

(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
2015 年 7 月 30 日 (30.07.2015)



(10) 国际公布号
WO 2015/109898 A1

(51) 国际专利分类号:

C07K 19/00 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)
C07K 14/475 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01) A61P 27/02 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2014/093555

(22) 国际申请日: 2014 年 12 月 11 日 (11.12.2014)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201410033821.5 2014 年 1 月 24 日 (24.01.2014) CN

(71) 申请人: 上海恒瑞医药有限公司 (SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [CN/CN]; 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。江苏恒瑞医药股份有限公司 (JI-ANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路 7 号, Jiangsu 222047 (CN)。

(72) 发明人: 屈向东 (QU, Xiangdong); 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。曹国庆 (CAO, Guoqing); 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。叶鑫 (YE, Xin); 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。陈侃 (CHEN, Kan); 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。张蕾 (ZHANG, Lei); 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。许志宾 (XU, Zhibin); 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。袁纪军 (YUAN, Jijun); 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。张连山 (ZHANG, Lianshan); 中国上海市闵

行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。潘琴 (PAN, Qin); 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。管雁宾 (GUAN, Yanbin); 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。

(74) 代理人: 北京戈程知识产权代理有限公司 (GE CHENG & CO., LTD.); 中国北京市东城区东长安街 1 号东方广场东三办公楼 19 层, Beijing 100738 (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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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, 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))。

(54) Title: VEGF AND PDGFRB BISPECIFIC FUSION PROTEIN AND USE THEREOF

(54) 发明名称: VEGF 与 PDGFR β 双特异性融合蛋白及其用途

(57) Abstract: Provided are a VEGF and PDGFR β bispecific fusion protein and a use thereof. More particularly, provided is a dual functional fusion protein comprising a VEGFR extracellular ligand binding domain and a PDGFR β antibody fragment, which can be used for treating wet age-related macular degeneration (AMD) and any other diseases which can be ameliorated by inhibiting the VEGF and PDGF signaling pathways, such as tumours and diabetic retinopathy.

(57) 摘要: 提供的是 VEGF 与 PDGFR β 双特异性融合蛋白及其用途。更具体地, 提供了包含 VEGFR 胞外配体结合结构域和 PDGFR β 抗体片段的双功能融合蛋白, 可用于治疗湿性老年性黄斑变性 (AMD) 以及其他任何能够通过抑制 VEGF 和 PDGF 信号通路改善的疾病, 比如肿瘤和糖尿病视网膜病变。



WO 2015/109898 A1

VEGF 与 PDGFR β 双特异性融合蛋白及其用途

技术领域

5 本发明涉及一种 VEGF 与 PDGFR β 双特异性融合蛋白，包含其药物组合物及其用途。

背景技术

10 老年性黄斑变性（AMD）是一种致残、致盲性疾病。其主要影响黄斑区或视网膜中负责高视敏度视力的中心区域，并且是导致老年人不可逆性视力丧失的原因。据统计，全世界超过 3000 万人罹患此病。随着中国人口老龄化逐渐加剧，目前该疾病已严重危害我国人民群众的生命健康。

15 AMD 有两种形式，干性 AMD 和湿性 AMD。虽然干性 AMD 更常见，但一般导致较轻的、较缓慢的视力丧失。湿性 AMD 患者的视网膜之下生成新血管。当感光细胞和视网膜色素上皮细胞（RPE）细胞慢慢退化时，血管趋于从脉络膜中的正常位置发展到视网膜之下的异常位置。这种异常的新血管生长被称为脉络膜新生血管（CNV）。这些异常血管渗漏流血，导致出血、肿胀、瘢痕组织和严重的视力丧失。只有 10%左右的 AMD 患者是湿性类型，但是却大约占 AMD 所导致的失明总数的 90%。湿性老年视黄斑变性（AMD）已经成为 65 岁以上老年人失明的首要
20 威胁。

目前批准用于治疗湿性 AMD 的治疗方法包括激光凝固法、光动力疗法和用于降低过剩 VEGF 的水平、或阻断 VEGF 生成的抗血管药物疗法。

25 根据部位，有时可以使用激光治疗来破坏湿性 AMD 中形成的异常血管。只有 15%的湿性 AMD 适合采用激光治疗，因为血管不能离黄斑部的中内区域太近。激光是光束，由血液色素、药物和 PRE 细胞所吸收，并转化为热能而烧灼异常血管。由于刺激物依然没有被去除，新生血管形成时常反复，导致视力丧失。光动力疗法主要通过静脉注入光敏药物，继而采用特定波长的非热能激光照射脉络膜新生血管病灶，将光敏药物活化。用光动力疗法治疗湿性 AMD，只能稳定或降低湿性 AMD 视力下降的风险。由于并非对因治疗，光动力疗法不能阻止复发的可能，一
30 般需要多次治疗。而且，治疗后要避光 48 小时，以免发生光敏反应，造成皮肤灼伤。因此，给患者带来很多痛苦。

血小板衍生长因子家族包括血小板生长因子（PDGF）和血管内皮细胞因子（VEGF）。每种生长因子均可由多种细胞产生，其受体均为酪氨酸激酶（RTK）型受体。血小板衍生长因子家族成员包括：PDGFA、PDGFB、PDGFC、PDGFD、
35 胎盘生长因子（Placental growth factor, PGF）以及血管内皮生长因子（VEGF、VEGF41、VEGFB、VEGFC、FIGF（也作 VEGFD））等。

VEGF 是血管内皮细胞强有力和特有的促有丝分裂原,可促进血管生成过程的所有环节。在几个研究血管生成的体内试验中, VEGF 均可诱导血管新生。在对体外培养的血管和淋巴管内皮细胞的试验中, VEGF 能促进内皮细胞增殖、迁移及管状结构形成。VEGF 可以增加毛细血管及后微静脉的渗透性。皮肤或肌肉注射后, 5 能迅速诱导连续性的内皮结构破坏 (Xie K, Wei D, Huag S. Transcriptional anti-angiogenesis therapy of human pancreatic cancer [J]. Cytokine Growth Factor Rev 2006, 17:147-156)。各 VEGF 受体(VEGFR)的作用有所不同。VEGFR-2 起着调节内皮生长、分化、渗透性的作用;而 VEGFR-1 则与调节内皮细胞移动、聚集有关, 并且通过 VEGFR-2 抑制信号的传导。VEGFR-3 对于血管发育可能也有作用, 但 10 更独特的是其在淋巴管组织中表达, 可能对淋巴系统生成有重要作用(Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, et al. A novel vascular endothelial growth factor VEGF-C is a ligand for the Flt4 and KDR receptor tyrosine kinases [J]. EMBO J, 2003, 15(2): 290-298)。

VEGF 通过 VEGFR 发挥生物学效应。VEGF 与 VEGFR 结合, 使 VEGFR 二 15 聚体化、自我磷酸化, 通过多个细胞内途径传递信号(包括 MAPK、PI3 激酶、Ras 和磷脂酶 C 途径等), 最终发挥作用。迄今, 已发现 VEGF 有 3 个受体 VEGFR-1(Flt-1)、VEGFR-2(Flk-1)和 VEGFR-3(Flt-4)。前两者主要在内皮细胞中表达, 在肿瘤细胞中也有表达, 而 VEGFR-3 主要在淋巴管组织中表达。其中前 2 个受体与 VEGF-A 亲和力高, 属酪氨酸激酶家族。与 VEGF-A 结合导致其本身二聚 20 化、胞内段酪氨酸自磷酸化、随后激活下游信号蛋白而发挥其生理功能。前两者主要在内皮细胞中表达, 在肿瘤细胞中也有表达, 而 VEGFR-3 主要在淋巴管组织中表达 (Oh H. A novel molecular mechanism involving neuropilin-1 for vascular endothelial growth factor-induced retinal angiogenesis. Nippon Gakkai Zasshi. 2003-Nov; 107(11): 651-656)。

25 已知 VEGF 是与眼内病症有关的新血管生成过程中关键的调节因子。眼液中 VEGF 水平与糖尿病患者和其它缺血性视网膜病患者的活性血管增生水平密切相关。其它研究证明了在 AMD 患者脉络膜新生血管膜中存在 VEGF。目前批准的用于治疗湿性 AMD 的抗血管药物, 目的在于中和 VEGF 的作用, 从而阻断血管新生。例如: 辉瑞的哌加他尼钠(Pegaptanib, 商品名 Macugen), 其活性成分哌加他 30 尼钠是一种由 28 个核苷酸组成的“aptamer”, 其三维结构使其能与细胞外的血管内皮生长因子受体 (VEGF) 结合, 抑制 VEGF 与相应的受体结合。需要每六周经玻璃体内注射施用; 诺华的兰尼单抗(Ranibizumab, 商品名 Lucentis), Lucentis 中的活性成分兰尼单抗是一种与 VEGF 结合的抗体片段, 需要每个月进行玻璃体内注射; 拜耳的艾力亚(VEGF-Trap-eye, 商品名 Eylea), 其活性成分阿普西柏是一种 35 与 VEGF 结合的多肽片段, 需要头三个月每个月注射, 之后每两个月注射施用。

但目前的标准药物治疗对相当一部分患者无效, 比如目前标准的 Ranibizumab

治疗只能提高 1/3 患者的视力，10%患者对该治疗无反应；另外，大概 70%患者经过抗 VEGF 治疗后无明显的视力增加。目前的药物治疗还存在适应性抗性，也就是患者在经过一段时间治疗后对该治疗药物产生了抗性。同时由于目前的治疗是通过眼内注射，每一次注射都不仅产生昂贵的治疗费用，也会引起眼内感染，出血以及视网膜脱离，其中最值得重视的并发症是眼内感染。一旦感染，后果不堪设想，有可能会失明。因此注射频度的降低对于药物的发展亦有重要意义。因此，这个领域需要更有效的治疗，克服抗 VEGF 治疗的抗性，以及延长抗 VEGF 药物作用的时间（不需要一个月或者两个月的眼底注射），以期更有效，更安全。

血小板衍生因子 PDGF 是创伤愈合过程中较早出现的生长因子之一。在创面愈合的全过程中起重要作用，主要表现在促进创面愈合方面。常见的 PDGF 是由两条多肽链通过二硫键连接而成的同型或异型二聚体，这使 PDGF 具有多种形式的二聚体结构，即 PDGF-AA、PDGF-BB、PDGF-AB、PDGF-CC 以及 PDGF-DD。PDGF 必须与细胞膜上的相应受体结合后才能发挥其生物学效应。PDGF 受体（PDGFR）由两种亚单位 α 及 β 构成，其分子量为 170~180KD。二者与 PDGF 结合力相差很大， α 单位与 PDGFa 链及 b 链有较高的亲和力，而 β 亚单位仅与 b 链有高亲和力。所以 α 亚单位可与 PDGF-AA、PDGF-AB 及 PDGF-BB 结合， β 亚单位仅与 PDGF-BB 及 PDGF-AB 结合。

PDGFR 是一种跨膜糖蛋白，具有酪氨酸蛋白激酶活性。由细胞外 N 端与 PDGF 特异识别的结构域、跨膜的中间疏水结构域和细胞内 C 端具有酪氨酸蛋白激酶活性的结构域组成。当 PDGF 与细胞表面的 PDGFR 结合后，促使受体分子二聚化；激活细胞内结构域酪氨酸残基自身磷酸化，或促使激活特殊靶蛋白的酪氨酸残基磷酸化；从而将信号传入细胞内，经级联式放大效应调控细胞的生命活动（包括靶细胞的分裂增殖）。由此，阻止 PDGF 结合或 PDGFR 二聚化的 PDGFR 拮抗剂，可用于治疗或预防与 PDGFR 通路相关的疾病。

目前认为中和 VEGF 的手段效果有限，主要是因为附在血管上的周细胞（vascular mural cells）在缺少 VEGF 的情况下保护了血管。因此在中和 VEGF 的基础上，如果能够阻断周细胞对血管的保护，就能够克服抗 VEGF 治疗的抗性，更有效的治疗老年黄斑变性。

发明内容

为了达到以上目的，本发明提供一种双特异性融合蛋白，包括 VEGF 结合肽和 PDGFR β 结合肽。VEGF 结合肽可以位于 PDGFR β 结合肽的上游；反之亦然。

在本发明一个优选的实施方案中，所述的双特异性融合蛋白，其中还包括免疫球蛋白的 Fc 段。Fc 段的作用在于，作为多聚化成分，使得融合蛋白多聚化。Fc 段可以位于 VEGF 结合肽的上游或下游；可以位于 PDGFR β 结合肽的上游或下游；或位于 VEGF 结合肽和 PDGFR β 结合肽之间。

在本发明又一个优选的实施方案中,所述免疫球蛋白的Fc段是免疫球蛋白IgG的Fc段。

在本发明又一个优选的实施方案中,所述的双特异性融合蛋白,其中所述的Fc段的氨基酸序列选自 SEQ ID NO:7、SEQ ID NO: 8 或 SEQ ID NO: 9。

5 在本发明又一个优选的实施方案中,所述的双特异性融合蛋白,其中所述的VEGF结合肽包含 VEGFR 胞外结构域。

在本发明又一个优选的实施方案中,所述的 VEGFR 是 Flt-1。

在本发明又一个优选的实施方案中,所述的 VEGFR 是 Flk-1。

在本发明又一个优选的实施方案中,所述的 VEGFR 是 Flt-4。

10 在本发明又一个优选的实施方案中,所述的 VEGFR 胞外结构域是 Flt1 的免疫球蛋白结构域 2, 和 Flk1 或 Flt4 的免疫球蛋白结构域 3。

在本发明又一个优选的实施方案中,所述的 VEGFR 胞外结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示。

