

(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
2023 年 6 月 1 日 (01.06.2023)



(10) 国际公布号
WO 2023/092324 A1

(51) 国际专利分类号:

C07K 19/00 (2006.01) *A61K 38/17* (2006.01)

C07K 14/71 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/132735

(22) 国际申请日: 2021 年 11 月 24 日 (24.11.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 苏州光度生物科技有限公司
(SUZHOU LIGHT FERRY BIOMED. CO., LTD) [CN/
CN]; 中国江苏省苏州市相城区高铁新城
南天成路 16 号科正大厦 505 室, Jiangsu 215000
(CN)。 香港光度生物有限公司 (HK LIGHT
FERRY BIOMED. LIMITED) [CN/CN]; 中国香港
特别行政区九龙旺角弥敦道 678 号华侨商业
中心 15 楼 C 室, Hong Kong (CN)。

(72) 发明人: 张健行 (CHANG, Chien-Hsing); 中国江
苏省苏州市相城区高铁新城南天成路 16
号科正大厦 505 室, Jiangsu 215000 (CN)。 尹
晴晴 (YIN, Qingqing); 中国江苏省苏州市相
城区高铁新城南天成路 16 号科正大厦
505 室, Jiangsu 215000 (CN)。

(74) 代理人: 中国贸促会专利商标事务所有
限公司 (CCPIT PATENT AND TRADEMARK LAW
OFFICE); 中国北京市复兴门内大街 158 号远
洋大厦 F10 层, Beijing 100031 (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,

(54) Title: MULTISPECIFIC LIGAND BINDING MOLECULE AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 多特异性配体结合分子及其应用

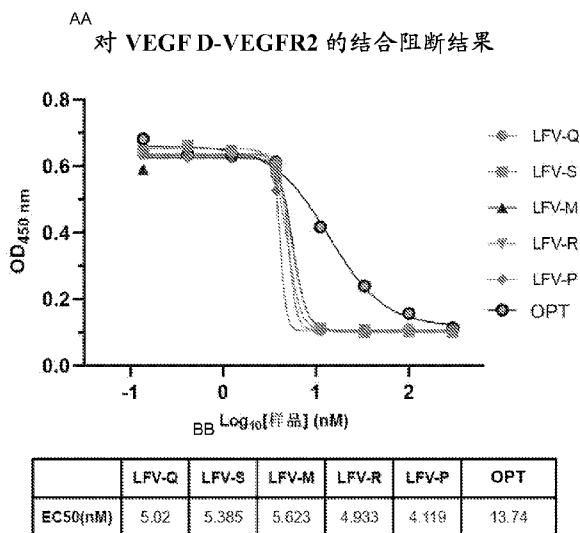


图 15d

AA Binding blocking result for VEGF D-VEGFR2
BB Log10[sample] (nM)

(57) Abstract: The present invention relates to a ligand binding molecule capable of binding one or more growth factors comprising VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, PIGF, PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, and PDGF-CC, a glycosylation modified molecule thereof, a fusion protein and composition containing the ligand binding molecule, and a production method for and application of the ligand binding molecule.

(57) 摘要: 本发明涉及可结合包括 VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、PIGF、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB、PDGF-CC 在内的一种或多种生长因子的配体结合分子, 其糖基化改造形式分子, 包含这类配体结合分子的融合蛋白和组合物, 以及其产生方法和用途。

[见续页]

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,
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))。

多特异性配体结合分子及其应用

技术领域

本发明涉及蛋白质领域，具体地，本发明涉及配体结合分子，以及此类配体结合分子的糖基化改造形式、融合蛋白和缀合物，编码这类分子的核酸序列，以及其产生方法和用途。

背景技术

血管内皮生长因子（又称为VEGF）相关基因家族包括多种分泌型的糖蛋白，包括VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E。VEGF-A是一个45000Da的具有广泛血管生成活性的糖蛋白，其基因由8个外显子和7个内含子组成，根据不同的剪切方式形成分为5种单体，即VEGF121、VEGF145、VEGF165、VEGF189、VEGF206，其中VEGF165是VEGF-A最重要的同源单体之一。

VEGF-A在血管早期的形成中发挥重要作用，所有血管化组织均可表达VEGF-A。除此之外，许多其它细胞在缺氧应激条件下也可表达VEGF-A，如巨噬细胞、血小板、树突状细胞（DC）、活化的T细胞、视网膜色素上皮细胞、视网膜中的Muller细胞、星形胶质细胞、成骨细胞、支气管与肺泡上皮细胞、周细胞、血管平滑肌细胞、肌成纤维细胞、角质形成细胞、肾系膜细胞和肿瘤细胞等。

VEGF-C和VEGF-D在胚胎和出生后的淋巴管生成方面发挥着关键作用。纯合子缺乏VEGF-C基因小鼠在胚胎期是致命的，杂合子缺乏导致生后小鼠淋巴管发展缺陷。VEGF-C和VEGF-D可能在新生血管方面也发挥着重要作用，特别在病理期时，如肿瘤生长。VEGF-E是从羊口疮病毒感染组分离出来的，有刺激内皮细胞的增殖、迁移，还具有增强血管的通透性的作用（Vladimir Joukov等人The EMBO Journal 15（2）:290-98，1996年2月）。

VEGF配体通过多种不同受体（即通过配体-受体相互作用）介导血管生成作用。两个受体最初在内皮细胞证实，它们为特殊的酪氨酸激酶受体（receptor tyrosine kinase, RTK）VEGFR-1（Flt-1）和VEGFR-2（Flk-1）。后来证实在成人多种生血细胞谱上也是表达的。这两种受体由具有7个免疫球蛋白样结构的胞外区、膜区及酪氨酸激酶区组成，均是跨膜受体，属于RTK III型，其共同特点是催化域内有酪氨酸激酶插入区，该酪氨酸

激酶的活性通过受体和配体结合而激活，受体磷酸化可引起细胞内许多酶和其他反应，在细胞的生长和分化中起重要作用。最近，一种另外的RTK，VEGFR3 (Fit-4) 被证实，并且发现与淋巴管生成密切相关。不同的VEGF家族成员具有不同的受体结合位点。

在肿瘤生长、眼科血管增生等与血管新生相关的疾病中，抑制血管新生是一种有效的治疗手段。在过去几十年中，对VEGF相关信号进行了大量的研究，并且有许多药物用于治疗，例如Lucentis (Ranibizumab雷珠单抗)、Eylea (Aflibercept阿柏西普)、Avastin (bevacizumab贝伐珠单抗)、Cyramza (Ramucirumab雷莫芦单抗)、Inlyta (Axitinib阿西替尼)、Stivarga (regorafenib 瑞戈非尼)、Cometriq (cabozantinib卡博替尼)、OFEV (Nintedanib尼达尼布)、Lenvim (envatinib乐伐替尼)。

年龄相关湿性黄斑病变 (wAMD) 与糖尿病黄斑水肿 (DME) 病患广，病程进展快，发病后果严重 (视力丧失)，是导致失明的最大诱因。目前的主要治疗方式是靶向VEGF-A，其比传统治疗手段 (激光光凝等) 具有明显进步的疗效，相应的靶向药 (如雷珠单抗、阿柏西普等) 也取得了巨大的市场成功。但单一靶向VEGF-A仍无法彻底攻克这些疾病，例如在AMD治疗后，仅三分之一的病人能够完全受益，其余病人的视力无明显增加，三分之一的病人视力仍接近失明 (Rofagha S, Bhisitkul RB, Boyer DS, Sadda SR, Zhang K. Seven-Year Outcomes in Ranibizumab-Treated Patients in ANCHOR, MARINA, and HORIZON: A multicenter cohort study (SEVEN UP) [J]. Ophthalmology, 2013, 120 (11):2292-2299)。目前已知的上市及在临床中的多个靶向VEGF-A的药品，亲和力 (K_D) 从皮摩尔到纳摩尔水平不等，在临床治疗中均展现出接近的效果，这表明了单一靶向VEGF-A疗法或已经到达了其疗效上限。

综上所述，过去几十年中，对VEGF相关信号进行了大量的研究，在新生血管及肿瘤等相关疾病，还有明显的未被满足的临床需求。本发明针对这一需求提出了新的解决办法。本发明提供了能够靶向VEGF、PIGF和PDGF家族的新分子，这对于治疗新生血管相关的疾病有重要的临床意义。

发明内容

本发明涉及可结合包括VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、PIGF、PDGF-A、PDGF-B、PDGF-C在内的一种或多种生长因子的配体结合分子 (即多特异性配体结合分子)，其糖基化改造形式分子，包含这类配体结合分子的组合物，及其产生方法和使用

用途。本发明进一步验证了所述配体结合分子在体内和体外的效果，尤其是用于抗血管新生方面的效果。

在一些方面，本公开提供一种分离的配体结合分子，其包含VEGFR2衍生序列，并且其相比于天然VEGFR2（例如天然全VEGFR2胞外结构域，例如胞外序列Met 1-Glu 764）具有增强的对VEGF-A、VEGF-C、VEGF-D、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB和PDGF-CC中的至少一种，更优选两种，更优选三种，更优选四种，更优选五种，更优选六种，最优选七种的结合能力。所述VEGFR2衍生序列是与以下任一种氨基酸序列具有至少95%同一性的氨基酸序列：

(a) SEQ ID NO: 2的位置117-218限定的氨基酸序列（例如LFV-A）；

(b) SEQ ID NO: 2的位置117-327限定的氨基酸序列（例如LFV-B）；

(c) SEQ ID NO: 2的位置123-327限定的氨基酸序列（例如LFV-C、LFV-G、LFV-H、LFV-I、LFV-J、LFV-K、LFV-L）；

(d) SEQ ID NO: 2的位置117-421限定的氨基酸序列（例如LFV-D）；

(e) SEQ ID NO: 2的位置23-327限定的氨基酸序列（例如LFV-E）；和

(f) SEQ ID NO: 2的位置23-421限定的氨基酸序列（例如LFV-F）。

在一些实施方案中，所述 VEGFR2 衍生序列是 (a) - (f) 中任一种的 N 末端和/或 C 末端截短后的片段，例如截短 20 个、15 个、10 个、9 个、8 个、7 个、6 个、5 个、4 个、3 个、2 个或 1 个氨基酸或由其组成。

在一些实施方案中，所述 VEGFR2 衍生序列相比于天然 VEGFR2 胞外域中相应位置处的序列包含一个或多个氨基酸的插入、取代或缺失，例如在糖基化位点处的插入、缺失或取代。

在一些实施方案中，可在糖基化位点处进行多种修饰以去除糖基化，特别是消除“NXT”和/或“NXS”三氨基酸等已知的糖基化作用位点，例如通过将 N 突变为 Q 或 A。具体的糖基化位点可选自例如，对应于 SEQ ID NO: 2 的氨基酸位置 46、66、96、143、158、245 和 318 处。在一些实施方案中，将上述位点处的 Asn 取代为 Gln 或 Ala 或其他合适的氨基酸。具体地，糖基化位点的取代可选自以下：N143A、N143Q、N158A、N158Q、N245Q 和 N318Q。

在一些实施方案中，所述 VEGFR2 衍生序列包含选自下组的氨基酸序列或由其组成：SEQ ID No: 4-15 和 18。

在一些实施方案中，所述配体结合分子除了包含 VEGFR2 衍生序列以外，还包含 VEGFR1 衍生序列。所述 VEGFR1 衍生序列可选自下组：

(i) 与 SEQ ID NO: 1 的位置 132-230 所示的氨基酸序列具有至少 95% 同一性的氨基酸序列；和

5 (ii) (i) 的氨基酸序列的 N 末端和/或 C 末端截短后的氨基酸序列，例如截短 20 个、15 个、10 个、9 个、8 个、7 个、6 个、5 个、4 个、3 个、2 个或 1 个氨基酸。

10 在一些实施方案中，所述配体结合分子包含与 SEQ ID NO: 2 的位置 117-327 或 123-327 所示的氨基酸序列具有至少 95% 同一性的氨基酸序列可操作地连接于所述 VEGFR1 衍生序列。例如，所述配体结合分子包含选自下组的氨基酸序列或由其组成：SEQ ID No: 16-17 和 19-21。

在一些另外的实施方案中，所述配体结合分子除了包含 VEGFR2 衍生序列以外，还包含 VEGFR3 衍生序列。所述 VEGFR3 衍生序列可选自下组：

(i) 与 SEQ ID NO: 3 的位置 25-216、25-115、47-115、154-210、248-314 或 25-329 所示的氨基酸序列具有至少 95% 同一性的氨基酸序列；和

15 (ii) (i) 的氨基酸序列的 N 末端和/或 C 末端截短后的氨基酸序列，例如截短 20 个、15 个、10 个、9 个、8 个、7 个、6 个、5 个、4 个、3 个、2 个或 1 个氨基酸。

20 在一些另外的实施方案中，所述配体结合分子包含与 SEQ ID NO: 2 的位置 117-327、123-327 或 221-312 所示的氨基酸序列具有至少 95% 同一性的氨基酸序列可操作地连接于所述 VEGFR3 衍生序列。例如，所述配体结合分子包含选自下组的氨基酸序列或由其组成：SEQ ID No: 22-30。

25 在一些实施方案中，所述配体结合分子还包含免疫球蛋白的 Fc 区，所述免疫球蛋白选自 IgA、IgM、IgE、IgD 和 IgG，包括 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4，优选为人 IgG1 的 Fc 区或其变体，任选地还包含铰链区。所述免疫球蛋白的铰链区和 Fc 区可以通过接头（例如 GPG）或不通过接头可操作性地连接于所述 VEGFR2 衍生序列、VEGFR1 衍生序列或 VEGFR3 衍生序列的 C 末端。在一些实施方案中，所述 Fc 区或其变体是包含磷脂等大分子化合物的聚合形式。

在一些实施方案中，Fc 区如 SEQ ID No: 31 的第 104-330 位氨基酸序列所示。

在一些具体的实施方案中，本文公开的配体结合分子包含 SEQ ID No: 32-59 中的任

一种序列或由其组成。

在一些实施方案中，所述配体结合分子还包含信号肽。

在一些实施方案中，所述配体结合分子能结合 VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、PIGF、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB 和 PDGF-CC 蛋白中的至少一种，优选至少两种，更优选至少三种，更优选至少四种，更优选至少五种，更优选至少六种，更优选至少七种，更优选至少八种，更优选全部九种。优选地，所述配体结合分子能结合多种靶标，即是一种多特异性配体结合分子。所述 VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、PIGF、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB 和 PDGF-CC 蛋白可以来自或衍生自人、小鼠、大鼠或食蟹猴。例如，上述蛋白可以是人源的，包括其加工或未加工形式，以及磷酸化激活或未磷酸化激活形式。

在一些实施方案中，所述配体结合分子能以 5nM 或更低的 K_D 结合 VEGF-A、VEGF-C、VEGF-D、PDGF-AB 中的至少一种，优选至少两种，更优选至少三种，最优选全部四种，如通过 SPR 测定的。

在一些实施方案中，所述配体结合分子能以 50 pM 或更低，优选 40 pM 或更低，更优选 30 pM 或更低，更优选 20 pM 或更低，更优选 10 pM，更优选 5 pM，更优选 4 pM，更优选 3 pM，更优选 1 pM，或更低的 K_D 结合 VEGF-A 和 VEGF-C 中的至少一种，如通过 SPR 测定的。

在一些实施方案中，所述配体结合分子能以 20 nM 或更低，优选 15 nM 或更低，更优选 10 nM 或更低，更优选 5 nM 或更低，更优选 3 nM 或更低的 K_D 结合 VEGF-D，如通过 SPR 测定的。

在一些实施方案中，所述配体结合分子能以 50nM 或更低，优选 40 nM 或更低，更优选 30 nM 或更低，更优选 28 nM 或更低，更优选 26 nM 或更低，更优选 24 nM 或更低，更优选 22 nM 或更低，更优选 20 nM 或更低，更优选 18 nM 或更低，更优选 15 nM 或更低，更优选 10 nM 或更低的 K_D 结合 PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB 和 PDGF-CC 中的至少一种，优选至少两种，优选至少三种，更优选全部四种，如通过 SPR 测定的。

在一些实施方案中，所述配体结合分子能抑制或阻断 VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、PIGF、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB 和 PDGF-CC 蛋白中的至少一种与该蛋白的相应受体的结合。

在一些实施方案中，所述受体选自 VEGFR-1 受体、VEGFR-2 受体、VEGFR-3 受体、PDGFR- α 受体和 PDGFR- β 受体。所述受体根据其在生理、病理中发挥作用时的结合形式，可以为单体形式、同源二聚体形式或相互间形成任意异二聚体的形式。

在一些方面，本发明还提供了一种融合蛋白，其包含上文公开的配体结合分子可操作地连接于异源性肽。所述异源性肽可以选自以下：另外的配体结合分子，如常见的人源受体蛋白胞外结构域（ECD）或其截短及重组多肽；抗体可变区片段及其组合，如抗体 Fab、单链抗体（scFv）、纳米抗体（nanobody）、人重链可变区单域抗体（V_H）；活性多肽及蛋白适配体。

在一些实施方案中，所述异源性肽为靶向 VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB、PDGF-CC、PDGF-DD、Ang-2、TGF- β 、CTGF（结缔组织生长因子）、EGF（表皮生长因子）、S1P、Galectin、Decorin、或前述蛋白的受体的异源性肽。

在一些实施方案中，所述可操作地连接为直接连接或经由连接子连接。

在一些实施方案中，所述配体结合分子直接连接或通过连接子连接于所述异源性肽的 N 末端或 C 末端。例如，在 C 末端通过肽键直接连接于异源性肽的 N 末端，或在 N 末端通过肽键直接连接于异源性肽的 C 末端。在一些实施方案中，所述连接子为多肽或化学基团。

在一些方面，本发明还提供了一种缀合物，其包含如上文所述的配体结合分子或融合蛋白缀合于至少一个选自以下的模块：修饰模块、毒素（例如化学治疗剂）、可检测标记（例如放射性同位素、镧系元素、发光标记、荧光标记或酶-底物标记）或纯化模块。例如，所述修饰模块是聚乙二醇模块，任选地所述聚乙二醇模块附接于所述配体结合分子的氨基末端。

在一些方面，本发明还提供了一种分离的核酸分子，其包含编码所述配体结合分子或融合蛋白的多核苷酸序列。所述核酸分子可以进一步包含连接至所述多核苷酸序列的启动子序列或其他调控序列。

在一些方面，本发明还提供了一种载体，其包含所述核酸分子。所述载体可以包括但不限于，慢病毒载体、腺相关病毒载体、腺病毒载体、脂质体载体及其任意组合。在一些实施方案中，所述载体为复制缺陷型腺病毒载体，其中所述核酸分子可操作地连接至启动子并且两侧具有腺病毒多核苷酸序列。

在一些方面，本发明还提供了一种宿主细胞，其经过上文所述的多核苷酸或载体转化或转染。所述宿主细胞优选为真核细胞，例如中国仓鼠卵巢（CHO）细胞或人细胞。

在一些方面，本发明还提供了一种制备配体结合分子的方法，其包括以下步骤：

在适宜的条件下培养如上文所述的宿主细胞以表达所述配体结合分子；并从宿主细胞5 的培养上清液分离所述配体结合分子。

在一些方面，本发明还提供了一种药物组合物，其包含如上文公开的所述配体结合分子或融合蛋白或编码所述配体结合分子的核酸分子，以及药学上可接受的佐剂或载剂，例如稀释剂或赋形剂。所述组合物可以被制成用于局部施用或玻璃体内注射或植入施用。所述组合物可以为固体、糊剂、软膏、凝胶、液体、气雾剂、喷雾剂、聚合物、薄膜、乳10 液或混悬液形式。

在一些方面，本发明还提供了一种预防、抑制和/或治疗受试者中的新生血管形成以及由新生血管形成引起的疾病或病况的方法，所述方法包括以有效抑制所述受试者中的新生血管形成的量向所述受试者施用如本文公开的配体结合分子或药物组合物。

在一些实施方案中，所述新生血管形成为视网膜新生血管形成和/或脉络膜新生血管15 形成。

在一些实施方案中，所述疾病或病况选自脉络膜血管病变或新生、视网膜血管新生、黄斑血管新生和与眼底渗漏有关的眼部病症。

在一些实施方案中，所述组合物被局部施用于所述受试者的眼睛，或者通过玻璃体内注射施用、通过玻璃体内植入物施用、或通过局部施用来施用所述组合物。

20 在一些方面，本发明还提供了所述的配体结合分子或融合蛋白在制备用于治疗受试者中新生血管形成以及由新生血管形成引起的疾病或病况的药物中的用途。

在一些方面，本发明还提供了所述的配体结合分子或融合蛋白用于治疗受试者中新生血管形成以及由新生血管形成引起的疾病或病况。

25 在一些方面，本发明提供了一种试剂盒，其包含如本文所述的配体结合分子或融合蛋白或药物组合物。

以上内容是一个概述，因此必要时包含细节的简化、概括和省略；因此，本领域技术人员将认识到，该概述仅是举例说明性的，并不意图以任何方式进行限制。本文所述的方法、组合物和用途和/或其他主题的其它方面、特征和优势将在本文所示的教导中变

得明显。

附图说明

图 1 显示衍生于 VEGFR2 和 VEGFR3 的各种融合蛋白配体结合分子与 VEGF-A165 (图 1a)、VEGF-C (图 1b) 或 VEGF-D (图 1c) 结合的 ELISA 结果。

图 2 显示衍生于 VEGFR2 的各种配体结合分子与 VEGF-C 结合的 ELISA 结果。

图 3-4 分别显示各种配体结合分子对 VEGFR2-VEGF C (图 3a)、VEGFR2-VEGF D (图 3b)、VEGFR3-VEGF C (图 4a) 和 VEGFR3-VEGF D (图 4b) 之间结合的阻断 ELISA 结果。

图 5 显示衍生于 VEGFR2 的各种配体结合分子对 VEGF-A 165 (图 5a) 和 VEGF-A 121 (图 5b) 的结合 ELISA 结果。

图 6 分别显示各种配体结合分子对 VEGFR2-VEGF A165(图 6a)和 VEGFR2-VEGF-A 121 (图 6b) 之间结合的阻断 ELISA 结果。

图 7 显示配体结合分子在小鼠体内的药代动力学结果。

图 8 显示配体结合分子在大鼠 CNV 模型中的治疗效果。

图 9 显示经糖基化修饰去除的配体结合分子对 VEGF-A 165-VEGFR2 (图 9a)、VEGF C-VEGFR2 (图 9b)、VEGF D-VEGFR2 (图 9c)、VEGF D-VEGFR3 (图 9d) 的阻断 ELISA 结果。

图 10 显示衍生于 VEGFR1 和 VEGFR2 的配体结合分子对 VEGF-A 165-VEGFR2 (图 10a)、VEGF-A 165-VEGFR1 (图 10b)、VEGF C-VEGFR2 (图 10c)、VEGF D-VEGFR2 (图 10d)、VEGF D-VEGFR3 (图 10e) 的阻断 ELISA 结果。

图 11 显示衍生于 VEGFR1 和 VEGFR2 的配体结合分子对 VEGF-B (图 11a)、PIGF (图 11b) 的结合 ELISA 结果。

图 12 显示经融合和糖基化改造后的配体结合分子对 VEGF-A 165-VEGFR2(图 12a)、VEGF C-VEGFR2 (图 12b)、VEGF D-VEGFR2 (图 12c) 的阻断 ELISA 结果。

图 13 显示 LFV-Q 对 VEGF-B (图 13a)、PIGF (图 13b) 的结合 ELISA 结果。

图 14 显示 LFV-M 糖基化位点去除前后的一步纯化后的 SEC 单峰纯度检测结果。

图 15 显示 LFV-Q、LFV-S、LFV-M、LFV-R 分子对 VEGF-A 165-VEGFR2 (图 15a)、VEGF-A 165-VEGFR1 (图 15b)、VEGF C-VEGFR2 (图 15c)、VEGF D-VEGFR2 (图 15d) 的阻断 ELISA 结果。

图 16 显示 LFV-Q、LFV-S、LFV-M、LFV-R 对 VEGF-B (图 16a)、PlGF (图 16b) 的结合 ELISA 结果。

图 17 显示 LFV-Q、LFV-B、LFV-R、LFV-C 对 VEGF-A (图 17a)、VEGF-C (图 17b)、VEGF-D (图 17c) 的与 VEGFR2-Fc 相对比的 ELISA 结合效力。

图 18a-18b 显示 LFV-R、LFV-Q 对 HUVEC 细胞的增殖抑制实验结果。

图 19a-19b 显示 LFV-R、LFV-Q 对激光诱导大鼠脉络膜新生血管的治疗实验结果。

发明详述

除非另有定义，否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本公开所属领域的普通技术人员通常所理解的相同含义。本文引用的所有专利、专利申请和其他出版物均通过引用全文并入。如果本文中提出的定义与通过引用并入本文的专利、专利申请和其他出版物中提出的定义相冲突，则以本文中提出的定义为准。

如本文所用的，术语“VEGF”是指 VEGF 家族，其由 VEGF 糖蛋白(VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D 和 VEGF-E)。VEGF-A 涵盖 VEGF-A 的任何形式，包括 VEGF-A 的天然蛋白(加工或未加工形式)、全长 VEGF-A、其片段(例如截短形式、胞外/跨膜结构域)或变体(例如剪接变体、等位变体或人工改造的变体)以及其修饰形式(例如糖基化)。人体中根据不同的剪切方式存在 5 种 VEGF-A 同等型，即 VEGF121、VEGF145、VEGF165、VEGF189、VEGF206，其中 VEGF165 是 VEGF-A 最重要的同源单体。类似地，VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D 也涵盖其天然蛋白(包括加工或未加工形式)、全长或片段(例如截短形式、胞外/跨膜结构域)或变体(例如剪接变体、等位变体或人工改造的变体)以及其修饰形式(例如糖基化)。

如本文所用的，术语“血管内皮生长因子受体”或“VEGF 受体”包括 VEGFR1、VEGFR2 和 VEGFR3，它们是受体酪氨酸激酶家族的成员。这三种受体的蛋白质包含由 6 或 7 个免疫球蛋白(Ig)样结构域(分别称为 D1-D7)组成的大的细胞外区域、单一的跨膜(TM)螺旋和具有酪氨酸激酶活性的胞质区域以及另外的调控序列。在提及“VEGFR2”、“VEGFR1”、“VEGFR3”时，根据上下文，本文中指的是全长或其全部

或部分细胞外结构域。人 VEGFR2 和 VEGFR3 的天然蛋白的全长氨基酸序列的示例分别是 SEQ ID No: 2 和 SEQ ID No: 3。所有的 VEGF-A 亚型可同时结合 VEGFR1 和 VEGFR2, VEGF-B 与 VEGFR-1 特异性结合和激活, VEGF-E 的特异性与 VEGFR-2 有关。VEGF-C 和 VEGF-D 主要经由结合 VEGFR3 发挥作用, 但也可以结合 VEGFR2, 5 不过这种结合要弱于对 VEGFR3 的结合。VEGF-A 也可以结合 VEGFR2, 但同样这种结合要弱于对 VEGFR1 的结合。之前, 由于 VEGFR2 可以结合多种 VEGF 分子, 其特异性被认为不如 VEGFR1, 所以阿柏西普的研发主要是基于 VEGFR1, 而 VEGFR2, 尤其是其与 VEGF-C 和 VEGF-D 的结合特性至今未引起足够的重视和探究。

如本文所用的, 术语“血小板衍生生长因子”或“PDGF”属于血管内皮生长因子家族, 10 是含有糖链, 相对分子量为 30kD 左右的多肽生长因子。PDGF 基本是由 A、B、C、D 4 条多肽链通过二硫键形成的同源或异源二聚体分子, 有 PDGF-AA、BB、AB、CC、DD 5 种亚型。PDGF 最先发现于血小板的 α 颗粒中, 目前已经证明二倍体细胞, 如单核细胞、血管平滑肌细胞、内皮细胞、胚胎细胞、系膜细胞 (MC) 和集合管细胞等均可产生 PDGF。PDGF 促进周细胞迁移、募集分布, PDGF-B 是机体发育过程中血管成熟和稳定 15 极其重要的调节基因, PDGF-A、B、C 有一定的促淋巴管新生的作用, 尤其是 PDGF-B 被认为有很强的促淋巴管新生的作用, 且与血管生成有一定的关系。此外, PDGF 是最早被发现的结缔组织生长因子, 其能促进内皮细胞、胶质细胞、成纤维细胞和血管平滑肌细胞的生长及分化, 已在临床上被应用于创伤的修复治疗。

如本文所用的, 术语“PDGF-AA”、“PDGF-AB”、“PDGF-BB”和“PDGF-CC”是指 20 PDGF 的二聚体形式 AA、AB、BB、CC 以及其片段或变体。它们一般以由二硫键固定的同型或异型二聚体与 PDGF 受体结合并发挥作用。PDGF A 与 B 链既可形成同型二聚体, 又可形成异型二聚体。PDGF C 链主要以同二聚体形式发挥作用。实验证明 PDGF 是一种重要的促有丝分裂因子, 具有刺激特定细胞群分裂增殖的能力, 在组织的病理纤维化中具有重要作用。

PDGF 受体由两种亚基 α 及 β 构成, 有 $\alpha\alpha$ 、 $\alpha\beta$ 、 $\beta\beta$ 三种二聚体形式, 都可以结合 25 PDGF 分子。 α 单位主要识别 PDGF A 链、B 链与 C 链, 因而 $\alpha\alpha$ 受体可结合 PDGF-AA、AB、BB 与 CC。 β 单位主要识别 PDGF B 链, 从而 $\beta\beta$ 受体主要结合 PDGF-BB。 $\alpha\beta$ 受体可结合 PDGF-AB、BB。PDGF 分子与 PDGF 受体结合以后, 会促进受体的二聚化, 进而向下游传导信号, 以自分泌、旁分泌的方式发挥促进细胞增殖与刺激细胞趋化等作用, 主要在血管平滑肌细胞、成纤维细胞、胶质细胞等细胞中发挥作用。 30

如本文所用的，术语“可操作地连接”是指两个或更多个感兴趣的生物序列的并置（带有或不带有间隔区或接头或插入序列）以使得它们处于允许以意图方式起作用的关系。当就多肽使用时，是指以允许连接的产物具有意图的生物学功能的方式连接多肽序列。例如，配体结合分子可以可操作地连接于免疫球蛋白恒定区，以便提供具有配体结合活性的稳定产物。又例如，配体结合分子可以与免疫球蛋白恒定区通过其间的插入序列可操作地连接，并且该类插入序列可以是间隔区或可以包含更长的序列。

如本文所用的，当就氨基酸序列（例如肽、多肽或蛋白质）使用时，术语“融合”或“融合的”是指两个或更多个氨基酸序列的组合，例如通过化学键合或重组的方式，形成天然不存在的单个氨基酸序列。融合氨基酸序列可以通过两个编码多核苷酸序列的遗传重组产生，并且可以通过将包含重组多核苷酸的构建体引入宿主细胞的方法来表达。

如本文所用，术语“分离的”是指通过人工方式从天然状态获得的状态。如果某种“分离的”物质或组分天然存在，则可能是因为其天然环境发生变化，或者物质与天然环境分离，或者两者兼而有之。例如，某种未分离的多核苷酸或多肽天然存在于某个活动物体体内，从该天然状态分离的相同的高纯度多核苷酸或多肽被称为分离的多核苷酸或多肽。术语“分离的”既不排除混合的人造或合成物质，也不排除不影响分离的物质的活性的其他不纯物质。

如本文所用，术语“同一性”是指通过比对和比较序列确定的两个或更多个多肽或多肽分子或两个或更多个核酸分子的序列之间的关系。“百分比同一性”是指比较分子中氨基酸或核苷酸之间相同残基的百分比，并基于被比较的最小分子的大小计算。对于这些计算，比对中的缺口（如果有的话）优选通过特定的数学模型或计算机程序（即“算法”）来寻址。可以用于计算比对的核酸或多肽的同一性的方法包括在 **Computational Molecular Biology**, (Lesk, A. M. 编), 1988, New York: Oxford University Press ; **Biocomputing Informatics and Genome Projects**, (Smith, D. W. 编), 1993, New York: Academic Press; **Computer Analysis of Sequence Data, Part I**, (Griffin, A. M. 和 Griffin, H. G. 编), 1994, New Jersey: Humana Press; von Heinje, G., 1987, **Sequence Analysis in Molecular Biology**, New York: Academic Press; **Sequence Analysis Primer**, (Gribskov, M. 和 Devereux, J. 编), 1991, New York: M. Stockton Press; 和 Carillo 等人, 1988, **SIAMJ. Applied Math.** 48:1073 中描述的那些。

如本文所用，术语“特异性结合”或“特异性地结合”是指两个分子之间，例如配体和配体结合分子之间的非随机结合反应。在某些实施方案中，本文提供的配体结合分子以

$\leq 10^{-6}\text{M}$ (例如, $\leq 5 \times 10^{-7}\text{M}$ 、 $\leq 2 \times 10^{-7}\text{M}$ 、 $\leq 10^{-7}\text{M}$ 、 $\leq 5 \times 10^{-8}\text{M}$ 、 $\leq 2 \times 10^{-8}\text{M}$ 、 $\leq 10^{-8}\text{M}$ 、 $\leq 5 \times 10^{-9}\text{M}$ 、 $\leq 4 \times 10^{-9}\text{M}$ 、 $\leq 3 \times 10^{-9}\text{M}$ 、 $\leq 2 \times 10^{-9}\text{M}$ 、或 $\leq 10^{-9}\text{M}$) 的结合亲和力 (K_D 或写为 KD) 特异性结合人 VEGF-A 和/或人 PDGF。如本文中在 SPR 实验中所提供的, K_d 是解离常数, K_a 是缔合常数, 而 K_D 是平衡解离常数 (K_d/K_a)。 K_D 可通过使用本领域已知的任何常规方法来确定, 包括但不限于表面等离子体共振方法、微量热泳动法、HPLC-MS 方法和流式细胞术 (例如 FACS) 方法。

