗体或其抗原结合片段与重组人 VEGF165 蛋白的结合亲和力  $K_D$  为 0.01-8E-10M，优选 0.1-5E-10M，更优选 0.5-3E-10M，最优选 1.54E-10M。

在一些实施方式中，所述抗原结合片段为 Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')<sub>2</sub>、Fd 片段、Fd'片段、单链抗体分子或单域抗体；其中所述单链抗体分子优选为 scFv、di-scFv、tri-scFv、双体抗体或 scFab。

在又一个方面，本发明提供了一种抗体-药物缀合物，其包含本发明的抗 VEGF 抗体或其抗原结合片段和另外的治疗剂，优选地所述抗 VEGF 抗体或其抗原结合片段和所述另外的治疗剂通过接头连接。

在又一个方面，本发明提供了一种核酸，其编码本发明的抗 VEGF 抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方式中，所述核酸包含 SEQ ID NO: 4 所示的核苷酸序列和/或 SEQ ID NO: 5 所示的核苷酸序列；或者其包含 SEQ ID NO: 20 所示的核苷酸序列和/或 SEQ ID NO: 21 所示的核苷酸序列；或者其包含 SEQ ID NO: 45 所示的核苷酸序列和/或 SEQ ID NO: 46 所示的核苷酸序列。优选地，所

述核酸进一步包含 SEQ ID NO: 49 所示的核苷酸序列和/或 SEQ ID NO: 48 所示的核苷酸序列。更优选地，所述核酸包含 SEQ ID NO: 41 所示的核苷酸序列和/或 SEQ ID NO: 42 所示的核苷酸序列。

在又一个方面，本发明提供了一种表达载体，其包含本发明的核酸。

5 在又一个方面，本发明提供了一种宿主细胞，其包含本发明的核酸或本发明的表达载体。

在又一个方面，本发明提供了一种用于产生本发明的抗 VEGF 抗体或其抗原结合片段的方法，其包括在适合于抗体表达的条件下培养如本发明的宿主细胞，和从培养基中回收表达的抗体。

10 在又一个方面，本发明提供了一种用于产生本发明的抗 VEGF 抗体或其抗原结合片段的方法，其包括在适合于 Fab 抗体片段表达的条件下培养如本发明的宿主细胞，和从培养基中回收表达的 Fab 抗体片段。

在又一个方面，本发明提供了一种药物组合物，其包含本发明的抗 VEGF 抗体或其抗原结合片段，或本发明的抗体-药物缀合物，或本发明的核酸，或本发明的表达载体，及药学上可接受的载体。

15 在又一个方面，本发明提供本发明的抗 VEGF 抗体或其抗原结合片段或本发明的抗体-药物缀合物或本发明的药物组合物，其用于治疗与血管生成相关的病症。

在一些实施方式中，所述与血管生成相关的病症是眼病。

20 在一些实施方式中，所述眼病是以脉络膜新生血管为特征的眼病，包括年龄相关性老年黄斑变性（AMD）、糖尿病性黄斑水肿（DME）、视网膜水肿、退行性近视、脉络膜新生血管（CNV）。

在又一个方面，本发明提供了一种用于治疗与血管生成相关的病症的方法，其包括向需要的受试者施用治疗有效量的本发明的抗 VEGF 抗体或其抗原结合片段或本发明的抗体-药物缀合物或本发明的药物组合物，从而治疗所述与血管生成相关的病症。

在一些实施方式中，所述与血管生成相关的病症是眼病。

30 在一些实施方式中，所述眼病是以脉络膜新生血管为特征的眼病，包括年龄相关性老年黄斑变性（AMD）、糖尿病性黄斑水肿（DME）、视网膜水肿、退行性近视、脉络膜新生血管（CNV）。

在又一个方面，本发明提供了本发明的抗 VEGF 抗体或其抗原结合片段或本发明的抗体-药物缀合物或本发明所述的药物组合物在制备用于治疗与血管生成相关的病症的药物中的用途。

在一些实施方式中，所述与血管生成相关的病症是眼病。

35 在一些实施方式中，所述眼病是以脉络膜新生血管为特征的眼病，包

括年龄相关性老年黄斑变性（AMD）、糖尿病性黄斑水肿（DME）、视网膜水肿、退行性近视、脉络膜新生血管（CNV）。

在又一个方面，本发明提供了一种药物组合，其包含本发明的抗 VEGF 抗体或其抗原结合片段或本发明的抗体-药物缀合物或本发明的药物组合物与一种或多种另外的治疗剂。

在又一个方面，本发明提供了一种试剂盒，其包含本发明的抗 VEGF 抗体或其抗原结合片段或本发明的抗体-药物缀合物或本发明的药物组合物，优选地，还进一步包含给药装置。

## 附图说明

本发明结合附图进行说明，附图中：

图 1 显示 VEGF165 兔源抗体 VEGF-R988 封闭 VEGF165 与 VEGFR2 蛋白结合。

图 2 显示 VEGF165 兔源抗体 VEGF-R988 中和 VEGF165 对 HUVEC 细胞的增殖。

图 3 显示 ELISA 检测人源化抗体 VEGF-H988 Fab 与 VEGF165 结合。

图 4 显示 ELISA 检测 VEGF-H988 Fab 与 mVEGF164 的种属交叉结合。

图 5 显示 ELISA 检测 VEGF-H988 Fab 阻断 VEGF165 与 VEGFR2 蛋白结合。

图 6 显示 VEGF-H988 Fab 对比 Lucentis 中和不同浓度 VEGF165 的作用。

图 7 显示 VEGF-H988 Fab 对比 EYLEA 中和不同浓度 VEGF165 的作用。

图 8 显示 VEGF-H988 Fab 对比 Avastin 中和不同浓度 VEGF165 的作用。

图 9 显示 VEGF-H988 Fab 对比 Conbercept 中和不同浓度 VEGF165 的作用。

图 10 显示 VEGF-H988 Fab 对比 Brolucizumab 中和不同浓度 VEGF165 的作用。

## 具体实施方式

本发明的各个方面涉及分离的抗 VEGF Fab 抗体片段、包含该抗体片段或其抗原结合片段的抗体-药物缀合物、编码该 Fab 抗体片段的核酸和表达载体、包含该核酸或表达载体的宿主细胞、产生该抗 VEGF Fab 抗体片段的方法、包含该抗 VEGF Fab 抗体片段的药物组合物以及使用该抗 VEGF Fab 抗体片段治疗与血管生成相关的病症的方法。

35

## 定义

除非另有说明，本文使用的所有技术和科学术语具有本发明所属的技术领域的普通技术人员通常理解的含义。为了本发明的目的，定义以下术语，以同本技术领域通常理解的含义保持一致。

5 当用于本文和所附权利要求书中时，单数形式“一”、“一种”、“另一”和“所述”包括复数指代对象，除非上下文明确地另有指示。

术语“抗体”意指免疫球蛋白分子，是指表现所需生物学活性的抗体的任何形式。包括但不限于单克隆抗体（包括全长单克隆抗体）、多克隆抗体和多特异性抗体（例如双特异性抗体），甚至包括抗体片段。典型地，全长  
10 抗体结构优选包含 4 条多肽链，通常通过二硫键相互连接的 2 条重（H）链和 2 条轻（L）链。每条重链包含重链可变区和重链恒定区。每条轻链包含轻链可变区和轻链恒定区。在此典型全长抗体结构外，其结构还包括其他衍生形式。

所述重链可变区和轻链可变区可进一步细分为更保守的区域（称为框架区（FR））和穿插其中的高变区（称为互补决定区（CDR））。

术语“互补决定区”（CDR，例如 CDR1、CDR2 和 CDR3）是指抗体可变区的这样一些氨基酸残基，其存在对于抗原结合来说是必需的。每个可变区通常具有 3 个被鉴别为 CDR1、CDR2 和 CDR3 的 CDR 区域。每个互补决定区可包含来自如 Kabat 所定义的“互补决定区”的氨基酸残基（Kabat  
20 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. 1991)）和/或来自“高变环”的那些残基（Chothia 和 Lesk; J Mol Biol 196: 901-917 (1987)）。

术语“构架”或“FR”残基是如本文中定义的 CDR 残基之外的那些可变区残基。

25 每个重链可变区和轻链可变区通常包含 3 个 CDR 和最多达 4 个 FR，所述 CDR 和 FR 从氨基末端至羧基末端以例如以下顺序排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

给定抗体的互补性决定区(CDR)和框架区(FR)可以使用 Kabat 体系标识 (Kabat 等: Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版, 美国卫生和公众服务部, PHS, NIH, NIH 出版编号 91-3242, 1991)。  
30

术语“恒定区”是指抗体的轻链和重链上的这样一些氨基酸序列，不直接参与抗体与抗原的结合，但展现出多种效应子功能，例如抗体依赖性细胞毒性。

根据其恒定区的氨基酸序列的抗原性差异，抗体的重链可以被分为  $\alpha$ 、  
35  $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$  和  $\mu$  五类，当其与轻链组成完整的抗体，可被分为五类：IgA、IgD、

IgE、IgG 和 IgM，这些类中的若干还可进一步分为亚类（同种型），例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA 和 IgA2。基于其恒定结构域的氨基酸序列，抗体的轻链可归入  $\kappa$  和  $\lambda$ 。

“抗体的抗原结合片段”包含完整抗体分子的一部分，其保留母体抗体的至少某些结合特异性，通常包括至少部分母体抗体的抗原结合区或可变区（例如一个或多个 CDR）。抗原结合片段的实例包括但不限于 Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')<sub>2</sub>、Fd 片段、Fd' 片段、单链抗体分子（例如 scFv、di-scFv 或 tri-scFv、双体抗体或 scFab）、单域抗体。Fab 片段通常包含重链可变区（V<sub>H</sub>）和重链恒定区 1（C<sub>H1</sub>）和轻链可变区（V<sub>L</sub>）和轻链恒定区（C<sub>L</sub>）。

术语“抗体片段”是指保留母体抗体的至少某些生物学特性的非完整抗体分子，其实例除上述“抗原结合片段”所述及的那些之外，还包括但不限于 Fc 片段。

术语“抗体-药物缀合物”或“ADC”是指与一种或多种化学药物（在本文中也称为药剂）化学连接的结合蛋白如抗体或其抗原结合片段），其可以任选地是治疗剂或细胞毒性剂。在优选的实施方案中，ADC 包括抗体、细胞毒性或治疗药物，以及能够使药物与抗体连接或缀合的接头。ADC 通常具有与抗体缀合的 1 至 8 个中任一值的药物，包括 2、4、6 或 8 的载药物质。可以包含在 ADC 中的药物的非限制性实例是有丝分裂抑制剂、抗肿瘤抗生素、免疫调节剂、用于基因治疗载体、烷化剂、抗血管生成剂、抗代谢药、含硼药剂、化疗保护剂、激素、抗激素剂、皮质类固醇、光活性治疗剂、寡核苷酸、放射性核素剂、拓扑异构酶抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂和放射致敏剂。

术语“嵌合抗体”是指重链和/或轻链的一部分来源于特定来源或物种，而其余部分来源于不同来源或物种的抗体。“嵌合抗体”亦可以为如上定义的功能性的片段。“人源化抗体”是“嵌合抗体”的子集。

术语“人源化抗体”或“人源化抗原结合片段”在本文中被定义为这样的抗体或抗体片段：（i）来源于非人来源（例如，携带异源免疫系统的转基因小鼠）且基于人种系序列；或（ii）可变区是非人来源而恒定区是人来源的嵌合抗体；或者（iii）CDR 移植的，其中可变区的 CDR 来自非人来源，而可变区的一个或多个构架区为人来源的，并且恒定区（如果有的话）是人来源的。“人源化”的目的是消除非人来源抗体在人体内的免疫原性，而同时最大可能地保留亲和力。选择与非人来源抗体构架序列最相似的人构架序列为模板进行人源化改造是有利的。在某些情况下，可能需要用非人构架中相应的残基替换人类构架序列中的一个或多个氨基酸，以避免亲和性的丧失。

“单克隆抗体”是指获自基本上同质的抗体群体的抗体，即，所述包含单一抗体的群体除了可能以极少量存在的可能突变（例如天然突变）之外是相同的。因此，所述术语“单克隆”表明所述抗体的性质，即不是不相关抗体的混合物。与通常包括针对不同决定簇（表位）的不同抗体的多克隆抗体制剂相反，单克隆抗体制剂的每个单克隆抗体均对抗原上的单独一个决定簇。除了其特异性之外，单克隆抗体制剂的优点在于它们通常不会被其他抗体污染。所述术语“单克隆”不应被理解为需要通过任何特定的方法产生所述抗体。

抗体“特异性结合”目的抗原例如肿瘤相关的多肽抗原靶（本文中，VEGF），即以足够的亲和力结合所述抗原以使得所述抗体可用作治疗性试剂，靶向表达所述抗原的细胞或组织，并且与其他蛋白质无显著交叉反应或者与除了上文提到的抗原靶的同源体和变体（例如突变形式、剪接变体，或蛋白水解作用截短的形式）以外的蛋白质无显著交叉反应。

术语“结合亲和力”是指分子的单个结合位点与其结合伴侣之间非共价相互作用总和的强度。除非另有说明，用于本文时“结合亲和力”是指固有的结合亲和力，其反映结合对（例如抗体和抗原）的成员之间 1:1 的相互作用。如本文所用，术语“ $K_D$ ”是指抗体-抗原相互作用的平衡解离常数。如本文所用，术语“ $k_{on}$ ”是指抗体与抗原结合的速率常数。如本文所用，术语“ $k_{off}$ ”是指抗体与抗体/抗原复合物解离的速率常数。“ $K_D$ ”、“结合速率常数  $k_{on}$ ”和“解离速率常数  $k_{off}$ ”通常用于描述分子（例如抗体）与其结合伴侣（例如抗原）之间的亲和力，即，配体结合特定蛋白的紧密程度。结合亲和力受非共价分子间相互作用的影响，例如氢键，静电相互作用，两个分子之间的疏水和范德华力。另外，配体与其靶分子之间的结合亲和力可能受到其他分子的存在的影响。亲和力可通过本领域中已知的常规方法来分析，包括本文描述的 ELISA。

术语“表位”包括能够特异性结合至抗体或 T 细胞受体的任何蛋白质决定簇。表位决定簇通常由分子的化学活性表面基团（例如氨基酸或糖侧链，或其组合）组成，并且通常具有特定三维结构特征以及特定的电荷特征。

术语“分离的”抗体是已经被鉴别并且从表达它的细胞的组分中分离的抗体。分离的抗体包括重组细胞内的原位抗体，所述抗体的天然环境中的至少一种组分是不存在的。然而，通常情况下，分离的抗体是通过至少一个纯化步骤进行制备。

两条多肽或核酸序列之间的“序列同一性”表示所述序列之间相同的残基的数目占残基总数的百分比，且基于比较的分子中较小者的大小来计算。在计算同一性百分数时，将正在比较的序列以产生序列之间最大匹配的方

式比对, 通过特定算法解决比对中的空位(如果存在的话)。确定两个序列之间同一性的优选计算机程序方法包括, 但不限于, GCG 程序包, 包括 GAP、BLASTP、BLASTN 和 FASTA(Altschul 等人, 1990, J.Mol.Biol.215: 403-410)。上述程序可以公开地从国际生物技术信息中心(NCBI)和其他来源得到。熟知  
5 的 Smith Waterman 算法也可用于确定同一性。

术语“Fc 受体”或“FcR”指与抗体 Fc 区结合的受体。优选天然序列的人 FcR, 且优选与 IgG 抗体结合的受体( $\gamma$  受体), 其包括 Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RII 和 Fc $\gamma$ RIII 亚型, 以及这些受体的变体。其它 FcR 均被包含在术语“FcR”中。该术语也包括新生儿受体 (FcRn) 其负责将母体的 IgG 转运至胎儿(Guyer 等, 免疫学杂志 117: 587(1976)和 Kim 等, 免疫学杂志 24: 249(1994))。  
10

术语“新生儿 Fc 受体”、简称“FcRn”, 其结合 IgG 抗体 Fc 区。新生儿 Fc 受体(FcRn)在体内 IgG 类抗体的代谢命运中起重要作用。FcRn 行使功能以从溶酶体降解途径营救 IgG, 从而降低其在血清中的清除率并加长半衰期。因此, IgG 体外 FcRn 结合性质/特征指示它在血液循环中的体内药代动力学性质。  
15

术语“效应子功能”指可归因于抗体的 Fc 区的那些生物学活性, 其随抗体同种型而不同。抗体效应子功能的实例包括: C1q 结合和依赖补体的细胞毒性 (CDC)、Fc 受体结合、依赖抗体的细胞毒性 (ADCC)、依赖抗体的吞噬作用 (ADCP)、细胞因子分泌、免疫复合物介导的抗原呈递细胞对抗原的摄取、细胞表面受体 (例如 B 细胞受体) 的下调和 B 细胞激活。  
20

术语“效应细胞”指表达一种或多种 FcR 并行行使效应子功能的白细胞。在一个方面, 所述效应细胞至少表达 Fc $\gamma$ RIII 并执行 ADCC 效应子功能。介导 ADCC 的人白细胞的实例包括外周血单核细胞(PBMC)、自然杀伤(NK)细胞、单核细胞、细胞毒性 T 细胞和嗜中性粒细胞。效应细胞可以从天然来源, 例如, 血液中分离。效应细胞通常是与效应子阶段相关联的淋巴细胞, 并发挥作用, 以产生细胞因子 (辅助 T 细胞)、杀死被病原体感染的细胞 (细胞毒性 T 细胞) 或分泌抗体 (分化的 B 细胞)。  
25

