



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117279941 A

(43) 申请公布日 2023. 12. 22

(21) 申请号 202280029374.9

(22) 申请日 2022.02.18

(30) 优先权数据
10202101681W 2021.02.19 SG

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2023.10.18

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2022/054137 2022.02.18

(87) PCT国际申请的公布数据
W02022/175481 EN 2022.08.25

(71) 申请人 多特生物私人有限公司
地址 新加坡新加坡城

(72) 发明人 雅思杰

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100

专利代理师 韦东

(51) Int.Cl.
C07K 16/22 (2006.01)

权利要求书4页 说明书51页 附图24页

(54) 发明名称

VEGFA结合分子

(57) 摘要

公开了VEGFA结合分子。还公开了编码VEGFA结合分子的核酸和表达载体、包含该VEGFA结合分子的组合物和使用该方法。

CDR-1															
序列编号(1)	C	A	I	S	G	F	N	I	K	D	T	Y	I	D	W
模板(1)	S/C	A	I	S	G	F	S	S	S	S	S	I	D	W	
文库1	S	A	I	S	G	F	Xaa	F/L/I/V	Xaa	Xaa	T	Xaa	I	D	W
文库2	C	A	I	S	G	F	Xaa	F/L/I/V	Xaa	Xaa	T	Xaa	I	D	W

CDR-2															
序列编号(1)	A	R	I	Y	P	T	N	G	Y	T	R	Y	A	D	
模板(1)	A	R	I	S	P	S	S	S	T	S	Y	A	D		
文库1	A	R	I	Xaa	P	Xaa	Xaa	G	Xaa	T	Xaa	Y	A	D	
文库2	A	R	I	Xaa	P	Xaa	Xaa	G	Xaa	T	Xaa	Y	A	D	

CDR-3															
序列编号(1)	C	S	R	W	G	G	D	F	Y	A		M		D	
模板(1)	T/C	G	R	S	S	S	-	-	-	A		M		D	
文库1	T	G/V	R		Xaa (6-20个氨基酸残基)					A/G		M/F/L/I/V		D	

1. 一种结合VEGFA的任选分离的抗原结合分子,其中所述抗原结合分子包含含有以下CDRs的单域抗体序列:

具有SEQ ID NO:45的氨基酸序列的CDR1

具有SEQ ID NO:46的氨基酸序列的CDR2

具有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的CDR3。

2. 根据权利要求1所述的抗原结合分子,其中所述抗原结合分子包含与SEQ IDNO:49的氨基酸序列具有至少70%序列同一性的氨基酸序列或由其组成。

3. 根据权利要求1或2所述的抗原结合分子,其特征在于,所述抗原结合分子包含含有以下FRs的单域抗体序列:

具有SEQ ID NO:40的氨基酸序列的FR1

具有SEQ ID NO:41的氨基酸序列的FR2

具有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的FR3

具有SEQ ID NO:44的氨基酸序列的FR4。

4. 根据权利要求1至3任一项所述的抗原结合分子,其特征在于,所述抗原结合分子包含含有以下CDRs的单域抗体序列:

具有SEQ ID NO:50的氨基酸序列的CDR1

具有SEQ ID NO:51的氨基酸序列的CDR2

具有SEQ ID NO:52的氨基酸序列的CDR3。

5. 根据权利要求1至4任一项所述的抗原结合分子,其中所述抗原结合分子包含与SEQ ID NO:53的氨基酸序列具有至少70%序列同一性的氨基酸序列或由其组成。

6. 根据权利要求1至5任一项所述的抗原结合分子,其中所述抗原结合分子包含:

(i) 含有以下CDRs的单域抗体序列:

具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的CDR1

具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的CDR2

具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的CDR3;或者

(ii) 含有以下CDRs的单域抗体序列:

具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的CDR1

具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的CDR2

具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的CDR3;或者

(iii) 含有以下CDRs的单域抗体序列:

具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的CDR1

具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的CDR2

具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的CDR3。

7. 根据权利要求1至6任一项所述的抗原结合分子,其中所述抗原结合分子包含与SEQ ID NO:16,5或12的氨基酸序列具有至少70%序列同一性的氨基酸序列或由其组成。

8. 如权利要求1至3任一项所述的抗原结合分子,其特征在于,所述抗原结合分子包含含有以下CDRs的单域抗体序列:

具有SEQ ID NO:54的氨基酸序列的CDR1

具有SEQ ID NO:55的氨基酸序列的CDR2

具有SEQ ID NO:56的氨基酸序列的CDR3。

9.根据权利要求1至3任一项或权利要求8所述的抗原结合分子,其中所述抗原结合分子包含与SEQ ID NO:57的氨基酸序列具有至少70%序列同一性的氨基酸序列或由其组成。

10.根据权利要求1至3任一项,权利要求8或权利要求9所述的抗原结合分子,其中所述抗原结合分子包含:

(i) 含有以下CDRs的单域抗体序列:

具有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的CDR1

具有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的CDR2

具有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的CDR3;或者

(ii) 含有以下CDRs的单域抗体序列:

具有SEQ ID NO:25的氨基酸序列的CDR1

具有SEQ ID NO:26的氨基酸序列的CDR2

具有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的CDR3;或者

(iii) 含有以下CDRs的单域抗体序列:

具有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的CDR1

具有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的CDR2

具有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的CDR3;或者

(iv) 含有以下CDRs的单域抗体序列:

具有SEQ ID NO:33的氨基酸序列的CDR1

具有SEQ ID NO:34的氨基酸序列的CDR2

具有SEQ ID NO:35的氨基酸序列的CDR3;或者

(v) 含有以下的CDRs单域抗体序列:

具有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的CDR1

具有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的CDR2

具有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的CDR3。

11.根据权利要求1至3任一项或权利要求8-10任一项所述的抗原结合分子,其中所述抗原结合分子包含与SEQ ID NO:20,24,28,32或36的氨基酸序列具有至少70%序列同一性的氨基酸序列或由其组成。

12.如权利要求1至3任一项所述的抗原结合分子,其特征在于,所述抗原结合分子包含含有以下CDRs的单域抗体序列:

具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDR1

具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDR2

具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的CDR3。

13.根据权利要求1至3任一项或权利要求12所述的抗原结合分子,其中所述抗原结合分子包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少70%序列同一性的氨基酸序列或由其组成。

14.如权利要求1至3任一项所述的抗原结合分子,其特征在于,所述抗原结合分子包含含有以下CDRs的单域抗体序列:

具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDR1

具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的CDR2

具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的CDR3。

15.根据权利要求1至3任一项或权利要求14所述的抗原结合分子,其中所述抗原结合分子包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少70%序列同一性的氨基酸序列或由其组成。

16.如权利要求1至13任一项所述的抗原结合分子,其特征在于,所述抗原结合分子包含含有以下FRs的单域抗体序列:

具有SEQ ID NO:40的氨基酸序列的FR1

具有SEQ ID NO:41的氨基酸序列的FR2

具有SEQ ID NO:42的氨基酸序列的FR3

具有SEQ ID NO:44的氨基酸序列的FR4。

17.如权利要求1至3任一项,权利要求15或权利要求16所述的抗原结合分子,其特征在于,所述抗原结合分子包含含有以下FRs的单域抗体序列:

具有SEQ ID NO:40的氨基酸序列的FR1

具有SEQ ID NO:41的氨基酸序列的FR2

具有SEQ ID NO:43的氨基酸序列的FR3

具有SEQ ID NO:44的氨基酸序列的FR4。

18.根据权利要求1至17任一项所述的抗原结合分子,其特征在于,所述抗原结合分子抑制VEGFA与VEGFR的相互作用。

19.根据权利要求1至18任一项所述的抗原结合分子,其特征在于,所述抗原结合分子是多特异性抗原结合分子,其还具有对VEGFA以外的靶抗原具有特异性的抗原结合结构域。

20.一种嵌合抗原受体(CAR),其包含根据权利要求1至19任一项所述的抗原结合分子。

21.任选分离的核酸,其编码根据权利要求1至19任一项所述的抗原结合分子,或根据权利要求20所述的CAR。

22.一种包含根据权利要求21所述的核酸的表达载体。

23.一种细胞,其包含根据权利要求1至19任一项所述的抗原结合分子,根据权利要求20所述的CAR,根据权利要求21所述的核酸或根据权利要求22所述的表达载体。

24.一种产生与VEGFA结合的抗原结合分子的方法,包括在适合于细胞表达抗原结合分子或CAR的条件下培养根据权利要求23所述的细胞。

25.一种组合物,其包含根据权利要求1至19任一项所述的抗原结合分子,根据权利要求20所述的CAR,根据权利要求21所述的核酸,根据权利要求22所述的表达载体或根据权利要求23所述的细胞,以及药学上可接受的载体、稀释剂、赋形剂或佐剂。

26.根据权利要求1至19任一项所述的抗原结合分子,根据权利要求20所述的CAR,根据权利要求21所述的核酸,根据权利要求22所述的表达载体,根据权利要求23所述的细胞,或根据权利要求25所述的组合物,用于医学治疗或预防的方法。

27.根据权利要求1至19任一项所述的抗原结合分子,根据权利要求20所述的CAR,根据权利要求21所述的核酸,根据权利要求22所述的表达载体,根据权利要求23所述的细胞,或根据权利要求25所述的组合物,用于治疗或预防VEGFA/VEGFR介导的信号传导与病理有关的疾病的方法。

28. 根据权利要求1至19任一项所述的抗原结合分子, 根据权利要求20所述的CAR, 根据权利要求21所述的核酸, 根据权利要求22所述的表达载体, 根据权利要求23所述的细胞, 或根据权利要求25所述的组合物, 用于制备用于治疗或预防VEGFA/VEGFR介导的信号传导与病理有关的疾病的药物。

29. 一种治疗或预防VEGFA/VEGFR介导的信号传导与病理有关的疾病的方法, 包括向受试者施用治疗或预防有效量的根据权利要求1至19任一项所述的抗原结合分子, 根据权利要求20所述的CAR, 根据权利要求21所述的核酸, 根据权利要求22所述的表达载体, 根据权利要求23所述的细胞, 或根据权利要求25所述的组合物。

30. 根据权利要求27所述的抗原结合分子、CAR、核酸、表达载体、细胞或组合物的用途, 根据权利要求28所述的用途或根据权利要求29所述的方法, 其中所述疾病选自: 以病理性血管生成为特征的疾病、癌症、表达VEGFA的癌症、表达VEGFR的癌症、眼部疾病、视网膜病、糖尿病性视网膜病、黄斑变性、年龄相关性黄斑变性、湿性年龄相关性黄斑变性、视网膜静脉阻塞、近视性脉络膜新生血管形成、早产儿视网膜病变、新生血管性青光眼、中心性浆液性脉络膜视网膜病变、眼部肿瘤、角膜新生血管形成、炎症性疾病、自身免疫性疾病、关节炎、类风湿性关节炎、骨关节炎、银屑病、多发性硬化症、败血症、运动神经元疾病和肌萎缩侧索硬化症。

31. 一种任选分离的体外复合物, 其包含与VEGFA结合的根据权利要求1至19中任一项所述的抗原结合分子。

32. 一种检测样品中VEGFA的方法, 包括将含有或怀疑含有VEGFA的样品与根据权利要求1至19任一项所述的抗原结合分子接触, 并检测抗原结合分子与VEGFA复合物的形成。

33. 根据权利要求1至19任一项所述的抗原结合分子在用于检测、定位或成像VEGFA或包含或表达VEGFA的细胞的方法中的用途。

34. 一种选择或分类受试者以使用VEGFA靶向剂治疗的方法, 该方法包括在体外使来自受试者的样品与根据权利要求1至19任一项所述的抗原结合分子接触, 并检测抗原结合分子与VEGFA的复合物的形成。

35. 根据权利要求1至19任一项所述的抗原结合分子作为体外或体内诊断试剂或预后试剂的用途。

36. 根据权利要求1至19任一项所述的抗原结合分子在用于检测、定位或成像以表达VEGFA为特征的疾病/病症的方法中的用途。

VEGFA结合分子

[0001] 本申请要求2022年2月19日提交的SG 10202101681 W的优先权,其内容和元素出于所有目的通过引用并入本文。

技术领域

[0002] 本公开涉及分子生物学领域,更具体地涉及抗原结合分子技术。本发明还涉及医学治疗和预防的方法。

背景技术

[0003] 抗VEGF疗法可用于治疗多种疾病,特别是在肿瘤学和眼科领域(1-3)。由于其尺寸小和模块化,开发针对VEGF靶点的人源化和稳定的抗体结构域是可取的。眼科应用需要小尺寸和高稳定性,因为这可以使药物实现局部递送(4,5)。模块化,即结构域抗体自主折叠并与其他结构域抗体或其他蛋白质融合而不损害其完整的能力,对于多价和多特异性分子的开发是非常需要的。事实上,它通过将抗体结构域串联融合到单克隆抗体或任何其他融合蛋白,简化了提高效价和特异性的过程(6-8)。

发明内容

[0004] 在第一方面,本公开提供了一种抗原结合分子,任选地为分离的,其结合VEGFA,所述抗原结合分子包含含有以下CDRs的单域抗体序列:

[0005] 具有SEQ ID NO:45的氨基酸序列的CDR1,

[0006] 具有SEQ ID NO:46的氨基酸序列的CDR2,

[0007] 具有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的CDR3。

[0008] 在一些实施方案中,所述抗原结合分子包含与SEQ ID NO:49的氨基酸序列具有至少70%序列同一性的氨基酸序列或由其组成。

[0009] 在一些实施方案中,所述抗原结合分子包含含有以下FRs的单域抗体序列:

[0010] 具有SEQ ID NO:40的氨基酸序列的FR1,

[0011] 具有SEQ ID NO:41的氨基酸序列的FR2,

[0012] 具有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的FR3,

[0013] 具有SEQ ID NO:44的氨基酸序列的FR4。

[0014] 在一些实施方案中,所述抗原结合分子包含含有以下CDRs的单域抗体序列:

[0015] 具有SEQ ID NO:50的氨基酸序列的CDR1,

[0016] 具有SEQ ID NO:51的氨基酸序列的CDR2,

[0017] 具有SEQ ID NO:52的氨基酸序列的CDR3。

[0018] 在一些实施方案中,所述抗原结合分子包含与SEQ ID NO:53的氨基酸序列具有至少70%序列同一性的氨基酸序列或由其组成。

[0019] 在一些实施方案中,所述抗原结合分子包含:

[0020] (i) 含有以下CDRs的单域抗体序列:

- [0021] 具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的CDR1,
- [0022] 具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的CDR2,
- [0023] 具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的CDR3;或者
- [0024] (ii) 含有以下CDRs的单域抗体序列:
- [0025] 具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的CDR1,
- [0026] 具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的CDR2,
- [0027] 具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的CDR3;或者
- [0028] (iii) 含有以下CDRs的单域抗体序列:
- [0029] 具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的CDR1,
- [0030] 具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的CDR2,
- [0031] 具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的CDR3。
- [0032] 在一些实施方案中,所述抗原结合分子包含与SEQ ID NO:16,5或12的氨基酸序列具有至少70%序列同一性的氨基酸序列或由其组成。
- [0033] 在一些实施方案中,所述抗原结合分子包含含有以下CDRs的单域抗体序列:
- [0034] 具有SEQ ID NO:54的氨基酸序列的CDR1,
- [0035] 具有SEQ ID NO:55的氨基酸序列的CDR2,
- [0036] 具有SEQ ID NO:56的氨基酸序列的CDR3。
- [0037] 在一些实施方案中,所述抗原结合分子包含与SEQ ID NO:57的氨基酸序列具有至少70%序列同一性的氨基酸序列或由其组成。
- [0038] 在一些实施方案中,所述抗原结合分子包含:
- [0039] (i) 含有以下CDRs的单域抗体序列:
- [0040] 具有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的CDR1,
- [0041] 具有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的CDR2,
- [0042] 具有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的CDR3;或者
- [0043] (ii) 含有以下CDRs的单域抗体序列:
- [0044] 具有SEQ ID NO:25的氨基酸序列的CDR1,
- [0045] 具有SEQ ID NO:26的氨基酸序列的CDR2,
- [0046] 具有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的CDR3;或者
- [0047] (iii) 含有以下CDRs的单域抗体序列:
- [0048] 具有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的CDR1,
- [0049] 具有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的CDR2,
- [0050] 具有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的CDR3;或者
- [0051] (iv) 含有以下CDRs的单域抗体序列:
- [0052] 具有SEQ ID NO:33的氨基酸序列的CDR1,
- [0053] 具有SEQ ID NO:34的氨基酸序列的CDR2,
- [0054] 具有SEQ ID NO:35的氨基酸序列的CDR3;或者
- [0055] (v) 含有以下CDRs的单域抗体序列:
- [0056] 具有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的CDR1,
- [0057] 具有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的CDR2,

- [0058] 具有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的CDR3。
- [0059] 在一些实施方案中,所述抗原结合分子包含与SEQ ID NO:20,24,28,32或36的氨基酸序列具有至少70%序列同一性的氨基酸序列或由其组成。
- [0060] 在一些实施方案中,所述抗原结合分子包含含有以下CDRs的单域抗体序列:
- [0061] 具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDR1,
- [0062] 具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDR2,
- [0063] 具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的CDR3。
- [0064] 在一些实施方案中,所述抗原结合分子包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少70%序列同一性的氨基酸序列或由其组成。
- [0065] 在一些实施方案中,所述抗原结合分子包含含有以下CDRs的单域抗体序列:
- [0066] 具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDR1,
- [0067] 具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的CDR2,
- [0068] 具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的CDR3。
- [0069] 在一些实施方案中,所述抗原结合分子包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少70%序列同一性的氨基酸序列或由其组成。
- [0070] 在一些实施方案中,所述抗原结合分子包含含有以下FRs的单域抗体序列:
- [0071] 具有SEQ ID NO:40的氨基酸序列的FR1,
- [0072] 具有SEQ ID NO:41的氨基酸序列的FR2,
- [0073] 具有SEQ ID NO:42的氨基酸序列的FR3,
- [0074] 具有SEQ ID NO:44的氨基酸序列的FR4。
- [0075] 在一些实施方案中,所述抗原结合分子包含含有以下FRs的单域抗体序列:
- [0076] 具有SEQ ID NO:40的氨基酸序列的FR1,
- [0077] 具有SEQ ID NO:41的氨基酸序列的FR2,
- [0078] 具有SEQ ID NO:43的氨基酸序列的FR3,
- [0079] 具有SEQ ID NO:44的氨基酸序列的FR4。
- [0080] 在一些实施方案中,所述抗原结合分子抑制VEGFA和VEGFR之间的相互作用。
- [0081] 在一些实施方案中,所述抗原结合分子是多特异性抗原结合分子,其还包含对除VEGFA之外的靶抗原具有特异性的抗原结合结构域。
- [0082] 本公开还提供了包含本文所述抗原结合分子的嵌合抗原受体(CAR)。
- [0083] 本公开还提供了一种核酸,任选地为分离的核酸,其编码本文所述的抗原结合分子或CAR。
- [0084] 本公开还提供了包含本文所述核酸的表达载体。
- [0085] 本公开还提供了一种细胞,其包含本文所述的抗原结合分子、CAR、核酸或表达载体。
- [0086] 本公开还提供了一种产生结合VEGFA的抗原结合分子的方法,包括在适合于细胞表达抗原结合分子的条件培养本文所述的细胞。
- [0087] 本公开还提供了一种组合物,其包含本文所述的抗原结合分子、CAR、核酸、表达载体或细胞,以及药学上可接受的载体、稀释剂、赋形剂或佐剂。
- [0088] 本公开还提供了本文所述的抗原结合分子、CAR、核酸、表达载体、细胞或组合物,

用于医学治疗或预防的方法。

[0089] 本公开还提供了本文所述的抗原结合分子、CAR、核酸、表达载体、细胞或组合物，用于治疗或预防VEGFA/VEGFR介导的信号传导与病理有关的疾病的方法。

[0090] 本公开还提供了本文所述的抗原结合分子、CAR、核酸、表达载体、细胞或组合物，用于制备用于治疗或预防VEGFA/VEGFR介导的信号传导与病理有关的疾病的药物。

[0091] 本公开内容还提供了一种治疗或预防VEGFA/VEGFR介导的信号传导与病理有关的疾病的方法，包括向受试者施用治疗或预防有效量的本文所述的抗原结合分子、CAR、核酸、表达载体、细胞或组合物。

[0092] 在一些实施方案中，所述疾病选自：以病理性血管生成为特征的疾病、癌症、表达VEGFA的癌症、表达VEGFR的癌症、眼部疾病、视网膜病、糖尿病性视网膜病、黄斑变性、年龄相关性黄斑变性、湿性年龄相关性黄斑变性、视网膜静脉阻塞、近视性脉络膜新生血管形成、早产儿视网膜病变、新生血管性青光眼、中心性浆液性脉络膜视网膜病变、眼部肿瘤、角膜新生血管形成、炎症性疾病、自身免疫性疾病、关节炎、类风湿性关节炎、骨关节炎、牛皮癣、多发性硬化症、败血症、运动神经元疾病和肌萎缩侧索硬化症。

[0093] 本公开还提供了一种体外复合物，任选地为分离的，其包含与VEGFA结合的本文所述的抗原结合分子。

[0094] 本公开还提供了一种检测样品中VEGFA的方法，包括将含有或怀疑含有VEGFA的样品与本文所述的抗原结合分子接触，并检测抗原结合分子与VEGFA复合物的形成。

[0095] 本公开还提供了本文所述的抗原结合分子在用于检测、定位或成像VEGFA或包含或表达VEGFA的细胞的方法中的用途。

[0096] 本公开内容还提供了一种选择或分类受试者以使用VEGFA靶向剂治疗的方法，该方法包括在体外使来自受试者的样品与根据本文所述的抗原结合分子接触，并检测抗原结合分子与VEGFA复合物的形成。

[0097] 本公开还提供了本文所述的抗原结合分子作为体外或体内诊断试剂或预后试剂的用途。

[0098] 本公开还提供了本文所述的抗原结合分子在用于检测、定位或成像VEGFA以表达VEGFA为特征的疾病/病症的方法中的用途。

[0099] 描述

[0100] 我们在此描述了以高亲和力靶向人和鼠VEGFA的人源化、稳定和自制的VH结构域抗体的生成，这些抗体能够高效阻断VEGF-VEGFR相互作用。这些VEGF结合分子可用作生成多价和多特异性分子的构件，如两个VH结构域抗体串联构建的二价抗VEGFA分子所例证的。

VEFGA

[0101] 血管内皮生长因子A(VEGFA)是被标识为UniProt P15692的蛋白质。人VEGFA基因编码的mRNA的选择性剪接产生四种主要VEGFA亚型(isoform): VEGF206(SEQ ID NO:60), VEGF189(SEQ ID NO:61), VEGF165(SEQ ID NO:62)和VEGF121(SEQ ID NO:63)。在经加工去除N端26个氨基酸信号肽(SEQ ID NO:68)后, VEGF206, VEGF189, VEGF165和VEGF121分别包含SEQ ID NO:64至67中所示的氨基酸序列。VEGF165似乎是主要的VEGFA亚型。

[0102] VEGFA是一种生长因子,例如在Holme and Zachary Genome Biol. (2005) 6(2): 209, and Claesson-Welsh and Welsh, J Intern Med. (2013) 273(2):114-27中所描述的,

这两篇文献均通过引用整体并入本文。

[0103] 血管内皮生长因子 (VEGFs) 是具有保守的受体结合半胱氨酸结 (cystine-knot) 结构的分泌性多肽家族。VEGFA 单体通过链间二硫键缔合形成同型二聚体 (homodimer)。VEGFA 通过内皮细胞表达的同源受体激酶家族发挥作用, 刺激血管形成。

[0104] VEGFA 在正常血管发育以及涉及血管异常生长的疾病 (例如癌症) 中具有重要作用。VEGFA 刺激源自动脉、静脉和淋巴系统的血管内皮细胞的生长, 并在多种体内模型中诱导血管生成 (即形成薄壁内皮衬里结构), 从而诱导微血管通透性快速升高。

[0105] 在本说明书中, “VEGFA” 是指来自任何物种的 VEGFA, 并且包括来自任何物种的亚型、片段、变体或同源物 (homologue)。在一些实施方案中, VEGFA 是来自哺乳动物 (例如兽类、胎盘类、上皮类、前兽类、古猿、灵长类动物 (恒河猴、食蟹猴、非人灵长类动物或人)) 的 VEGFA。在一些实施方案中, 所述 VEGFA 是人或小鼠 VEGFA。

[0106] 如本文所用, 给定参考蛋白的亚型、片段、变体或同源物可表征为与参考蛋白的氨基酸序列具有至少 70% 序列同一性, 优选具有 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 氨基酸序列同一性。“片段” 通常指参考蛋白质的一部分。“变体” 一般是指具有相对于参考蛋白质的氨基酸序列包含一个或多个氨基酸取代、插入、缺失或其他修饰的氨基酸序列的蛋白质, 但与参考蛋白质的氨基酸序列保留相当程度的序列同一性 (例如与参考蛋白有至少 60% 的序列同一性)。“亚型” 通常是指由与参考蛋白的物种相同的物种表达的参考蛋白的变体。“同源物” 通常指与参考蛋白的物种相比由不同物种产生的参考蛋白的变体。同源物包括直系同源物。

[0107] VEGFA 的亚型包括 VEGF206 (UniProt P15692-1), VEGF189 (UniProt P15692-2), VEGF165 (UniProt P15692-4) 和 VEGF121 (UniProt P15692-9)。VEGFA 的亚型还包括 VEGF183 (UniProt P15692-3), VEGF148 (UniProt P15692-5), VEGF145 (UniProt P15692-6), VEGF165B (UniProt P15692-8), VEGF111 (UniProt P15692-10), L-VEGF165 (UniProt P15692-11), L-VEGF121 (UniProt P15692-12), L-VEGF189 (UniProt P15692-13), L-VEGF206 (UniProt P15692-14), VEGFA 亚型 15 (UniProt P15692-15), VEGFA 亚型 16 (UniProt P15692-16), VEGFA 亚型 17 (UniProt P15692-17) 和 VEGFA 亚型 18 (UniProt P15692-18)。