在本发明又一个优选的实施方案中,所述的 PDGFR β 结合肽的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5 或 SEQ ID NO: 6 中的一个或多个。其中 SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5 为 PDGFR β 结合肽中的重链 CDR 序列, SEQ ID NO:6 为 PDGFR β 结合肽中的轻链 CDR 序列。当选自其中的多个序列时,优选 SEQ ID NO:6 与 SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5 之一的组合。

20 在本发明又一个优选的实施方案中,所述的双特异性融合蛋白还包括隔区,隔区的氨基酸序列选自: SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO: 14 或 SEQ ID NO: 15。

在本发明又一个优选的实施方案中,所述的双特异性融合蛋白还包括氨基酸序列如(GGGGS) n 所示的隔区,其中 n 为 1-10, 优选 2-5。

25 在本发明又一个优选的实施方案中,所述的双特异性融合蛋白的氨基酸序列选自: SEQ ID NO:19 至 SEQ ID NO:24。

本发明还涉及一种 PDGFR β 抗体衍生物,包括 PDGFR β 结合肽和免疫球蛋白的Fc段。

30 在本发明又一个优选的实施方案中,PDGFR β 抗体衍生物所述的 PDGFR β 结合肽定义如上;PDGFR β 抗体衍生物还包括如上定义的隔区。

在本发明又一个优选的实施方案中,所述的 PDGFR β 抗体衍生物氨基酸序列为 SEQ ID NO:18。

35 本发明还涉及一种如上所述的双特异性融合蛋白或 PDGFR β 抗体衍生物的制备方法,包括:构建表达载体,将表达载体转化至宿主细胞,表达载体在宿主细胞中进行表达获得表达前体,表达前体分泌到细胞外得到所述的双特异性融合蛋白。在一些实施方案中,将编码如 SEQ ID No.19-24 所示融合蛋白的多核苷酸,或

编码如 SEQ ID No.18 所示 PDGFR β 抗体衍生物的多核苷酸引入质粒构建表达载体，所述质粒可以是现有技术中任何适于在宿主细胞中表达的质粒，包括但不限于 pcDNA3.1(+). 在一些实施方案中，通过现有技术中的公知方法将表达载体转化至宿主细胞，例如转化、转染等。在适当的培养条件下培养宿主细胞，获得表达前体。表达前体分泌到细胞外得到如 SEQ ID No.19-24 所示的融合蛋白，或如 SEQ ID No.18 所示的 PDGFR β 抗体衍生物。

本发明还涉及一种如上所述的双特异性融合蛋白或 PDGFR β 抗体衍生物的表达前体，其中所述表达前体由信号肽和所述双特异性融合蛋白或 PDGFR β 抗体衍生物组成；所述信号肽的氨基酸序列选自 SEQ ID NO:16 或 SEQ ID NO:17；优选所述信号肽位于所述双特异性融合蛋白或 PDGFR β 抗体衍生物的 N 端。

本发明进一步提供一种编码如上所述的表达前体产物的多核苷酸，优选 DNA。

本发明进一步提供一种含有如上所述的多核苷酸的表达载体。

本发明进一步提供一种包含如上所述的表达载体的宿主细胞。

在本发明一个优选的实施方案中，所述的宿主细胞为细菌，优选为大肠杆菌。

在本发明又一个优选的实施方案中，所述的宿主细胞为酵母细胞，优选为毕赤酵母或酿酒酵母。

本发明进一步提供一种药物组合物，其含有如上所述的双特异性融合蛋白或 PDGFR β 抗体衍生物和可药用载体。

在本发明一个优选的实施方案中，其中所述的药物组合物为一种可注射的溶液，其中所述的双特异性融合蛋白、PDGFR β 抗体衍生物，或可药用载体是溶解形式的。

本发明还涉及上述的双特异性融合蛋白在制备用于治疗哺乳动物中与抑制 VEGF 和 PDGFR β 双靶点相关的疾病或病症的药物中的用途。所述哺乳动物是人类。

本发明还涉及所述的双特异性融合蛋白、PDGFR β 抗体衍生物在制备抑制 VEGF 和 PDGF 信号通路的药物中的用途。

本发明还涉及上述的 PDGFR β 抗体衍生物在制备用于治疗哺乳动物中与抑制 PDGFR β 靶点相关的疾病或病症的药物中的用途。所述哺乳动物是人类。

本发明还涉及所述的 PDGFR β 抗体衍生物在制备抑制 PDGF 信号通路的药物中的用途。

在本发明一个优选的实施方案中，药物用途中所述的疾病或病症是眼睛的疾病、或其它任何能够通过抑制 VEGF 和/或 PDGF 信号通路改善的疾病，比如肿瘤和糖尿病视网膜病变。

在本发明又一个优选的实施方案中，药物用途中所述的眼睛的疾病或病症是年龄相关的黄斑变性，优选湿性老年性黄斑变性。

本发明还涉及一种治疗湿性 AMD 的方法，其包括给予所需患者治疗有效量的

如上所述的双特异性融合蛋白或 PDGFR β 抗体衍生物, 或如上所述的药物组合物。

附图说明

图 1: VTEP-0 对 PDGFRbb 诱导的 PDGFR β 和 AKT 磷酸化的抑制效果。

5 图 2: VTEP-13 对 PDGFRbb 诱导的 PDGFR β 和 AKT 磷酸化的抑制效果。

图 3: VTEP-15 对 PDGFRbb 诱导的 PDGFR β 和 AKT 磷酸化的抑制效果。

图 4: VTEP-17 对 PDGFRbb 诱导的 PDGFR β 和 AKT 磷酸化的抑制效果。

图 5: VTEP-22 对 PDGFRbb 诱导的 PDGFR β 和 AKT 磷酸化的抑制效果。

图 6: VTEP-17 对 PDGFR 配体 PDGFRbb 诱导的 PDGFR 磷酸化的抑制率。

10 图 7: VTEP-17 对 PDGFR 配体 PDGFRbb 诱导的 AKT 磷酸化的抑制率。

图 8: VTEP-13 对 VEGF 诱导的人脐静脉内皮细胞增殖的抑制效果。

图 9: VTEP-17 对 VEGF 诱导的人脐静脉内皮细胞增殖的抑制效果。

图 10: VTEP-22 对 VEGF 诱导的人脐静脉内皮细胞增殖的抑制效果。

15 图 11: 模型小鼠眼部脉络膜新生血管面积, 表示 VTEP-17 对激光诱导脉络膜新生血管生成小鼠模型中脉络膜新生血管生成的抑制作用。

具体实施方式

为了更容易理解本发明, 以下具体定义了某些技术和科学术语。除显而易见在本文件中的它处另有明确定义, 否则本文使用的所有其它技术和科学术语都具有本发明所属领域的一般技术人员通常理解的含义。

定义

本发明所用氨基酸三字母代码和单字母代码如 J.biol.chem, 243, p3558 (1968) 中所述。

25 本发明提供了包括第一种成分 VEGF 结合肽和第二种成分 PDGFR β 结合肽的双特异性融合蛋白; 更具体地, 提供了通过将 VEGFR (Flt-1、Flk-1、Flt-4) 的修饰过的胞外结构域、PDGFR β 结合肽、和 IgG 的 Fc 区嵌合所形成的新型融合蛋白。

本文所采用的术语“结合肽”是指能够与靶结合的可溶性受体及其片段及其类似物; 或抗体及其片段及其类似物。

30 本发明中的 VEGF 结合肽是优选含有 VEGFR 胞外配体结合结构域(本申请中也作 VEGFR 胞外结构域)的多肽。

胞外配体结合结构域被定义为受体的一部分, 它在细胞膜中的天然构象中, 是朝着细胞外定向的。它可以接触它的同源配体。所述胞外结构域不包括与受体跨膜结构域相关的疏水性氨基酸或与受体胞内结构域相关的任何氨基酸。Von Heijone 公开了被本领域技术人员经常引用的用于测定一种特定受体的氨基酸是否属于胞外、跨膜或胞内结构域的详细规则(参见 Von Heijone, 1995, BioEssay 35 17:25-30)。另外, 网站如 <http://ulrec3.unil.cn/software/TMPRED-form.html> 能够向

蛋白质化学家提供有关制备蛋白结构域的先决条件的信息。

本文所采用的术语“PDGFR β 结合肽”优选包含可特异性识别并结合靶标抗原 PDGFR β 的抗体所有的或部分抗原结合位点的多肽；例如重链和/或轻链可变区的全部或部分，或者至少是重链可变区的 HCDR3 区。PDGFR β 结合肽包含并不
5 限于抗体，或抗体片段，和含有抗体全部或部分抗原结合位点的类免疫球蛋白结构域。更具体地，采用 US61/610905 中相关定义，比如包括 CDR3 序列为 HGGDRSY (SEQ ID NO: 11) 的抗体序列，还可以包括序列为 GIPIFGTANYAQKFQG (SEQ ID NO: 12) 或 GILPILKTPNYAQRFG (SEQ ID NO: 13) 的 CDR2 序列。

本发明所述的“PDGFR β 抗体衍生物”包括 PDGFR β 结合肽和免疫球蛋白的
10 Fc 段。

本发明所述的“双特异性融合蛋白”是指即能特异性识别并结合 VEGF 抗原表位，也能特异性识别并结合 PDGFR β 抗原表位的多肽。本发明所述的“双特异性融合蛋白”还可包含人 IgG 的 Fc 段。可以使用 IgG 的任何同种型，包括 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4。为了增加融合蛋白的功能，Fc 段也可以经过突变，或增加较
15 链区。用于制备双特异性抗体的方法是本领域已知的。

融合蛋白的组分可直接相互连接或通过隔区（也作连接肽）连接。通常，术语“连接肽”（或隔区、连接区）指一个或多个分子，例如核酸、氨基酸或多肽部分，它们可插入至一个或多个组分结构域之间。连接肽序列可用于在组分之间提供合意的靶标位点来使得操作变得容易。也可以提供连接肽来增强嵌合多个组
20 分在宿主细胞中的表达、减少空间位阻，从而该组分可采取它的最佳三级结构与它的靶标分子更好地相互作用。“隔区”在本发明中用于 VEGF 结合肽、PDGFR 抗体片段和 Fc 区之间的融合连接，以保证不同功能蛋白的正确折叠和稳定性。在本发明中，隔区优选为包含在一个或多个组分之间的一个或多个肽序列。这些多肽序列在 1-50 个氨基酸长度之间，优选在 1-25 之间。“隔区”更优选为 (GGGGS)
25 n，其中 n 为 1-10，优选 2-5。

本发明所述的“双特异性融合蛋白的前体”也可以包含信号肽，便于蛋白由细胞内分泌到细胞外，增加其产量。

本发明所述的“抗体”是指表现出所需生物学活性的任何形式的抗体。因此，它以最广义使用，具体地说，包括但不限于全长抗体，抗体结合片段或衍生物。
30 抗体的来源包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、基因工程抗体（例如双特异性抗体）。

本发明所述的“全长抗体”是指包含 4 条多肽链（即 2 条重链和 2 条轻链通过二硫键相互交联形成多聚体）的免疫球蛋白分子（例如 IgM）。每条重链包含一段重链可变区(简称 VH)和一段重链恒定区，重链恒定区包含 3 个结构域：CH1、
35 CH2 和 CH3。每条轻链包含一段轻链可变区(简称 VL)和一段轻链恒定区，轻链恒定区包含 1 个结构域(CL1)。VH 区和 VL 区可进一步包括高变区（文中也作互补

决定区(CDR))。各互补决定区之间穿插着更加保守的结构域,称为框架区(FR)。

本发明所述的“抗体结合片段或衍生物”包括任何一种自然发生的、酶催化获得的、合成的、或是通过基因工程得到的,可与抗原特异性结合形成复合物的多肽或糖蛋白。通常包括亲本抗体的至少部分抗原结合区或可变区(例如一个或多个 CDR),其保留亲本抗体的至少某些结合特异性。“抗体结合片段或衍生物”可能由抗体衍生而来,例如通过适宜的标准技术包括蛋白水解或重组基因工程技术(包括对表达抗体可变区和部分恒定区的 DNA 进行操作和表达)对抗体全长进行改造而得。“抗体结合片段或衍生物”包括但不限于:(i) Fab 片段;(ii) F(ab')₂ 片段;(iii) Fd 片段;(iv) Fv 片段;(v) 单链 Fv (scFv);(vi) dAb 片段;和(vii)模拟抗体高变区氨基酸残基的最小识别单元(如一个分离的互补决定区(CDR))。其它工程分子如双价抗体、三价抗体、四价抗体和微抗体也在“抗体结合片段或衍生物”范围内。

“Fab 片段”由一条完整的轻链和重链的 VH 和 CH1 功能区组成。Fab 分子的重链不能与另一个重链分子形成二硫键。

“Fab'片段”包含一条轻链和重链的 VH 和 CH1 功能区,还包含在 CH1 与 CH2 结构域之间的区域,以至于可在两个 Fab'片段的两条重链之间形成链间二硫键,以形成 F(ab')₂ 分子。

“F(ab')₂ 片段”包含二条轻链和含有 CH1 与 CH2 结构域之间的部分恒定区的两条重链,以至于在两条重链之间形成链间二硫键。因此, F(ab')₂ 片段由通过两条重链之间的二硫键保持在一起的两个 Fab'片段组成。