如本文所用, “阻断结合”的能力是指本发明的配体结合分子抑制两个分子 (例如 VEGF-A、C、D 和 VEGFR2, VEGF-C、D 和 VEGFR3) 之间的结合相互作用至任何可检测程度的能力。在某些实施方案中, 阻断两个分子之间的结合的配体结合分子抑制两个分子之间的结合相互作用至少 85% 或至少 90%。在某些实施方案中, 抑制可以大于 85%, 或大于 90%。

如本文所用, 术语“有效量”涉及活性化合物的量或包含活性化合物的材料、组合物或剂量的量, 其在按照所需的治疗方案施用时有效用于产生与合理的益处/风险比相称的某些所需的治疗效果, 例如, 有效量在本文中可以指有效抑制受试者中的新生血管形成的量, 有效抑制受试者中 (例如眼部) VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、PIGF、PDGF-AA、PDGF-BB、PDGF-AB、PDGF-CC 中的至少一种所需的量, 或刺激在眼部细胞或眼睛血管中表达的 VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3 和 PDGF 受体家族的至少一种的量。

I. 包含衍生于 VEGFR2 的氨基酸序列的配体结合分子

在一些方面, 本发明提供了一种分离的配体结合分子, 其能够特异性结合一种或多种 VEGF/PDGF 分子。所述 VEGF/PDGF 分子可以选自下组: VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、PIGF、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB 和 PDGF-CC。

优选地, 所述配体结合分子能够特异性地结合 VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、PIGF、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB 和 PDGF-CC 中的至少两种, 更优选至少三种, 更优选地至少四种, 更优选地至少五种, 更优选地至少六种, 更优选地至少七种, 更优选地至少八种。最优选地, 所述配体结合分子对 VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、PIGF、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB 和 PDGF-CC 都具有特异性结合亲和力。

如本文所用，表述“特异性结合...”或“对...具有特异性结合亲和力”在指生长因子时，不仅包括特异性结合该生长因子的游离、活性形式，还包括结合该生长因子的其他形式。例如，**VEGF-A** 有多种同工型，其中一些处于循环中而另一些与细胞表面上的肝素硫酸蛋白聚糖缔合。特异性结合 **VEGF-A** 的配体结合分子结合至少一种循环中的同工型，优选所有循环中的同工型，更优选结合其他的同工型。因此，在提到配体结合分子特异性结合 **VEGF-A** 时，涵盖其能够特异性结合 **VEGF-A121**、**VEGF-A145**、**VEGF-A165**、**VEGF-A189** 和 **VEGF-A206**。再比如，**VEGF-C** 在翻译时被翻译成具有延展的氨基末端和羧基末端原肽的前体分子，其被切割而产生 **VEGF-C** 的“完全加工”形式。特异性结合 **VEGF-C** 的配体结合分子涵盖结合 **VEGF-C** 的完全加工形式，优选还涵盖结合其部分加工形式和未加工形式。

在一些实施方案中，所述配体结合分子包含一个或多个衍生于天然 **VEGFR2**，且相比于天然 **VEGFR2** 全胞外结构域或对照配体结合分子，对 **VEGF-A**、**VEGF-B**、**VEGF-C**、**VEGF-D**、**PIGF**、**PDGF-AA**、**PDGF-AB**、**PDGF-BB** 和 **PDGF-CC** 中一种或多种的结合亲和力显著提高。例如，所述配体结合分子相比于天然 **VEGFR2** 全胞外结构区或对照配体结合分子，对 **VEGF-A**、**VEGF-C** 和 **VEGF-D** 中一种或多种的结合亲和力显著提高。

优选地，所述 **VEGF-A**、**VEGF-B**、**VEGF-C**、**VEGF-D**、**PIGF**、**PDGF-AA**、**PDGF-AB**、**PDGF-BB**、**PDGF-CC** 是来自或衍生自哺乳动物例如人、鼠、猴的，更优选地，分别是人的天然 **VEGF-A**、**VEGF-B**、**VEGF-C**、**VEGF-D**、**PIGF**、**PDGF-AA**、**PDGF-AB**、**PDGF-BB**、**PDGF-CC**，包括其各种同工型、部分加工或未加工的前体形式。

在一些实施方案中，所述 **VEGF-A**、**VEGF-B**、**VEGF-C**、**VEGF-D**、**PIGF**、**PDGF-AA**、**PDGF-AB**、**PDGF-BB** 和 **PDGF-CC** 中的一种或多种呈现为游离的可溶性蛋白质，或者是在细胞表面表达的锚定形式。

本发明还涵盖所述配体结合分子能够结合 **VEGF-A**、**VEGF-B**、**VEGF-C**、**VEGF-D**、**PIGF**、**PDGF-AA**、**PDGF-AB**、**PDGF-BB**、**PDGF-CC** 的异常高表达形式，从而可经由结合这些异常高表达的生长因子而促进机体恢复正常机能。如本领域已知的，部分在病理状态中 **VEGF/PDGF/PIGF** 生长因子过量表达，使这些生长因子在机体组织中呈现异常功能。

在一些实施方案中，所述配体结合分子优选以约 **1nM** 或更小（例如，**500pM**、**400pM**、**300pM**、**200pM**、**100pM**、**50pM**、**10pM**、**5pM**、**1pM** 或更小）的 K_D 结合人 **VEGF-A**，

和/或人 VEGF-C。所述配体结合分子优选以约 10nM 或更小（例如，5nM、1nM、500pM、400pM、300pM、200pM、100pM、50pM、10pM 或更小）的 K_D 结合人 VEGF-D、人 PDGF-AB 和人 PDGF-BB 的至少一种。所述配体结合分子优选以约 50nM 或更小（例如，30nM、10nM、5nM、1nM、500pM、400pM、300pM、200pM、100pM、50pM、10pM 或更小）的 K_D 结合人 PDGF-AA 和/或人 PDGF-CC。

在一些实施方案中，所述配体结合分子能以 50 pM 或更低，优选 40 pM 或更低，更优选 30 pM 或更低，更优选 20 pM 或更低，更优选 10 pM 或更低的 K_D 结合 VEGF-A 和 VEGF-C 中的至少一种，如通过 SPR 测定的。

在一些实施方案中，所述配体结合分子能以 20 nM 或更低，优选 15 nM 或更低，更优选 10 nM 或更低，更优选 5 nM 或更低，更优选 3 nM 或更低的 K_D 结合 VEGF-D，如通过 SPR 测定的。

在一些实施方案中，所述配体结合分子能以 1 nM 或更低，优选 0.5 nM 或更低，更优选 0.4 nM 或更低，更优选 0.3 nM 或更低，更优选 0.2 nM 或更低的 EC_{50} 结合 VEGF-C；能以 1 nM 或更低，优选 0.5 nM 或更低，更优选 0.4 nM 或更低，更优选 0.3 nM 或更低，更优选 0.2 nM 或更低，更优选 0.1 nM 或更低的 EC_{50} 结合 VEGF-A（例如 VEGF-A165），如通过 ELISA 测定的。

在一些实施方案中，所述配体结合分子能以 50nM 或更低，优选 40 nM 或更低，更优选 30 nM 或更低，更优选 28 nM 或更低，更优选 26 nM 或更低，更优选 24 nM 或更低，更优选 22 nM 或更低，更优选 20 nM 或更低，更优选 18 nM 或更低，更优选 15 nM 或更低，更优选 10 nM 或更低的 K_D 结合 PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB 和 PDGF-CC 中的至少一种，优选至少两种，优选至少三种，更优选全部四种，如通过 SPR 测定的。

在一些实施方案中，本文所公开的配体结合分子能够阻断选自以下的一种或多种生长因子与受体之间的结合：

(a) VEGF-A 与 VEGFR-1、VEGFR-2 或 PDGFR- α ;

(b) VEGF-B、PlGF 与 VEGFR-1

(c) VEGF-C 与 VEGFR-2 或 VEGFR-3;

(d) VEGF-D 与 VEGFR-2 或 VEGFR-3;

(e) PDGF-A 与 PDGFR- α ;

(f) PDGF-B 与 PDGFR- α 或 PDGFR- β ;

(g) PDGF-C 与 PDGFR- α ;

(h) PDGF-D 与 PDGFR- β 。

任选地，所述配体结合分子能够阻断选自以下的一种或多种生长因子与受体之间的结合：

5 (a) VEGF-A、B、C、D 中的任一种与 PDGFR- α 或人 PDGFR- β ;

(b) PDGF-A、B、C、D 中的任一种与 VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3、PDGFR- α 和 PDGFR- β 中的任一种。

如实施例所验证的，本文公开的配体结合分子能以相比于天然 VEGFR2 分子或对照配体结合分子更低的 EC₅₀（例如低于 1 nM、低于 0.5 nM、低于 0.4 nM）阻断 VEGF-C
10 或 VEGF-D 与 VEGFR-2 或 VEGFR-3 的结合。

如本领域已知的，VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3、PDGFR- α 和 PDGFR- β 中的任一种或多种可以是以同源二聚化形式与 VEGF/PDGF 生长因子结合而被激活，也可以是以任意异源二聚化形式与 VEGF/PDGF 生长因子结合而被激活。以人 VEGFR-2 为例，其相应形成的二聚化形式包括但不限于，人 VEGFR2-人 VEGFR2、人 VEGFR2-人
15 VEGFR1、人 VEGFR2-人 VEGFR3、人 VEGFR2-人 PDGFR α 、人 VEGFR2-人 PDGFR β 二聚体。因此，在本文中提及阻断生长因子与受体之间的结合时，涵盖阻断生长因子与处于各种形式（例如单体、同源二聚体或异源二聚体等）的受体之间的结合。

在一些实施方案中，所述配体结合分子包含一个或多个衍生于 VEGFR2（特别是 VEGFR2 的胞外区）的氨基酸序列，所述衍生于 VEGFR2 的氨基酸序列是 VEGFR2 的
20 片段或与其具有至少 80% 同一性的氨基酸序列。具体地，所述 VEGFR2 的片段可选自以下：

(a) SEQ ID NO: 2 的位置 20-116 限定的氨基酸序列，或 SEQ ID NO: 2 的位置 46-110 限定的氨基酸序列；

(b) SEQ ID NO: 2 的位置 117-218 限定的氨基酸序列，或 SEQ ID NO: 2 的位置 141-
25 207 限定的氨基酸序列；

(c) SEQ ID NO: 2 的位置 219-327 限定的氨基酸序列，或 SEQ ID NO: 2 的位置 224-320 限定的氨基酸序列；

(d) SEQ ID NO: 2 的位置 328-421 限定的氨基酸序列，或 SEQ ID NO: 2 的位置 328-414 限定的氨基酸序列；和

(e) (a)、(b)、(c)或(d)的 N 末端或 C 末端截短或延长片段（例如截短或延长不超过 20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2 或 1 个氨基酸）。

所述配体结合分子可以包含两个或更多个衍生于 VEGFR2 胞外区的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述衍生于 VEGFR2 胞外区的氨基酸序列是 VEGFR2（优选人 VEGFR2）胞外区的片段。两个或更多个衍生于 VEGFR2 胞外区的氨基酸序列彼此之间可以直接连接或经由间隔区连接，或者，在所述配体结合分子为双链二聚体的情况下，可以在两条分别的链上。

在一些实施方案中，所述配体结合分子包含(b)的 N 末端截短片段，例如 SEQ ID NO: 2 的位置 123-218 限定的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述配体分子包含(b)和(c)的氨基酸序列两者，例如(b)的氨基酸序列直接连接于(c)的氨基酸序列，即 SEQ ID NO: 2 的位置 117-327 限定的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述配体分子包含(b)的 N 末端截短片段和(c)的氨基酸序列两者，例如(b)的 N 末端截短的片段直接连接于(c)的氨基酸序列，即 SEQ ID NO: 2 的位置 123-327 限定的氨基酸序列。

在一些实施方案中，本文所述的配体结合分子包含如 SEQ ID NO:2 的位置 20-116 所示的氨基酸序列、如 SEQ ID NO:2 的位置 117-218 所示的氨基酸序列、如 SEQ ID NO:2 的位置 219-327 所示的氨基酸序列、如 SEQ ID NO:2 的位置 328-421 所示的氨基酸序列、或与上述序列具有至少 80%、或至少 85%、或至少 90%、或至少 92%、或至少 95%、或至少 96%、或至少 97%、或至少 98%、或至少 99%同一性的氨基酸序列。

在一些实施方案中，本文所述的配体结合分子包含如 SEQ ID NO:2 的位置 117-327 所示的氨基酸序列、如 SEQ ID NO:2 的位置 23-327 所示的氨基酸序列、如 SEQ ID NO:2 的位置 117-421 所示的氨基酸序列、如 SEQ ID NO:2 的位置 23-421 所示的氨基酸序列、或与上述序列具有至少 80%、或至少 85%、或至少 90%、或至少 92%、或至少 95%、或至少 96%、或至少 97%、或至少 98%、或至少 99%同一性的氨基酸序列。

在一些实施方案中，具有同一性的氨基酸序列是如 SEQ ID NO:2 的位置 20-116 所示的氨基酸序列、如 SEQ ID NO:2 的位置 117-218 所示的氨基酸序列、如 SEQ ID NO:2 的位置 219-327 所示的氨基酸序列、如 SEQ ID NO:2 的位置 328-421 所示的氨基酸序列、如 SEQ ID NO:2 的位置 117-327 所示的氨基酸序列、如 SEQ ID NO:2 的位置 23-327 所示的氨基酸序列、如 SEQ ID NO:2 的位置 117-421 所示的氨基酸序列、或如 SEQ ID NO:2 的位置 23-421 所示的氨基酸序列的 N 末端和/或 C 末端截短和/或延伸后的片段。优选地，所述截短或延伸不多于 40 个氨基酸，例如不多于 30 个氨基酸，不多于 20 个氨基

酸, 不多于 15 个氨基酸、不多于 10 个氨基酸、不多于 8 个氨基酸、不多于 6 个氨基酸、不多于 5 个氨基酸、不多于 4 个氨基酸、不多于 3 个氨基酸、不多于 2 个氨基酸或不多于 1 个氨基酸。在一些特定的实施方案中, 本文所述的配体结合分子包含如 SEQ ID NO:2 的位置 123-218 所示的氨基酸序列或如 SEQ ID NO:2 的位置 123-327 所示的氨基酸序列。

5 在一些实施方案中, 具有同一性的氨基酸序列相比于如 SEQ ID NO:2 的位置 20-116 所示的氨基酸序列、如 SEQ ID NO:2 的位置 117-218 所示的氨基酸序列、如 SEQ ID NO:2 的位置 219-327 所示的氨基酸序列、如 SEQ ID NO:2 的位置 328-421 所示的氨基酸序列、如 SEQ ID NO:2 的位置 117-327 所示的氨基酸序列、如 SEQ ID NO:2 的位置 23-327 所示的氨基酸序列、如 SEQ ID NO:2 的位置 117-421 所示的氨基酸序列、或如 SEQ ID NO:2 的位置 23-421 所示的氨基酸序列包含一个或多个氨基酸修饰, 例如氨基酸的取代、插入、缺失等。所述氨基酸修饰可以是在糖基化位点的突变以消除糖基化位点, 例如消除 N 糖基化位点或 O 糖基化位点。在一些实施方案中, 所述修饰是在 SEQ ID NO:2 的位置 Asn46、Asn66、Asn96、Asn143、Asn158、Asn245 和 Asn318 中一处或多处的突变。

15 II. 包含衍生于 VEGFR2 以及衍生于其他受体的氨基酸序列的配体结合分子

20 在一些方面, 本发明的配体结合分子除了包含衍生于 VEGFR2 的氨基酸序列以外, 还包含衍生于其他受体的氨基酸序列, 用于改进对 VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、PIGF、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB、PDGF-CC 中至少一种的结合或阻断。其他受体可以是其他受体酪氨酸激酶, 如 VEGFR-1、VEGFR-3、PDGFR- α 和/或人 PDGFR- β 。

在一些实施方案中, 本公开的配体结合分子包含一个或多个衍生于 VEGFR2 的氨基酸序列以及一个或多个衍生于 VEGFR3 (例如人 VEGFR3, 特别是 VEGFR3 的胞外区) 的氨基酸序列。具体地, 所述衍生于 VEGFR2 的氨基酸序列可操作地连接于衍生于 VEGFR3 的氨基酸序列。所述可操作地连接可以是彼此直接连接或经由间隔区相连接。

25 在一些实施方案中, 所述衍生于 VEGFR3 的氨基酸序列是 VEGFR3 的片段或与其具有至少 80% 同一性的氨基酸序列。具体地, 所述 VEGFR3 的片段可选自以下: SEQ ID NO: 3 的位置 25-115 限定的氨基酸序列; SEQ ID NO: 3 的位置 154-210 限定的氨基酸序列; SEQ ID NO: 3 的位置 248-314 限定的氨基酸序列; SEQ ID NO: 3 的位置 25-210 限定的氨基酸序列; SEQ ID NO: 3 的位置 154-314 限定的氨基酸序列; SEQ ID NO: 3 的

位置 25-314 限定的氨基酸序列；和上述任一项的 N 末端或 C 末端截短和/或延长片段（例如截短或延长不超过 40、30、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2 或 1 个氨基酸）。

所述配体结合分子可以包含两个或更多个衍生于 VEGFR3（优选人 VEGFR3）胞外区的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述衍生于 VEGFR3 胞外区的氨基酸序列是人 VEGFR3 胞外区的片段。在包含两个或更多个衍生于 VEGFR3 胞外区的氨基酸序列的情况下，所述彼此之间可以直接连接或经由间隔区连接，或者，在所述配体结合分子为双链二聚体的情况下，可以在两条分别的链上。

在一些实施方案中，本文所述的配体结合分子包含如 SEQ ID NO: 3 的位置 25-210 所示的氨基酸序列、如 SEQ ID NO: 3 的位置 25-314 所示的氨基酸序列、或与上述序列具有至少 80%、或至少 85%、或至少 90%、或至少 92%、或至少 95%、或至少 96%、或至少 97%、或至少 98%、或至少 99% 同一性的氨基酸序列。

在一些实施方案中，具有同一性的氨基酸序列是如 SEQ ID NO: 3 的位置 25-210 所示的氨基酸序列或如 SEQ ID NO: 3 的位置 25-314 所示的氨基酸序列的 N 末端或 C 末端截短后的片段。例如，所述截短不多于 40 个氨基酸，例如不多于 30 个氨基酸，不多于 20 个氨基酸，不多于 15 个氨基酸、不多于 10 个氨基酸、不多于 8 个氨基酸、不多于 6 个氨基酸、不多于 5 个氨基酸、不多于 4 个氨基酸、不多于 3 个氨基酸、不多于 2 个氨基酸或不多于 1 个氨基酸。在一些特定的实施方案中，本文所述的配体结合分子包含如 SEQ ID NO: 3 的位置 47-210 所示的氨基酸序列所示的氨基酸序列。

在一些实施方案中，具有同一性的氨基酸序列相比于如 SEQ ID NO: 3 的位置 25-210 所示的氨基酸序列或如 SEQ ID NO: 3 的位置 25-314 所示的氨基酸序列包含一个或多个氨基酸修饰，例如氨基酸的取代、插入、缺失等。

如本领域已知的，间隔区可以采用多种形式。在一些实施方案中，间隔区为肽序列，其长度在 1-100 个氨基酸之间，优选 1-50 个氨基酸。在一些实施方案中，间隔区衍生于天然 VEGFR-2 或 VEGFR-3 中对应位置处的连接序列（即衍生片段的序列两端处的连接序列）。在一些实施方案中，间隔区包含与连接天然人 VEGFR-2 或人 VEGFR-3 中的片段的天然肽序列或其部分至少 80%、或至少 85%、或至少 90%、或至少 92%、或至少 95%、或至少 96%、或至少 97%、或至少 98%、或至少 99% 相同的氨基酸序列。

备选地，所述间隔区可以使用或不被使用，可以是本领域中常用的接头序列，例如 (G4S)_n、AAA 或其他天然短肽序列。如本领域技术人员将理解的，间隔区可以具有较广

范围的氨基酸序列。

在一些具体的实施方案中，衍生于人 VEGFR3 的氨基酸序列与衍生于人 VEGFR2 的氨基酸序列经由间隔区相连接，其中衍生于人 VEGFR3 的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 3 的位置 25-210 限定的氨基酸序列，衍生于人 VEGFR2 的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 2 的位置 219-327 限定的氨基酸序列，间隔区包含与 SEQ ID NO: 3 的位置 211-231 或 SEQ ID NO: 2 的位置 211-220 限定的氨基酸序列具有至少 80%、或至少 85%、或至少 90%、或至少 92%、或至少 95%、或至少 96%、或至少 97%、或至少 98%、或至少 99% 同一性的氨基酸序列。所述衍生于人 VEGFR3 的氨基酸序列可以在衍生于人 VEGFR2 的氨基酸序列的 N 末端或 C 末端。

在一些实施方案中，本公开的所述配体结合分子包含一个或多个衍生于 VEGFR2 的氨基酸序列以及一个或多个衍生于 VEGFR1（例如人 VEGFR1，特别是 VEGFR1 的胞外区）的氨基酸序列。具体地，所述其中衍生于 VEGFR2 的氨基酸序列可操作地连接于衍生于 VEGFR3 的氨基酸序列。所述可操作地连接可以是直接彼此直接连接或经由间隔区相连接。

在一些实施方案中，所述衍生于 VEGFR1 的氨基酸序列是 VEGFR1 的片段或与其具有至少 80% 同一性的氨基酸序列。具体地，所述 VEGFR1 的片段可选自以下：SEQ ID NO: 1 的位置 132-230 限定的氨基酸序列和/或其 N 末端和/或 C 末端截短和/或延长后的片段（例如截短或延长不超过 40、30、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2 或 1 个氨基酸）。

在一些实施方案中，具有同一性的氨基酸序列相比于如 SEQ ID NO: 1 的位置 132-230 所示的氨基酸序列包含一个或多个氨基酸修饰，例如氨基酸的取代、插入、缺失等。

在一些方面，所述配体结合分子包含一个或多个衍生于 VEGFR2 的氨基酸序列以及一个或多个衍生于 VEGFR1 的氨基酸序列。具体地，所述衍生于 VEGFR2 的氨基酸序列可操作地连接于衍生于 VEGFR1 的氨基酸序列。所述可操作地连接可以是彼此直接连接或经由间隔区相连接。在一些实施方案中，所述衍生于 VEGFR1 的氨基酸序列是 VEGFR1 的片段或与其具有至少 80% 同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述 VEGFR1 的片段选自如 SEQ ID NO: 1 的位置 132-230 所示的氨基酸序列，或其 N 末端和/或 C 末端的截短和/或延长后的片段。

III. 包含 Fc 区以及任选地信号肽的配体结合分子

本发明的配体结合分子可以是单体（即单链），也可以是二聚体（即双链）或多聚体。在二聚体或多聚体结构中，配体结合分子的各个链彼此共价或非共价连接。在一些实施方案中，连接发生在配体结合分子的 VEGFR-2 衍生的序列之间。

5 在一些实施方案中，本发明提供的配体结合分子还包含免疫球蛋白恒定结构域序列，例如人 IgG 的恒定结构域序列，更具体地可包含铰链区和 Fc 区，例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 的 Fc 区序列。所述免疫球蛋白恒定结构域序列可以通过接头连接至衍生自 VEGFR1 和/或 VEGFR2 和/或 VEGFR3 的序列。如本领域已知的，Fc 是指由抗体的第一重链的第二和第三恒定区经由二硫键合结合至第二重链的第二和第三恒定区组成的抗体的部分，任选地 Fc 区还包含全部或部分的铰链区。本文中的 Fc 区既包括野生型 Fc 区还包括其变体，具有用于多种目的的不同突变。所述变体可在 Fc 区中包含一个或多个氨基酸残基修饰，例如取代。

在某些实施方案中，Fc 区变体包含一个或多个氨基酸取代，其改善对新生儿 Fc 受体（FcRn）的 pH 依赖性结合。这样的变体可以具有延长的药代动力学半衰期，因为它在酸性 pH 结合 FcRn 从而使其能够逃离溶酶体中的降解并随后被转运并释放出细胞。工程化抗体分子以改善与 FcRn 的结合亲和力的方法在本领域中是众所周知的，参见，例如，Vaughn, D.等人，Structure, 6(1): 63-73, 1998; Kontermann, R.等人，Antibody Engineering, Volume 1, Chapter 27: Engineering of the Fc region for improved PK, Springer, 2010; Yeung, Y.等人，Cancer Research, 70: 3269-3277 (2010); 和 Hinton, P. 等人，J. Immunology, 176:346-356 (2006)。

在某些实施方案中，Fc 区变体包含一个或多个改变抗体依赖性细胞毒性（ADCC），或者通过改善或减少 C1q 结合和/或 CDC 来改变补体依赖性细胞毒性（CDC）的氨基酸取代。

在某些实施方案中，本发明提供的配体结合分子包含人 IgG4 恒定区，其中第 228 个氨基酸残基被改变，例如 Ser228Pro（S228P，其可以防止或减少链交换），和/或第 235 个氨基酸残基被改变，例如 Leu235Glu（L235E，其可以改变 Fc 受体相互作用）。

在某些实施方案中，本发明提供的配体结合分子在 Fc 区的界面中包含一个或多个氨基酸取代，以协助和/或促进异二聚化。这些修饰包括将突起引入第一 Fc 多肽中和将腔引入第二 Fc 多肽中，其中突起可以位于腔中以促进第一和第二 Fc 多肽的相互作用而形

成异二聚体或复合物。生成具有这些修饰的蛋白分子的方法在本领域中是已知的，例如，如在美国专利号 5,731,168 中所述。

在某些实施方案中，本发明提供的配体结合分子包含人 IgG1 的天然 Fc 序列，如 SEQ ID NO: 31 的 Asp104-Lys330 所示。在一些实施方案中，本发明提供的配体结合分子包含与 SEQ ID NO: 31 的位置 104-330 的氨基酸序列具有至少 80%、或至少 85%、或至少 90%、或至少 92%、或至少 95%、或至少 96%、或至少 97%、或至少 98%、或至少 99% 同一性或具有 100% 同一性的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述配体结合分子还在氨基末端包含信号肽，以便于在细胞中分泌和纯化。

IV. 配体结合分子的性质

在本发明中，发现了包含衍生自 VEGFR2 的一个或多个氨基酸序列（和/或衍生于其他受体的氨基酸序列）的配体结合分子对 VEGF-A、VEGF-C 与 VEGF-D，尤其是对 VEGF-C、VEGF-D 的结合与阻断能力。在一些实施方案中，所述配体结合分子具有明显改进的对 VEGF-A、VEGF-C 与 VEGF-D 的结合或阻断能力，其中对 VEGF-A 的结合或阻断能力优于贝伐单抗（Avastin）、接近或优于阿柏西普（Eylea），对 VEGF-C 与 VEGF-D 的结合或阻断能力均明显优于对照品 OPT。所述配体结合分子可经由阻断 VEGF-A、VEGF-C、VEGF-D、PDGF 家族分子从而有效的抑制血管新生，在多种疾病特别是眼科疾病或肿瘤疾病治疗中发挥作用。

本发明发现所述配体结合分子可阻断 VEGF-A、VEGF-C、VEGF-D 三种分子与受体的结合，并且还可结合 PDGF 分子。如实施例中所验证的：

1) 如通过 Biacore 测定的，LFV-B 与 VEGF-C 结合的 K_D 比对照品 OPT 强 5.6 倍，LFV-E 的 K_D 略优于 OPT；在 VEGF-C 阻断实验中，LFV-B 的 EC_{50} 比 OPT 强 1.4-2.2 倍（分别为对 VEGFR2 与 VEGFR3 的与 VEGF-C 结合的阻断实验），LFV-C 的 EC_{50} 比 OPT 强 1.3-2.4 倍，LFV-E 的 EC_{50} 比 OPT 强 1.57-2.2 倍，而作为对照的 Avastin 与 Eylea 无法阻断。

2) 如通过 Biacore 测定的，LFV-B 与 VEGF-D 结合的 K_D 比 OPT 强 7.8 倍，LFV-E 的 K_D 略优于 OPT；在 VEGF-D 阻断实验中，LFV-B 的 EC_{50} 比 OPT 强 4.7-7.4 倍（分别为对 VEGFR2 与 VEGFR3 的与 VEGF-D 结合的阻断实验），LFV-C 的 EC_{50} 比 OPT 强

4.6-5.9 倍, LFV-E 的 EC_{50} 比 OPT 强 4.8-3.8 倍, 而作为对照的 Avastin 与 Eylea 无法阻断。

3) 如通过 Biacore 测定的, LFV-B 与 VEGF-A 结合的 K_D 为 9.3 pM, 接近或类似于 Eylea; 在 VEGF-A 165-VEGFR2 阻断 ELISA 实验中, LFV-B 的 EC_{50} 为 4.67 nM, 介于 Avastin (6.68 nM) 与 Eylea (3.2 nM) 之间, LFV-C 的 EC_{50} 为 4.57 nM, 与 LFV-B 接近; 在 VEGF-A 121-VEGFR2 阻断 ELISA 实验中, LFV-B 的 EC_{50} 为 7.63 nM, 优于 Avastin (22.37 nM) 与 Eylea (9.55 nM), LFV-C 的 EC_{50} 为 9.35 nM, 接近 Eylea, 优于 Avastin。

4) 在鼠 AMD 眼科体内实验中, 相比对照药 Eylea, LFV-B 和 LFV-C 亦展现出更好的改善趋势。

进一步的, 在本发明中, 发现了包含衍生自 VEGFR2 的一个或多个氨基酸序列可操作地连接于衍生自 VEGFR1 的一个或多个氨基酸序列的新型配体结合分子(例如 LFV-M、LFV-N、LFV-Q、LFV-R、LFV-S), 在一些实施方案中, 所述配体结合分子具有进一步改进的对 VEGF-A 的结合或阻断能力, 同时良好的保留了对 VEGF-C 与 VEGF-D 的结合或阻断能力, 以及具有了对 VEGF-B、PlGF 的结合能力, 如实施例中所验证的:

1) 在 VEGF-A 165-VEGFR2 阻断 ELISA 实验中, LFV-M、LFV-N 的 EC_{50} 分别为 1.60、1.87 nM, 优于未经与 VEGFR1 融合原始分子 LFV-C (3.18 nM), 也优于对照药 Eylea (2.23 nM) 与 Avastin (4.58 nM); 在 VEGF-A 165-VEGFR1 阻断 ELISA 实验中, LFV-M、LFV-N 的 EC_{50} 分别为 3.14、3.30 nM, 优于 Eylea (4.64 nM) 与 Avastin (7.31 nM)。

2) 在 VEGF-C-VEGFR2 阻断 ELISA 实验中, LFV-M、LFV-N 的 EC_{50} 分别为 27.6、27.3 nM, 接近 LFV-C (26.2 nM), 略优于对照品 OPT (32.1 nM)。

3) 在 VEGF-D-VEGFR2 阻断 ELISA 实验中, LFV-M、LFV-N 的 EC_{50} 分别为 2.17、1.79 nM, 接近 LFV-C (2.30 nM), 明显优于对照品 OPT (24.59 nM); 在 VEGF-D-VEGFR3 阻断 ELISA 实验中, LFV-M、LFV-N 的 EC_{50} 分别为 2.74、2.31 nM, 接近 LFV-C (2.62 nM), 亦明显优于对照品 OPT (25.22 nM)。

4) 同时在 VEGF-B、PlGF 的结合 ELISA 实验中, LFV-M、LFV-N 亦展现出较好的结合能力, 而 LFV-C 则呈现极弱的结合。

进一步的, 本发明中发现在对 LFV-M 进行 N 糖基化去除以后, 所得到的分子 LFV-R 具有更进一步优化的对 VEGF 家族分子的阻断效力, 以及对 VEGF-B、PlGF 分子的结合效力, 如实施例中所验证的:

(1) 在 VEGF A 165-VEGFR2 的结合阻断 ELISA 实验中, LFV-R 的 EC_{50} 为 1.901 nM, 优于 LFV-M 的 2.645 nM, 也优于对照药 Eylea (3.937 nM); 在 VEGF A 165-VEGFR1 的结合阻断 ELISA 实验中, LFV-R 的 EC_{50} 为 6.972 nM, 优于 LFV-M 的 7.797 nM, 接近对照药 Eylea (6.959 nM)。

(2) 在 VEGF D-VEGFR2 的结合阻断 ELISA 实验中, LFV-R 的 EC_{50} 为 4.933 nM, 优于 LFV-M 的 5.623 nM。

(3) 在对 VEGF-B 的结合实验中, LFV-R 的 EC_{50} 为 125.6 ng/ml, 优于 LFV-M 的 181.7 ng/ml。

(4) 在对 PlGF 的结合实验中, LFV-R 的 EC_{50} 为 32.01 ng/ml, 优于 LFV-M 的 43.85 ng/ml。

V. 多核苷酸、载体和宿主细胞

在一些方面, 本发明还提供编码此类配体结合分子的多核苷酸。所述多核苷酸可用于表达配体结合分子。在一些实施方案中, 所述多核苷酸还可以用作用于实现多肽配体结合分子的体内表达的呈活性形式的治疗剂。

在某些实施方案中, 分离的多核苷酸包含编码以下氨基酸序列中至少一种的核苷酸序列和/或与其具有至少 80% (例如, 至少 85%、88%、90%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99%) 序列同一性的核苷酸序列, 和/或其仅具有简并取代的变体:

(a) SEQ ID NO: 2 的位置 117-218 所示的氨基酸序列;

(b) SEQ ID NO: 2 的位置 117-327 或 123-327 所示的氨基酸序列;

(c) SEQ ID NO: 2 的位置 117-421 所示的氨基酸序列;