[0108] VEGFA 亚型、片段、变体或同源物可任选地表征为与来自选定物种的未成熟或成熟的 VEGFA 亚型的氨基酸序列具有至少 70%、优选自 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的氨基酸序列同一性, 例如人类。

[0109] 在一些实施方式中, VEGFA 是人 VEGFA。在一些实施方式中, VEGFA 是小鼠 VEGFA。

[0110] 亚型、片段、变体或同源物可以任选地是功能亚型、片段、变体或同源物, 例如功能亚型、片段、变体或同源物, 例如, 具有参考 VEGFA (例如人 VEGF165) 的功能特性或活性, 如通过针对功能特性或活性的合适测定法进行分析所确定的。例如, VEGFA 的亚型、片段、变体或同源物可以表现出与 VEGF 受体 (例如 VEGFR1、VEGFR2 和/或 VEGFR3) 的关联。

[0111] 在一些实施方案中, VEGFA 包含与 SEQ ID NO: 60、61、62 或 63 具有至少 70%, 优选自 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 氨基酸序列同一性的氨基酸序列, 或由上述序列组成。

[0112] 在一些实施方案中, VEGFA 包含与 SEQ ID NO: 64、65、66 或 67 具有至少 70%, 优选自 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 氨基酸序列

同一性的氨基酸序列,或由上述序列组成。

[0113] VEGF通过结合VEGF受体(VEGFRs) VEGFR1(AAH39007.1 G1:24660372)、VEGFR2(P35968.2 G1 9087218)和VEGFR3(AAA85215.1 G1:1150991)发挥其生物学作用。每个受体都具有VEGF的胞外结合域、跨膜序列和胞内酪氨酸激酶部分。VEGF与细胞外受体结构域结合使受体二聚化并导致细胞内酪氨酸激酶部分磷酸化。VEGFA已被证明主要通过VEGFR1和VEGFR2发挥其生物学作用。

[0114] 在本说明书中,“VEGFR1”,“VEGFR2”和“VEGFR3”分别指来自任何物种的VEGFR1/VEGFR2/VEGFR3,并且包括来自任何物种的亚型、片段、变体或同源物。在一些实施方案中,VEGFR1/VEGFR2/VEGFR3来自哺乳动物(例如兽类、胎盘类、上皮类、前兽类、古猿、灵长类动物(恒河猴、食蟹猴、非人灵长类动物或人))。在一些实施方案中,VEGFR1/VEGFR2/VEGFR3是人或小鼠VEGFR1/VEGFR2/VEGFR3。

[0115] VEGFR1/VEGFR2/VEGFR3的亚型、片段、变体或同源物可任选地表征为与来自选定物种的未成熟或成熟亚型的氨基酸序列具有至少70%、优选自80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的氨基酸序列同一性,例如人类。

[0116] 本文中,“VEGFA/VEGFR介导的信号传导”是指通过VEGFA与VEGF受体的结合引发的信号传导。“信号传导”是指信号转导和其他控制细胞活动的细胞过程。

[0117] VEGFA/VEGFR介导的信号传导被描述为,例如记载于Geindreau et al.,Int J Mol Sci (2021) 22(9):4871,其全部内容通过引用并入本文。VEGFA/VEGFR介导的信号传导在细胞内通过PI3K/AKT、MAPK/ERK和PLC- γ 途径以及SCR和FAK进行,促进细胞存活、增殖、细胞骨架重排,并影响血管通透性、血管舒张和促进血管生成的变化。

[0118] 抗原结合分子

[0119] 本公开提供了能够结合(即结合) VEGFA的抗原结合分子。本公开提供了特异性结合VEGFA的抗原结合分子。根据本公开内容的抗原结合分子可以以纯化或分离的形式提供,即来自其他天然存在的生物材料。

[0120] 如本文所用,“抗原结合分子”是指能够结合靶抗原的分子。术语“抗原结合分子”涵盖单克隆抗体、多克隆抗体、单特异性和多特异性抗体(例如双特异性抗体)、以及抗体片段(例如Fv、scFv、Fab、scFab、F(ab')₂、Fab₂、双抗体、三抗体、scFv-Fc、微型抗体、单域抗体(VHH)等)和适体。

[0121] 更具体地,根据本公开内容的抗原结合分子包含抗原结合多肽部分,其可以被称为“抗原结合结构域”。在优选的实施方案中,根据本公开内容的抗原结合分子包含特异性结合VEGFA的单域抗体或由其组成。

[0122] 单域抗体(sdAbs) - 在本领域中也以不同地称为“重链抗体上的单可变结构域(single variable domain on a heavy chain antibodies)”、“VHHs”、“纳米抗体”和“重链抗体(heavy chain only antibodies, HcAbs)”,并且有时在本文中被称作“DotBodies”-如Henry and MacKenzie,Front Immunol. (2018) 9:41和Bever et al.,Anal Bioanal Chem. (2016) 408(22):5985-6002所描述的,两者均通过引用整体并入本文。

[0123] 单域抗体由单个单体抗体可变域形成。第一个单域抗体是从骆驼科动物中发现的重链抗体改造而来的,软骨鱼也有重链抗体。

[0124] 根据本公开的单域抗体通常包含三个互补决定区CDRs:CDR1,CDR2和CDR3。三个

CDRs共同定义了分子的互补位,即分子与其靶抗原结合的部分。

[0125] 单域抗体还包含每个CDR两侧的框架区(FRs),其为CDRs提供支架。从N端到C端,单域抗体包含以下结构:N端-[FR1]-[CDR1]-[FR2]-[CDR2]-[FR3]-[CDR3]-[FR4]-C端。

[0126] 定义抗体CDR和FR有几种不同的约定,例如Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987) 和 VBASE2 中所描述的, Retter et al., *Nucl. Acids Res.* (2005) 33(suppl 1):D671-D674 中所描述的。

[0127] 在一些实施方案中,抗原结合分子包含本文所述的结合 VEGFA 的单域抗体的 CDRs, 或包含衍生自本文所述的结合 VEGFA 的单域抗体的 CDRs。在一些实施方案中,抗原结合分子包含本文所述的结合 VEGFA 的单域抗体的 FRs, 或包含衍生自本文所述的结合 VEGFA 的单域抗体的 FRs。在一些实施方案中,抗原结合分子包含本文所述的结合 VEGFA 的单域抗体的 CDRs 和 FRs, 或包含衍生自本文所述的结合 VEGFA 的单域抗体的 CDRs 和 FRs。即, 在一些实施方案中,抗原结合分子包含本文所述的结合 VEGFA 的单域抗体的氨基酸序列, 或包含衍生自本文所述的结合 VEGFA 的单域抗体的氨基酸序列。在一些实施方案中,本文提及的抗原结合分子的 CDRs 和 FRs 根据 IMGT 信息系统 (国际 IMGT (ImMunoGeneTics) 信息系统 (描述于 LeFranc et al., *Nucleic Acids Res.* (2015) 43 (数据库版本:D413-22), 其使用如 LeFranc et al., *Dev. Comp. Immunol.* (2003) 27:55-77 中描述的 IMGT V-DOMAIN 编号规则), Kabat 系统 (描述于 Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)) 或 Chothia 系统 (描述于 Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)) 定义。在一些实施方案中,本文提及的抗原结合分子 (例如单域抗体) 的 CDRs 和 FRs 根据 Kabat 系统定义。在一些实施方案中,在 SEQ ID NOs:1、5、9、12、16、20、24、28、32、36、49、53 和 57 的氨基酸序列中: FR1 由第 1 位至第 31 位的氨基酸序列组成; CDR1 由第 32 位至第 36 位的氨基酸序列组成; FR2 是由第 37 位至第 50 位的氨基酸序列组成; CDR2 由第 51 位至第 67 位的氨基酸序列组成; FR3 由第 68 位至第 99 位的氨基酸序列组成; CDR3 由第 100 位至第 119 位的氨基酸序列组成; FR4 由第 120 位至第 130 位的氨基酸序列组成。

[0128] 如本文所用,“衍生自”参考氨基酸序列/结构域包含与参考序列具有至少 60%, 例如至少 65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 序列同一性的氨基酸序列。

[0129] 在一些实施方案中,抗原结合分子包含选自:13A6、16A2.1、16A6.1、20A2.1、20A3.1、21A1.1、21A8.1、21D9.1、21E6.1 和 23D5.1 的 VEGFA 结合单域抗体的 CDRs、FRs 和/或完整的氨基酸序列。

[0130] 在一些实施方案中,抗原结合分子包含具有 SEQ ID NOs:1、5、9、12、16、20、24、28、32、36、49、53 或 57 之一的氨基酸序列的 VEGFA 结合单域抗体的 CDRs、FRs 和/或完整氨基酸序列。在一些实施方案中,抗原结合分子包含具有 SEQ ID NOs:1、5、9、12、16、20、24、28、32、36、49、53 或 57 之一的氨基酸序列的 VEGFA 结合单域抗体的 CDRs (即 CDRs1、2 和 3)。在一些实施方案中,抗原结合分子包含具有 SEQ ID NOs:1、5、9、12、16、20、24、28、32、36、49、53 或 57 之一的氨基酸序列的 VEGFA 结合单域抗体的 FRs (即 FRs1、2、3 和 4)。在一些实施方案中,抗原

结合分子包含具有SEQ ID NOs:1、5、9、12、16、20、24、28、32、36、49、53或57之一的氨基酸序列的VEGFA结合单域抗体的CDRs(即CDRs1、2和3)和FRs(即FRs1、2、3和4)。

[0131] 在一些实施方案中,抗原结合分子包含根据以下(1)至(13)之一的单域抗体序列或由其组成:

[0132] (1) (ConAII) 包含以下CDRs的单域抗体序列:

[0133] 具有SEQ ID NO:45的氨基酸序列的CDR1

[0134] 具有SEQ ID NO:46的氨基酸序列的CDR2

[0135] 具有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的CDR3,

[0136] 或其变体,其中CDR1、CDR2或CDR3中的一个或多个中的一个或两个或三个氨基酸被其它氨基酸取代。

[0137] (2) (Con16A2.1来源) 包含以下CDRs的单域抗体序列:

[0138] 具有SEQ ID NO:50的氨基酸序列的CDR1

[0139] 具有SEQ ID NO:51的氨基酸序列的CDR2

[0140] 具有SEQ ID NO:52的氨基酸序列的CDR3,

[0141] 或其变体,其中CDR1、CDR2或CDR3中的一个或多个中的一个或两个或三个氨基酸被其它氨基酸取代。

[0142] (3) (Con21/23) 包含以下CDRs的单域抗体序列:

[0143] 具有SEQ ID NO:54的氨基酸序列的CDR1

[0144] 具有SEQ ID NO:55的氨基酸序列的CDR2

[0145] 具有SEQ ID NO:56的氨基酸序列的CDR3,

[0146] 或其变体,其中CDR1、CDR2或CDR3中的一个或多个中的一个或两个或三个氨基酸被其它氨基酸取代。

[0147] (4) (13A6) 包含以下CDRs的单域抗体序列:

[0148] 具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDR1

[0149] 具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDR2

[0150] 具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的CDR3,

[0151] 或其变体,其中CDR1、CDR2或CDR3中的一个或多个中的一个或两个或三个氨基酸被其它氨基酸取代。

[0152] (5) (16A2.1) 包含以下CDRs的单域抗体序列:

[0153] 具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的CDR1

[0154] 具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的CDR2

[0155] 具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的CDR3,

[0156] 或其变体,其中CDR1、CDR2或CDR3中的一个或多个中的一个或两个或三个氨基酸被其它氨基酸取代。

[0157] (6) (16A6.1) 包含以下CDRs的单域抗体序列:

[0158] 具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDR1

[0159] 具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的CDR2

[0160] 具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的CDR3,

[0161] 或其变体,其中CDR1、CDR2或CDR3中的一个或多个中的一个或两个或三个氨基酸

被其它氨基酸取代。

[0162] (7) (20A2.1) 包含以下CDRs的单域抗体序列:

[0163] 具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的CDR1

[0164] 具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的CDR2

[0165] 具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的CDR3,

[0166] 或其变体,其中CDR1、CDR2或CDR3中的一个或多个中的一个或两个或三个氨基酸被其它氨基酸取代。

[0167] (8) (20A3.1) 包含以下CDRs的单域抗体序列:

[0168] 具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的CDR1

[0169] 具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的CDR2

[0170] 具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的CDR3,

[0171] 或其变体,其中CDR1、CDR2或CDR3中的一个或多个中的一个或两个或三个氨基酸被其它氨基酸取代。

[0172] (9) (21A1.1) 包含以下CDRs的单域抗体序列:

[0173] 具有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的CDR1

[0174] 具有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的CDR2

[0175] 具有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的CDR3,

[0176] 或其变体,其中CDR1、CDR2或CDR3中的一个或多个中的一个或两个或三个氨基酸被其它氨基酸取代。

[0177] (10) (21A8.1) 包含以下CDRs的单域抗体序列:

[0178] 具有SEQ ID NO:25的氨基酸序列的CDR1

[0179] 具有SEQ ID NO:26的氨基酸序列的CDR2

[0180] 具有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的CDR3,

[0181] 或其变体,其中CDR1、CDR2或CDR3中的一个或多个中的一个或两个或三个氨基酸被其它氨基酸取代。

[0182] (11) (21D9.1) 包含以下CDRs的单域抗体序列:

[0183] 具有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的CDR1

[0184] 具有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的CDR2

[0185] 具有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的CDR3,

[0186] 或其变体,其中CDR1、CDR2或CDR3中的一个或多个中的一个或两个或三个氨基酸被其它氨基酸取代。

[0187] (12) (21E6.1) 包含以下CDRs的单域抗体序列:

[0188] 具有SEQ ID NO:33的氨基酸序列的CDR1

[0189] 具有SEQ ID NO:34的氨基酸序列的CDR2

[0190] 具有SEQ ID NO:35的氨基酸序列的CDR3,

[0191] 或其变体,其中CDR1、CDR2或CDR3中的一个或多个中的一个或两个或三个氨基酸被其它氨基酸取代。

[0192] (13) (23D5.1) 包含以下CDRs的单域抗体序列:

[0193] 具有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的CDR1

- [0194] 具有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的CDR2
- [0195] 具有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的CDR3,
- [0196] 或其变体,其中CDR1、CDR2或CDR3中的一个或多个中的一个或两个或三个氨基酸被其它氨基酸取代。
- [0197] 在一些实施方案中,抗原结合分子包含根据以下(14)至(16)之一的单域抗体序列或由其组成:
- [0198] (14) (ConAII) 包含以下FRs的单域抗体序列:
- [0199] 具有SEQ ID NO:40的氨基酸序列的FR1
- [0200] 具有SEQ ID NO:41的氨基酸序列的FR2
- [0201] 具有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的FR3
- [0202] 具有SEQ ID NO:44的氨基酸序列的FR4,
- [0203] 或其变体,其中FR1、FR2、FR3或FR4中的一个或多个中的一个或两个或三个氨基酸被其它氨基酸取代。
- [0204] (15) (13A6,16A2.1,20A2.1,20A3.1,21A1.1,21A8.1,21D9.1,21E6.1) 包含以下FRs的单域抗体序列:
- [0205] 具有SEQ ID NO:40的氨基酸序列的FR1
- [0206] 具有SEQ ID NO:41的氨基酸序列的FR2
- [0207] 具有SEQ ID NO:42的氨基酸序列的FR3
- [0208] 具有SEQ ID NO:44的氨基酸序列的FR4,
- [0209] 或其变体,其中FR1、FR2、FR3或FR4中的一个或多个中的一个或两个或三个氨基酸被其它氨基酸取代。
- [0210] (16) (16A6.1) 包含以下FRs的单域抗体序列:
- [0211] 具有SEQ ID NO:40的氨基酸序列的FR1
- [0212] 具有SEQ ID NO:41的氨基酸序列的FR2
- [0213] 具有SEQ ID NO:43的氨基酸序列的FR3
- [0214] 具有SEQ ID NO:44的氨基酸序列的FR4,
- [0215] 或其变体,其中FR1、FR2、FR3或FR4中的一个或多个中的一个或两个或三个氨基酸被其它氨基酸取代。
- [0216] 在一些实施方案中,抗原结合分子包含根据上述(1)至(13)之一的CDRs和根据上述(14)至(16)之一的FRs的单域抗体序列或由其组成。
- [0217] 在一些实施方案中,抗原结合分子包含根据以下(17)至(29)之一的单域抗体序列或由其组成:
- [0218] (17) (ConAII) 含有根据(1)的CDRs和根据(14)的FRs的单域抗体序列。
- [0219] (18) (Con16A2.1来源) 含有根据(2)的CDRs和根据(15)的FRs的单域抗体序列。
- [0220] (19) (Con21/23) 含有根据(3)的CDRs和根据(15)的FRs的单域抗体序列。
- [0221] (20) (13A6) 含有根据(4)的CDRs和根据(15)的FRs的单域抗体序列。
- [0222] (21) (16A2.1) 含有根据(5)的CDRs和根据(15)的FRs的单域抗体序列。
- [0223] (22) (16A6.1) 含有根据(6)的CDRs和根据(16)的FRs的单域抗体序列。
- [0224] (23) (20A2.1) 含有根据(7)的CDRs和根据(15)的FRs的单域抗体序列。

- [0225] (24) (20A3.1) 含有根据(8)的CDRs和根据(15)的FRs的单域抗体序列。
- [0226] (25) (21A1.1) 含有根据(9)的CDRs和根据(15)的FRs的单域抗体序列。
- [0227] (26) (21A8.1) 含有根据(10)的CDRs和根据(15)的FRs的单域抗体序列。
- [0228] (27) (21D9.1) 含有根据(11)的CDRs和根据(15)的FRs的单域抗体序列。
- [0229] (28) (21E6.1) 含有根据(12)的CDRs和根据(15)的FRs的单域抗体序列。
- [0230] (29) (23D5.1) 含有根据(13)的CDRs和根据(15)的FRs的单域抗体序列。
- [0231] 在一些实施方案中,抗原结合分子包含根据以下(30)至(42)之一的单域抗体序列或由其组成:
- [0232] (30) (ConAII) 单域抗体序列,其包含与SEQ ID NO:49的氨基酸序列具有至少70%序列同一性,更优选至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。
- [0233] (31) (Con16A2.1来源) 单域抗体序列,其包含与SEQ ID NO:53的氨基酸序列具有至少70%序列同一性,更优选至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。
- [0234] (32) (Con21/23) 单域抗体序列,其包含与SEQ ID NO:57的氨基酸序列具有至少70%序列同一性,更优选至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。
- [0235] (33) (13A6) 单域抗体序列,其包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少70%序列同一性,更优选至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。
- [0236] (34) (16A2.1) 单域抗体序列,其包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少70%序列同一性,更优选至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。
- [0237] (35) (16A6.1) 单域抗体序列,其包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少70%序列同一性,更优选至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。
- [0238] (36) (20A2.1) 单域抗体序列,其包含与SEQ ID NO:12的氨基酸序列具有至少70%序列同一性,更优选至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。
- [0239] (37) (20A3.1) 单域抗体序列,其包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少70%序列同一性,更优选至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。
- [0240] (38) (21A1.1) 单域抗体序列,其包含与SEQ ID NO:20的氨基酸序列具有至少70%序列同一性,更优选至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。
- [0241] (39) (21A8.1) 单域抗体序列,其包含与SEQ ID NO:24的氨基酸序列具有至少70%序列同一性,更优选至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。
- [0242] (40) (21D9.1) 单域抗体序列,其包含与SEQ ID NO:28的氨基酸序列具有至少70%

序列同一性,更优选至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。

[0243] (41) (21E6.1) 单域抗体序列,其包含与SEQ ID NO:32的氨基酸序列具有至少70%序列同一性,更优选至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。

[0244] (42) (23D5.1) 单域抗体序列,其包含与SEQ ID NO:36的氨基酸序列具有至少70%序列同一性,更优选至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。

[0245] 在根据本公开的实施方案中,其中一个或多个氨基酸被另一种氨基酸取代,取代可以是保守取代,例如根据下表。在一些实施方案中,表中间一列中同一块中的氨基酸被取代。在一些实施方案中,表中最右列中同一行的氨基酸被取代。

[0246]

脂肪族	非极性	G A P
		I L V
	非荷电极性	C S T M
		N Q
	带电极性	D E
		K R
芳香族		H F W Y

[0247] 在一些实施方案中,取代可以是功能保守的。也就是说,在一些实施方案中,与等效的未取代分子相比,取代可能不影响(或基本上不影响)包含取代的抗原结合分子的一种或多种功能特性(例如靶结合)。

[0248] 在一些实施方案中,本公开的抗原结合分子包含免疫球蛋白重链恒定序列的一个或多个区域(例如CH1、CH2和/或CH3)。在一些实施方案中,免疫球蛋白重链恒定序列是或衍生自IgG(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、IgA(例如IgA1、IgA2)、IgD、IgE或IgM,例如人IgG(例如hIgG1、hIgG2、hIgG3、hIgG4)、hIgA(例如hIgA1、hIgA2)、hIgD、hIgE或hIgM。在一些实施方案中,免疫球蛋白重链恒定序列是或衍生自人IgG1同种异型(例如G1m1、G1m2、G1m3或G1m17)的重链恒定序列。

[0249] 在一些实施方案中,抗原结合分子包含与SEQ ID NO:69的氨基酸序列具有至少70%序列同一性,更优选至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性的氨基酸序列。

[0250] 在一些实施方案中,抗原结合分子包含CH1区,该CH1区与SEQ ID NO:70的氨基酸序列具有至少70%序列同一性,更优选至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗原结合分子包含铰链区,该铰链区与SEQ ID NO:71的氨基酸序列具有至少70%序列同一性,更优选至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗原结合分子包含CH2区,该CH2区与SEQ ID NO:72的氨基酸序列具有至少70%序列同一性,更优选至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、

93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗原结合分子包含CH3区,该CH3区与SEQ ID NO:73的氨基酸序列具有至少70%序列同一性,更优选至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性的氨基酸序列。

[0251] 在一些实施方案中,本公开的抗原结合分子包含Fc区。Fc区由来自一条多肽的CH2和CH3区以及来自另一条多肽的CH2和CH3区组成。来自两条多肽的CH2和CH3区一起形成Fc区。

[0252] Fc区提供与Fc受体和免疫系统其他分子的相互作用,以产生功能效应。IgG Fc介导的效应功能在例如Jefferis et al., Immunol Rev 1998 163:59-76 (特此通过引用将其全部内容并入) 中被评价,并且是通过Fc介导的免疫细胞 (例如巨噬细胞、树突细胞、嗜中性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、血小板、肥大细胞、NK细胞和T细胞) 的募集和激活、通过Fc区和免疫细胞表达的Fc受体之间的相互作用,通过Fc区与补体蛋白C1q结合募集补体途径组分,随后激活补体级联。Fc介导的功能包括Fc受体结合、抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)、抗体依赖性细胞介导的吞噬作用 (ADCP)、补体依赖性细胞毒性 (CDC)、膜攻击复合物 (MAC) 的形成、细胞脱颗粒、细胞因子和/或趋化因子产生以及抗原加工和呈递。

[0253] 在一些实施方案中,根据本公开的抗原结合分子包含能够针对包含/表达VEGFA的细胞 (例如表达VEGFA的细胞和/或在细胞表面包含VEGFA的复合物) 增强/指导ADCC、ADCP、CDC中的一种或多种和/或增强在其上形成MAC或使其细胞脱颗粒。

[0254] 影响Fc介导的功能的对抗体Fc区的修饰是本领域已知的,参见Wang et al., Protein Cell (2018) 9 (1) :63-73,其全部内容通过引用并入本文。Wang et al., Protein Cell (2018) 9 (1) :63-73的表1总结了已知影响抗体效应功能的示例性Fc区修饰。

[0255] 多特异性抗原结合分子也是预期可用的。“多特异性”是指抗原结合分子表现出与多于一种靶标的特异性结合。在一些实施方案中,抗原结合分子是双特异性抗原结合分子。在一些实施方案中,抗原结合分子包含至少两个不同的抗原结合结构域。

[0256] 在一些实施方案中,抗原结合分子结合VEGFA和另一靶标 (例如除VEGFA之外的抗原),因此至少是双特异性的。术语“双特异性”是指抗原结合分子能够与至少两个不同的抗原决定簇特异性结合。

[0257] 应理解,根据本公开内容的抗原结合分子 (例如多特异性抗原结合分子) 可包含能够结合至抗原结合分子特异性的靶标的抗原结合分子。例如,与VEGFA和VEGFA以外的抗原结合的抗原结合分子可以包含: (i) 与VEGFA结合的抗原结合分子,和 (ii) 与VEGFA以外的抗原结合的抗原结合分子。在一些实施方案中,作为较大抗原结合分子 (例如多特异性抗原结合分子) 的组成部分的抗原结合分子例如可以称为较大抗原结合分子的“抗原结合结构域”或“抗原结合区”。

[0258] 还应当理解,根据本公开的抗原结合分子 (例如多特异性抗原结合分子) 可以包含能够结合抗原结合分子特异性的靶标的抗原结合多肽或抗原结合多肽复合物。在一些实施方案中,多特异性抗原结合分子中除VEGFA之外的抗原是免疫细胞表面分子。在一些实施方案中,抗原是癌细胞抗原。在一些实施方案中,抗原是受体分子,例如细胞表面受体。在一些实施方案中,抗原是细胞信号分子,例如细胞因子、趋化因子、干扰素、白细胞介素或淋巴因子。在一些实施方案中,抗原是生长因子或激素。