“Fv 片段”包含轻链或/和重链的可变区 VH 功能区。本发明 PDGFR β 结合肽优选 Fv 片段,一个优选实施例为 PDGFRβ 的重链可变区,另一优选实施例为重链可变区与轻链可变区连接的融合蛋白。

术语“Fc 段”指的是人免疫球蛋白链恒定区,特别是免疫球蛋白重链恒定区的羧基端或其中的一部分,无抗原结合活性,是抗体分子与效应分子和细胞相互作用的部位。例如,免疫球蛋白 Fc 区可包括重链 CH1、CH2、CH3、CH4 的两个或更多结构域与免疫球蛋白铰链区的组合。根据重链恒定区的氨基酸序列,免疫球蛋白可以分为不同的种类,主要有 5 类免疫球蛋白: IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM。其中一些还可进一步分成亚类(同种型),如 IgG-1、IgG-2、IgG-3、IgG-4; IgA-1 和 IgA-2。

“Fc 区”优选包括至少一个免疫球蛋白铰链区,以及 IgG 的 CH2 和 CH3 区。更优选包括 IgG1 的一个 CH2 结构域,一个 CH3 结构域和一个免疫球蛋白铰链区,铰链区起始氨基酸位置可以变动。“Fc 段”无抗原结合活性,是抗体分子与效应分子和细胞相互作用的部位。

“铰链区”用于连接抗体的 Fab 段和 Fc 段。在本发明中可以将双特异性融合蛋白与 Fc 段连接。

在本发明的实施方案中，本发明的第一种组分 VEGF 结合肽简称为 VTE；第二种组分 PDGFR 结合肽简称为 PDX；第三种组分 IgG 的 Fc 段简称为 Fc。三种组分的组合顺序有三种：（1）VTE 氨基酸序列在 Fc 氨基酸序列的上游，Fc 氨基酸序列在 PDX 氨基酸序列的上游，顺序如 VTE---Fc---PDX；（2）VTE 氨基酸序列在 PDX 氨基酸序列的上游，PDX 氨基酸序列在 Fc 氨基酸序列的上游，顺序如 VTE--- PDX --- Fc；（3）PDX 氨基酸序列在 VTE 氨基酸序列的上游，VTE 氨基酸序列在 Fc 氨基酸序列的上游，顺序如 PDX ---VTE --- Fc。

相应的，在本发明的实施方案中，编码 VEGF 结合肽的核苷酸序列位于编码 PDGFR 结合肽的核苷酸序列的上游。在本发明的另一种实施方案中，编码 VEGF 结合肽的核苷酸序列位于编码 PDGFR 结合肽的核苷酸序列的下游。

施用方法

本发明提供治疗方法，包括施用给受试者有效量的本发明的双特异性融合蛋白。在一优选的方面，所述的融合蛋白是充分纯化的，即基本没有限制其效果或产生非期望的副作用的物质。受试者优选地是哺乳动物，最优选是人。

在特定的实施方案中，期望将本发明药物组合物局部施用至需要治疗的区域；这可通过例如，但不以此作为限制，在手术期间局部灌注、局部施用完成，所述的局部灌注和局部施用是例如通过注射、通过导管的方式或通过植入物的方式进行，其中的植入物是多孔的、非多孔的或凝胶状的物质，包括膜，例如硅橡胶（silastic）膜、纤维或商业的皮肤代用品。

用于实践本发明方法的组合物可以是包含本发明试剂的溶液、悬液或两者的液体。术语“溶液/悬液”指液体组合物，其中第一部分活性剂存在于溶液中而第二部分活性剂表现为颗粒的形式，所述颗粒在液体基质中悬浮。液体组合物也包括凝胶体。液体组合物可以是含水的或是以软膏剂的形式。进一步，组合物可采用固体物的形式可将该固体物放入眼睛中，例如放入眼和眼睑之间或结膜囊中，在这里释放本发明所公开的双特异性蛋白。双特异性蛋白一般可从上述固体物释放至角膜，或直接传至角膜本身，固体物一般与角膜直接接触。适合植入眼睛的固体物通常主要由生物溶蚀或非生物溶蚀聚合物组成。水溶液和/或悬液可以是滴眼液的形式。理想的活性剂的剂量可以通过施用已知数量的滴数至眼中测量。例如，对于 50 μ l 体积一滴，施用 1-3 滴将递送 50-150 μ l 组合物。

用于实现本发明方法的含水悬液或溶液/悬液可包含一种或多种作为助悬剂的聚合物。有用的聚合物包括水溶性聚合物，如纤维素聚合物，和不可水溶的聚合物如交联的含有羧基的聚合物。本发明的含水悬液或溶液/悬液优选地是粘性的或粘膜粘附性的，或更优选地两者都是粘性的或两者都是粘膜粘附性的。

诊断和筛选方法

本发明的双特异性蛋白或作诊断性使用和/或用于筛选方法。例如，该双特异性蛋白可用于在临床研究阶段监控 VEGF 和 PDGFR 的水平来评价治疗效率。在另

外的实施方案中，本发明方法和组合物可用于筛选具有例如太高或太低 VEGF 和 PDGFR 的水平个体。也可用于在体内和体外筛选检测法来定量存在的非结合的 VEGF 和 PDGFR 的量，例如可用于筛选方法来鉴定能降低 VEGF 和 PDGFR 的表达的检测试剂。更一般地，本发明的双特异性蛋白可用于定量和/或分离 VEGF 和 PDGFR 的任意检测或方法。

药物组合物

本发明也提供包含本发明双特异性蛋白的药物组合物。这种组合物包含治疗有效量的一种或多种本发明所提供的双特异性蛋白和可药用载体。术语“可药用的”指用于动物以及更特别是用于人的中国药典或其它药典中列出的。术语“载体”指与药物一起施用的稀释剂、佐剂、赋形剂。这种药用载体可以是无菌液体，如水或油。这些组合物可采取溶液、悬液、乳剂、片剂、丸剂、胶囊剂、粉剂、缓释剂等形式。

此外，用于实现本发明方法的药物组合物具有与眼睛相容的 PH 值和摩尔渗透压浓度。

实施例

以下结合实施例进一步描述本发明，但这些实施例并非限制本发明的范围。

本发明实施例或测试例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。未注明具体来源的试剂，为市场购买的常规试剂。

一般方法

分子生物学的标准方法已有描述 (Maniatis 等 (1982) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Sambrook 和 Russell (2001) Molecular Cloning, 第 3 版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Wu (1993) Recombinant DNA, 第 217 卷, Academic Press, San Diego, CA)。标准方法还见于 Ausbel 等, (2001) Current Protocols in Molecular Biology, 第 1-4 卷, John Wiley and Sons, Inc. New York, 其描述了在细菌细胞中克隆和 DNA 诱变 (第 1 卷)、在哺乳动物细胞和酵母中克隆 (第 2 卷)、复合糖和蛋白质表达 (第 3 卷), 以及生物信息学 (第 4 卷)。

本发明提供了构建编码融合蛋白分子的多核苷酸的方法, 该核酸分子被插入一种载体上, 该载体在导入合适的宿主细胞之后能够表达所述融合蛋白。合适的宿主细胞包括, 但不限于细菌细胞、酵母细胞、昆虫细胞和哺乳动物细胞。优选 Lonza CHO 细胞。本领域技术人员所公知的, 任何用于将 DNA 片段插入载体中的方法, 都可用于构建编码所述融合蛋白的受转录/翻译控制信号控制的表达载体。

所述方法可以包括体外重组 DNA 和合成技术和体内重组 (遗传重组) (参见 Sambrook 等, 分子克隆, 实验室手册, 冷泉港实验室; 当代分子生物学方法, Ausubel

等著, Greene 出版协会, Wiley Interscience, NY)。

编码本发明融合蛋白的多核苷酸分子的表达可通过另一核苷酸序列调控, 以便该融合蛋白是在用所述重组 DNA 分子转化过的宿主中表达。例如, 本发明的融合蛋白的表达可通过本领域所公知的任何启动子/增强子元件控制。

5 因此, 根据本发明用含有本文所披露的融合蛋白的多核苷酸的能够在细菌或真菌宿主中复制的表达载体转染所述宿主, 并因此控制所述多核苷酸的表达, 以便产生所述融合蛋白, 然后以生物学活性形式回收该融合蛋白。在发明中, 生物学活性形式包括能够同时与 VEGF 和 PDGFR 结合的形式。

含有本发明所述多核苷酸的表达载体可以通过三种一般方法鉴定: (a)
10 DNA-DNA 杂交, (b) “标记” 基因功能的有和无, 和 (c) 插入序列的表达。在第一种方法中, 插入一种表达载体的外源基因的存在可以用含有与插入的融合蛋白序列同源的序列的探针进行 DNA-DNA 杂交进行检测。在第二种方法中, 可以根据由于在所述载体上插入外源基因所导致的某些 “标记” 基因功能 (例如对抗生
15 融合蛋白 DNA 序列被插入所述载体的标记基因序列之内, 可以通过该标记基因功能的缺乏鉴定含有该插入片段的重组体。在第三种方法中, 可以通过检测由重组体所表达的外源基因产物鉴定重组表达载体。例如, 所述检测可以基于所述融合蛋白的物理特性或功能特性。

本发明所述细胞可以是暂时性的, 优选组成型并永久地, 表达所述融合蛋白。

20 所述融合蛋白可以用任何方法纯化, 以便能够随后制成稳定的、有生物学活性的融合蛋白。例如, 但并非限定, 所述融合蛋白可以可溶蛋白形式从细胞中回收, 或者作为包涵体形式回收。为了进一步纯化所述融合蛋白, 可以使用常规的离子交换层析、疏水性相互作用层析、反相层析或凝胶过滤。

25 实施例 1. 双特异性融合蛋白

本发明提供了包括 VEGF 结合肽和 PDGFR β 结合肽的双特异性融合蛋白; 更具体地, 提供了通过将 VEGFR (Flt-1、Flk-1、Flt-4) 的修饰过的胞外结构域、PDGFR β 结合肽和 IgG 的 Fc 区嵌合所形成的新型融合蛋白。

在本发明的实施方案中, 本发明 VEGF 结合肽氨基酸序列称为 VTE; 第二种
30 组分 PDGFR 抗体, 称为 PDX; 第三种组分 IgG 的 Fc 区称为 Fc。三种组分的组合顺序有三种:

(1) VTE 氨基酸序列在 Fc 氨基酸序列的上游, Fc 氨基酸序列在 PDX 氨基酸序列的上游, 顺序如 VTE---Fc---PDX, 简称 VFP;

(2) VTE 氨基酸序列在 PDX 氨基酸序列的上游, PDX 氨基酸序列在 Fc 氨基酸序列的上游, 顺序如 VTE---PDX---Fc, 简称 VPF;
35

(3) PDX 氨基酸序列在 VTE 氨基酸序列的上游, VTE 氨基酸序列在 Fc

氨基酸序列的上游，顺序如 PDX ---VTE --- Fc，简称 PVF。

融合蛋白的组分可直接相互连接或通过连接肽连接。比如在 Fc 上游加上 5-20 个氨基酸，优选 5-15 个氨基酸的铰链区。

本发明中的 VEGF 结合肽是指含有 VEGFR 胞外结构域序列的多肽片段。例如
5 包括 Flt-1 的胞外结构域 D2 和 Flk-1 的胞外结构域 D3 的序列(为方便命名为 VTE)，
序列如下：

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSR
KGFII SNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVNLN
TARTELVNGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTC
10 AASSGLMTKKNSTFVRVHEK SEQ ID NO: 1。

VEGF 结合肽也可以是 VTE 加上 Fc 片段，简称 VEGF-Trap-Fc：

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFII
SNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVNLNCTARTE
15 LVNGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSG
LMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYTQKSLSLSPGK
20 SEQ ID NO: 2。

本发明中的 PDGFR β 结合肽可以是具有 PDGFR β 结合活性的 VH 片段，序列
如下(为方便命名为 PDX，选自 PDX1，PDX2 或 PDX3)：

PDX1(又名 XB2202 VH，本发明中简称 VH)：

25 QVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSCASGGTFSRHAISWVRQAPGQGLEWIGILPILKTPNYA
QRFQGRVTINADESTSTVYMEMSSLRSEDVAVYYCATHGGDRSYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 3。

PDX2 (XB1115 VH)：

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAIWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYA
30 QKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAIHGGDRSYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 4。

PDX3 (XB2708 VH)：

QVQLVQSGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTSRSYGMHWVRQAPGKGLEWVAFILFDGNNKY
YADSVKGRFTISSDNSKNTLYLQMNSLRAEDVAVYYCATHGGDRSYWGQGLTVTVSS
35 SEQ ID NO: 5。

PDX4 (XB2202 VL)：

DVVMVTQSPSSLSASVGDRTITCQASQDISNWLNWYQQKPGKAPKLLIYEASNLETGVPSRF
SGSGSGTDFTFTISSLQPEDATYYCQQYNNVLRFTFGQGTKVEIK SEQ ID NO: 6。

40 本发明的 Fc 区包含 IgG (如 IgG1，IgG2，IgG3 或 IgG4，优选 IgG1) 的 CH2
和 CH3 功能区，序列如下(为方便命名为 Fc)：

Fc-1:

CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
5 LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK SEQ ID NO: 7。

Fc-2:

CPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
10 TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK SEQ ID NO: 8。