(d) SEQ ID NO: 2 的位置 23-327 所示的氨基酸序列; 和

(e) SEQ ID NO: 2 的位置 23-421 所示的氨基酸序列。

任选地, 所述多核苷酸进一步包含编码以下氨基酸序列中至少一种的核苷酸序列和/或与其具有至少 80% (例如, 至少 85%、88%、90%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99%) 序列同一性的核苷酸序列, 和/或其仅具有简并取代的变体:

(i) SEQ ID NO: 3 的位置 25-115 或 47-115 所示的氨基酸序列;

(ii) SEQ ID NO: 3 的位置 154-210 所示的氨基酸序列;

(iii) SEQ ID NO: 3 的位置 248-314 所示的氨基酸序列; 和

(iv) SEQ ID NO: 1 的位置 132-230 所示的氨基酸序列。

编码所述配体结合分子的多核苷酸易于使用本领域已知的常规程序进行分离和测序。

5 所述多核苷酸也可以通过合成方法获得。优选地, 所述多核苷酸经过密码子优化以便在真核宿主细胞, 特别是哺乳动物细胞中表达。

使用已知的重组技术, 可以将编码配体结合分子的多核苷酸插入载体中以进一步克隆 (DNA 的扩增) 或表达。载体组分通常包括但不限于以下一种或多种: 信号序列、复制起点、一个或多个标志物基因、增强子元件、启动子 (例如 SV40、CMV、EF-1 α) 以及转录终止序列。

在一些实施方案中, 本公开提供了包含本文提供的编码配体结合分子的多核苷酸的载体 (例如表达载体), 与所述多核苷酸可操作地连接的至少一个启动子 (例如 SV40、CMV、EF-1 α), 和至少一个选择标志物。载体的实例包括但不限于逆转录病毒 (包括慢病毒), 腺病毒, 腺伴随病毒, 疱疹病毒 (例如单纯疱疹病毒), 痘病毒, 杆状病毒, 15 乳头瘤病毒, 乳多空病毒 (例如 SV40), λ 噬菌体, 和 M13 噬菌体, 脂质体, 质粒 pcDNA3.3, pMD18-T, pOptivec, pCMV, pEGFP, pIRES, pQD-Hyg-GSeu, pALTER, pBAD, pcDNA, pCal, pL, pET, pGEMEX, pGEX, pCI, pEGFT, pSV2, pFUSE, pVITRO, pVIVO, pMAL, pMONO, pSELECT, pUNO, pDUO, Psg5L, pBABE, pWPXL, pBI, p15TV-L, pPro18, pTD, pRS10, pLexA, pACT2.2, pCMV-SCRIPT.RTM, pCDM8, 20 pCDNA1.1 /amp, pcDNA3.1, pRc/RSV, PCR 2.1, pEF-1, pFB, pSG5, pXT1, pCDEF3, pSVSPORT, pEF-Bos 等。

可以将包含编码配体结合分子的多核苷酸序列的载体导入宿主细胞用于进行克隆或基因表达。用于在本文的载体中克隆或表达 DNA 的合适宿主细胞是原核生物、酵母或更高等的真核细胞。为此目的合适的原核生物包括真细菌, 例如革兰氏阴性或革兰氏阳性 25 细菌, 如大肠杆菌。除了原核生物外, 真核微生物如丝状真菌或酵母是用于提供的载体的合适克隆或表达宿主。酿酒酵母或普通的面包酵母是低等真核宿主微生物中最常用的。然而, 许多其他属、种和菌株在本文中是普遍可获得的和有用的。

用于表达本文提供的配体结合分子的合适宿主细胞也可以衍生自多细胞生物。无脊

椎动物细胞的实例包括植物和昆虫细胞。已经鉴定出来自寄主的许多杆状病毒株和变体以及相应的允许的昆虫寄主细胞。然而，对脊椎动物细胞的兴趣最大，并且在培养（组织培养）中脊椎动物细胞的繁殖已成为常规程序。有用的哺乳动物宿主细胞系的实例是用 SV40 转化的猴肾 CV1 系（COS-7，ATCC CRL 1651）；人胚胎肾细胞系（在悬浮培养中亚克隆生长的 293 或 293 细胞，Graham 等人，*J. Gen Virol.* 36:59（1977））；幼仓鼠肾细胞（BHK，ATCC CCL 10）；中国仓鼠卵巢细胞/-DHFR（CHO，Urlaub 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216（1980））；猴肾细胞（CV1 ATCC CCL 70）；非洲绿猴肾细胞（VERO-76，ATCC CRL-1587）；人宫颈癌细胞（HELA，ATCC CCL 2）；犬肾细胞（MDCK，ATCC CCL 34）；水牛大鼠肝细胞（BRL 3A，ATCC CRL 1442）；人肺细胞（W138，ATCC CCL 75）；人肝细胞（Hep G2，HB 8065）；小鼠乳腺肿瘤（MMT 060562，ATCC CCL51）；TRI 细胞（Mather 等人，*Annals N.Y.Acad.Sci.* 383:44-68（1982））；MRC 5 细胞；FS4 细胞；和人类肝癌细胞系（Hep G2）。在一些优选的实施方案中，宿主细胞是中国仓鼠卵巢（CHO）细胞。在一些另外的优选的实施方案中，宿主细胞是其他哺乳动物细胞系，例如人细胞系。

用上述表达或克隆载体转化宿主细胞用于产生配体结合分子并在经适当修饰的常规营养培养基中培养用于诱导启动子，选择转化子或扩增编码所需序列的基因。

用于产生本文提供的配体结合分子的宿主细胞可以在多种培养基中培养。诸如 Ham 的 F10（Sigma），基本必需培养基（MEM），（Sigma），RPMI-1640（Sigma）和 Dulbecco 改良的 Eagle's 培养基（DMEM），Sigma 的可商购获得的培养基都适合于培养宿主细胞。另外，Ham 等人，*Meth. Enz.* 58:44（1979），Barnes 等人，*Anal. Biochem.* 102:255（1980），美国专利号 4,767,704；4,657,866；4,927,762；4,560,655；或 5,122,469；WO 90/03430；WO 87/00195；或 U.S. Pat. Re. 30,985 中描述的任何培养基可以用作宿主细胞的培养基。这些培养基中的任何一种可以根据需要补充激素和/或其他生长因子（例如胰岛素、转铁蛋白或表皮生长因子），盐（例如氯化钠、钙、镁和磷酸盐），缓冲液（例如 HEPES），核苷酸（例如腺苷和胸苷），抗生素（例如 GENTAMYCIN™ 药物），微量元素（定义为通常以微摩尔范围的最终浓度存在的无机化合物），和葡萄糖或等效能量来源。也可以以本领域技术人员已知的适当浓度包括任何其他必要的补充剂。培养条件，例如温度、pH 等是先前与选择用于表达的宿主细胞一起使用的那些条件，并且对于普通技术人员而言是显而易见的。

当使用重组技术时，配体结合分子可以在细胞内、在周质空间中产生，或直接分泌到培养基中。如果配体结合分子在细胞内产生，则第一步，例如通过离心或超滤除去宿主细胞或裂解片段的颗粒碎片。可以通过离心去除细胞碎片。在配体结合分子分泌到培养基中的情况下，通常首先使用可商购获得的蛋白质浓缩过滤器，例如 Amicon 或 Millipore Pellicon 超滤单元，浓缩来自这种表达系统的上清液。蛋白酶抑制剂例如 PMSF 可以包括在上述任何步骤中以抑制蛋白水解，并且可以包括抗生素以防止不定污染物的生长。

由细胞制备的配体结合分子可以使用例如羟磷灰石色谱、凝胶电泳、透析、DEAE-纤维素离子交换色谱、硫酸铵沉淀、盐析和亲和色谱来纯化，其中亲和色谱是优选的纯化技术。

在某些实施方案中，固定化在固相上的蛋白 A 用于配体结合分子的免疫亲和纯化。蛋白 A 作为亲和配体的适用性取决于在配体结合分子中存在的任何免疫球蛋白 Fc 结构域的种类和同种型。蛋白 A 可以用于纯化基于人 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 或 $\gamma 4$ 重链的抗体（Lindmark 等人，*J.Immunol.Meth.*62:1-13（1983））。亲和配体所附着的基质最通常是琼脂糖，但也可以使用其他基质。机械稳定的基质（例如受控孔玻璃或聚（苯乙烯二乙烯基）苯）允许比琼脂糖所实现的更快的流速和更短的处理时间。其他蛋白质纯化技术，例如在离子交换柱上的分馏，乙醇沉淀，反相 HPLC，在硅胶上的色谱，在肝素 SEPHAROSE™ 色谱上在阴离子或阳离子交换树脂上的色谱（例如聚天冬氨酸柱），色谱聚焦，SDS -PAGE 和硫酸铵沉淀也可用，取决于要回收的抗体。

VI. 缀合物

在一些方面，本发明还提供包含配体结合分子和与其缀合的缀合物模块的缀合物。缀合物模块是可以附着至配体结合分子的部分。涵盖多种缀合物模块可以与本文提供的配体结合分子连接（参见，例如，“Conjugate Vaccines”，Contributions to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse 和 R. E. Lewis, Jr. (编), Carger Press, New York, (1989)）。这些缀合物模块可以通过共价结合、亲和力结合、插入（intercalation）、配位结合、络合、缔合、掺合或加入等方法与配体结合分子连接。

在某些实施方案中，可以将本文公开的配体结合分子工程化为在配体结合部分之外

包含可以用于结合一种或多种缀合物模块的特异性位点。例如，这样的位点可以包括一个或多个反应性氨基酸残基，例如半胱氨酸或组氨酸残基，以协助与缀合物模块的共价连接。

在某些实施方案中，所述缀合物包含将缀合物模块连接至所述配体结合分子的连接子。在一些其他实施方案中，本文所述的配体结合分子在 C 末端通过肽键直接附接到缀合物模块的 N 末端氨基酸，或在 N 末端通过肽键直接附接到缀合物模块的 C 末端氨基酸。亦可以通过化学键，包括但不限于酰胺键与缀合物模块连接形成多肽链。在某些实施方案中，配体结合分子可以间接地或通过第二缀合物模块与第一缀合物模块连接。例如，可以将配体结合分子与生物素缀合，然后间接地缀合至与抗生物素蛋白缀合的第二缀合物模块。缀合物模块可以是清除修饰（clearance modifying）模块、毒素（例如化学治疗剂）、可检测标记（例如放射性同位素、镧系元素、发光标记、荧光标记或酶-底物标记）或纯化模块。

“毒素”可以是对细胞有害或可以损害或杀死细胞的任何试剂。毒素的实例包括但不限于紫杉醇，细胞松弛素 B，短杆菌肽 D，溴化乙锭，依米丁，丝裂霉素，依托泊苷，替诺泊苷，长春新碱，MMAE，MMAF，DM1，长春碱，秋水仙碱，阿霉素，柔红霉素，二羟基蒽醌二酮，米托蒽醌，光辉霉素，放线菌素 D，1-去氢睾酮，糖皮质激素，普鲁卡因，丁卡因，利多卡因，普萘洛尔，嘌呤霉素及其类似物，抗代谢物（例如甲氨蝶呤、6-巯基嘌呤、6-硫鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶脱氧腺苷），烷基化剂（例如甲乙胺、噻菌灵苯丁酸氮芥、美法仑、卡莫司汀（BSNU）和洛莫司汀（CCNU）、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链脲佐菌素、丝裂霉素 C 和顺式二氯二胺铂（II）（DDP）顺铂），蒽环类药物（例如柔红霉素（以前称为道诺霉素）和阿霉素），抗生素（例如放线菌素（以前称为更生霉素）、博来霉素、光神霉素和蒽霉素（AMC）），抗有丝分裂剂（例如长春新碱和长春花碱），拓扑异构酶抑制剂和微管蛋白结合剂。

可检测标记的实例可以包括荧光标记（例如荧光素、罗丹明、丹酰、藻红蛋白或德克萨斯红），酶-底物标记（例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、萤光素酶、葡糖淀粉酶、溶菌酶、糖氧化酶或 β -D-半乳糖苷酶），放射性同位素（例如 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、 ^3H 、 ^{111}In 、 ^{112}In 、 ^{14}C 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{86}Y 、 ^{88}Y 、 ^{90}Y 、 ^{177}Lu 、 ^{211}At 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{153}Sm 、 ^{212}Bi 和 ^{32}P 、其他镧系元素），发光标记，发色团部分，洋地黄毒苷，生物素/亲和素，DNA 分子或用于检测的金。

在某些实施方案中，缀合物模块可以是清除修饰剂，其帮助增加配体结合分子的半衰期。示例说明性实例包括水溶性聚合物，例如 PEG、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、乙二醇/丙二醇的共聚物等。聚合物可以具有任何分子量，并且可以是支链的或非支链的。附着至配体结合分子的聚合物的数量可以变化，并且如果附着多于一个聚合物，则它们可以是相同或不同的分子。在一些具体的实施方案中，本发明提供的配体结合分子缀合于至少一个聚乙二醇模块，所述聚乙二醇模块可以附接于配体结合分子的氨基末端。

在某些实施方案中，缀合物模块可以是纯化模块，例如磁珠。

VII. 药物组合物

在一些方面，本发明提供包含与药学上可接受的载体一起配制的本发明的配体结合分子的组合物，例如药物组合物。这类组合物包含至少一种本发明的配体结合分子、融合蛋白或缀合物。在一些实施方案中，所述药物组合物为适合于玻璃体内注射的制剂。

如本文所使用的，“药学上可接受的载体”包括生理上相容的任何和所有药学上可接受的液体、凝胶或固体载体、水性媒介物、非水媒介物、抗微生物剂、等渗剂、缓冲剂、抗氧化剂、麻醉剂、悬浮液/分散剂、隔绝剂或螯合剂、稀释剂、佐剂、赋形剂或无毒的辅助物质，本领域已知的其他组分或其各种组合等等。所述载体可以适于静脉内、肌内、皮下、胃肠外、脊髓、经表皮、玻璃体内注射或植入施用等。取决于给药途径，活性化合物，即本发明的成分，可以包被在材料中以防止所述化合物免受酸和其它可能灭活所述化合物的自然条件的作用。

本发明的药物组合物还可包括药学上可接受的抗氧化剂。药学上可接受的抗氧化剂的实例包括：(1)水溶性抗氧化剂，例如抗坏血酸、盐酸半胱氨酸、硫酸氢钠、偏亚硫酸氢钠、亚硫酸钠等等；(2)油溶性抗氧化剂，例如抗坏血酸棕榈酸酯、丁羟茴醚(BHA)、丁羟甲苯(BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、 α -生育酚等等；和(3)金属螯合剂，例如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨醇、酒石酸、磷酸等等。

可用于本发明的药物组合物中的适当的水性载体和非水性载体的实例包括水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、聚乙二醇等等)和其适当的混合物、植物油如橄榄油及可注射的有机酯如油酸乙酯。例如，可以通过利用包衣材料(如卵磷脂)、在分散剂的情况下通过维持所需要的颗粒大小和通过利用表面活性剂维持适当的流动性。

5 这些组合物还可包含辅助剂如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。通过灭菌方法和通过包含各种抗菌剂和抗真菌剂(例如对羟苯甲酸酯、氯代丁醇、苯酚、山梨酸等等)可以确保防止微生物的存在。将等渗剂如糖、氯化钠等等包括入所述组合物也可能是期望的。此外,通过包含延迟吸收的物质如单硬脂酸铝和明胶,可以引起注射药物形式的吸收延

长。

药物组合物可以是固体、糊剂、软膏、凝胶、液体、气雾剂、喷雾剂、聚合物、薄膜、乳液或混悬液形式。

在某些实施方案中,药物组合物配制成可注射的组合物。可以以任何常规形式制备可注射药物组合物,例如液体溶液,悬浮剂,乳剂或适于产生液体溶液、悬浮剂或乳剂

10 的固体形式。用于注射的制备物可以包括准备注射的无菌和/或非热解溶液,无菌干燥可溶产品,如冻干粉,准备在使用前与溶剂混合,包括皮下注射片剂,准备注射的无菌悬浮液,准备在使用前与媒介物组合的无菌干燥的不溶性产品,以及无菌和/或非热解乳液。溶液可以是水性或非水性的。

药学上可接受的载体包括无菌水溶液或分散液和用于临时制备无菌注射溶液或分散

15 液的无菌粉末。用于药学上活性物质的这类介质和试剂在本领域中是已知的。除非任何常规介质或试剂与活性化合物不相容,可以考虑任何常规介质或试剂在本发明的药物组合物中的使用。补充活性化合物也可以被加入所述组合物中。

药物组合物通常必须是无菌的并且在制造和储存的条件下是稳定的。所述组合物可以被配制为溶液、微乳剂、脂质体或其它适于高药物浓度的有序结构。所述载体可以是

20 溶剂或分散介质,其包含例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等等)及其适当的混合物。例如,通过利用包衣(如卵磷脂)、在分散剂的情况下通过维持所需要的颗粒大小和通过利用表面活性剂可以维持适当的流动性。在很多情况下,优选在所述组合物中包括等渗剂例如糖、多元醇(如甘露糖醇、山梨醇)或氯化钠。通过将延迟吸收的物质(例如单硬脂酸盐和明胶)包括在所述组合物内可以引起可注射组合物的吸收延长。

25 可以通过将活性化合物以需要的量与按照需要的上文列举的组分之一或其组合一起加入适当的溶剂中,然后无菌微过滤制备无菌注射溶液。通常,可以通过将所述活性化合物加入包含基本分散介质和来自上文列举的物质的其它需要的组分的无菌载体中制备分散液。在用于制备无菌注射液的无菌粉末的情况中,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥(冻干),其从先前无菌过滤的溶液产生活性成分加任何附加的需要成分的粉末。

可以与载体物质结合以产生单一剂型的活性成分的量取决于所治疗的对象和特定施用模式。可以与载体结合以产生单一剂型的活性成分的量一般是产生治疗效应的组合物的量。通常，以 100% 算，该量的范围为约 0.01% 至约 99% 的活性成分，优选从约 0.1% 至约 70%，最优选约 1% 至约 30% 的活性成分与药学上可接受的载体组合。

5 调节给药方案以提供最佳的期望反应(例如治疗反应)。例如，可以施用单一大丸剂，可以随着时间施用几个分开的剂量，或者可以根

据治疗情况的紧迫性而按比例减少或增加所述剂量。由于便于施用和剂量的均匀性，将药物组合物配制成单位剂型是特别有利的。如本文所使用，单位剂型是指适合作为用于待治疗对象的单一剂量的物理上分散的单位；各单元包含与需要的药物载体结合的适于产生期望治疗效应的预定量的活性化合物。本发明的单位剂型的规格由以下因素规定并直接取决于以下因素：(a) 活性化合物的独特性质和待实现的特定治疗效应，和(b) 在配制这类活性化合物用于治疗个体敏感性的领域中固有的限制。

对于所述配体结合分子的施用，剂量范围为宿主体重的约 0.0001 至 100mg/kg，并更通常是 0.01 至 5mg/kg。例如，剂量可以是 0.3mg/kg 体重、1mg/kg 体重、3mg/kg 体重、5mg/kg 体重或 10mg/kg 体重或在 1-10mg/kg 的范围内。示例性的治疗方案包括每周施用一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、一月一次、每 3 个月一次或每三至 6 个月一次。

可选地，所述配体结合分子可以作为缓释制剂进行施用，在这种情况下需要较低频率的施用。剂量和频率随所施用的物质在患者中的半衰期而变化。施用的剂量和频率可以取决于治疗是预防性或者是治疗性的。在预防性应用中，以相对不频繁的间隔在长时间内施用以相对低的剂量施用。一些患者在他们的余生中持续接受治疗。在治疗性应用中，有时要求相对短的时间间隔和相对高的剂量，直到疾病的进展被减缓或终止，并优选直到患者显示出疾病症状的部分或完全改善。其后，可以给予患者预防性方案。

活性成分和小分子在本发明的药物组合物中的实际剂量水平可以有所变化，以便获得对特定患者、组成和施用模式有效实现期望治疗响应而对所述患者无毒性的活性成分的量。所选择的剂量水平取决于各种药代动力学因素，包括所使用的本发明的特定组合、或者其酯、盐或酰胺的活性、给药途径、施用时间、使用的特定化合物的排泄速率、治疗持续时间、与所使用的特定组合联合使用的其它药物、化合物和/或材料、待治疗患者的年龄、性别、体重、病症、总体健康状况和在先病史、以及医学领域内熟知的类似因素。

VIII. 配体结合分子的使用方法

在一些方面，本发明提供一种抑制、预防或治疗受试者中的新生血管形成以及由新生血管形成引起的疾病或病况的方法，该方法包括向受试者施用如本文所述的配体结合分子、其缀合物或药物组合物。所述新生血管形成包括视网膜新生血管形成和/或脉络膜新生血管形成；所述疾病或病况包括息肉状脉络膜血管病变、视网膜新生血管形成、与眼底渗漏有关的眼部病症。

在一些实施方案中，所述眼部病症选自老年黄斑变性、糖尿病性眼部病症、息肉状脉络膜血管病变、眼底纤维化病变、视网膜静脉阻塞相关病变、早产儿视网膜病变和黄斑毛细血管扩张。优选地，本文所述的包含配体结合分子的药物组合物通过滴眼、通过玻璃体注射、通过玻璃体内植入物从而被局部施用于受试者的眼睛。

在一些实施方案中，本文公开的配体结合分子、其缀合物或药物组合物可以以单次施用或多次施用的方式施用。优选地，通过单次施用即能实现期望的治疗效果，而无需与其他靶向治疗药物一起施用。

在一些实施方案中，本文公开的配体结合分子、其缀合物或药物组合物可以单独施用或者与一种或多种另外的治疗手段或试剂组合施用。例如，本文公开的配体结合分子、其缀合物或药物组合物可以与另外的治疗剂，例如化学治疗剂，或其他治疗方法联用实施。例如，在眼部疾病的治疗实施中，其他治疗方法包括激光光凝术、玻璃体切除术等。

在这些实施方案的某些中，与一种或多种另外的治疗剂组合施用的本文公开的配体结合分子、其缀合物或药物组合物可以与一种或多种另外的治疗剂同时或顺序地或交替地施用。与另一种治疗剂“组合”施用的配体结合分子不必与该试剂同时或在相同的组合物中施用。即使在配体结合分子和第二种试剂经由不同途径施用的情况下，在本文中使用的短语也认为在另一种试剂之前或之后施用的配体结合分子与该试剂“组合”施用。在可能的情况下，根据另外的治疗剂产品信息表中列出的时间表或根据 **Physicians's Desk Reference 2003 (Physicians' Desk Reference, 57th Ed; Medical Economics Company; ISBN: 1563634457; 57th edition (November 2002))**或本领域众所周知的方案施用与本文公开的配体结合组合施用的另外的治疗剂。

在一些方面，本发明还提供试剂盒，其包含所述配体结合分子、其缀合物或药物组合物。

IX. 本发明的有益效果

在肿瘤生长、眼科血管增生等与血管新生相关的疾病中，抑制血管新生是一种有效的治疗手段。在过去几十年中，对 VEGF 相关信号进行了大量的研究，并且有许多药物用于治疗。为了突破单一靶向疗法的局限，同时靶向 PDGF-BB 与 VEGF-A 曾被寄予厚望，抑制 PDGF-BB 可使周细胞凋亡，从而打破对抗 VEGF-A 治疗的抗药性，另外 PDGF-BB 与组织的纤维化病变密切相关，眼底纤维化是 AMD 的晚期发展形式和致盲原因所在，是 VEGF-A 疗法最终失效的一大原因 (Rofagha S.等人(2013), J. Ophthalmology. 120 (11) :2292-2299) (Rosenfeld P.J.等人 (2011) , Ophthalmology.118(3):523-530)。在靶向 PDGF 疗法中比较引人注目的是诺华公司引入的 PDGF-BB 拮抗剂 E10030 以及艾伯维公司研发的双特异性抗体 ABBV642，前者在对 AMD 的一二期临床试验中取得比单一使用雷珠单抗更有效的疗效，而且对眼底纤维化有较明显的改善效果，尽管在更大规模的三期临床试验中 E10030 相比单一靶向 VEGF-A 疗法并未展现出比较优势，但由于对纤维化的有效干预效果，仍在进行其对纤维化治疗方向的研究。

另一家 Opthea 公司则开发了可同时靶向 VEGF-C、VEGF-D 的产品 OPT-302，与靶向 VEGF-A 的产品联合注射使用，在临床实验中则较明确的展现出了比单独靶向 VEGF-A 明显更优、应答更广的疗效，从而将 nAMD 等疾病的治疗引入第二世代。并且该疗法对亚洲人高发的息肉状脉络膜血管病变(Polypoidal Choroidal Vasculopathy, PCV) 患者也有良好的疗效，息肉状脉络膜血管病变是湿性黄斑病变的一种亚型，与湿性黄斑病变又存在一定区别，其对靶向 VEGF-A 疗法无有效、广泛应答，而且在亚洲地区高发 (Imamura Y 等人 (2010) , Surv.Ophthalmol.55 (6) :501-515) , 我国初诊为 AMD 患者中 PCV 占比高至 33% (LandeA.等人 (2010) , Prog Retin Eye Res.29 (1) :19-29) , 日本达 54.7% (Maruko I.等人 (2007) , Am J Ophthalmol.144:15-22) , 由于亚洲地区较大的人口基数，目前 PCV 存在巨大的治疗缺口。

但该疗法属于联合治疗，需要同时向玻璃体内注射两种药剂即靶向 VEGF-A 药与 OPT-302，治疗成本较高，同时该疗法需要每月穿眼注射，不仅相应增加治疗成本，而且不便、病人依从性差、增加了注射引起的眼内感染等事故风险。此外，这种疗法需要同时靶向 VEGF-A、VEGF-C 与 VEGF-D，对其均需具有较高的亲和力（至 10pM 及以下水平），这也阻碍了使用目前热门的单克隆抗体技术（一个抗体一般只结合一个靶点，亲和力一般在 100pM）开发其的替代品。

本发明人意外地发现，包含衍生于 VEGFR2 的特定氨基酸序列（例如 SEQ ID NO:

2 的位置 123-327 或 117-327) 的配体结合分子, 具有比 OPT 更好的对 VEGF-C 或 VEGF-D 的结合能力。为了进一步研究, 构建表达了包含来自 VEGFR2 的不同片段的多种 VEGF Trap 分子, 对其对 VEGF-A、VEGF-C、VEGF-D 等的结合与阻断能力进行了详细研究和表征。

5 结果发现, 包含衍生于 VEGFR2 的氨基酸序列, 特别是 SEQ ID NO: 2 的位置 123-327 或 117-327 所示的氨基酸序列的配体结合分子展现出明显优于 OPT 或全 VEGFR2 胞外结构域的对 VEGF-C 或 VEGF-D 的结合与阻断能力, 同时对 VEGF-A 也具有明显更优的结合与阻断能力。

同时, 发明人还意外表征了包含衍生于 VEGFR2 的氨基酸序列, 特别是 SEQ ID NO: 10 2 的位置 117-327 或 123-327 所示的氨基酸序列的配体结合分子对 PDGF-AA、AB、BB、CC 等 PDGF 家族生长因子也具有一定的结合能力, 是参与结合的主要结构域, 并优于天然 VEGFR2 全胞外结构域重组分子对 PDGF 的结合。由于 PDGF 家族分子高表达被认为是靶向 VEGF-A 疗法应答不充分、产生抗性以及产生治疗后眼底纤维化的原因之一, 所以同时靶向 PDGF 家族或将能使更多的患者受益, 特别是对糖尿病引起的眼底病 15 变, 有文献报告 PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB 在这种眼底病变中高表达, 因而有治疗糖尿病引起的眼底病变的潜力。

此外, 包含衍生于 VEGFR2 的氨基酸序列, 特别是 SEQ ID NO: 2 的位置 117-327 或 123-327 所示的氨基酸序列的配体结合分子相比 OPT 分子, 在 HEK293 与 CHO 细胞的表达纯化过程中, 初始的单体纯度及终产量均明显更优, 这意味着可具有比其更低的 20 生成成本及用药成本。

另外, 还发明了包含衍生自 VEGFR2 的一个或多个氨基酸序列可操作地连接于衍生自 VEGFR1 的一个或多个氨基酸序列的新型配体结合分子及其糖基化改造形式 (例如 LFV-M、LFV-N、LFV-Q、LFV-R (LFV-R HPLC-SEC 纯度高于 LFV-M)、LFV-S), 其在良好的保留对 VEGF-C、VEGF-D 的结合与阻断能力的同时, 具有了优化的对 VEGF- 25 A 的结合与阻断能力, 尤其是被发现具有了对 VEGF A-VEGFR1 的阻断能力, 并且其对 VEGF A-VEGFR1、VEGF A-VEGFR2 的阻断能力均优于对照药 Eylea 与 Avastin, 此外其还具有了对 VEGF-B、PIGF 的结合能力。

这样, 本发明中通过采用一种配体结合分子即可以阻断 VEGF-A、VEGF-C、VEGF-D, 同时还能结合 VEGF-B、PIGF 以及 PDGF 家族分子, 既有助于满足临床未被满足的 30 需求, 实现卓越的治疗效果, 又解决了同时使用两种及多种药物的高成本问题; 同时,

对 VEGF-A、VEGF-C、VEGF-D 均具有较高的亲和力和阻断能力，如 LFV-B，LFV-C 对 VEGF-C、VEGF-D 的亲和力比 OPT 强，对 VEGF-A 的亲与阻断能力也明显优于 Avastin、接近或优于阿柏西普，这样有助于实现延长注射间隔、减少注射次数，从而进一步降低治疗成本，同时解决频繁注射所带来的多种不利。

- 5 采用本发明的配体结合分子或包含其的药物组合物，可以一药替代多药联用，满足对 VEGF-A 靶向无明显应答的治疗方法空缺，以及藉由高亲和力而减少注射次数，从而在得到最优疗效的同时明显降低患者负担，减少治疗不便，提高依从性，以及减少注射带来的眼内感染等危险。

本发明的序列汇总

SEQ ID NO: 1	人 VEGFR-1 的全长氨基酸序列
MVS YWDTGVLLCALLSCLLLTGSSSGSKLKDP ELSLKG TQHIMQAGQTLHLQCR GEAAHKWSLP EMVSKESERLSITKSACGRNGKQFCSTLTLNTAQANHTGFYSCK YLAVPTSKKKETESAIIYIFISDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITV TLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLYLTHR QTNTIIDVQISTPRPVKLLRGHTLVLNCTATTPLNTRVQMTWSYPDEKNKRASVR RRIDQSN SHANIFYSVLTIDKMQN KDKGLYTCRVRSGPSFKSVNTSVHIYDKAFIT VKHRKQQVLETVAGKRSYRLSMKVKA FPSPEV VWLKDGLPATEKSARYLTRGYS LIIKDVTEEDAGNYTILLSIKQSNVFNLTATLIVNVKPQIYEKAVSSFPDPALYPLG SRQILTCTAYGIPQPTIKWFWHPCNHNHSEARCD FCSNNEESFILDADSNMGNRIE SITQRM AII EGKNKMASTLVVADSRISGIYICIASNKVGT VGRNISFYITDVPNGFHV NLEKMPTEGEDLKL SCTVNKFLYRDVTWILLRTVNNRTMHYSISKQKMAITKEH SITLNLTIMNVSLQDSGT YACRARNVYTGE EILQKKEITIRDQEAPYLLRNLS DHT VAISSSTTL DCHANGVPEPQITWFKNNHKIQQEPG IILGPGSSTLFIERVTEEDEGV YHCKATNQKGSVESSAYLTVQGTSDKSNLELITLTCTCVAATLFWLLTLTFIRKM KRSSSEIKTDYLSIIMDPDEVPLDEQCERLPYDASKWEFARERLKL GKS LGRGAF GKV VQASAFGIKKSPTC RTVAVKMLKEGATASEYKALMTELKILTHIGHHLNVVN LLGACTKQGGPLMVIVEYCKYGNLSNYLKS KRDLFFLNKDAALHMEPKKEKME PGLEQGKKPRLDSVTSSSEFASSGFQEDKSLSDVEEEEDSDGFYKEPITMEDLISYS FQVARGMEFLSSRKCIHRDLAARNILLSENNVVKICDFGLARDIYKNPDYVRKGD TRLPLKWMAPESIFDKIYSTKSDVWSYGVLLWEIFSLGGSPYPGVQMDEDFCSRL REGMRMRAPEYSTPEIYQIMLDCWHRDPKERPRFAELVEKLGDLLQANVQQDG KDYIPINAILTGNSGFTYSTPAFSEDFFKESISAPKFNSGSSDDVRYVNAFKFMSLER IKTFEELLPNATSMFDDYQGDSTLLASPM LKRFTWTD SKPKASLKIDLRVTSKS KESGLSDVSRPSFCHSSCGHVSE GKRRFTYDHAELERKIACCSPPPDYNSVVLYST PPI	
SEQ ID NO: 2	人 VEGFR-2 的全长氨基酸序列
MQSKVLLAVALWLCVETRAASVGLPSVSLDLPRLSIQKDILT IKANTTLQITCRGQ RDL DWLWPNNQSGSEQRVEVTECSDGLFCKTLTIPKVIGNDTGAYKCFYRETDL ASVIYVYVQDYRSPFIASVSDQHGVVYITENKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPE	