“免疫细胞”包括具有造血的起源并在免疫应答中起作用的细胞。免疫细胞包括: 淋巴细胞, 例如 B 细胞和 T 细胞; 天然杀伤细胞; 髓样细胞, 例如单核细胞、巨噬细胞、嗜曙红细胞、肥大细胞、嗜碱细胞和粒细胞。  
30

“抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”或“ADCC”是指一种细胞毒性形式, 其中结合到在某些细胞毒性细胞 (例如 NK 细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞) 上存在的 Fc $\gamma$  受体上的分泌 Ig 使得这些细胞毒性效应细胞能够特异性结合至承载抗原的靶细胞, 随后使用例如细胞毒素杀死所述靶细胞。为了  
35 评估目的抗体的 ADCC 活性, 可进行体外 ADCC 测定法, 例如记载于美国

专利 No. 5,500,362 或 5,821,337 或美国专利 No. 6,737,056 (Presta) 中的体外 ADCC 测定法。用于这类测定法的有效效应细胞包括 PBMC 和 NK 细胞。

“补体依赖性细胞毒性”或“CDC”是指在补体的存在下靶细胞的裂解。典型的补体途径的活化是通过将补体系统的第一组分 (C1q) 与结合至其相应抗原的 (适当亚类的) 抗体结合来起始。为了评估补体活化, 可进行 CDC 测定法, 例如记载于 Gazzano-Santoro 等, J. Immunol Methods 202: 163 (1996) 中的 CDC 测定法。例如在美国专利 No.6,194,551 B1 和 WO1999/51642 中描述了具有改变的 Fc 区氨基酸序列的多肽变体 (具有变体 Fc 区的多肽) 和具有增强或降低的 C1q 结合的多肽变体。

“人类脐静脉内皮细胞 (HUVEC)”分离自脐带静脉, 一般用于生理学和药理学研究, 例如例如大分子转运、血液凝固、血管发生和纤维蛋白溶解作用。特别是可以用作血管生成研究和其他依赖 VEGF 的信号通路研究 (相关内皮生长因子) 研究的模型。

#### *本发明的抗体的氨基酸序列*

本发明首先采用重组人 VEGF165 蛋白来免疫兔, 然后通过噬菌体展示文库筛选获得与重组人 VEGF165 蛋白特异性结合的抗体克隆 VEGF165-R988。之后采用 PCR 方法将编码 VEGF165-R988 scFv 抗体的重链和轻链可变区的核苷酸序列分别插入带兔重链 IgG1 恒定区或兔轻链 kappa 恒定区核苷酸序列的 pSTEP2 载体中, 并进行培养表达。采用蛋白 A 纯化柱进行纯化获得高纯度抗体。ELISA 测试表明, 兔源抗体 VEGF165-R988 可有效抑制 VEGF165 蛋白与 VEGFR2 蛋白结合, 且 VEGF165-R988 可有效中和 VEGF165 促进 HUVEC 细胞增殖的能力。

然后, 采用经典的人源化方式 CDR 移植方法, 选择与兔轻链或重链可变区较接近的人抗体轻链或重链可变区为模板, 将兔抗体轻链或重链的各 3 个 CDR (表 1) 插入到该人抗体的可变区中, 获得人源化的轻链可变区 (VL) 和重链可变区 (VH) 序列。由于兔源框架区有关键点对于支撑 CDR 的活性至关重要, 因此将关键位点回复突变为兔抗体对应的序列。通过全基因合成的方法获得 VEGF-H988-10 轻链/重链表达载体, 转染 HEK-293 细胞并进行培养表达, 培养上清采用蛋白 A 纯化柱进行纯化获得高纯度 VEGF-H988-10 抗体。为了改善 VEGF-H988-10 抗体的亲和力, 构建重链和轻链可变结构域 CDR 区 (包括 LCDR1、LCDR3、HCDR2 和 HCDR3) 的 SDM 库, 将 4 个突变库构建成 scFv 序列以基因 3 融合蛋白形式克隆至噬菌粒载体, 对于各 CDR 通过可溶性抗原 VEGF 的结合能力筛选较优克隆, 最终得到 CDR 亲和力和稳定性优化的 VEGF-H988 Fab 抗体片段并检测。

相比于全长结构，Fab 片段的抗体具有更强的穿透性，和更低的胃肠道穿孔、高血压和出血等毒副作用且不能激发补体级联反应，从而降低引发眼内炎和自身免疫炎症反应的风险。

### 5 本发明的核酸

本发明还涉及编码本发明的抗体或其部分的核酸分子。这些核酸分子的序列包括但不限于 SEQ ID NO: 2-3、4-7、16-17、20-21、41-49 和 52-53。

本发明的核酸分子不限于本文公开的序列，还包括其变体。本发明中变体可以参照它们在杂交中的物理特性来描述。本领域技术人员会认识到  
10 利用核酸杂交技术，核酸可用于鉴别其互补物以及其等同物或同系物。还会认识到杂交可以以低于 100% 互补性发生。然而，考虑到条件的适当选择，杂交技术可用于基于 DNA 序列与特定探针的结构相关性来区分所述 DNA 序列。对于这类条件的指导参见 Sambrook 等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring  
15 Harbor, N.Y., 1989 和 Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Sedman, J. G., Smith, J. A., & Struhl, K. eds.(1995). Current Protocols in Molecular Biology. New York:John Wiley and Sons。

### 重组载体和表达

20 本发明还提供了包含本发明的一个或多个核苷酸序列的重组构建体。通过将编码本发明的抗体的核酸分子插入载体例如质粒、噬粒、噬菌体或病毒载体中构建本发明的重组构建体。

本发明的抗体可通过在宿主细胞中重组表达编码轻链和重链或其部分的核苷酸序列来制备。为了以重组方法表达抗体，可用携带编码轻链和/或  
25 重链或其部分的核苷酸序列的一个或多个重组表达载体转染宿主细胞，以使得所述轻链和重链在所述宿主细胞中表达。标准重组 DNA 方法学被用于制备和/或获得编码重链和轻链的核酸、将这些核酸纳入重组表达载体中并且将所述载体引入至宿主细胞中，例如 Sambrook, Fritsch and Maniatis (eds.), Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor,  
30 N.Y., (1989)、 Ausubel, F. M.等(eds.) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates, (1989)和 Boss 等的美国专利 No. 4,816,397 中记载的那些。

合适的宿主细胞为原核细胞和真核细胞。原核宿主细胞的实例为细菌，真核宿主细胞的实例为酵母、昆虫或哺乳动物细胞。应理解，包括选择调节序列的表达载体的设计受到多种因素的影响，例如宿主细胞的选择、所  
35

需的蛋白质的表达水平以及表达是组成型的还是可诱导型的。

### 细菌表达

5 通过将编码所需抗体的结构 DNA 序列连同合适的翻译起始和终止信号以及有功能的启动子插入可操作阅读框中，来构建可用于细菌的可用表达载体。所述载体包含一个或多个表型选择标记以及复制起点以确保维持所述载体，以及根据需要在宿主内提供扩增。用于转化的合适的原核宿主包括大肠杆菌 (*E. coli*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 以及假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、链霉菌属 (*Streptomyces*) 和葡萄球菌属 (*Staphylococcus*) 中的多个物种。

10 细菌载体可以是例如基于噬菌体、质粒或噬粒的。这些载体可含有选择标记和细菌复制起点，其来源于通常含有公知的克隆载体 pBR322 (ATCC 37017) 的元件的可商购的质粒。转化合适的宿主菌株并使所述宿主菌株生长至适当细胞密度之后，通过适当的方法 (例如，温度变化或化学诱导) 15 将所选择的启动子去阻遏/诱导，并且将细胞培养额外的时间。通常通过离心收获细胞，通过物理或化学方法使细胞破裂，并且保留所得的粗提取物用于进一步纯化。

20 在细菌系统中，根据所表达的蛋白的目的用途，可有利地选择多种表达载体。例如，当要生产大量这样的蛋白用于生产抗体或用于筛选肽文库时，例如，可能需要指导易于纯化的融合蛋白产物的高水平表达的载体。

### 哺乳动物表达和纯化

用于哺乳动物宿主细胞表达的优选调节序列包括在哺乳动物细胞中指导高水平蛋白表达的病毒元件，例如源于巨细胞病毒 (CMV) 的启动子和/或增强子 (例如 CMV 启动子/增强子)、猿猴病毒 40 (SV40) 的启动子和/或增强子 (例如 SV40 启动子/增强子)、腺病毒的启动子和/或增强子 (例如腺病毒主要晚期启动子 (AdMLP)) 和多瘤病毒的启动子和/或增强子。对病毒调节元件及其序列的进一步描述参见例如，Stinski 的 U.S. 5,168,062、Bell 等的 U.S. 4,510,245 和 Schaffner 等的 U.S. 4,968,615。重组表达载体还可以包括复制起点和选择标记 (参见例如，Axel 等的 U.S. 4,399,216、U.S. 4,634,665 和 U.S. 5,179,017)。合适的选择标记包括赋予已经引入所述载体的宿主细胞对药物例如 G418、潮霉素或甲氨蝶呤的抗性的基因。例如，二氢叶酸还原酶 (DHFR) 基因赋予对甲氨蝶呤的抗性，而 neo 基因赋予对 G418 的抗性。

35 将所述表达载体至宿主细胞中的转染可以利用标准技术例如电穿孔、

磷酸钙沉淀和 DEAE-葡聚糖转染来进行。

用于表达本文提供的抗体的合适的哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢 (CHO 细胞) [包括 dhfr-CHO 细胞, 记载于 Urlaub 和 Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-4220 中, 使用 DHFR 选择标记, 例如记载于 R. J. Kaufman 和 P. A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159: 601-621 中]、NSO 骨髓瘤细胞、COS 细胞和 SP2 细胞。

本发明的抗体可通过公知方法从重组细胞培养物回收和纯化, 所述公知方法包括但不限于, 硫酸铵或乙醇沉淀、酸提取、蛋白 A 亲和层析、蛋白 G 亲和层析、阴离子或阳离子交换色谱法、磷酸纤维素色谱法、疏水相互作用色谱法、亲和色谱法、羟磷灰石色谱法以及凝集素色谱法。高效液相色谱法 (“HPLC”) 也可用于纯化。参见例如, Colligan, Current Protocols in Immunology 或 Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, N.Y., (1997-2001), 例如第 1、4、6、8、9、10 章, 各自以引用的方式全文纳入本文。

#### *本发明的抗体的特性和功能*

对本发明的人源化 VEGF-H988 Fab 抗体进行特性分析和功能分析。分析结果表明, 本发明的抗体具备以下优势:

(1) 与 VEGF165 蛋白结合的能力与 Lucentis 相近;

(2) 与 VEGF165 蛋白的结合亲和力强于 Lucentis 的亲和力, 约为 Lucentis 的亲合力的 3.75 倍;

(3) 与重组人 VEGF165 蛋白有特异性结合, 与重组小鼠 mVEGF164 蛋白无交叉结合;

(4) 有效抑制 VEGFR2 蛋白与 VEGF165 蛋白的结合, 且阻断能力明显优于 Lucentis; 和

(5) 在不同浓度重组人 VEGF165 条件下, 中和作用均强于 Lucentis; 高浓度 VEGF165 下, 中和活性强于 EYLEA; 不同浓度的 VEGF165 条件下, 活性均强于贝伐珠单抗及 Brolucizumab, 而与 Conbercept 活性相当。

#### *用途*

本发明的抗体可用于治疗与血管生成相关的病症, 包括以脉络膜新生血管为特征的眼病, 包括但不限于年龄相关性老年黄斑变性 (AMD)、糖尿病性黄斑水肿 (DME)、视网膜水肿、退行性近视、脉络膜新生血管等的发生 (CNV)。

### 药物组合物

可将本发明的抗体与至少一种其他试剂（例如稳定化合物）制备成药物组合物，其包括本发明的抗体和一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。任选地，所述药物组合物可包含另外的治疗剂。

5

### 试剂盒

本发明还涉及药物包装和包含一个或多个容器的试剂盒，所述容器含有上文提到的本发明的药物组合物。其上附有管理药物或生物制品的生产、使用或销售的政府机构规定形式提示，其反映该药物被上述机构批准用于人类给药。

10

### 制备和储存

本发明的药物组合物可以以本领域中已知的方式制备，例如通过常规的混合、溶解、造粒、锭剂制备、研磨、乳化、包裹、包埋或冻干方法。

15

在已经制备包含配制于可接受的载体中的本发明化合物的药物组合物之后，可以将它们放置在适当的容器中并贴上标签用于治疗所标明的病症。这类标签会包括给药的量、频率和方法。

### 药物组合

20

上述包含本发明的抗体的药物组合物还与一种或多种其他治疗剂，例如抗肿瘤剂组合，其中所得组合不会引起不可接受的不利影响。

### 实施例

25

以下的实施例便于更好地理解本发明，但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法，如无特殊说明，均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料，如无特殊说明，均为自常规生化试剂公司购买。

实施例 1: 采用噬菌体抗体展示文库筛选阻断 VEGF165 与 VEGFR2 结合的兔源抗体

30

#### 1.1 兔子免疫

采用重组人 VEGF165 蛋白（来源：北京义翘神州科技有限公司，Cat. 11066-HNAH）来对兔子进行免疫。该人 VEGF165 蛋白(UniProtKB P15692-4)的胞外区 Met1-Arg191 氨基酸序列为 SEQ ID NO: 1。

35

具体方法为：将重组人 VEGF165 蛋白与弗氏佐剂混合，使用混合物进行四次免疫，每次免疫剂量为 500  $\mu$ g，皮下注射，免疫间隔依次为 3 周、2

5 周、2周。从第四次免疫起，免疫后四天经眼眶内眦静脉丛采血。采用 ELISA 方法，包被重组人 VEGF165 蛋白以检测兔抗 VEGF165 的血清效价。第五次免疫血清滴度达到 25000 倍稀释，第五次免疫 9 周后使用 25  $\mu$ g 重组人 VEGF165 蛋白进行静脉注射加强，7 天之后处死兔子，取兔子的脾脏组织冻存于液氮中。

### 1.2 噬菌体抗体库筛选

用 TriPure Isolation Reagent 试剂(来源: Roche, Cat. No. 11 667 165 001)提取兔脾组织的 RNA，用反转录试剂盒(来源: Invitrogen, Cat. No. 10 18080-051)进行反转录获得 cDNA。设计 10 对引物扩增兔抗体的轻链可变区序列,4 对引物扩增重链可变区序列(Barbas C F et al., CSHL Press. 2004)。采用重叠延伸拼接 PCR 法将编码兔抗体轻链和重链可变区的序列拼接成编码 scFv 的核苷酸序列，轻重链可变区通过接头：

15 TCTAGTGGTGGCGGTGGTTCGGGCGGTGGTGGAGGTGGTAGTTC  
TAGATCTTCC (SSGGGGSGGGGGSSRSS) (SEQ ID NO: 2)

进行连接 (Jones S T et al., Bio/technology. 1991; 9(1): 88)，再通过限制性内切酶 *Sfi* I (来源: Fermentas) 酶切连接到噬菌体载体 pComb3x (来源: 北京义翘神州科技有限公司) 中，电转化 X-Blue 感受态细胞以构建免疫兔的噬菌体展示 scFv 抗体库。将重组人 VEGF165 蛋白包被在 ELISA 板上，按照噬菌体抗体淘选的流程，筛选获得抗 VEGF165 阳性抗体富集的噬菌体文库 (O'Brien, P. M., & Aitken, R. (Eds.), Springer Science & Business Media. 20 2002; ISBN: 9780896037113)。从富集的文库中挑取单克隆噬菌体进行表达，用 ELISA 方法检测与重组人 VEGF165 蛋白的结合，筛选获得与重组人 VEGF165 特异性结合的抗体克隆，将筛选得到的克隆送测序公司测序获得 VEGF165-R988 scFv 抗体的核苷酸序列 (SEQ ID NO: 3)。

### 1.3 靶向 VEGF165 兔源抗体的生产

以 PCR 扩增 VEGF165-R988 scFv 抗体的重链可变区核苷酸序列，通过 in-fusion 方法插入到带重链信号肽(SEQ ID NO: 43)和兔重链 IgG1 恒定区 (SEQ ID NO: 6)的经 *Sca* I + *Kpn* I (Fermentas)酶切的 pSTEP2 载体中获得重链(SEQ ID NO: 52)表达载体。PCR 扩增 VEGF-R988 scFv 抗体的轻链可变区核苷酸序列，通过 in-fusion 方法插入到带轻链信号肽(SEQ ID NO: 44)和兔轻链 kappa 恒定区(SEQ ID NO: 7)的经 *Sca* I + *Bam*H I (Fermentas)酶切的 pSTEP2 载体中获得轻链(SEQ ID NO: 53)表达载体。提取重组质粒，转染 HEK-293 细胞进行培养表达 7 天，培养上清采用蛋白 A 纯化柱进行纯化获

得高纯度抗体。

扩增重链可变区引物:

F1	ACCAGGGTGCTGAGTCAGTCGGTGGAGGAGTCC
R1	TGTGACCAGGGTACCTGGGCCCA

扩增轻链可变区引物:

F2	ACAGGAGTGCATAGTGAGCTCGATCTGACCCAGAC
R2	GGTGCAACTGGATCCCCTTTGACGACCACCTCGGT

5

#### 1.4 靶向 VEGF165 兔源抗体功能检测

##### 1.4.1 兔源抗体阻断 VEGF165 结合 VEGFR2-his

将浓度为 1  $\mu\text{g/mL}$  的 VEGF165 蛋白 (来源: 北京义翘神州科技有限公司) 包被于 96 孔板上, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 4 $^{\circ}\text{C}$  包被过夜。次日洗板, 室温封闭 1 小时后, 加入 100  $\mu\text{L}$  5  $\mu\text{g/mL}$  VEGFR2-生物素蛋白 (来源: 北京义翘神州科技有限公司) 和不同浓度 VEGF-R988 抗体共同孵育。洗板去除未结合抗体, 加入链霉亲和素/HRP (来源: 北京中杉金桥) 孵育后重复洗板, 最后加入底物显色液进行显色。终止显色后酶标仪读取 OD450。结果分析以抗体浓度为横坐标, 抑制率 PI% 为纵坐标, 利用 GraphPad Prism 绘图分析。

抑制率  $\text{PI}\% = (\text{OD 空白} - \text{OD 样品}) / \text{OD 空白} \times 100\%$ , 其中 OD 空白表示只加 VEGFR2-生物素不加抗体组的 OD 值, OD 样品表示同时加 VEGFR2-生物素和抗体的待测组 OD 值。

15

如图 1 所示, VEGF-R988 抗体可有效结合包被的 VEGF165 蛋白, 并可有效的抑制 VEGFR165 蛋白与 VEGFR2 蛋白的结合。

20

##### 1.4.2 兔源抗体对 HUVEC 增殖的抑制

采用 WST-8 法, 检测嵌合抗体中和 VEGF165 对脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 细胞的增殖作用。96 孔板接种 HUVEC 细胞  $4 \times 10^3$  个细胞/孔, 在含有 10% FBS 及 5% L-Gln 的 M199 培养基中培养 4 h 后加入不同浓度的 VEGF-R988 抗体, 50  $\mu\text{L}$ /孔。随后加入终浓度为 10  $\text{ng/mL}$  的 VEGF165 10  $\mu\text{L}$ /孔。将 96 孔板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下的  $\text{CO}_2$  培养箱内 3 天。设置检测空白孔 B (无细胞)、阴性对照组 M (接种细胞, 不加样品, 加 VEGF165) 和 M' (接种细胞, 不加样品及 VEGF165) 对照。培养结束后加入 WST-8 显色液, 10  $\mu\text{L}$ /孔, 将 96 孔板置于  $\text{CO}_2$  培养箱中孵育, 显色稳定后置酶标仪上于 450 nm、630 nm 处测定吸光度。以吸光度值 (OD450 - OD630) 减去检

25

30

测空白孔 B 的读值来计算抗体的中和率，中和率% = (阴性对照 M 组 OD 值 - 样品 OD 值) / (阴性对照 M 组 OD 值 - M'组 OD 值) × 100%，采用统计软件 GraphPad Prism 的自动分析功能计算标准曲线，横坐标为样品的浓度，纵坐标为中和率，回归方程为四参数方程，得到“S”型曲线，计算样品半数有效浓度 (EC<sub>50</sub>)。

如图 2 所示，VEGF-R988 抗体可有效降低 VEGF165 促进 HUVEC 增殖的能力。

实施例 2：兔抗体 VEGF-R988 的人源化、突变改造和 Fab 形式抗体的生产

### 2.1 兔抗体 VEGF-R988 轻链及重链的 CDR 确定

根据实施例 1.2 中测定的 VEGF-R988 scFv 抗体的核苷酸序列，推导出 VEGF-R988 scFv 的重链和轻链可变区氨基酸序列，见 SEQ ID NO: 8/9。

参考 Kabat 以及 IMGT 编号方式确定鼠抗体 VEGF-R988-scFv 轻链及重链各 3 个 CDR 的氨基酸序列，参见表 1。上述的轻链及重链各 3 个 CDR 在后续步骤中被移植到人源化抗体 VEGF-H988-10-scFv 中，见实施例 2.2。

表 1：VEGF-R988 轻链及重链 CDR 序列

名称	序列
LCDR1	QSSQTIYANRRLA (SEQ ID NO: 10)
LCDR2	GASTLAS (SEQ ID NO: 11)
LCDR3	AGYKSYDGDDVG (SEQ ID NO: 12)
HCDR1	GIDLSSYAISWV (SEQ ID NO: 13)
HCDR2	YIWNAGNTYYASWAKG (SEQ ID NO: 14)
HCDR3	ARGTLGDYNGMDP (SEQ ID NO: 15)

### 2.2 通过 CDR 移植将兔 VEGF-R988 人源化

兔抗体人源化采用经典的人源化方式 CDR 移植方法，选择与兔轻链或重链可变区较接近的人抗体轻链或重链可变区为模板，将兔抗体轻链或重链的各 3 个 CDR (表 1) 插入到该人抗体的可变区中，获得人源化的轻链可变区 (VL) 和重链可变区 (VH) 序列。所用 VEGF-R988 的轻链可变区的人源模板为 IGKV1-27\*01，该模板与 VEGF-R988 轻链的同源性为 65.30%，重链可变区的人源模板为 IGHV4-4\*08，该模板与 VEGF-R988 重链的同源性为 53.20%。

### 2.3 将人源化可变区序列的框架区回复突变

由于兔源框架区有关键点对于支持 CDR 的活性至关重要，因此将关键位点回复突变为兔抗体对应的序列，其中轻链的第 1 位回复突变为 E，第 2 位回复突变为 L，第 4 位回复突变为 L，第 63 位回复突变为 K；重链的第 3 位回复突变为 V，第 37 位回复突变为 V，第 47 位回复突变为 Y，第 78 位回复突变为 V，第 79 位回复突变为 D，第 91 位回复突变为 F，回复位点均为 Kabat 编号。经 CDR 人源化移植和框架区回复突变获得人源化抗体 VEGF-H988-10。

### 2.4 人源化抗体 VEGF-H988-10 的生产及 CDR 亲和力优化

通过全基因合成的方法获得 VEGF-H988-10 重链可变区(SEQ ID NO: 20)，通过 in-fusion 方法插入到带重链信号肽(SEQ ID NO: 43)和人 IgG1 恒定区(SEQ ID NO: 47)的经 *Sca I* + *Nhe I* (Fermentas)酶切的 pSTEP2 载体中获得 VEGF-H988-10 重链(SEQ ID NO: 16)表达载体。通过全基因合成的方法获得 VEGF-H988-10 轻链可变区(SEQ ID NO: 21)，通过 in-fusion 方法插入到带轻链信号肽(SEQ ID NO: 44)和人 kappa 恒定区(SEQ ID NO: 48)的经 *Sca I* + *BsiW I* (Fermentas)酶切的 pSTEP2 载体中获得 VEGF-H988-10 轻链(SEQ ID NO: 17)表达载体。提取质粒后转染 HEK-293 细胞进行培养表达 7 天，培养上清液采用蛋白 A 纯化柱进行纯化获得高纯度抗体。

全基因合成重链可变区引物：

F3	CCACAGGAGTGCATAGTGA ACTCCA ACTTACCCAGAGCCC ATCCTCCCTG
R3	CCTGTCTCCCACAGAGGCAGACAGGGAGGATGG
F4	TCTGTGGGAGACAGGGTGACCATCACTTGTCAG
R4	GGCATAGATGGTCTGGCTGGACTGACAAGTGAT
F5	CAGACCATCTATGCCAACAGGAGACTGG
R5	TTCTGTTGATACCAAGCCAGTCTCCTGT
F6	TTGGTATCAACAGAAGCCTGGCAAGGTG
R6	AAATCAGCAGTTTTGGCACCTTGCCAGG
F7	CAAACTGCTGATTTATGGAGCCAGCAC
R7	CACTCCAGATGCCAGGGTGCTGGCTCCA
F8	CTGGCATCTGGAGTGCCAAGCAGGTTCAAGGGC

R8	GAAGTCTGTGCCAGAGCCAGAGCCCTTGAACCT
F9	TCTGGCACAGACTTCACCCTGACCATCTCCTCC
R9	AGCCACATCCTCAGGTTGGAGGGAGGAGATGGT
F10	CCTGAGGATGTGGCTACCTACTACTGTGCTGGC
R10	ATCTCCATCATAGGACTTGTAGCCAGCACAGTA
F11	TCCTATGATGGAGATGATGTGGGGCTTTGGAGGA
R11	GGTGCAGCCACCGTACGCTTAATCTCCACCTTGGTGCCTCC TCCAAAGCC

全基因合成轻链可变区引物:

F12	GCTACCAGGGTGCTGAGTCAGTCTGTCCAGGAGTCTGGACCTG GACTGGTG
R12	GGACAGGGTCTCAGATGGCTTCACCAGTCCAGG
F13	TCTGAGACCCTGTCCCTGACTTGTACTGTGTCT
R13	ATAGGAGGACAGGTCAATGCCAGACACAGTACA
F14	GACCTGTCCTCCTATGCCATCTCCTGGGTGA
R14	CCCTTGCCAGGAGGTTGTCTCACCCAGGAGA
F15	ACCTCCTGGCAAGGGATTGGAATACATTGGC
R15	TGCCAGCATTCCAGATGTAGCCAATGTATTC
F16	TCTGGAATGCTGGCAACACCTACTATGCCTC
R16	CACCCTGCCCTTAGCCCAGGAGGCATAGTAG
F17	GCTAAGGGCAGGGTGACCATCTCTGTGGACACC
R17	CAGGTCCACCTGGTTCTTGCTGGTGTCCACAGA
F18	AACCAGGTGGACCTGAAACTGTCCTCTGTGACA
R18	GTAGACTGCTGTGTCTGCTGCTGTCACAGAGGA
F19	GACACAGCAGTCTACTTCTGTGCCAGGGGCACC
R19	CATCCCATTGTAGTCTCCCAGGGTGCCCCTGGC
F20	GACTACAATGGGATGGACCCATGGGGACCTGGC
R20	GGGCCCTTGGTGCTAGCGCTGGACACTGTCACCAGGGTGCCA GGTCCCCA

5 为了改善 VEGF-H988-10 的亲合力, 重链和轻链可变结构域 CDR 区构建 SDM 库, 包括 LCDR1、LCDR3、HCDR2 三个饱和突变库; 同时为了提高抗体的化学稳定性, 需要将含有脱酰胺或者异构化位点改变成另一氨基

酸残基。天冬酰胺的脱酰胺可在 NG、NS、NA、NT 等序列上，导致产生异天冬氨酸残基，影响抗体的稳定性或生物功能。VEGF-H988 可变结构域 HCDR3 存在易脱酰胺位点，为了提高抗体的化学稳定性和生物功能同时构建了 SDM 库。将 4 个突变库构建成 scFv 序列以基因 3 融合蛋白形式克隆至噬菌粒载体，对于各 CDR 通过可溶性抗原 VEGF 的结合能力筛选较优克隆，最终得到 CDR 亲和力和稳定性优化的抗体 VEGF-H988。VEGF-H988 轻链及重链 CDR 序列见表 2。

表 2: VEGF-H988 轻链及重链 CDR 序列

名称	序列
LCDR1	QSSKFLWQGRRLA (SEQ ID NO: 24)
LCDR2	GASTLAS (SEQ ID NO: 25)
LCDR3	AGYKSYDGDVVG (SEQ ID NO: 26)
HCDR1	GIDLSSY AIS (SEQ ID NO: 27)
HCDR2	YIWNDLFTYYASWAKG (SEQ ID NO: 28)
HCDR3	ARGTLGDYGGMDP (SEQ ID NO: 29)

## 2.5 人源化 VEGF-H988 Fab 的生产

将编码上述含有信号肽的 VEGF-H988 Fab 轻链核苷酸序列(SEQ ID NO: 42) PCR 扩增后，其中包含依次连接的轻链信号肽的核苷酸序列 (SEQ ID NO: 44)、人源化抗体轻链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO: 46)和人 kappa 轻链恒定区的核苷酸序列 (SEQ ID NO: 48)，通过 in-fusion 方法插入自主研发的 pGS 载体 (*Kpn* I + *Xba* I) 中，通过测序验证获得正确的质粒。将 VEGF-H988 Fab 重链 Fab 核苷酸序列(SEQ ID NO: 41) PCR 扩增后，其中包含依次连接的重链信号肽的核苷酸序列 (SEQ ID NO: 43)、人源化抗体重链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO: 45)和人 IgG1 重链 CH1 恒定区的核苷酸序列 (SEQ ID NO: 49)，通过 in-fusion 方法插入已经构建正确的包含轻链的 pGS 载体(*Nhe* I + *Not* I)中，通过测序验证获得正确的 VEGF-H988 Fab 轻重链表达载体。该表达载体包含 GS 筛选基因和抗体轻、重链的表达元件的真核细胞表达载体。将该表达载体转染至 CHO-K1-GS 缺陷的细胞中，经 MSX 筛选获得 VEGF-H988 Fab 高表达细胞株。采用 ELISA 检测选取抗体高表达的克隆，并结合细胞生长的状态和抗体药物的关键质量属性分析结果筛选获得高表达细胞株。采用无血清加料悬浮培养的方式培养 VEGF-H988 Fab 生产 CHO 细胞株，获得高纯度和高质量的 VEGF-H988

Fab。

### 实施例 3: 人源化 VEGF-H988 Fab 特性分析

#### 3.1 VEGF-H988 Fab 结合 VEGF165 的特性

##### 3.1.1 VEGF-H988 Fab 特异性结合 VEGF165

将不同浓度 (0.15ng/mL、0.46 ng/mL、1.37 ng/mL、4.12ng/mL、12.35 ng/mL、37.04 ng/mL、111.11 ng/mL、333.33 ng/mL、1000 ng/mL 和 3000 ng/mL) 的重组人 VEGF165 蛋白 (来源: 北京义翘神州科技有限公司) 包被于 96 孔板上, 每孔 100  $\mu$ L, 4  $^{\circ}$ C 包被过夜。次日洗板, 室温封闭 1 h 后, 分别加入 100  $\mu$ L 1  $\mu$ g/mL 的 VEGF165-H988 Fab、Lucentis (来源: Novartis) 和阴性对照抗体 H7N9-R1 Fab (来源: 北京义翘神州科技有限公司) 孵育 1 h, 之后洗板去除未结合抗体, 加入二抗山羊 F(ab')<sub>2</sub> 抗人 IgG F(ab')<sub>2</sub>/HRP (来源: Jackson ImmunoResearch 公司) 孵育后重复洗板, 加入底物显色液进行显色, 终止后酶标仪读取 OD450。以重组人 VEGF165 蛋白浓度为横坐标, OD450 读数为纵坐标, 利用 GraphPad Prism 6.0 软件拟合 S 型曲线并分析抗体与重组人 VEGF165 蛋白结合的 EC<sub>50</sub>。

结果如图 3 所示, 人源化抗体 VEGF165-H988 Fab 与重组人 VEGF165 的特异性结合 EC<sub>50</sub> 为 18.75 ng/mL, R<sup>2</sup>= 0.993; Lucentis 结合的 EC<sub>50</sub> 为 12.87 ng/mL, R<sup>2</sup>=0.989; 人源化抗体 VEGF165-H988 Fab 与 VEGF165 蛋白结合的能力与 Lucentis 相近。阴性对照 H7N9-R1 Fab 与重组人 VEGF165 蛋白无结合。

##### 3.1.2 VEGF-H988 Fab 与 VEGF165 蛋白的结合亲和力

使用链霉亲和素包被的 Sensor 固定生物素标记的 VEGF165 蛋白, 检测多个浓度点的 VEGF-H988 Fab、Lucentis 与 VEGF165 的亲和力。

首先将重组人 VEGF165 蛋白与生物素以摩尔比 1:2 的比率进行标记, 方法如下: 利用 5000 MW 超滤管通过超滤形式将重组 VEGF165 蛋白的缓冲液 (20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH8.0) 更换为 PBS, UV 定量后得到 567.57  $\mu$ g 蛋白, 所得蛋白与 20 mM 生物素溶液以 1:2 摩尔比混匀, 室温避光反应 30 分钟, 通过 5000 MW 超滤管再次过滤去除未标记的生物素, UV 定量后加入等体积的甘油和终浓度 0.1% 的 BSA 后获得生物素标记蛋白。UV 检测其浓度为 2.08 mg/mL。

然后测定不同浓度梯度 VEGF-H988 Fab、Lucentis 与生物素化的重组人 VEGF165 蛋白的亲和力, 获得 KD 值为最终的亲和力。

如表 3 所示, VEGF-H988 Fab 与重组人 VEGF165 蛋白结合亲和力 KD

值为 1.54E-10 (M), 结合常数  $k_{on}$  值为 2.74E+05 (1/Ms), 解离常数  $k_{dis}$  值为 4.21E-05 (1/s); Lucentis 与 VEGF165 蛋白结合亲和力 KD 值为 5.78E-11 (M), 结合常数  $k_{on}$  值为 5.36E+04 (1/Ms), 解离常数  $k_{dis}$  值为 3.10E-05 (1/s)。结果表明 VEGF-H988 Fab 亲和力强于 Lucentis 的亲和力, 约为 Lucentis 的亲