Fc-3:

CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
15 VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK SEQ ID NO: 9。

在 Fc 区前可以有铰链区，选自原始序列或其突变体，序列如下：

Fc-H1: DKTHT SEQ ID NO: 10。

Fc-H2: EPKSSDKTHT SEQ ID NO: 11。

20

各组分之间可以有连接肽，序列如下：

SPAC1: (GGGGS)_n; n=0-10 SEQ ID NO: 12。

SPAC2: ASTKGPSGGGGSGGGGS SEQ ID NO: 13。

SPAC3: ASTKGPSVFPLAPGGGGS SEQ ID NO: 14。

25 SPAC4: GGGSEPKSSDKTHTSPSPAGGGS SEQ ID NO: 15。

本发明所述的双特异性融合蛋白的表达前体还可以有分泌信号肽，例如：

SIG1: MEFGLSWLFLVAILKGVC SEQ ID NO: 16。

SIG2: MDMRVPAQLLGLLLWFPGSRC SEQ ID NO: 17。

30

本发明所述的双特异性融合蛋白，经细胞表达得到如下优选序列：

VTEP-0:

CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
35 YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKK
PGSSVRVSCASGGTFSRHAISWVRQAPGQGLEWIGILPILKTPNYAQRFRQGRVTINADEST
STVYMEMSSLRSEDTAVYYCATHGGDRSYWGQGTLVTVSS SEQ ID NO: 18。

序列说明：排列如 Fc(hIgG1)-XB2202 VH，Fc(人 IgG1，Fc-3，SEQ ID NO:

40 9)通过一个连接肽 (SPAC1, n=2) 连接 XB2202 重链可变区 (PDX1, SEQ ID NO:

3), 组合顺序为: Fc-PDX;

VTEP-13:

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWD SRKGFII
 5 SNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTE
 LNVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSG
 LMTKKNSTFVRVHEKGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSCASGGTFSRHAIS
 WVRQAPGQGLEWIGGILPILKTPNYAQRFGQGRVTINADESTSTVYMEMSSLRSEDTAVYYC
 ATHGGDRSYWGQGLTVTSSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
 10 VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
 KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
 KSLSLSPGK SEQ ID NO: 19。

序列说明: 排列如 VEGF-Trap-XB2202-FC, VEGF Trap (VTE) 通过连接肽
 15 (SPAC1, n=2) 连接 XB2202 重链可变区 (PDX1, SEQ ID NO: 3) 和 Fc (Fc-1,
 SEQ ID NO: 7), 在 PDX1 与 Fc 之间有铰链区 (Fc-H2, SEQ ID NO: 11), 组合
 顺序为: VTE -PDX-Fc;

VTEP-15:

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWD SRKGFII
 20 SNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTE
 LNVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSG
 LMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
 EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 25 GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
 NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGG
 GGGSGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSCASGGTFSRHAISWVRQAPG
 QGLEWIGGILPILKTPNYAQRFGQGRVTINADESTSTVYMEMSSLRSEDTAVYYCATHGGDRS
 YWGQGLTVTVSS SEQ ID NO: 20。

序列说明: 排列如 VEGF-Tarp-Fc-(G4S)4-XB2202, VEGF-Trap Fc 融合蛋白
 30 (VF1 序列, 通过铰链区 Fc-H1, SEQ ID NO: 10, 与 Fc-2, SEQ ID NO: 6 连接
 融合), 通过连接肽 (SPAC1, n=4) 连接 XB2202 重链可变区 (PDX1, SEQ ID NO:
 3), 组合顺序为: VTE-Fc-PDX;

VTEP-17:

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWD SRKGFII
 SNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTE
 LNVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSG
 LMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
 40 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
 KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
 NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGG
 GGGSGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSCASGGTFSRHAISWVRQAPG
 QGLEWIGGILPILKTPNYAQRFGQGRVTINADESTSTVYMEMSSLRSEDTAVYYCATHGGDRS
 YWGQGLTVTVSS

LIYEASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFITSSLPEDIATYYCQQYNNVLRFTGQGTKVEIKGG
GGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSCASGGTFSRHAISWVRQAPG
QGLEWIGGILPILKTPNYAQRFGQGRVTINADESTSTVYMEMSSLRSEDTAVYYCATHGGDRS
YWGQGT LTVSS SEQ ID NO: 21。

- 5 序列说明：排列如 VEGF-Tarp-FC-(G4S)5-XB2202VL-Linker-VH，VEGF-Trap Fc 融合蛋白通过连接肽（SPAC1, n=4）连接 XB2202 的轻链可变区（PDX4, SEQ ID NO: 6）和重链可变区（PDX1, SEQ ID NO: 3），组合顺序为：VTE-Fc-PDX；

VTEP-22:

- 10 QVQLVQSGGGVVPQGGSLRLSCAASGFTSRSYGMHWVRQAPGKGLEWVAFILFDGNNKYY
ADSVKGRFTISSDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATHGGDRSYWGQGT LTVSSASTKG
PSGGGSGGGGSSDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPD
GKRIIWDSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSV
GEKLVNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTR
15 SDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGK SEQ ID NO: 22。

- 20 序列说明：排列如 XB2708VH-linker-1-VEGF-Tarp-Fc，XB2708 重链可变区（PDX3, SEQ ID NO: 5）通过一个连接肽（SPAC2）连接到 VEGF-Trap Fc 融合蛋白，组合顺序为：PDX- VTE - Fc

VTEP-25:

- 25 QVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSCASGGTFSRHAISWVRQAPGQGLEWIGGILPILKTPNYA
QRFQGRVTINADESTSTVYMEMSSLRSEDTAVYYCATHGGDRSYWGQGT LTVSSGGGGG
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKK
FPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVL
PSHGIELSVGEKLVNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLS
30 TLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK SEQ ID NO: 23。

- 35 序列说明：排列如 XB2202VH-(G4S)5-VEGF-Tarp-Fc，XB2202 重链可变区通过一个连接肽（SPAC1, n=5）连接到 VEGF-Trap Fc 融合蛋白，组合顺序为：PDX-VTE - Fc；

VTEP-26:

- 40 QVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSCASGGTFSRHAISWVRQAPGQGLEWIGGILPILKTPNYA
QRFQGRVTINADESTSTVYMEMSSLRSEDTAVYYCATHGGDRSYWGQGT LTVSSGGGGG
GGGGSGGGGSDVVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNWLNWYQQKPGKAPKLLIYEA

SNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFITSSSLQPEDATYYCQQYNNVLRFTGQGTKVEIKGGGGSGG
GGSGGGGSGGGGSGGGSSDTGRPFVEMYSEIPEIHHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFP
LDTLIPDGKRIIWDSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPS
HGIELSVGEKLVNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTL
5 TIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK SEQ ID NO: 24.

10 序列说明：排列如 XB2202VH-(G4S)3-VL-(G4S)5-VEGF-Tarp-Fc，为 XB2202
重链可变区和轻链可变区通过一个连接肽（SPAC1,n=3）连接到 VEGF Trap Fc 融
合蛋白，组合顺序为：PDX- VTE – Fc。

表 1. 序列组成

名称	组分	连接肽	组分	连接肽	组分
VTEP-0	Fc-3	SPAC1, n=2	PDX1		
VTEP-13	VTE1	SPAC1, n=2	PDX1	Fc-H2	Fc-1
VTEP-15	VTE1	Fc-H1	Fc-2	SPAC1, n=4	PDX1
VTEP-17	VTE1	Fc-H1	Fc-1	SPAC1, n=3	PDX4, PDX1
VTEP-22	PDX3	SPAC2	VTE1	Fc-H1	Fc-1
VTEP-25	PDX1	SPAC1, n=5	VTE1	Fc-H1	Fc-1
VTEP-26	PDX1	SPAC1, n=3	PDX4	SPAC1, n=5	VTE1, Fc-1

15 实施例 2 载体构建

所有 PCR 和克隆相关操作均按照分子克隆标准操作进行，详细参考《分子克
隆》（Sambrook 等，冷泉港实验室）。

实验材料：

真核表达载体 pcDNA3.1(+)(Life technologies, 货号 V790-20);

20 编码 VTE 蛋白（SEQ ID NO: 1）的核苷酸序列：由基因合成公司合成（金唯
智，苏州）；

编码 Fc 蛋白片段（SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 或 SEQ ID NO: 9）的核
苷酸序列：人源抗体重链 γ 1 恒定区 Fc 片段，由基因合成公司合成（金唯智，苏
州）；

25 PDX 蛋白片段（SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO:
6）的核苷酸序列：由基因合成公司合成（金唯智，苏州）。

实验方法：

1、片段拼接

30 按照 VTEP-0、VTEP-13、VTEP-15、VTEP-17、VTEP-22、VTEP-25、VTEP-26
各序列中 VTE、Fc、PDX 的顺序，并加入连接肽修饰序列，翻译成对应的核苷酸
序列，进行 overlap PCR，将各片段拼接成对应蛋白的核苷酸序列表达片段。

2、引入酶切位点及信号肽序列：

利用 PCR 方法在各个表达片段的 5' 端引入限制性内切酶 KpnI 位点, Kozak 序列, 信号肽序列; 在各个片段的 3' 端分别引入终止密码子 TGA 和 NotI 限制性内切酶位点。最终得到的 DNA 序列从 5' 至 3' 端依次为: KpnI 位点-Kozak 序列-信号肽序列-表达片段 (结构顺序包括 Fc-PDX, VTE-Fc-PDX, PDX-VTE-Fc 或 VTE-PDX-Fc) -TGA 终止密码子-NotI 位点。在本发明的实施例中, VTE-0 的信号肽优选 SIG2 的序列, 其它实施例优选 SIG1 的序列。

3. 构建表达载体

利用 KpnI 和 NotI 限制酶位点将各个片段分别插入质粒 pcDNA3.1(+), 构建成表达载体。

实施例 3. 蛋白表达

实验方法:

使用 FreeStyle 293 细胞 (GIBCO, Cat#R79007) 瞬时转染表达实施例 2 中构建的表达载体。

FreeStyle 293 细胞悬浮培养在培养基 (Freestyle 293 expression medium, GIBCO, Cat#12338018) 中, 添加终浓度为 1% 的超低免疫球蛋白胎牛血清 (Ultra Low IgG Fetal Bovine Serum, GIBCO, Cat#16250078)。

准备好实施例 2 中构建好的表达载体和转染试剂 PEI (Polysciences, Cat#239662), 表达载体量为 100 μ g/100ml 细胞, 表达载体和 PEI 的质量比为 1:2。转染当天细胞密度为 1×10^6 /ml。1L 的 FreeStyle 293 待转染细胞, 取 50ml Opti-MEM 培养基 (GIBCO, Cat#11058021) 与表达载体混匀, 静置 5 min, 过滤; 另取 50ml Opti-MEM 培养基与 PEI 混匀, 静置 5min, 过滤。将表达载体和 PEI 进行混匀, 静置 15 min。

将表达载体和 PEI 混合物缓慢加入细胞中, 置入 37 $^{\circ}$ C, 8% CO₂, 130rpm 摇床培养箱中培养。5 天后离心收集上清进行蛋白纯化。

实施例 4 蛋白纯化

实验方法:

1、亲合层析

细胞培养液高速离心后收集上清, 利用亲合层析进行第一步层析。层析条件: 层析介质为与 Fc 相互作用的 Protein A 或者衍生填料, 如 GE 的 Mabselect; 平衡缓冲液为 1 $\times$ PBS (NaCl 137mmol/L, KCl 2.7mmol/L, Na₂HPO₄ 10mmol/L, KH₂PO₄ 2mmol/L, pH7.4), 平衡 5 倍柱体积; 细胞上清上样结合, 流速控制在样品柱上保留时间 $\geq$ 1min; 上样结束后, 利用 1 $\times$ PBS (pH7.4) 进行清洗, 直至紫外吸收回落到基线; 洗脱缓冲液为 0.1M 甘氨酸 (pH3.0) 进行层析洗脱, 根据紫外吸收峰收集洗脱样品, 最后用 1M Tris (pH9.0) 中和。

2、体积排阻。

将第一步洗脱样品超滤浓缩后进行体积排阻层析，排阻层析条件：缓冲液为 1×PBS (NaCl 137mmol/L, KCl 2.7mmol/L, Na₂HPO₄ 10mmol/L, KH₂PO₄ 2mmol/L, pH7.4)，层析柱 XK26/60 Superdex200 (GE)，流速 4ml/min，上样体积小于 5ml。

5 根据紫外吸收合并目的蛋白峰。

3：纯度检测。

纯度检测采用 SEC-HPLC，检测用柱为 TSK-Gel 2000-SWXL (TOSOH)，流速：0.7ml/min，上样量：50μl，流动相：1×PBS (NaCl 137mmol/L, KCl 2.7mmol/L, Na₂HPO₄ 10mmol/L, KH₂PO₄ 2mmol/L, pH7.4)。SEC-HPLC 纯度大于 95%。

10

测试例

测试例 1 PDGFR 磷酸化细胞实验

一、试验目的：

通过 Western 印迹方法评估本发明的融合蛋白抑制 Caki 细胞中 PDGFRβ 和
15 AKT (S473) 磷酸化作用，测试本发明的融合蛋白具有的 PDGFR 抗体功能。