[0259] 癌细胞抗原是癌细胞表达或过表达的抗原。癌细胞抗原可以是任何肽/多肽、糖蛋白、脂蛋白、聚糖、糖脂、脂质或其片段。癌细胞抗原的表达可能与癌症有关。癌细胞抗原的表达可能与癌症有关。癌细胞抗原可以由癌细胞异常表达(例如,癌细胞抗原可以通过异常定位表达),或者可以由癌细胞以异常结构表达。癌细胞抗原可能能够引发免疫反应。在一些实施方案中,抗原在癌细胞的细胞表面表达(即癌细胞抗原是癌细胞表面抗原)。在一些实施方案中,被本文所述的抗原结合分子结合的抗原部分展示在癌细胞的外表面上(即,在细胞外)。癌细胞抗原可以是癌症相关抗原。在一些实施方案中,癌细胞抗原是其表达与癌症症状的发生、进展或严重性相关的抗原。癌症相关抗原可以与癌症的病因或病理学相关,或者可以作为癌症的结果而异常表达。在一些实施方案中,癌细胞抗原是其表达被癌症细胞上调(例如在RNA和/或蛋白质水平)的抗原,例如,与非癌细胞(例如源自相同组织/细胞类型的非癌细胞)的表达水平相比。在一些实施方案中,癌症相关抗原可以优先由癌细胞表达,并且不由相对的非癌细胞(例如源自相同组织/细胞类型的非癌细胞)表达。在一些实施方案中,癌症相关抗原可以是突变的癌基因或突变的肿瘤抑制基因的产物。在一些实施方案中,癌症相关抗原可以是过表达的细胞蛋白、由致癌病毒产生的癌抗原、致癌胎儿抗原或细胞表面糖脂或糖蛋白的产物。

[0260] 免疫细胞表面分子可以是在免疫细胞的细胞表面处或之上表达的任何肽/多肽、糖蛋白、脂蛋白、聚糖、糖脂、脂质或其片段。在一些实施方案中,被本公开所述的抗原结合分子结合的部分位于免疫细胞的外表面上(即,在细胞外)。免疫细胞表面分子可以在任何免疫细胞的细胞表面表达。在一些实施方案中,免疫细胞可以是造血来源的细胞,例如中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、树突细胞、淋巴细胞或单核细胞。淋巴细胞可以是例如T细胞、B细胞、自然杀伤(NK)细胞、NKT细胞或先天性淋巴样细胞(ILC)或其前体(例如胸腺细胞或前B细胞)。在一些实施方案中,抗原是CD3多肽(例如CD3 ϵ 、CD3 δ 、CD3 γ 或CD3 ζ)。

[0261] 在一些实施方案中,本文所述的多特异性抗原结合分子表现出对VEGFA的至少单价的结合,并且还表现出对除VEGFA之外的抗原的至少单价的结合。结合价是指抗原结合分子中给定抗原决定簇的结合位点的数量。

[0262] 在一些实施方案中,抗原结合分子包含能够结合VEGFA的单域抗体(例如,如本文所述),以及能够结合除VEGFA之外抗原的抗原结合区(例如,多肽(例如,单域抗体)、Fv、Fab或抗体)。

[0263] 在一些实施方案中,抗原结合分子包含免疫细胞接合部分。在一些实施方案中,抗原结合分子是免疫细胞接合器(immune cell engager)。免疫细胞接合器在例如Goebeler and Bargou, Nat. Rev. Clin. Oncol. (2020) 17:418-434和Ellerman, Methods (2019) 154:102-1177中进行了综述,这两篇文献均通过引用整体并入本文。

[0264] 免疫细胞接合分子包含感兴趣的靶抗原的抗原结合区和用于募集/接合感兴趣的免疫细胞的抗原结合区。免疫细胞接合器通过针对免疫细胞表面分子的特异性抗原结合区域招募/接合免疫细胞。

[0265] 在一些实施方案中,抗原结合分子包含CD3多肽结合部分(例如,能够结合CD3多肽的抗原结合结构域)。研究最充分的免疫细胞接合器是双特异性T细胞接合器(BiTEs),其包含靶抗原结合结构域和CD3多肽(通常为CD3 ϵ)结合结构域,BiTE通过该结构域招募T细胞。BiTE与其靶抗原以及T细胞表达的CD3多肽的结合引起T细胞的激活,并最终引导针对表达

靶抗原的细胞的T细胞效应子活性。其他类型的免疫细胞接合器是本领域众所周知的,并且包括自然杀伤细胞接合器,例如双特异性杀伤细胞接合器(BiKEs),其募集并激活NK细胞。

[0266] 在一些实施方案中,被免疫细胞接合器接合的免疫细胞是T细胞或NK细胞。在一些实施方式中,免疫细胞接合器是T细胞接合器。

[0267] 抗原结合分子的具体示例性实施方案

[0268] 在一些实施方案中,本公开的抗原结合分子包含与SEQ ID NO:49具有至少70%,优选自75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列或由其组成。

[0269] 在一些实施方案中,本公开的抗原结合分子包含与SEQ ID NO:53具有至少70%,优选自75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列或由其组成。

[0270] 在一些实施方案中,本公开的抗原结合分子包含与SEQ ID NO:57具有至少70%,优选自75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列或由其组成。

[0271] 在一些实施方案中,本公开的抗原结合分子包含与SEQ ID NO:1具有至少70%,优选自75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列或由其组成。

[0272] 在一些实施方案中,本公开的抗原结合分子包含与SEQ ID NO:5具有至少70%,优选自75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列或由其组成。

[0273] 在一些实施方案中,本公开的抗原结合分子包含与SEQ ID NO:9具有至少70%,优选自75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列或由其组成。

[0274] 在一些实施方案中,本公开的抗原结合分子包含与SEQ ID NO:12具有至少70%,优选自75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列或由其组成。

[0275] 在一些实施方案中,本公开的抗原结合分子包含与SEQ ID NO:16具有至少70%,优选自75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列或由其组成。

[0276] 在一些实施方案中,本公开的抗原结合分子包含与SEQ ID NO:20具有至少70%,优选自75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列或由其组成。

[0277] 在一些实施方案中,本公开的抗原结合分子包含与SEQ ID NO:24具有至少70%,优选自75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列或由其组成。

[0278] 在一些实施方案中,本公开的抗原结合分子包含与SEQ ID NO:28具有至少70%,优选自75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列或由其组成。

[0279] 在一些实施方案中,本公开的抗原结合分子包含与SEQ ID NO:32具有至少70%,

优选自75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列或由其组成。

[0280] 在一些实施方案中,本公开的抗原结合分子包含与SEQ ID NO:36具有至少70%,优选自75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列或由其组成。

[0281] 连接子和附加序列

[0282] 除了结合靶抗原所需的氨基酸序列之外,抗原结合分子还可包含另外的氨基酸/氨基酸序列。在一些实施方案中,此类另外的氨基酸/氨基酸序列位于本公开的单域抗体序列的N末端。在一些实施方案中,此类另外的氨基酸/氨基酸序列位于本公开的单域抗体序列的C末端。在一些实施方案中,此类另外的氨基酸/氨基酸序列位于本公开的单域抗体序列的N末端和C末端。

[0283] 在一些实施方案中,抗原结合分子包含氨基酸子序列之间的一个或多个接头序列。例如,可以在本公开的抗原结合分子的抗原结合结构域的一端或两端设置接头序列。

[0284] 接头序列是本领域技术人员已知的,并且在例如Chen et al., Adv Drug Deliv Rev (2013) 65 (10) :1357-1369中进行了描述,其通过引用全文并入本文。在一些实施方式中,接头序列可以是柔性接头序列。柔性接头序列允许由接头序列连接的氨基酸序列的相对移动。柔性接头是本领域技术人员已知的,并且在Chen et al., Adv Drug Deliv Rev (2013) 65 (10) :1357-1369中鉴定了几种。柔性接头序列经常包含高比例的甘氨酸和/或丝氨酸残基。

[0285] 在一些实施方案中,接头序列包含至少一个甘氨酸残基和/或至少一个丝氨酸残基。在一些实施方案中,接头序列由甘氨酸和丝氨酸残基组成。在一些实施方案中,接头序列包含由甘氨酸和丝氨酸残基组成的序列基序的一个或多个(例如1、2、3、4、5、6或7个之一)拷贝(例如串联),例如G₄S。在一些实施方案中,接头序列具有1-2、1-3、1-4、1-5、1-10、1-15、1-20、1-25或1-30个氨基酸的长度。在一些实施方案中,本公开的抗原结合分子包含与SEQ ID NO:58具有至少70%,优选自75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列或由其组成。

[0286] 本公开内容的抗原结合分子和多肽可以另外包含另外的氨基酸或氨基酸序列。例如,抗原结合分子和多肽可以包含促进抗原结合分子/多肽的表达、折叠、运输、加工、纯化或检测的氨基酸序列。例如,抗原结合分子/多肽可以包含编码His(例如6XHis)、Myc、GST、MBP、FLAG、HA、E或生物素标签的序列,任选地位于抗原结合分子/多肽的N-或C-末端。在一些实施方案中,抗原结合分子/多肽包含可检测部分,例如荧光、发光、免疫可检测、放射、化学、核酸或酶标记。

[0287] 本公开内容的抗原结合分子和多肽可以另外包含信号肽(也称为前导序列或信号序列)。信号肽通常由5-30个疏水性氨基酸的序列组成,形成单个 α 螺旋。分泌的蛋白质和在细胞表面表达的蛋白质经常包含信号肽。

[0288] 信号肽可以存在于抗原结合分子/多肽的N末端。信号肽可以提供抗原结合分子/多肽的有效运输和分泌。信号肽通常通过切割去除,因此不包含在表达抗原结合分子的细胞分泌的成熟抗原结合分子/多肽中。

[0289] 信号肽对于许多蛋白质来说是已知的,并且被记录在诸如GenBank、UniProt、

Swiss-Prot、TrEMBL、蛋白质信息资源、蛋白质数据库、Ensembl和InterPro等数据库中,和/或可以被识别/预测,例如使用氨基酸序列分析工具例如SignalP(Petersen et al.,2011 Nature Methods 8:785-786)或Signal-BLAST(Frank和Sippl,2008 Bioinformatics 24:2172-2176)。

[0290] 标记和共轭物

[0291] 在一些实施方案中,本公开的抗原结合分子另外包含可检测部分。

[0292] 在一些实施方案中,抗原结合分子包含可检测部分,例如荧光标记、磷光标记、发光标记、免疫可检测标记(例如表位标签)、放射性标记、化学标记、核酸标记或酶标记。抗原结合分子可以用可检测部分共价或非共价标记。

[0293] 荧光标记包括例如荧光素,罗丹明,别藻蓝蛋白,曙红和NDB,绿色荧光蛋白(GFP),铕(Eu)、铽(Tb)和钐(Sm)等稀土螯合物,四甲基罗丹明,德克萨斯红,4-甲基伞形酮,7-氨基-4-甲基香豆素,Cy3和Cy5。放射性标记包括放射性同位素,例如碘¹²³,碘¹²⁵,碘¹²⁶,碘¹³¹,碘¹³³,溴⁷⁷,铈^{99m},铟¹¹¹,铟^{113m},镓⁶⁷,镓⁶⁸,钷⁹⁵,钷⁹⁷,钷¹⁰³,钷¹⁰⁵,汞²⁰⁷,汞²⁰³,铈^{99m},铈¹⁰¹,铈¹⁰⁵,钷⁴⁷,碲^{121m},碲^{122m},碲^{125m},铪¹⁶⁵,铪¹⁶⁷,铪¹⁶⁸,铜⁶⁷,氟¹⁸,钷⁹⁰,钷¹⁰⁰,铈²¹⁷和铈²¹¹。发光标记包括放射发光、化学发光(例如吖啶酯、鲁米诺、异鲁米诺)和生物发光标记。免疫可检测标记包括半抗原、肽/多肽、抗体、受体和配体,例如生物素、抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白或地高辛。核酸标记包括适体。酶标记包括例如过氧化物酶、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶、 β -半乳糖苷酶和荧光素酶。

[0294] 在一些实施方案中,本公开的抗原结合分子缀合至化学部分。化学部分可以是用于提供治疗效果的部分。抗体-药物缀合物在例如Parslow et al.,Biomedicines.2016 Sep;4(3):14中进行了综述。在一些实施方案中,化学部分可以是药物部分(例如细胞毒性剂),使得抗原结合分子对包含/表达VEGFA的细胞(例如表达VEGFA的细胞和/或在细胞表面包含VEGFA的复合物)表现出细胞毒性。在一些实施方案中,药物部分可以是化疗剂。在一些实施方案中,药物部分选自加利车霉素、DM1、DM4、单甲基auristatin E(MMAE)、单甲基auristatin F(MMAF)、SN-38、阿霉素、多卡霉素、D6.5和IPBD。

[0295] 抗原结合分子的功能特性

[0296] 本文描述的抗原结合分子可以通过参考某些功能特性来表征。在一些实施方案中,本文所述的抗原结合分子可以具有一种或多种以下特性:

[0297] 结合VEGFA(例如人VEGFA和/或小鼠VEGFA);

[0298] 抑制VEGFA和VEGFR(即VEGFA受体,例如VEGFR1)之间的相互作用;

[0299] 抑制VEGFA/VEGFR介导的信号传导;

[0300] 热处理后保留与VEGFA的结合;

[0301] 减少表达VEGFA的细胞数量/比例;

[0302] 增加表达VEGFA的细胞的细胞杀伤。

[0303] 应当理解,给定的抗原结合分子可以表现出一种以上在前一段中列举的特性。可以使用合适的测定来评估给定抗原结合分子的前一段中列举的性质。测定可以是,例如体外测定,可以是无细胞或基于细胞的测定。或者,测定可以是,例如体内测定,即在非人类动物中进行。测定可以使用被可检测实体标记的物种以促进它们的检测。

[0304] 此类测定结果的分析可包括确定达到相关活性最大水平的50%时的浓度。达到相

关活性最大水平的50%时的抗原结合分子的浓度可以称为抗原结合分子相对于相关活性的“半最大有效浓度”,其也可以称为“EC₅₀”。举例来说,给定抗原结合分子与VEGFA的结合的EC₅₀可以是达到与相关物种的结合的最大水平的50%时的浓度。

[0305] 根据特性,EC₅₀也可称为“半最大抑制浓度”或“IC₅₀”,这是观察到给定特性的最大抑制水平的50%时的抗原结合分子的浓度。作为说明,给定抗原结合分子抑制VEGFA和VEGFR(例如VEGFR1)之间相互作用的IC₅₀可以是实现最大抑制水平的50%时的浓度。

[0306] 本文所述的抗原结合分子和抗原结合结构域优选表现出与VEGFA的特异性结合。如本文所用,“特异性结合”是指对抗原具有选择性的结合,并且其可以与对非靶抗原的非特异性结合相区别。特异性结合靶分子的抗原结合分子/结构域优选结合该靶分子,且比其结合其他非靶分子具有更大的亲和力和/或更长的持续时间。

[0307] 给定多肽特异性结合给定分子的能力可以通过根据本领域已知的方法进行分析来确定,例如通过ELISA、表面等离子共振(SPR;参见例如Hearty et al., Methods Mol Biol (2012) 907:411-442)、Bio-Layer Interferometry(参见例如Lad et al., (2015) J Biomol Screen 20(4):498-507)、流式细胞术或放射性标记抗原结合测定(RIA)、酶联免疫吸附测定。通过这种分析,可以测量和量化与给定分子的结合。在一些实施方案中,结合可以是在给定测定中检测到的响应。

[0308] 在一些实施方案中,抗原结合分子与非靶分子的结合程度小于抗体与靶分子的结合的约10%,例如通过ELISA、SPR、生物层干涉测量法或RIA测量。或者,结合特异性可以用结合亲和力来反映,其中抗原结合分子以至少0.1个数量级(即 0.1×10^n ,其中n是代表大于抗原结合分子对非靶分子的K_d的数量级的整数,可以任选地是至少0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5或2.0之一)。

[0309] 与VEGFA的结合可以通过生物层干涉测量法来确定,例如如本公开实施例10所述。

[0310] 在一些实施方案中,根据本公开的抗原结合分子结合VEGFA。在一些实施方案中,根据本公开的抗原结合分子结合包含VEGFA的多肽复合物。

[0311] 在一些实施方案中,本文所述的抗原结合分子以亚微摩尔亲和力结合VEGFA,即K_d < 1×10^{-6} M。在一些实施方案中,本文所述的抗原结合分子以纳摩尔范围内的亲和力结合VEGFA,即K_d = 9.9×10^{-7} 至 1×10^{-9} M。在一些实施方案中,本文所述的抗原结合分子以亚纳摩尔亲和力结合VEGFA,即K_d < 1×10^{-9} M。在一些实施方案中,本文所述的抗原结合分子以皮摩尔范围内的亲和力结合VEGFA,即K_d = 9.9×10^{-10} 至 1×10^{-12} M。在一些实施方案中,本文所述的抗原结合分子以亚皮摩尔亲和力结合VEGFA,即K_d < 1×10^{-12} M。

[0312] 在一些实施方案中,本文所述的抗原结合分子以5μM或更低的K_d结合VEGFA(例如人VEGF165),优选自≤5μM、≤2μM、≤1μM、≤500nM、≤100nM、≤75nM、≤50nM、≤40nM、≤30nM、≤20nM、≤15nM、≤12.5nM、≤10nM、≤9nM、≤8nM、≤7nM、≤6nM、≤5nM、≤4nM、≤3nM、≤2nM、≤1nM、≤500pM、≤400pM、≤300pM、≤200pM、≤100pM、≤75pM、≤50pM、≤45pM、≤40pM、≤35pM、≤30pM、≤25pM、≤20pM、≤15pM或≤10pM。在一些实施方案中,抗原结合分子以K_d ≤1nM、≤500pM、≤400pM、≤300pM、≤200pM、≤100pM、≤75pM、≤50pM、≤45pM、≤40pM、≤35pM、≤30pM、≤25pM、≤20pM、≤15pM或≤10pM的亲和力结合VEGFA(例如人VEGF165)。

[0313] 在一些实施方案中,根据本公开的抗原结合分子在相同的测试中以与雷珠单抗

(即,通过SEQ ID NO:74和75的多肽缔合而形成的分子)相似的 K_D (例如,通过BLI测定,例如,如本公开内容的实施例10中所述)结合VEGFA(例如,人VEGF165),其 K_D (例如通过BLI测定,例如如本公开实施例8中所述)在同样的测试中与雷珠单抗测定的 K_D 相比,其 $K_D \geq 0.5$ 倍且 ≤ 2 倍,例如 ≥ 0.55 倍且 ≤ 1.9 倍、 ≥ 0.6 倍且 ≤ 1.8 倍、 ≥ 0.65 倍且 ≤ 1.7 倍、 ≥ 0.7 倍且 ≤ 1.6 倍、 ≥ 0.75 倍且 ≤ 1.5 倍、 ≥ 0.8 倍且 ≤ 1.4 倍、 ≥ 0.85 倍且 ≤ 1.3 倍、 ≥ 0.9 倍且 ≤ 1.2 倍、 ≥ 0.95 倍且 ≤ 1.1 倍。

[0314] 在一些实施方案中,根据本公开的抗原结合分子在相同测定中以低于雷珠单抗测定的 K_D (例如通过BLI测定,例如如本公开实施例10中所述)结合VEGFA(例如人VEGF165)。在一些实施方案中,抗原结合分子在同样测试中(例如通过BLI测定,例如如本公开实施例10中所述)与雷珠单抗测定的 K_D 相比,其结合VEGFA(例如人VEGF165)的 K_D 小于1倍,例如选自 ≤ 0.99 倍、 ≤ 0.95 倍、 ≤ 0.9 倍、 ≤ 0.85 倍、 ≤ 0.8 倍、 ≤ 0.75 倍、 ≤ 0.7 倍、 ≤ 0.65 倍、 ≤ 0.6 倍、 ≤ 0.55 倍或 ≤ 0.5 倍其中之一。

[0315] 在一些实施方案中,根据本公开的抗原结合分子在相同的测试中以与贝伐单抗(即,通过SEQ ID NO:76和77的多肽缔合而形成的分子)相似的 K_D (例如,通过BLI测定,例如,如本公开内容的实施例10中所述)结合VEGFA(例如,人VEGF165),其 K_D (例如通过BLI测定,例如如本公开实施例10中所述)在同样的测试中与贝伐单抗测定的 K_D 相比,其 $K_D \geq 0.5$ 倍且 ≤ 2 倍,例如 ≥ 0.55 倍且 ≤ 1.9 倍、 ≥ 0.6 倍且 ≤ 1.8 倍、 ≥ 0.65 倍且 ≤ 1.7 倍、 ≥ 0.7 倍且 ≤ 1.6 倍、 ≥ 0.75 倍且 ≤ 1.5 倍、 ≥ 0.8 倍且 ≤ 1.4 倍、 ≥ 0.85 倍且 ≤ 1.3 倍、 ≥ 0.9 倍且 ≤ 1.2 倍、 ≥ 0.95 倍且 ≤ 1.1 倍其中之一。

[0316] 在一些实施方案中,根据本公开的抗原结合分子在相同测定中以低于贝伐单抗测定的 K_D (例如通过BLI测定,例如如本公开实施例10中所述)结合VEGFA(例如人VEGF165)。在一些实施方案中,抗原结合分子在同样测试中(例如通过BLI测定,例如如本公开实施例10中所述)与贝伐单抗测定的 K_D 相比,其结合VEGFA(例如人VEGF165)的 K_D 小于1倍,例如选自 ≤ 0.99 倍、 ≤ 0.95 倍、 ≤ 0.9 倍、 ≤ 0.85 倍、 ≤ 0.8 倍、 ≤ 0.75 倍、 ≤ 0.7 倍、 ≤ 0.65 倍、 ≤ 0.6 倍、 ≤ 0.55 倍或 ≤ 0.5 倍其中之一。

[0317] 本公开的抗原结合分子可以结合VEGFA的特定感兴趣区域。根据本公开的抗原结合分子可以结合VEGFA的线性表位,其由连续的氨基酸序列(即氨基酸一级序列)组成。在一些实施方案中,抗原结合分子可以结合VEGFA的构象表位,其由氨基酸序列的不连续氨基酸序列组成。

[0318] 抗原结合分子结合的给定靶分子的区域可以由技术人员使用本领域熟知的各种方法来确定,包括抗体-抗原复合物的X射线共结晶分析、肽扫描、诱变图谱、通过质谱法的氢-氘交换分析、噬菌体展示、竞争ELISA和基于蛋白水解的“保护”方法。此类方法描述于例如Gershoni et al., BioDrugs, 2007, 21(3):145-156,其全部内容通过引用并入本文。

[0319] 在一些实施方案中,根据本公开的抗原结合分子与VEGFA的相同区域或VEGFA的重叠区域结合,所述VEGFA的区域由包含选自以下的VEGFA结合单域抗体的CDRs、FRs和/或完整氨基酸序列的抗原结合分子结合:13A6、16A2.1、16A6.1、20A2.1、20A3.1、21A1.1、21A8.1、21D9.1、21E6.1和23D5.1。

[0320] 在一些实施方案中,根据本公开的抗原结合分子结合VEGFA的区域,VEGFA通过该区域结合VEGFR(例如VEGFR1和/或VEGFR2)。

[0321] 在一些实施方案中,抗原结合分子结合VEGFA中与VEGFR(例如VEGFR1)结合区域。在一些实施方案中,所述抗原结合分子抑制VEGFA和VEGFR之间的相互作用。在一些实施方案中,抗原结合分子是VEGFR(例如VEGFR1)与VEGFA结合的竞争性抑制剂。在一些实施方案中,抗原结合分子阻断VEGFA与VEGFR(例如VEGFR1)的结合。在一些实施方案中,抗原结合分子占据VEGFR(例如VEGFR1)结合的VEGFA区域,从而抑制VEGFR(例如VEGFR1)与VEGFA之间的相互作用。在一些实施方案中,抗原结合分子从包含VEGFA和VEGFR(例如VEGFR1)的复合物中置换VEGFR(例如VEGFR1)。

[0322] 抗原结合分子抑制两个因子之间相互作用的能力可以通过下述方法来测定,例如,在抗体/片段存在下,或在相互作用配偶体之一或两者与抗体/片段温育后分析相互作用来确定。一个合适的测定方法用来确定给定的抗原结合分子抑制两个相互作用伙伴之间的相互作用的例子是竞争性ELISA测定。抑制给定相互作用(例如VEGFA和VEGFR之间)的抗原结合分子通过观察与不存在抗原结合分子时(或存在适当的对照抗原结合分子时)的相互作用水平相比,在存在抗原结合分子的情况下或在相互作用配偶体之一或两者与抗原结合分子一起温育后观察到相互作用配偶体之间的相互作用水平的减少/降低来鉴定。可以在体外进行合适的分析,例如使用重组相互作用配偶体或使用表达相互作用配偶体的细胞。表达相互作用配偶体的细胞可以内源地表达相互作用配偶体,或者可以通过引入细胞中的核酸表达相互作用配偶体。为了此类测定的目的,相互作用配偶体和/或抗原结合分子之一或两者可以被标记或与可检测实体结合使用以用于检测和/或测量相互作用水平的目的。

[0323] 在一些实施方案中,根据本公开的抗原结合分子抑制VEGFA与VEGFR1(例如人VEGF121和人VEGFR1)之间的相互作用,其 IC_{50} (例如通过竞争性ELISA测定,例如本公开实施例11中描述的竞争性ELISA)为 $10\mu M$ 或更低,优选自 $\leq 5\mu M$ 、 $\leq 2\mu M$ 、 $\leq 1\mu M$ 、 $\leq 500nM$ 、 $\leq 100nM$ 、 $\leq 75nM$ 、 $\leq 50nM$ 、 $\leq 40nM$ 、 $\leq 30nM$ 、 $\leq 20nM$ 、 $\leq 15nM$ 、 $\leq 12.5nM$ 、 $\leq 10nM$ 、 $\leq 9nM$ 、 $\leq 8nM$ 、 $\leq 7nM$ 、 $\leq 6nM$ 、 $\leq 5nM$ 、 $\leq 4nM$ 或 $\leq 3nM$ 。