5 力的 3.75 倍。因此 VEGF-H988 Fab 比 Lucentis 具有更强的结合 VEGF165 蛋白的能力。

表 3 VEGF-H988-48-IgG1(Fab-N103G)、Lucentis 与重组 VEG165F 蛋白的亲和力

样品	KD(M)	$k_{on}$ (1/Ms)	$k_{dis}$ (1/s)
VEGF-H988 Fab 抗体	1.54E-10	2.74E+05	4.21E-05
Lucentis	5.78E-10	5.36E+04	3.10E-05

### 3.1.3 VEGF-H988 Fab 种属交叉

将重组人 VEGF165 蛋白、重组小鼠 mVEGF164 蛋白 (来源: 北京义翘神州科技有限公司) 稀释到 0.1  $\mu\text{g/mL}$ 、1  $\mu\text{g/mL}$  和 10  $\mu\text{g/mL}$  并分别包被于 96 孔板上, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 4  $^{\circ}\text{C}$  包被过夜。次日洗板, 室温封闭 1 h, 分别加入 100  $\mu\text{L}$  浓度为 2  $\mu\text{g/mL}$  的 VEGF165-H988 Fab、Lucentis 和阴性对照抗体 H7N9-R-Fab 孵育 1 h, 洗板去除未结合抗体, 加入检测二抗山羊 F(ab')<sub>2</sub> 抗人 IgG F(ab')<sub>2</sub>/HRP (来源: Jackson ImmunoResearch 公司) 孵育后重复洗板, 加入底物显色液进行显色, 终止后酶标仪读取 OD450。以蛋白浓度为横坐标, OD450 读数为纵坐标, 利用 GraphPad Prism 6.0 软件做柱状图。

20 结果如图 4 所示, VEGF165-H988 Fab 与重组人 VEGF165 蛋白有特异性结合, 与重组小鼠 mVEGF164 蛋白有交叉结合, Lucentis 与重组小鼠 mVEGF164 蛋白无交叉结合。

### 3.2 VEGF-H988 Fab 阻断受体结合特性

25 将浓度为 1  $\mu\text{g/mL}$  的 VEGF165 蛋白包被于 96 孔板上, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 4 $^{\circ}\text{C}$  包被过夜。次日洗板, 室温封闭 1 小时后, 加入 100  $\mu\text{L}$  2  $\mu\text{g/mL}$  VEGFR2-his 蛋白 (来源: 北京义翘神州科技有限公司), 再加入不同浓度的人源化 VEGF-H988 Fab、Lucentis 和阴性对照抗体 H7N9-R1-Fab (来源: 北京义翘神州科技有限公司) 共同孵育。洗板去除未结合抗体, 加入 C-his-R023/HRP 孵育后重复洗板, 最后加入底物显色液进行显色, 终止后酶标仪读取

30 OD450, 每组 2 次平行。

以抗体浓度为横坐标，抑制率 PI% 为纵坐标，利用 GraphPad Prism 软件分析并绘图并计算 IC50 值。抑制率  $PI\% = (OD_{\text{空白}} - OD_{\text{样品}}) / OD_{\text{空白}} \times 100$ ，其中 OD 空白表示只加 VEGFR2-his 不加抗体组的 OD 值，OD 样品表示同时加 VEGFR2-his 和抗体的待测组 OD 值。

5 如图 5 所示，VEGFR2 蛋白可有效结合包被的 VEGF165 蛋白，VEGF-H988Fab 可有效抑制 VEGFR2 蛋白与 VEGF165 蛋白的结合，且 VEGF-H988 Fab 阻断能力明显优于 Lucentis，阴性对照抗体无抑制作用。

### 3.3 VEGF-H988 Fab 阻滞不同浓度 VEGF165 生长抑制活性

10 采用 WST-8 法，检测人源化抗体中和 VEGF165 对 HUVEC 细胞的增殖作用。96 孔板接种 HUVEC 细胞  $4 \times 10^3$ /孔，在含有 10% FBS 及 5% L-Gln 的 M199 培养基中培养 4 h 后加入不同浓度的抗体，50  $\mu$ L/孔。随后加入终浓度分别为 1000 ng/mL、100 ng/mL、10 ng/mL 的 VEGF165 10  $\mu$ L/孔。将 96 孔板置于 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下的 CO<sub>2</sub> 培养箱内 3 天。设置检测空白孔 B（无细胞）、阴性对照组 M（接种细胞，不加样品，加 VEGF165）和 M'（接种细胞，不加样品及 VEGF165）对照。培养结束后加入 WST-8 显色液，10  $\mu$ L/孔，将 96 孔板置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育，显色稳定后置酶标仪上于 450 nm、630 nm 处测定吸光度。以吸光度值（OD<sub>450</sub> - OD<sub>630</sub>）减去检测空白孔 B 的读值来计算抗体的中和率，中和率% = （阴性对照 M 组 OD 值 - 样品 OD 值） / （阴性对照 M 组 OD 值 - M' 组 OD 值） $\times 100\%$ ，采用统计软件 GraphPad Prism 的自动分析功能计算标准曲线，横坐标为样品的浓度，纵坐标为中和率，回归方程为四参数方程，得到“S”型曲线，计算样品半数有效浓度（EC<sub>50</sub>）。

25 如图 6-10 及表 4 所示，在不同浓度重组人 VEGF165 条件下，VEGF-H988 Fab 的中和作用均强于 Lucentis。当 VEGF165 浓度为 1000 ng/mL、100 ng/mL 时，VEGF-H988 Fab 的中和活性强于 EYLEA，但当 VEGF165 浓度为 10 ng/mL 时，VEGF-H988 Fab 稍弱于 EYLEA。不同浓度的 VEGF165 条件下，VEGF-H988 Fab 的活性均强于贝伐珠单抗及 Brolucizumab，而与 Conbercept 活性相当。随着 VEGF165 浓度的升高，VEGF-H988 Fab 维持了较高的最大中和率，而 EYLEA 和 Avastin 则有所降低。

30

表 4 VEGF-H988 Fab 中和 VEGF165 作用的 EC<sub>50</sub> 及最大中和率

中和 VEGF165 浓度	样品名称	EC <sub>50</sub> (nM)	最大中和率, %
1000ng/mL	VEGF-H988 Fab	19.4	100.4
	Lucentis	43.6	93.9
100ng/mL	VEGF-H988 Fab	2.3	95.5
	Lucentis	6.0	93.5
10ng/mL	VEGF-H988 Fab	0.23	96.8
	Lucentis	0.31	96.9
1000ng/mL	VEGF-H988 Fab	23.45	101.1
	EYLEA	32.44	76.7
100ng/mL	VEGF-H988 Fab	2.50	100.4
	EYLEA	2.56	89.6
10ng/mL	VEGF-H988 Fab	0.18	90.1
	EYLEA	0.15	92.7
1000ng/mL	VEGF-H988 Fab	29.75	103.7
	贝伐珠单抗	38.49	91.3
100ng/mL	VEGF-H988 Fab	2.99	103.7
	贝伐珠单抗	4.77	88
10ng/mL	VEGF-H988 Fab	0.22	100.1
	贝伐珠单抗	0.25	94.5
1000ng/mL	VEGF-H988 Fab	30.08	109.3
	Conbercept	29.03	108.2
100ng/mL	VEGF-H988 Fab	3.04	102.1
	Conbercept	2.86	99.7
10ng/mL	VEGF-H988 Fab	0.23	101.7
	Conbercept	0.18	101.9
1000ng/mL	VEGF-H988 Fab	30.50	101.7
	Brolucizumab	71.18	100.6
100ng/mL	VEGF-H988 Fab	2.99	100.9
	Brolucizumab	6.74	101.3
10ng/mL	VEGF-H988 Fab	0.22	101.0
	Brolucizumab	0.41	100.3

序列表

编号	名称	序列
SEQ ID NO: 1	人 VEGF 蛋白 (UniProtKB P15692) 氨基酸序列 Met1-Arg191	MNFLLSVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQN HHEVVKFMDVYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPS CVPLMRCGGCCNDEGLECVPTESNITMQIMRIKPHQGQ HIGEMSFLQHNKCECRPKKDRARQEKKSVRGKGGKQK RKRKKSRYKSWSVYVGARCCLMPWSLPGPHPCGPCSER R
SEQ ID NO: 2	构建噬菌体抗体库 时所用兔抗体 scFv 的接头核苷酸序列	TCTAGTGGTGGCGGTGGTTCGGGCGGTGGTGGAGGTG GTAGTTCTAGATCTTCC (SSGGGSGGGGGSSRSS)
SEQ ID NO: 3	兔 抗 体 VEGF165-R988 scFv 核苷酸序列	VEGF165-R988 轻链可变区核苷酸序列(SEQ ID NO: 5): GAGCTCGATCTGACCCAGACTCCATCCCCGTGTCTGC GGCTGTTGGAGGCACAGTCACCATCAATTGCCAGTCC AGTCAGACTATTTATGCTAACAGGCGCTTAGCCTGGTAT CAACAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGATCT ATGGTGCATCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCGCGG TTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACTCTCA CCATCAGCGGCGTGCAGTGTGACGATGCTGCCACTTAC TACTGTGCAGGCTATAAAAGTTATGATGGTGGTGGTGGT GGTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTCGTCAA 接头(SEQ ID NO: 2): TCTAGTGGTGGCGGTGGTTCGGGCGGTGGTGGAGGTG GTAGTTCTAGATCTTCC VEGF165-R988 重链可变区核苷酸序列(SEQ ID NO: 4): CAGTCGGTGGAGGAGTCCGGGGTTCGCTGGTAACGC CTGGGACACCCCTGACACTCACCTGCACAGTCTCTGG AATCGACCTCAGTAGCTATGCAATAAGCTGGGTCCGCC AGGCTCCAGGAAGGGGCTGGAATACATCGGATACAT TTGGAATGCTGGTAACACCTACTACGCGAGCTGGGCA AAAGGCCGATTCACCATCTCCAAAACCTCGACCACGG TGGATCTGAAAATCACCAGTCCGACAACCGAGGACAC GGCCACCTATTTCTGTGCCAGAGGAACATTAGGGGACT

		ACAATGGCATGGACCCCTGGGGCCCAGGGACCCTCGT CACCGTCTCTTCA
SEQ ID NO: 4	兔 抗 体 VEGF165-R988 重链 可变区核苷酸序列	CAGTCGGTGGAGGAGTCCGGGGGTCGCCTGGTAACGC CTGGGACACCCCTGACACTCACCTGCACAGTCTCTGG AATCGACCTCAGTAGCTATGCAATAAGCTGGGTCCGCC AGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATACATCGGATACAT TTGGAATGCTGGTAACACCTACTACGCGAGCTGGGCA AAAGGCCGATTACCATCTCCAAAACCTCGACCACGG TGGATCTGAAAATCACCAGTCCGACAACCGAGGACAC GGCCACCTATTTCTGTGCCAGAGGAACATTAGGGGACT ACAATGGCATGGACCCCTGGGGCCCAGGGACCCTCGT CACCGTCTCTTCA
SEQ ID NO: 5	兔 抗 体 VEGF165-R988 轻链 可变区核苷酸序列	GAGCTCGATCTGACCCAGACTCCATCCCCGTGTCTGC GGCTGTTGGAGGCACAGTCACCATCAATTGCCAGTCC AGTCAGACTATTTATGCTAACAGGCGCTTAGCCTGGTAT CAACAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGATCT ATGGTGCATCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCGCGG TTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACTCTCA CCATCAGCGGCGTGCAGTGTGACGATGCTGCCACTTAC TACTGTGCAGGCTATAAAAAGTTATGATGGTGATGATGTT GGTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTCGTCAA
SEQ ID NO: 6	兔 IgG1 重链恒定区 核苷酸序列	GGTCAACCTAAGGCTCCGTCACTTCCCCTGGCCCC CTGCTGCGGGGACACACCAGCTCCACGGTGACCCTG GGCTGCCTGGTCAAAGGCTACCTCCCGGAGCCAGTGA CCGTGACCTGGAACCTCGGGCACCCTACCAATGGGGT ACGCACCTTCCCGTCCGTCCGGCAGTCCTCAGGCCTCT ACTCGCTGAGCAGCGTGGTGAGCGTGACCTCAAGCAG CCAGCCCGTCACCTGCAACGTGGCCCACCCAGCCACC AACACCAAAGTGGACAAGACCGTTGCGCCCTCGACAT GCAGCAAGCCCACGTGCCACCCCCCTGAACTCCTGGG GGGACCGTCTGTCTTCATCTTCCCCCAAACCCAAGG ACACCCTCATGATCTCACGCACCCCGAGGTACATGC GTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGATGACCCCGAGGTGC AGTTCACATGGTACATAACAACGAGCAGGTGCGCAC

		CGCCCGGCCGCCGCTACGGGAGCAGCAGTTCAACAGC ACGATCCGCGTGGTCAGCACCCCTCCCCATCGCGCACC AGGACTGGCTGAGGGGCAAGGAGTTCAAGTGCAAAG TCCACAACAAGGCACTCCCGGCCCCCATCGAGAAAAC CATCTCCAAAGCCAGAGGGCAGCCCCTGGAGCCGAAG GTCTACACCATGGGCCCTCCCGGGAGGAGCTGAGCA GCAGGTCGGTCAGCCTGACCTGCATGATCAACGGCTT CTACCCTTCCGACATCTCGGTGGAGTGGGAGAAGAAC GGGAAGGCAGAGGACAACACTACAAGACCACGCCGGCC GTGCTGGACAGCGACGGCTCCTACTTCCTCTACAGCA AGCTCTCAGTGCCACAGAGTGAGTGGCAGCGGGGCGA CGTCTTCACCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCTTGACA ACCACTACACGCAGAAGTCCATCTCCCGCTCTCCGGGT AAATAA
SEQ ID NO: 7	兔 kappa 轻链恒定区 核苷酸序列	GGGGATCCAGTTGCACCTACTGTCCTCATCTTCCCACC AGCTGCTGATCAGGTGGCAACTGGAACAGTCACCATC GTGTGTGTGGCGAATAAATACTTCCCGATGTCACCGT CACCTGGGAGGTGGATGGCACCACCCAAACAACCTGGC ATCGAGAACAGTAAACACCCGAGAATTCTGCAGATT GTACCTACAACCTCAGCAGCACTCTGACACTGACCAG CACACAGTACAACAGCCACAAAGAGTACACCTGCAAG GTGACCCAGGGCACGACCTCAGTCGTCCAGAGCTTCA ATAGGGGTGACTGTAA
SEQ ID NO: 8	兔 抗 体 VEGF165-R988 重链 可变区氨基酸序列	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGIDLSSYAIWVRQAP GKGGLEYIGYIWNAGNTYYASWAKGRFTISKSTTVDLKI TSPTTEDTATYFCARGTLGDYNGMDPWGPGTLVTVSS
SEQ ID NO: 9	兔 抗 体 VEGF165-R988 轻链 可变区氨基酸序列	ELDLTQTPSPVSAAVGGT VTINCQSSQTIYANRRLAWYQ QKPGQPPKLLIYGASTLASGVPSRFKSGSGTQFTLTISG VQCDDAATYYCAGYKSYDGDVGFGGGTEVVVK
SEQ ID NO: 10	兔 抗 体 VEGF165-R988 轻链 CDR1 氨基酸序列	QSSQTIYANRRLA
SEQ ID NO: 11	兔 抗 体 VEGF165-R988 轻链	GASTLAS

	CDR2 氨基酸序列	
SEQ ID NO: 12	兔 抗 体 VEGF165-R988 轻链 CDR3 氨基酸序列	AGYKSYDGDDVG
SEQ ID NO: 13	兔 抗 体 VEGF165-R988 重链 CDR1 氨基酸序列	GIDLSSYAIS
SEQ ID NO: 14	兔 抗 体 VEGF165-R988 重链 CDR2 氨基酸序列	YIWNAGNTYYASWAKG
SEQ ID NO: 15	兔 抗 体 VEGF165-R988 重链 CDR3 氨基酸序列	ARGTLGDYNGMDP
SEQ ID NO: 16	含有信号肽的人源 化 VEGF165-H988-10 重链核苷酸序列	重链信号肽核苷酸序列(SEQ ID NO: 43): ATGGGCTGGTCCCTGATTCTGCTGTTCCCTGGTGGCTGT GGCTACCAGGGTGCTGAGT 重链可变区核苷酸序列(SEQ ID NO: 20): CAGTCTGTCCAGGAGTCTGGACCTGGACTGGTGAAGC CATCTGAGACCCTGTCCCTGACTTGTACTGTGTCTGGC ATTGACCTGTCCTCCTATGCCATCTCCTGGGTGAGACA ACCTCCTGGCAAGGGATTGGAATACATTGGCTACATCT GGAATGCTGGCAACACCTACTATGCCTCCTGGGCTAAG GGCAGGGTGACCATCTCTGTGGACACCAGCAAGAACC AGGTGGACCTGAACTGTCCTCTGTGACAGCAGCAGA CACAGCAGTCTACTTCTGTGCCAGGGGCACCCTGGGA GACTACAATGGGATGGACCCATGGGGACCTGGCACCC TGGTGACAGTGTCCAGC 人 IgG1 重链恒定区的核苷酸序列(SEQ ID NO: 47): GCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACC CTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTG GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGA CGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGT GCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCT ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAG

		<p>CTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACA  AGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGC  CCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTG  CCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTC  CTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTC  CCGGACCCCTGAGGTCACgTGCGTGGTGGTGGACGTG  AGCCACGAAGACCCcGAGGTCAAGTTCAACTGGTACG  TGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCC  GCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC  AGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATG  GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCT  CCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAA  GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCC  CATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT  GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCG  CCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA  ACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGG  CTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGA  GCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGT  GATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAG  AGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA</p>
<p>SEQ ID NO: 17</p>	<p>含有信号肽的人源 化 VEGF165-H988-10 轻链核苷酸序列</p>	<p>轻链信号肽核苷酸序列(SEQ ID NO: 44):  ATGGGCTGGTCTGTATCATCCTGTTCTGGTGGCTAC  AGCCACAGGAGTGCATAGT  轻链可变区核苷酸序列(SEQ ID NO: 21):  GAACTCCAACTTACCCAGAGCCATCCTCCCTGTCTGC  CTCTGTGGGAGACAGGGTGACCATCACTTGTGAGTCC  AGCCAGACCATCTATGCCAACAGGAGACTGGCTTGGTA  TCAACAGAAGCCTGGCAAGGTGCCAAAACCTGCTGATT  TATGGAGCCAGCACCCCTGGCATCTGGAGTGCCAAGCA  GGTTCAAGGGCTCTGGCTCTGGCACAGACTTCACCCT  GACCATCTCCTCCCTCCAACCTGAGGATGTGGCTACCT  ACTACTGTGCTGGCTACAAGTCCTATGATGGAGATGAT  GTGGGCTTTGGAGGAGGCACCAAGGTGGAGATTAAG</p>

		<p>人 kappa 轻链恒定区的核苷酸序列(SEQ ID NO: 48):</p> <p>CGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCC                  ATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTG                  TGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAA                  GTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA                  ACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGG                  ACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAG                  CAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGC                  GAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAA                  AGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG</p>
<p>SEQ ID NO: 18</p>	<p>含有信号肽的人源                  化                  VEGF165-H988-10                  重链氨基酸序列</p>	<p>重链信号肽氨基酸序列(SEQ ID NO: 34):</p> <p>MGWSLILLFLVAVATRVLS</p> <p>重链可变区氨基酸序列(SEQ ID NO: 22):</p> <p>QSVQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGIDLSSYAISWVRQPPG                  KGLEIYIGYIWNAGNTYYASWAKGRVTISVDTSKNQVDL                  KLSSVTAADTAVYFCARGTLGDYNGMDPWGPGTLVTVS                  S</p> <p>人 IgG1 重链恒定区氨基酸序列(SEQ ID NO: 38):</p> <p>ASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS                  WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT                  YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG                  GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN                  WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW                  LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP                  PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY                  KTTTPVLDSGFSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE                  ALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO: 19</p>	<p>含有信号肽的人源                  化                  VEGF165-H988-10                  轻链氨基酸序列</p>	<p>轻链信号肽氨基酸序列(SEQ ID NO: 35):</p> <p>MGWSCILFLVATATGVHS</p> <p>轻链可变区氨基酸序列(SEQ ID NO: 23):</p> <p>ELQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQTIYANRRRLAWYQQ                  KPGKVPKLLIYGASTLASGVPSRFKSGSGTDFLTISL                  QPEDVATYYCAGYKSYDGDVDFGGGTKVEIK</p> <p>人 IgG1 轻链恒定区氨基酸序列(SEQ ID NO: 39):</p>

		RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 20	人 源 化 抗 体 VEGF165-H988-10 重链可变区核苷酸 序列	CAGTCTGTCCAGGAGTCTGGACCTGGACTGGTGAAGC CATCTGAGACCCTGTCCCTGACTTGTACTGTGTCTGGC ATTGACCTGTCCTCCTATGCCATCTCCTGGGTGAGACA ACCTCCTGGCAAGGGATTGGAATACATTGGCTACATCT GGAATGCTGGCAACACCTACTATGCCTCCTGGGCTAAG GGCAGGGTGACCATCTCTGTGGACACCAGCAAGAACC AGGTGGACCTGAAACTGTCCTCTGTGACAGCAGCAGA CACAGCAGTCTACTTCTGTGCCAGGGGCACCCTGGGA GACTACAATGGGATGGACCCATGGGGACCTGGCACCC TGGTGACAGTGTCCAGC
SEQ ID NO: 21	人 源 化 抗 体 VEGF165-H988-10 轻链可变区核苷酸 序列	GAACTCCAACTTACCCAGAGCCCATCCTCCCTGTCTGC CTCTGTGGGAGACAGGGTGACCATCACTTGTCAGTCC AGCCAGACCATCTATGCCAACAGGAGACTGGCTTGTA TCAACAGAAGCCTGGCAAGGTGCCAAAAGTCTGATT TATGGAGCCAGCACCCCTGGCATCTGGAGTGCCAAGCA GGTTCAAGGGCTCTGGCTCTGGCACAGACTTCACCCT GACCATCTCCTCCCTCCAACCTGAGGATGTGGCTACCT ACTACTGTGCTGGCTACAAGTCCTATGATGGAGATGAT GTGGGCTTTGGAGGAGGCACCAAGGTGGAGATTAAG
SEQ ID NO: 22	VEGF165-H988-10 重链可变区氨基酸 序列	QSVQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGIDLSSYAIWVRQPPG KGLEIYIYIWNAGNTYYASWAKGRVTISVDTSKNQVDL KLSSVTAADTAVYFCARGTLGDYNGMDPWGPGTLVTVS S
SEQ ID NO: 23	VEGF165-H988-10 轻链可变区氨基酸 序列	ELQLTQSPSSLSASVGDRVITTCQSSQTIYANRRRLAWYQQ KPGKVPKLLIYGASTLASGVPSRFKGSSTDFTLTISSL QPEDVATYYCAGYKSYDGDVGFVGGGKVEIK
SEQ ID NO: 24	人 源 化 抗 体 VEGF-H988 Fab 轻 链 CDR1 氨基酸序列	QSSKFLWQGRRLA
SEQ ID NO: 25	人 源 化 抗 体 VEGF-H988 Fab 轻	GASTLAS

	链 CDR2 氨基酸序列	
SEQ ID NO: 26	人 源 化 抗 体 VEGF-H988 Fab 轻 链 CDR3 氨基酸序列	AGYKSYDGDVVG
SEQ ID NO: 27	人 源 化 抗 体 VEGF-H988 Fab 重 链 CDR1 氨基酸序列	GIDLSSYAIS
SEQ ID NO: 28	人 源 化 抗 体 VEGF-H988 Fab 重 链 CDR2 氨基酸序列	YIWNDLFTYYASWAKG
SEQ ID NO: 29	人 源 化 抗 体 VEGF-H988 Fab 重 链 CDR3 氨基酸序列	ARGTLGDYGGMDP
SEQ ID NO: 30	人 源 化 抗 体 VEGF-H988 Fab 重 链氨基酸序列	重链可变区氨基酸序列(SEQ ID NO: 36): QSVQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGIDLSSYAISWVRQPPG KGLEIYIGYIWNDLFTYYASWAKGRVTISVDTSKNQVDLK LSSVTAADTAVYFCARGTLGDYGGMDPWGQGLVTVSS 人 IgG1 重链 CH1 恒定区的氨基酸序列(SEQ ID NO: 40): ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
SEQ ID NO: 31	人 源 化 抗 体 VEGF-H988 Fab 轻 链氨基酸序列	轻链可变区氨基酸序列(SEQ ID NO: 37): ELQLTQSPSSLSASVGDRVITTCQSSKFLWQGRRLAWYQ QKPGKVPKLLIYGASTLASGVPSRFKGSQSGTDFTLTIS LQPEDVATYYCAGYKSYDGDVVGFGGGTKVEIK 人 IgG1 轻链恒定区氨基酸序列(SEQ ID NO: 39): RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 32	含有信号肽的人源 化抗体 VEGF-H988 Fab 重链氨基酸序列	重链信号肽氨基酸序列(SEQ ID NO: 34): MGWSLILLFLVAVATRVLS 重链可变区氨基酸序列(SEQ ID NO: 36): QSVQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGIDLSSYAISWVRQPPG KGLEIYIGYIWNDLFTYYASWAKGRVTISVDTSKNQVDLK

		LSSVTAADTAVYFCARGTLGDYGGMDPWGQGTLVTVSS 人 IgG1 重链 CH1 恒定区的氨基酸序列(SEQ ID NO: 40): ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
SEQ ID NO: 33	含有信号肽的人源 化抗体 VEGF-H988 Fab 轻链氨基酸序列	轻链信号肽氨基酸序列(SEQ ID NO: 35): MGWSCILFLVATATGVHS 轻链可变区氨基酸序列(SEQ ID NO: 37): ELQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSKFLWQGRRLAWYQ QKPGKVPKLLIYGASTLASGVPSRFKGS SGTDFLT LQPEDVATYYCAGYKSYDGDVVGFGGGTKVEIK 人 IgG1 轻链恒定区氨基酸序列(SEQ ID NO: 39): RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 34	重链信号肽氨基酸 序列	MGWSLILLFLVAVATRVLS
SEQ ID NO: 35	轻链信号肽氨基酸 序列	MGWSCILFLVATATGVHS
SEQ ID NO: 36	人源化抗体 VEGF-H988 Fab 重 链可变区氨基酸序 列	QSVQESGPGLVK PSETLSLTCTVSGIDLSSY AISWVRQPPGKGLE YIGYIWN DLFTYYASWAK GRVTISVDTSKNQVDLK LSSVTAADTAVYFC ARGTLGDYGGMDPWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 37	人源化抗体 VEGF-H988 Fab 轻 链可变区氨基酸序 列	ELQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSKFLWQGRRLAWYQ QKPGKVPKLLIYGASTLASGVPSRFKGS SGTDFLT LQPEDVATYYCAGYKSYDGDVVGFGGGTKVEIK
SEQ ID NO: 38	人 IgG1 重链恒定区 氨基酸序列	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL P PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY

		KTPPPVLDSDGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 39	人 Kappa 轻链恒定区 氨基酸序列	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 40	人 IgG1 重链 CH1 恒 定区的氨基酸序列	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGLVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
SEQ ID NO: 41	含有信号肽的人源 化抗体 VEGF-H988 Fab 重链核苷酸序列	重链信号肽核苷酸序列(SEQ ID NO: 43): ATGGGCTGGTCCCTGATTCTGCTGTTCCCTGGTGGCTGT GGCTACCAGGGTGCTGAGT 重链可变区核苷酸序列(SEQ ID NO: 45): CAGTCTGTCCAGGAGTCTGGACCTGGACTGGTGAAGC CATCTGAGACCCTGTCCCTGACTTGTACTGTGTCTGGC ATTGACCTGTCCCTCCTATGCCATCTCCTGGGTGAGACA ACCTCCTGGCAAGGGATTGGAATACATTGGCTACATCT GGAATGATCTCTTCACCTACTATGCCTCCTGGGCTAAG GGCAGGGTGACCATCTCTGTGGACACCAGCAAGAACC AGGTGGACCTGAAACTGTCCTCTGTGACAGCAGCAGA CACAGCAGTCTACTTCTGTGCCAGGGGCACCCTGGGA GACTACGGCGGGATGGACCCATGGGGACAGGGCACCC TGGTGACAGTGTCCAGC 人 IgG1 重链 CH1 恒定区的核苷酸序列(SEQ ID NO: 49): GCAAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCAC CCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCT GGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTG ACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCG TGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCCTCAGGACTC TACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCA GCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAG CCCAAATCTTGTTAA
SEQ ID NO: 42	含有信号肽的人源 化抗体 VEGF-H988	轻链信号肽核苷酸序列(SEQ ID NO: 44): ATGGGCTGGTCCCTGTATCATCCTGTTCCCTGGTGGCTAC

	Fab 轻链核苷酸序列	<p>AGCCACAGGAGTGCATAGT</p> <p>轻链可变区核苷酸序列(SEQ ID NO: 46):</p> <p>GAACTCCAACCTTACCCAGAGCCCATCCTCCCTGTCTGCTCTCTGTGGGAGACAGGGTGACCATCACTTGTCAGTCCAGCAAGTTCCTCTGGCAGGGCAGGAGACTGGCTTGGTATCAACAGAAGCCTGGCAAGGTGCCAAAAGTCTGCTGATTTATGGAGCCAGCACCCCTGGCATCTGGAGTGCCAAGCAGGTTCAAGGGCTCTGGCTCTGGCACAGACTTCACCCTGACCATCTCCTCCCTCCAACCTGAGGATGTGGCTACCTACTACTGTGCTGGCTACAAGTCCTATGATGGAGATGTGTGGGCTTTGGAGGAGGCACCAAGGTGGAGATTAAG</p> <p>人 kappa 轻链恒定区的核苷酸序列(SEQ ID NO: 48):</p> <p>CGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGGCCAAA GTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA ACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAA</p>
SEQ ID NO: 43	重链信号肽核苷酸序列	<p>ATGGGCTGGTCCCTGATTCTGCTGTTCCCTGGTGGCTGTGGCTACCAGGGTGCTGAGT</p>
SEQ ID NO: 44	轻链信号肽核苷酸序列	<p>ATGGGCTGGTCCCTGTATCATCCTGTTCCCTGGTGGCTACAGCCACAGGAGTGCATAGT</p>
SEQ ID NO: 45	人源化抗体 VEGF-H988 Fab 重链可变区核苷酸序列	<p>CAGTCTGTCCAGGAGTCTGGACCTGGACTGGTGAAGCCATCTGAGACCCTGTCCCTGACTTGTACTGTGTCTGGCATTGACCTGTCCTCCTATGCCATCTCCTGGGTGAGACAACCTCCTGGCAAGGGATTGGAATACATTGGCTACATCTGGAATGATCTCTTCACCTACTATGCCTCCTGGGCTAAGGGCAGGGTGACCATCTCTGTGGACACCAGCAAGAACCAGGTGGACCTGAAACTGTCCTCTGTGACAGCAGCAGACACAGCAGTCTACTTCTGTGCCAGGGGCACCCCTGGGAGACTACGGCGGGATGGACCCATGGGGACAGGGCACCC</p>

		TGGTGACAGTGTCCAGC
SEQ ID NO: 46	人源化抗体 VEGF-H988 Fab 轻 链可变区核苷酸序 列	GAACTCCAACTTACCCAGAGCCCATCCTCCCTGTCTGC CTCTGTGGGAGACAGGGTGACCATCACTTGTCAGTCC AGCAAGTTCCTCTGGCAGGGCAGGAGACTGGCTTGGT ATCAACAGAAGCCTGGCAAGGTGCCAAAAGTGTCTGAT TTATGGAGCCAGCACCCCTGGCATCTGGAGTGCCAAGC AGGTTCAAGGGCTCTGGCTCTGGCACAGACTTCACCC TGACCATCTCCTCCCTCCAACCTGAGGATGTGGCTACC TACTACTGTGCTGGCTACAAGTCCTATGATGGAGATGT TGTGGGCTTTGGAGGAGGCACCAAGGTGGAGATTAAG
SEQ ID NO: 47	人 IgG1 重链恒定 区的核苷酸序列	GCAAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCAC CCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCT GGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTG ACGGTGTTCGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCG TGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTC TACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCA GCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAG CCCAAATCTTGTGACAAAAGTCAACATGCCACCGT GCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTT CCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCT CCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGT GAGCCACGAAGACCCCGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGT CAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAAT GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC TCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAA AGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCC CCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCC TGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAAC AACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACG GCTCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAG

		AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCG TGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAA GAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAA
SEQ ID NO: 48	人 kappa 轻链恒定区的核苷酸序列	CGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCC ATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTG TGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAA GTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA ACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGG ACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAG CAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGC GAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAA AGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAA
SEQ ID NO: 49	人 IgG1 重链 CH1 恒定区的核苷酸序列	GCAAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCAC CCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCT GGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTG ACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCG TGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTC TACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCA GCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAG CCCAAATCTTGTTAA
SEQ ID NO: 50	兔 抗 体 VEGF165-R988 scFv 氨基酸序列	VEGF165-R988 轻链可变区氨基酸序列(SEQ ID NO: 9): ELDLTQTPSPVSAVGGTVTINCQSSQTIYANRRLAWYQ QKPGQPPKLLIYGASTLASGVPSRFKSGSGTQFTLTISG VQCDDAATYYCAGYKSYDGDDVGFGGGTEVVVK 接头(SEQ ID NO: 51): SSGGGSGGGGGSSRSS VEGF165-R988 重链可变区氨基酸序列(SEQ ID NO: 8): QSVEESGGRLVTPGTPLTLCTVSGIDLSSYAISWVRQAP GKGLEIYIGYIWNAGNTYYASWAKGRFTISKSTTTVDLKI TSPTTEDTATYFCARGTLGDYNGMDPWGPGTLVTVSS
SEQ ID NO: 51	构建噬菌体抗体库 时所用兔抗体 scFv 的接头氨基酸序列	SSGGGSGGGGGSSRSS