二、试验材料：

本发明样品：VTEP-0, VTEP-13, VTEP-15, VTEP-17 和 VTEP-22。

Caki 细胞：购自中科院上海生命科学研究院细胞资源中心，货号 TCHu135；

Phospho-PDGF 受体 β (Tyr751) (88H8) Mouse mAb (PDGFRβ 抗体)：购自
20 Cell SignallingTechnology 公司，货号#3166；

重组人 PDGF-BB CF (10 UG) (PDGFR 配体 PDGFRbb)：购自 R&D 公司，
货号 220-BB-010；

蛋白酶抑制剂：Complete Mini EDTA-free 购自罗氏公司，货号 04693159001；

磷酸化酶抑制剂：PhosSTOP 购自罗氏公司，货号 04906837001；

25 McCOY's 5A 培养基：购自 Life Technologies，货号 16600-082；

细胞 RIPA 裂解液：购自碧云天生物技术研究，货号 P0013B。

三、试验方法：

1、取 4 块 6 孔板，每个孔加 0.8×10^6 个 Caki 细胞，37℃培养 6 小时，换为
McCOY's 5A 无血清培养基培养 37℃培养过夜；

30 2、第二天给细胞换液，每个孔加 2 ml 无血清培养基。

3、配制不同浓度样品溶液：VTEP-0, VTEP-13, VTEP-15, VTEP-17, VTEP-22，
用 McCOY's 5A 无血清培养基稀释配制，各样品浓度见图 1-图 5 上的第 1 行。如
VTEP-13 的加样方式依次为 200、66.7、22.2、7.4、0、200 nM，每孔 1 ml。

4、37℃孵育 50 分钟后加 PDGFR 配体 PDGFRbb(配体)，终浓度为 40 ng/ml，
35 37℃孵育 10 分钟；各样品加配体的情况见图 1-图 5 上的第 2 行，“+”表示所示
样品按前述加入配体，“-”表示所示样品不加入配体；

5、用 PBS (pH7.4) 洗涤 2 次, 用细胞 RIPA 裂解液 (含蛋白酶和磷酸化酶抑制剂) 裂解细胞, BCA 蛋白定量;

6、电泳, 8% SDS-PAGE, Western 印迹。

四、试验结果:

结果如图 1-图 5 所示: 图 1-图 5 中 p-PDGFR β 表示该行电泳图表示测试加入样品后, 细胞裂解液中磷酸化 PDGFR β 的含量; p- AKT (S473) 表示该行电泳为测试加入样品后, 细胞裂解液中磷酸化 AKT (S473) 的含量; PDGFR β 表示该行电泳为测试加入样品后, 细胞裂解液中磷酸化 PDGFR β 与非磷酸化 PDGFR β 的总含量; GAPDH 表示该行电泳为测试加入样品后, 细胞裂解液中看家基因 GAPDH 蛋白的含量。

结果显示, 本发明样品具有 PDGFR 抗体功能, 均能够抑制 PDGFR β 和 AKT (S473) 磷酸化, 对 PDGFR β 磷酸化抑制作用具有明显的剂量效应, 对下游 AKT (S473) 磷酸化抑制作用也有一定的剂量效应。且抗体本身没有 PDGFR β 磷酸化激动剂作用。其中 VTEP-17 对 PDGFR 配体 PDGFRbb 诱导的 PDGFR 磷酸化的抑制率 IC₅₀ 为 3.6nm, 如图 6 所示; VTEP-17 对 PDGFR 配体 PDGFRbb 诱导的 AKT (S473) 磷酸化的抑制率 IC₅₀ 为 3.2nm, 如图 7 所示。

测试例 2 HUVEC 细胞增殖实验

一、试验目的:

检测本发明样品对 HUVEC 细胞增殖的抑制作用。

二、试验材料:

本发明样品: VTEP-13, VTEP-15 和 VTEP-22;

HUVEC 细胞 (人脐静脉内皮细胞): 购自 ATCC, 货号 CRL-1730™;

Low Serum Growth Supplement (LSGS, 低浓度血清生长补充剂): 购自 GIBCO, 货号 S-003-10;

Medium 200 培养基: 购自 GIBCO, 货号 M-200-500;

VEGF165: 购自 R&D, 货号 293-VE-010;

CCK8: 购自同仁化学, 货号 CK04。

三、试验方法:

1、96 孔板中, 每孔加入 100 μ l 含 2000 个 HUVEC 细胞的 Medium200+ Low Serum Growth Supplement 培养基 (加 LSGS 的 Medium 200 培养基), 培养板放在 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养。

2、24 小时后, 将 Medium200+ Low Serum Growth Supplement 培养基换为 0.5%FBS 的 medium200 培养基, 每孔 90 μ l。

3、将样品从原始浓度开始用无血清 medium200 培养基三倍稀释, 共稀释 9 个点, 稀释后的样品分别与 200ng/ml VEGF165, 37℃、5%CO₂ 培养箱孵育 1 小时。

4、将步骤3中配置好的不同稀释度的样品与 VEGF 的混合物加至细胞中，每孔 10 μ l，将培养板放在 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中培养。

5、72 小时后，每孔加入 10 μ l CCK8 显色，4 小时后检测 CD450。

四、试验结果：

5 结果如图 8-10 所示，3 个样品对 HUVEC 细胞增殖均有不同抑制作用，见表 2。

表 2：对 HUVEC 细胞增殖的抑制作用

名称	IC50(ng/ml)
VTEP-13	159
VTEP-17	292
VTEP-22	220

测试例 3 样品与 PDGFR β 蛋白的反应亲和力测试

一、试验目的：

10 用 Biacore，GE 仪器测定本发明样品和 PDGFR β 蛋白的反应亲和力(affinity)。

二、实验仪器、材料与试剂

本发明样品：VTEP-0，VTEP-13，VTEP-15，VTEP-17，VTEP-22，VTEP-25 和 VTEP-26。

实验仪器：Biacore X100，GE；

15 实验材料：生物传感芯片 CM5 (Cat. # BR-1000-12，GE)；

实验试剂：

1)、氨基偶联试剂盒 (Cat. # BR-1000-50，GE)；

2)、人抗捕获试剂盒 (Cat. # BR-1008-39，GE)；

3)、PDGFR β (Cat. # 10514-H08H，Sino Biological)；

20 4)、盐酸甘氨酸 (pH 1.5) 再生溶液 (Cat. # BR-1003-54，GE)；

5)、HBS-EP+ 10 倍缓冲溶液 (Cat. # BR-1006-69，GE) 用 D. I. Water 稀释至 1 倍 (pH 7.4)。

三、试验方法：

实验样品 VTEP-0，VTEP-13，VTEP-15；

25 按照人抗捕获试剂盒说明书中的方法将人抗捕获抗体共价偶联于 CM5 生物芯片上，从而亲和捕获一定量的 VTE 蛋白，然后于芯片表面流经一系列浓度梯度下的 PDGFR β 蛋白，利用 Biacore 仪器实时检测反应信号获得结合和解离曲线。在实验中每个循环解离完成后，用人抗捕获试剂盒里配置的再生溶液将生物芯片洗净再生。

30 实验样品 VTEP-17，VTEP-22，VTEP- 25，VTEP-26

按照氨基偶联试剂盒说明书中的方法将 PDGFR β 蛋白共价偶联于 CM5 生物芯片上，然后于芯片表面流经一系列浓度的 VTE 蛋白，进而利用 Biacore 仪器实时检测反应信号获得结合和解离曲线。使用 GE 的 BIAevaluation 软件以 1:1

(Langmuir) 结合模型分析所得数据, 以此法测定的亲和力 K_d 值显示于下表 3。

四、实验结果

本发明样品与 PDGFR β 蛋白有较高的反应亲和力, 结果见表 3。

表 3: 与 PDGFR β 蛋白的反应亲和力

编号	K_d (nM)
VTEP-0	5.9
VTEP-13	81
VTEP-15	58
VTEP-17	2.3
VTEP-22	3.1
VTEP-25	22
VTEP-26	49

5

测试例 4 样品与 VEGF 蛋白的反应亲和力测试

一、试验目的:

用 Biacore, GE 仪器测定本发明样品和 VEGF 蛋白的反应亲和力(affinity)。

二、实验仪器、材料与试剂

10 本发明样品: VTEP-17 和 VTEP-22。

实验仪器: Biacore X100, GE;

实验材料: 生物传感芯片 CM5 (Cat. # BR-1000-12, GE);

实验试剂:

- 1) 氨基偶联试剂盒 (Cat. # BR-1000-50, GE);
- 15 2) 人抗捕获试剂盒 (Cat. # BR-1008-39, GE);
- 3) VEGF165 / VEGFA (Cat. # 11066-HNAB, Sino Biological);
- 4) HBS-EP+ 10 倍缓冲溶液 (Cat. # BR-1006-69, GE) 用 D. I. Water 稀释至 1 倍 (pH 7.4)。

三、试验方法:

20 按照人抗捕获试剂盒说明书中的方法将人抗捕获抗体共价偶联于 CM5 生物芯片上, 从而亲和捕获一定量的 VTE 蛋白, 然后于芯片表面流经一系列梯度浓度下的 VEGF165 蛋白, 利用 Biacore 仪器实时检测反应信号获得结合和解离曲线。使用 GE 的 BIAevaluation 软件以 1:1 (Langmuir) 结合模型分析所得数据, 以此法测定的亲和力 K_d 值显示于下表 4。

25 四、实验结果

本发明样品与 VEGF 蛋白有较高的反应亲和力, 结果见表 4:

表 4. 与 VEGF 蛋白的反应亲和力

编号	K_d (pM)
VTEP-17	52
VTEP-22	250

测试例 5 体内的半衰期检测

一、实验目的：

为了检测本发明 VTEP-17 在大鼠体内药代动力学参数。

二、实验材料与试剂：

动物：180 ± 10 g SD 大鼠，雌雄各半 (西普尔-必凯实验动物有限公司提供，动物生产许可证号 SCXK(沪)2008-0016)，每组 6 只。

PDGFR-His：组成为 PDGFRβ 的胞外片段 (人源 CD140b / PDGFRb 基因功能区，来自 www.uniprot.org，SEQ ID NO：25) 加上 Flag 标签和 his 标签 (序列中以横线标注)，可用领域内熟知的办法制备，如建立克隆，瞬转质粒和用镍柱纯化蛋白，经电泳验证为所要的蛋白后使用。在本测试中，可用于结合检测具有 PDGFRβ 抗体功能的片段，序列如下：

LVVTPPGPELVNLVSSTFVLTCSGSAPVWVERMSQEPPQEMAKAQDGTFSVLTLTNL
TGLDTGEYFCTHNSRGLTDERKRLYIFVPDPTVGFLPNDAEELFIFLTEITEITIPCRVTDPO
15 LVVTLHEKKGDVALPVPYDHQRGFSGIFEDRSYICKTTIGDREVDSDAYVYRLQVSSINVS
VNAVQTVVRQGENITLMCIVIGNEVVNFEWTPRKESGRLVEPVTDFLLDMPYHIRSILHIPS
AELEDSGTYYTCNVTESVNDHQDEKAINITVVESGYVRLLGEVGTLLQFAELHRSRTLQVVF
AYPPPTVLWFKDNRTLGDSSAGEIALSTRNVSETRYVSELTLVRVKVAEAGHYTMRAFHE
AEVQLSFQLQINVPVRVLELSHPSDGEQTVRCRGRGMPQPNIIWSACRDLKRCPRELPPTL
20 LGNSSEEEESQLETNVTYWEEEQEFVSTLRLQHVDRLPSVRCTLRNAVQDQTQEVIVPH
SLPFKVGSSDYKDDDDKHHHHHHH SEQ ID NO：25。

羊抗人 IgG 过氧化物酶偶联抗体：Jackson Cat. No.：109-035-088；

酶标仪：Thermo Scientific。

三、实验方法：

25 1、体内给药

SD 大鼠 6 只，雌雄各半，腹腔注射给药；无菌条件下，VTEP-17 溶于生理盐水中，终浓度为 20 μg/mL；每只大鼠 IP 给药，给药剂量为 100 μg/kg；

IP 组按时间点 15 min、30 min、1hr、2hr、4hr、8hr、11hr、24hr、48hr、72 hr 大鼠眼底静脉取血，每次 200 μL (相当于取血清 100 μL)；

30 收集的血液在室温下置放半小时至凝集，然后 4℃ 下 10000 × g 离心 5 分钟。收集上清，立即进行实验或样品等分放置 -80℃ 贮存。避免反复冻融。

2、用步骤 1 中得到的血清样品进行 ELISA 检测

1) 直接包被 100 ng/ml 的 PDGFR，4 °C 过夜；

2) 用 300 μl 含 5% 脱脂乳的 PBST 封闭酶标板，37 °C 恒温封闭 2h，同时封
35 闭无包被的空白孔作对照；

3) PBST 洗涤 3 次；

4) 每孔加入 100 μl 含 VTEP-17 的大鼠血清样品 (实验前取一个大鼠血清样品，按照不同比例稀释，得到一个血清中抗体浓度正好在标准曲线中间位置的最佳稀

释比例，将血清样品按照最佳稀释比例进行稀释），37℃恒温孵育 2h；

5) PBST 洗涤 3 次；

6) 每孔加入 100 μl 羊抗人 IgG 过氧化物酶偶联抗体 (1:2500)，37℃恒温孵育 1h；

7) PBST 洗涤 3 次。每孔加入 100 μl TMB 底物，37℃恒温孵育 5-10 min，随后每孔加入 100 μl 1.25M H₂SO₄ 中止反应；