[0324] 在一些实施方案中,根据本公开内容的抗原结合分子抑制VEGFA和VEGFR1(例如人VEGF121和人VEGFR1)之间的相互作用,其 IC_{50} (例如通过竞争性ELISA测定,例如本公开内容实施例11中描述的竞争性ELISA)在同一测定中与针对雷珠单抗(即通过SEQ ID NO:74和SEQ ID NO:75的多肽缔合而形成的分子)测定的抑制此类相互作用的 IC_{50} 相似。在一些实施方案中,抗原结合分子抑制VEGFA和VEGFR1(例如人VEGF121和人VEGFR1)之间的相互作用,其 IC_{50} (例如通过竞争性ELISA测定,例如本公开实施例11中描述的竞争性ELISA)在相同测定中是雷珠单抗抑制这种相互作用的 ≥ 0.5 倍且 ≤ 2 倍,例如选自 ≥ 0.55 倍且 ≤ 1.9 倍、 ≥ 0.6 倍且 ≤ 1.8 倍、 ≥ 0.65 倍且 ≤ 1.7 倍、 ≥ 0.7 倍且 ≤ 1.6 倍、 ≥ 0.75 倍且 ≤ 1.5 倍、 ≥ 0.8 倍且 ≤ 1.4 倍、 ≥ 0.85 倍且 ≤ 1.3 倍、 ≥ 0.9 倍且 ≤ 1.2 倍、 ≥ 0.95 倍且 ≤ 1.1 倍其中之一。

[0325] 在一些实施方案中,根据本公开内容的抗原结合分子抑制VEGFA和VEGFR1(例如人VEGF121和人VEGFR1)之间的相互作用,其 IC_{50} (例如通过竞争性ELISA测定,例如本公开内容实施例11中描述的竞争性ELISA)在同一测定中低于针对雷珠单抗测定的抑制此类相互作用的 IC_{50} 。在一些实施方案中,抗原结合分子抑制VEGFA和VEGFR1(例如人VEGF121和人VEGFR1)之间的相互作用,其 IC_{50} (例如通过竞争性ELISA测定,例如如本公开实施例11中所述的竞争性ELISA)小于在相同测定中对雷珠单抗测定的抑制此类相互作用的 IC_{50} 的1倍,例

如选自 ≤ 0.99 倍、 ≤ 0.95 倍、 ≤ 0.9 倍、 ≤ 0.85 倍、 ≤ 0.8 倍、 ≤ 0.75 倍、 ≤ 0.7 倍、 ≤ 0.65 倍、 ≤ 0.6 倍、 ≤ 0.55 倍或 ≤ 0.5 倍其中之一。

[0326] 在一些实施方案中,根据本公开的抗原结合分子抑制VEGFA和VEGFR1(例如人VEGF121和人VEGFR1)之间的相互作用,其 IC_{50} (例如通过竞争性ELISA测定,例如本公开内容实施例11中描述的竞争性ELISA)与针对贝伐单抗(即通过SEQ ID NO:76和SEQ ID NO:77的多肽缔合而形成的分子)在相同试验中测定的抑制此类相互作用的 IC_{50} 相似。在一些实施方案中,抗原结合分子抑制VEGFA和VEGFR1(例如人VEGF121和人VEGFR1)之间的相互作用,其 IC_{50} (例如通过竞争性ELISA测定,例如本公开实施例11中描述的竞争性ELISA)在相同测定中是贝伐单抗抑制这种相互作用的 ≥ 0.5 倍且 ≤ 2 倍,例如选自 ≥ 0.55 倍且 ≤ 1.9 倍、 ≥ 0.6 倍且 ≤ 1.8 倍、 ≥ 0.65 倍且 ≤ 1.7 倍、 ≥ 0.7 倍且 ≤ 1.6 倍、 ≥ 0.75 倍且 ≤ 1.5 倍、 ≥ 0.8 倍且 ≤ 1.4 倍、 ≥ 0.85 倍且 ≤ 1.3 倍、 ≥ 0.9 倍且 ≤ 1.2 倍、 ≥ 0.95 倍且 ≤ 1.1 倍其中之一。

[0327] 在一些实施方案中,根据本公开的抗原结合分子抑制VEGFA和VEGFR1(例如人VEGF121和人VEGFR1)之间的相互作用,其 IC_{50} (例如通过竞争性ELISA测定,例如本公开实施例11中描述的竞争性ELISA)在同一测定中低于针对贝伐单抗测定的抑制此类相互作用的 IC_{50} 。在一些实施方案中,抗原结合分子抑制VEGFA和VEGFR1(例如人VEGF121和人VEGFR1)之间的相互作用,其 IC_{50} (例如通过竞争性ELISA测定,例如如本公开实施例11中所述的竞争性ELISA)小于在相同测定中对贝伐单抗测定的抑制此类相互作用的 IC_{50} 的1倍,例如选自 ≤ 0.99 倍、 ≤ 0.95 倍、 ≤ 0.9 倍、 ≤ 0.85 倍、 ≤ 0.8 倍、 ≤ 0.75 倍、 ≤ 0.7 倍、 ≤ 0.65 倍、 ≤ 0.6 倍、 ≤ 0.55 倍或 ≤ 0.5 倍其中之一。

[0328] 在一些实施方案中,抗原结合分子抑制VEGFA/VEGFR介导的信号传导(即,由VEGFA与VEGFR的结合介导的信号传导)。可以使用表达VEGFR的细胞来分析VEGFA/VEGFR介导的信号传导,例如在用于检测和/或定量VEGFA/VEGFR介导的信号传导的测定中。

[0329] 用于研究VEGFA/VEGFR介导的信号传导的合适测定法包括用于检测因VEGFA/VEGFR介导的信号传导而被磷酸化/激活/表达的因子的磷酸化/活性/表达的测定方法。此类测定方法可以包括在VEGFA存在下使表达VEGFR的细胞与根据本公开的抗原结合分子接触。用于研究VEGFA/VEGFR介导的信号传导的测定可以包括分析通过PI3K/AKT、MAPK/ERK和/或PLC- γ 途径、和/或通过SCR和/或FAK的信号传导。

[0330] 在一些实施方案中,本公开的抗原结合分子能够将VEGFA/VEGFR介导的信号传导(例如,通过人VEGF121与人VEGFR1的结合介导的信号传导)抑制到与不存在抗原结合分子的情况下(或在存在适当的对照抗原结合分子的情况下)的信号转导相比小于1倍,例如选自 ≤ 0.99 倍、 ≤ 0.95 倍、 ≤ 0.9 倍、 ≤ 0.85 倍、 ≤ 0.8 倍、 ≤ 0.75 倍、 ≤ 0.7 倍、 ≤ 0.65 倍、 ≤ 0.6 倍、 ≤ 0.55 倍、 ≤ 0.5 倍、 ≤ 0.45 倍、 ≤ 0.4 倍、 ≤ 0.35 倍、 ≤ 0.3 倍、 ≤ 0.25 倍、 ≤ 0.2 倍、 ≤ 0.15 倍、 ≤ 0.1 倍、 ≤ 0.05 倍,或 ≤ 0.01 倍的水平。

[0331] 在一些实施方案中,根据本公开的抗原结合分子抑制VEGFA/VEGFR介导的信号传导(例如,通过人VEGF121与人VEGFR1的结合介导的信号传导),其 IC_{50} 与在相同测定中针对雷珠单抗(即通过SEQ ID NO:74和75的多肽缔合而形成的分子)测定的抑制此类相互作用的 IC_{50} 相似。在一些实施方案中,抗原结合分子抑制VEGFA/VEGFR介导的信号传导(例如,通过人VEGF121与人VEGFR1的结合介导的信号传导),其 IC_{50} 为在相同测定中雷珠单抗抑制此类信号传导的 IC_{50} 值的 ≥ 0.5 倍且 ≤ 2 倍,例如选自 ≥ 0.55 倍且 ≤ 1.9 倍、 ≥ 0.6 倍且 ≤ 1.8 倍、

≥ 0.65 倍且 ≤ 1.7 倍、 ≥ 0.7 倍且 ≤ 1.6 倍、 ≥ 0.75 倍且 ≤ 1.5 倍、 ≥ 0.8 倍且 ≤ 1.4 倍、 ≥ 0.85 倍且 ≤ 1.3 倍、 ≥ 0.9 倍且 ≤ 1.2 倍、 ≥ 0.95 倍且 ≤ 1.1 倍其中之一。

[0332] 在一些实施方案中,根据本公开的抗原结合分子抑制VEGFA/VEGFR介导的信号传导(例如,通过人VEGF121与人VEGFR1的结合介导的信号传导),其 IC_{50} 低于在相同测定中对雷珠单抗测定的抑制此类相互作用的 IC_{50} 。在一些实施方案中,抗原结合分子抑制VEGFA/VEGFR1介导的信号传导(例如人VEGF121和人VEGFR1的结合介导的信号传导),其 IC_{50} (例如,通过人VEGF121与人VEGFR1的结合介导的信号传导)小于在相同测定中对雷珠单抗测定的抑制此类相互作用的 IC_{50} 的1倍,例如选自 ≤ 0.99 倍、 ≤ 0.95 倍、 ≤ 0.9 倍、 ≤ 0.85 倍、 ≤ 0.8 倍、 ≤ 0.75 倍、 ≤ 0.7 倍、 ≤ 0.65 倍、 ≤ 0.6 倍、 ≤ 0.55 倍或 ≤ 0.5 倍其中之一。

[0333] 在一些实施方案中,根据本公开的抗原结合分子抑制VEGFA/VEGFR介导的信号传导(例如,通过人VEGF121与人VEGFR1的结合介导的信号传导),其 IC_{50} 与在相同测定中针对贝伐单抗(即通过SEQ ID NO:76和77的多肽缔合而形成的分子)测定的抑制此类相互作用的 IC_{50} 相似。在一些实施方案中,抗原结合分子抑制VEGFA/VEGFR介导的信号传导(例如,通过人VEGF121与人VEGFR1的结合介导的信号传导),其 IC_{50} 为在相同测定中贝伐单抗抑制此类信号传导的 IC_{50} 值的 ≥ 0.5 倍且 ≤ 2 倍,例如选自 ≥ 0.55 倍且 ≤ 1.9 倍、 ≥ 0.6 倍且 ≤ 1.8 倍、 ≥ 0.65 倍且 ≤ 1.7 倍、 ≥ 0.7 倍且 ≤ 1.6 倍、 ≥ 0.75 倍且 ≤ 1.5 倍、 ≥ 0.8 倍且 ≤ 1.4 倍、 ≥ 0.85 倍且 ≤ 1.3 倍、 ≥ 0.9 倍且 ≤ 1.2 倍、 ≥ 0.95 倍且 ≤ 1.1 倍其中之一。

[0334] 在一些实施方案中,根据本公开的抗原结合分子抑制VEGFA/VEGFR介导的信号传导(例如,通过人VEGF121与人VEGFR1的结合介导的信号传导),其 IC_{50} 低于在相同测定中对贝伐单抗测定的抑制此类相互作用的 IC_{50} 。在一些实施方案中,抗原结合分子抑制VEGFA/VEGFR1介导的信号传导(例如人VEGF121和人VEGFR1的结合介导的信号传导),其 IC_{50} (例如,通过人VEGF121与人VEGFR1的结合介导的信号传导)小于在相同测定中对贝伐单抗测定的抑制此类相互作用的 IC_{50} 的1倍,例如选自 ≤ 0.99 倍、 ≤ 0.95 倍、 ≤ 0.9 倍、 ≤ 0.85 倍、 ≤ 0.8 倍、 ≤ 0.75 倍、 ≤ 0.7 倍、 ≤ 0.65 倍、 ≤ 0.6 倍、 ≤ 0.55 倍或 ≤ 0.5 倍其中之一。

[0335] 在一些实施方案中,根据本公开的抗原结合分子在热处理之前和之后以相似的亲和力结合VEGFA(例如人VEGFA)。热处理可以包括在适当的缓冲液(例如包含0.1% BSA和0.01% Tween-20的PBS溶液的缓冲液)中在室温、60°C、70°C或80°C下温育1小时。热处理可以如本公开的实施例12中所述进行。

[0336] 在一些实施方案中,抗原结合分子在热处理之前和在室温下热处理1小时之后对VEGFA表现出相似的亲和力。在一些实施方案中,抗原结合分子在热处理之前和在60°C热处理1小时之后显示出对VEGFA的相似亲和力。在一些实施方案中,抗原结合分子在热处理之前和在70°C热处理1小时之后显示出对VEGFA的类似亲和力。在一些实施方案中,抗原结合分子在热处理之前和在80°C热处理1小时之后对VEGFA表现出相似的亲和力。

[0337] 本文中,与参考结合亲和力“相似”的结合亲和力是指与用同样方法测定的参考亲和力相比在50%以内的结合亲和力,例如选自40%、45%、30%、25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、20%、4%、3%、2%或1%其中之一以内的结合亲和力。

[0338] 热处理前后与VEGFA(例如人VEGFA)结合的 K_D 可能相似。在本文中,与参考值“相似”的 K_D 值可以是与参考值相比 ≥ 0.5 倍且 ≤ 2 倍,例如选自 ≥ 0.7 倍且 ≤ 1.5 倍、 ≥ 0.75 倍且

≤ 1.25 倍、 ≥ 0.8 倍且 ≤ 1.2 倍、 ≥ 0.85 倍且 ≤ 1.15 倍、 ≥ 0.9 倍且 ≤ 1.1 倍、 ≥ 0.91 倍且 ≤ 1.09 倍、 ≥ 0.92 倍且 ≤ 1.08 倍、 ≥ 0.93 倍且 ≤ 1.07 倍、 ≥ 0.94 倍且 ≤ 1.06 倍、 ≥ 0.95 倍且 ≤ 1.05 倍、 ≥ 0.96 倍且 ≤ 1.04 倍、 ≥ 0.97 倍且 ≤ 1.03 倍、 ≥ 0.98 倍且 ≤ 1.02 倍、或 ≥ 0.99 倍且 ≤ 1.01 倍。

[0339] 在一些实施方案中,根据本公开的抗原结合分子可以增强(即上调、增强)包含/表达VEGFA的细胞的细胞杀伤。

[0340] 在一些实施方案中,根据本公开的抗原结合分子能够减少包含/表达VEGFA的细胞的数量/比例。在一些实施方案中,根据本公开的抗原结合分子能够消耗/增强此类细胞的消耗。

[0341] 在一些实施方案中,根据本公开的抗原结合分子,在用相同实验方法的情况下,将包含/表达VEGFA的细胞的数量/比例减少至与在没有抗原结合分子时或在有相同量的适当对照抗原结合分子存在下观察到的此类细胞数量/比例相比小于1倍,例如选自 ≤ 0.99 倍、 ≤ 0.95 倍、 ≤ 0.9 倍、 ≤ 0.85 倍、 ≤ 0.8 倍、 ≤ 0.75 倍、 ≤ 0.7 倍、 ≤ 0.65 倍、 ≤ 0.6 倍、 ≤ 0.55 倍、 ≤ 0.5 倍、 ≤ 0.45 倍、 ≤ 0.4 倍、 ≤ 0.35 倍、 ≤ 0.3 倍、 ≤ 0.25 倍、 ≤ 0.2 倍、 ≤ 0.15 倍、 ≤ 0.1 倍、 ≤ 0.05 倍,或 ≤ 0.01 倍。

[0342] 根据本公开内容的抗原结合分子可以包含用于增强包含/表达VEGFA的细胞的数量/比例的减少的一个或多个部分。例如,根据本公开内容的抗原结合分子可以是,例如,包含Fc区和/或药物部分。

[0343] 在一些实施方案中,根据本公开的抗原结合分子包含Fc区,该Fc区能够增强/引导针对包含/表达VEGFA的细胞的ADCC、ADCP、CDC中的一种或多种,和/或增强包含/表达VEGFA的细胞的MAC形成或细胞脱颗粒。

[0344] 在一些实施方案中,根据本公开的抗原结合分子能够针对包含/表达VEGFA的细胞增强/引导ADCC。

[0345] 在一些实施方案中,根据本公开的抗原结合分子包含药物部分。抗原结合分子可以缀合至药物部分。抗体-药物缀合物在例如Parslow et al., Biomedicines. 2016 Sep; 4 (3): 14中进行了综述(上述文献在此处并入本文)。在一些实施方案中,药物部分是或包含细胞毒性剂,使得抗原结合分子对包含/表达VEGFA的细胞表现出细胞毒性。在一些实施方案中,药物部分是或包含化疗剂。

[0346] 在一些实施方案中,根据本公开的抗原结合分子包含免疫细胞接合部分。在一些实施方案中,抗原结合分子包含CD3多肽结合部分(例如,能够结合CD3多肽的抗原结合结构域)。

[0347] 在一些实施方案中,根据本公开的抗原结合分子能够增强/指导针对包含/表达VEGFA的细胞的T细胞介导的溶细胞活性。

[0348] 在一些实施方案中,根据本公开的抗原结合分子,在给定的测定中,将包含/表达VEGFA的细胞的数量/比例与不存在抗原结合分子或存在相同量的适当对照抗原结合分子的情况下观察到的此类细胞的数量/比例减少至小于1倍,例如 ≤ 0.99 倍、 ≤ 0.95 倍、 ≤ 0.9 倍、 ≤ 0.85 倍、 ≤ 0.8 倍、 ≤ 0.75 倍、 ≤ 0.7 倍、 ≤ 0.65 倍、 ≤ 0.6 倍、 ≤ 0.55 倍、 ≤ 0.5 倍、 ≤ 0.45 倍、 ≤ 0.4 倍、 ≤ 0.35 倍、 ≤ 0.3 倍、 ≤ 0.25 倍、 ≤ 0.2 倍、 ≤ 0.15 倍、 ≤ 0.1 倍、 ≤ 0.05 倍、或 ≤ 0.01 倍。

[0349] 在一些实施方案中,根据本公开的抗原结合分子,在给定的测定中,将包含/表达 VEGFA 的细胞的杀伤水平与不存在抗原结合分子或存在相同量的适当对照抗原结合分子的情况下观察到的此类细胞的杀灭水平相比,提高至大于1倍,例如 ≥ 1.5 倍、 ≥ 2 倍、 ≥ 3 倍、 ≥ 4 倍、 ≥ 5 倍、 ≥ 6 倍、 ≥ 7 倍、 ≥ 8 倍、 ≥ 9 倍、 ≥ 10 倍、 ≥ 15 倍、 ≥ 20 倍、 ≥ 30 倍、 ≥ 40 倍或 ≥ 50 倍。

[0350] 嵌合抗原受体 (CARs)

[0351] 本公开还提供了包含本公开的抗原结合多肽的嵌合抗原受体 (CARs)。

[0352] CARs 是重组受体,提供抗原结合和T细胞激活功能。CAR结构和工程在例如 Dotti et al., Immunol Rev (2014) 257 (1) 中进行了综述,特此通过引用将其全部内容并入。CARs 包含与细胞膜锚定区和信号传导区连接的抗原结合区。任选的铰链区可以提供抗原结合区和细胞膜锚定区之间的分离,并且可以充当柔性接头。

[0353] 本公开的CARs包含抗原结合区,其包含本公开的抗原结合分子或由本公开的抗原结合分子组成,或者其包含根据本公开的单域抗体序列或由本公开的单域抗体序列组成。即,根据本公开的抗原结合分子/单域抗体序列包含在或构成CAR的抗原结合区。

[0354] 细胞膜锚定区设置在CAR的抗原结合区和信号传导区之间,并提供将CAR锚定至表达CAR的细胞的细胞膜,其中抗原结合区位于细胞外空间,而信号传导区位于细胞内部。在一些实施方案中,CAR包含细胞膜锚定区,所述细胞膜锚定区包含氨基酸序列或由其组成,所述氨基酸序列包含CD3- ζ 、CD4、CD8或CD28之一的跨膜区氨基酸序列、由其组成或衍生自CD3- ζ 、CD4、CD8或CD28之一的跨膜区氨基酸序列。如本文所用,“衍生自”参考氨基酸序列的区域包含与参考氨基酸序列具有至少60%,例如选自至少65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的氨基酸序列同一性。

[0355] CAR的信号传导区域可激活T细胞。CAR信号传导区域可以包含CD3- ζ 胞内结构域的氨基酸序列,其提供用于磷酸化和激活表达CAR的T细胞的基于免疫受体酪氨酸的激活基序 (ITAMs)。包含其他含有ITAM的蛋白质,例如Fc γ RI的序列的信号传导区也已被用于CARs中 (Haynes et al., 2001 J Immunol 166 (1):182-187)。CARs的信号传导区域还可以包含源自共刺激分子的信号传导区域的共刺激分子,以促进表达CAR的T细胞在与靶蛋白结合后的激活。合适的共刺激分子包括CD28、OX40、4-1BB、ICOS和CD27。在某些情况下,CARs被设计为提供不同细胞内信号通路的共同刺激。例如,与CD28共刺激相关的信号传导优先激活磷脂酰肌醇3-激酶 (PI3K) 途径,而4-1BB介导的信号传导则通过TNF受体相关因子 (TRAF) 衔接蛋白。因此,CARs的信号传导区域有时包含源自超过一种共刺激分子的信号传导区域的共刺激序列。在一些实施方案中,本公开的CAR包含一种或多种共刺激序列,所述共刺激序列包含氨基酸序列或由其组成,所述氨基酸序列包含CD28、OX40、4-1BB、ICOS和CD27中的一种或多种的胞内结构域的氨基酸序列、由其组成或衍生自所述氨基酸序列。

[0356] 任选的铰链区可以提供抗原结合区和跨膜结构域之间的分离,并且可以充当柔性接头。铰链区可以源自IgG1。在一些实施方案中,本公开的CAR包含铰链区,该铰链区包含氨基酸序列或由氨基酸序列组成,该氨基酸序列包含IgG1铰链区的氨基酸序列、由IgG1铰链区的氨基酸序列组成或衍生自IgG1铰链区的氨基酸序列。

[0357] 还提供了包含根据本公开的CAR的细胞。根据本公开的CAR可以用于产生表达CAR的免疫细胞,例如CAR-T或CAR-NK细胞。将CAR工程化到免疫细胞中可以在体外培养过程中进行。

[0358] 本公开的CAR的抗原结合区可以以任何合适的形式提供,例如scFv、scFab等。

[0359] 核酸和载体

[0360] 本公开提供了编码根据本公开的抗原结合分子和CARs的核酸。在一些实施方案中,核酸包含DNA和/或RNA或由DNA和/或RNA组成。

[0361] 本公开还提供了包含根据前段的核酸的载体。

[0362] 根据本公开的核酸和载体可以以纯化或分离的形式提供,即来自其他核酸或天然存在的生物材料。

[0363] 根据本公开的核酸的核苷酸序列可以包含在载体中,例如表达载体。本文所用的“载体”是用作将外源核酸转移至细胞中的载体的核酸分子。载体可以是用于在细胞中表达核酸的载体。此类载体可以包括与编码待表达序列的核苷酸序列可操作地连接的启动子序列。载体还可以包括终止密码子和表达增强子。本领域已知的任何合适的载体、启动子、增强子和终止密码子可应用于表达根据本公开的载体的肽或多肽。

[0364] 术语“可操作地连接”可以包括其中选择的核酸序列和调控性核酸序列(例如启动子和/或增强子)以将核酸序列的表达置于调控序列的影响或控制下(从而形成表达盒)的方式共价连接的情况。因此,如果调控序列能够影响核酸序列的转录,则调控序列可操作地连接至所选核酸序列。所得的转录物可以被翻译成所需的肽/多肽。

[0365] 合适的载体包括质粒、二元载体、DNA载体、mRNA载体、病毒载体(例如 γ 逆转录病毒载体(例如鼠白血病病毒(MLV)衍生的载体)、慢病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体、牛痘病毒载体和疱疹病毒载体)、基于转座子的载体和人工染色体(例如酵母人工染色体)。

[0366] 在一些实施方案中,载体可以是真核载体,例如包含在真核细胞中表达蛋白质所必需的元件的载体。在一些实施方案中,载体可以是哺乳动物表达载体,例如包含巨细胞病毒(CMV)或SV40启动子以驱动蛋白质表达的哺乳动物表达载体。

[0367] 包含/表达抗原结合分子/CARs的细胞

[0368] 本公开还提供了包含或表达根据本公开的抗原结合分子和CARs的细胞。还提供了包含或表达根据本公开的核酸或载体的细胞。

[0369] 细胞可以是真核细胞,例如哺乳动物细胞。哺乳动物可以是灵长类动物(恒河猴、食蟹猴、非人灵长类动物或人)或非人哺乳动物(例如兔、豚鼠、大鼠、小鼠或其他啮齿类动物(包括啮齿动物目中的任何动物)、猫、狗、猪、绵羊、山羊、牛(包括牛,例如奶牛或牛目中的任何动物)、马(包括马科动物中的任何动物)、驴和非人类哺乳动物)。

[0370] 在一些实施方案中,细胞是或源自常用于表达用于人类治疗的多肽的细胞类型。示例性细胞在例如Kunert and Reinhart, Appl Microbiol Biotechnol. (2016) 100:3451-3461中有描述(特此通过引用将其全部内容并入),并且包括例如CHO、HEK 293、PER.C6、NS0和BHK细胞。

[0371] 本公开还提供了用于产生包含根据本公开的核酸或载体的细胞的方法,包括将根据本公开的核酸或载体引入细胞中。在一些实施方案中,将根据本公开的分离的核酸或载体引入细胞中包括转化、转染、电穿孔或转导(例如逆转录病毒转导)。

[0372] 本公开还提供了用于产生表达/包含根据本公开的抗原结合分子/CAR的细胞的方法,包括将根据本公开的核酸或载体引入细胞中。在一些实施方案中,该方法另外包括在适合于细胞表达核酸/载体的条件下培养细胞。在一些实施方案中,该方法在体外进行。

[0373] 本公开还提供了通过根据本公开的方法获得的或可获得的细胞。

[0374] 生产抗原结合分子和多肽

[0375] 根据本公开的抗原结合分子和多肽可以根据技术人员已知的用于产生多肽的方法来制备。

[0376] 多肽可以通过化学合成来制备,例如液相或固相合成。例如,可以使用例如 Chandrudu et al., *Molecules* (2013), 18:4373-4388 中描述的方法合成肽/多肽,该文献通过引用整体并入本文。