SEQ ID NO:	含有信号肽的兔抗	重链信号肽核苷酸序列(SEQ ID NO: 43):
52	体 VEGF165-R988 重	ATGGGCTGGTCCCTGATTCTGCTGTTCCCTGGTGGCTGT
	链核苷酸序列	GGCTACCAGGGTGCTGAGT
		重链可变区核苷酸序列(SEQ ID NO: 4):
		<p>CAGTCGGTGGAGGAGTCCGGGGGTCGCTGGTAACGC  CTGGGACACCCCTGACACTCACCTGCACAGTCTCTGG  AATCGACCTCAGTAGCTATGCAATAAGCTGGGTCCGCC  AGGCTCCAGGAAGGGGCTGGAATACATCGGATACAT  TTGGAATGCTGGTAACACCTACTACGCGAGCTGGGCA  AAAGGCCGATTCACCATCTCCAAAACCTCGACCACGG  TGGATCTGAAAATCACCAGTCCGACAACCGAGGACAC  GGCCACCTATTTCTGTGCCAGAGGAACATTAGGGGACT  ACAATGGCATGGACCCCTGGGGCCAGGGACCCTCGT  CACCGTCTCTTCA</p>
		兔 IgG 重链恒定区核苷酸序列(SEQ ID NO: 6):
		<p>GGTCAACCTAAGGCTCCGTCAGTCTTCCCCTGGCCCC  CTGCTGCGGGGACACACCCAGCTCCACGGTGACCCTG  GGCTGCCTGGTCAAAGGCTACCTCCCGGAGCCAGTGA  CCGTGACCTGGAACCTCGGGCACCCCTACCAATGGGGT  ACGCACCTTCCCGTCCGTCCGGCAGTCCTCAGGCCTCT  ACTCGCTGAGCAGCGTGGTGAGCGTGACCTCAAGCAG  CCAGCCCGTCACCTGCAACGTGGCCCACCCAGCCACC  AACACCAAAGTGGACAAGACCGTTGCGCCCTCGACAT  GCAGCAAGCCCACGTGCCACCCCTGAACTCCTGGG  GGGACCGTCTGTCTTCATCTTCCCCCAAACCCAAGG  ACACCCTCATGATCTCACGCACCCCGAGGTCACATGC  GTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGATGACCCCGAGGTGC  AGTTCACATGGTACATAAACAACGAGCAGGTGCGCAC  CGCCCGCCCGCTACGGGAGCAGCAGTTCAACAGC  ACGATCCGCGTGGTCAGCACCCCTCCCATCGCGCACC  AGGACTGGCTGAGGGGCAAGGAGTTCAAGTGCAAAG  TCCACAACAAGGCACTCCCGGCCCCATCGAGAAAAC  CATCTCAAAGCCAGAGGGCAGCCCTGGAGCCGAAG  GTCTACACCATGGGCCCTCCCGGGAGGAGCTGAGCA</p>

		GCAGGTCGGTCAGCCTGACCTGCATGATCAACGGCTT CTACCCTTCCGACATCTCGGTGGAGTGGGAGAAGAAC GGGAAGGCAGAGGACAACACTACAAGACCACGCCGGCC GTGCTGGACAGCGACGGCTCCTACTTCCTCTACAGCA AGCTCTCAGTGCCCACGAGTGAGTGGCAGCGGGGCGA CGTCTTCACCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCTTGCACA ACCACTACACGCAGAAGTCCATCTCCCGCTCTCCGGGT AAATAA
SEQ ID NO: 53	含有信号肽的兔抗 体 VEGF165-R988 轻 链核苷酸序列	轻链信号肽核苷酸序列(SEQ ID NO: 44): ATGGGCTGGTCCTGTATCATCCTGTTCTGGTGGCTAC AGCCACAGGAGTGCATAGT 轻链可变区核苷酸序列(SEQ ID NO: 5): GAGCTCGATCTGACCCAGACTCCATCCCCGTGTCTGC GGCTGTTGGAGGCACAGTCACCATCAATTGCCAGTCC AGTCAGACTATTTATGCTAACAGGCGCTTAGCCTGGTAT CAACAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGATCT ATGGTGCATCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCGCGG TTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACTCTCA CCATCAGCGGCGTGCAGTGTGACGATGCTGCCACTTAC TACTGTGCAGGCTATAAAAGTTATGATGGTGATGATGTT GGTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTCGTCAA 兔 kappa 轻链恒定区核苷酸序列(SEQ ID NO: 7): GGGGATCCAGTTGCACCTACTGTCCTCATCTTCCCACC AGCTGCTGATCAGGTGGCAACTGGAACAGTCACCATC GTGTGTGTGGCGAATAAATACTTTCCCGATGTCACCGT CACCTGGGAGGTGGATGGCACCACCCAAACAACCTGGC ATCGAGAACAGTAAAACACCGCAGAATTCTGCAGATT GTACCTACAACCTCAGCAGCACTCTGACACTGACCAG CACACAGTACAACAGCCACAAAGAGTACACCTGCAAG GTGACCCAGGGCACGACCTCAGTCGTCCAGAGCTTCA ATAGGGGTGACTGTAA
SEQ ID NO: 54	含有信号肽的兔抗 体 VEGF165-R988 重 链氨基酸序列	重链信号肽氨基酸序列(SEQ ID NO: 34): MGWSLILLFLVAVATRVLS 重链可变区氨基酸序列(SEQ ID NO: 8):

		<p>QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGIDLSSYAISWVRQAP GKGGLEYIGYIWNAGNTYYASWAKGRFTISKSTTTVDLKI TSPTTEDTATYFCARGTLGDYNGMDPWGPGTLVTVSS</p>
		<p>重链恒定区氨基酸序列:</p>
		<p>GQPKAPSVFPLAPCCGDTSPSTVTLGCLVKGYLPEPVTV TWNSGTLTNGVRTFPSVRQSSGLYSLSSVSVTSSSQPVT CNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPTCPPPELLGGPSVFIFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQDDPEVQFTWYINNEQ VRTARPLREQQFNSTIRVVSTLPIAHQDWLRGKEFKCK VHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREELSSRS VSLTCMINGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTTPAVLDS GSYFLYSKLSVPTSEWQRGDVFTCSVMHEALHNHYTQK SISRSPGK</p>
<p>SEQ ID NO: 55</p>	<p>含有信号肽的兔抗 体 VEGF165-R988 轻 链氨基酸序列</p>	<p>轻链信号肽氨基酸序列(SEQ ID NO: 35): MGWSCILFLVATATGVHS 轻链可变区氨基酸序列(SEQ ID NO: 9): ELDLTQTPSPVSAVGGTVTINCQSSQTIYANRRLAWYQ QKPGQPPKLLIYGASTLASGVPSRFKGSQSGTQFTLTISG VQCDDAATYYCAGYKSYDGDVGFVGGGTEVVVK 轻链恒定区氨基酸序列 GDPVAPTVLIFPPAADQVATGTVTIVCVANKYFPDVTVT WEVDGTTQTTGIENSKTPQNSADCTYNLSSTLTLTSTQY NSHKEYTCKVTQGTTSVVQSFNRGDC</p>

## 权利要求书

1. 一种分离的抗 VEGF Fab 抗体片段，其包含具有 SEQ ID NO: 27 所示的氨基酸序列的重链 CDR1 域、具有 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列的重链 CDR2 域和具有 SEQ ID NO: 29 所示的氨基酸序列的重链 CDR3 域的重链可变区，和具有 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列的轻链 CDR1 域、具有 SEQ ID NO: 25 所示的氨基酸序列的轻链 CDR2 域和具有 SEQ ID NO: 26 所示的氨基酸序列的轻链 CDR3 域的轻链可变区。
2. 如权利要求 1 所述的抗 VEGF Fab 抗体片段，其包含具有 SEQ ID NO: 36 所示的氨基酸序列或与 SEQ ID NO: 36 至少 90%、92%、95%、98% 或 99% 序列同一性的氨基酸序列的重链可变区，和具有 SEQ ID NO: 37 所示的氨基酸序列或与 SEQ ID NO: 37 具有至少 90%、92%、95%、98% 或 99% 序列同一性的氨基酸序列的轻链可变区。
3. 如权利要求 1 或 2 所述的抗 VEGF Fab 抗体片段，其为 Fab 片段，所述 Fab 片段进一步包含重链恒定区 CH1 和轻链恒定区，优选地所述重链恒定区 CH1 为氨基酸序列为 SEQ ID NO: 40 的 IgG1 重链恒定区的氨基酸序列或与 SEQ ID NO: 40 具有至少 90%、92%、95%、98% 或 99% 序列同一性的氨基酸序列，和/或所述轻链恒定区为氨基酸序列为 SEQ ID NO: 39 的轻链恒定区的氨基酸序列或与 SEQ ID NO: 39 具有至少 90%、92%、95%、98% 或 99% 序列同一性的氨基酸序列。
4. 如权利要求 1-3 中任一项所述的抗 VEGF Fab 抗体片段，其进一步包含重链信号肽和轻链信号肽，优选地所述重链信号肽为氨基酸序列为 SEQ ID NO: 34 的氨基酸序列或与 SEQ ID NO: 34 具有至少 90%、92%、95%、98% 或 99% 序列同一性的氨基酸序列，和/或所述轻链信号肽为氨基酸序列为 SEQ ID NO: 35 的氨基酸序列或与 SEQ ID NO: 35 具有至少 90%、92%、95%、98% 或 99% 序列同一性的氨基酸序列。
5. 如权利要求 1-4 中任一项所述的抗 VEGF Fab 抗体片段，其为 IgG 抗体相关 Fab 抗体片段，优选为 IgG1 抗体相关 Fab 抗体片段。
6. 如权利要求 1-5 中任一项所述的抗 VEGF Fab 抗体片段，其为单克隆的。
7. 如权利要求 1-6 中任一项所述的抗 VEGF Fab 抗体片段，其与重组人 VEGF165 蛋白的结合亲和力 KD 为 0.01-8E-10M，优选 0.1-5E-10M，更优选 0.5-3E-10M，最优选 1.54E-10M。

8. 一种抗体-药物缀合物，其包含如权利要求 1-7 中任一项所述的抗 VEGF Fab 抗体片段和另外的治疗剂，优选地所述抗 VEGF Fab 抗体片段和所述另外的治疗剂通过接头连接。

5 9. 一种核酸，其编码根据权利要求 1-7 中任一项所述的抗 VEGF Fab 抗体片段。

10. 如权利要求 9 所述的核酸，其包含 SEQ ID NO: 45 所示的核苷酸序列和/或 SEQ ID NO: 46 所示的核苷酸序列；优选地，其进一步包含 SEQ ID NO: 49 所示的核苷酸序列和/或 SEQ ID NO: 48 所示的核苷酸序列；更优选地，其包含 SEQ ID NO: 41 所示的核苷酸序列和/或 SEQ ID NO: 42 所示的核苷酸序列。

11. 一种表达载体，其包含如权利要求 9 或 10 所述的核酸。

12. 一种宿主细胞，其包含如权利要求 9 或 10 所述的核酸或如权利要求 11 所述的表达载体。

13. 一种用于产生如权利要求 1-7 中任一项所述的抗 VEGF Fab 抗体片段的方法，其包括在适合于 Fab 抗体片段表达的条件下培养如权利要求 12 所述的宿主细胞，和从培养基中回收表达的 Fab 抗体片段。

14. 一种药物组合物，其包含如权利要求 1-7 中任一项所述的抗 VEGF Fab 抗体片段，或如权利要求 8 所述的抗体-药物缀合物，或如权利要求 9 或 10 所述的核酸，或如权利要求 11 所述的表达载体，及药学上可接受的载体。

15. 如权利要求 1-7 中任一项所述的抗 VEGF Fab 抗体片段或如权利要求 8 所述的抗体-药物缀合物或如权利要求 14 所述的药物组合物，其用于治疗与血管生成相关的病症。

16. 如权利要求 15 所述的抗 VEGF Fab 抗体片段或者抗体-药物缀合物或者药物组合物，其中所述与血管生成相关的病症是眼病。

17. 如权利要求 16 所述的抗 VEGF Fab 抗体片段或者抗体-药物缀合物或者药物组合物，其中所述眼病是以脉络膜新生血管为特征的眼病，包括年龄相关性老年黄斑变性（AMD）、糖尿病性黄斑水肿（DME）、视网膜水肿、退行性近视、脉络膜新生血管（CNV）。

18. 一种用于治疗与血管生成相关的病症的方法，其包括向需要的受试者施用治疗有效量的如权利要求 1-7 中任一项所述的抗 VEGF Fab 抗体片段或如权利要求 8 所述的抗体-药物缀合物或如权利要求 14 所述的药物组合物，从而治疗所述与血管生成相关的病症。

19. 如权利要求 18 所述的方法，其中所述与血管生成相关的病症是眼病。

20. 如权利要求 19 所述的方法，其中所述眼病是以脉络膜新生血管为特征的眼病，包括年龄相关性老年黄斑变性（AMD）、糖尿病性黄斑水肿（DME）、视网膜水肿、退行性近视、脉络膜新生血管（CNV）。

5 21. 如权利要求 1-7 中任一项所述的抗 VEGF Fab 抗体片段或如权利要求 8 所述的抗体-药物缀合物或如权利要求 14 所述的药物组合物在制备用于治疗与血管生成相关的病症的药物中的用途。

22. 如权利要求 21 所述的用途，其中所述与血管生成相关的病症是眼病。

10 23. 如权利要求 22 所述的用途，其中所述眼病是以脉络膜新生血管为特征的眼病，包括年龄相关性老年黄斑变性（AMD）、糖尿病性黄斑水肿（DME）、视网膜水肿、退行性近视、脉络膜新生血管（CNV）。

24. 一种药物组合，其包含如权利要求 1-7 中任一项所述的抗 VEGF Fab 抗体片段或如权利要求 8 所述的抗体-药物缀合物或如权利要求 14 所述的药物组合物与一种或多种另外的治疗剂。

15 25. 一种试剂盒，其包含如权利要求 1-7 中任一项所述的抗 VEGF Fab 抗体片段或如权利要求 8 所述的抗体-药物缀合物或如权利要求 14 所述的药物组合物，优选地，还进一步包含给药装置。