8) ELISA 酶标仪读取 450nm 波长处的 OD 值。

根据标准曲线方程和样品的 OD 值，计算得到样品的实际浓度。

标准曲线：以 VTE-17 浓度(5, 10, 20, 50 和 100 ng/ml)为横坐标，不同浓度 VTE-17 对应的 OD 值为纵坐标，获得典型标准曲线方程，标准曲线的线性范围为 5-100 ng/ml。

四、实验结果：

按以上方法，对实施例 2 中得到的 VTEP-17 进行检测，用 Phoenix™ WinNonlin 6.1 软件中非房室模型进行药动力学计算，得到其体内半衰期（T_{1/2}），结果如下：

表 5. 药代动力学测试

实验动物	给药方式	T _{1/2} (均值±SD, h)
SD 大鼠	IP (100 g/kg)	14.6±4.7

发明人在中和 VEGF 的基础上引入了抗 PDGFRβ 的 VH 片段。该融合蛋白具有中和 VEGF 以及阻断 PDGFRβ 的信号通路的双重特异性，因此可以使本来对中和 VEGF 治疗无反应的人群得到有效的治疗，并能够克服中和 VEGF 药物疗法的抗性，另外有可能延长病人需要眼内注射的周期，从而会在现有基础上更好治疗老年黄斑变性。

测试例 6 VTEP 蛋白对激光诱导脉络膜新生血管小鼠模型中脉络膜新生血管生成抑制作用的研究

一、试验目的：

本测试例用于研究 VTEP 蛋白对激光诱导脉络膜新生血管生成小鼠模型中脉络膜新生血管生成的抑制作用。

试验原理：本实验通过一定能量激光破坏小鼠视网膜组织中局部的 Bruch's 膜，使得本该阻隔的脉络膜血供系统和视网膜血供系统相沟通，脉络膜毛细血管内皮细胞、周细胞、纤维细胞和炎症细胞等进入视网膜下和色素上皮层内，同时，伴随炎症因子、促血管生成因子产生和细胞外基质成分改变，打破局部促血管-抑血管生成因子间的平衡，促发局部新生血管生成，其中血管内皮生长因子(VEGF)、血小板衍生生长因子(PDGF)介导的内皮细胞生长和胞外基质、周细胞包绕对脉络膜新生血管生成具有重要作用。

二、实验材料与试剂:

实验动物: 成年 (6-8 周龄) C57BL/6J 母鼠, 购自上海斯莱克试验动物有限责任公司。

5 试验仪器:

图像分析仪: 德国 Zeiss 公司 KS 400 型

氩激光发射器: Lumenis Selecta Duet, 美国 Lumenis 公司

裂隙灯: 苏州六六

眼科手术器械: 淮阴医疗器械

10 眼科手术显微镜: 美国 LEICA 公司

载玻片、盖玻片: 世泰

微量注射仪及进样针: 美国 Parker 公司, Parker Hannifin PICOSPRITZER III

试剂准备:

美多丽眼药水: 参天制药有限公司

15 盐酸丙美卡因滴眼液: Alcon 公司

迪可罗眼膏: 兴齐制药有限公司

4%多聚甲醛: 上海生工

水合氯醛: 上海生工

葡聚糖荧光素钠试剂 fluorescein-labeled dextran : 美国 Sigma-Aldrich 公司

20 封片剂 (Fluorescent Mounting Medium) : DAKO

VTEP-17 (SEQ ID NO: 21) 和 VEGF-Trap (SEQ ID NO: 2) 蛋白: 用提供的溶解稀释缓冲液 (PBS 缓冲液) 按设计分组浓度要求稀释, 超净台内操作完成, 分装为 20ul/管 4 度低温保存, 以备取用。

GONIC 粘合剂: 美国 DOW

25 测试样品分组如下:

Group 1 (g1) : PBS 缓冲液

Group 2 (g2) : VEGF-Trap 10 ug

Group 6 (g6) : VTEP-17 5.1 ug

Group 7 (g7) : VTEP-17 15.4 ug

30 Group8 (g8) : VTEP-17 46.2 ug

三、实验方法:

6-8 周龄 C57/BL6 小鼠自由饮水进食, 12 小时明暗交替环境饲养, 随机分成 5 组, 每组 8 只, 雌雄各半, 按 0.01ml/g 体重腹腔注射 3.5%水合氯醛进行麻醉,

35 美多丽滴眼液涂于眼表扩瞳, 待麻醉充分后于裂隙灯下行眼底激光光凝 (波长 532nm, 能量 120mw, 时间 0.1s, 光斑直径 100nm), 以激光后可见气泡生成者计

为有效，其中有效激光斑距视乳头 1-2PD，分别位于不同象限，每眼 4-6 处，即造模成功。各组分别于造模后第 1 天、第 7 天腹腔注射水合氯醛麻醉，以玻璃体腔给药方式，用微量注射仪给予相应蛋白（见实验分组设计）。激光后第 14 天，腹腔注射水合氯醛麻醉，解剖胸腔，暴露心脏，25mg/ml 荧光素钠每只小鼠 0.4ml 行心腔灌注，过量麻醉处死小鼠后，取眼球，于 4%福尔马林室温固定 5 小时。取出固定后眼球，沿角巩缘剪开，去除晶体、角膜、玻璃体，余下眼杯以视乳头为中心做放射状切口剪开，将之展平于载玻片上，小心去除视网膜，滴加封片剂，盖盖玻片完成铺片。组织片于-20 度保存，隔天荧光显微镜下观察，20 倍放大物镜拍下激光斑图片，以 Image pro Plus 计数脉络膜新生血管面积。

数据处理：使用 SAS 9.0 统计学软件进行分析，单因素方差分析（One-way ANOVA）检验，用 t-test 对两组间均数进行比较， $P < 0.05$ 为有统计学差异。

四、实验结果：

单因素方差分析显示各组有统计学差异（ $P < 0.02$ ），其中 g1、g2 与其余各组均有显著性差异，g6、g7、g8 间无显著性差异。结果见图 11：模型小鼠眼部脉络膜新生血管面积，柱状图表示均数±标准误。

讨论：本实验中，VEGF-Trap 具有中和 VEGF 作用，VTEP-17 具有中和 PDGF 与中和 VEGF 的双重作用。实验结果提示这两种蛋白均能有效抑制脉络膜新生血管生成（G1 与其余各组比较有统计学差异），G2（单纯 VEGF-Trap）与 G6-8（不同浓度 VTEP-17）间存在统计学差异，提示 VTEP-17 抗血管生成作用效果强于 VEGF-Trap，但在此浓度跨度内计量-效应关系不明显，不同浓度 VTEP-17 组间抗血管生成作用无明显差异。

权利要求书:

1、一种双特异性融合蛋白，包括 VEGF 结合肽和 PDGFR β 结合肽。

5 2、如权利要求 1 所述的双特异性融合蛋白，其中还包括免疫球蛋白的 Fc 段。

3、如权利要求 2 所述的双特异性融合蛋白，其中所述免疫球蛋白的 Fc 段是免疫球蛋白 IgG 的 Fc 段。

10 4、如权利要求 3 所述的双特异性融合蛋白，其中所述 Fc 段的氨基酸序列选自 SEQ ID NO:7、SEQ ID NO: 8 或 SEQ ID NO: 9。

5、如权利要求 1 所述的双特异性融合蛋白，其中所述的 VEGF 结合肽包含 VEGFR 胞外结构域。

15 6、如权利要求 5 所述的双特异性融合蛋白，其中所述的 VEGFR 是 Flt-1。

7、如权利要求 5 所述的双特异性融合蛋白，其中所述的 VEGFR 是 Flk-1。

20 8、如权利要求 5 所述的双特异性融合蛋白，其中所述的 VEGFR 是 Flt-4。

9、如权利要求 5 所述的双特异性融合蛋白，其中所述的 VEGFR 胞外结构域包含 Flt1 的免疫球蛋白结构域 2，和 Flk1 或 Flt4 的免疫球蛋白结构域 3。

25 10、如权利要求 5 所述的双特异性融合蛋白，其中所述的 VEGFR 胞外结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示。

30 11、如权利要求 1 所述的双特异性融合蛋白，其中所述的 PDGFR β 结合肽的氨基酸序列选自序列 SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5 或 SEQ ID NO: 6 中的一个或多个。

12、如权利要求 1 所述的双特异性融合蛋白，其中还包括隔区，所述隔区的氨基酸序列选自：SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:12 的多个重复、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO: 14 或 SEQ ID NO: 15。

35 13、如权利要求 1 所述的双特异性融合蛋白，其中还包括氨基酸序列如 (GGGS)_n 所示的隔区，n 为 1-10，优选 2-5。

14、如权利要求 1 至 13 任一项所述的双特异性融合蛋白，其氨基酸序列选自：SEQ ID NO:19 至 SEQ ID NO:24。

5 15、一种如权利要求 1 至 14 任一项所述的双特异性融合蛋白的制备方法，包括：

构建表达载体，

将表达载体转化至宿主细胞，

在宿主细胞中表达，得到表达前体，

将双特异性融合蛋白分泌到细胞外，得到所述的双特异性融合蛋白。

10

16、一种用于制备如权利要求 1 至 14 任一项所述的双特异性融合蛋白的表达前体，其中所述表达前体由信号肽和如权利要求 1 至 14 任一项所述的双特异性融合蛋白组成；所述信号肽的氨基酸序列选自 SEQ ID NO:16 或 SEQ ID NO:17；优选所述信号肽位于所述双特异性融合蛋白的 N 端。

15

17、一种编码如权利要求 16 所述的表达前体的多核苷酸。

18、一种含有如权利要求 17 所述的多核苷酸的表达载体。

20

19、一种含有如权利要求 18 所述表达载体的宿主细胞。

20、如权利要求 19 所述的宿主细胞，其中所述的宿主细胞为真核细胞，优选酵母细胞，更优选毕赤酵母或酿酒酵母。

25

21、一种药物组合物，其含有：

如权利要求 1 至 14 任一项所述的双特异性融合蛋白，和可药用载体。

22、如权利要求 21 所述的药物组合物，其中所述的药物组合物为可注射的溶液，其中所述的双特异性融合蛋白和/或可药用载体是溶解形式的。

30

23、如权利要求 1 至 14 任一项所述的双特异性融合蛋白在制备用于治疗哺乳动物中与抑制 VEGF 和 PDGFR β 双靶点相关的疾病或病症的药物中的用途；优选在制备抑制 VEGF 和 PDGF 信号通路的药物中的用途；哺乳动物优选人类。

35

24、如权利要求 23 所述的用途，其中所述的疾病或病症是肿瘤或眼睛的疾病。

25、如权利要求 23 所述的用途，其中所述的疾病或病症是糖尿病视网膜病变

或年龄相关的黄斑变性，优选湿性老年性黄斑变性。

26、一种治疗湿性老年性黄斑变性的方法，其包括：

5 向患者给予治疗有效量的如权利要求 1 至 14 任一项所述的双特异性融合蛋白，或如权利要求 21 所述的药物组合物。

27、一种 PDGFR β 抗体衍生物，包括 PDGFR β 结合肽和免疫球蛋白的 Fc 段。

10 28、如权利要求 27 所述的 PDGFR β 抗体衍生物，其中所述的 PDGFR β 结合肽的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5 或 SEQ ID NO: 6。

29、如权利要求 27 所述的 PDGFR β 抗体衍生物，其中还包括隔区，所述隔区的氨基酸序列选自：SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:12 的多个重复、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO: 14 或 SEQ ID NO: 15。

15

30、如权利要求 27 所述的 PDGFR β 抗体衍生物，其中还包括氨基酸序列如 (GGGGS)_n 所示的隔区，n 为 1-10，优选 2-5。

20 31、如权利要求 27 所述的 PDGFR β 抗体衍生物，其氨基酸序列为 SEQ ID NO:18。

32、一种如权利要求 27 至 31 任一项所述的 PDGFR β 抗体衍生物的制备方法，包括：

25 构建表达载体，
将表达载体转化至宿主细胞，
在宿主细胞中表达，得到表达前体，
将 PDGFR β 抗体衍生物分泌到细胞外，得到所述的 PDGFR β 抗体衍生物。

30 33、一种用于制备如权利要求 27 至 31 任一项所述的 PDGFR β 抗体衍生物的表达前体，其中所述表达前体由信号肽和如权利要求 27 至 31 任一项所述的 PDGFR β 抗体衍生物组成；所述信号肽的氨基酸序列选自 SEQ ID NO:16 或 SEQ ID NO:17；优选所述信号肽位于所述 PDGFR β 抗体衍生物的 N 端。

34、一种编码如权利要求 33 所述的表达前体的多核苷酸。

35

35、一种含有如权利要求 34 所述的多核苷酸的表达载体。

36、一种含有如权利要求 35 所述表达载体的宿主细胞。

37、如权利要求 36 所述的宿主细胞，其中所述的宿主细胞为真核细胞，优选酵母细胞，更优选毕赤酵母或酿酒酵母。

5

38、一种药物组合物，其含有：

如权利要求 27 至 31 任一项所述的 PDGFR β 抗体衍生物，和
可药用载体。

10

39、如权利要求 38 所述的药物组合物，其中所述的药物组合物为可注射的溶液，其中所述的 PDGFR β 抗体衍生物和/或可药用载体是溶解形式的。

15

40、如权利要求 27 至 31 任一项所述的 PDGFR β 抗体衍生物在制备用于治疗哺乳动物中与抑制 PDGFR β 靶点相关的疾病或病症的药物中的用途；优选在制备抑制 PDGF 信号通路的药物中的用途；哺乳动物优选人类。