KRFVPDGNRISWDSKKGFTIPSYMISYAGMVFCEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRI
YDVVLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTELVNVDGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLK
TQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKPFVAFG
SGMESLVEATVGERVRIPAKYLGYPPEIKWYKNGIPLESNHTIKAGHVLTIMEVS
ERDTGNYTVILTNPISKEKQSHVVSLLVYVPPQIGEKSLISPVDSYQYGTQTTLTCT
VYAIPPPHHIHWYWQLEEECANEPSQAVSVTNPYPCEEWRSVEDFQGGNKIEVN
KNQFALIEGKNKTVSTLVIQAANVSALYKCEAVNKVGRGERVISFHVTRGPEITLQ
PDMQPTEQESVSLWCTADRSTFENLTWYKLGQPPLPIHVGLPTPVCKNLDTLW
KLNATMFSNSTNDILIMELKNASLQDQGDYVCLAQDRKTKKRHCVVRQLTVLER
VAPTITGNLENQTTSIGESIEVSCTASGNPPPQIMWFKDNETLVEDSGIVLKDGNRN
LTIRRVKKEDEGLYTCQACSVLGCAKVEAFFIIEGAQEKTNLEIHLVGTAVIAMFF
WLLLVIILRTVKRANGGELKTGYLSIVMDPDELPLDEHCERLPYDASKWEFPRDR
LKLKGKPLGRGAFGQVIEADAFGIDKTATCRTVAVKMLKEGATHSEHRALMSELKI
LIHIGHHLNVVNLLGACTKPGGPLMVIVEFCKFGNLSTYLRSKRNEFVPHYKTKG
ARFRQGKDYVGAIPVDLKRRLDSITSSQSSASSGFVEEKSLSDVEEEEAPEDLYKD
FLTLEHLICYSFQVAKGMEFLASRKCIHRDLAARNILLSEKNVVKICDFGLARDIY
KDPDYVRKGDARLPLKWMAPETIFDRVYTIQSDVWSFGVLLWEIFSLGASPYPGV
KIDEEFCRRLKEGTRMRAPDYTTPEMYQTMLDCWHGEPSPQRPTFSELVEHLGN
LLQANAQQDGKDYIVLPISETLSMEEDSGLSLPTSPVSCMEEEEVCDPKFHYDNT
AGISQYLQNSKRKSRPVSVKTFEDIPLEEPEVKVIPDDNQTDSGMVLASEELKTLE
DRTKLSPSFGGMVPSKSRESVASEGSNQTSQGYQSGYHSDDTDTTVYSSEEAEELLKL
IEIGVQTGSTAQILQPDSGTTLSSPPV

SEQ ID NO: 3

人 VEGFR-3 的全长氨基酸序列

MQRGAALCLRLWLCLGLLDGLVSGYSMTPTLNITEESHVIDTGDSLSISCRGQH
PLEWAWPGAQEAPATGDKDSEDGTGVVRDCEGTDARPYCKVLLLHEVHANDTGS
YVCYYKYIKARIEGTTAASSYVFVRDFEQPFINKPDTLLVNRKDAMWVPCLVSIPG
LNVTLRSQSSVLWPDGQEVVWDDRRGMLVSTPLLHDALYLQCETTWGDQDFLS
NPFLVHITGNELYDIQLLPRKSLELLVGEKLVNCTVWAEFNSGVTFDWDYPGKQ
AERGKWVPERRSQQTHTELSSILTIHNVSQHDLGSYVCKANNGIQRFRETEVIV
HENPFISVEWLKGPILEATAGDELVKLPVKLAAYPPPEFQWYKD GKALSGRHSPH
ALVLKEVTEASTGTYTALWNSAAGLRNLSLELVNVNPPQIHEKEASSPSIYSRHS
RQALTCTAYGVPLPLSIQWHWRPWTPCKMFAQRSLRRRQQQDLMPQCRDWRA
VTTQDAVNPIESLDTWTEFVEGKNKTVSKLVIQANVVSAMYKCVVSNKVGQDER
LIIFYVTTPDGFTIESKPSEELLEGPVLLSCQADSYKYEHLRWYRLNLSTLHDA
HGNPLLLDCKNVHLFATPLAASLEEVPAGARHATLSLSIPRVAPEHEGHYVCEVQ
DRRSHDKHCHKKYL SVQALEAPRLTQNLTDLLNVNVSLSLEMQLVAGAHAPSIV
WYKDERLLEEKSGVDLADSNQKLSIQRVREEDAGRYLCSVCNAKGCVNSSASVA
VEGSEDKGSMEIVILVGTGVIAVFFWVLLLLIFCNMRRPAHADIKTGYSIIMDPG
EVPLEEQCEYLSYDASQWEFPRERLHLGRVLGYGAFGKVVEASAFGIHKGSSCD
TVAVKMLKEGATASEHRALMSELKILIHIGNHLNVVNLLGACTKPQGPLMVIVEF
CKYGNLSNFLRAKRDAFSPCAEKSPEQRGRFRAMVELARLDRRRPGSSDRVLFA
RFSKTEGGARRASPDQEAEDLWLSPLTMEDLVCYSFQVARGMEFLASRKCIHRDL
AARNILLSESDVVKICDFGLARDIYKDPDYVRKGSARLPLKWMAPESIFDKVYTT
QSDVWSFGVLLWEIFSLGASPYPGVQINEEFCQRLRDGTRMRAPELATPAIRRIM
LNCWSGDPKARPAFSELVEILGDLLQGRGLQEEEEVCMAPRSSQSSEEGSFSQVS

TMALHIAQADAEDSPPSLQRHSLAARYYNWVSFPGCLARGAETRGSSRMKTFEE FPMTPTTYKGSVDNQTDSGMVLASEEFEQIESRHRQESGFSCCKGPGQNVAVTRAH PDSQGRRRRPERGARGGQVFYNSEYGELSEEDHCSPSARVTFFTDNSY			
SEQ ID NO: 4	LFV-A Trap	多肽 YVQDYRSPFIASVSDQHGVVYITENKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVP DGNRISWDSKKGFTIPSYMISYAGMVCFCEAKINDESYQSIMYIVVV	
SEQ ID NO: 5	LFV-B Trap	多肽 YVQDYRSPFIASVSDQHGVVYITENKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVP DGNRISWDSKKGFTIPSYMISYAGMVCFCEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVL SPSHGIELSVGEKLVNLCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGS EMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK	
SEQ ID NO: 6	LFV-C Trap	多肽 SPFIASVSDQHGVVYITENKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISW DSKKGFTIPSYMISYAGMVCFCEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIEL SVGEKLVNLCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLS TLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK	
SEQ ID NO: 7	LFV-D Trap	多肽 YVQDYRSPFIASVSDQHGVVYITENKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVP DGNRISWDSKKGFTIPSYMISYAGMVCFCEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVL SPSHGIELSVGEKLVNLCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGS EMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKPFVAFGSGMES LVEATVGERVRIPAKYLGYPPEIKWYKNGIPLESNHTIKAGHVLTIMEVSRDTG NYTVILTNPISKEKQSHVVSLVVYVPP	
SEQ ID NO: 8	LFV-E Trap	多肽 GLPSVSLDLPRLSIQKDILTIKANTTLQITCRGQRDLDWLWPNNQSGSEQRVEVTE CSDGLFCKTLTIPKVIGNDTGAYKCFYRETDLASVIYVYVQDYRSPFIASVSDQHG VYITENKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISWDSKKGFTIPSY MISYAGMVCFCEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLVNL CTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSD QGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK	
SEQ ID NO: 9	LFV-F Trap	多肽 GLPSVSLDLPRLSIQKDILTIKANTTLQITCRGQRDLDWLWPNNQSGSEQRVEVTE CSDGLFCKTLTIPKVIGNDTGAYKCFYRETDLASVIYVYVQDYRSPFIASVSDQHG VYITENKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISWDSKKGFTIPSY MISYAGMVCFCEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLVNL CTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSD QGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKPFVAFGSGMESLVEATVGERVRIPAKYLG YPPEIKWYKNGIPLESNHTIKAGHVLTIMEVSRDTGNYTVILTNPISKEKQSHV VSLVVYVPP	
SEQ ID NO: 10	LFV-G Trap	多肽 SPFIASVSDQHGVVYITENKAKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISW	

DSKKGFTIPSYMISYAGMVFCEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIEL
SVGEKLVNCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLS
TLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK

SEQ ID NO: 11 LFV-H Trap 多肽

SPFIASVSDQHGVVYITENKQKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISW
DSKKGFTIPSYMISYAGMVFCEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIEL
SVGEKLVNCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLS
TLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK

SEQ ID NO: 12 LFV-I Trap 多肽

SPFIASVSDQHGVVYITENKNKTVVIPCLGSISNLAVSLCARYPEKRFVPDGNRISW
DSKKGFTIPSYMISYAGMVFCEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIEL
SVGEKLVNCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLS
TLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK

SEQ ID NO: 13 LFV-J Trap 多肽

SPFIASVSDQHGVVYITENKNKTVVIPCLGSISNLQVSLCARYPEKRFVPDGNRISW
DSKKGFTIPSYMISYAGMVFCEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIEL
SVGEKLVNCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLS
TLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK

SEQ ID NO: 14 LFV-K Trap 多肽

SPFIASVSDQHGVVYITENKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISW
DSKKGFTIPSYMISYAGMVFCEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIEL
SVGEKLVNQCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLS
TLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK

SEQ ID NO: 15 LFV-L Trap 多肽

SPFIASVSDQHGVVYITENKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISW
DSKKGFTIPSYMISYAGMVFCEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIEL
SVGEKLVNCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLS
TLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK

SEQ ID NO: 16 LFV-M Trap 多肽

GRPFVEMYSEIPEIIHMTGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDNR
KGFIHSNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLYLTHRQTNTIIGGGGSGGSPFIASVSD
QHGVVYITENKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISWDSKKGFTI
PSYMISYAGMVFCEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLV
LNCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVT
RSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK

SEQ ID NO: 17 LFV-N Trap 多肽

SPFIASVSDQHGVVYITENKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISW
 DSKKGFTIPSYMISYAGMVCFCEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIEL
 SVGEKLVNCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLS
 TLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKGGGGSGRPFVEMYSEIPE
 IHHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEI
 GLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTII

SEQ ID NO: 18 LFV-P Trap 多肽

YVQDYRSPFIASVSDQHGVVYITENKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVP
 DGNRISWDSKKGFTIPSYMISYAGMVCFCEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVL
 SPSHGIELSVGEKLVQCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGS
 EMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK

SEQ ID NO: 19 LFV-Q Trap 多肽

YVQDYRSPFIASVSDQHGVVYITENKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVP
 DGNRISWDSKKGFTIPSYMISYAGMVCFCEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVL
 SPSHGIELSVGEKLVQCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGS
 EMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKGGGGSGRPFV
 EMYSEIPEIHHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFI
 SNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTII

SEQ ID NO: 20 LFV-R Trap 多肽

GRPFVEMYSEIPEIHHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSR
 KGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIGGGGSGGSPFIASVSD
 QHGVVYITENKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISWDSKKGFTI
 PSYMISYAGMVCFCEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLV
 LQCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVT
 RSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK

SEQ ID NO: 21 LFV-S Trap 多肽

YVQDYRSPFIASVSDQHGVVYITENKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVP
 DGNRISWDSKKGFTIPSYMISYAGMVCFCEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVL
 SPSHGIELSVGEKLVNCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGS
 EMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKGGGGSGRPFV
 EMYSEIPEIHHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFI
 SNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTII

SEQ ID NO: 22 LFV-001 Trap 多肽

YSMTPPTLNITEESHVIDTGDSLISISCRGQHPLEWAWPGAQEAPATGDKDSED TG
 VVRDCEGTDARPYCKVLLLEHVHANDTGSYVCYYKYIKARIEGTTAASSYVFVR
 DFEQPFINKPDTLLVNRKDAMWVPCLVSIPGLNVTLLRSQSSVLWPDGQEVVWDD
 RRGMLVSTPLLHDALYLQCETTWGDQDFLSNPFLVHITGYRIYDVVLSPSHGIELS
 VGEKLVNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLST
 LTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK

SEQ ID NO: 23 LFV-010 Trap 多肽

YSMTPPTLNITEESHVIDTGDSLISISCRGQHPLEWAWPGAQEAPATGDKDSED TG
 VVRDCEGTDARPYCKVLLLEHVHAQDTGSYVCYYKYIKARIEGTTAASSYVFVR
 DFEQPFINKPDTLLVNRKDAMWVPCLVSIPGLNVTLLRSQSSVLWPDGQEVVWDD
 RRGMLVSTPLLHDALYLQCETTWGDQDFLSNPFLVHITGNELYDVVLSPSHGIEL
 SVGEKLVNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLS
 TLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK

SEQ ID NO: 24 LFV-002 Trap 多肽

YSMTPPTLNITEESHVIDTGDSLISISCRGQHPLEWAWPGAQEAPATGDKDSED TG
 VVRDCEGTDARPYCKVLLLEHVHANDTGSYVCYYKYIKARIEGTTAASSYVFVR
 DFEQPFINKPDTLLVNRKDAMWVPCLVSIPGLNVTLLRSQSSVLWPDGQEVVWDD
 RRGMLVSTPLLHDALYLQCETTWGDQDFLSNPFLVHIGYRIYDVVLSPSHGIELSV
 GEKLVNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTL
 TIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK

SEQ ID NO: 25 LFV-003 Trap 多肽

YSMTPPTLNITEESHVIDTGDSLISISCRGQHPLEWAWPGAQEAPATGDKDSED TG
 VVRDCEGTDARPYCKVLLLEHVHANDTGSYVCYYKYIKARIEGTTAASSYVFVR
 DFEQPFINKPDTLLVNRKDAMWVPCLVSIPGLNVTLLRSQSSVLWPDGQEVVWDD
 RRGMLVSTPLLHDALYLQCETTWGDQDFLSNPFLVHIGGYRIYDVVLSPSHGIEL
 SVGEKLVNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLS
 TLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK

SEQ ID NO: 26 LFV-004 Trap 多肽

YSMTPPTLNITEESHVIDTGDSLISISCRGQHPLEWAWPGAQEAPATGDKDSED TG
 VVRDCEGTDARPYCKVLLLEHVHANDTGSYVCYYKYIKARIEGTTAASSYVFVR
 DFEQPFINKPDTLLVNRKDAMWVPCLVSIPGLNVTLLRSQSSVLWPDGQEVVWDD
 RRGMLVSTPLLHDALYLQCETTWGDQDFLSNPFLVHVTGYRIYDVVLSPSHGIEL
 SVGEKLVNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLS
 TLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK

SEQ ID NO: 27 LFV-005 Trap 多肽

YSMTPPTLNITEESHVIDTGDSLISISCRGQHPLEWAWPGAQEAPATGDKDSED TG
 VVRDCEGTDARPYCKVLLLEHVHANDTGSYVCYYKYIKARIEGTTAASSYVFVR
 DFEQPFINKPDTLLVNRKDAMWVPCLVSIPGLNVTLLRSQSSVLWPDGQEVVWDD
 RRGMLVSTPLLHDALYLQCETTWGDQDFLSNPFLVVVGYRIYDVVLSPSHGIEL

SVGEKLVNCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLS
TLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK

SEQ ID NO: 28 LFV-006 Trap 多肽

YSMTPTLNITEESHVIDTGDSLSISCRGQHLEWAWPGAQEAPATGDKDSEDG
VVRDCEGTDARPYCKVLLLEHVHANDTGSYVCYYKYIKARIEGTTAASSYVFVR
DFEQPFINKPDTLLVNRKDAMWVPCLVSIPLNVTLSQSSVLWPDGQEVVWDD
RRGMLVSTPLLHDALYLQCETTWGDQDFLSNMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIEL
SVGEKLVNCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLS
TLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK

SEQ ID NO: 29 LFV-007 Trap 多肽

YSMTPTLNITEESHVIDTGDSLSISCRGQHLEWAWPGAQEAPATGDKDSEDG
VVRDCEGTDARPYCKVLLLEHVHANDTGSYVCYYKYIKARIEGTTAASSYVFVR
DFEQPFINKPDTLLVNRKDAMWVPCLVSIPLNVTLSQSSVLWPDGQEVVWDD
RRGMLVSTPLLHDALYLQCETTWGDQDFLSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIEL
SVGEKLVNCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLS
TLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK

SEQ ID NO: 30 LFV-008 Trap 多肽

YSMTPTLNITEESHVIDTGDSLSISCRGQHLEWAWPGAQEAPATGDKDSEDG
VVRDCEGTDARPYCKVLLLEHVHANDTGSYVCYYKYIKARIEGTTAASSYVFVR
DFEQPFINKPDTLLVNRKDAMWVPCLVSIPLNVTLSQSSVLWPDGQEVVWDD
RRGMLVSTPLLHDALYLQCETTWGDQDFLSAMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIEL
SVGEKLVNCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLS
TLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK

SEQ ID NO: 31 人 IgG1 恒定区结构域的氨基酸序列 (含 Fc 和铰链区)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 32 LFV-A 重组受体分子

YVQDYRSPFIASVSDQHGVVYITENKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVP
DGNRISWDSKKGFTIPSYMISYAGMVFCEAKINDESYQSIMYIVVVVGPGDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K

SEQ ID NO: 33 LFV-B 重组受体分子

YVQDYRSPFIASVSDQHGVVYITENKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVP
DGNRISWDSKKGFTIPSYMISYAGMVFCEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVL

SPSHGIELSVGEKLVNCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGS
EMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKGPGDKTHTCP
PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K

SEQ ID NO: 34 LFV-C 重组受体分子

SPFIASVSDQHGCVVYITENKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISW
DSKKGFTIPSYMISYAGMVFEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGI
ELSVGEKLVNCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLS
TLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKGPGDKTHTCPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 35 LFV-D 重组受体分子

YVQDYRSPFIASVSDQHGCVVYITENKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVP
DGNRISWDSKKGFTIPSYMISYAGMVFEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVV
LSPSHGIELSVGEKLVNCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGS
EMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKPFVAFGSGMES
LVEATVGERVRIPAKYLGYPPEIKWYKNGIPLESNHTIKAGHVLTIMEVSRDTG
NYTVILTNPISKEKQSHVVSLLVYVPPGPGDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 36 LFV-E 重组受体分子

GLPSVSLDLPRLSIQKDILTILKANTTLQITCRGQRDLWLWPNNQSGSEQRVEVTE
CSDGLFCKTLTIPKVIGNDTGAYKCFYRETDLASVIYVVYVQDYRSPFIASVSDQHG
VVYITENKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISWDSKKGFTIPSY
MISYAGMVFEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLVNCT
ARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSD
QGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKGPGDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 37 LFV-F 重组受体分子

GLPSVSLDLPRLSIQKDILTILKANTTLQITCRGQRDLWLWPNNQSGSEQRVEVTE
CSDGLFCKTLTIPKVIGNDTGAYKCFYRETDLASVIYVVYVQDYRSPFIASVSDQHG
VVYITENKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISWDSKKGFTIPSY

MISYAGMVFCEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLVNLC
TARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSD
QGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKPFVAFSGMESLVEATVGERVRIPAKYLG
YPPPEIKWYKNGIPLESNHTIKAGHVLTIMEVSERDTGNYTVILTNPISKEKQSHV
VSLVVYVPPGPGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 38 LFV-G 重组受体分子

SPFIASVSDQHGCVYITENKAKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISW
DSKKGFTIPSYMISYAGMVFCEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIEL
SVGEKLVNLTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLS
TLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKGPDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 39 LFV-H 重组受体分子

SPFIASVSDQHGCVYITENKQKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISW
DSKKGFTIPSYMISYAGMVFCEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIEL
SVGEKLVNLTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLS
TLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKGPDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 40 LFV-I 重组受体分子

SPFIASVSDQHGCVYITENKNKTVVIPCLGSISNLAVSLCARYPEKRFVPDGNRISW
DSKKGFTIPSYMISYAGMVFCEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIEL
SVGEKLVNLTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLS
TLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKGPDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 41 LFV-J 重组受体分子

SPFIASVSDQHGCVYITENKNKTVVIPCLGSISNLQVSLCARYPEKRFVPDGNRISW
DSKKGFTIPSYMISYAGMVFCEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIEL
SVGEKLVNLTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLS
TLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKGPDKTHTCPPCPAPELL

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
 REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
 SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 42 LFV-K 重组受体分子

SPFIASVSDQHGVVYITENKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISW
 DSKKGFTIPSYMISYAGMVCFEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIEL
 SVGEKLV LQCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLS
 TLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKGPGDKTHTCPPCPAPELL
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
 REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
 SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 43 LFV-L 重组受体分子

SPFIASVSDQHGVVYITENKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISW
 DSKKGFTIPSYMISYAGMVCFEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIEL
 SVGEKLV LNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLS
 TLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKQSTFVRVHEKGPGDKTHTCPPCPAPELL
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
 REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
 SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 44 LFV-M 重组受体分子

GRPFVEMYSEIPEIHHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWD
 SRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLYLTHRQTNTIIGGGGSGGSPFIASVSD
 QHGVVYITENKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISWDSKKGFTI
 PSYMISYAGMVCFEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLV
 LNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVT
 RSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKGPGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
 PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
 PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
 KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 45 LFV-N 重组受体分子

SPFIASVSDQHGVVYITENKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISW
 DSKKGFTIPSYMISYAGMVCFEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIEL
 SVGEKLV LNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLS
 TLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKG GGGSGRPFVEMYSEIPE
 IHHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWD SRKGFIISNATYKEI
 GLLTCEATVNGHLYKTNLYLTHRQTNTIIGPGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
 KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
 YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS

**RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**

SEQ ID NO: 46 LFV-O 重组受体分子

**SPFIASVSDQHGVVYITENKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISW
DSKKGFTIPSYMISYAGMVFEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIEL
SVGEKLVNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLS
TLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKGPDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGAGGGGSG
GGGSGGGGSGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIP
DGKRIIWDSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIHDVVLS
SHGIELSVGEKLVNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEM
KKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK**

SEQ ID NO: 47 LFV-P 重组受体分子

**YVQDYRSPFIASVSDQHGVVYITENKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVP
DGNRISWDSKKGFTIPSYMISYAGMVFEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVL
SPSHGIELSVGEKLVLQCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGS
EMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKGPDKTHTTCP
PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K**

SEQ ID NO: 48 LFV-Q 重组受体分子

**YVQDYRSPFIASVSDQHGVVYITENKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVP
DGNRISWDSKKGFTIPSYMISYAGMVFEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVL
SPSHGIELSVGEKLVLQCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGS
EMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKGGGGSGRPFV
EMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFII
SNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIGPGDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**

SEQ ID NO: 49 LFV-R 重组受体分子

**GRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSR
KGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIGGGGSGGSPFIASVSD
QHGVVYITENKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISWDSKKGFTI
PSYMISYAGMVFEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLV
LQCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVT**

RSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKGPGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLF
PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 50 LFV-S 重组受体分子

YVQDYRSPFIASVSDQHGVVYITENKNKTVVIPCLGSIENLVSLCARYPEKRFVP
DGNRISWDSKKGFTIPSYMISYAGMVFEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVL
SPSHGIELSVGEKLVNCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGS
EMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKGGGGSGRPFV
EMYSEIPEIIHMTREGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDNRKGFII
SNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIGPGDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 51 LFV-001 重组受体分子

YSMTPTLNTTEESHVIDTGDSLSISCRGQHLEWAWPGAQEAPATGDKDSEDG
VVRDCEGTDARPYCKVLLLEHVHANDTGSYVCYYKYIKARIEGTTAASSYVFVR
DFEQPFINKPDTLLVNRKDAMWVPCLVSIPLNVTLSQSSVLWPDGQEVVWDD
RRGMLVSTPLLHDALYLQCETTWGDQDFLSNPFLVHITGYRIYDVVLSPSHGIELS
VGEKLVNCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLST
LTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKGPGDKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 52 LFV-010 重组受体分子

YSMTPTLNTTEESHVIDTGDSLSISCRGQHLEWAWPGAQEAPATGDKDSEDG
VVRDCEGTDARPYCKVLLLEVHAQDTGSYVCYYKYIKARIEGTTAASSYVFVR
DFEQPFINKPDTLLVNRKDAMWVPCLVSIPLNVTLSQSSVLWPDGQEVVWDD
RRGMLVSTPLLHDALYLQCETTWGDQDFLSNPFLVHITGNELYDVVLSPSHGIEL
SVGEKLVNCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLS
TLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKGPGDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 53 LFV-002 重组受体分子

YSMTPTLNTTEESHVIDTGDSLSISCRGQHLEWAWPGAQEAPATGDKDSEDG
VVRDCEGTDARPYCKVLLLEHVHANDTGSYVCYYKYIKARIEGTTAASSYVFVR

DFEQPFINKPDTLLVNRKDAMWVPCLVSIPGLNVTLLRSQSSVLWPDGQEVVWDD
 RRGMLVSTPLLHDALYLQCETTWGDQDFLSNPFLVHIGYRIYDVVLSPSHGIELSV
 GEKLVNCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTL
 TIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKGPGDKTHTCPPCPAPELLG
 GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
 PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
 EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 54 LFV-003 重组受体分子

YSMTPTLNITEESHVIDTGDSLSISCRGQHLEWAWPGAQEAPATGDKDSEDG
 VVRDCEGTDARPYCKVLLLHEVHANDTGSYVCYYKYIKARIEGTTAASSYVFVR
 DFEQPFINKPDTLLVNRKDAMWVPCLVSIPGLNVTLLRSQSSVLWPDGQEVVWDD
 RRGMLVSTPLLHDALYLQCETTWGDQDFLSNPFLVHIGGYRIYDVVLSPSHGIEL
 SVGEKLVNCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLS
 TLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKGPGDKTHTCPPCPAPELL
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
 REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
 SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 55 LFV-004 重组受体分子

YSMTPTLNITEESHVIDTGDSLSISCRGQHLEWAWPGAQEAPATGDKDSEDG
 VVRDCEGTDARPYCKVLLLHEVHANDTGSYVCYYKYIKARIEGTTAASSYVFVR
 DFEQPFINKPDTLLVNRKDAMWVPCLVSIPGLNVTLLRSQSSVLWPDGQEVVWDD
 RRGMLVSTPLLHDALYLQCETTWGDQDFLSNPFIVHVTGYRIYDVVLSPSHGIEL
 SVGEKLVNCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLS
 TLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKGPGDKTHTCPPCPAPELL
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
 REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
 SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 56 LFV-005 重组受体分子

YSMTPTLNITEESHVIDTGDSLSISCRGQHLEWAWPGAQEAPATGDKDSEDG
 VVRDCEGTDARPYCKVLLLHEVHANDTGSYVCYYKYIKARIEGTTAASSYVFVR
 DFEQPFINKPDTLLVNRKDAMWVPCLVSIPGLNVTLLRSQSSVLWPDGQEVVWDD
 RRGMLVSTPLLHDALYLQCETTWGDQDFLSNPFIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIEL
 SVGEKLVNCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLS
 TLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKGPGDKTHTCPPCPAPELL
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
 REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
 SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 57 LFV-006 重组受体分子

YSMTPTLNLNITEESHVIDTGDSLISCRGQHLEWAWPGAQEAPATGDKDSEDG
 VVRDCEGTDARPYCKVLLLEHVHNDTGSYVCYYKYIKARIEGTTAASSYVFVR
 DFEQPFINKPDTLLVNRKDAMWVPCLVSIPLNVTLSQSSSLWPDGQEVVWDD
 RRGMLVSTPLLHDALYLQCETTWGDQDFLSNMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIEL
 SVGEKLVNLCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLS
 TLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKGPGDKTHTCPPCPAPELL
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
 REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
 SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 58 LFV-007 重组受体分子

YSMTPTLNLNITEESHVIDTGDSLISCRGQHLEWAWPGAQEAPATGDKDSEDG
 VVRDCEGTDARPYCKVLLLEHVHNDTGSYVCYYKYIKARIEGTTAASSYVFVR
 DFEQPFINKPDTLLVNRKDAMWVPCLVSIPLNVTLSQSSSLWPDGQEVVWDD
 RRGMLVSTPLLHDALYLQCETTWGDQDFLSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIEL
 SVGEKLVNLCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLS
 TLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKGPGDKTHTCPPCPAPELL
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
 REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
 SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 59 LFV-008 重组受体分子

YSMTPTLNLNITEESHVIDTGDSLISCRGQHLEWAWPGAQEAPATGDKDSEDG
 VVRDCEGTDARPYCKVLLLEHVHNDTGSYVCYYKYIKARIEGTTAASSYVFVR
 DFEQPFINKPDTLLVNRKDAMWVPCLVSIPLNVTLSQSSSLWPDGQEVVWDD
 RRGMLVSTPLLHDALYLQCETTWGDQDFLSAMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIEL
 SVGEKLVNLCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLS
 TLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKGPGDKTHTCPPCPAPELL
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
 REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
 SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

实施例

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施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制造厂商所建议的条件。除非另外说明，否则所有的百分比和份数按重量计。

实施例 1-重组受体分子的设计与表达

首先，构建了包含 VEGFR2 的不同衍生序列的各种 Trap 多肽，如下表 1A 所示。其中部分 Trap 多肽包含衍生于 VEGFR1 或 VEGFR3 的片段。这些片段之间可通过接头或连接子可操作地连接。本发明中使用的突变位点编号，例如 N143A、N158Q、N318Q 等，都是相对于 SEQ ID NO: 2 的相应位置而言的。

表 1A

Trap 多肽命名	序列说明	SEQ ID No
LFV-A	SEQ ID NO: 2 的 117-218 位氨基酸	4
LFV-B	SEQ ID NO: 2 的 117-327 位氨基酸	5
LFV-C	SEQ ID NO: 2 的 123-327 位氨基酸	6
LFV-D	SEQ ID NO: 2 的 117-421 位氨基酸	7
LFV-E	SEQ ID NO: 2 的 23-327 位氨基酸	8
LFV-F	SEQ ID NO: 2 的 23-421 位氨基酸	9
LFV-G	具有 N143A 突变的 LFV-C	10
LFV-H	具有 N143Q 突变的 LFV-C	11
LFV-I	具有 N158A 突变的 LFV-C	12
LFV-J	具有 N158Q 突变的 LFV-C	13
LFV-K	具有 N245Q 突变的 LFV-C	14
LFV-L	具有 N318Q 突变的 LFV-C	15
LFV-M	VEGFR1 的 132-230 位氨基酸可操作性地连接于 LFV-C 的 N 末端	16
LFV-N	VEGFR1 的 132-230 位氨基酸可操作性地连接于 LFV-C 的 C 末端	17
LFV-O	VEGFR1 (132-230) -VEGFR2 (225-327) 可操作性地连接于 LFV-C	46

LFV-P	具有 N245Q 突变的 LFV-B	18
LFV-Q	VEGFR1 的 132-230 位氨基酸可操作性地连接于 LFV-P	19
LFV-R	具有 N245Q 突变的 LFV-M	20
LFV-S	VEGFR1 的 132-230 位氨基酸可操作性地连接于 LFV-B	21
LFV-001 或 V0	VEGFR3 的 25-216 位氨基酸可操作性地连接于 SEQ ID NO: 2 的 221-327 位氨基酸	22

上述各设计的 Trap 多肽，可经由短的人造连接序列 Gly-Pro-Gly (GPG)，与人免疫球蛋白 IgG1 恒定结构域序列 (与 Fc Hinge 铰链区融合) 连接构建在一起。上述各序列经基因合成、载体构建与抽提后瞬转 HEK293 或 CHO 细胞 (购自 Gibco Life)，用蛋白 A 亲和层析以及分子筛二次精纯进行纯化 (其中 LFV-D、LFV-F 以及 LFV-001/V0 分子经蛋白 A 一步纯化后已满足纯度要求，未进行分子筛二次纯化)。所获得的截短 VEGFR2-Fc 融合多肽也称为重组受体分子或配体结合分子。

将 Eylea、Avastin、R3A 和 OPT 作为对照。Eylea 按照 WO0075319 公开的序列。R3A 采用 VEGFR3 采用位置 25-329 的氨基酸与人免疫球蛋白 IgG1 恒定结构域序列 (与 Fc Hinge 铰链区融合)) 连接构建在一起。OPT 如 WO2015/123715 A1 中所述进行构建，其采用位置 25-329 的氨基酸，包括 VEGFR3 位置 47-314 的氨基酸，并按 WO2015/123715 A1 中所述在第 104-106 位进行糖基化改造，将 N-D-T 序列改造为非 Q-D-T 序列，与人免疫球蛋白 IgG1 恒定结构域序列 (与 Fc Hinge 铰链区融合) 连接构建在一起构建成的分子在本文中称为 OPT。

各种重组受体分子的表达纯化情况如下表 1B 所示。

表 1B

Trap 分子	蛋白 A 一步亲和层析纯化后 SEC 单峰纯度	分子筛二次纯化后 SEC 单峰纯度
LFV-A	80%	97.8%
LFV-B	83.5%	96.6%
LFV-C	80%	99.4%
LFV-D	97.2%	/
LFV-E	87%	99.7%
LFV-F	98.5%	/

LFV-Q	66.4%	99.9%
LFV-M	52.1%	99.7%
LFV-P	83.8%	96.7%
LFV-R	78.7%	99.6%
LFV-S	85.4%	95%
R3A	69%	95%
OPT	66%	96%
LFV-001/V0	99.6%	/

实施例 2-衍生于 VEGFR2 和 VEGFR3 的重组受体分子的构建、产生和结合测试

2.1 重组受体分子的构建和表达

为了构建具有更优的人结合能力的新型受体相关 trap 蛋白，使用来自人 VEGFR3 的片段 (SEQ ID NO: 3 的 25-216) 与来自人 VEGFR2 的片段 (SEQ ID NO: 2 的 221-327) 作为构成元件，并在它们之间设计了一系列的连接子序列 (如下面表 2A 中所示)。

具体地，LFV-001 或 V0 使用了天然 VEGFR3 中的序列 (SEQ ID NO: 3 的位置 217-227)；LFV-010 使用了将 LFV-001 中所述序列在 VEGFR3 中进一步向 C 端延长一些的序列；为了引入长度上的灵活性，LFV-002 在基于 LFV-001 所述连接序列中去除了 Thr；LFV-003 将此 Thr 替换为 Gly 以引入主链结构扭转上更大的灵活性。另一方面，在 LFV-004 至 008 中，将 LFV-001 所用的源自 VEGFR3 的连接子序列进行了一系列的向 VEGFR2 相应区域的连接序列的突变 (如下面表 1 中所示)，其中在 LFV-008 中，将一处源自 VEGFR2 的 Ile 突变为侧链更小的相同极性的 Ala，以减小侧链间的空间位阻 (steric clash)。作为对照 trap 蛋白，设计了仅包含如 SEQ ID NO: 2 的 117-327 所示的 VEGFR2 片段的 LFV-B 以及仅包含如 SEQ ID NO: 3 的 25-329 所示的 VEGFR3 片段的 R3A。

表 2A

Trap 多肽命名	序列说明	中间连接子序列	SEQ ID No
LFV-001/V0	SEQ ID NO: 3 的位置 25-216+SEQ ID NO: 2 的 221-327	SNPFLVHITG	22

LFV-010/V0-4	SEQ ID NO: 3 的位置 25-216+SEQ ID NO: 2 的 221-327	SNPFLVHITGNELYD	23
LFV-002/V0_2	SEQ ID NO: 3 的位置 25-216+SEQ ID NO: 2 的 221-327	SNPFLVHI-G	24
LFV-003/V0_3	SEQ ID NO: 3 的位置 25-216+SEQ ID NO: 2 的 221-327	SNPFLVHIGG	25
LFV-004/V1	SEQ ID NO: 3 的位置 25-216+SEQ ID NO: 2 的 221-327	SNPFIVHVTG	26
LFV-005/V2	SEQ ID NO: 3 的位置 25-216+SEQ ID NO: 2 的 221-327	SNPFIVVVVG	27
LFV-006/V3	SEQ ID NO: 3 的位置 25-216+SEQ ID NO: 2 的 221-327	SNMYIVVVVG	28
LFV-007/V4	SEQ ID NO: 3 的位置 25-216+SEQ ID NO: 2 的 221-327	SIMYIVVVVG	29
LFV-008/V5	SEQ ID NO: 3 的位置 25-216+SEQ ID NO: 2 的 221-327	S <u>A</u> MYIVVVVG	30

上述各 trap 多肽均, 可由短的人造连接序列 Gly-Pro-Gly (GPG) 与人 IgG1 免疫球蛋白恒定结构域序列 (与 Fc Hinge 铰链区融合) 连接构建在一起, 经基因合成、载体构

建与抽提后瞬转 HEK293 细胞（购自 Gibco Life），再经过蛋白 A 一步亲和洗脱纯化后获得，在下文称为重组受体分子，其表达特征如下面表 2B 所示：

表 2B.