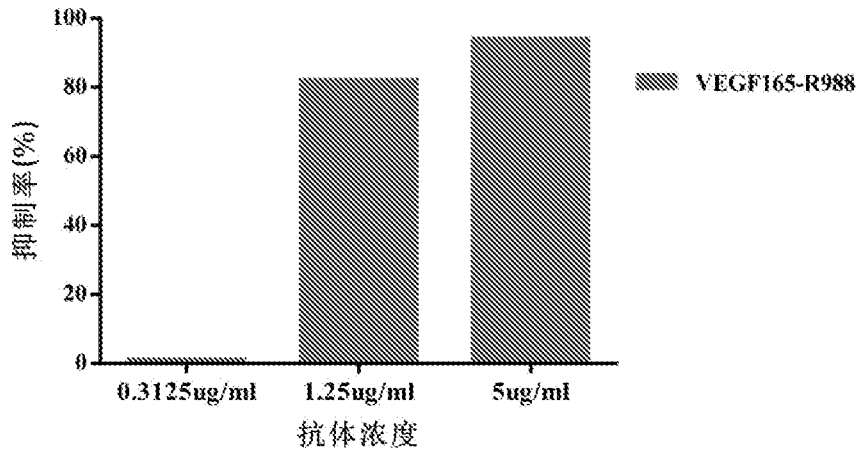


图 1

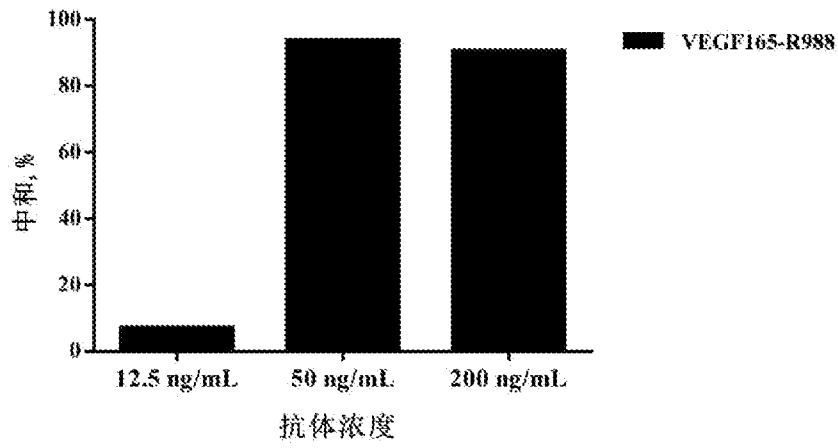


图 2

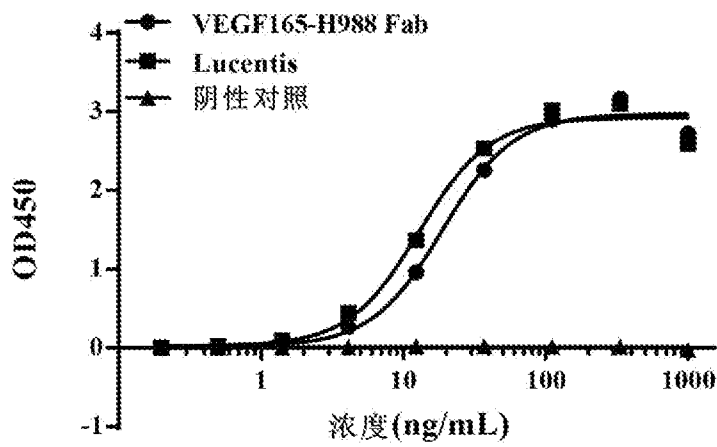


图 3

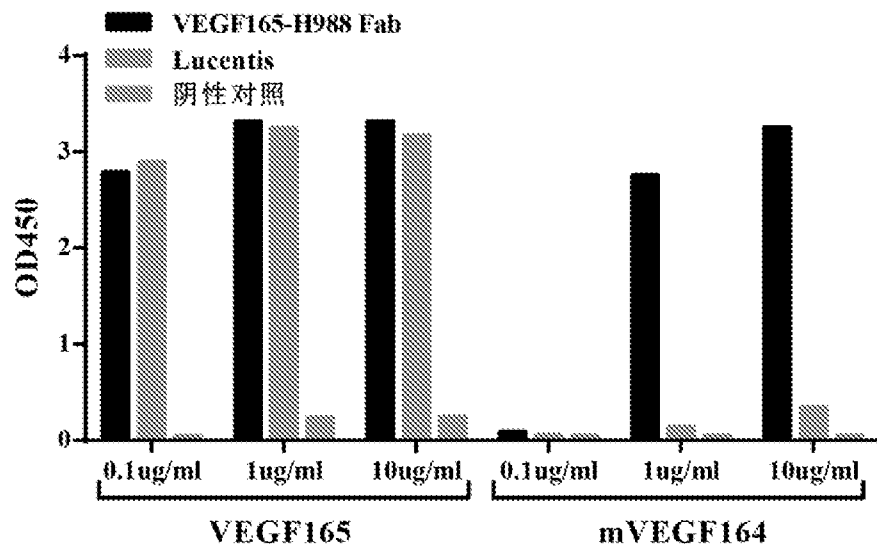


图 4

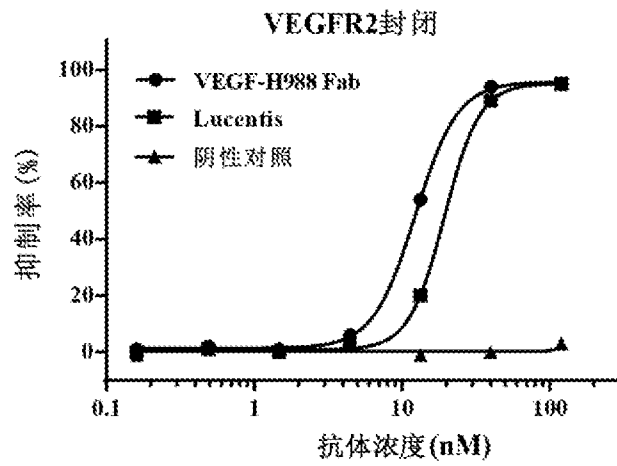


图 5

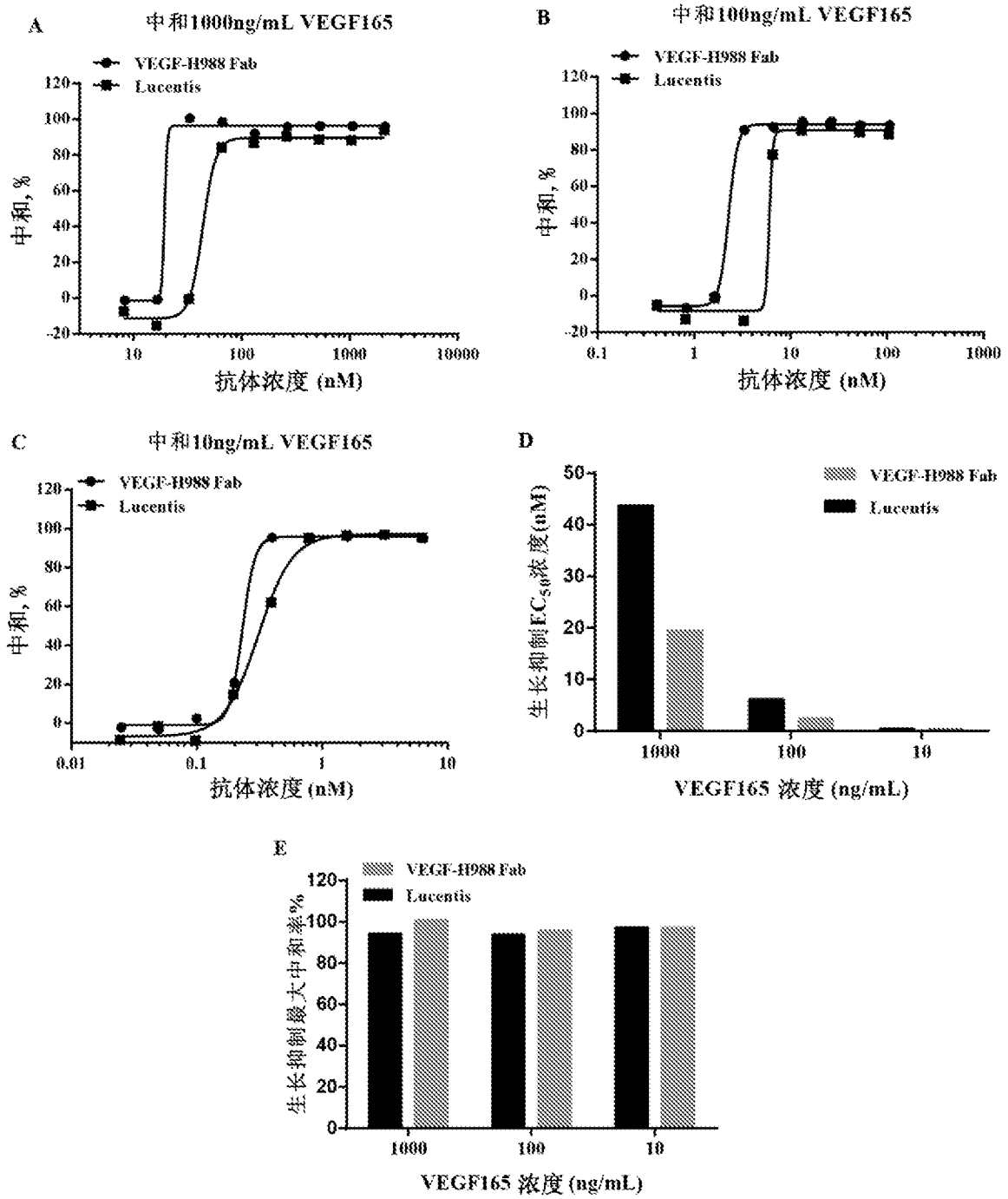


图6

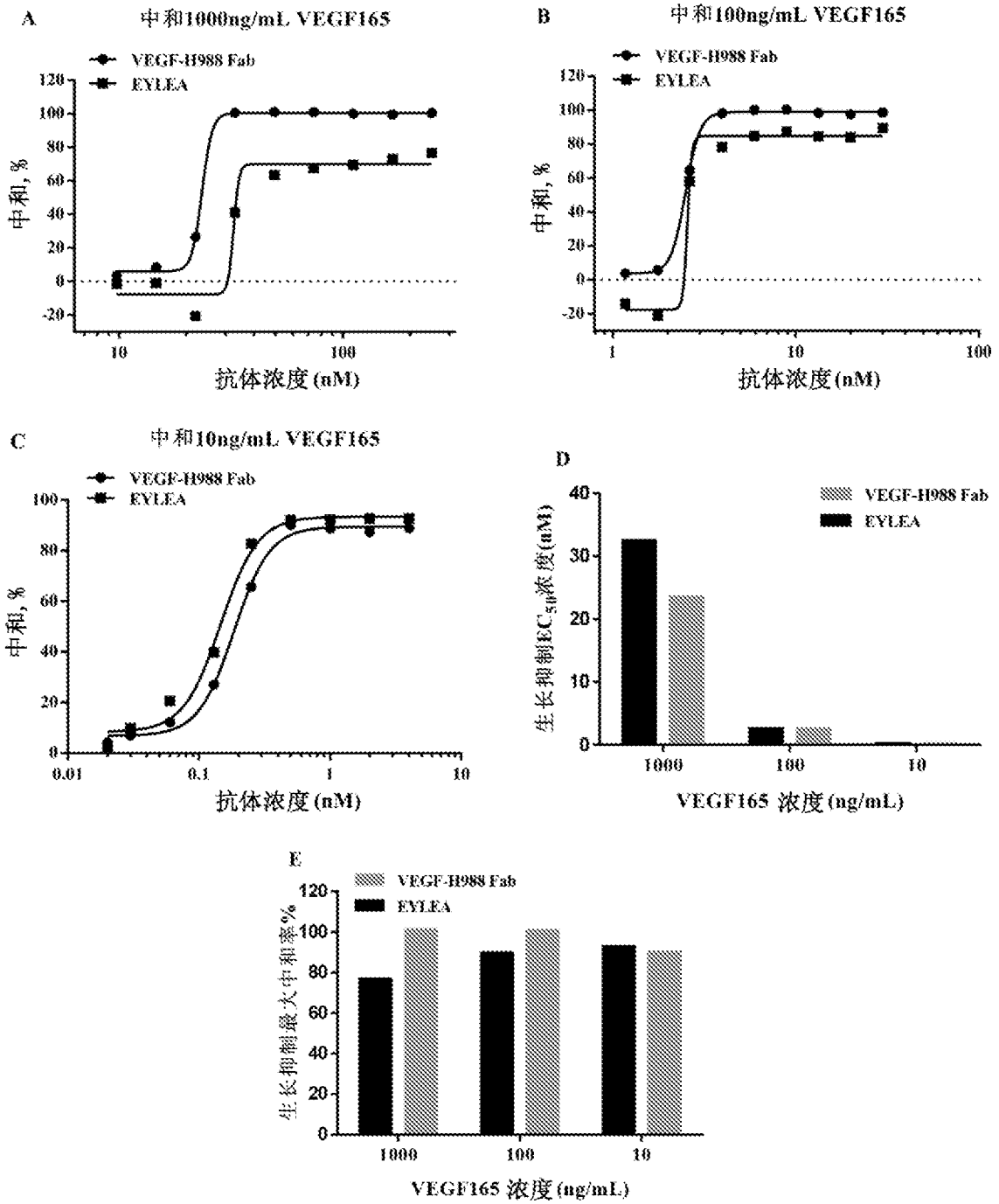


图 7

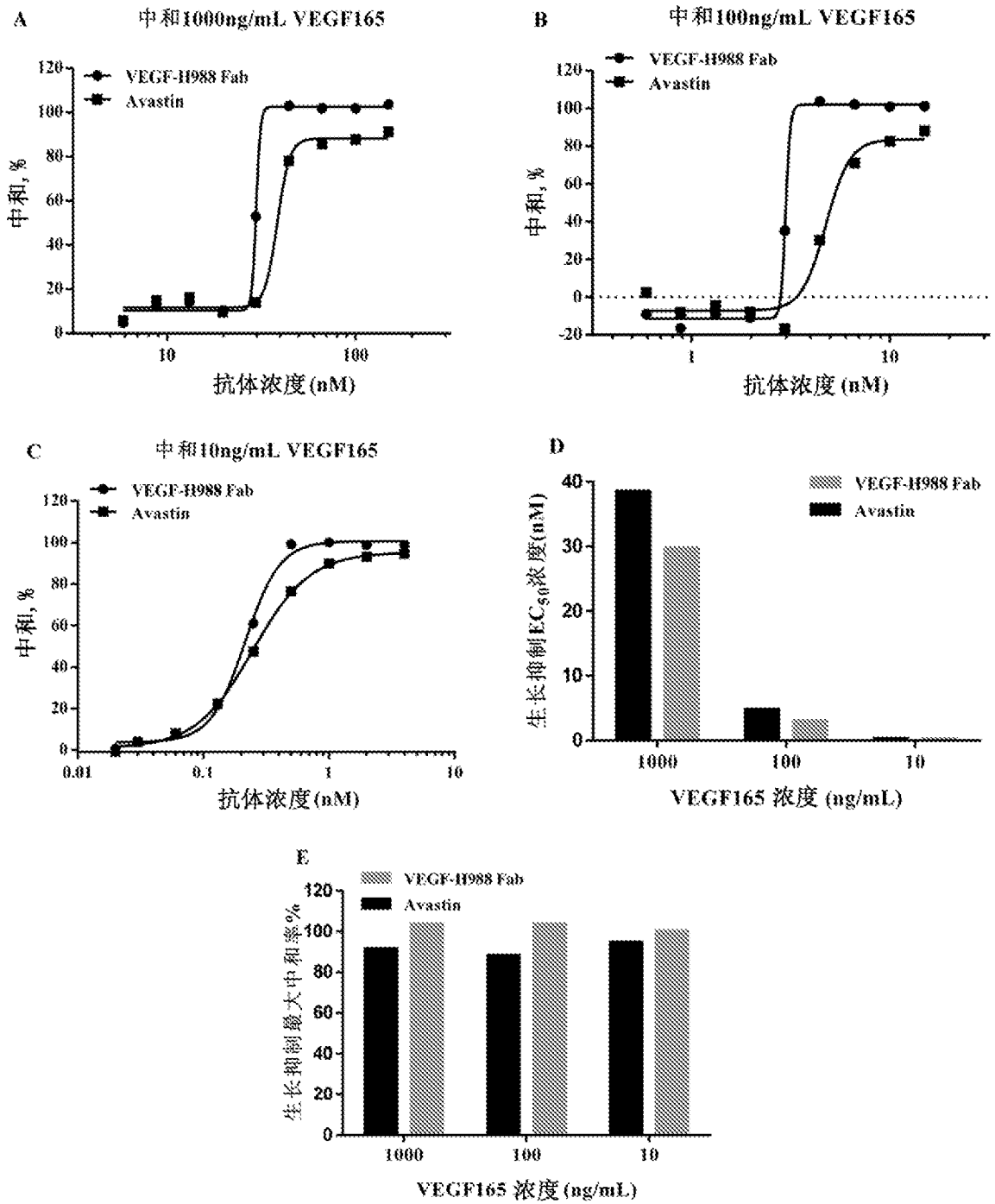


图 8

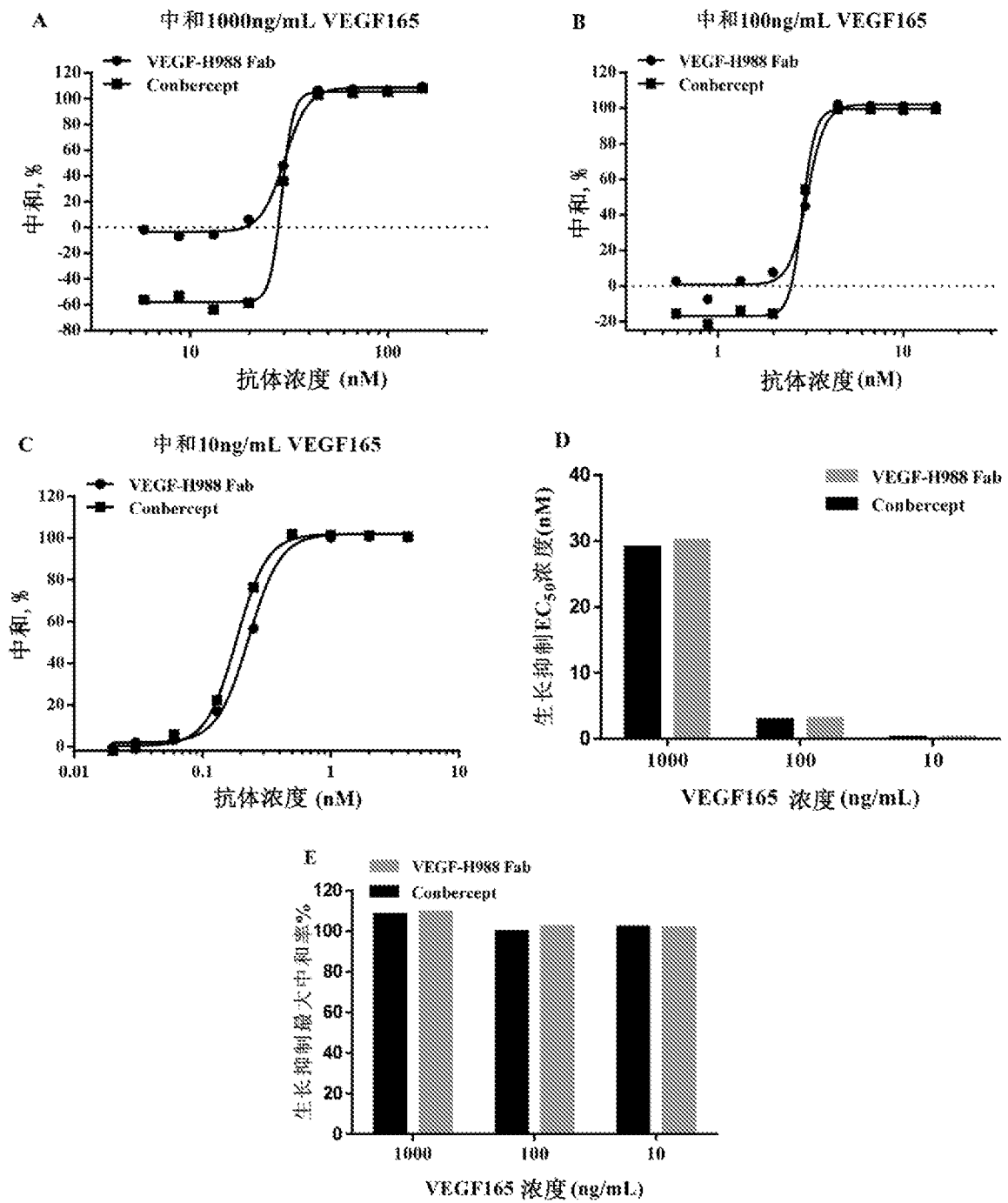
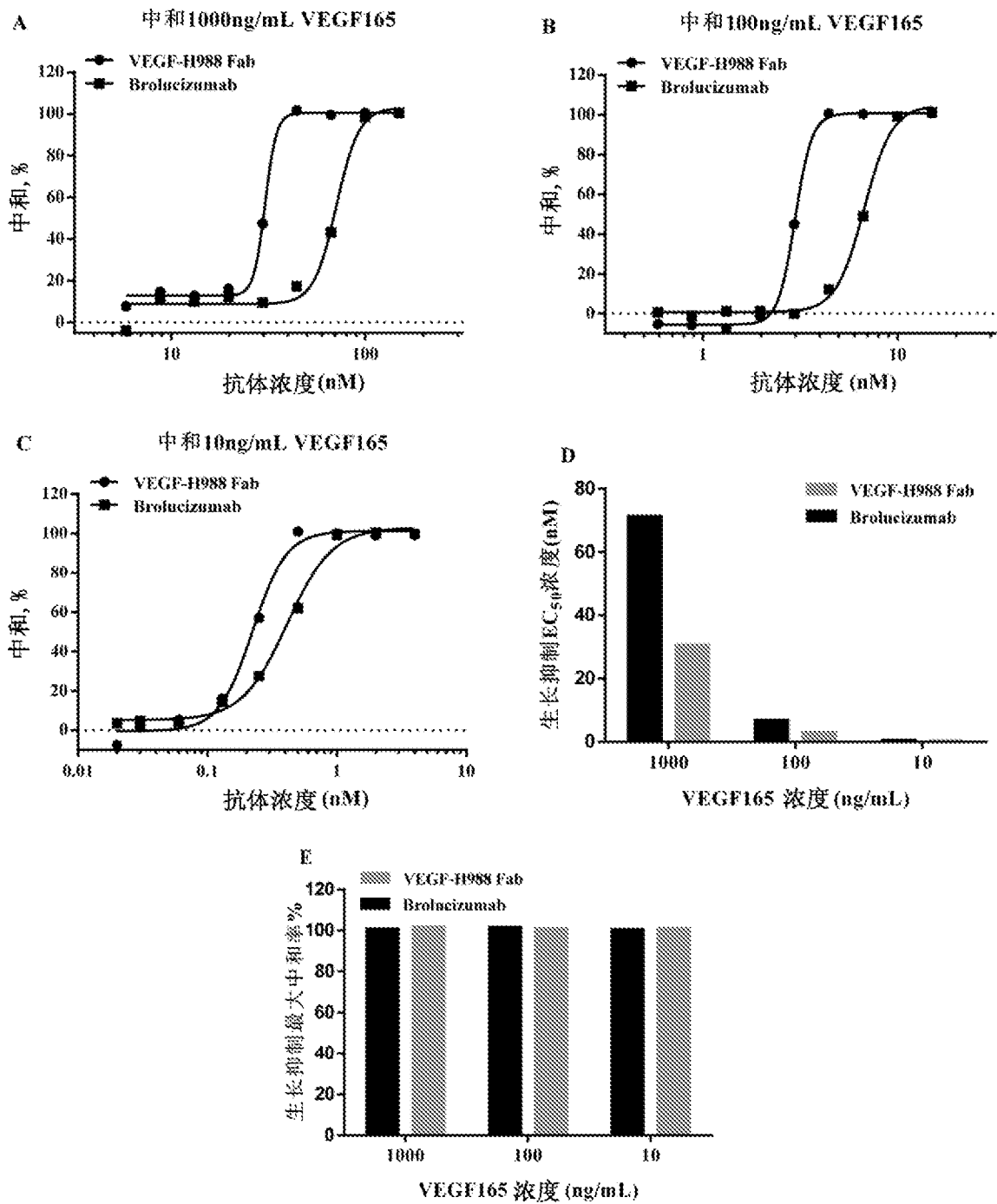