41、如权利要求 40 所述的用途，其中所述的疾病或病症是肿瘤或眼睛的疾病。

20

42、如权利要求 41 所述的用途，其中所述的疾病或病症是糖尿病视网膜病变或年龄相关的黄斑变性，优选湿性老年性黄斑变性。

43、一种治疗湿性老年性黄斑变性的方法，其包括：

向患者给予治疗有效量的如权利要求 27 至 31 任一项所述的 PDGFR β 抗体衍生物，或如权利要求 38 所述的药物组合物。

25

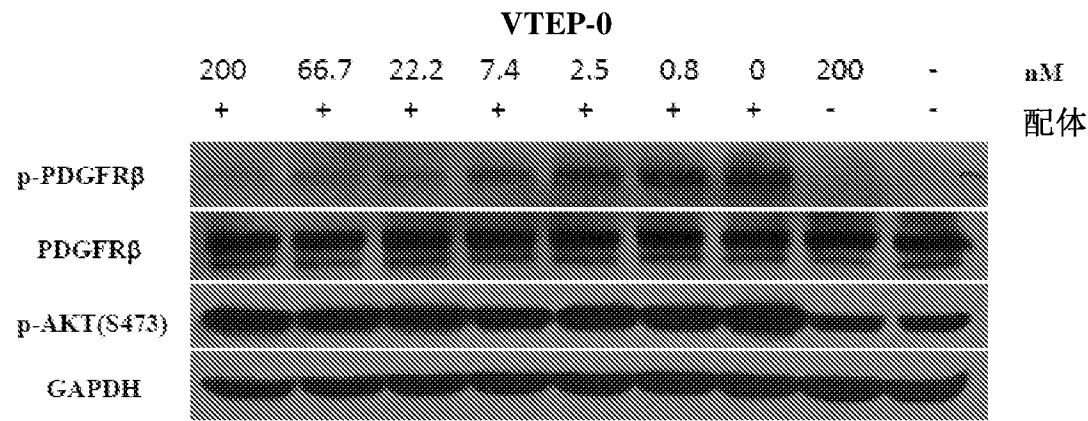


图 1

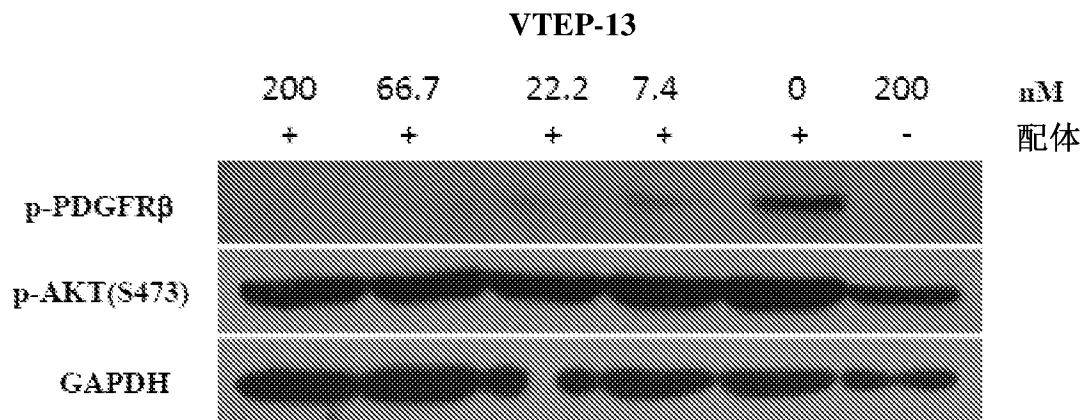


图 2

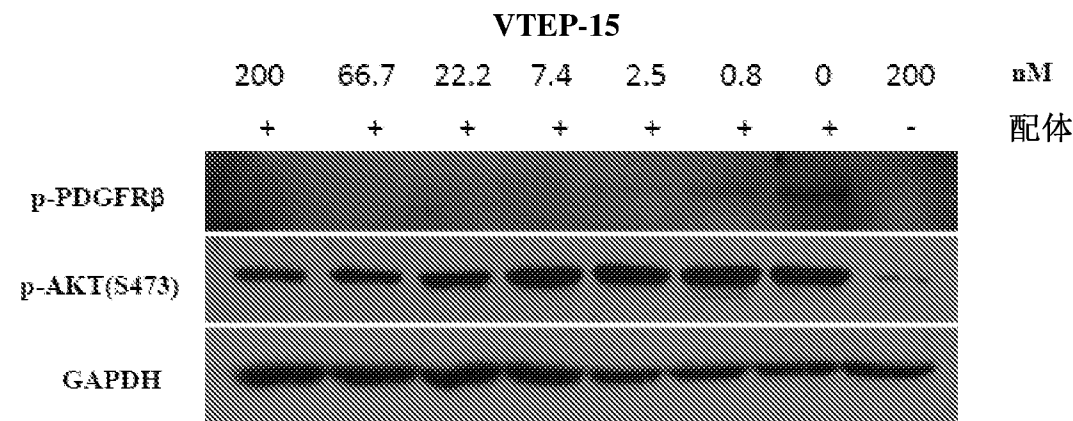


图 3

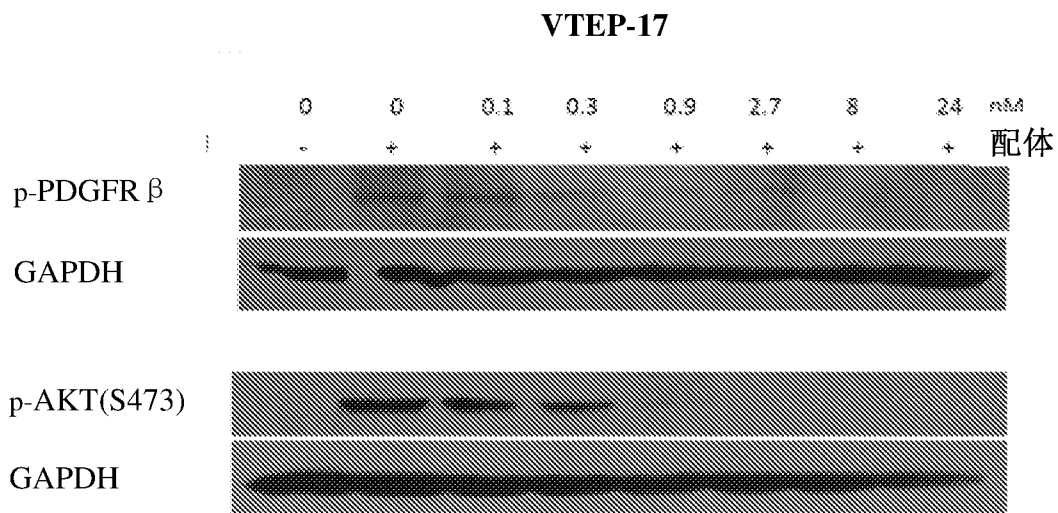


图 4

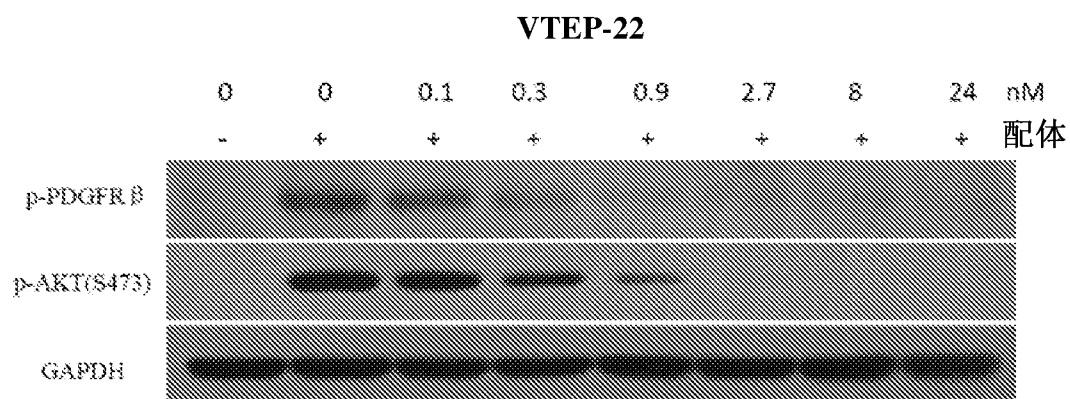


图 5

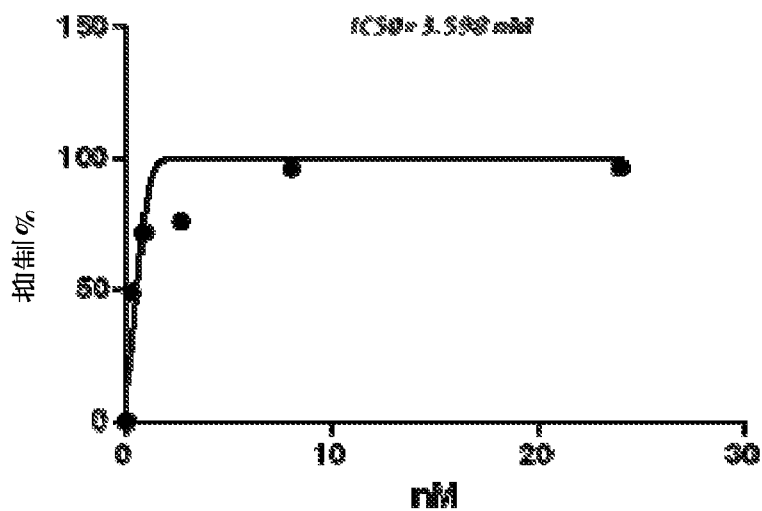


图 6

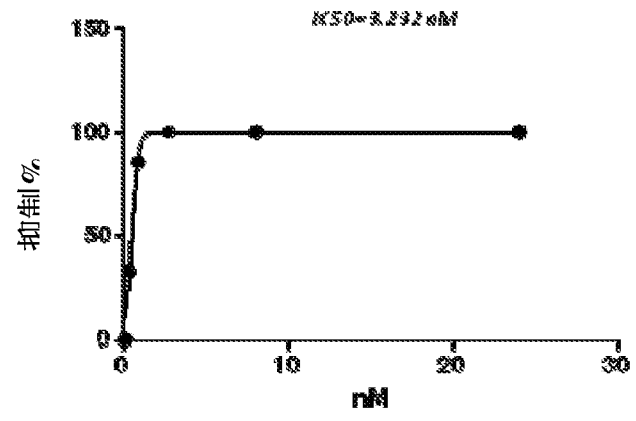


图 7

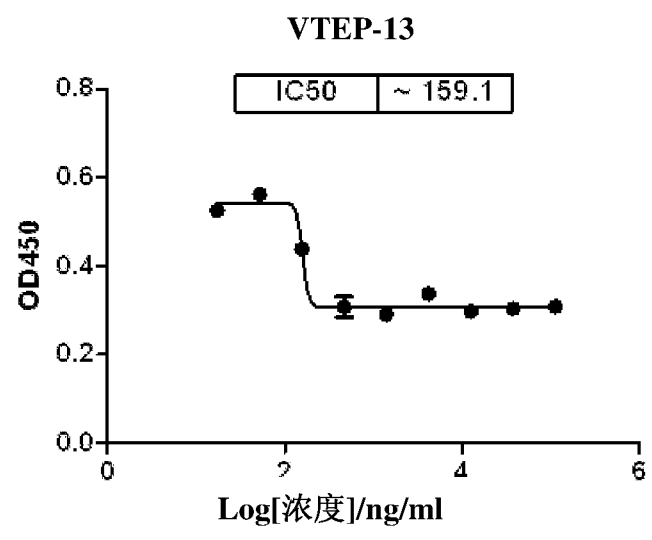


图 8

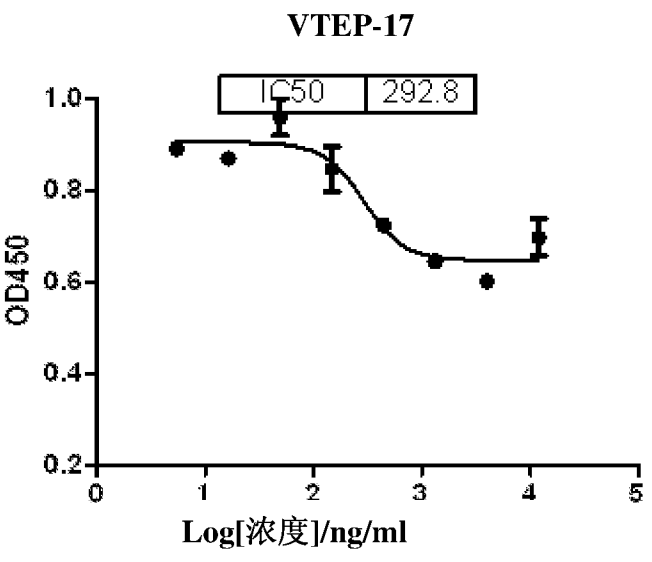


图 9

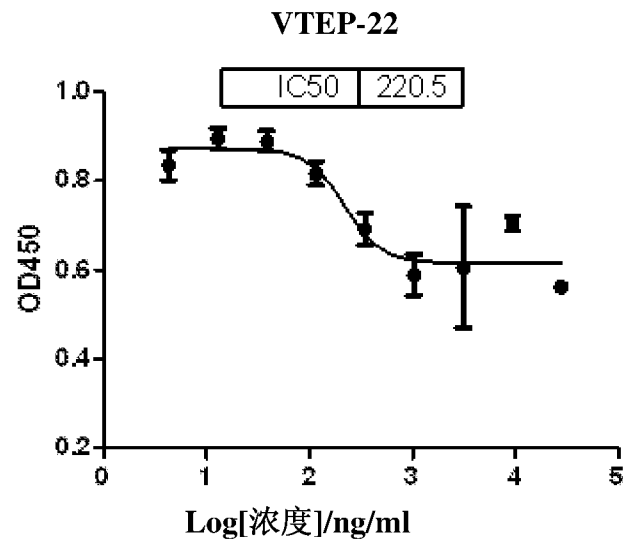


图 10

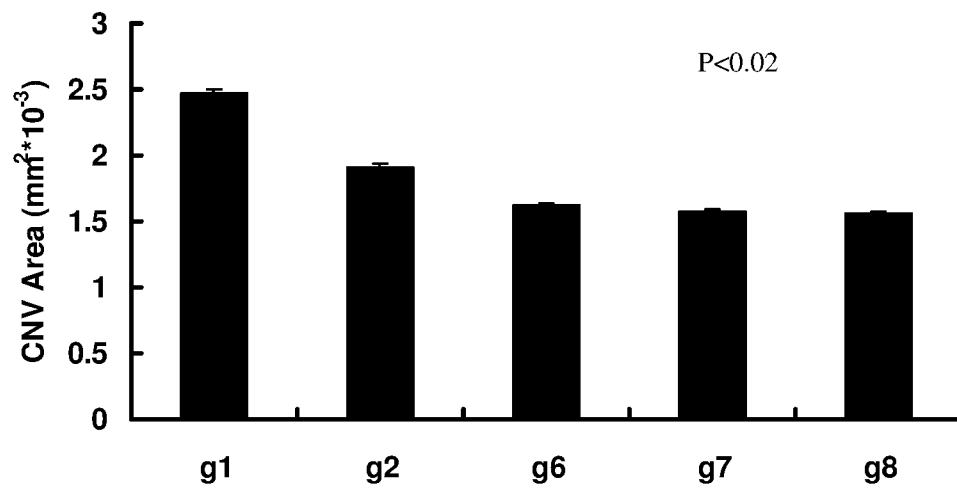


图 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2014/093555

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 19/00 (2006.01) i; C07K 16/46 (2006.01) i; C07K 14/475 (2006.01) i; C07K 16/28 (2006.01) i; C12N 15/62 (2006.01) i; C12N 15/63 (2006.01) i; C12N 5/10 (2006.01) i; A61K 38/00 (2006.01) i; A61K 39/395 (2006.01) i; A61P 35/00 (2006.01) i; A61P 27/02 (2006.01) i;

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K; C12N; 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)

DWPI; SIPOABS; CPRSABS; CNKI; NCBI; ISI Web of knowledge; ELISEVIER and keywords: VEGF, vascular endothelial growth factor, PDGFR, platelet derived growth factor receptor, XB2202, XB2708, antibody, fusion, etc.

Genbank; EMBL; Retrieving System for Biological Sequence of Chinese Patent: SEQ ID NO: 1-6

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 102250246 A (CHANGZHOU ADAM BIOTECH INC.) 23 November 2011 (23.11.2011) the abstract, claims 1-5, description, paragraphs [0009], [0059]-[0061], example 1	1, 2, 12, 13, 15, 23-25
X	WO 2013085972 A1 (BODY INC X) 13 June 2013 (13.06.2013) description, page 3, lines 3-5, pages 15-21, tables 3 and 4, page 28, lines 15-30, claims 5, 28 and 34	27, 28, 32, 38, 40-42
Y	CN 102219859 A (YANTAI RONGCHANG BIOENGINEERING CO., LTD.) 19 October 2011 (19.10.2011) claims 1-6	3-11, 14, 16-22, 29-31, 33-37, 39
Y	CN 102250246 A (YANTAI RONGCHANG BIOENGINEERING CO., LTD.) 23 November 2011 (23.11.2011) the abstract, claims 1-5, description, paragraphs [0009], [0059]-[0061], example 1	3-11, 14, 16-22, 29-31, 33-37, 39

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 02 March 2015	Date of mailing of the international search report 25 March 2015
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer YANG, Zhenyu Telephone No. (86-10) 62089435

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/CN2014/093555

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2013085972 A1 (BODY INC X) 13 June 2013 (13.06.2013) description, page 3, lines 3-5, pages 15-21, tables 3 and 4, page 28, lines 15-30, claims 5, 28 and 34	3-11, 14, 16-22, 29-31, 33-37, 39

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2014/093555

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.: 26 and 43
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] PCT Rule 39.1(iv)-Method for treatment of the human or animal body by surgery or therapy.
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).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

This Authority considers that there are 2 inventions covered by the claims 1-25 and 27-42 indicated as follows:

Invention 1, claims 1-25, directed to a bispecific fusion protein comprising VEGF binding peptide and PDGFR β binding peptide, and corresponding preparation method, precursor for expression, polynucleotide, expression vector, host cell, pharmaceutical composition and use thereof; invention 2, claims 27-42, directed to a PDGFR β antibody derivative comprising PDGFR β binding peptide and Fc fragment of immunoglobulin, and corresponding preparation method, precursor for expression, polynucleotide, expression vector, host cell, pharmaceutical composition and use thereof.

The same or corresponding technical feature between these two inventions is "a protein comprising PDGFR β binding peptide", such a technical feature has been disclosed by WO2013/085972A1 (see the abstract, description, page 15, table 3, page 24, lines 17-26). Therefore, the two inventions do not share a same or corresponding special technical feature that makes a contribution over the prior art, do not belong to one single general inventive concept, and therefore do not meet the requirement of unity of invention as defined in PCT Rule 13. 1.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on protest**
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2014/093555

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 102250246 A	23 November 2011	None	
WO 2013085972 A1	13 June 2013	JP 2015501814 A	19 January 2015
		AU 2012347972 A1	19 June 2014
		CN 104105708 A	15 October 2014
		TW 201333038 A	16 August 2013
		EP 2788379 A1	15 October 2014
		CA 2857721 A1	13 June 2013
		US 2013177572 A1	11 July 2013
CN 102219859 A	19 October 2011	AU 2012261410 A1	17 October 2013
		KR 20130125809 A	19 November 2013
		CN 102219859 B	12 September 2012
		WO 2012159548 A1	29 November 2012
		CA 2831161 A1	29 November 2012
		EP 2711377 A1	26 March 2014
		JP 2014513940 A	19 June 2014
		EP 2711377 A4	31 December 2014
		US 2013190235 A1	25 July 2013