[0377] 或者,抗原结合分子和多肽可以通过重组表达来产生。适合重组产生多肽的分子生物学技术是本领域众所周知的,例如 Green and Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (4th Edition), Cold Spring Harbor Press, 2012, 和 Nat Methods. (2008); 5 (2): 135-146 中阐述的那些技术,两者均通过引用整体并入本文。用于重组产生抗原结合分子的方法也描述于 Frenzel et al., *Front Immunol.* (2013); 4: 217 以及 Kunert 和 Reinhart, *Appl Microbiol Biotechnol.* (2016) 100: 3451-3461, 两者的全部内容通过引用并入本文。

[0378] 对于根据本公开内容的重组生产,可以使用适合表达多肽的任何细胞。细胞可以是原核生物或真核生物。在一些实施方案中,细胞是原核细胞,例如古细菌或细菌的细胞。在一些实施方案中,细菌可以是革兰氏阴性细菌,例如肠杆菌科细菌,例如大肠杆菌。在一些实施方案中,细胞是真核细胞,例如酵母细胞、植物细胞、昆虫细胞或哺乳动物细胞,例如上文描述的细胞。

[0379] 在一些情况下,细胞不是原核细胞,因为一些原核细胞不允许进行与真核细胞相同的折叠或翻译后修饰。此外,真核生物中可能有非常高的表达水平,并且使用适当的标签可以更容易地从真核生物中纯化蛋白质。还可以使用增强蛋白质分泌到培养基中的特定质粒。

[0380] 在一些实施方案中,多肽可以通过无细胞蛋白质合成 (CFPS) 来制备,例如,根据 Zemella et al. *Chembiochem* (2015) 16 (17): 2420-2431 描述的系统,其全部内容通过引用并入本文。

[0381] 生产可以涉及经修饰以表达目的多肽的真核细胞的培养或发酵。培养或发酵可以在提供有适当的营养物、空气/氧气和/或生长因子的生物反应器中进行。可以通过从细胞中分离培养基/发酵液、提取蛋白质内容物并分离单个蛋白质以分离分泌的多肽来收集分泌的蛋白质。培养、发酵和分离技术是本领域技术人员众所周知的,并且描述于例如 Green 和 Sambrook, *分子克隆: 实验室手册* (第四版; 以上通过引用并入本文) 中。

[0382] 生物反应器包括一个或多个可在其中培养细胞的容器。生物反应器中的培养可以连续进行,反应物连续流入反应器,并且培养细胞连续流出反应器。或者,培养可以分批进行。生物反应器监测和控制环境条件,例如 pH、氧气、进出容器的流速以及容器内的搅拌,从而为培养的细胞提供最佳条件。

[0383] 培养表达抗原结合分子的细胞后,可以分离或纯化抗原结合分子 (例如从细胞培养物上清液)。可以采用任何合适的方法来分离/纯化通过培养物中的细胞表达产生的感兴趣的多肽。

[0384] 为了分离多肽,可能需要将细胞与营养培养基分离。如果多肽是从细胞分泌的,则

可以通过离心从含有所分泌的目的多肽的培养基中分离细胞。如果感兴趣的多肽收集在细胞内,则蛋白质分离可包括离心以将细胞与细胞培养基分离,用裂解缓冲液处理细胞沉淀,以及细胞破碎,例如通过超声处理、快速冻融或渗透裂解。

[0385] 然后可能需要从上清液或培养基中分离感兴趣的多肽,其可能含有其他蛋白质和非蛋白质组分。从上清液或培养基中分离蛋白质成分的常用方法是沉淀。不同溶解度的蛋白质在不同浓度的沉淀剂如硫酸铵下沉淀。例如,在低浓度的沉淀剂下,可提取水溶性蛋白质。因此,通过添加不同浓度的沉淀剂,可以区分不同溶解度的蛋白质。随后可以使用透析从分离的蛋白质中除去硫酸铵。

[0386] 用于区分不同蛋白质的其他方法是本领域已知的,例如离子交换层析和尺寸层析。这些可以用作沉淀的替代方案或者可以在沉淀之后进行。

[0387] 一旦从培养物中分离出感兴趣的多肽,可能需要或必须浓缩该多肽。许多用于浓缩蛋白质的方法是本领域已知的,例如超滤或冻干。

[0388] 组合物

[0389] 本公开还提供了包含本文所述的抗原结合分子、CAR、核酸、表达载体和细胞的组合物。

[0390] 本文所述的抗原结合分子、CARs、核酸、表达载体和细胞可以配制为用于临床用途的药物组合物或药物,并且可以包含药学上可接受的载体、稀释剂、赋形剂或佐剂。

[0391] 本公开的组合物可以包含一种或多种药学上可接受的载体(例如脂质体、胶束、微球体、纳米颗粒)、稀释剂/赋形剂(例如淀粉、纤维素、纤维素衍生物、多元醇、葡萄糖、麦芽糊精、硬脂酸镁)、佐剂、填充剂、缓冲剂、防腐剂(例如维生素A、维生素E、维生素C、棕榈酸视黄酯、硒、半胱氨酸、蛋氨酸、柠檬酸、柠檬酸钠、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯)、抗氧化剂(例如维生素A、维生素E、维生素C、棕榈酸视黄酯、硒)、润滑剂(例如硬脂酸镁、滑石粉、二氧化硅、硬脂酸、植物硬脂)、粘合剂(例如蔗糖、乳糖、淀粉、纤维素、明胶、聚乙二醇(PEG)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、木糖醇、山梨醇、甘露醇)、稳定剂、增溶剂、表面活性剂(例如润湿剂)、掩蔽剂或着色剂(例如钛氧化物)。

[0392] 本文使用的术语“药学上可接受的”涉及化合物、成分、材料、组合物、剂型等,其在合理的医学判断范围内适合与所讨论的受试者(例如人类受试者)的组织接触而没有过度毒性、刺激、过敏反应或其他问题或并发症,并与合理的效益/风险比相称。根据本公开内容的组合物的每种载体、稀释剂、赋形剂、佐剂、填充剂、缓冲剂、防腐剂、抗氧化剂、润滑剂、粘合剂、稳定剂、增溶剂、表面活性剂、掩蔽剂、着色剂、调味剂或甜味剂也必须在与制剂的其他成分相容的意义上是“可接受的”。合适的载体、稀释剂、赋形剂、佐剂、填充剂、缓冲剂、防腐剂、抗氧化剂、润滑剂、粘合剂、稳定剂、增溶剂、表面活性剂、掩蔽剂、着色剂、调味剂或甜味剂可以在标准药学教科书中找到,例如,Remington's The Science and Practice of Pharmacy' (Ed.A.Adejare),第23版(2020),Academic Press。

[0393] 该组合物可以配制用于局部、肠胃外、全身、腔内、静脉内、动脉内、肌内、鞘内、眼内、结膜内、瘤内、皮下、皮内、鞘内、口服或经皮施用途径。在一些实施方案中,药物组合物/药物可以配制用于通过注射或输注施用,或通过摄入施用。

[0394] 合适的制剂可以包含在无菌或等渗介质中的抗原结合分子。药物和药物组合物可以配制为流体形式,包括凝胶形式。流体制剂可以配制用于通过注射或输注(例如通过导

管)至人体或动物体的选定区域施用。

[0395] 在一些实施方案中,组合物被配制用于注射或输注,例如注射或输注。进入感兴趣的血管或组织/器官。

[0396] 本公开还提供了用于产生药学上有用的组合物的方法,此类产生方法可以包括选自以下的一个或多个步骤:产生本文所述的抗原结合分子、CAR、核酸、表达载体或细胞;分离本文所述的抗原结合分子、CAR、核酸、表达载体或细胞;和/或将本文所述的抗原结合分子、CAR、核酸、表达载体或细胞与药学上可接受的载体、佐剂、赋形剂或稀释剂混合。

[0397] 例如,本公开的另一方面涉及配制或生产用于治疗疾病/病症(例如本文所述的疾病/病症)的药物或药物组合物的方法,该方法包括通过将本文所述的抗原结合分子、CAR、核酸、表达载体或细胞与药学上可接受的载体、佐剂、赋形剂或稀释剂混合来配制药物组合物或药物。

[0398] 治疗和预防应用

[0399] 本文所述的抗原结合分子、CARs、核酸、表达载体、细胞和组合物可用于治疗和预防方法。

[0400] 本公开提供了本文所述的抗原结合分子、CAR、核酸、表达载体、细胞或组合物,其用于医学治疗或预防的方法中。还提供了本文所述的抗原结合分子、CAR、核酸、表达载体、细胞或组合物在制造用于治疗或预防疾病或病症的药物中的用途。还提供了治疗或预防疾病或病症的方法,包括向受试者施用治疗或预防有效量的本文所述的抗原结合分子、CAR、核酸、表达载体、细胞或组合物。

[0401] 根据本公开的治疗性或预防性干预可有效减少疾病/病症的发生或进展、减轻疾病/病症的症状或减轻疾病/病症的病理。干预措施可能有效预防疾病/病症的进展,例如防止疾病/病症恶化或减缓疾病/病症的发展速度。在一些实施方案中,该方法可以导致疾病/病症的改善,例如疾病/病症的症状减轻或疾病/病症的严重性/活动性的一些其他相关性的减轻。在一些实施方案中,该方法可以预防疾病/病症的后期发展(例如,更严重的阶段,或慢性阶段)。

[0402] 术语“发展(develop)”、“发展中(developing)”和“发展(development)”,例如本文所用的病症的发展,指疾病的发作以及疾病状态/其相关物的进展、恶化或恶化。

[0403] 应当理解,本公开的制品可用于治疗/预防任何疾病/病症,所述疾病/病症将从VEGFA, VEGFA/VEGFR介导的信号传导水平的降低、包含/表达VEGFA的细胞数量的减少和/或表达VEGFR的细胞活性的降低获得治疗或预防益处。疾病/病症可能例如是涉及VEGFA, VEGFA/VEGFR介导的信号传导的疾病/病症和/或病理上的包含/表达VEGFA/VEGFR的细胞的疾病/病症,例如,疾病/病症中VEGFA/VEGFR介导的信号传导水平升高和/或包含/表达VEGFA/VEGFR的细胞数量增加与疾病/病症的发作、发展或进展和/或疾病/病症的一种或多种症状的严重性正相关的疾病/病症,或者VEGFA/VEGFR介导的信号传导水平升高和/或细胞数量增加是疾病/病症的发作、发展或进展的危险因素。

[0404] 根据本文公开的方面和实施方案的治疗和预防主要涉及以VEGFA/VEGFR介导的信号传导为特征的疾病/病症。

[0405] 在一些实施方案中,根据本公开的治疗/预防的疾病/病症是以VEGFA表达水平增加为特征的疾病/病症,例如与不存在疾病/病症时VEGFA的表达水平相比,VEGFA表达水平

增加。在一些实施方案中,根据本公开的治疗/预防的疾病/病症是以表达VEGFR的细胞的数量/比例/活性增加为特征的疾病/病症,例如,与不存在疾病/病症时表达VEGFR的细胞的数量/比例/活性相比。

[0406] VEGFA/VEGFR介导的信号传导及其在疾病中的作用在综述中提及,例如Karaman Development (2018) 145 (14) :dev151019,Ferrara and Adamis,Nat Rev Drug Discov. (2016) 15 (6) :385-403和Claesson-Welsh and Welsh,J Intern Med. (2013) 273 (2) :114-27,所有这些均通过引用整体并入本文。

[0407] VEGFA/VEGFR介导的信号传导与多种疾病的发病机制有关。VEGFA可促进糖尿病视网膜病变和湿性年龄相关性黄斑变性等眼部疾病患者的血管生成、血视网膜屏障破坏、炎症和视力丧失。

[0408] VEGFs和VEGF受体也在非内皮细胞中表达,包括一些肿瘤细胞。肿瘤细胞分泌的VEGFA刺激内皮细胞的增殖和存活,导致新血管的形成,促进肿瘤生长。VEGFA中和抗体的开发和使用首次提供了肿瘤生长依赖于血管生成的直接证据,并证实了VEGFA在此过程中的重要性。

[0409] 在一些实施方案中,根据本发明的待治疗的疾病/病症选自:以病理性(即过度)血管生成为特征的疾病、癌症、表达VEGFA的癌症(即包含表达VEGFA的细胞的癌症;例如包含与相当的非癌性细胞的表达水平相比具有升高的VEGFA表达水平的细胞的癌症)、表达VEGFR的癌症(即包含表达VEGFR的细胞的癌症;例如包括与相当的非癌性细胞的表达水平相比具有升高的VEGFR表达水平的细胞的癌症)、眼部疾病、视网膜病、糖尿病性视网膜病、黄斑变性、年龄相关性黄斑变性、湿性(即新生血管性)年龄相关性黄斑变性、视网膜静脉阻塞、近视性脉络膜新生血管形成、早产儿视网膜病、新生血管性青光眼、中心性浆液性视网膜病、眼部肿瘤、角膜新生血管形成,炎症性疾病、自身免疫性疾病、关节炎、类风湿性关节炎、骨关节炎、牛皮癣、多发性硬化症、败血症、运动神经元疾病和肌萎缩侧索硬化症。

[0410] 应当理解,前一段中列举的某些疾病是相互关联的。例如,以病理性血管生成为特征的疾病包括癌症和眼部疾病。

[0411] 如本文所用,“病理性血管生成”是指血管生成(即,从现有血管丛生长出新血管),其中血管生成有助于疾病的发生和/或进展。

[0412] 在一些实施方案中,根据本公开的待治疗/预防的疾病/病症是癌症。癌症可以是任何不需要的细胞增殖(或通过不需要的细胞增殖表现出来的任何疾病)、赘生物或肿瘤。癌症可以是良性的或恶性的,并且可以是原发性的或继发性的(转移性的)。赘生物或肿瘤可以是细胞的任何异常生长或增殖并且可以位于任何组织中。癌症可以是源自组织/细胞,例如肾上腺、肾上腺髓质、肛门、阑尾、膀胱、血液、骨、骨髓、脑、乳腺、盲肠、中枢神经系统(包括或不包括大脑)、小脑、子宫颈、结肠、十二指肠、子宫内膜、上皮细胞(例如肾上皮)、胆囊、食道、神经胶质细胞、心脏、回肠、空肠、肾脏、泪腺、喉、肝、肺、淋巴、淋巴结、淋巴母细胞、上颌骨、纵膈、肠系膜、子宫肌层、鼻咽、大网膜、口腔、卵巢、胰腺、腮腺、周围神经系统、腹膜、胸、膜、前列腺、唾液腺、乙状结肠、皮肤、小肠、软组织、脾、胃、睾丸、胸腺、甲状腺、舌、扁桃体、气管、子宫、外阴、白细胞的癌症。

[0413] 待治疗的肿瘤可以是神经或非神经系统肿瘤。神经系统肿瘤可能起源于中枢或周围神经系统,例如神经胶质瘤、髓母细胞瘤、脑膜瘤、神经纤维瘤、室管膜瘤、神经鞘瘤、神经

纤维肉瘤、星形细胞瘤和少突胶质细胞瘤。非神经系统癌症/肿瘤可能起源于任何其他非神经组织,实例包括黑色素瘤、间皮瘤、淋巴瘤、骨髓瘤、白血病、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、霍奇金淋巴瘤、慢性粒细胞性白血病(CML)、急性髓性白血病(AML)、骨髓增生异常综合征(MDS)、皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、肝癌、表皮样癌、前列腺癌、乳腺癌、肺癌、结肠癌、卵巢癌、胰腺癌、胸腺癌、非小细胞肺癌、血液癌和肉瘤。

[0414] 治疗/预防可以针对以下一项或多项:延迟/预防癌症症状的发作/进展、降低癌症症状的严重性、减少癌症细胞的存活/生长/侵袭/转移、减少癌症细胞的数量和/或增加受试者的存活。

[0415] 在一些实施方案中,待治疗/预防的癌症包含表达VEGFA的细胞。在一些实施方案中,待治疗/预防的癌症包含表达VEGFR的细胞。在一些实施方案中,待治疗/预防的癌症是VEGFA阳性的癌症。在一些实施方案中,待治疗/预防的癌症是VEGFR阳性的癌症。在一些实施方案中,癌症过表达VEGFA。在一些实施方案中,癌症过表达VEGFR。VEGFA和/或VEGFR的过度表达可以通过检测VEGFA和/或VEGFR相关因子的表达水平高于同等非癌细胞/非肿瘤组织的表达水平来确定。

[0416] VEGFA和/或VEGFR表达可以通过任何合适的方法测定。表达可以是基因表达或蛋白质表达。基因表达可以被确定,例如通过检测编码VEGFA和/或VEGFR的mRNA,例如通过实时定量PCR(qRT-PCR)。蛋白质表达可以被确定,例如通过检测VEGFA和/或VEGFR,例如通过基于抗体的方法,例如通过蛋白质印迹、免疫组织化学、免疫细胞化学、流式细胞术或ELISA。

[0417] 在一些实施方案中,可以基于表达VEGFA和/或VEGFR、或过表达VEGFA和/或VEGFR的癌症的检测来选择患者进行本文所述的治疗,例如,在从受试者获得的样本中。

[0418] VEGFA/VEGFR拮抗剂已被研究作为治疗/预防多种癌症的药剂,例如Kieran et al., Cold Spring Harb Perspect Med. 2012 Dec; 2(12): a006593所述(通过引用将其全部内容并入本文;参见例如表2)。在一些实施方案中,根据本公开的待治疗/预防的癌症选自:实体瘤、血液恶性肿瘤、髓系血液恶性肿瘤、急性髓系白血病、多发性骨髓瘤、乳腺癌、肾癌、肾细胞癌、肺癌、非小细胞肺癌、甲状腺癌、甲状腺髓样癌、脑/脊髓癌、成胶质细胞瘤、神经胶质瘤、高级神经胶质瘤、头颈癌、皮肤癌、黑色素瘤、鳞状细胞癌、肝癌、肝细胞癌、胰腺癌、胃癌、肠癌、结肠癌、直肠癌、结直肠癌、胆管癌、胆管癌、骨癌、肉瘤、卵巢癌、宫颈癌、腹膜癌、前列腺癌、尿路上皮癌、神经内分泌癌。在一些实施方案中,待治疗/预防的癌症是原发性癌症。在一些实施方案中,待治疗/预防的癌症是继发性癌症(即转移)。

[0419] VEGFA/VEGFR靶向干预也已被研究用于治疗/预防眼部疾病,如Cornel et al., Rom J Ophthalmol. (2015) 59(4): 235-242,其全部内容通过引用并入本文。在一些实施方案中,根据本公开内容治疗/预防的疾病/病症选自:眼部疾病、视网膜病、糖尿病性视网膜病、黄斑变性、年龄相关性黄斑变性、湿性(即新生血管性)年龄相关性黄斑变性、视网膜静脉阻塞、近视性脉络膜新生血管、早产儿视网膜病、新生血管性青光眼、中心性浆液性视网膜病、眼部肿瘤和角膜新生血管。

[0420] VEGFA/VEGFR介导的信号传导也与炎症和自身免疫性疾病的病理学有关,如Le and Kwon, Int J Mol Sci. (2021) 22(10): 5387, Marina et al., Clujul Med. (2015) 88(3): 247-252, Ferrara, Endocr Rev. (2004) 25(4): 581-611和Azimi et al., Neurol Sci.

(2020) 41 (6) :1459-1465中所述,所有这些均通过引用整体并入本文。在一些实施方案中,根据本公开待治疗/预防的疾病/病症选自:炎性疾病、自身免疫性疾病、关节炎、类风湿性关节炎、骨关节炎、牛皮癣、多发性硬化症和败血症。

[0421] VEGFA/VEGFR介导的信号传导也与运动神经元疾病例如肌萎缩侧索硬化症的病理学有关,例如Lambrechts et al., Nat Genet. (2003) 34 (4) :383-94所述。在一些实施方案中,根据本公开的待治疗/预防的疾病/病症是运动神经元疾病或肌萎缩侧索硬化症。

[0422] 根据本公开的各个方面,提供了用于或包括(例如,在如本文所述的治疗/预防性干预的背景下)抑制VEGFA和VEGFR(即VEGFA受体,例如VEGFR1)之间的相互作用和/或抑制VEGFA/VEGFR介导的信号传导的方法。

[0423] 还提供了用于此类方法的根据本公开的试剂,以及根据本公开的试剂在制造用于此类方法的组合物(例如药物)中的用途。在一些实施例中,根据本公开的治疗/预防性干预可以被描述为与前一段中描述的一种或多种效果“相关”。技术人员能够使用本领域常规实践的技术容易地评估这些性质。

[0424] 本公开的制品的施用优选以“治疗有效”或“预防有效”量,这足以显示对受试者的治疗或预防益处。实际施用量以及施用速率和时程将取决于疾病/病症的性质和严重性以及所施用的特定制品。治疗处方,例如剂量等的决定,在全科医生和其他医生的责任范围内,并且通常考虑待治疗的疾病/病症、患者的病症。个体受试者、给药部位、给药方法和从业者已知的其他因素。上述技术和方案的示例可以在雷明顿的《药学科学与实践》(A.Adejare编),第23版(2020年),学术出版社中找到。

[0425] 施用可以单独或与其他治疗组合,取决于待治疗的病症同时或顺序施用。本文所述的抗原结合分子或组合物和治疗剂可以同时或依次施用。

[0426] 同时施用是指将本公开内容的抗原结合分子、CAR、核酸、表达载体、细胞或组合物与其他治疗剂一起施用,例如作为包含两种试剂的药物组合物(即,在组合制剂的情况下),或在彼此之后立即施用,并且任选地通过相同的施用途径,例如至同一动脉、静脉或其他血管。顺序施用是指施用一种药剂,然后在给定的时间间隔后单独施用另一种药剂。它不是需要两种药剂通过相同途径施用,尽管在一些实施方案中是这种情况。该时间间隔可以是任意时间间隔。

[0427] 可以提供多剂量的抗原结合分子、CAR、核酸、表达载体、细胞或组合物。一个或多个或每个剂量可以伴随同时或顺序施用另一种治疗剂。多个剂量可以由预定时间间隔分开,该预定时间间隔可以选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或31天,或1、2、3、4、5或6个月。举例来说,可以每7、14、21或28天(正负3、2或1天)给予一次剂量。

[0428] 检测方法

[0429] 本公开还提供了用于检测VEGFA的方法或用于检测包含/表达VEGFA的细胞的方法的本公开的制品。

[0430] 本文描述的抗原结合分子可以用于涉及检测抗原结合分子与VEGFA的结合的方法中。这些方法可以涉及抗原结合分子和VEGFA的结合复合物的检测。

[0431] 因此,提供了一种方法,包括接触含有或疑似含有VEGFA的样品,并检测抗原结合分子和VEGFA的复合物的形成。还提供了一种方法,其包括接触含有或疑似含有包含/表达

VEGFA的细胞的样品,并检测抗原结合分子和包含/表达VEGFA的细胞的复合物的形成。

[0432] 合适的方法形式是本领域众所周知的,包括免疫测定法,如夹心测定法,例如ELISA。所述方法可涉及用可检测的片段标记抗原结合分子或靶标或两者,例如本文所述的荧光标记、磷光标记、发光标记、免疫可检测标记、放射性标记、化学标记、核酸标记或酶标记。检测技术对于本领域技术人员来说是众所周知的,并且可以选择与标记剂相对应。

[0433] 包括检测VEGFA或包含/表达VEGFA的细胞的方法包括用于诊断/预测其中病理学涉及VEGFA表达/活性的疾病/病症的方法。

[0434] 这种方法可以在体外对患者样品进行,或者在处理患者样品后进行。一旦收集了样品,进行体外方法时不需要患者在场,因此该方法可能不是在人体或动物体上实施的方法。在一些实施方案中,该方法在体内进行。

[0435] 这些方法可能涉及检测或定量一种或多种:VEGFA,包括/表达VEGFA的细胞,例如在患者样本中。当该方法包括量化相关因素时,该方法可以进一步包括将所确定的量与作为诊断或预后评估的一部分的标准值或参考值进行比较。其他诊断/预后测试可与本文描述的测试一起使用,以提高诊断或预后的准确性,或确认使用本文描述的测试获得的结果。

[0436] 样品中的检测可用于疾病/病症(例如癌症)的诊断、对疾病/病症的倾向,或用于提供疾病/病症(例如本文所述的疾病/病症)的预后(预测)。诊断或预后可能与现有的(先前诊断的)疾病/状况有关。

[0437] 样品可以取自任何组织或体液。样品可以包含或可以源自:一定量的血液;一定量的源自个体血液的血清,其可能包含去除纤维蛋白凝块和血细胞后获得的血液的液体部分;组织样本或活检;胸膜液;脑脊液(CSF);或从所述个体分离的细胞。在一些实施方案中,样品可以获自或源自受疾病/病症影响的一个或多个组织(例如,其中表现出疾病症状的一个或多个组织,或者参与疾病/病症发病机制的组织)。

[0438] 本公开还提供了选择/分类受试者用VEGFA靶向药物治疗的方法。在一些实施例中,根据本公开选择受试者进行治疗/预防,或者基于VEGFA的检测/定量或包含/表达VEGFA的细胞,例如在从个体获得的样品中,将受试者确定为将受益于此类治疗/预防的受试者。

[0439] 受试者

[0440] 根据本公开的受试者可以是任何动物。在一些实施方案中,受试者可以是哺乳动物。在一些实施方案中,受试者可以是人类。在一些实施方案中,受试者可以是非人类动物,例如非人类哺乳动物。受试者可以是男性或女性。

[0441] 受试者可以是患者。患者可能患有本文所述的疾病/病症。受试者可能已被诊断患有本文所述的疾病/病症,可能怀疑患有本文所述的疾病/病症,或可能处于本文所述的疾病/病症进展的风险中。

[0442] 可以基于本文所述的疾病/病症的标志物的表征来选择受试者/患者用于根据本公开的治疗/预防。

[0443] 在根据本公开的一些实施方案中,受试者优选是人类受试者。在一些实施方案中,根据本公开的治疗或预防方法治疗的受试者是患有本文所述的疾病或处于发生本文所述的疾病的风险的受试者。