图 9



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/102560

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
C07K 16/22(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 27/02(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS; CNTXT; VEN; WOTXT; EPTXT; USTXT; CNKI; ISI Web of Science; 中国专利生物序列检索系统; GenBank; EMBL; DDBJ; STN; search based on sequences 16-49, 神州细胞, 谢良志, 孙春昀, 赵俊, 孔德生, 血管内皮生长因子, 抗体, 互补决定区, SINOCELLTECH, xie liangzhi, sun chunyun, zhao jun, kong desheng, VEGF, Vascular endothelial growth factor, antibody, CDR, complementary determining region, QSSKFLWQGRRLA, GASTLAS, AGYKSYDGDVVG, GIDLSSY AIS, YIWNDFLYYASWAKG, ARGTLGDYGGMDP		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 104761643 A (GENENTECH, INC.) 08 July 2015 (2015-07-08) claims 1-42 and sequence table	1-17, 21-25
A	CN 102286101 A (CHANGZHOU ADAM BIOTECH INC.) 21 December 2011 (2011-12-21) entire document	1-17, 21-25
A	CN 1946422 A (ABMAXIS INC.) 11 April 2007 (2007-04-11) entire document	1-17, 21-25
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&amp;” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search <b>02 September 2020</b>		Date of mailing of the international search report <b>12 October 2020</b>
Name and mailing address of the ISA/CN <b>China National Intellectual Property Administration (ISA/ CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088 China</b>		Authorized officer
Facsimile No. <b>(86-10)62019451</b>		Telephone No.

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
  - a.  forming part of the international application as filed:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
    - on paper or in the form of an image file.
  - b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
  - c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
    - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: **18-20**  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  - [1] The subject matter of claim 18 is a method for treating an angiogenesis-related illness, and is a method for treatment of the human or animal body. Claim 18 belongs to subject matter which does not require a search by an international searching authority, as defined by PCT Rule 39.1(iv).
  - [2] Claims 19-20 refer to claim 18, and similarly belong to subject matter which does not require a search by an international searching authority, as defined by PCT Rule 39.1(iv).
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2020/102560**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	104761643	A	08 July 2015	US	2013266581	A1	10 October 2013
				KR	20060067950	A	20 June 2006
				SG	193170	A1	30 September 2013
				KR	20160052799	A	12 May 2016
				US	7811785	B2	12 October 2010
				AU	2004262006	C1	18 October 2012
				CA	2533297	C	07 June 2016
				SG	145725	A1	29 September 2008
				KR	20130098436	A	04 September 2013
				US	7691977	B2	06 April 2010
				KR	101644717	B1	01 August 2016
				US	9353177	B2	31 May 2016
				CA	2932216	A1	10 February 2005
				US	2005106667	A1	19 May 2005
				NZ	575674	A	27 August 2010
				JP	2007526756	A	20 September 2007
				US	8092797	B2	10 January 2012
				KR	20120074336	A	05 July 2012
				WO	2005012359	A2	10 February 2005
				NO	20061014	A	24 April 2006
				JP	2011046732	A	10 March 2011
				US	8492527	B2	23 July 2013
				WO	2005012359	A3	15 December 2005
				US	2012322982	A1	20 December 2012
				JP	5162644	B2	13 March 2013
				KR	20140048973	A	24 April 2014
				EA	012835	B1	30 December 2009
				US	2007141065	A1	21 June 2007
				US	2010189719	A1	29 July 2010
				EP	2420512	A2	22 February 2012
				KR	101446849	B1	15 October 2014
				EP	2420512	A3	21 August 2013
				US	2017073405	A1	16 March 2017
				KR	101359142	B1	07 February 2014
				AU	2004262006	B2	22 December 2011
				US	9018357	B2	28 April 2015
				US	2011020346	A1	27 January 2011
				JP	4845732	B2	28 December 2011
				EP	1648939	A2	26 April 2006
				US	8975381	B2	10 March 2015
				US	8512699	B2	20 August 2013
				US	8101177	B2	24 January 2012
				US	7758859	B2	20 July 2010
				US	2015232549	A1	20 August 2015
				US	2015175689	A1	25 June 2015
				US	2013315918	A1	28 November 2013
				US	2011014198	A1	20 January 2011
				US	2009023602	A1	22 January 2009
				US	2007020267	A1	25 January 2007
				US	2006280747	A1	14 December 2006

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2020/102560**

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		SG 119497 B	30 September 2008
		SG 119497 A1	28 March 2006
		PH 12006500245 B1	29 June 2012
		NZ 545135 A	30 October 2009
		MX 281243 B	23 November 2010
		MX 2006001319 A1	01 May 2006
		KR 20110059806 A	03 June 2011
		IN 237795 B	15 January 2010
		IN 200903571 P1	16 April 2010
		IN 200601101 P1	10 August 2007
		IL 243914 A1	31 March 2016
		HK 1211600 A0	27 May 2016
		HK 1167266 A0	23 November 2012
		CN 1863818 B	28 September 2016
		CN 1863818 A	15 November 2006
		BR 200412637 A	26 September 2006
		AU 2014259593 A1	27 November 2014
		AU 2012201667 B2	27 November 2014
		AU 2012201667 A1	12 April 2012
		AU 2004262006 A2	20 July 2006
		IL 173317 A	30 May 2013
		AU 2004262006 A1	16 February 2006
CN 102286101	A 21 December 2011	CN 102286101 B	08 May 2013
CN 1946422	A 11 April 2007	CN 101602806 A	16 December 2009
		CN 101899113 A	01 December 2010
		EP 1699484 A4	29 October 2008
		EP 1699484 A2	13 September 2006
		WO 2005054273 A2	16 June 2005
		WO 2005054273 A3	26 January 2006
		JP 2008504215 A	14 February 2008
		KR 20070036018 A	02 April 2007
		AU 2004295339 A1	22 June 2006
		IN 200903627 P1	07 May 2010
		SG 122574 A1	29 June 2006
		IN 200602938 P1	03 August 2007

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/102560

<p><b>A. 主题的分类</b></p> <p>C07K 16/22 (2006.01)i; A61K 39/395 (2006.01)i; A61P 27/02 (2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>														
<p><b>B. 检索领域</b></p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C07K A61K A61P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNABS;CNTXT;VEN;WOTXT;EPTXT;USTXT;CNKI;ISI Web of Science;中国专利生物序列检索系统;GenBank;EMBL;DDBJ;STN:基于序列16-49的检索, 神州细胞, 谢良志, 孙春昀, 赵俊, 孔德生, 血管内皮生长因子, 抗体, 互补决定区, SINOCELLTECH, xie liangzhi, sun chunyun, zhao jun, kong desheng, VEGF, Vascular endothelial growth factor, antibody, CDR, complementary determining region, QSSKFLWQGRRLA, GASTLAS, AGYKSYDGDVVG, GIDLSSYAIS, YIWNDLFTYYASWAKG, ARGTLGDYGGMDP</p>														
<p><b>C. 相关文件</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>CN 104761643 A (健泰科生物技术公司) 2015年 7月 8日 (2015 - 07 - 08) 权利要求1-42及序列表</td> <td>1-17、21-25</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 102286101 A (常州亚当生物技术有限公司) 2011年 12月 21日 (2011 - 12 - 21) 全文</td> <td>1-17、21-25</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 1946422 A (埃博马可西斯公司) 2007年 4月 11日 (2007 - 04 - 11) 全文</td> <td>1-17、21-25</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	A	CN 104761643 A (健泰科生物技术公司) 2015年 7月 8日 (2015 - 07 - 08) 权利要求1-42及序列表	1-17、21-25	A	CN 102286101 A (常州亚当生物技术有限公司) 2011年 12月 21日 (2011 - 12 - 21) 全文	1-17、21-25	A	CN 1946422 A (埃博马可西斯公司) 2007年 4月 11日 (2007 - 04 - 11) 全文	1-17、21-25
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求												
A	CN 104761643 A (健泰科生物技术公司) 2015年 7月 8日 (2015 - 07 - 08) 权利要求1-42及序列表	1-17、21-25												
A	CN 102286101 A (常州亚当生物技术有限公司) 2011年 12月 21日 (2011 - 12 - 21) 全文	1-17、21-25												
A	CN 1946422 A (埃博马可西斯公司) 2007年 4月 11日 (2007 - 04 - 11) 全文	1-17、21-25												
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>														
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>“&amp;” 同族专利的文件</p>														
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2020年 9月 2日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2020年 10月 12日</p>												
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>柳洋洋</p> <p>电话号码 (86-512) 88996554</p>												

## 第1栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列列表进行的:
  - a.  作为国际申请的一部分提交的:
    - 附件C/ST. 25文本文件形式
    - 纸件或图形文件形式
  - b.  根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:
  - c.  仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:
    - 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))
    - 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)
2.  另外,在提交/提供了多个版本或副本的序列列表的情况下,提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。
3. 补充意见:

## 第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1.  权利要求： 18-20  
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
  - [1] 权利要求18的主题是一种用于治疗与血管生成相关的病症的方法，是对有生命的人体或动物体的治疗方法。属于PCT细则39.1(iv)定义的不要求国际检索单位检索的主题。
  - [2] 权利要求19-20引用权利要求18，同样属于PCT细则39.1(iv)定义的不要求国际检索单位检索的主题。
2.  权利要求：  
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3.  权利要求：  
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/102560

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN 104761643 A	2015年 7月 8日	US 2013266581 A1	2013年 10月 10日
		KR 20060067950 A	2006年 6月 20日
		SG 193170 A1	2013年 9月 30日
		KR 20160052799 A	2016年 5月 12日
		US 7811785 B2	2010年 10月 12日
		AU 2004262006 C1	2012年 10月 18日
		CA 2533297 C	2016年 6月 7日
		SG 145725 A1	2008年 9月 29日
		KR 20130098436 A	2013年 9月 4日
		US 7691977 B2	2010年 4月 6日
		KR 101644717 B1	2016年 8月 1日
		US 9353177 B2	2016年 5月 31日
		CA 2932216 A1	2005年 2月 10日
		US 2005106667 A1	2005年 5月 19日
		NZ 575674 A	2010年 8月 27日
		JP 2007526756 A	2007年 9月 20日
		US 8092797 B2	2012年 1月 10日
		KR 20120074336 A	2012年 7月 5日
		WO 2005012359 A2	2005年 2月 10日
		NO 20061014 A	2006年 4月 24日
		JP 2011046732 A	2011年 3月 10日
		US 8492527 B2	2013年 7月 23日
		WO 2005012359 A3	2005年 12月 15日
		US 2012322982 A1	2012年 12月 20日
		JP 5162644 B2	2013年 3月 13日
		KR 20140048973 A	2014年 4月 24日
		EA 012835 B1	2009年 12月 30日
		US 2007141065 A1	2007年 6月 21日
		US 2010189719 A1	2010年 7月 29日
		EP 2420512 A2	2012年 2月 22日
		KR 101446849 B1	2014年 10月 15日
		EP 2420512 A3	2013年 8月 21日
		US 2017073405 A1	2017年 3月 16日
		KR 101359142 B1	2014年 2月 7日
		AU 2004262006 B2	2011年 12月 22日
		US 9018357 B2	2015年 4月 28日
		US 2011020346 A1	2011年 1月 27日
		JP 4845732 B2	2011年 12月 28日
		EP 1648939 A2	2006年 4月 26日
		US 8975381 B2	2015年 3月 10日
		US 8512699 B2	2013年 8月 20日
		US 8101177 B2	2012年 1月 24日
		US 7758859 B2	2010年 7月 20日
		US 2015232549 A1	2015年 8月 20日
		US 2015175689 A1	2015年 6月 25日
		US 2013315918 A1	2013年 11月 28日
		US 2011014198 A1	2011年 1月 20日
		US 2009023602 A1	2009年 1月 22日
		US 2007020267 A1	2007年 1月 25日
		US 2006280747 A1	2006年 12月 14日

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/102560

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
		SG 119497 B	2008年 9月 30日
		SG 119497 A1	2006年 3月 28日
		PH 12006500245 B1	2012年 6月 29日
		NZ 545135 A	2009年 10月 30日
		MX 281243 B	2010年 11月 23日
		MX 2006001319 A1	2006年 5月 1日
		KR 20110059806 A	2011年 6月 3日
		IN 237795 B	2010年 1月 15日
		IN 200903571 P1	2010年 4月 16日
		IN 200601101 P1	2007年 8月 10日
		IL 243914 A1	2016年 3月 31日
		HK 1211600 A0	2016年 5月 27日
		HK 1167266 A0	2012年 11月 23日
		CN 1863818 B	2016年 9月 28日
		CN 1863818 A	2006年 11月 15日
		BR 200412637 A	2006年 9月 26日
		AU 2014259593 A1	2014年 11月 27日
		AU 2012201667 B2	2014年 11月 27日
		AU 2012201667 A1	2012年 4月 12日
		AU 2004262006 A2	2006年 7月 20日
		IL 173317 A	2013年 5月 30日
		AU 2004262006 A1	2006年 2月 16日
CN 102286101 A	2011年 12月 21日	CN 102286101 B	2013年 5月 8日
CN 1946422 A	2007年 4月 11日	CN 101602806 A	2009年 12月 16日
		CN 101899113 A	2010年 12月 1日
		EP 1699484 A4	2008年 10月 29日
		EP 1699484 A2	2006年 9月 13日
		WO 2005054273 A2	2005年 6月 16日
		WO 2005054273 A3	2006年 1月 26日
		JP 2008504215 A	2008年 2月 14日
		KR 20070036018 A	2007年 4月 2日
		AU 2004295339 A1	2006年 6月 22日
		IN 200903627 P1	2010年 5月 7日
		SG 122574 A1	2006年 6月 29日
		IN 200602938 P1	2007年 8月 3日