Trap 多肽	HEK293 瞬转得量 (mg/L)	SEC 单峰纯度
LFV-001/V0	23.6	99.60%
LFV-010/V0-4	127	95.40%
LFV-002/V0_2	11	93.40%
LFV-003/V0_3	63.9	86.80%
LFV-004/V1	74.5	85.90%
LFV-005/V2	52.9	78.20%
LFV-006/V3	11.8	40.00%
LFV-007/V4	2.5	50.60%
LFV-008/V5	9.1	48.70%
/	/	/
LFV-B	38	82.70%
R3A	11	69.00%

2.2 与 VEGF-A、VEGF-C、VEGF-D 的结合测试

5 VEGF-A165、VEGF-C、VEGF-D 多肽分子购自 ACROBiosystems 公司。100-300ng/孔的 VEGF 分子配置在 PBS 中，4°过夜包被，第二天用 PBS 洗板，加入 1% BSA 液室温封闭 2 小时，PBS 洗板，将实施例 1 中表达得到的重组受体分子从高浓度到低浓度使用 PBT 液（0.5% BSA 溶于含 0.05% 吐温-20 的 PBS 液中）梯度稀释后加入各孔，室温、300 rpm 孵育 1.5 小时，使用 PBST 液（含 0.05%吐温-20 的 PBS）洗板三次，加入
10 使用 PBT 稀释的偶联辣根过氧化物酶的羊抗人 Fc 二抗，室温、300 rpm 孵育 1h，PBST 液洗板三次，加入 TMB 进行显色，5%盐酸液终止，使用酶标仪读取 450 nm 下的 OD 值。

结果如图 1 所示, 其中各种重组配体结合分子均展现出与 VEGF-A (以 VEGF-A165 为代表)、VEGF-C、和 VEGF-D 的结合能力, 同时意外发现作为对照的 LFV-B 分子展现出比 R3A 还要强的对 VEGF-C、VEGF-D 的结合能力。

实施例 3- 重组受体分子对 VEGF-C 的结合

100 ng/孔的 VEGF-C 分子配制在 PBS 中, 4°过夜包被, 第二天用 PBS 洗板, 加入 1% BSA 液室温封闭 2 小时, PBS 洗板, 将实施例 1 中表达得到的重组受体分子从高浓度到低浓度梯度稀释后加入各孔, 室温、300 rpm 孵育 1.5 小时, 使用 PBST 液洗板三次, 加入偶联辣根过氧化物酶的羊抗人 Fc 二抗, 室温、300 rpm 孵育 1h, PBST 液洗板三次, 加入 TMB 进行显色, 5%盐酸液终止, 使用酶标仪读取 450 nm 下的 OD 值。

结果如图 2 所示, 可见相关重组受体分子具有较好的 VEGF-C 的结合能力, 其中 LFV-B 及其截短形式 LFV-C 具有最优的 VEGF-C 结合能力, 其结合能力优于 OPT, LFV-E 也具有与 OPT 接近的结合能力。它们的结合 EC₅₀ 值如下表 3 所示:

表 3.

	R3A	LFV-E	LFV-D	LFV-B	LFV-C	LFV-A	OPT	LFV-F	V0
EC ₅₀ (ng/ml)	161.6	85.19	191.7	16.24	24.16	/	54.59	916	398.5
EC ₅₀ (nM)	1.35	0.71	1.6	0.16	0.24	/	0.45	6.5	3.3

实施例 4- 重组受体分子对 VEGF-C、VEGF-D 的 VEGFR2 结合阻断实验

500 ng/孔的 VEGFR2-Fc(Met 1-Glu 764)分子 4°过夜包被, 第二天用 PBS 洗板, 加入 BSA 液室温封闭 2 小时, 封闭期间, 将各个重组受体分子从高浓度到低浓度梯度稀释, 与 100ng/孔的 VEGF-C 或 VEGF-D(均带 His 标签)混匀, 室温孵育 30 分钟, 将 VEGFR2-Fc 板洗板, 将重组受体分子与 VEGF-C、VEGF-D 的孵育液加入其中, 室温孵育结合 1 小时, PBST 洗板, 加入偶联辣根过氧化物酶的抗多组氨酸二抗, 室温孵育结合 1 小时, PBST 洗板, 加入 TMB 显色, 5%盐酸液终止, 使用酶标仪读取 450 nm 下的 OD 值。

结果如图 3 所示, 相关重组受体分子具有一定的阻断能力, 其中 LFV-B 及其截短形式 LFV-C 以及 LFV-E 的阻断能力最好, 而且均优于 OPT。V0 分子对 VEGF-C 也具有较好的阻断能力。各个重组受体分子对 VEGF-C 和 VEGF-D 与 VEGFR2 结合的阻断 EC₅₀ 值分别如下表 4 和表 5 所示。

表 4.对 VEGFR2-VEGFC 结合的阻断 EC₅₀ 值

	LFV-A	LFV-D	LFV-F	LFV-B	OPT	LFV-C	LFV-E	V0	R3A	Eylea	Avastin
EC ₅₀ (ng/ml)	/	58280	24088	2085	3567	2252	2275	3593	7808	/	/
EC ₅₀ (nM)	/	485.7	170.6	20.85	29.7	22.52	18.96	29.9	65.1	/	/

表 5.对 VEGFR2-VEGFD 结合的阻断 EC₅₀ 值

	LFV-A	LFV-D	LFV-F	LFV-B	OPT	LFV-C	LFV-E	V0	R3A	Eylea	Avastin
EC ₅₀ (ng/ml)	/	920.4	521.6	26.78	241.3	34.02	50.54	1542	532.2	/	/
EC ₅₀ (nM)	/	7.7	3.7	0.27	2.01	0.34	0.42	12.85	4.4	/	/

5 实施例 5- 重组受体分子对 VEGF-C、VEGF-D 的 VEGFR3 结合阻断实验

500 ng/孔的 VEGFR3-Fc(Tyr25-Ile776)分子 4°过夜包被, 第二天用 PBS 洗板, 加入 BSA 液室温封闭 2 小时, 封闭期间, 将各个重组受体分子从高浓度到低浓度梯度稀释, 与 10 ng/孔的 VEGF-C 或 500 ng/孔的 VEGF-D (均带 His 标签) 混匀, 室温孵育 30 分钟, 将 VEGFR3-Fc 板洗板, 将孵育液加入其中, 室温孵育结合 1 小时, PBST 洗板, 加入偶联辣根过氧化物酶的抗多组氨酸二抗, 室温孵育结合 1 小时, PBST 洗板, 加入 TMB 显色, 5% 盐酸液终止, 使用酶标仪读取 450 nm 下的 OD 值。

结果如图 4 所示, 可以发现阻断结果与对 VEGFR2 的阻断实验基本一致。各个分子对 VEGF-C 和 VEGF-D 与 VEGFR3 结合的阻断 EC₅₀ 值分别如下表 6 和表 7 所示。

表 6.对 VEGFR3-VEGFC 的阻断 EC₅₀ 值

	LFV-A	LFV-D	LFV-F	LFV-B	OPT	LFV-C	LFV-E	V0	R3A	Eylea	Avastin
EC ₅₀ (ng/ml)	/	4323	2915	114.6	300.4	106.1	135.8	188.6	560.7	/	/
EC ₅₀ (nM)	/	36.03	20.72	1.15	2.5	1.06	1.13	1.57	4.67	/	/

表 7.对 VEGFR3-VEGFD 的阻断 EC₅₀ 值

	LFV-A	LFV-D	LFV-F	LFV-B	OPT	LFV-C	LFV-E	V0	R3A	Eylea	Avastin
EC ₅₀ (ng/ml)	/	10049	3440	122.3	688.1	124.6	179.5	2438	2447	/	/
EC ₅₀ (nM)	/	83.74	24.45	1.22	5.73	1.25	1.5	20.32	20.39	/	/

实施例 6- 重组受体分子对 VEGF-A 的结合

50 ng/孔的 VEGF-A 165 或 VEGF-A 121 分子 (购自 ACROBiosystems 公司) 4°过夜包被, 第二天用 PBS 洗板, 室温封闭 2 小时, PBS 洗板, 将重组受体分子从高浓度到

低浓度梯度稀释后加入各孔，室温孵育 1.5 小时，使用 PBST 液洗板三次，加入偶联辣根过氧化物酶的羊抗人 Fc 二抗，室温孵育 1h，PBST 液洗板三次，加入 TMB 进行显色，5% 盐酸液终止，使用酶标仪读取 450 nm 下的 OD 值。

结果如图 5 所示，可见各个 VEGFR2 相关的重组受体分子分子除了 LFV-A、LFV-D、LFV-F 以外均具有较好的 VEGF-A 的结合能力，其中 LFV-B 以及其截短形式 LFV-C 具有最优的 VEGF-A 结合能力，其结合能力优于 Eylea，LFV-E 则具有与 Eylea 接近的 VEGF-A 结合能力。对 VEGF-A 165 和 VEGF-A 121 的结合 EC₅₀ 值分别如下表 8 和表 9 所示。

表 8.对 VEGF-A 165 的结合 EC₅₀ 值

	LFV-C	LFV-E	LFV-B	LFV-D	LFV-F	Eylea
EC ₅₀ (ng/ml)	12.61	21.19	9.268	476.1	983.4	17.39
EC ₅₀ (nM)	0.126	0.177	0.093	3.97	6.99	0.174

表 9.对 VEGF-A 121 的结合 EC₅₀ 值

	LFV-C	LFV-E	LFV-B	LFV-D	LFV-F	Eylea
EC ₅₀ (ng/ml)	47.59	72.1	31.14	/	/	71.89
EC ₅₀ (nM)	0.476	0.601	0.311	/	/	0.719

实施例 7- 重组受体分子对 VEGF-A 的 VEGFR2 结合阻断实验

500 ng/孔的 VEGFR2-Fc 分子 4°过夜包被，第二天用 PBS 洗板，加入 BSA 液室温封闭 2 小时，封闭期间，将各个重组受体分子从高浓度到低浓度梯度稀释，然后与 60 ng/孔的 VEGF-A 165 或 120 ng/孔的 VEGF-A 121（均带 His 标签）混匀，室温孵育 30 分钟，将 VEGFR2-Fc 板洗板，将孵育液加入其中，室温孵育结合 1 小时，PBST 洗板，加入偶联辣根过氧化物酶的抗多组氨酸二抗，室温孵育结合 1 小时，PBST 洗板，加入 TMB 显色，5% 盐酸液终止，使用酶标仪读取 450 nm 下的 OD 值。

结果如图 6 所示，LFV-B 及其截短形式 LFV-C 具有较好的阻断能力，达到优于贝伐单抗、接近 Eylea 的水平。对 VEGF-A 165 和 VEGF-A 121 的 VEGFR2 结合的阻断 EC₅₀ 值分别如下表 10 和表 11 所示。

表 10.对 VEGF-A 165 的阻断 EC₅₀ 值

	LFV-A	LFV-D	LFV-F	LFV-B	LFV-C	LFV-E	Eylea	Avastin
EC ₅₀ (ng/ml)	/	/	/	467.1	456.8	1111	319.5	1002
EC ₅₀ (nM)	/	/	/	4.67	4.57	9.26	3.2	6.68

表 11.对 VEGF-A 121 的阻断 EC₅₀ 值

	LFV-A	LFV-D	LFV-F	LFV-B	LFV-C	LFV-E	Eylea	Avastin
EC ₅₀ (ng/ml)	/	/	/	762.8	935	1278	954.9	3356
EC ₅₀ (nM)	/	/	/	7.63	9.35	10.65	9.55	22.37

实施例 8- 对 VEGF-A、VEGF-C、VEGF-D 的结合亲和力检测实验

使用表面等离子共振方法对亲和力进行检测，仪器为 **Biacore T200**，使用 **Protein A chip** 抓取重组受体分子(包括 LFV-B、LFV-E，以 OPT 作为对照)，运行缓冲液为 1×HBS-EP，以 30ul/min 的流速流入各个浓度的抗原

检测结果如下表 12 所示，从中可见，LFV-B 具有明显优于 OPT 的与 VEGF-C、VEGF-D 的亲和力，其与 VEGF-A 的亲和力也较强，达到了 9.3 pM。LFV-E 具有略优于 OPT 的与 VEGF-C、VEGF-D 的亲和力，与 LFV-B 相比，由于相对低的 Ka 值，LFV-E 在表观亲和力值上明显要弱，但它们的 Kd 值差别不大，因而在阻断实验中展现出接近的阻断效力，OPT 相对低些的阻断效力，或可以在相对明显更弱的 Kd 值上得以解释。

表 12A.

	VEGF-A			VEGF-C			VEGF-D		
	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)
LFV-B	1.13E+07	1.05E-04	9.30E-12	4.32E+06	3.88E-05	8.97E-12	1.51E+04	3.44E-05	2.28E-09
LFV-E	2.99E+06	1.23E-04	4.10E-11	9.38E+05	3.80E-05	4.05E-11	5855	8.67E-05	1.48E-08
OPT	N/A			3.29E+06	1.67E-04	5.07E-11	1.74E+04	3.11E-04	1.79E-08
V0	2.822E+06	0.001524	5.4E-10	N/A			N/A		

表 12B.

	VEGF-A			VEGF-C			VEGF-D		
	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)

全 VEGFR2 胞外结 构域	3.727E+4	1.316E-4	1.158E- 8	2.706E+4	4.521E- 4	1.671E- 8	3.208E+4	6.728E- 4	2.098E- 8
--------------------------	----------	----------	--------------	----------	--------------	--------------	----------	--------------	--------------

实施例 9-对 PDGF 家族分子的结合检测实验

在本实施例中，还测试了 VEGFR2 及其相关截短形式 trap 分子与 PDGF 家族分子之间的结合。简言之，使用表面等离子共振方法对 LFV-B、LFV-E、VEGFR2-Fc（使用 VEGFR2 的全胞外结构域序列：Met 1-Glu 764）分子与 PDGF 家族分子的结合进行了检测，在初期的检测实验中发现 PDGF 家族分子（购自 R&D Systems 公司）容易在芯片内产生非特异性结合，带来测量值的假性升高，使检测无法完成，后改用 CM5 chip 分别偶联装载 PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB、PDGF-CC 分子，然后流入重组受体分子，从而有效去除了非特异性结合对亲和力测定带来的影响。

相关检测结果如下表 13 所示，可见全 VEGFR2 胞外结构域同 PDGF 分子均具有一定的结合力，而 LFV-C，LFV-B 则具有明显更优的对 PDGF 家族分子的结合能力，这意外表征了其是负责与 PDGF 结合的主要区段，有可能经由结合阻断 PDGF 家族分子而发挥更有效的疗效以及令更多患者获益。LFV-E 具有与 LFV-B、LFV-C 接近的对 PDGF 的结合能力。

表 13.

	LFV-B			LFV-E			LFV-C			VEGFR2-Fc		
	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)
PDGF-AA	5.79E+03	1.53E-04	2.63E-08	1.40E+05	1.34E-04	9.58E-10	3.42E+04	6.64E-04	1.94E-08	-	-	3.113E-08
PDGF-AB	1.21E+05	1.92E-04	1.59E-09	4.68E+04	2.01E-04	4.29E-09	2.90E+04	8.60E-04	2.96E-08	-	-	3.506E-08
PDGF-BB	4.82E+05	4.70E-04	9.76E-09	5.83E+04	3.11E-04	5.33E-09	2.67E+04	5.51E-04	2.01E-08	-	-	1.410E-08
PDGF-CC	-	-	2.23E-08	-	-	4.61E-08	-	-	6.00E-08	-	-	7.364E-08

实施例 10- 鼠体内药代动力学实验

C57BL/6 小鼠分为 3 组，每组 6 只，每组分别尾静脉注射 LFV-B、LFV-E、对照品 OPT 4mg/Kg，于注射后的 1h、2h、12h、24h、72h（3 天）、168h（7 天）、336h（14 天）、504h（21 天）采血，离心取血清，使用抗人 Fc 抗体捕获 ELISA 法对目的分子进行定量，使用 WinNonlin（PhoenixTM, version 8.0）和其他相关软件进行药代动力学计

算。得出的 PK 数据如图 7 及下表 14 所示：

表 14.

组别	T _{1/2} (hr)	AUC _{0-384h} (hr*ng/mL)
G1: OPT	147.79	154722.19
G2: LFV-B	176.09	106657.38
G3: LFV-E	104.22	205515.11

可以看到三种分子具有接近的体内 PK 特征，LFV-E 的血清浓度相对最高，LFV-B 的半衰期相对较好。

5

实施例 11- 激光诱导大鼠脉络膜新生血管的治疗实验

Brown Norway 大鼠经麻醉后，使用激光光凝仪围绕视盘进行光凝，可见到有气泡产生即提示 Bruch 氏膜被击破。光凝后 12 天后进行分组，于分组后第二天眼内注射给药，4ul、40ug/眼。给药后第 10 或 14 天进行荧光造影检查以及眼底照相，统计各组的 4 级荧光光斑个数。

10

结果如图 8 所示，可见相比 PBS 及 Eylea 对照组，LFV-B、LFV-C 展现出四级光斑缓解趋势。

实施例 12- 糖基化改造设计与检测

将 LFV-E 中的 N 糖基化位点 (Asn46、Asn66、Asn96) 与 LFV-B、LFV-C 内的 N 糖基化位点 (Asn143、Asn158、Asn245、Asn318) 进行点突变以去除 N 糖基化，优先将 Asn 突变为 Gln 或 Ala。

15

将点突变设计后的序列进行基因合成、载体构建抽提与细胞转染表达与纯化，使用 ELISA 方法检测对 VEGFR2/R1-VEGFA、VEGFR2/R3-VEGFC、VEGFR2/R3-VEGFD 结合的阻断能力，与未经突变的原始分子进行比较，结合表达量、单峰纯度综合进行评估，选出若干个变体。使用 HEK 293 细胞进行转染表达与纯化，进行鼠体内的 PK 实验检测，与未经突变的原始分子进行比较。还使用上述经糖基化改造的重组蛋白与异源肽

20

进行重组，进行相关的 ELISA 实验、细胞实验及动物实验以进行进一步优选。

对 LFV-C 的四个 N 糖基化位点 (Asn143、Asn158、Asn245、Asn318) 进行点突变，它们的突变设计以及表达纯化情况如下表 15 所示：

表 15.

Trap分子	突变	Protein A一步亲和层析纯化后		分子筛二次纯化后	
		得量 (mg/L)	SEC单峰纯度	得量 (mg/L)	SEC单峰纯度
LFV-G	N143→A	30.7	41%	/	/
LFV-H	N143→Q	32.8	48.7%	2	91.8%
LFV-I	N158→A	14.1	21.2%	/	/
LFV-J	N158→Q	17.3	42.5%	0.33	97.1%
LFV-K	N245→Q	28	81.4%	7.3	99.4%
LFV-L	N318→Q	54	76.6%	17.4	98.7%

5

然后使用上述实施例中的条件，使用 ELISA 方法检测不同浓度的 LFV-H、LFV-J、LFV-K、LFV-L 相比非突变的 LFV-C 对 VEGF-A 165、VEGF-C、VEGF-D 与受体结合的阻断能力。其中 VEGF-A 165-VEGFR1 阻断 ELISA 所用的实验条件为：200ng/孔的 VEGFR1-Fc (Met1-Asn756) 分子 4°过夜包被，第二天用 PBS 洗板，加入 BSA 液室温封闭 2 小时，封闭期间，将各个重组受体分子从高浓度到低浓度梯度稀释，然后与 40ng/孔的 VEGF-A 165 (带 His 标签) 混匀，室温孵育 30 分钟，将 VEGFR1-Fc 板洗板，将孵育液加入其中，室温孵育结合 1 小时，PBST 洗板，加入偶联辣根过氧化物酶的抗多组氨酸二抗，室温孵育结合 1 小时，PBST 洗板，加入 TMB 显色，5%盐酸液终止，使用酶标仪读取 450 nm 下的 OD 值。

10

检测结果如图 9 所示，可见与未经糖基化改造的形式相比，LFV-K 分子对 VEGF-A、VEGF-C、VEGF-D 与受体的结合具有更优的阻断能力，开发潜力相对较大。

15

实施例 13- 新的 VEGFR2-VEGFR1 融合蛋白的设计

为了进一步增强重组受体分子对 VEGF-A 与受体结合的阻断能力，将 VEGFR1 的位置 132-230 区域，或将 VEGFR1 的位置 132-230 区域与 VEGFR2 的位置 225-327 区域

20

的组合形式引入到 LFV-B 或 LFV-C 分子或其糖基化改造分子中, 进行 CHO 细胞的瞬转及表达纯化。然后使用 ELISA 方法检测其对 VEGFR2/R1-VEGFA、VEGFR2/R3-VEGFC、VEGFR2/R3-VEGFD 的阻断能力, 使用实施例 8 和 9 中所述系统检测对 VEGF、PDGF 家族分子的阻断能力, 以探究其是否具有增强的 VEGF-A 与受体结合的阻断能力、以及具有对 VEGF-B、PIGF 的结合能力、同时保留较好的对 VEGF-C、VEGF-D 及 PDGF 家族分子与受体结合的阻断能力, 以及使用 Biacore 检测其对 PDGF 家族分子的结合能力, 以及进行优选融合蛋白的细胞或动物实验。

在一个实验中, 将 VEGFR1 的位置 132-230 区域分别连接在 LFV-C 分子的氮端及碳端, 以及将 VEGFR1 的位置 132-230 区域与 VEGFR2 的位置 225-327 区域的组合形式构建入 LFV-C 分子内, 使用 GS 连接子进行连接, 所构建分子 LFV-M、LFV-N、LFV-O 的全序列如 SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 46 所示, LFV-M 为将 VEGFR1 的位置 132-230 区域构建在 LFV-C 的氮端形式, LFV-N 为将 VEGFR1 的位置 132-230 区域构建在 LFV-C 的碳端形式, LFV-O 为 VEGFR1 (132-230)-VEGFR2 (225-327) 与 LFV-C 的重组形式, 它们在 CHO 细胞内的表达纯化情况如表 16 所示:

表 16

Trap分子	Protein A一步亲和层析纯化后		分子筛二次纯化后	
	得量 (mg/L)	SEC单峰纯度	得量 (mg/L)	SEC单峰纯度
LFV-M	135.8	52.1%	39.5	99.7%
LFV-N	101.6	55.8%	31.8	99.7%
LFV-O	65	较差	/	/

然后使用上述实施例中的条件, 使用 ELISA 方法检测它们对 VEGF-A、VEGF-C、VEGF-D 的阻断能力。结果如图 10 所示, 可见 LFV-M、LFV-N 具有与 LFV-C 一致或略优的对 VEGF-C、VEGF-D 与受体结合的阻断能力, 同时具有相比 LFV-C 明显改进的对 VEGF-A 与受体结合的阻断能力, 尤其是在 VEGF A-VEGFR1 的阻断实验中, LFV-M、LFV-N 展现出达到优于 Eylea 的阻断能力。

另外检测了它们对 VEGF-B、PIGF 的结合能力: 200ng/孔的 VEGF-B 或 PIGF 分子 (均购自 ACROBiosystems 公司) 配置在 PBS 中, 4°过夜包被, 第二天用 PBS 洗板, 加入 1% BSA 液室温封闭 2 小时, PBS 洗板, 将重组受体分子从高浓度到低浓度梯度稀释

后加入各孔，室温、300 rpm 孵育 1.5 小时，使用 PBST 液洗板三次，加入偶联辣根过氧化物酶的羊抗人 Fc 二抗，室温、300 rpm 孵育 1h，PBST 液洗板三次，加入 TMB 进行显色，5% 盐酸液终止，使用酶标仪读取 450 nm 下的 OD 值。

结果如图 11 所示，LFV-M、LFV-N 均展现出一定的对 VEGF-B、PIGF 的结合。

5

实施例 14- 糖基化改造的 VEGFR2 序列与 VEGFR1 序列的融合蛋白的设计与检验

对 LFV-B 分子或其截短或延长形式，引入 LFV-K、LFV-L 分子所使用的糖基化改造形式，并与 VEGFR1 的位置 132-230 区域进行重组，产生新的融合蛋白，进行表达纯化，进而进行分子、细胞水平的表征分析以及动物实验，以期能得到具有更加效力的治疗分子。

10

在一个实验中，将具有 N245Q 突变的 LFV-B 分子命名为 LFV-P 作为对照，并将 LFV-P 与 VEGFR1 的 132-230 区域进行组合产生新的融合蛋白，命名为 LFV-Q。LFV-P 的序列如 SEQ ID NO: 18 所示，LFV-Q 的序列如 SEQ ID NO: 19 所示。将 LFV-P、LFV-Q 进行表达纯化，然后使用上述实施例中的条件，使用 ELISA 方法检测它们对 VEGF-A、VEGF-C、VEGF-D 与受体结合的阻断能力以及对 VEGF-B、PIGF 的结合能力。

15

对 VEGF-A、VEGF-C、VEGF-D 与 VEGFR2 的结合阻断结果如图 12 所示，可见经糖基化修饰后，LFV-P 具有相比 LFV-B 更优的对 VEGF-A、VEGF-C、VEGF-D 与受体结合的阻断能力。LFV-Q 经过与 VEGFR1 的 132-230 区域融合后，具有了最优的对 VEGF-A 与受体结合的阻断能力。对 VEGF-B、PIGF 的结合结果如图 13 所示，可见经与 VEGFR1 的 132-230 区域融合后，LFV-Q 亦具有了较好的与 VEGF-B、PIGF 的结合能力。

20

实施例 15- LFV-Q 对 PDGF 家族分子的结合检测实验

使用表面等离子共振方法对 LFV-Q 分子与 PDGF 家族分子的结合进行了检测，具体实施步骤与上述实施例 9 一致，即采用先偶联装载 PDGF，再流入待测融合蛋白分子的方法以去除 PDGF 分子与芯片的非特异性结合。

25

相关检测结果显示如下表 17 所示：

表 17

	LFV-Q		
	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)
PDGF-AA	4.26E+04	4.42E-04	1.04E-08
PDGF-AB	2.96E+04	3.62E-03	1.22E-07
PDGF-BB	2.48E+04	1.70E-03	6.85E-08
PDGF-CC	2.16E+04	12.14E-03	9.93E-08

可见 LFV-Q 对 PDGF 家族分子均具有确定的结合能力。

5 实施例 16- LFV-M、LFV-Q 的进一步糖基化变体研究

如上所述，LFV-Q 使用了源自 VEGFR2 的序列 117-327 的 N245 位的去糖基化形式，即将 N245 突变为 Q，为了进一步对糖基化进行研究，也将 LFV-M 内的 N245 位突变为 Q 进行糖基化去除，所产生的新分子命名为 LFV-R，LFV-R 的序列如 SEQ ID NO: 20 所示，同时对 LFV-Q 的 Q245 位恢复突变为 N 以进行糖基化前后的功能比较，所产生的分子命名为 LFV-S。

首先对 LFV-R、LFV-S 进行了瞬转表达纯化，在这个过程中，发现去除 N245 位糖基化后的 LFV-R，相比未去除的 LFV-M，在 CHO 细胞瞬转和蛋白 A 一步纯化后，意外发现 SEC 单峰纯度由 52.1% 提高到了 78.7%（如图 14 所示），另外 LFV-R 在分子筛二次纯化后进行了在 PBS 内的浓缩以方便后期的晶状体内注射，发现浓度达到 19.2 mg/ml 时其仍展现出良好的溶解性，这反应了 LFV-R 较好的下游开发潜力。

另外使用 ELISA 法检测了这些分子对 VEGFR2/VEGFR1 与 VEGF-A、VEGFR2 与 VEGF-C、VEGFR2 与 VEGF-D 的结合阻断能力，结果如图 15 所示，可见 LFV-R 具有最优的对 VEGFR2 与 VEGF-A 的阻断能力，并且明显优于对照药 Eylea，4 个分子对 VEGFR2 与 VEGF-C、VEGF-D 的阻断能力比较接近，尤其是对 VEGF-D 的阻断能力均明显优于对照品 OPT。

另外还检测了它们对 PLGF、VEGF-B 的结合能力，结果如图 16 所示，可见 LFV-R 相对具有最优的对 PLGF、VEGF-B 的结合能力。

实施例 17- LFV-R、LFV-Q、LFV-B、LFV-C 等对 VEGF 家族分子的 ELISA 结合实验

使用 ELISA 方法对 LFV-R、LFV-Q、LFV-B、LFV-C 分子与 VEGF-A 的结合进行了检测，同时使用全胞外结构域的 VEGFR2-Fc 和 Eylea 作为对照，实验结果如图 17a 所示，可见 LFV-R 具有明显最优的与 VEGF-A 的结合能力，高于对照药 Eylea，LFV-R、LFV-Q、LFV-B、LFV-C 四种分子对 VEGF-A 的结合力均明显高于全胞外结构域的 VEGFR2-Fc。

使用 ELISA 方法对 LFV-R、LFV-Q、LFV-B、LFV-C 分子与 VEGF-C 的结合进行了检测，同时使用全胞外结构域的 VEGFR2-Fc 和 OPT 作为对照，实验结果如图 17b 所示，可见 LFV-R、LFV-Q 具有与 LFV-B 相似的结合能力，高于对照品 OPT，LFV-R、LFV-Q、LFV-B、LFV-C 四种分子对 VEGF-C 的结合力均明显高于全胞外结构域的 VEGFR2-Fc。

使用 ELISA 方法对 LFV-R、LFV-Q、LFV-B、LFV-C 分子与 VEGF-D 的结合进行了检测，同时使用全胞外结构域的 VEGFR2-Fc 和 OPT 作为对照，实验结果如图 17c 所示，可见 LFV-R、LFV-Q 具有与 LFV-B 相似的结合能力，明显高于对照品 OPT，LFV-R、LFV-Q、LFV-B、LFV-C 四种分子对 VEGF-D 的结合力均明显高于全胞外结构域的 VEGFR2-Fc。

实施例 18- LFV-R 对 PDGF 家族分子的结合检测实验

使用表面等离子共振方法对 LFV-R 分子与 PDGF 家族分子的结合进行了检测，具体实施步骤与上述实施例 9 一致，即采用先偶联装载 PDGF，再流入待测融合蛋白分子的方法以去除 PDGF 分子与芯片的非特异性结合，相关检测结果如下表 18 所示：

表 18.