[0444] 试剂盒

[0445] 在本公开的一些方面中,提供了一套试剂盒。在一些实施方案中,试剂盒可具有至

少一个容器,所述容器装有预定量的本文所述的抗原结合分子、核酸、表达载体、细胞或组合物。

[0446] 在一些实施方案中,试剂盒可以包含用于产生本文所述的抗原结合分子、核酸、表达载体、细胞或组合物的材料。

[0447] 试剂盒可以提供抗原结合分子、核酸、表达载体、细胞或组合物,连同向患者施用以治疗特定疾病/病症的说明。

[0448] 根据本公开的试剂盒可以包括使用说明书,例如以说明书或传单的形式。该说明可以包括用于执行本文描述的任何一种或多种方法的方案。

[0449] 序列同一性

[0450] 如本文所用,“序列同一性”是指主体序列中与参考序列中的核苷酸/氨基酸残基相同的核苷酸/氨基酸残基的百分比,比对序列并在必要时引入空位,以获得序列之间序列同一性的最大百分比。成对和多重序列比对可用于确定两个或更多个氨基酸或核酸序列之间的序列同一性百分比,可以以本领域技术人员已知的各种方式实现,例如,使用公开可用的计算机软件例如Clustal0mega (Söding, J., Bioinformatics (2005) 21, 951-960), T-coffee (Notredame et al., J. Mol. Biol. (2000) 302, 205-217), Kalign (Lassmann and Sonnhammer, BMC Bioinformatics (2005) 6, 298) 和MAFFT (Kato and Standley, Molecular Biology and Evolution (2013) 30 (4) 772-780)。使用此类软件时,优选使用默认参数,例如空位罚分和延伸罚分。

[0451] 序列

[0452]

SEQ ID NO.	描述	序列
1	13A6	SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAISGFLAATDIDWVRQAPGKGLEWWARIFPSAGSTDYA DSVKGRFTISADTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCGRSDSYSYNVFLHNPTYALTDIRGQGT LTVSS
2	13A6, 16A6.1 CDR1	SLAATD
3	13A6 CDR2	FPSAGSTD
4	13A6 CDR3	GRSDSYSYNVFLHNPTYALD
5	16A2.1	SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAISGFALAETDIDWVRQAPGKGLEWWARIFSSGGNTDYA DSVKGRFTISADTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCGRSDSIAYNVILPNSTYTARDYRGQGT LTVSS
6	16A2.1 CDR1	ALAETD
7	16A2.1 CDR2	FSSGGNTD
8	16A2.1 CDR3	GRSDSIAYNVILPNSTYTARD
9	16A6.1	SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAISGFLAATDIDWVRQAPGKGLEWWARIFPSGSTDYT DSVKGRFTISADTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCGRSDSYSYNVFLHDPAYTALDIRGQGT LTVSS
10	16A6.1 CDR2	FPFSGSTD
11	16A6.1 CDR3	GRSDSYSYNVFLHDPAYTALD
12	20A2.1	SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAISGFPLADTDIDWVRQAPGKGLEWWARIFSSYGSTDYA DSVKGRFTISADTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCGRSDSIAYNIILPASTYSSRDYRGQGT LTVSS
13	20A2.1 CDR1	PLADTD
14	20A2.1 CDR2	FSSYGSTD
15	20A2.1 CDR3	GRSDSIAYNIILPASTYSSRD
16	20A3.1	SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAISGFLADTDIDWVRQAPGKGLEWWARIFSSSGSTYYA DSVKGRFTISADTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCDRADSVGYNVIFPGSTYSRSGYRGQGT LTVSS
17	20A3.1 CDR1	SLADTD
18	20A3.1 CDR2	FSSSGSTY
19	20A3.1 CDR3	DRADSVGYNVIFPGSTYSRSG
20	21A1.1	SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAISGFALATTDIDWVRQAPGKGLEWWARIFNPSTFTDYA DSVKGRFTISADTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCGRPAVYGYNIFLDSPTYDASQYRGQGT LTVSS
21	21A1.1 CDR1	ALATTD
22	21A1.1 CDR2	FNPSDFTD
23	21A1.1 CDR3	GRPAVYGYNIFLDSPTYDASQ
24	21A8.1	SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAISGFSVDATDIDWVRQAPGKGLEWWARIFSPSGFTDYA DSVKGRFTISADTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCDRPEFYAYNIFHDPRTVPAGNYRGQGT LTVSS
25	21A8.1 CDR1	SVDATD
26	21A8.1 CDR2	FSPSGFTD
27	21A8.1 CDR3	DRPEFYAYNIFHDPRTVPAGN
28	21D9.1	SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAISGFLGATDIDWVRQAPGKGLEWWARIFSPSTFTDYA DSVKGRFTISADTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCSRPDYAYNIFPHTASHGAFNYRGQGT LTVSS
29	21D9.1 CDR1	SLGATD
30	21D9.1 CDR2	FSPSTFTD
31	21D9.1 CDR3	SRPDYAYNIFPHTASHGAFN
32	21E6.1	SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAISGFLAATDIDWVRQAPGKGLEWWARIFPTGFSDYA DSVKGRFTISADTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCGIPELYAYNIFMDIPAYNDVYRGQGT LTVSS
33	21E6.1 CDR1	TLAATD
34	21E6.1 CDR2	FTPTGFSD
35	21E6.1 CDR3	GIPELYAYNIFMDIPAYNDVY
36	23D5.1	SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAISGFLATTDIDWVRQAPGKGLEWWARIFRPSTFTDYA DSVKGRFTISADTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCVRPDSYAYNIFVTRTFNALHYRGQGT LTVSS
37	23D5.1 CDR1	DLATTD
38	23D5.1 CDR2	FRPSTFTD

[0453]

[0457] 本公开的方面和实施方案通过实施例以及参考附图的方式进行说明。其他方面和实施方案对于本领域技术人员来说将是显而易见的。本文中提及的所有文件均通过引用并入本文。

[0458] 贯穿本说明书,包括所附的权利要求书,除非上下文另有要求,词语“包含”以及诸如“包含”和“包含”的变体将被理解为包括所规定的整数或步骤或整数或步骤组,但不排除任何其他整数或步骤或整数或步骤组。

[0459] 必须注意的是,如说明书和所附权利要求中所使用的,单数形式“一”、“一个”和“该”包括复数指示物,除非上下文另外明确指出。范围在本文中可以表达为从“约”一,个特定值和/或到“约”另一特定值。当表达这样的范围时,另一实施例包括从一个特定值和/或到另一特定值。类似地,当通过使用先行词“大约”将值表达为近似值时,将理解该特定值形成另一个实施例。

[0460] 当本文公开核酸序列时,还明确考虑了其反向互补序列。

[0461] 本文描述的方法可以优选在体外进行。术语“体外”旨在涵盖用培养细胞进行的步骤,而术语“体内”旨在涵盖使用/在完整多细胞生物体上进行的步骤。

[0462] 附图简要说明

[0463] 现在将参照附图讨论说明本公开的原理的实施例和实验。

[0464] 图1:总结文库1和文库2、4D5(曲妥珠单抗)和起始模板的CDR1、CDR2和CDR3区域的氨基酸差异的表格。“Xaa”表示随机氨基酸。

[0465] 图2A至2K:传感图显示(2A) 13A6、(2B) 16A2.1、(2C) 16A6.1和(2D) 16A2.1x2、(2E) 20A2.1、(2F) 20A3.1、(2G) 21A1.1、(2H) 21A8.1、(2I) 21D9.1、(2J) 21E6.1和(2K) 23D5.1与人VEGFA的结合,通过生物层干涉测量法(BLI)测量。结合曲线下方列出了每个DotBody测试的浓度(以nM为单位)。

[0466] 图3A至3J:传感图显示(3A) 13A6、(3B) 16A2.1、(3C) 16A6.1、(3D) 20A2.1、(3E) 20A3.1、(3F) 21A1.1、(3G) 21A8.1、(3H) 21D9.1、(3I) 21E6.1和(3J) 23D5.1与小鼠VEGFA的结合,通过生物层干涉测量法(BLI)测量。结合曲线下方列出了每个DotBody测试的浓度(以nM为单位)。

[0467] 图4:该图显示在竞争性ELISA中13A6、16A2.1、16A6.1和雷珠单抗对人VEGFA和VEGFR1之间相互作用的抑制。

[0468] 图5A至5I:该图显示在竞争性ELISA中(5A) 16A2.1、(5B) 20A2.1、(5C) 20A3.1、(5D) 21A1.1、(5E) 21A8.1、(5F) 21D9.1、(5G) 21E6.1、(5H) 23D5.1和(5I) 雷珠单抗对人VEGFA和VEGFR1之间的相互作用的抑制。

[0469] 图6A至6H:传感图显示,在室温、60℃、70℃或80℃下孵育1小时后,抗VEGFA DotBodies (6A) 16C2.1、(6B) 20A2.1、(6C) 20A3.1、(6D) 21A1.1、(6E) 21A8.1、(6F) 21D9.1、(6G) 21E9.1和(6H) 23D5.1在单一浓度250nM下与人VEGFA结合。如实施例10中所述通过BLI进行测量。

实施例

[0470] 实施例1:生成天然合成DotBody噬菌体展示文库

[0471] 两个DotBody噬菌体展示文库用于鉴定抗VEGF DotBody。这些文库基于源自曲妥

珠单抗VH结构域的人源化、稳定且自主的VH结构域模板(“DotBody支架专利”,例如在WO 2016/072938A1中描述)。

[0472] 文库1基于以下VH结构域模板序列(为文库创建而突变的位置加下划线):

[0473] SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSSAISGFSISSTSIDWVRQAPGKGLEWVARISPSSGSTSYADSVKGRF
TISADTSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYTGRSSSAMDYRGQGTTLVTSS

[0474] 文库2基于以下VH结构域模板序列(为文库创建而突变的位置加下划线):

[0475] SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAISGFSISSTSIDWVRQAPGKGLEWVARISPSSGSTSYADSVKGRF
TISADTSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCGRSSSAMDYRGQGTTLVTSS

[0476] VH结构域模板的CDR-1、CDR-2和CDR-3根据图1所示的设计进行随机化突变,根据Bostrom J.et al. (14,15)和Tonikian R.et al. (16)的步骤,进行Kunkel诱变。用于文库1的引物如表1所示,而用于文库2的引物如表2所示。

[0477] 库1包含大约 2.87×10^{10} 个克隆,而库2包含大约 1.37×10^{10} 个克隆。所有克隆的CDRs均发生突变。文库转化后通过系列稀释和菌落计数进行评估。

引物名称	引物序列
H1	CCTCTGCAATTTCTGGCTTC [XYZ] NTT [XYZ][XYZ] ACT [XYZ] ATAGACTGGGTGCGTCAGG
H2	CTGGAATGGGTTGCAAGGATT [XYZ] CCT [XYZ][XYZ] GGT [XYZ] ACT [XYZ] TATGCCGATAGCGTCAAGGG
H3.6	GCCGTCTATTATACTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG
H3.7	GCCGTCTATTATACTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG
H3.8	GCCGTCTATTATACTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG
H3.9	GCCGTCTATTATACTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG
H3.10	GCCGTCTATTATACTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG
H3.11	GCCGTCTATTATACTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG
H3.12	GCCGTCTATTATACTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG
[0478] H3.13	GCCGTCTATTATACTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG
H3.14	GCCGTCTATTATACTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG
H3.15	GCCGTCTATTATACTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG
H3.16	GCCGTCTATTATACTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG
H3.17	GCCGTCTATTATACTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG
H3.18	GCCGTCTATTATACTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] [XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG
H3.19	GCCGTCTATTATACTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] [XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG
H3.20	GCCGTCTATTATACTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] [XYZ][XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG

[0479] 表1,用于创建文库1的引物。在对VH模板序列进行Kunkel诱变之前,将引物H1和H2与引物H3.6-H3.20混合,以创建15个子文库,随后将这些子文库组合以形成最终文库。密码子[XYZ]的核苷酸频率如下: $X=0.2G+0.2A+0.5T+0.1C$, $Y=0.4A+0.2T+0.4C$ 和 $Z=0.1G+0.9C$ 。

[0480]

引物名称	引物序列
H1	CCTGTGCAATTTCTGGCTTC [XYZ] NTT [XYZ][XYZ] ACT [XYZ] ATAGACTGGGTGCGTCAGG
H2	CTGGAATGGGTTGCAAGGATT [XYZ] CCT [XYZ][XYZ] GGT [XYZ] ACT [XYZ] TATGCCGATAGCGTCAAGGG
H3.6	GCCGTCTATTATTGTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG
H3.7	GCCGTCTATTATTGTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG
H3.8	GCCGTCTATTATTGTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG
H3.9	GCCGTCTATTATTGTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG
H3.10	GCCGTCTATTATTGTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG
H3.11	GCCGTCTATTATTGTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG
H3.12	GCCGTCTATTATTGTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG
H3.13	GCCGTCTATTATTGTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG
H3.14	GCCGTCTATTATTGTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG
H3.15	GCCGTCTATTATTGTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG
H3.16	GCCGTCTATTATTGTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG
H3.17	GCCGTCTATTATTGTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG
H3.18	GCCGTCTATTATTGTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG
H3.19	GCCGTCTATTATTGTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] [XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG
H3.20	GCCGTCTATTATTGTGKCCGC [XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ][XYZ] [XYZ][XYZ][XYZ] GSTNTKGACTACCGGGGTCAAG

[0481] 表2.用于创建文库2的引物。在对VH模板序列进行Kunkel诱变之前,将引物H1和H2与引物H3.6-H3.20混合,以创建15个子文库,随后将这些子文库组合以形成最终文库。密码子[XYZ]的核苷酸频率如下: $X=0.2G+0.2A+0.5T+0.1C$, $Y=0.4A+0.2T+0.4C$ 和 $Z=0.1G+0.9C$ 。

[0482] 实施例2:来自天然合成DotBody噬菌体展示文库的噬菌体展示

[0483] 将人VEGF-121(Acro Biosystems)固定在Maxisorp免疫管(Thermo Scientific)上,循环1为1mL PBS中20 μ g,后续循环中为1mL PBS中10 μ g,在4 $^{\circ}$ C下过夜。将管子在PBS中洗涤两次,并在室温(RT)条件下在牛奶封闭缓冲液(MBB:1%脱脂奶加入PBST中,即含有0.05%Tween-20的PBS)封闭1小时。按照与VEGF-121描述相同的方式制备阴性筛选管,但使用PBS代替VEGF-121蛋白,500 μ L文库1和文库2(约 2×10^{13} pfu/mL)用PEG/氯化钠缓冲液(20%PEG 8,000,2.5M氯化钠)沉淀,并重悬于MBB中,然后转移至阴性筛选管中在室温下孵育1小时。将噬菌体转移至涂有VEGF-121的免疫管中并在室温下孵育2小时。然后用MBB洗涤管3次,用PBST洗涤3次,用PBS洗涤2次,以除去未结合的噬菌体。用含有1mg/mL胰蛋白酶的胰蛋白酶缓冲液(TBS+2mM CaCl₂)洗脱结合的噬菌体。洗脱的噬菌体用于感染5mL TG1细菌细胞(在2YT培养基中),其处于指数生长期($OD_{600} \sim 0.5$)在37 $^{\circ}$ C培养30分钟。从第2轮开始,将

1.2mL感染的TG1细胞与20%甘油一起储存在-80℃下,以用于单克隆筛选(用于单克隆筛选的甘油储液)。将剩余的已感染TG1细胞转移至50mL 2YT。在用 1×10^{10} pfu/mL M13K07辅助噬菌体于37℃感染30分钟之前,将培养物在37℃下摇动孵育,直至 $OD_{600} \sim 0.5$ 。将受感染的TG1细胞在4℃下以3,900g沉淀20分钟,重悬于500 μ L 2YT肉汤中,并铺在补充有100 μ g/mL羧苄青霉素和50 μ g/mL卡那霉素的2x15cm圆形2YT琼脂平板上。30℃过夜孵育后,将菌苔重悬于25mL TBS中。通过用PEG/NaCl缓冲液沉淀来纯化产生的噬菌体。两轮PEG/NaCl沉淀后,将噬菌体重悬于PBS+10%甘油中。纯化的噬菌体用于下一轮选择。

[0484] 针对VEGF-121进行了四轮选择。从第二轮选择开始,洗涤次数增加如下:

[0485] • 第2轮:MBB洗涤4次,PBST洗涤4次,PBS洗涤2次。

[0486] • 第3轮:MBB洗涤6次,PBST洗涤6次,PBS洗涤2次。

[0487] • 第4轮:MBB洗涤7次,PBST洗涤7次,PBS洗涤2次。

[0488] 从第二轮选择开始,从上一轮选择中纯化出1mL噬菌体,终浓度为 1×10^{12} pfu/mL。其余的淘选过程是相同的。

[0489] 实施例3:通过单克隆噬菌体ELISA鉴定独特的结合物

[0490] 使用单克隆噬菌体ELISA来鉴定从初始文库以及亲和力成熟文库中选择独特结合DotBodies。将用于单克隆筛选的甘油储液接种到补充有100 μ g/mL羧苄青霉素的2YT琼脂平板上,并在37℃下孵育过夜。在用 1×10^{10} pfu/mL M13K07辅助噬菌体感染之前,将各个菌落在补充有100 μ g/mL羧苄青霉素的1mL 2YT肉汤中生长2小时。培养物进一步补充50 μ g/mL卡那霉素并在30℃下孵育过夜。

[0491] 通过在4℃下以1,100g离心10分钟来沉淀细胞,并且将上清液用于噬菌体单克隆ELISA。在噬菌体单克隆ELISA中,将VEGF-121以1 μ g/mL的浓度固定在Maxisorp 96孔板(Thermo Scientific)上,4℃过夜,用PBS洗涤两次,并用MBB在室温下封闭1小时。将25 μ L噬菌体培养物上清液与25 μ L MBB混合,添加到板中并在RT下孵育2小时。将板用PBST洗涤8次,添加50 μ L抗M13抗体HRP缀合物(GE Healthcare),按照1:7,000的稀释比例加入到MBB中,并在RT温育1小时。将板用PBST洗涤8次,并用50 μ L的3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)底物(GeneTex)显色。5-15分钟后,通过添加50 μ L 2M H_2SO_4 终止反应,并在450nm吸光度处测量信号。通过Sanger测序对具有高信号强度(吸光度高于1)的单克隆克隆进行测序,以鉴定与VEGF-121结合的独特VH结构域。

[0492] 实施例4:亲和力成熟噬菌体展示文库的构建

[0493] 选择抗VEGF DotBody 13A6进行亲和力成熟,因为其结合亲和力低于50nM,并且还阻断VEGFA和VEGF受体1(VEGFR1)之间的相互作用。根据Bostrom J.等人(14)、通过Kunkel诱变创建亲和力成熟噬菌体展示文库,使用表3所示的引物。该文库包含 1.1×10^8 个独特的序列,通过将文库电穿孔到TG1细胞中进行系列稀释、铺板到补充有100 μ g/mL羧苄青霉素的2YT琼脂上,随后对来自30个菌落的质粒进行测序。

[0494]

引物名称	引物序列
aVEGF-13A6 CDR1	TGTGCAATTTCTGGCTTC878788678678577657ATAGACTGGGTGCGTCAG
aVEGF-13A6 CDR2	GAATGGGTTGCAAGGATT888776878678668878577657TATGCCGATAGCGTCAAG
aVEGF-13A6 CDR3	ACTGCCGTCTATTATTGT66856587865787885787885755868888878875755877657785757767 8788657TACCGGGGTCAAGGAACA

[0495] 表3.用于生成抗VEGF DotBody 13A6的亲合力成熟噬菌体展示文库的引物的DNA序列。序列中的数字代表寡核苷酸序列中碱基A、T、C和G的频率。频率代码5=70%A、10%G、10%C、10%T;6=70%G、10%A、10%C、10%T;7=70%C、10%A、10%G、10%T;8=70%T、10%A、10%G、10%C。

[0496] 实施例5:基于13A6的亲合力成熟噬菌体展示的筛选

[0497] 将中性抗生物素蛋白以10 μ g在1mL PBS中固定在Maxisorp免疫管(ThermoScientific)上,在4 $^{\circ}$ C过夜。将管在PBS中洗涤两次,并在室温(RT)下在MBB中封闭1小时。根据筛选轮次以不同浓度添加生物素化VEGF-121(Acro Biosystems)(参见表4)。将蛋白质在室温下孵育1小时,并用PBS洗涤两次去除未结合的蛋白质。按照针对生物素化VEGF-121的描述制备阴性筛选管,但添加PBS代替生物素化VEGF-121。

[0498] 其余的筛选步骤与来自天然合成DotBody噬菌体展示文库的噬菌体展示筛选相似,但有一些变化,如表4所示。

[0499]

改变	细节
筛选轮数	5轮严密程度递增
衔接蛋白	生物素结合蛋白固定在Maxisorp盘上,如下: • 第1轮: 2 ml 中 20 μg 中性抗生物素蛋白 • 第2轮: 2 ml 中 10 μg 链霉亲和素 • 第3轮: 2 ml 中 10 μg 中性抗生物素蛋白 • 第4轮: 2 ml 中 10 μg 链霉亲和素

[0500]		第 5 轮: 2 ml 中 10 μg 中性抗生物素蛋白
	生物素化 VEGF-121 固定的量	在不同的轮次中, 在衔接蛋白包被管上孵育浓度降低的生物素化 VEGF-121: - 第 1-2 轮: 300 nM - 第 3-5 轮: 15 nM
	加入 VEGF-121 的噬菌体的量	文库在不同轮次中以不同浓度稀释到 1 mL MBB 中: - 第 1 轮: 1×10^{13} pfu/ml 亲和力成熟的噬菌体展示文库 - 第 2 轮: 1×10^{12} pfu/ml 来自上一轮的纯化的噬菌体 - 第 3-5 轮: 5×10^{11} pfu/ml 来自上一轮的纯化的噬菌体
	噬菌体和 VEGF-121 的孵育时间	噬菌体在阴性筛选管中室温孵育 1h, 然后转移至含有 VEGF-121 的管中, 并在不同轮次中室温孵育不同的时间: - 第 1 轮: 2 h - 第 2 轮: 1 h - 第 3 轮: 30 min - 第 4 轮: 10 min - 第 5 轮: 3 min
	洗脱未结合的噬菌体	未结合的噬菌体在不同轮次中被不同批次洗脱液去除: - 第 1 轮: MBB 洗涤 3 次, PBST 洗涤 3 次, PBS 洗涤 2 次 - 第 2 轮: MBB 洗涤 4 次, PBST 洗涤 4 次, PBS 洗涤 2 次 - 第 3 轮: MBB 洗涤 10 次, PBST 洗涤 10 次, PBS 洗涤 2 次 - 第 4 和 5 轮: MBB 洗涤 15 次, PBST 洗涤 15 次, PBS 洗涤 2 次

[0501] 表4, 基于13A6的噬菌体展示文库针对生物素化VEGF-121的亲和力成熟筛选条件。基于13A6的亲和力成熟噬菌体展示筛选产生16A2.1、16C2.1和16A6.1。

[0502] 实施例6: 基于16A2.1的亲和力成熟噬菌体展示文库构建

[0503] 选择抗VEGF DotBody 16A2.1进行亲和力成熟, 因为其结合亲和力低于5nM, 并且还阻断VEGFA和VEGF受体1 (VEGFR1) 之间的相互作用。根据Bostrom J. 等人 (14)、通过Kunkel 诱变创建亲和力成熟噬菌体展示文库, 使用表5所示的引物。由于CDR3含有潜在的N-糖基化位点 (“NST” 序列), 因此为此CDR设计了三种引物, 其中一种引物保留了亲本序列, 另两种引物在进行随机引物设计之前进行了如下更改 (更改以下划线表示):

[0504] 16A2.1 (AST):

[0505] SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAISGFALAETDIDWVRQAPGKGLEWVARIFSSGGNTDYADSVKGRF
TISADTSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCGRSDSIAYNVILPASTYTARDYRGQGT¹LVTVSS

[0506] 16A2.1 (NSA):

[0507] SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAISGFALAETDIDWVRQAPGKGLEWVARIFSSGGNTDYADSVKGRF
TISADTSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCGRSDSIAYNVILPNSAYTARDYRGQGT¹LVTVSS

[0508] 得到的文库含有 0.6×10^8 个独特的序列,通过将文库电穿孔到TG1细胞中进行系列稀释、铺板到补充有100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 羧苄青霉素的2YT琼脂上,以及随后对来自几个菌落的质粒进行测序以确定突变率:

引物名称	引物序列
aVEGF-16A2.1 CDR1	TGTGCAATTTCTGGCTTC678788678655577657ATAGACTGGGTGCGTCAG
aVEGF-16A2.1 CDR2	GAATGGGTTGCAAGGATT888878878668668558577657TATGCCGATAGCG TCAAG
[0509] aVEGF-16A2.1 CDR3	ACTGCCGTCTATTATTGT668565878657878588678857558688588788776558 878577857577678565657TACCGGGGTCAAGGAACA
aVEGF-16A2.1(AST) CDR3	ACTGCCGTCTATTATTGT668565878657878588678857558688588788776558 878678857577678565657TACCGGGGTCAAGGAACA
aVEGF-16A2.1(NSA) CDR3	ACTGCCGTCTATTATTGT668565878657878588678857558688588788776678 878577857577678565657TACCGGGGTCAAGGAACA

[0510] 表5.用于产生抗VEGF DotBody 16A2.1的亲合力成熟噬菌体展示文库的引物的DNA序列。序列中的数字代表寡核苷酸序列中碱基A、T、C和G的频率。频率代码5=70%A、10%G、10%C、10%T;6=70%G、10%A、10%C、10%T;7=70%C、10%A、10%G、10%T;8=70%T、10%A、10%G、10%C。