A. 主题的分类 C07K 19/00(2006.01)i; C07K 16/46(2006.01)i; C07K 14/475(2006.01)i; C07K 16/28(2006.01)i; C12N 15/62(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; A61K 38/00(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 27/02(2006.01)i 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																	
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C07K; C12N; A61K; A61P 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 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)) DWPI; SIPOABS; CPRSABS; CNKI; NCBI; ISI Web of knowledge; ELSEVIER和关键词: VEGF, 血管内皮生长因子, vascular endothelial growth factor, PDGFR, platelet-derived growth factor receptor, 血小板衍生的生长因 子受体, XB2202, XB2708, antibody, 抗体, fusion, 融合, 等; GenBank; EMBL; 中国专利生物序列检索系统: SEQ ID NO: 1-6																	
C. 相关文件 <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>X</td> <td>CN 102250246 A (常州亚当生物技术有限公司) 2011年 11月 23日 (2011 - 11 - 23) 摘要, 权利要求1-5, 说明书第0009段, 第0059-0061段, 实施例1</td> <td>1、2、12、 13、15、23-25</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WO 2013085972 A1 (BODY INC X) 2013年 6月 13日 (2013 - 06 - 13) 说明书第3页第3-5行, 第15-21页表3和4, 第28页第15-30行, 权利要求5, 28和34</td> <td>27、28、32、 38、40-42</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 102219859 A (烟台荣昌生物工程有限公司) 2011年 10月 19日 (2011 - 10 - 19) 权利要求1-6</td> <td>3-11、14、16-22、 29-31、33-37、39</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 102250246 A (常州亚当生物技术有限公司) 2011年 11月 23日 (2011 - 11 - 23) 摘要, 权利要求1-5, 说明书第0009段, 第0059-0061段, 实施例1</td> <td>3-11、14、16-22、 29-31、33-37、39</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	X	CN 102250246 A (常州亚当生物技术有限公司) 2011年 11月 23日 (2011 - 11 - 23) 摘要, 权利要求1-5, 说明书第0009段, 第0059-0061段, 实施例1	1、2、12、 13、15、23-25	X	WO 2013085972 A1 (BODY INC X) 2013年 6月 13日 (2013 - 06 - 13) 说明书第3页第3-5行, 第15-21页表3和4, 第28页第15-30行, 权利要求5, 28和34	27、28、32、 38、40-42	Y	CN 102219859 A (烟台荣昌生物工程有限公司) 2011年 10月 19日 (2011 - 10 - 19) 权利要求1-6	3-11、14、16-22、 29-31、33-37、39	Y	CN 102250246 A (常州亚当生物技术有限公司) 2011年 11月 23日 (2011 - 11 - 23) 摘要, 权利要求1-5, 说明书第0009段, 第0059-0061段, 实施例1	3-11、14、16-22、 29-31、33-37、39
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
X	CN 102250246 A (常州亚当生物技术有限公司) 2011年 11月 23日 (2011 - 11 - 23) 摘要, 权利要求1-5, 说明书第0009段, 第0059-0061段, 实施例1	1、2、12、 13、15、23-25															
X	WO 2013085972 A1 (BODY INC X) 2013年 6月 13日 (2013 - 06 - 13) 说明书第3页第3-5行, 第15-21页表3和4, 第28页第15-30行, 权利要求5, 28和34	27、28、32、 38、40-42															
Y	CN 102219859 A (烟台荣昌生物工程有限公司) 2011年 10月 19日 (2011 - 10 - 19) 权利要求1-6	3-11、14、16-22、 29-31、33-37、39															
Y	CN 102250246 A (常州亚当生物技术有限公司) 2011年 11月 23日 (2011 - 11 - 23) 摘要, 权利要求1-5, 说明书第0009段, 第0059-0061段, 实施例1	3-11、14、16-22、 29-31、33-37、39															
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。																	
* 引用文件的具体类型: “ A ” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “ E ” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “ 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) “ O ” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “ 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 “ 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 “ 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 “ 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 “ & ” 同族专利的文件																	
国际检索实际完成的日期 2015年 3月 2日		国际检索报告邮寄日期 2015年 3月 25日															
ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 中国 传真号 (86-10)62019451		受权官员 杨振宇 电话号码 (86-10)62089435															

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
Y	WO 2013085972 A1 (BODY INC X) 2013年 6月 13日 (2013 - 06 - 13) 说明书第3页第3-5行，第15-21页表3和4，第28页第15-30行，权利要求5，28和34	3-11、14、16-22、 29-31、33-37、39

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： 26和43
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] PCT细则39.1(iv)——处置人体或者动物体的外科手术方法或治疗方法。
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。

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

- [1] 本国际单位认为，权利要求书包括权利要求1-25和27-42所要求保护的2项发明。这2项发明如下：
- [2] 第1项，权利要求1-25，涉及包括VEGF结合肽和PDGFR β 结合肽的双特异性融合蛋白，相应的制备方法、表达前体、多核苷酸、表达载体、宿主细胞、药物组合物以及用途；
- [3] 第2项，权利要求27-42，涉及包括PDGFR β 结合肽和免疫球蛋白的Fc段的PDGFR β 抗体衍生物，相应的制备方法、表达前体、多核苷酸、表达载体、宿主细胞、药物组合物以及用途。
- [4] 这2项发明的相同或相应的技术特征为“包括PDGFR β 结合肽的蛋白”，这一技术特征已经被W02013/085972A1公开（参见，摘要，说明书第15页表3，第24页第17-26行）。因此，这2项发明不具有相同或相应的体现发明对现有技术作出贡献的特定技术特征，不属于一个总的发明构思，因而不满足发明单一性的要求，不符合PCT实施细则13.1的规定。

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。
2. ☒ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何加费。
3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求，具体地说，是权利要求：
4. ☐ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是：

对异议的意见

- ☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。
- ☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。
- ☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2014/093555

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	102250246	A	2011年 11月 23日	无			
WO	2013085972	A1	2013年 6月 13日	JP	2015501814	A	2015年 1月 19日
				AU	2012347972	A1	2014年 6月 19日
				CN	104105708	A	2014年 10月 15日
				TW	201333038	A	2013年 8月 16日
				EP	2788379	A1	2014年 10月 15日
				CA	2857721	A1	2013年 6月 13日
				US	2013177572	A1	2013年 7月 11日
CN	102219859	A	2011年 10月 19日	AU	2012261410	A1	2013年 10月 17日
				KR	20130125809	A	2013年 11月 19日
				CN	102219859	B	2012年 9月 12日
				WO	2012159548	A1	2012年 11月 29日
				CA	2831161	A1	2012年 11月 29日
				EP	2711377	A1	2014年 3月 26日
				JP	2014513940	A	2014年 6月 19日
				EP	2711377	A4	2014年 12月 31日
				US	2013190235	A1	2013年 7月 25日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)