抗体 抗原	LFV-R		
	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)
PDGF-AA	2190	0.001108	5.059E-7
PDGF-AB	1.570E+4	0.001439	9.166E-8
PDGF-BB	5.119E+4	2.224E-4	4.345E-9
PDGF-CC	9382	8.467E-4	9.025E-8

可见 LFV-R 对 PDGF-AA、AB、BB、CC 均具有明确的结合能力。

实施例 19- 对 HUVEC 的细胞增殖抑制测实验

使用 VEGF-A 加 VEGF-C 分子的 1:1 混合物刺激 HUVEC 细胞增殖，同时加入不同浓度的 LFV-R、Eylea、OPT 分子，细胞培养 72h 后，使用 MTS 进行显色观察，以检测不同药物对细胞增殖的抑制效力。结果如图 18a 所示，可见仅有 LFV-R 呈现明显的抑制效力，在约 3ug/ml 浓度即达到完全抑制的效果，OPT 无抑制效果呈现，Eylea 仅在超高浓度（30ug/ml 以上）才呈现出完全抑制的效力。

进一步的，作为目前有潜力的治疗手段，将 Eylea 与 OPT 混合在一起（1:1 混合物）对 HUVEC 进行增殖抑制检测，加入 LFV-R、LFV-Q 与其对比，结果如图 18b 所示，可见相比单用，Eylea 与 OPT 混合后可以完全抑制 HUVEC 细胞的增殖，进一步的，LFV-R 不仅 IC₅₀ 比 Eylea+OPT 和 LFV-Q 更优，而且相比 Eylea+OPT 和 LFV-Q，在低浓度即展示出明显高出的抑制效力，这将有利于在玻璃体给药后的浓度衰减期内仍维持持续的抑制疗效，从而提高治疗受益和延长注射间隔。

实施例 20- 激光诱导大鼠脉络膜新生血管的治疗实验

24 只 Brown-Norway 大鼠，根据体重随机分为 4 个组，每组 6 只动物，雌雄各半，分别为模型对照组、LFV-R 组、LFV-Q 组、Eylea 组，先进行双眼底激光造模，造模第 3 天分别双眼玻璃体单次注射给予 0.9%氯化钠、LFV-R、LFV-Q 及 Eylea，给药体积 4 μL/眼，给药浓度均为 10 mg/mL、剂量 40 μg/眼，给药当天定义为试验第 1 天。试验期间，每天观察各组存活大鼠状态。造模前和给药后第 18 天行眼底照相和荧光造影检查观察各组新生血管生长和渗漏情况，比较各组药效。

结果如图 19 所示, LFV-R、LFV-Q、Eylea 3 个治疗组均展现出相比模型对照组更低的四级光斑占比和荧光渗漏面积, LFV-R、LFV-Q 治疗组的四级荧光光斑占比与对照组和 Eylea 组相比显示出明显统计差异。

- 5 本领域技术人员将进一步认识到, 在不脱离其精神或中心特征的情况下, 本发明可以以其他具体形式来实施。由于本发明的前述描述仅公开了其示例性实施方案, 应该理解的是, 其他变化被认为是在本发明的范围内。因此, 本发明不限于在此详细描述的特
定实施方案。相反, 应当参考所附权利要求来指示本发明的范围和内容。

权 利 要 求

1. 一种分离的配体结合分子，其包含 VEGFR2 衍生序列，所述 VEGFR2 衍生序列是与以下任一种氨基酸序列具有至少 95% 同一性的氨基酸序列：

- (a) SEQ ID NO: 2 的位置 123-327 所示的氨基酸序列；
- (b) SEQ ID NO: 2 的位置 117-327 所示的氨基酸序列；
- (c) SEQ ID NO: 2 的位置 117-421 所示的氨基酸序列；
- (d) SEQ ID NO: 2 的位置 23-327 所示的氨基酸序列；和
- (e) SEQ ID NO: 2 的位置 23-421 所示的氨基酸序列；

其中所述配体结合分子能结合 VEGF-A、VEGF-C、VEGF-D、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB 和 PDGF-CC。

2. 权利要求 1 所述的配体结合分子，其相比于天然 VEGFR2 具有增强的对 VEGF-A、VEGF-C、VEGF-D、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB 和 PDGF-CC 中的至少三种的结合能力。

3. 权利要求 1 或 2 所述的配体结合分子，其中所述 VEGFR2 衍生序列是 (a) - (e) 中任一种的 N 末端和/或 C 末端截短后的片段，例如截短 20 个、15 个、10 个、9 个、8 个、7 个、6 个、5 个、4 个、3 个、2 个或 1 个氨基酸。

4. 权利要求 1-3 中任一项所述的配体结合分子，其中所述 VEGFR2 衍生序列相比于天然 VEGFR2 中相应位置处的序列包含一个或多个氨基酸的插入、取代或缺失，任选地为在糖基化位点的插入、缺失或取代以消除 NXT 或 NXS 三氨基酸，例如 N 被突变为 Q 或 A。

5. 权利要求 4 所述的配体结合分子，其中所述糖基化位点选自对应于 SEQ ID NO: 2 的氨基酸位置 46、66、96、143、158、245 和 318 处。

6. 权利要求 5 所述的配体结合分子，其中所述糖基化位点的取代选自以下：N143A、N143Q、N158A、N158Q、N245Q 和 N318Q。

7.前述权利要求中任一项所述的配体结合分子，其中所述 VEGFR2 衍生序列包含选自下组的氨基酸序列或由其组成：SEQ ID No: 4-15 和 18。

8.前述权利要求中任一项所述的配体结合分子，其还包含 VEGFR1 衍生序列或 VEGFR3 衍生序列。

9. 权利要求 8 所述的配体结合分子，其中所述 VEGFR1 衍生序列选自下组：

(i) 与 SEQ ID NO: 1 的位置 132-230 所示的氨基酸序列具有至少 95%同一性的氨基酸序列；和

(ii) (i)的氨基酸序列的 N 末端和/或 C 末端截短后的氨基酸序列，例如截短 20 个、15 个、10 个、9 个、8 个、7 个、6 个、5 个、4 个、3 个、2 个或 1 个氨基酸。

10. 权利要求 8 或 9 所述的配体结合分子，其包含与 SEQ ID NO: 2 的位置 117-327 或 123-327 所示的氨基酸序列具有至少 95%同一性的氨基酸序列可操作地连接于所述 VEGFR1 衍生序列。

11.权利要求 10 所述的配体结合分子，其包含选自下组的氨基酸序列或由其组成：SEQ ID No: 16-17 和 19-21。

12.权利要求 8 所述的配体结合分子，其中 VEGFR3 衍生序列选自下组：

(i) 与 SEQ ID NO: 3 的位置 25-216 所示的氨基酸序列具有至少 95%同一性的氨基酸序列；和

(ii) (i)的氨基酸序列的 N 末端和/或 C 末端截短后的氨基酸序列，例如截短 20 个、15 个、10 个、9 个、8 个、7 个、6 个、5 个、4 个、3 个、2 个或 1 个氨基酸。

13. 权利要求 8 或 12 所述的配体结合分子，其包含与 SEQ ID NO: 2 的位置 117-327、123-327 或 221-327 所示的氨基酸序列具有至少 95%同一性的氨基酸序列可操作地连接

于所述 VEGFR3 衍生序列。

14. 权利要求 13 所述的配体结合分子，其包含选自下组的氨基酸序列或由其组成：SEQ ID No: 22-30。

15. 前述权利要求中任一项所述的配体结合分子，其还包含免疫球蛋白的 Fc 区，优选为人 IgG1 的 Fc 区或其变体，任选地所述配体结合分子还包含铰链区。

16. 权利要求 15 所述的配体结合分子，其中所述免疫球蛋白的 Fc 区通过接头连接至所述 VEGFR2 衍生序列、VEGFR1 衍生序列或 VEGFR3 衍生序列的 C 末端。

17. 权利要求 15 或 16 所述的配体结合分子，其中 Fc 区如 SEQ ID No: 31 的第 104-330 位氨基酸序列所示。

18. 权利要求 15-17 中任一项所述的配体结合分子，其包含 SEQ ID No: 32-59 中的任一种序列或由其组成。

19. 一种分离的核酸分子，其包含编码权利要求 1-18 中任一项所述的配体结合分子的多核苷酸序列。

20. 一种载体，其包含权利要求 19 所述的核酸分子。

21. 一种宿主细胞，其经过权利要求 19 所述的核酸分子或权利要求 20 所述的载体转化或转染。

22. 一种制备配体结合分子的方法，其包括以下步骤：

- 在适宜的条件下培养权利要求 21 所述的宿主细胞以表达所述配体结合分子；并
- 从宿主细胞的培养上清液中分离所述配体结合分子。

23. 一种药物组合物，其包含权利要求 1-18 中任一项所述的配体结合分子以及药学上可接受的载剂。

24. 权利要求 23 所述的药物组合物，其被配制成用于局部施用、玻璃体内注射或玻璃体内植入施用。

25. 权利要求 1-18 中任一项所述的配体结合分子用于治疗受试者中新生血管形成以及由新生血管形成引起的疾病或病况。

26. 根据权利要求 25 使用的配体结合分子，其中新生血管形成引起的眼部疾病包括视网膜新生血管形成和脉络膜新生血管形成引起的眼部疾病。

27. 根据权利要求 25 使用的配体结合分子，其中所述疾病或病况选自脉络膜血管病变或新生、视网膜血管新生、黄斑血管新生和与眼底渗漏有关的眼部病症。

28. 根据权利要求 25-27 中任一项使用的配体结合分子，其中通过玻璃体内注射或通过玻璃体内植入物施用来施用所述药物。

29. 一种预防、抑制或治疗受试者中的新生血管形成以及由新生血管形成引起的疾病或病况的方法，所述方法包括以有效抑制所述受试者中的新生血管形成的量向所述受试者施用权利要求 1-18 中任一项所述的配体结合分子或权利要求 23 或 24 所述的药物组合物。