[0511] 实施例7:基于16C2.1的亲合力成熟噬菌体展示文库的构建

[0512] 选择抗VEGF DotBody 16C2.1用于亲合力成熟,因为其结合亲合力低于5nM,并且它还阻断了VEGFA和VEGF受体1(VEGFR1)之间的相互作用。根据Bostrom J.等人(14),通过Kunkel诱变创建亲合力成熟噬菌体展示文库,使用表6所示的引物。得到的文库含有 1.1×10^8 个独特的序列,通过将文库电穿孔到TG1细胞中进行系列稀释、铺板到补充有100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 羧苄青霉素的2YT琼脂上,以及随后对来自几个菌落的质粒进行测序以确定突变率:

引物名称	引物序列
aVEGF-16C2.1 CDR1	TGTGCAATTTCTGGCTTC878788678678577657ATAGACTGGGTGCGTCAG
[0513] aVEGF-16C2.1 CDR2	GAATGGGTTGCAAGGATT888878776878657888577657TATGCCGATAGCG TCAAG
aVEGF-16C2.1 CDR3	ACTGCCGTCTATTATTGT66856577665757785767885755858888788657577 776577857558678788757TACCGGGGTCAAGGAACA

[0514] 表6.用于产生抗VEGF DotBody 16C2.1的亲合力成熟噬菌体展示文库的引物DNA序列。序列中的数字表示寡核苷酸序列中碱基A、T、C和G的频率。频率代码5=70%A、10%G、10%C、10%T;6=70%G、10%A、10%C、10%T;7=70%C、10%A、10%G、10%T;8=70%T、10%A、10%G、10%C。

[0515] 实施例8:利用热激发,基于16A2.1和16C2.1的亲合力成熟的噬菌体展示文库的筛选

[0516] 按照相同的步骤分别筛选基于16A2.1和基于16C2.1的噬菌体展示文库。

[0517] 将中性抗生素蛋白以10 μg 在1mL PBS中固定在Maxisorp免疫管(Thermo Scientific)上,在4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。将管在PBS中洗涤两次,并在室温(RT)下在MBB中封闭1小时。根据筛选轮次以不同浓度添加生物素化VEGF-121(Acro Biosystems)(参见表7)。将蛋白质在

室温下孵育1小时,并用PBS洗涤两次去除未结合的蛋白质。按照针对生物素化VEGF-121的描述制备阴性筛选管,但添加PBS代替生物素化VEGF-121。

[0518] 其余的筛选步骤与来自天然合成DotBody噬菌体展示文库的噬菌体展示选择类似,但有一些变化,如表7中总结的那样。

[0519]	改变	细节
	筛选轮数	4 轮严密程度递增
	衔接蛋白	生物素结合蛋白固定在 Maxisorp 盘上, 如下: • 第 1 轮: 2 ml 中 20 μg 中性抗生物素蛋白 • 第 2 轮: 2 ml 中 10 μg 中性抗生物素蛋白 • 第 3 轮: 2 ml 中 10 μg 中性抗生物素蛋白 • 第 4 轮: 2 ml 中 10 μg 中性抗生物素蛋白
	生物素化 VEGF-121 固定的量	在不同的轮次中, 在衔接蛋白包被管上孵育不同浓度的生物素化 VEGF-121: • 第 1 轮: 75 nM • 第 1 轮: 24 nM • 第 3 轮: 7.5 nM • 第 4 轮: 7.5 nM
	加入 VEGF-121 的噬菌体的量	文库在不同轮次中以不同浓度稀释到 1 mL MBB 中: • 第 1 轮: 2×10^{12} pfu/ml 亲和力成熟的噬菌体展示文库

[0520]		- 第 2 轮: 5×10^{11} pfu/ml 来自上一轮的纯化的噬菌体 - 第 3 轮: 5×10^{11} pfu/ml 来自上一轮的纯化的噬菌体 - 第 4 轮: 5×10^{11} pfu/ml 来自上一轮的纯化的噬菌体
	热激发	在筛选前, 噬菌体在不同温度孵育, 1,5000 g 离心 5 min 沉降, 温度如下: - 第 1 轮: 没有热处理 - 第 2 轮: 没有热处理 - 第 3 轮: 55°C 30min - 第 4 轮: 70°C 30min
	噬菌体和 VEGF-121 的孵育时间	噬菌体在阴性筛选管中室温孵育 1h, 然后转移至含有 VEGF-121 的管中, 并在不同轮次中室温孵育不同的时间: - 第 1 轮: 1 h - 第 2 轮: 30 min - 第 3 轮: 30 min - 第 4 轮: 30 min
	洗脱未结合的噬菌体	未结合的噬菌体在不同轮中被不同批次洗脱液去除: - 第 1 轮: MBB 洗涤 3 次, PBST 洗涤 3 次 - 第 2 轮: MBB 洗涤 10 次, PBST 洗涤 10 次, PBS 洗涤 2 次 - 第 3 轮: MBB 洗涤 15 次, PBST 洗涤 15 次, PBS 洗涤 2 次 - 第 4 轮: MBB 洗涤 15 次, PBST 洗涤 15 次, PBS 洗涤 2 次

[0521] 表7. 基于16A2.1和基于16C2.1的噬菌体展示文库针对生物素化的VEGF-121的亲力和成熟筛选条件。

[0522] 利用热激发, 基于16A2.1的亲力和成熟噬菌体展示筛选产生20A2.1和20A3.1。

[0523] 利用热激发, 基于16C2.1的亲力和成熟噬菌体展示筛选产生21A1.1、21A8.1、21D9.1和21E6.1。

[0524] 实施例9: 不利用热激发, 基于16C2.1的亲力和成熟的噬菌体展示文库的筛选基于16C2.1的噬菌体展示文库也可以不利用热激发进行筛选, 如下所示。

[0525] 将中性抗生物素蛋白以10 μ g在1mL PBS中固定在Maxisorp免疫管(Thermo Scientific)上, 在4°C过夜。将管在PBS中洗涤两次, 并在MBB中室温(RT)封闭1小时。根据筛选轮次以不同浓度添加生物素化VEGF-165(Acro Biosystems) (参见表7)。将蛋白质在室温下孵育1小时, 并用PBS洗涤两次去除未结合的蛋白质。按照针对生物素化VEGF-165的描述制备阴性筛选管, 但添加PBS代替生物素化VEGF-165。

[0526] 其余的筛选步骤与来自天然合成DotBody噬菌体展示文库的噬菌体展示选择类似, 但有一些变化, 如表8中总结的那样。

[0527]

改变	细节
筛选轮数	4 轮严密程度递增
衔接蛋白	生物素结合蛋白固定在 Maxisorp 盘上, 如下: • 第 1 轮: 2 ml 中 20 μg 中性抗生物素蛋白 • 第 2 轮: 2 ml 中 10 μg 链霉亲和素 • 第 3 轮: 2 ml 中 10 μg 中性抗生物素蛋白 • 第 4 轮: 2 ml 中 10 μg 中性抗生物素蛋白
生物素化 VEGF-165 固定的量	在不同的轮次中, 在衔接蛋白包被管上孵育浓度降低的生物素化 VEGF-165: • 第 1 轮: 223 nM • 第 1 轮: 223 nM • 第 3 轮: 11 nM • 第 4 轮: 11 nM
加入 VEGF-165 的噬菌体的量	文库在不同轮次中以不同浓度稀释到 1 mL MBB 中: • 第 1 轮: 1×10^{13} pfu/ml 亲和力成熟的噬菌体展示文库 • 第 2 轮: 1×10^{12} pfu/ml 来自上一轮的纯化的噬菌体 • 第 3 轮: 1×10^{12} pfu/ml 来自上一轮的纯化的噬菌体 • 第 4 轮: 5×10^{11} pfu/ml 来自上一轮的纯化的噬菌体
噬菌体和 VEGF-165 的孵育时间	噬菌体在阴性筛选管中室温孵育 1h, 然后转移至含有 VEGF-165 的管中, 并在不同轮次中室温孵育不同的时间, 在第 3 轮和第 4 轮时加入雷珠单抗以实现额外的严密性: • 第 1 轮: 1 h • 第 2 轮: 30 min • 第 3 轮: 30 min, 在 5 nM 雷珠单抗存在的条件下 • 第 4 轮: 30 min, 在 5 nM 雷珠单抗存在的条件下
洗脱未结合的噬菌体	未结合的噬菌体在不同轮中被不同批次洗脱液去除: • 第 1 轮: MBB 洗涤 3 次, PBST 洗涤 3 次 • 第 2 轮: MBB 洗涤 10 次, PBST 洗涤 10 次, PBS 洗涤 2 次 • 第 3 轮: MBB 洗涤 15 次, PBST 洗涤 15 次, PBS 洗涤 2 次 • 第 4 轮: MBB 洗涤 15 次, PBST 洗涤 15 次, PBS 洗涤 2 次

[0528] 表8. 基于16C2.1的噬菌体展示文库针对生物素化的VEGF-165的亲和力成熟筛选条件。

[0529] 不利用热激发, 基于16C2.1的亲和力成熟噬菌体展示筛选产生23D5.1。

[0530] 实施例10: 通过biolayer干涉测量法进行蛋白质生产和结合动力学表征

[0531] VEGFA结合克隆被克隆到基于pET的表达载体中, 其中开放阅读框的5'末端含有ATG密码子, 3'末端含有编码组氨酸标签的序列。它们是在大肠杆菌中重组产生的, 通过固定化金属离子亲和层析纯化, 然后在PBS中脱盐。二价分子16A2.1x2也以相同的方式生成。

[0532] 使用BLI (Satorius) 在室温下以1000rpm的流速进行结合表征。将生物素化的人

VEGF-165 (Acro Biosystem) 在BLI缓冲液(含0.1% BSA和0.01% Tween-20的PBS溶液)中以3 μ g/mL的浓度固定在链霉亲和素包被的吸头上60秒。30秒基线后,抗VEGFA DotBodies在BLI缓冲液中以8种不同浓度(包括空白参照组)关联60秒,然后在BLI缓冲液中解离400秒。使用0nM浓度参考减去背景缓冲液信号,并使用BLI分析软件使用遵循1:1结合模型的全局拟合来计算结合动力学。二价分子16A2.1x2也按此方法所述进行表征,但解离时间为600秒。为了表征所有克隆对小鼠VEGFA的结合,采用相同的步骤,但将固定的靶标替换为生物素化的小鼠VEGF-164 (Acro Biosystem)。

[0533] 传感图如图2和图3所示,结合数据如下表所示:

[0534]

靶标抗原	分子	$K_{on} (M^{-1}s^{-1})$	$K_{diss} (s^{-1})$	结合亲和力 (K_D)
人VEGF165	13A6	1.22×10^5	4.75×10^{-3}	38.9 nM
	16A2.1	3.94×10^5	9.86×10^{-4}	2.5 nM
	16A6.1	9.24×10^4	1.36×10^{-3}	14.7 nM
	16A2.1x2	4.26×10^5	1.28×10^{-4}	0.301 nM
	20A2.1	9.77×10^4	5.50×10^{-4}	5.54 nM
	20A3.1	2.60×10^5	7.25×10^{-4}	2.78 nM
	21A1.1	9.15×10^4	1.03×10^{-3}	11.3 nM
	21A8.1	5.80×10^4	1.18×10^{-3}	20.0 nM
	21D9.1	4.82×10^4	9.90×10^{-4}	20.5 nM
	21E6.1	6.96×10^4	4.42×10^{-4}	6.3 nM
	23D5.1	2.86×10^5	8.02×10^{-4}	2.8 nM
小鼠VEGF164	13A6	4.19×10^4	1.04×10^{-2}	248 nM
	16A2.1	1.16×10^5	1.93×10^{-3}	16.6 nM
	16A6.1	1.22×10^5	2.25×10^{-3}	18.4 nM
	20A2.1	1.32×10^5	1.35×10^{-3}	10.2 nM
	20A3.1	1.02×10^5	8.89×10^{-4}	8.7 nM
	21A1.1	1.67×10^5	2.31×10^{-3}	13.8 nM
	21A8.1	6.34×10^4	2.92×10^{-3}	46.1 nM
	21D9.1	5.80×10^4	2.43×10^{-3}	41.7 nM
	21E6.1	8.28×10^4	1.17×10^{-3}	14.2 nM
	23D5.1	2.05×10^5	1.69×10^{-3}	8.34 nM

[0535] 实施例11:竞争性ELISA

[0536] 为了进行竞争性ELISA,将VEGFR1以2 μ g/mL的浓度固定在Maxisorp 96孔板(Thermo Scientific)上,4 $^{\circ}$ C过夜,用PBS洗涤3次,并用ELISA封闭缓冲液(EBB:含0.2%BSA的PBST)在室温下封闭1小时。将浓度0.5nM的人VEGF-121与不同浓度的纯化的抗VEGFA DotBodies混合,进行1:3系列稀释,从500nM开始到0.008nM结束,并使用0nM作为对照。雷珠单抗还与人VEGF-121使用1:3连续稀释,从30nM开始到0.0005nM结束,并使用0nM作为对照。将样品在室温下孵育2小时,然后将50 μ L转移到VEGFR1包被的板上。孵育2小时后,用PBST洗涤板3次。将50 μ L链霉亲和素-HRP缀合物(Thermo Scientific)以1:5,000的稀释比例添加到EBB中,并在室温下孵育1小时。将板用PBST洗涤5次,并用50 μ L3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)底物(GeneTex)显色。5-15分钟后,通过添加50 μ L2M H_2SO_4 终止反应,并在450nm的吸光度处测量信号。

[0537] 使用Graphpad Prism 9软件绘制数据,并使用"[抑制剂] vs. 响应-可变斜率(四个

参数)”非线性回归曲线确定 IC_{50} 。

[0538] 结果如图4和图5所示。

[0539] 基于图4中的数据确定的不同分子抑制人VEGF-121和人VEGFR1之间相互作用的 IC_{50} 值如下:

[0540] 13A6=5.9 μ M

[0541] 16A2.1=12.2nM

[0542] 16A6.1=41.4nM

[0543] 雷珠单抗=6.8nM。

[0544] 基于图5中的数据确定的不同分子抑制人VEGF-121和人VEGFR1之间相互作用的 IC_{50} 值如下:

[0545] 16A2.1=3.0nM

[0546] 20A2.1=1.6nM

[0547] 20A3.1=0.9nM

[0548] 21A1.1=0.9nM

[0549] 21A8.1=1.8nM

[0550] 21D9.1=1.0nM

[0551] 21E6.1=7.5nM

[0552] 23D5.1=1.4nM

[0553] 雷珠单抗=7.4nM

[0554] 实施例12:通过分析热激发后与VEGFA的结合来评估热稳定性

[0555] 将结合VEGFA的DotBodies在BLI缓冲液中于室温、60℃、70℃或80℃下以250nM的浓度孵育1小时(热激发)。热激发后,将样品在15,000g下离心5分钟,并使用上清液通过BLI进行与人VEGF165的结合的表征,如上文实施例10中所述。

[0556] 结果如图6所示。

[0557] 实施例13:结论

[0558] 发明人已经生产了稳定的VH结构域抗体,其特异性结合人VEGFA,并与小鼠VEGFA交叉反应。

[0559] 在产生的抗原结合分子中,克隆13A6对人VEGFA的亲合力为38.9nM,对小鼠VEGFA的亲合力为248nM。克隆13A6阻断VEGFA和VEGF受体1(VEGFR1)的相互作用,竞争性ELISA测量其 IC_{50} 值为5.9 μ M。

[0560] 通过噬菌体展示对13A6进行亲和力成熟,以进一步提高其对人和小鼠VEGFA的结合亲和力。生成了一个新的噬菌体展示文库,其中每一个CDR的位置都发生了突变,约50%的比例为13A6野生型序列中残基,另外50%的比例为任意其他的氨基酸。对人VEGFA的亲和力成熟的筛选按照严密程度递增的方式进行,降低噬菌体浓度、抗原浓度和结合时间,同时增加洗涤次数。这个步骤能够识别出几个亲和力改进的DotBodies。

[0561] 其中,克隆16A2.1和16A6.1对人VEGFA的亲合力分别为2.5nM和14.7nM。它们对小鼠VEGFA的亲合力分别为16.6nM和18.4nM。它们阻断VEGFA-VEGFR1相互作用的能力显著提高,16A2.1的 IC_{50} 值为12.2nM,16A6.1的 IC_{50} 值为41.4nM。

[0562] 为了证明针对VEGFA生成的DotBodies的模块性,克隆16A2.1被用于生成二价分

子,该分子包含由柔性连接子“(GGGS) x6-GGGG”连接的16A2.1双拷贝序列。该分子可以在大肠杆菌中重组产生,并且具有提高的亲合力,对VEGFA的亲合力为301pM。由于VEGFA以同型二聚体的形式存在(11),因此结合亲和力的提高表明二价16A2.1x2分子可能同时结合两个VEGF单体。

[0563] 选择DotBodies 16A2.1和16C2.1进行进一步的活性改造。此外,16A2.1的CDR3中含有一个潜在的糖基化位点(“NST”),需要在保持结合的同时将其去除。生成了两个新的噬菌体展示文库,其中每一个CDR的位置都发生了突变,约50%的比例为16A2.1和16C2.1各自序列中的残基,另外50%的比例为任意其他的氨基酸。对于16A2.1,在进行亲和力成熟文库设计时,CDR3中的“NST”序列被“AST”或“NSA”取代,目的是去除典型的Nx(T/S)N-糖基化基序中的Asn(N)或Ser(S)/Thr(T)(其中“x”是除了脯氨酸外的任意氨基酸)(12,13)。基于结合力和稳定性筛选人VEGFA是在温度升高的热激发条件下进行的,在降低抗原浓度和增加洗涤次数的同时,鉴定出最稳定、具有高亲和力的抗VEGF DotBodies。对基于16C2.1的文库额外进行了无热激发条件的筛选。热激发文库生成克隆20A2.1、20A3.1、21A1.1、21A8.1、21D9.1、21E9.1,而非热激发筛选鉴定了DotBody 23D5.1作为最丰富的序列。重要的是,DotBodies 20A2.1和20A3.1不包含其亲本克隆16A2.1中存在的潜在N-糖基化位点。

[0564] 所有的DotBodies均鉴定为具有与人VEGFA结合的亲和力,亲和力范围为2.8nM至20nM,与小鼠VEGFA的亲和力范围为8.3nM至46.1nM。它们阻断VEGF-VEGFR相互作用的能力通过竞争性ELISA测量,IC₅₀值的范围为0.9nM至7.5nM。作为对照的雷珠单抗测得的IC₅₀值为7.4nM。亲本DotBody 16A2.1的IC₅₀=3nM,新发现的DotBody 20A2.1和20A3.1的阻断活性增强(IC₅₀值分别为IC₅₀=1.6nM和IC₅₀=0.9nM)。以下DotBodies也具有高阻断活性:21A1.1(IC₅₀=0.9nM)、21D9.1(IC₅₀=1.0nM)和23D5.1(IC₅₀=1.4nM)。

[0565] 在室温和80℃之间的温度范围内孵育后,通过热激发筛选鉴定的所有DotBodies均保留了与VEGFA结合的能力。在非热激发条件筛选鉴定的23D5.1,在60℃或更高温度时丧失了其大部分的结合活性。

[0566] 总之,通过一系列定制的噬菌体展示文库设计和筛选策略,发明人产生了一系列具有中到低纳摩尔亲和力的抗VEGF DotBodies,其结合人VEGFA和鼠VEGFA。这些DotBodies还被证明可以在在低微摩尔到亚纳摩尔IC₅₀值的范围内阻断VEGF-VEGFR的相互作用。大多数已鉴定的DotBodies,包括5种有效的阻断剂—16A2.1、20A2.1、20A3.1和21D9.1—具有高热稳定性,在室温至80℃的温度范围内孵育后保留与人VEGFA的结合能力。这些DotBodies是模块化的,并且可用于通过串联连接几个DotBodies(例如通过在DotBodies之间引入连接子序列)来生成多价和/或多特异性分子。

[0567] 参考文献

[0568] 1.Fogli,S.,Del Re,M.,Rofi,E.,Posarelli,C.,Figus,M.,and Danesi,R.(2018)Clinical pharmacology of intravitreal anti-VEGF drugs.Eye(Lond)32,1010-1020

[0569] 2.Osaadon,P.,Fagan,X.J.,Lifshitz,T.,and Levy,J.(2014)A review of anti-VEGF agents for proliferative diabetic retinopathy.Eye(Lond)28,510-520

[0570] 3.Meadows,K.L.,and Hurwitz,H.I.(2012)Anti-VEGF therapies in the clinic.Cold Spring Harb Perspect Med 2

- [0571] 4. Williams, K.A., Brereton, H.M., Farrall, A., Standfield, S.D., Taylor, S.D., Kirk, L.A., and Coster, D.J. (2005) Topically applied antibody fragments penetrate into the back of the rabbit eye. *Eye (Lond)* 19, 910-913
- [0572] 5. Thiel, M.A., Coster, D.J., Standfield, S.D., Brereton, H.M., Mavrangelos, C., Zola, H., Taylor, S., Yusim, A., and Williams, K.A. (2002) Penetration of engineered antibody fragments into the eye. *Clin Exp Immunol* 128, 67-74
- [0574] 6. Kontermann, R.E. (2012) Dual targeting strategies with bispecific antibodies. *mAbs* 4, 182-197
- [0575] 7. Brinkmann, U., and Kontermann, R.E. (2017) The making of bispecific antibodies. *mAbs* 9, 182-212
- [0576] 8. Deshaies, R.J. (2020) Multispecific drugs herald a new era of biopharmaceutical innovation. *Nature* 580, 329-338
- [0577] 9. Cornvik, T., Dahlroth, S.L., Magnusdottir, A., Herman, M.D., Knaust, R., Ekberg, M., and Nordlund, P. (2005) Colony filtration blot: a new screening method for soluble protein expression in *Escherichia coli*. *Nat Methods* 2, 507-509
- [0578] 10. Asial, I., Cheng, Y.X., Engman, H., Dollhopf, M., Wu, B., Nordlund, P., and Cornvik, T. (2013) Engineering protein thermostability using a generic activity-independent biophysical screen inside the cell. *Nature communications* 4, 2901
- [0579] 11. Muller, Y.A., Li, B., Christinger, H.W., Wells, J.A., Cunningham, B.C., and de Vos, A.M. (1997) Vascular endothelial growth factor: crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 7192-7197
- [0580] 12. Bause, E. (1983) Structural requirements of N-glycosylation of proteins. Studies with proline peptides as conformational probes. *Biochem J* 209, 331-336
- [0581] 13. Bause, E., and Hettkamp, H. (1979) Primary structural requirements for N-glycosylation of peptides in rat liver. *FEBS Lett* 108, 341-344
- [0582] 14. Bostrom, J., Lee, C.V., Haber, L., and Fuh, G. (2009) Improving antibody binding affinity and specificity for therapeutic development. *Methods Mol Biol* 525, 353-376, xiii
- [0583] 15. Bostrom, J., and Fuh, G. (2009) Design and construction of synthetic phage-displayed Fab libraries. *Methods Mol Biol* 562, 17-35
- [0584] 16. Tonikian, R., Zhang, Y., Boone, C., and Sidhu, S.S. (2007) Identifying specificity profiles for peptide recognition modules from phage-displayed peptide libraries. *Nature protocols* 2, 1368-1386

CDR-1													
曲妥珠单抗VH	C	A	I	S	G	F	N	I	K	D	T	Y	I D W
模板VH	S/C	A	I	S	G	F	S	S	S	S	S	S	I D W
文库1	S	A	I	S	G	F	Xaa	F/L/I/V	Xaa	Xaa	T	Xaa	I D W
文库2	C	A	I	S	G	F	Xaa	F/L/I/V	Xaa	Xaa	T	Xaa	I D W

CDR-2													
曲妥珠单抗VH	A	R	I	Y	P	T	N	G	Y	T	R	Y	A D
模板VH	A	R	I	S	P	S	S	G	S	T	S	Y	A D
文库1	A	R	I	Xaa	P	Xaa	Xaa	G	Xaa	T	Xaa	Y	A D
文库2	A	R	I	Xaa	P	Xaa	Xaa	G	Xaa	T	Xaa	Y	A D

新图 Shift + Alt + A

CDR-3													
曲妥珠单抗VH	C	S	R	W	G	G	G	D	F	Y	A	M	D
模板VH	T/C	G	R	S	S	S	S	-	-	-	A	M	D
文库1	T	G/V	R			Xaa (6-20个氨基酸残基)				A/G	M/F/L/I/V		D