30. 一种试剂盒，其包含在容器中的权利要求 1-18 中任一项所述的配体结合分子或权利要求 23 或 24 所述的药物组合物。

VEGF-A₁₆₅ 结合的 ELISA 结果

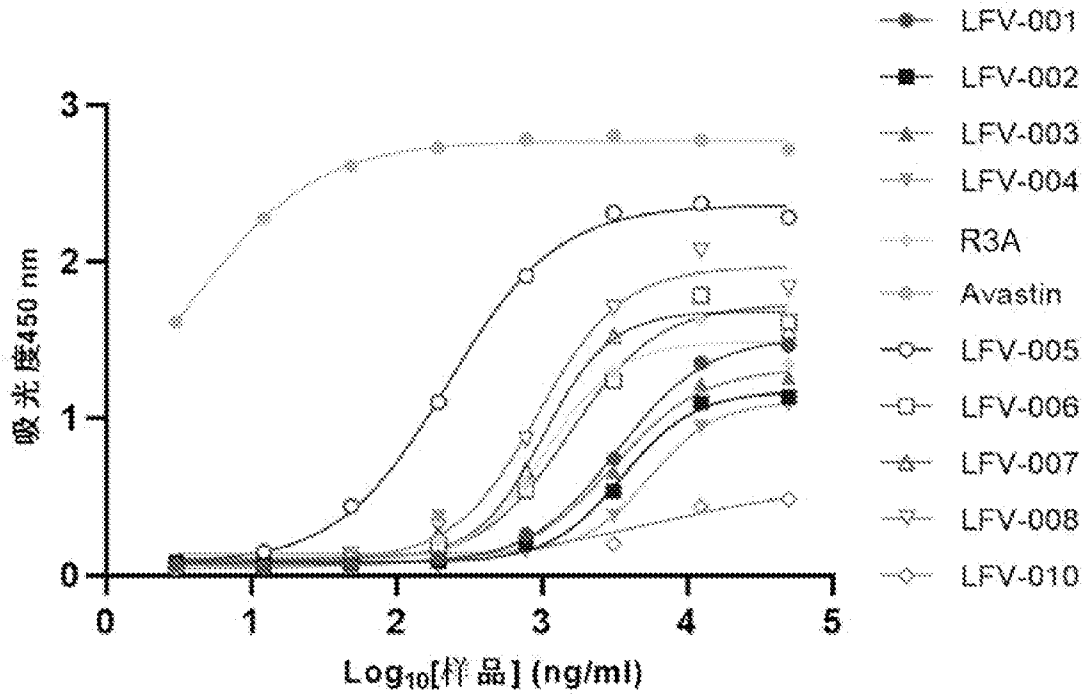


图 1a

VEGF-C 结合的 ELISA 结果

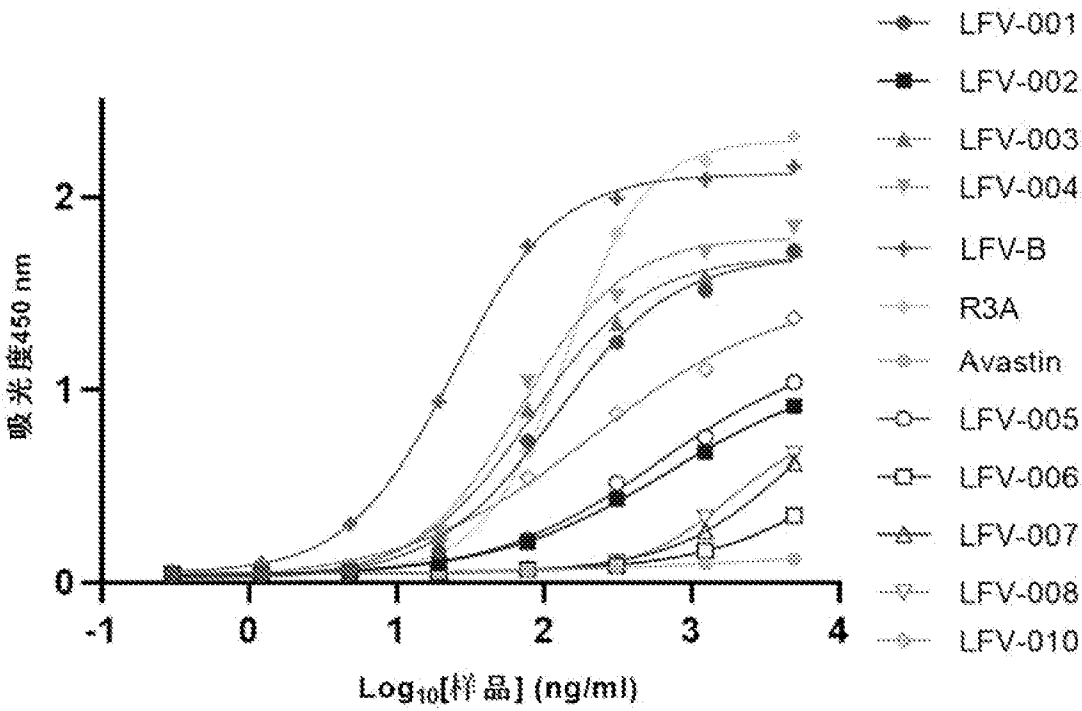


图 1b

VEGF-D 结合的 ELISA 结果

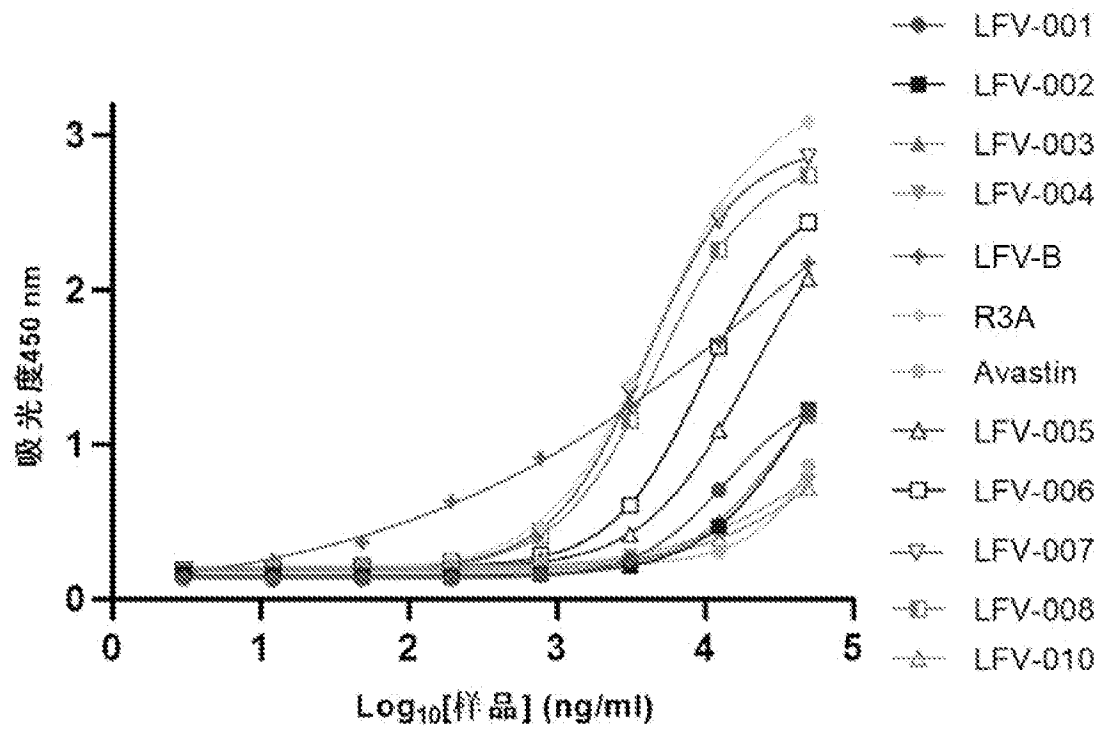


图 1c

VEGF-C 结合的 ELISA 结果

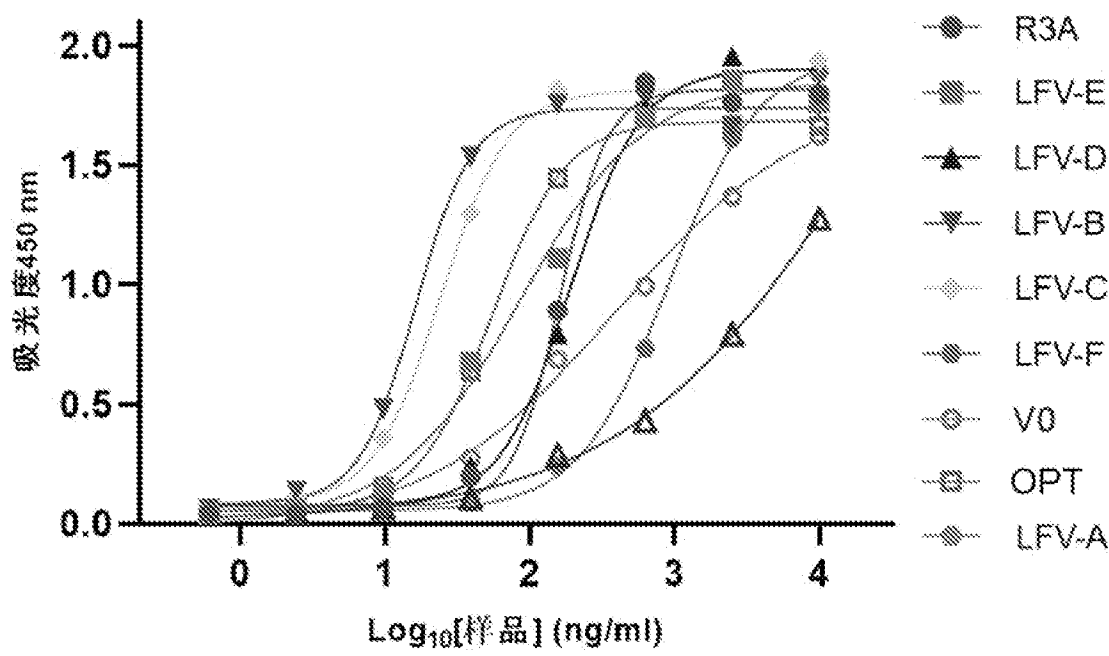


图 2

对 VEGFR2-VEGFC 的阻断 ELISA 结果

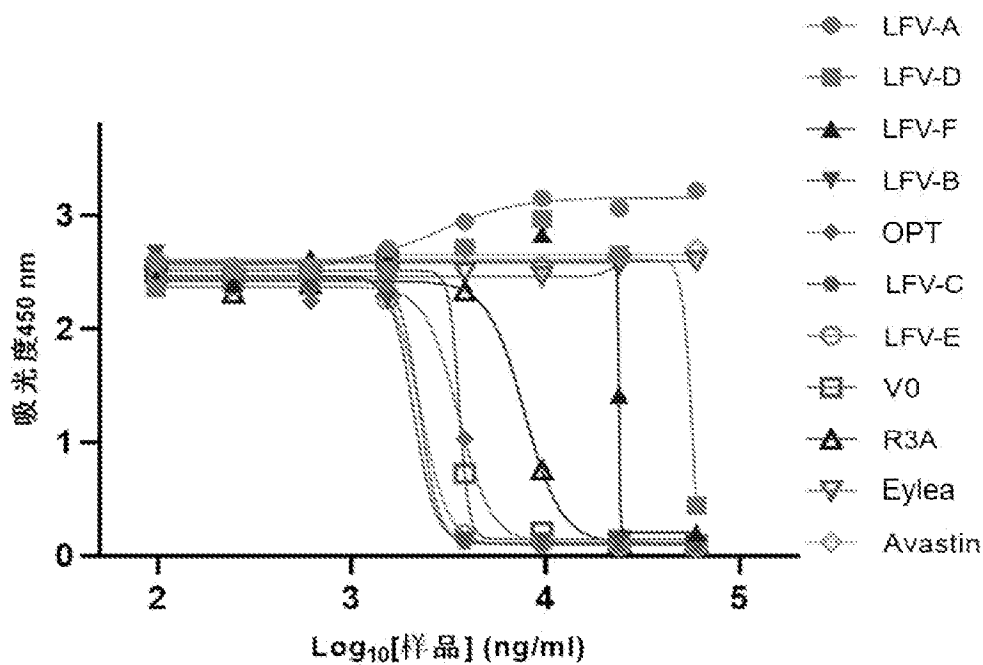


图 3a

对 VEGFR2-VEGFD 的阻断 ELISA 结果

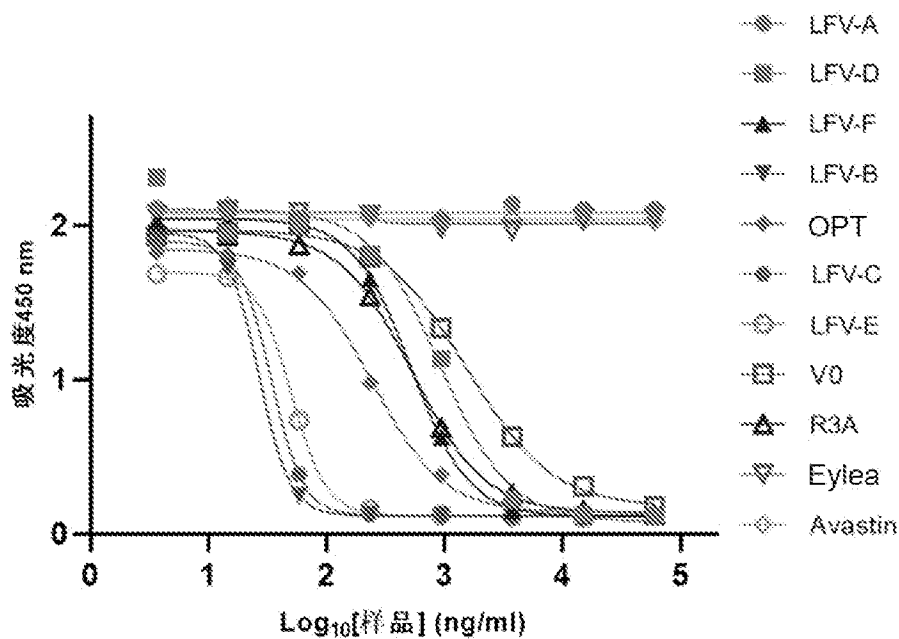


图 3b

对 VEGFR3-VEGF C 的阻断 ELISA 结果

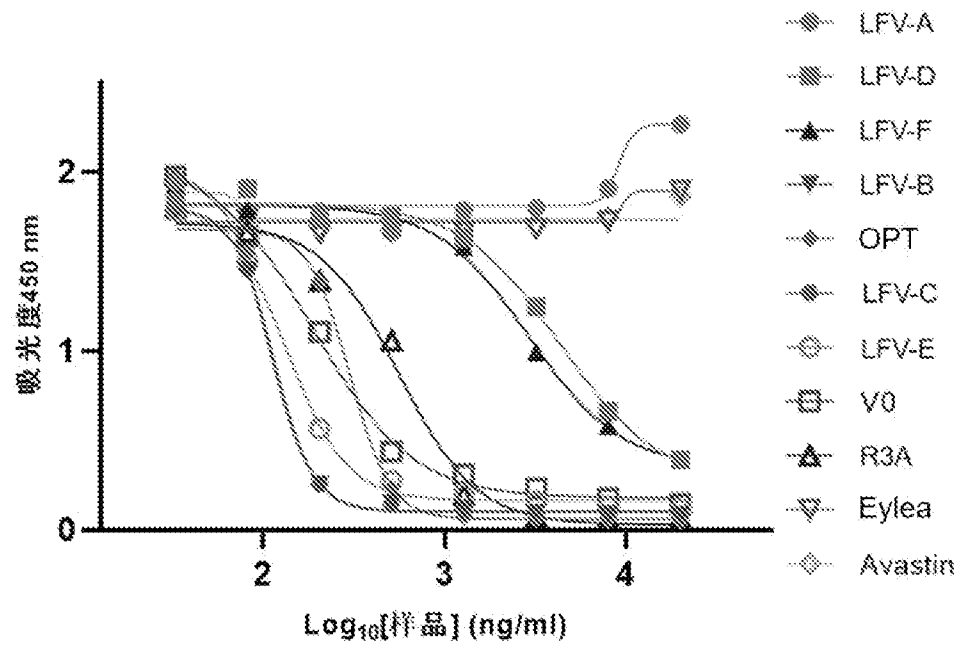


图 4a

对 VEGFR3-VEGF D 的阻断 ELISA 结果

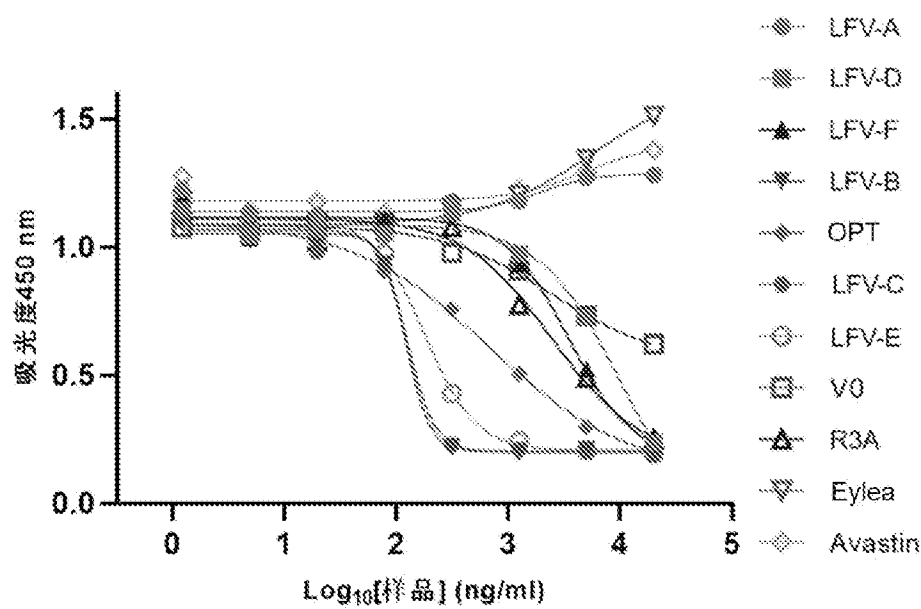


图 4b

对 VEGF-A 165 的结合 ELISA 结果

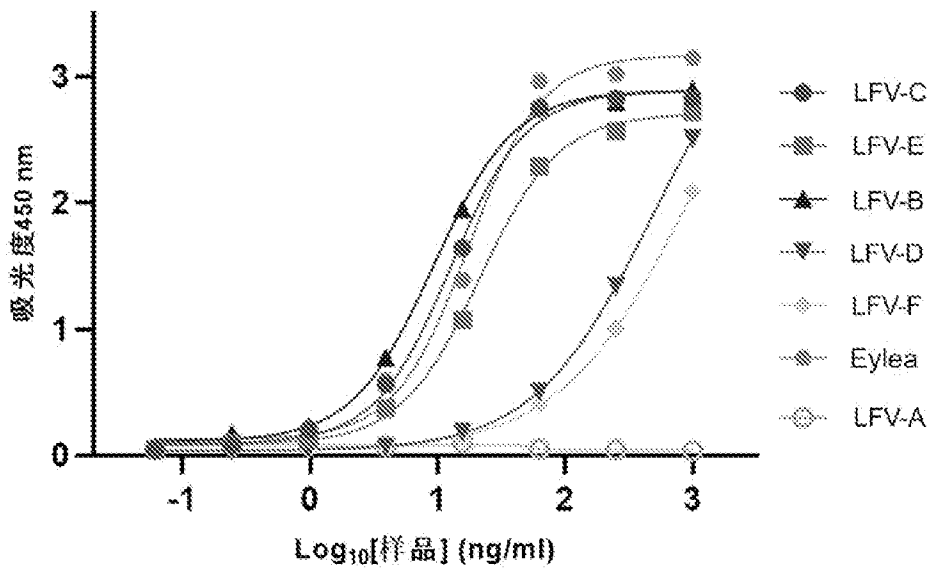


图 5a

对 VEGF-A 121 的结合 ELISA 结果

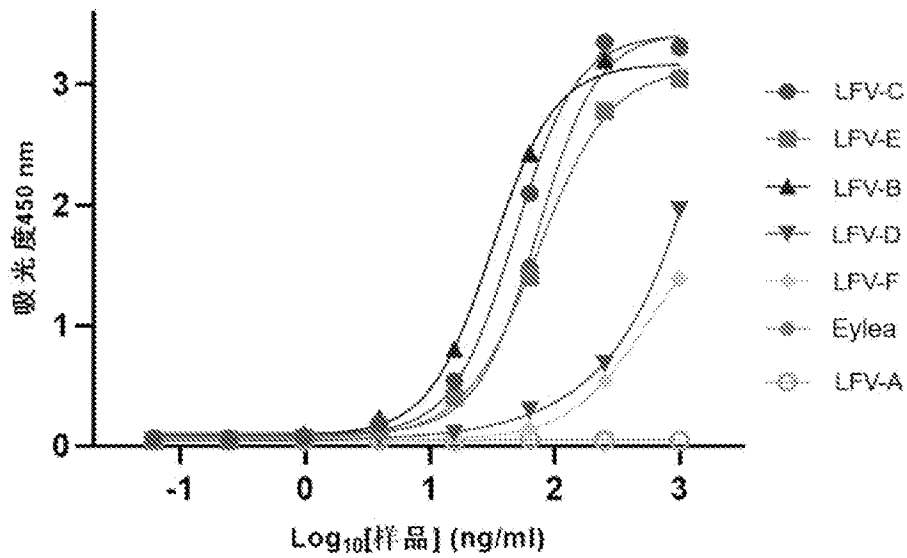


图 5b

对 VEGF-A 165 与 VEGFR2 的结合阻断结果

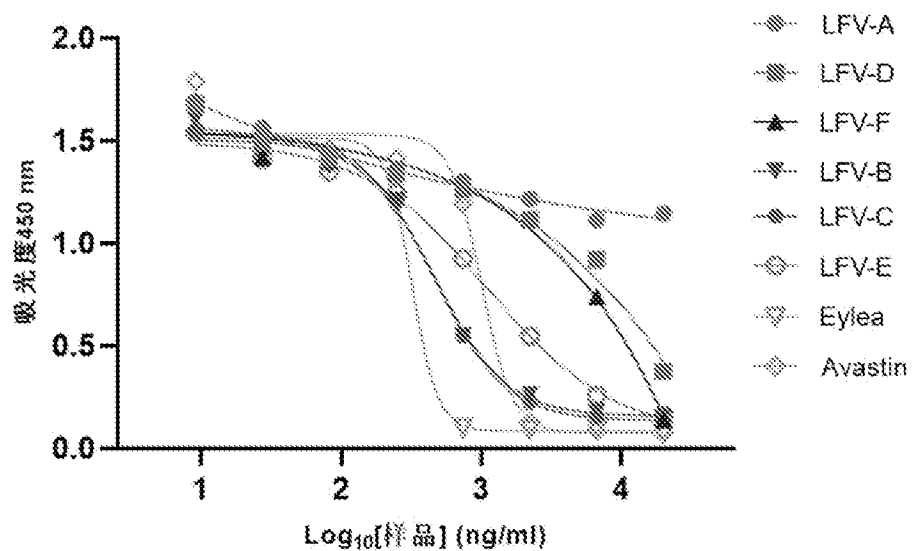


图 6a

对 VEGF-A 121 与 VEGFR2 的结合阻断结果

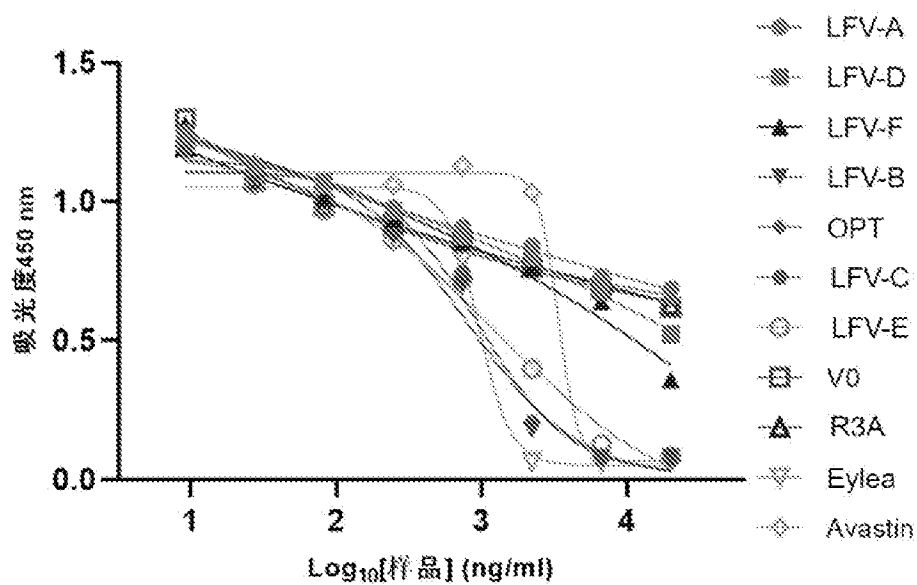


图 6b

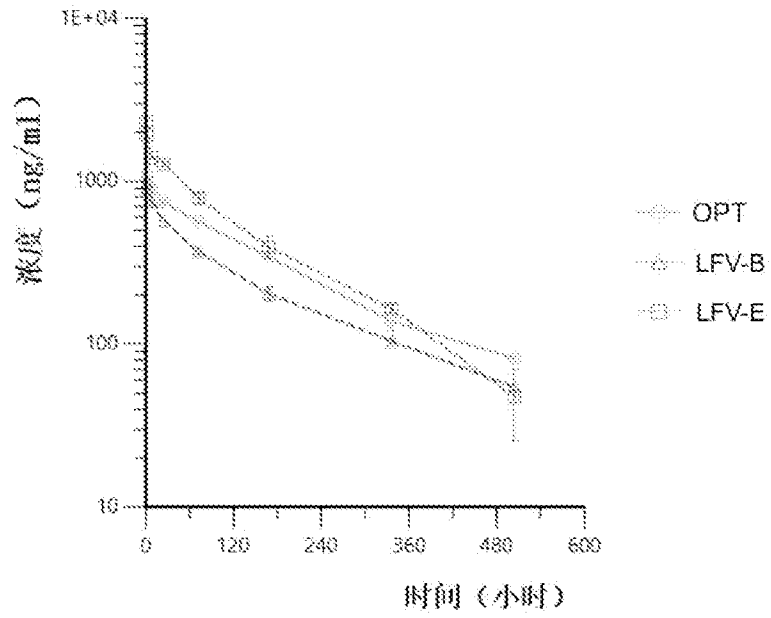


图 7

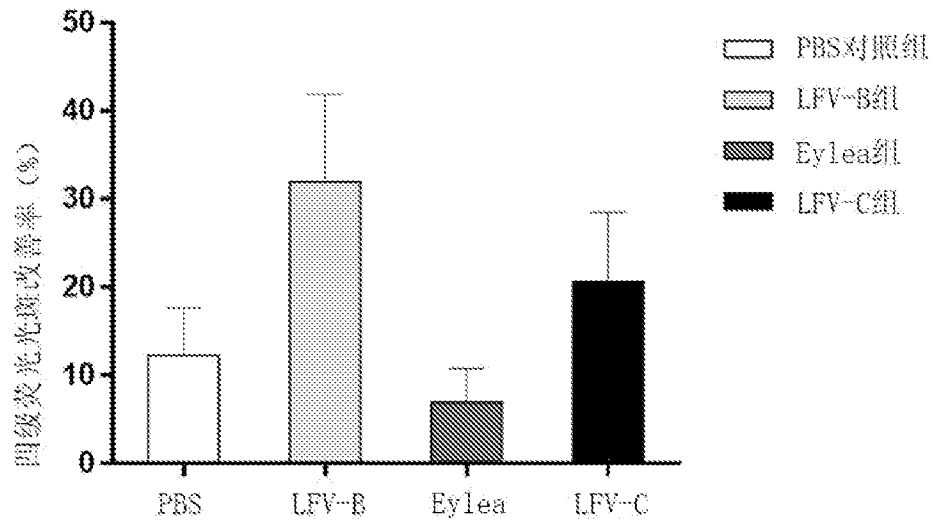


图 8

对 VEGF-A 165-VEGFR2 的结合阻断结果

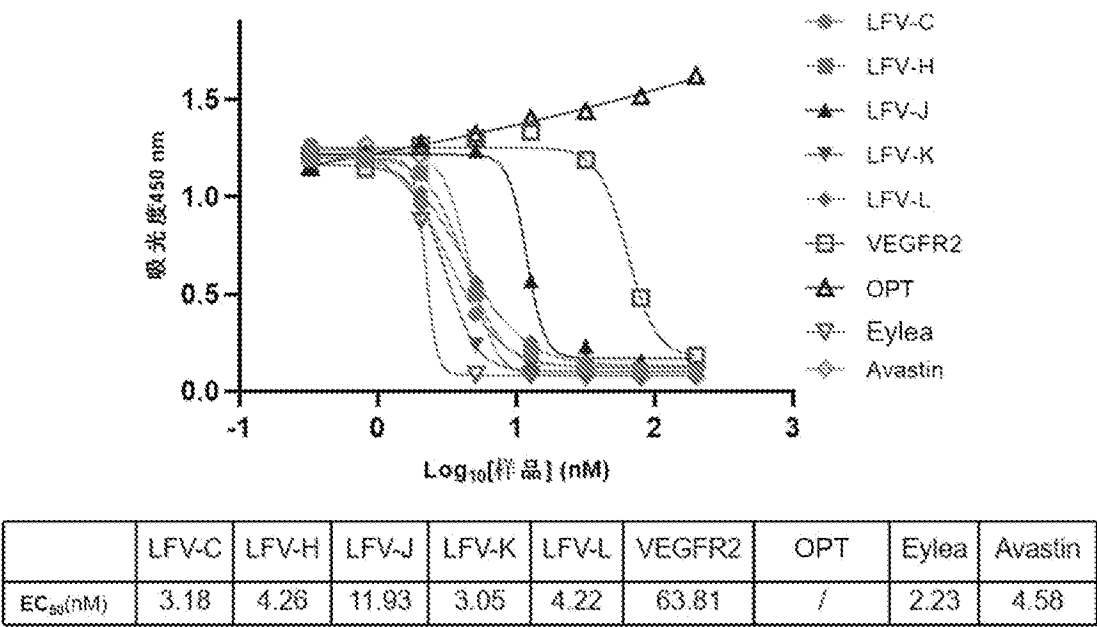


图 9a

对 VEGF C-VEGFR2 的结合阻断结果

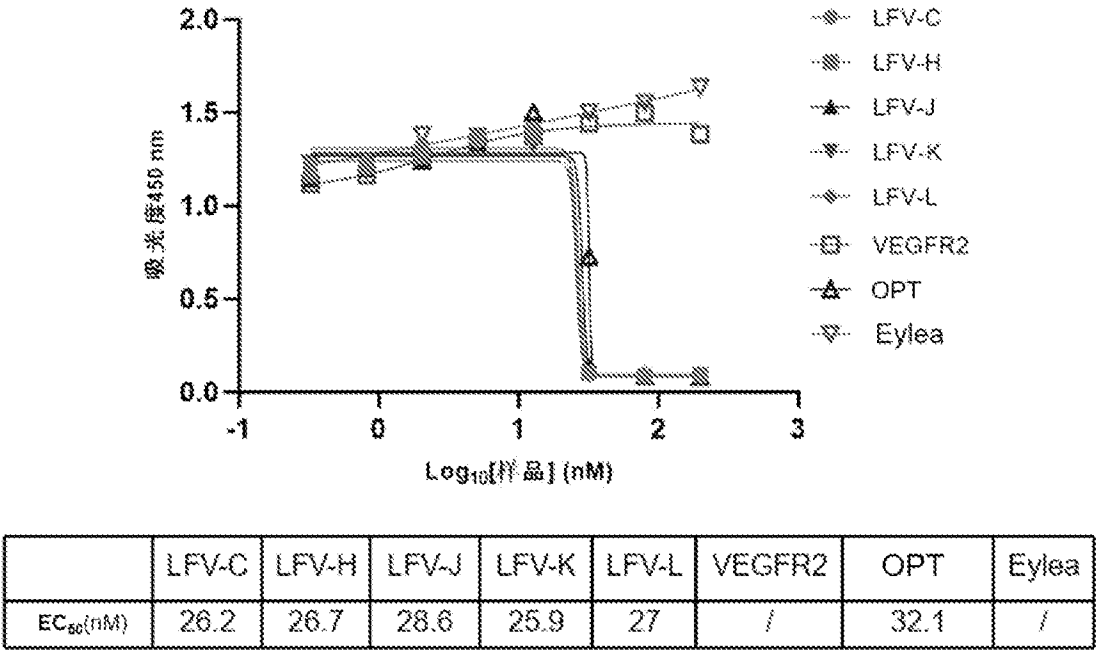


图 9b

对 VEGF D-VEGFR2 的结合阻断结果

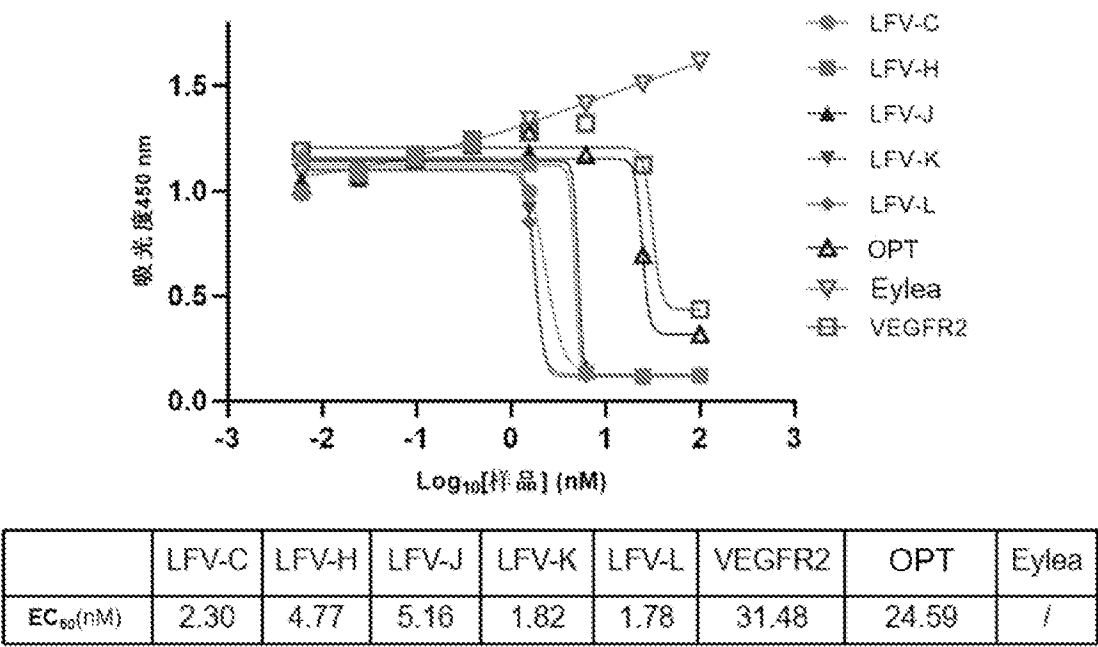


图 9c

对 VEGF D-VEGFR3 的结合阻断结果

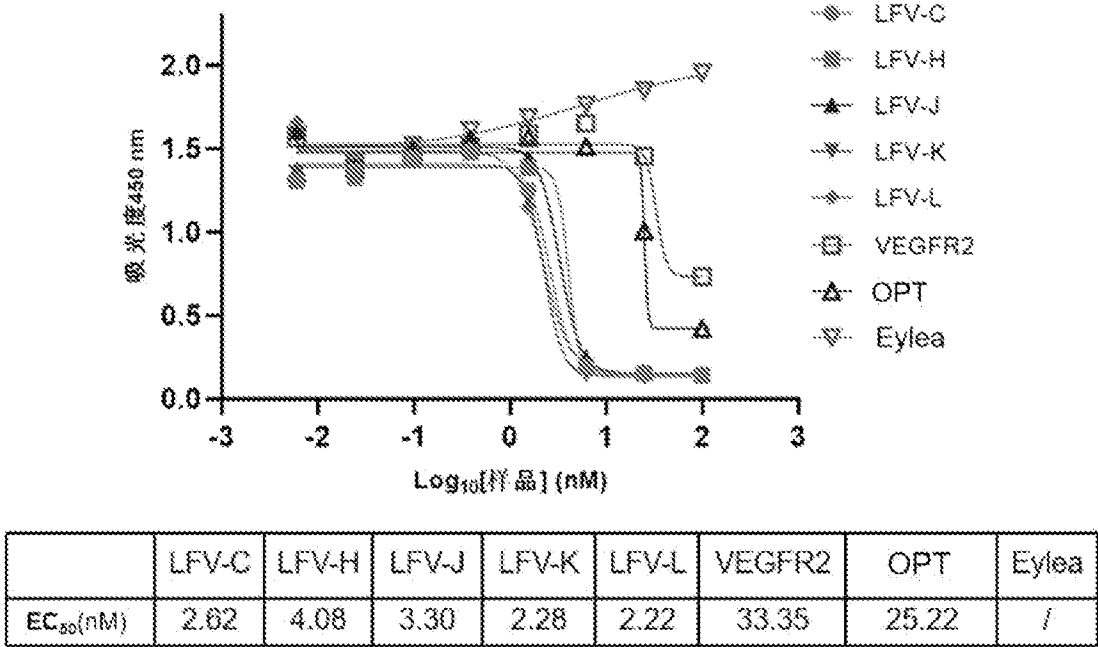


图 9d

对 VEGF-A 165-VEGFR2 的结合阻断结果

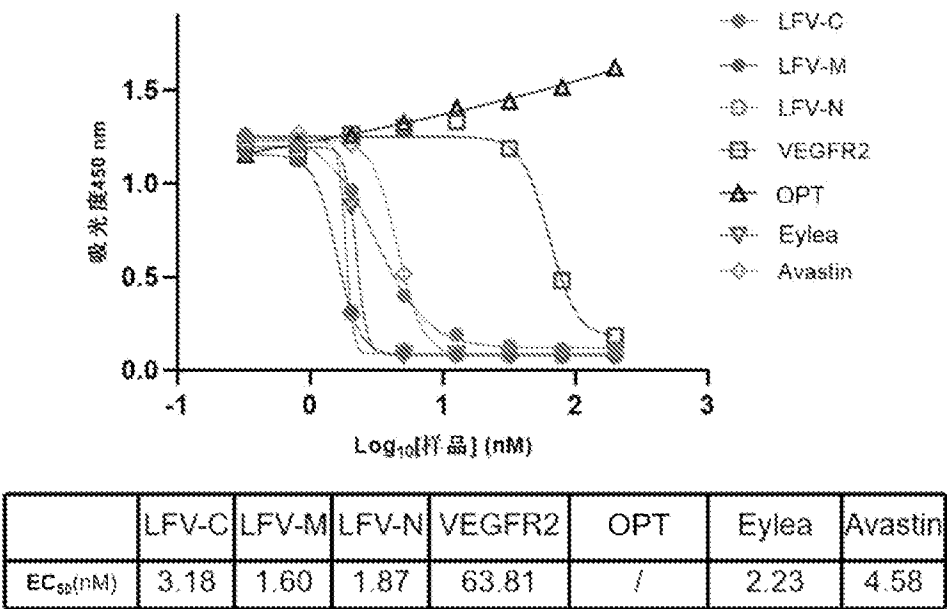


图 10a

对 VEGF-A 165-VEGFR1 的结合阻断结果

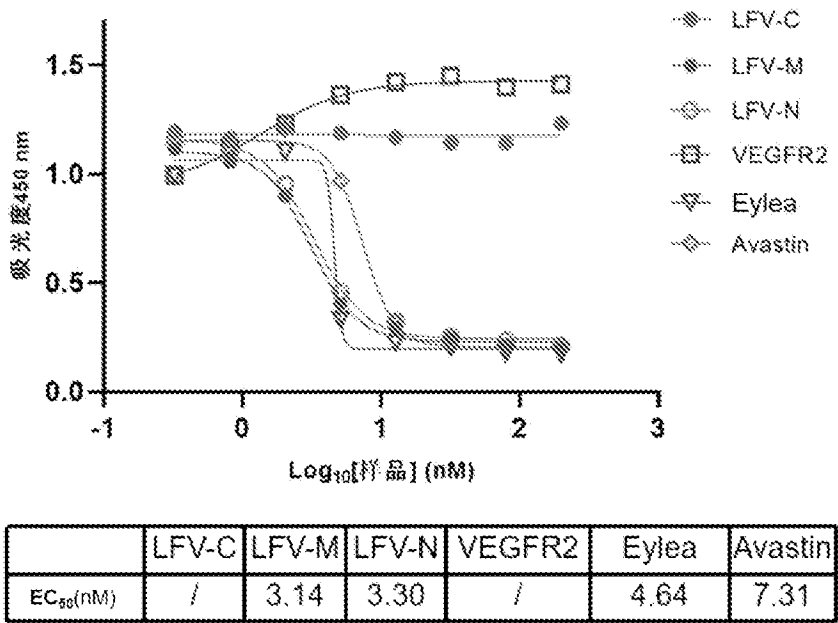


图 10b

对 VEGF C-VEGFR2 的结合阻断结果

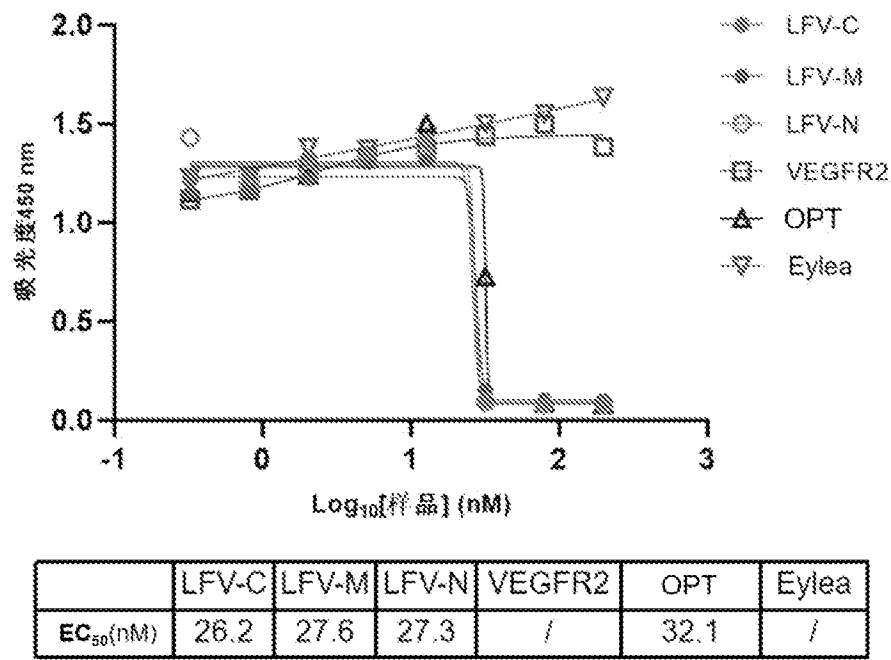


图 10c

对 VEGF D-VEGFR2 的结合阻断结果

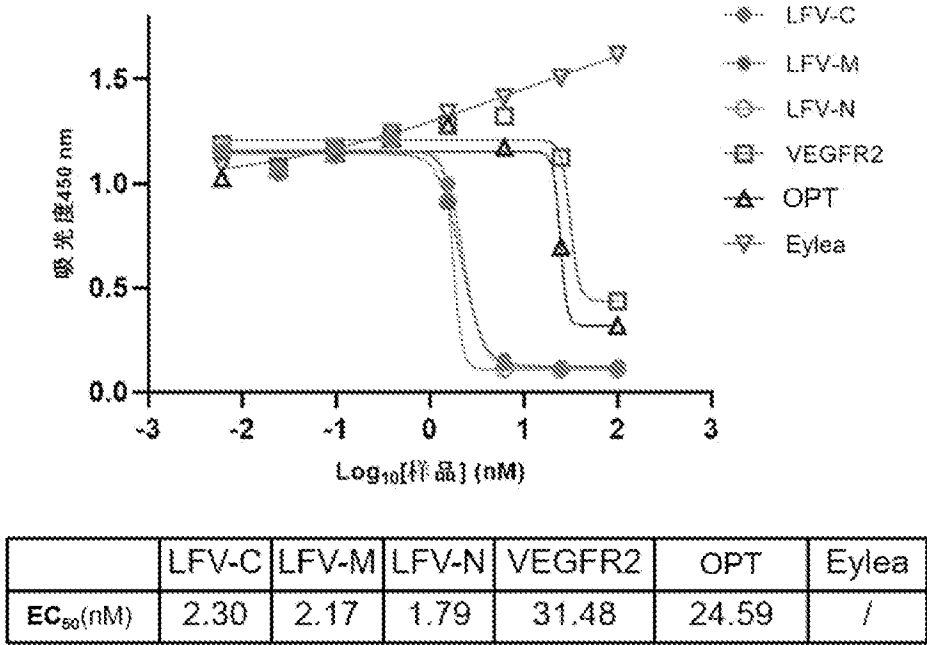


图 10d

对 VEGF D-VEGFR3 的结合阻断结果

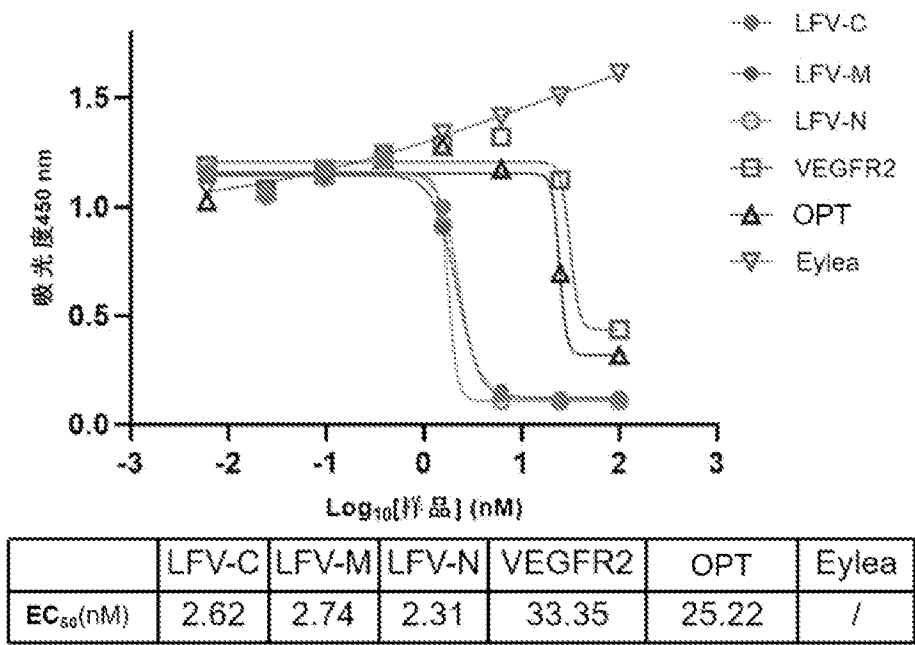


图 10e

对 VEGF-B 的结合结果

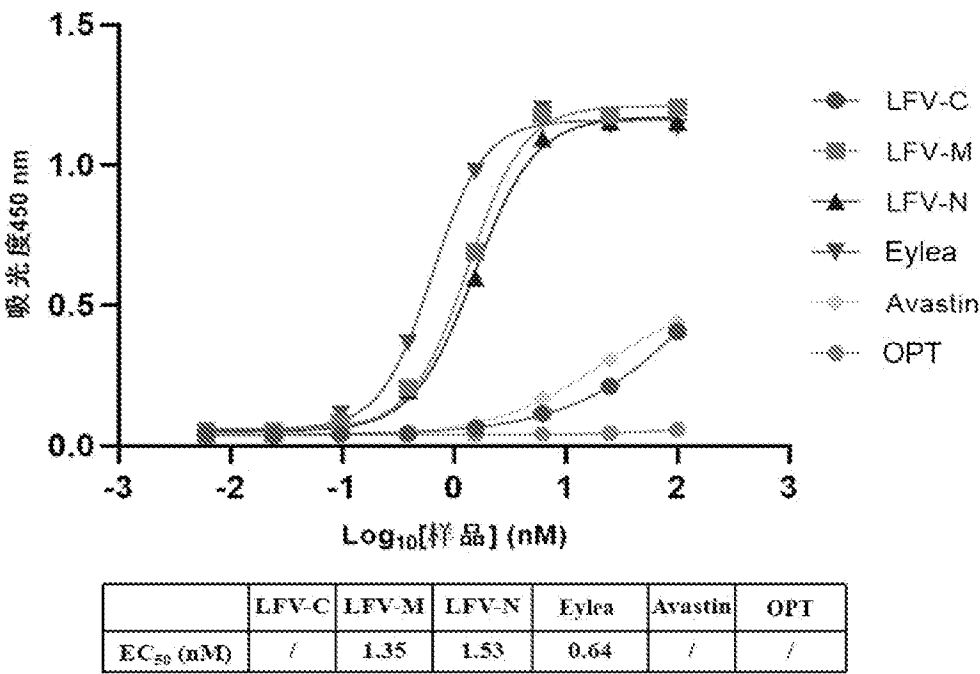


图 11a

对 PIGF 的结合结果

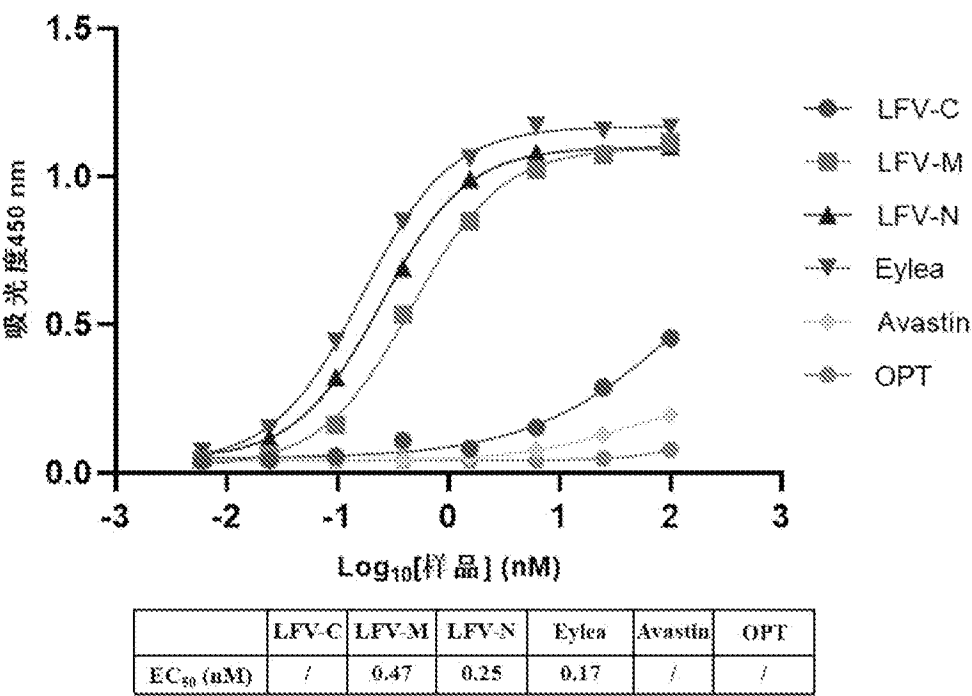


图 11b

对 VEGFA 165-VEGFR2 的结合阻断结果

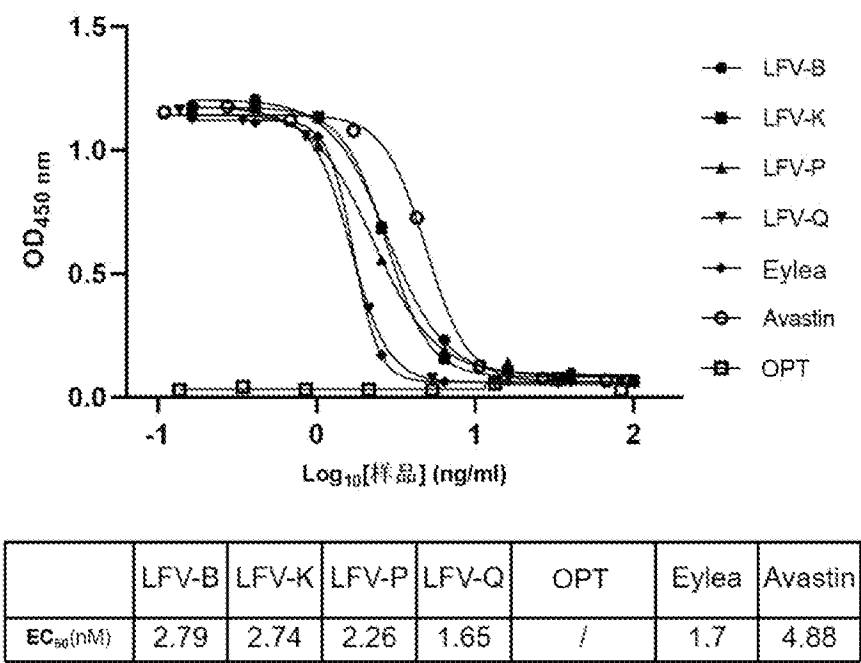


图 12a

对 VEGF C-VEGFR2 的结合阻断结果

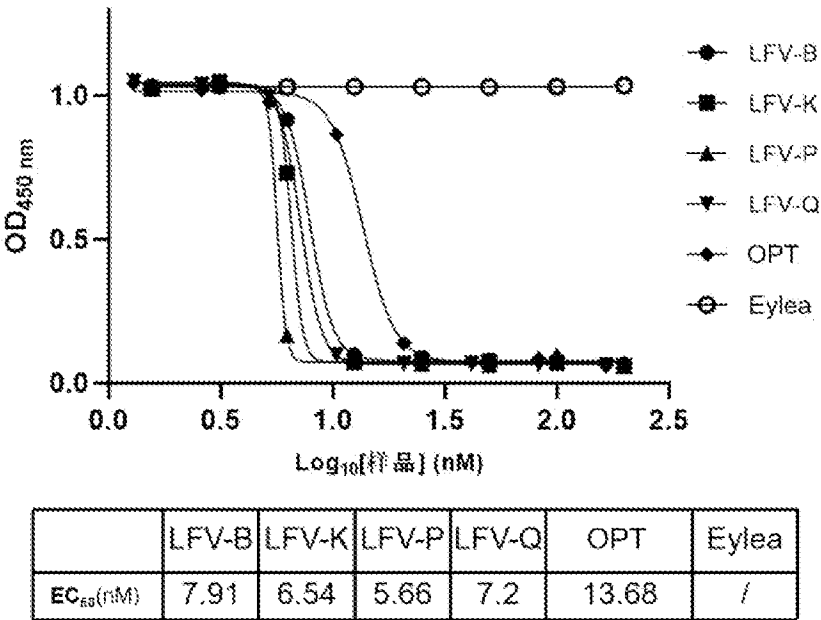


图 12b

对 VEGF D-VEGFR2 的结合阻断结果

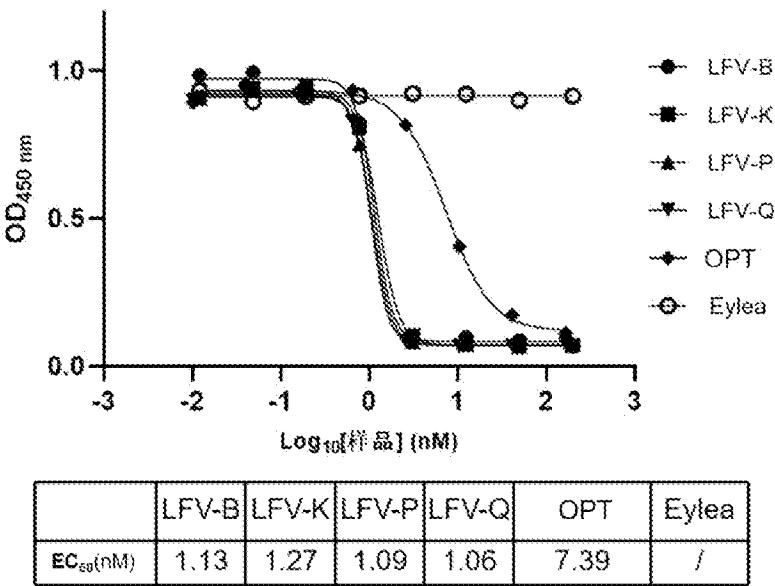


图 12c

对 VEGF-B 的结合结果

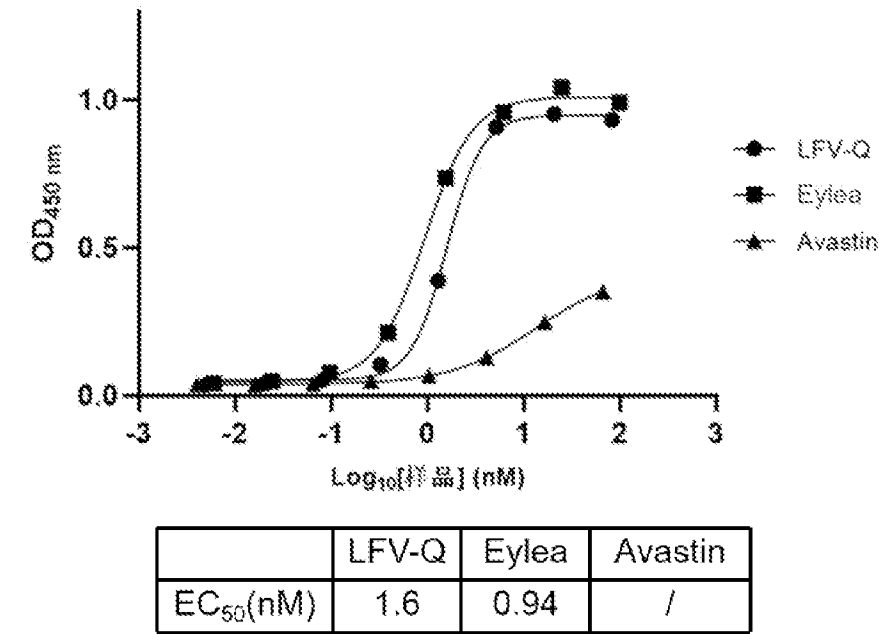


图 13a

对 PIGF 的结合结果

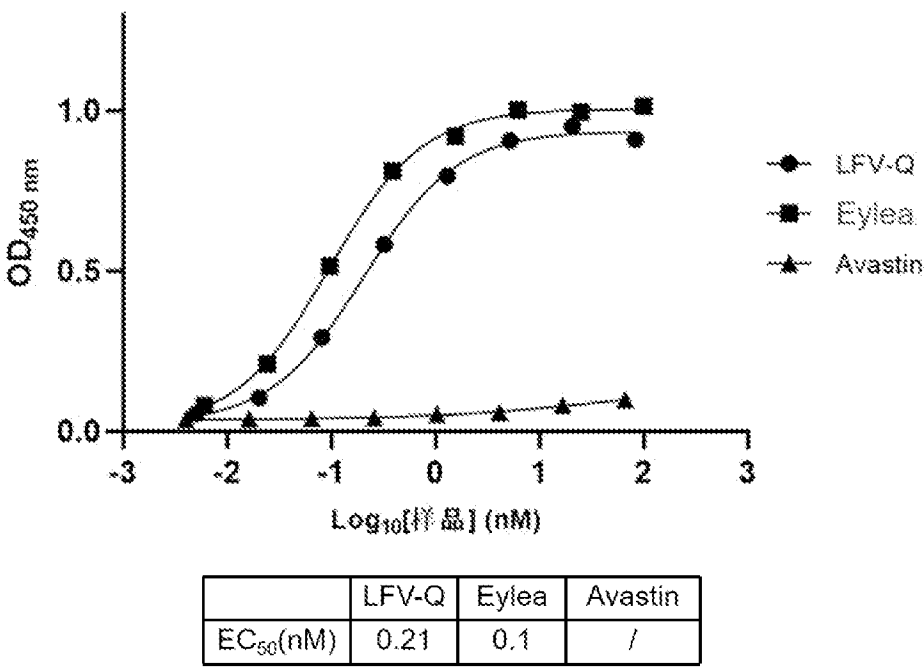


图 13b

LFV-M、LFV-R 的蛋白 A 一步纯化后的 SEC 检测数据

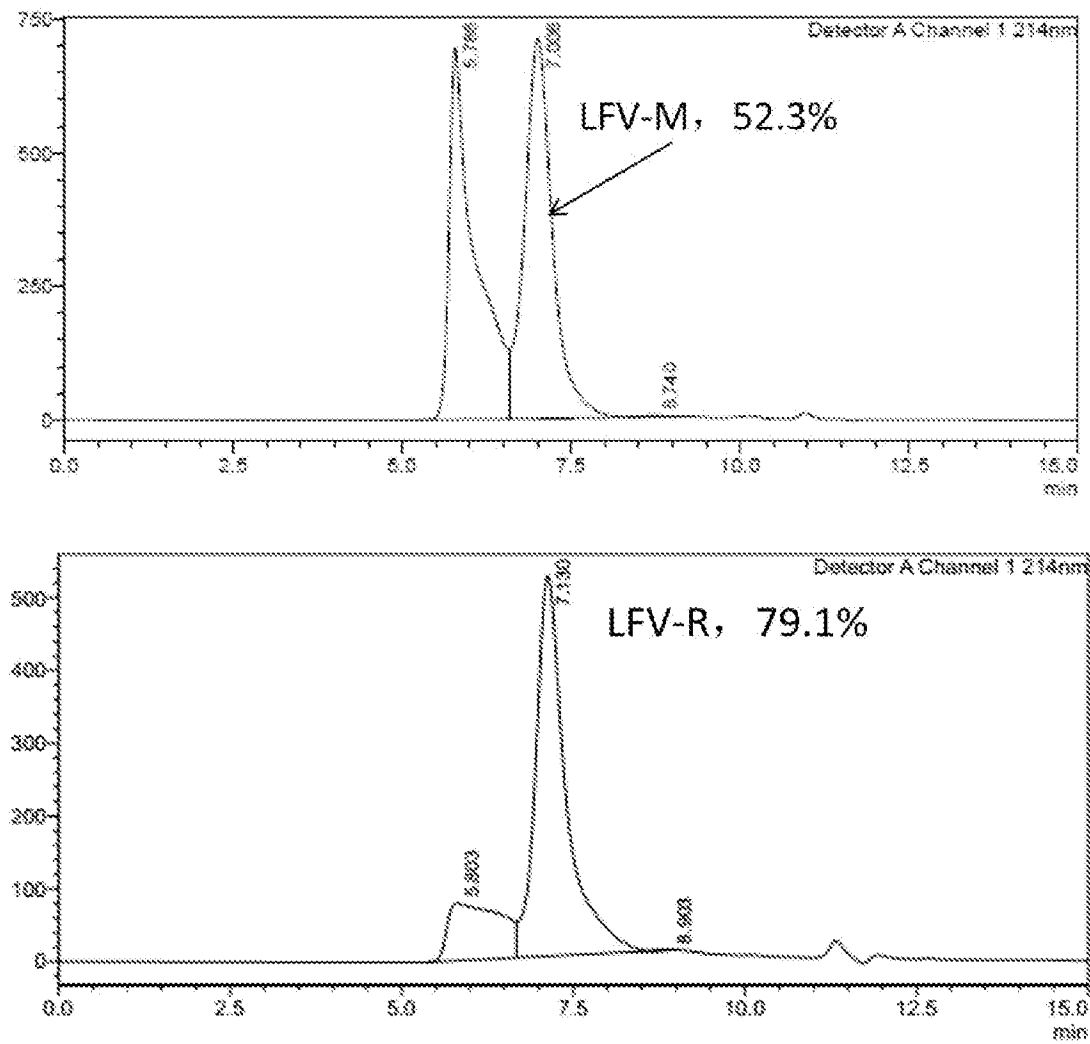
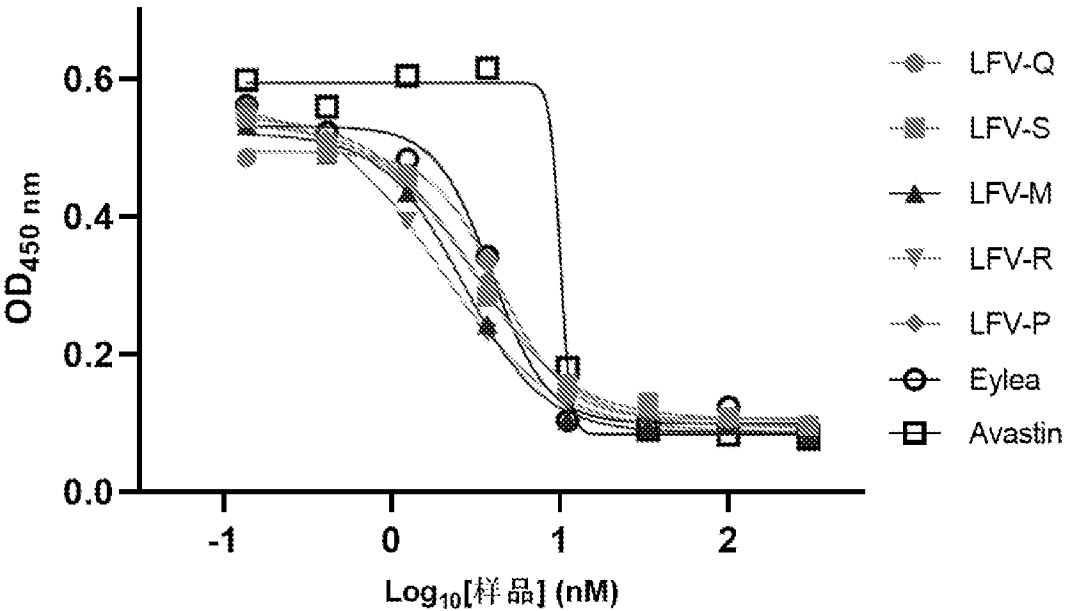


图 14

对 VEGF A 165-VEGFR2 的结合阻断结果



	LFV-Q	LFV-S	LFV-M	LFV-R	LFV-P	Eylea	Avastin
EC50(nM)	4.323	3.025	2.645	1.901	3.096	3.937	10.04

图 15a

对 VEGF A 165-VEGFR1 的结合阻断结果

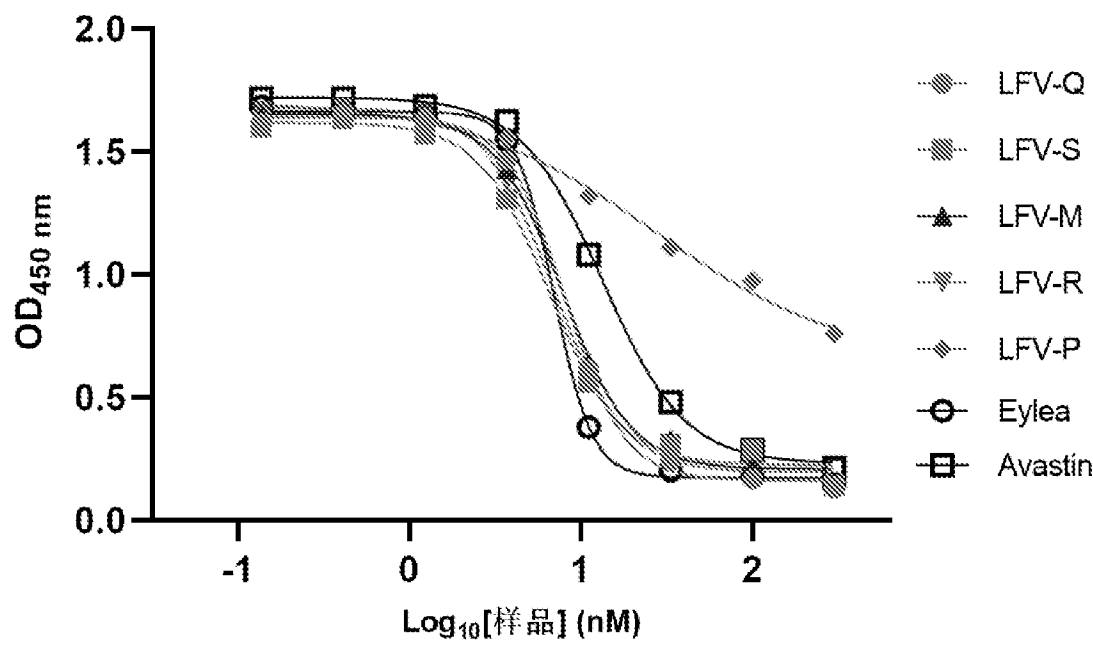


图 15b

对 VEGF C-VEGFR2 的结合阻断结果

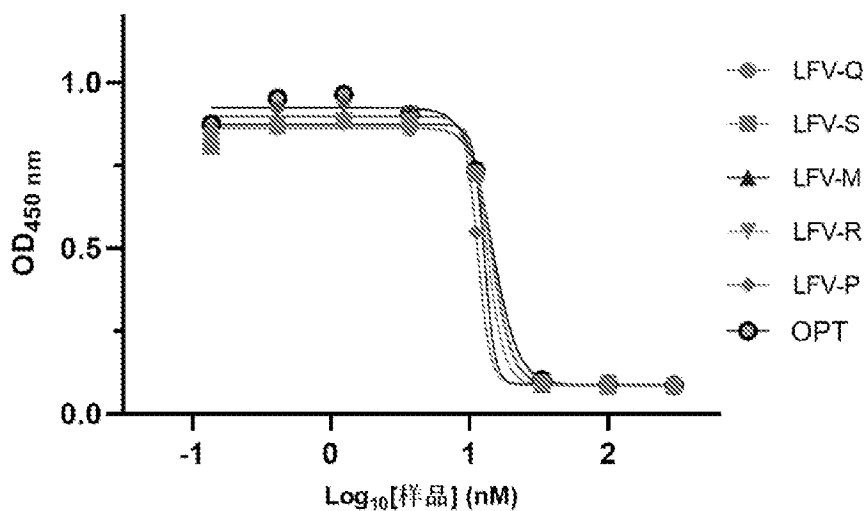


图 15c

对 VEGF D-VEGFR2 的结合阻断结果

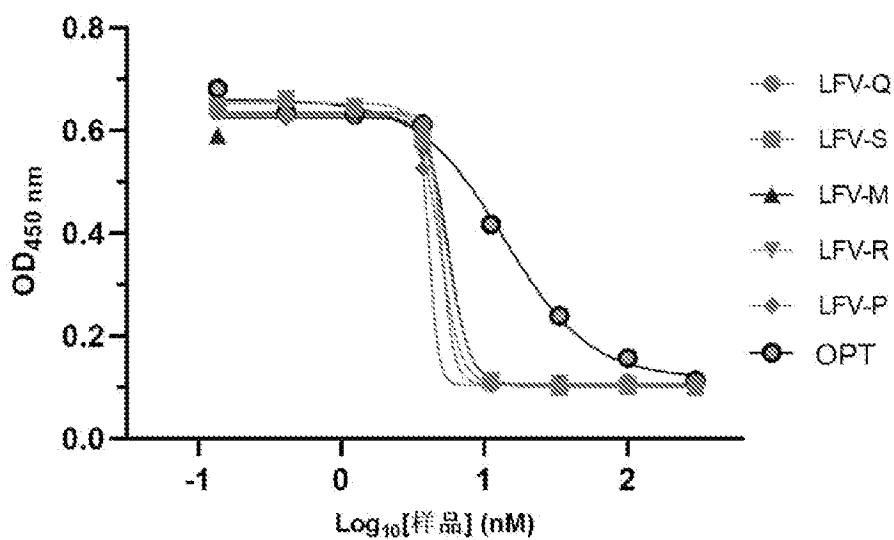


图 15d

对 VEGF-B 的结合结果

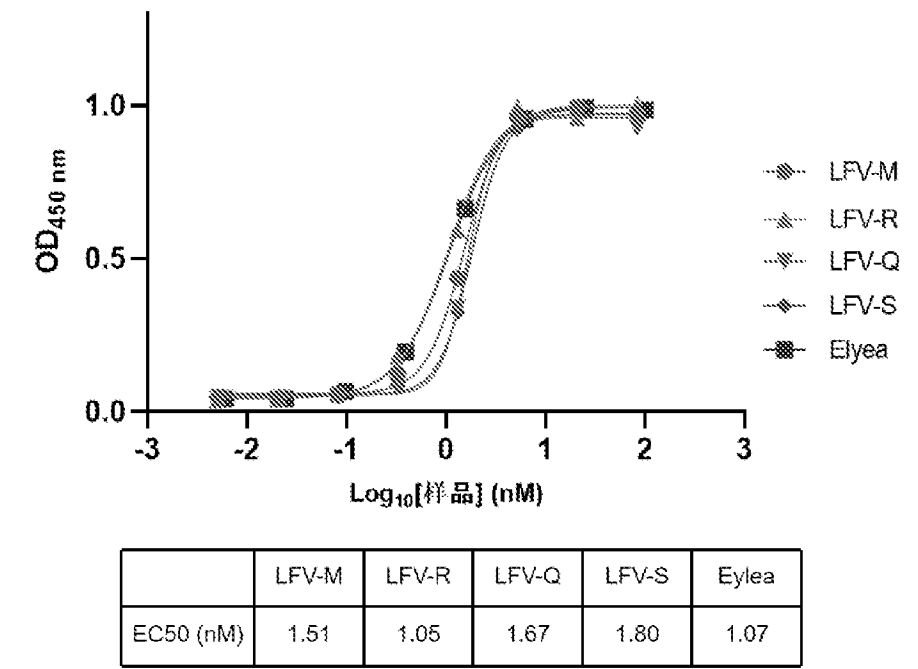


图 16a

对 PIGF 的结合结果

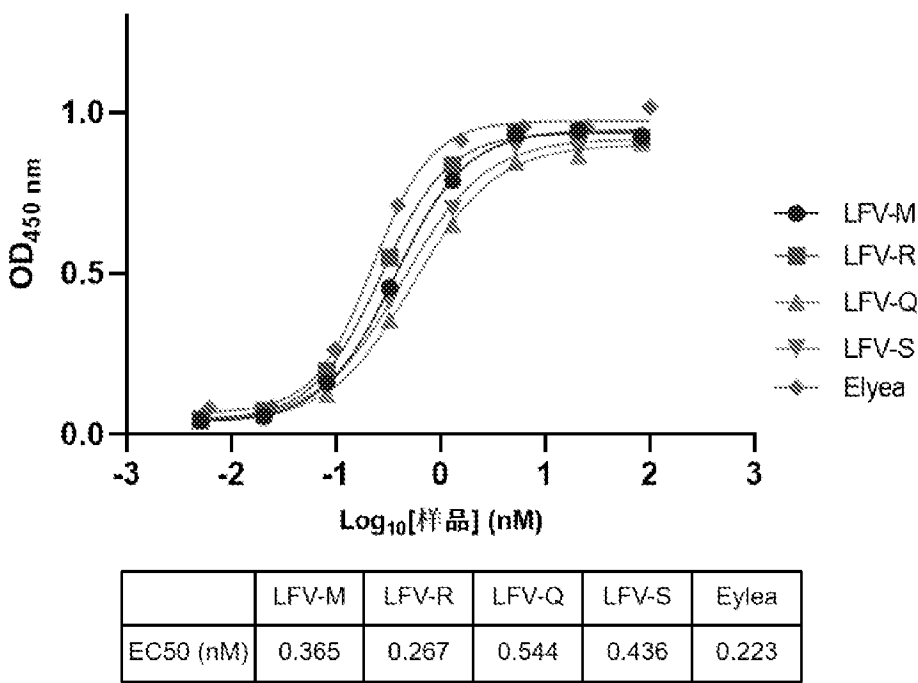
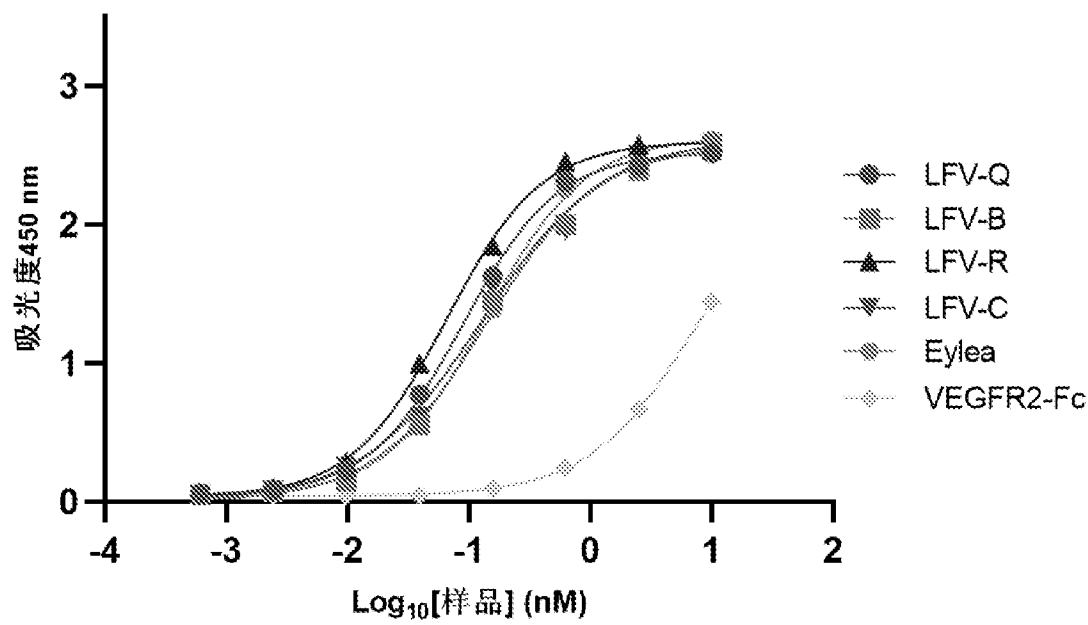


图 16b

对 VEGF-A 165 的 ELISA 结合实验



	LFV-Q	LFV-B	LFV-R	LFV-C	Eylea	VEGFR2-Fc
EC50 (nM)	0.089	0.139	0.065	0.128	0.138	7.791

图 17a

对 VEGF-C 的 ELISA 结合实验

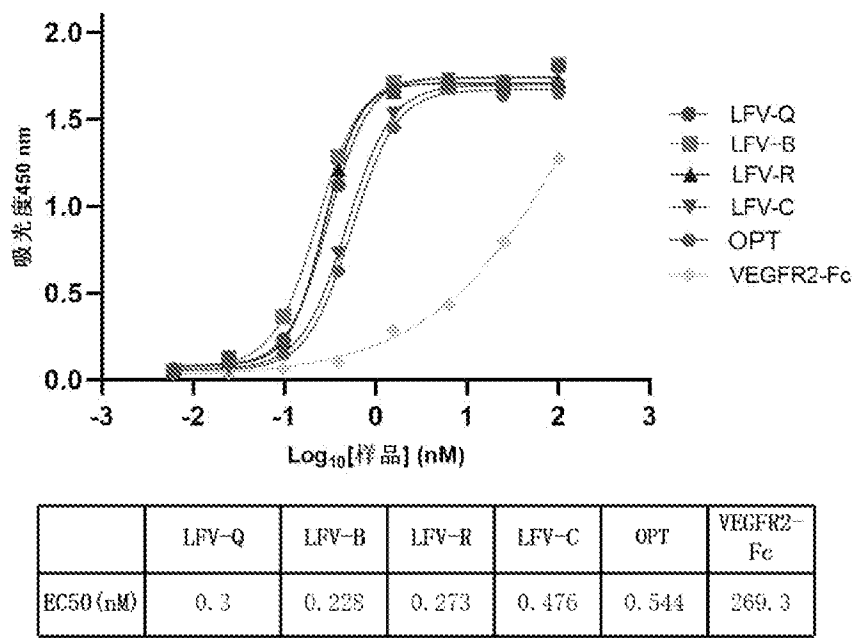


图 17b

对 VEGF-D 的 ELISA 结合实验

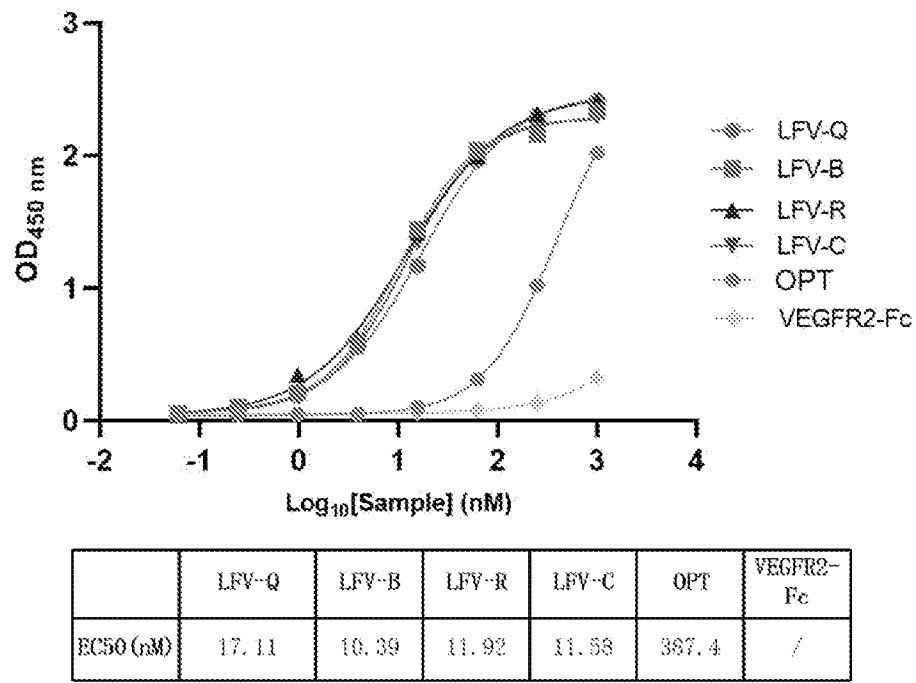


图 17c

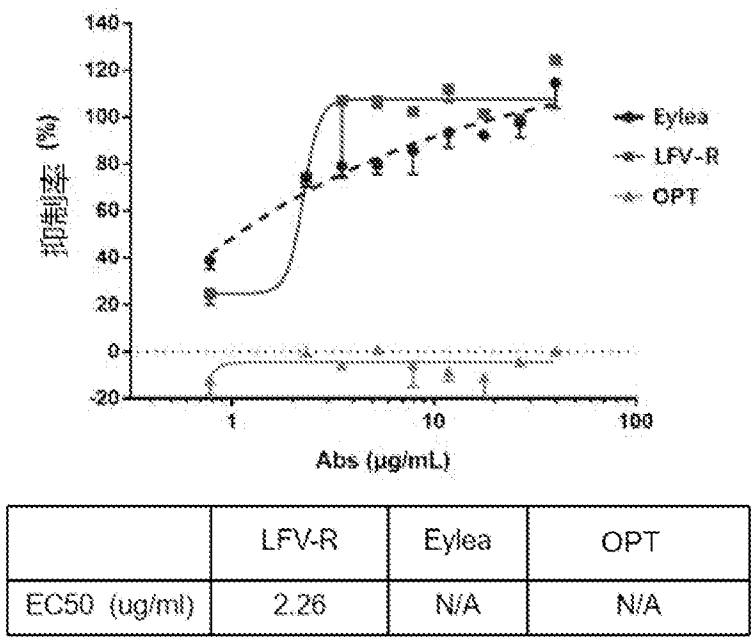


图 18a

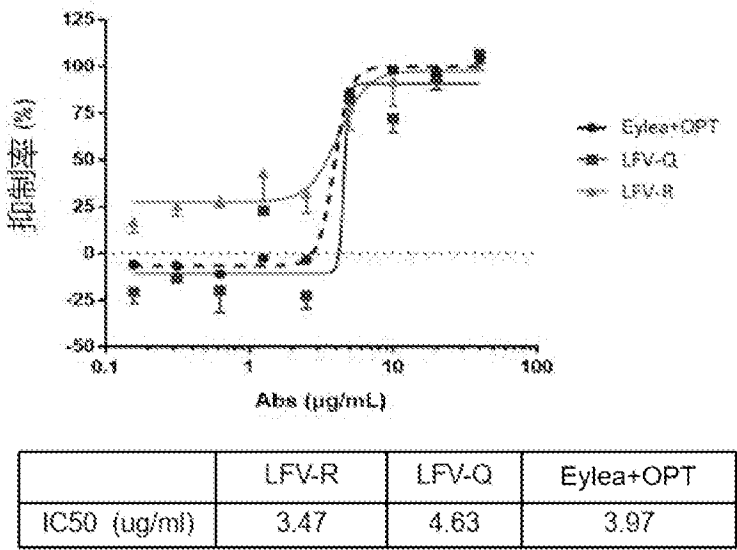


图 18b

给药第 18 天的四级荧光斑所占百分比的分析结果

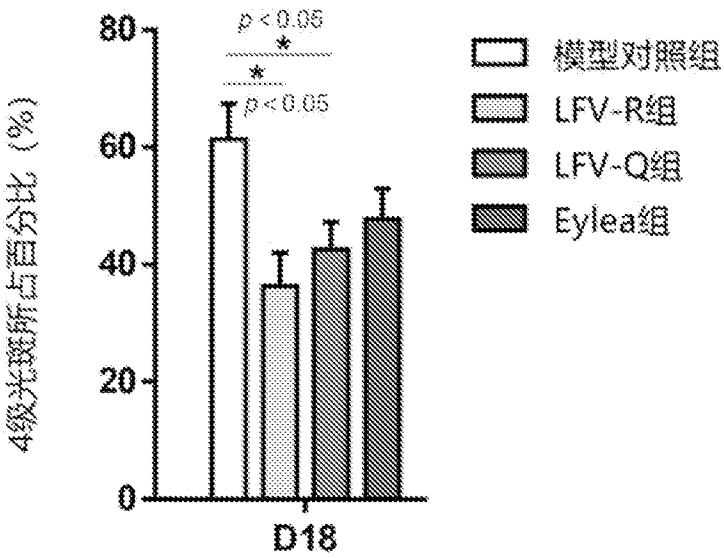


图 19a

给药第 18 天的荧光渗漏面积的分析结果

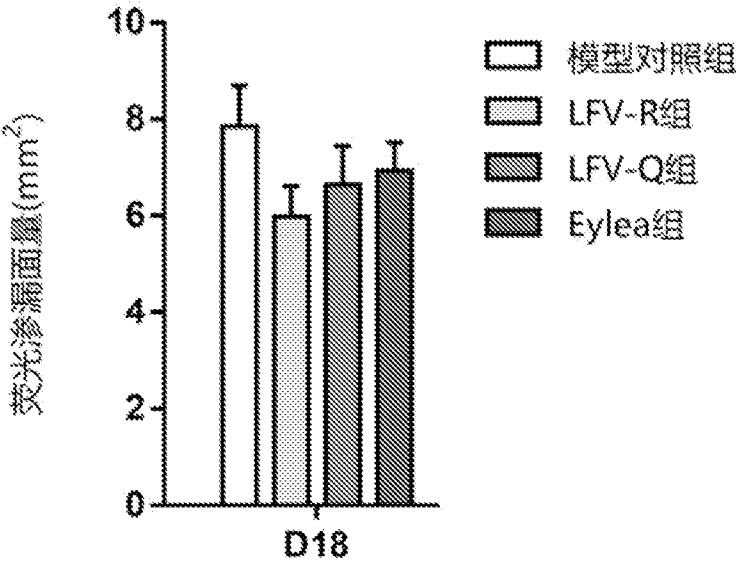


图 19b

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/132735

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 19/00(2006.01)i; C07K 14/71(2006.01)i; C12N 15/09(2006.01)i; A61K 38/17(2006.01)i; A61P 35/00(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)

CNABS, DWPI, SIPOABS, CNKI, NCBI, ISI Web of Science, GenBank, 中国专利生物序列检索系统, Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System: 血管内皮生长因子, 受体, 域, 免疫球蛋白, 样, vascular endothelial growth factor, receptor, VEGF, VEGFR, domain, immunoglobulin, ig, like, 本申请的SEQ ID NOs: 2, 4-15, 18, 32-59

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Sandra Markovic-Mueller, et al. "Structure of the Full-length VEGFR-1 Extracellular Domain in Complex with VEGF-A" <i>Structure</i> , Vol. 25, 07 February 2017 (2017-02-07), entire document, and in particular, p. 341, right-hand column, lines 27-30, p. 342, right-hand column, paragraph 3, p. 343, right-hand column, last paragraph, and abstract	1-17 (in part), 18, 19-30 (in part)
Y	Veli-Matti Leppänen, et al. "Structural determinants of growth factor binding and specificity by VEGF receptor 2" <i>PNAS</i> , Vol. 107, No. 6, 09 February 2010 (2010-02-09), entire document, and in particular, p. 2425, right-hand column, paragraph 3, p. 2426, left-hand column, paragraph 1, right-hand column, paragraph 2, and abstract	1-17 (in part), 18, 19-30 (in part)



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"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)

"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

"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

"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

"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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

07 December 2021

Date of mailing of the international search report

23 March 2022

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088, China

Authorized officer

Facsimile No. (86-10)62019451

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/132735

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 13*ter*.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 13*ter*.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.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:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/132735

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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: **1-17和19-30**
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:

[1] Claims 1-17 and 19-30 relate to a large number of possible compounds, violating the requirements of PCT Articles 5 and 6 for the reason that part of the sequence of SEQ ID NO: 2 that is sequence-defined in claim 1 may be derived from VEGFR1, and in combination with the definition of expressions such as "containing" and "deriving", novelty spillover is caused, and the specific examples disclosed in the description are far exceeded. The noncompliance on the substantive provisions has reached such an extent that when the extent of the search for claims 1-17 and 19-30 was determined, the noncompliance parts were taken into account before the search was performed. Therefore, the search for claims 1-17 and 19-30 was limited to an invention based on a hybrid or fusion peptide comprising domains in VEGFR1 and VEGFR2.
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).

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2021/132735

A. 主题的分类

C07K 19/00(2006.01)i; C07K 14/71(2006.01)i; C12N 15/09(2006.01)i; A61K 38/17(2006.01)i; A61P 35/00(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))

CNABS, DWPI, SIPOABS, CNKI, NCBI, ISI Web of Science, GenBank, 中国专利生物序列检索系统:血管内皮生长因子, 受体, 域, 免疫球蛋白, 样, vascular endothelial growth factor, receptor, VEGF, VEGFR, domain, immunoglobulin, ig, like, 本申请的SEQ ID NOs: 2, 4-15, 18, 32-59

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	Sandra Markovic-Mueller, 等. "Structure of the Full-length VEGFR-1 Extracellular Domain in Complex with VEGF-A" Structure, 第25卷, 2017年2月7日 (2017 - 02 - 07), 全文, 尤其是第341页右栏第27-30行, 第342页右栏第3段, 第343页右栏最后一段和摘要	1-17(部分), 18, 19-30(部分)
Y	Veli-Matti Leppänen, 等. "Structural determinants of growth factor binding and specificity by VEGF receptor 2" PNAS, 第107卷, 第6期, 2010年2月9日 (2010 - 02 - 09), 全文, 尤其是第2425页右栏第三段, 第2426页左栏第一段, 右栏第二段和摘要	1-17(部分), 18, 19-30(部分)

☐ 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

2021年12月7日

国际检索报告邮寄日期

2022年3月23日

ISA/CN的名称和邮寄地址

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

传真号 (86-10)62019451

授权官员

吴永庆

电话号码 +86-10-62089161

第I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：
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
2. ☒ 权利要求： 1-17和19-30
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：
[1] 权利要求1-17和19-30涉及极大数量的可能的化合物，违反了《PCT条约》第5条和第6条的要求，因为权利要求1中以序列限定的SEQ ID NO: 2部分序列可以来源于VEGFR1，结合“包含”和“衍生”等措辞的限定，导致了新颖性溢出，也远远超出说明书中公开的具体实例。对实质规定的不遵从到了如此程度，使得在确定权利要求1-17和19-30的检索程度时，考虑了不遵从的部分，才进行检索。所以，权利要求1-17和19-30的检索限制到基于包含VEGFR1和VEGFR2中的结构域的杂合或融合肽的发明。
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。