图1

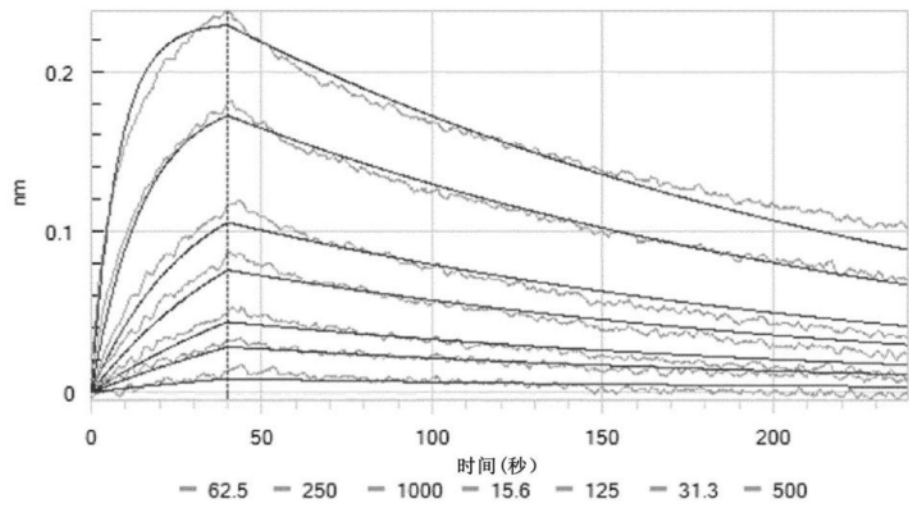


图2A

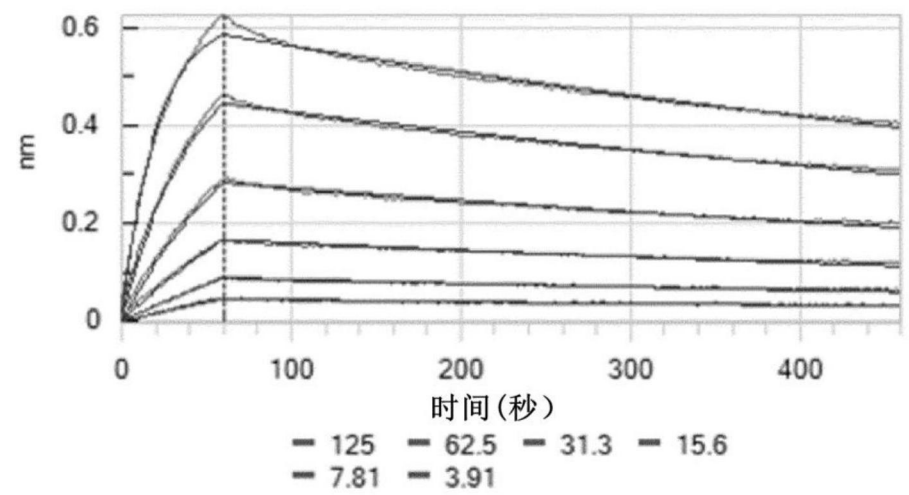


图2B

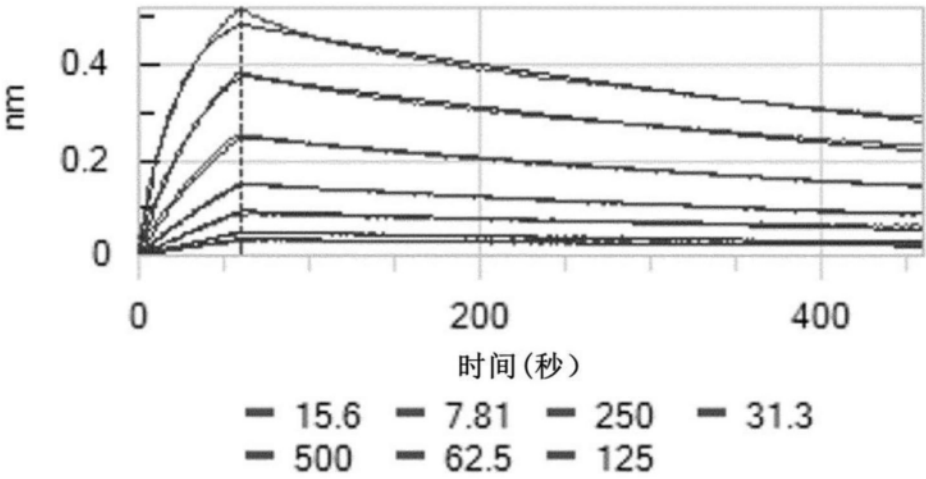


图2C

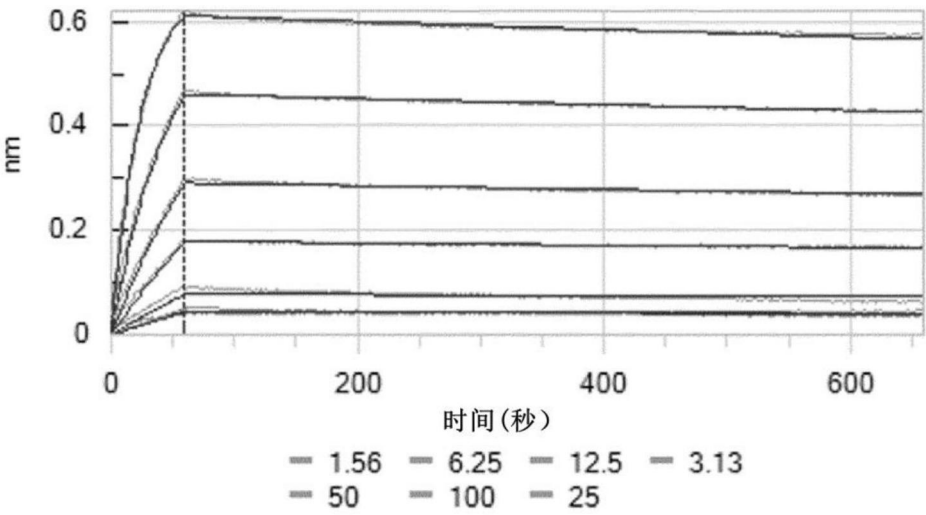


图2D

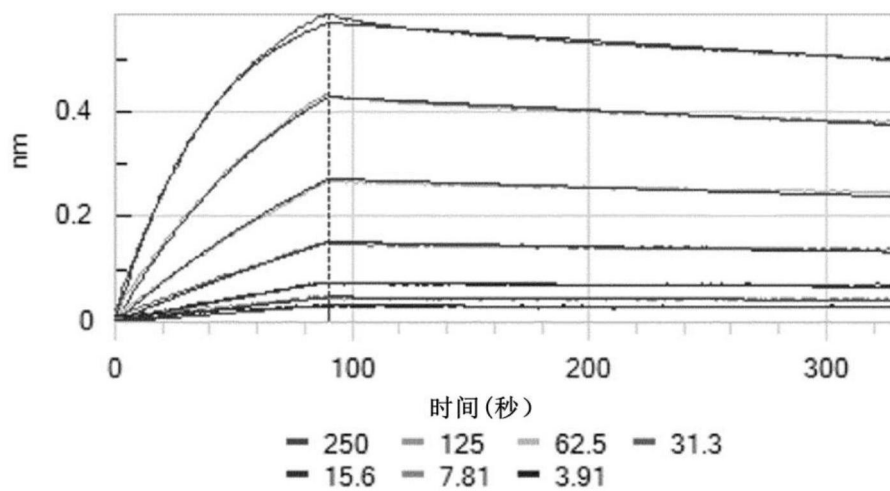


图2E

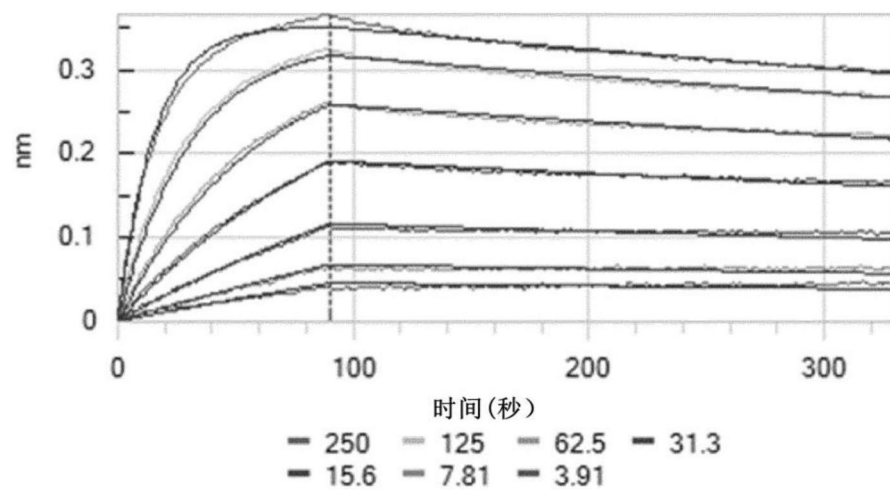


图2F

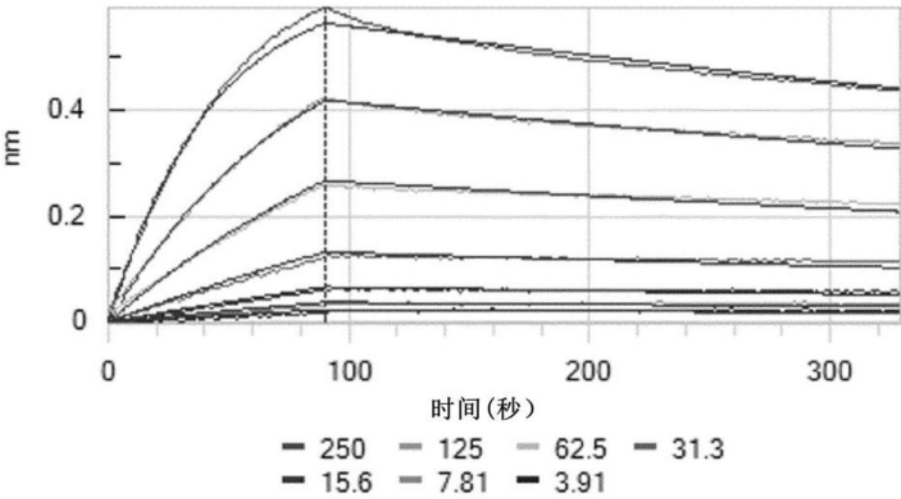


图2G

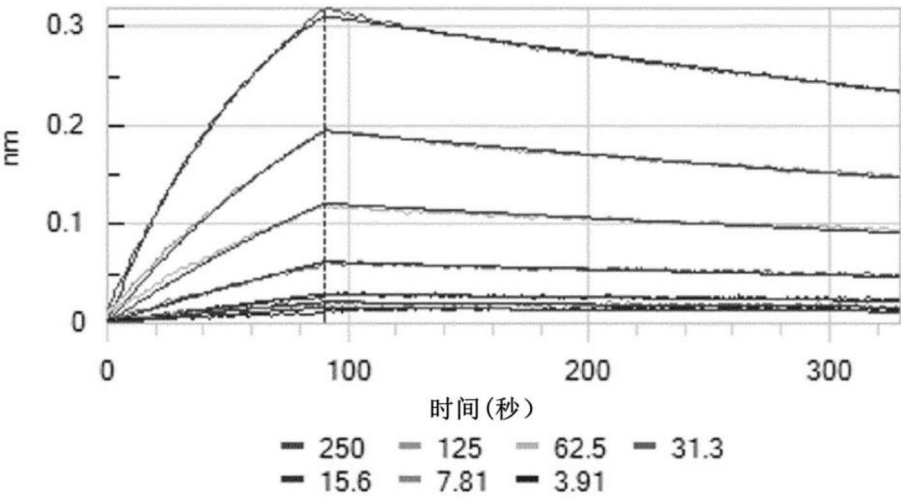


图2H

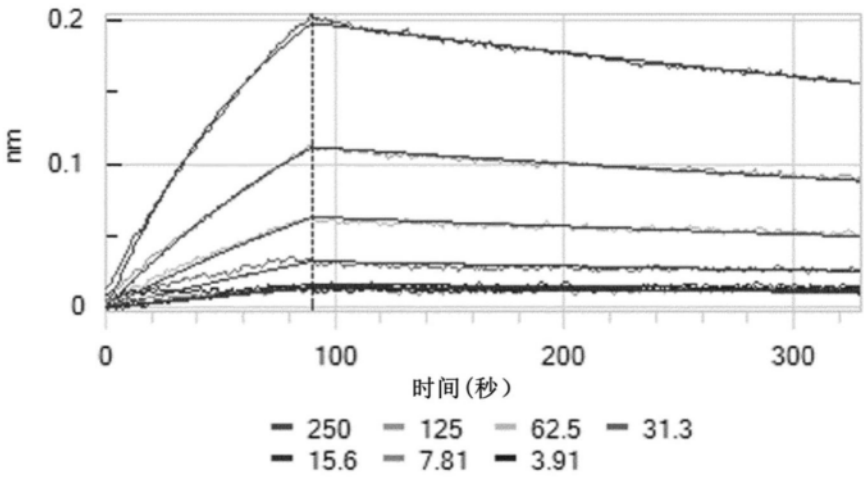


图2I

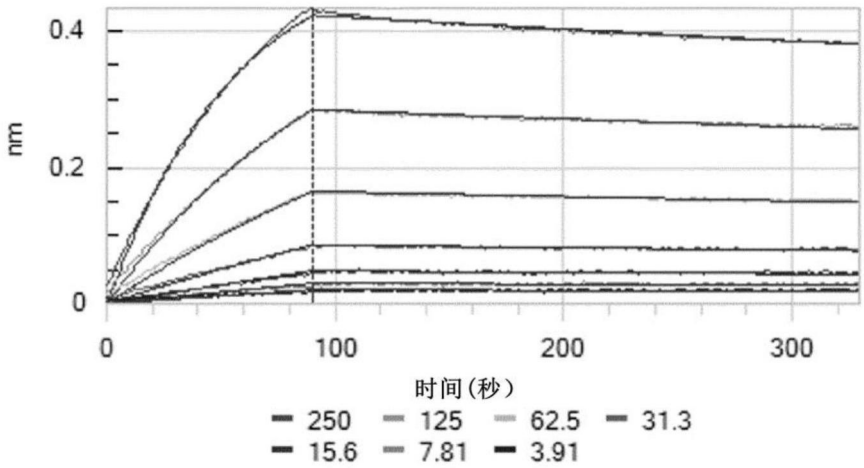


图2J

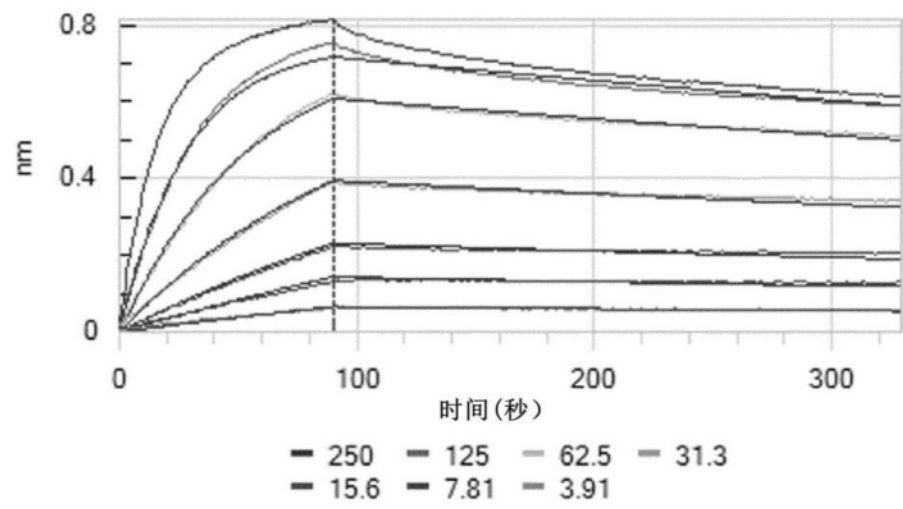


图2K

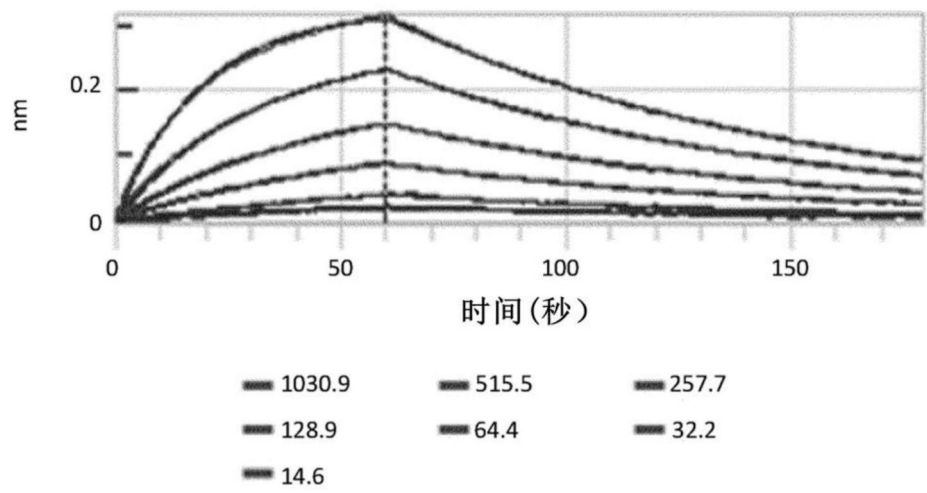


图3A

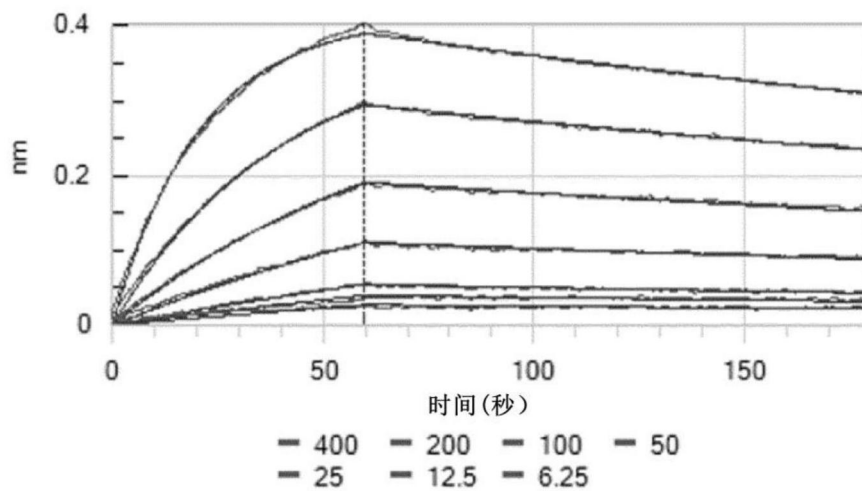


图3B

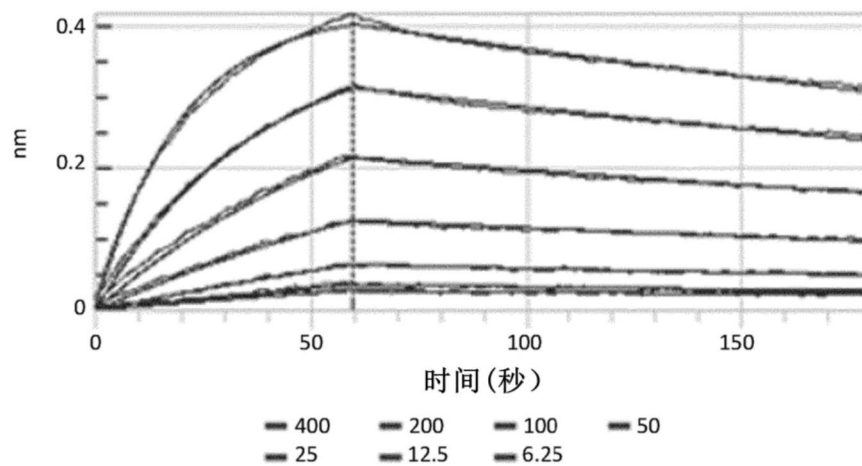


图3C

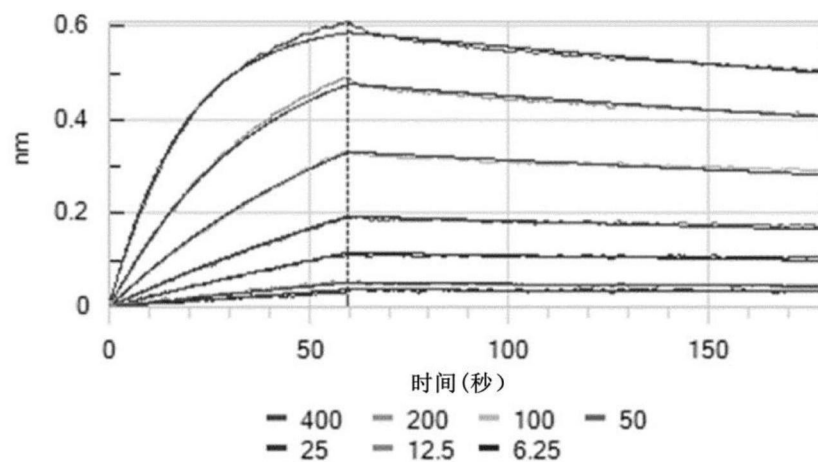


图3D

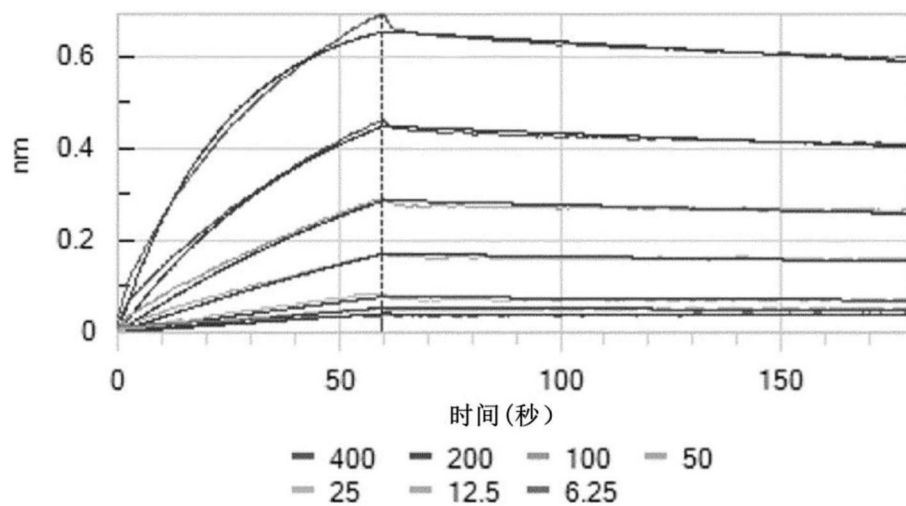


图3E

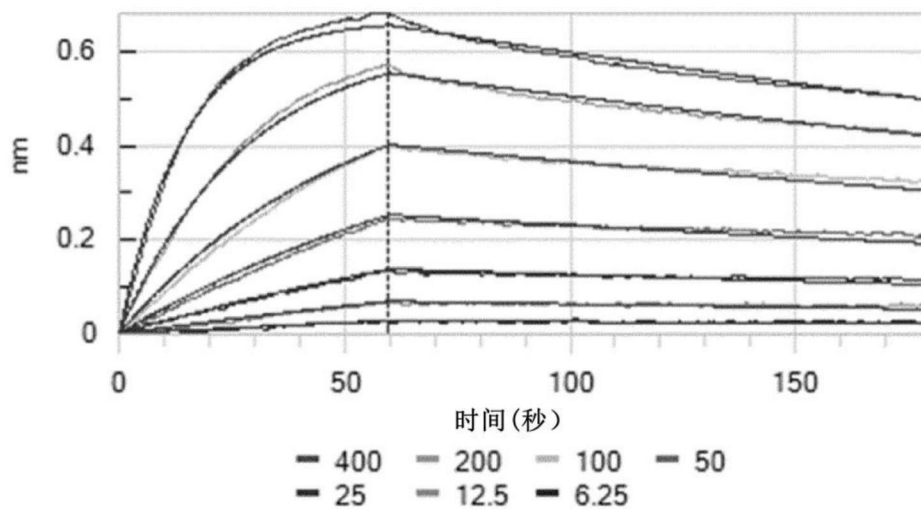


图3F

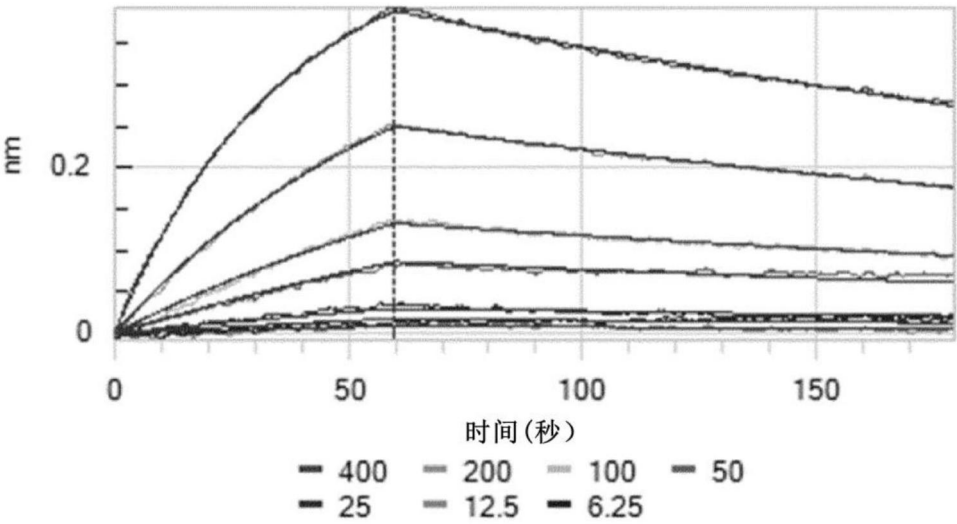


图3G

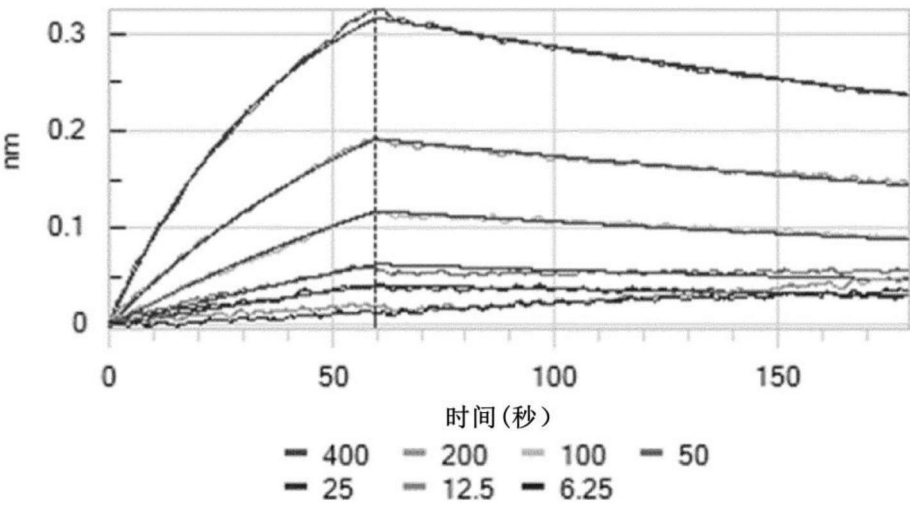


图3H

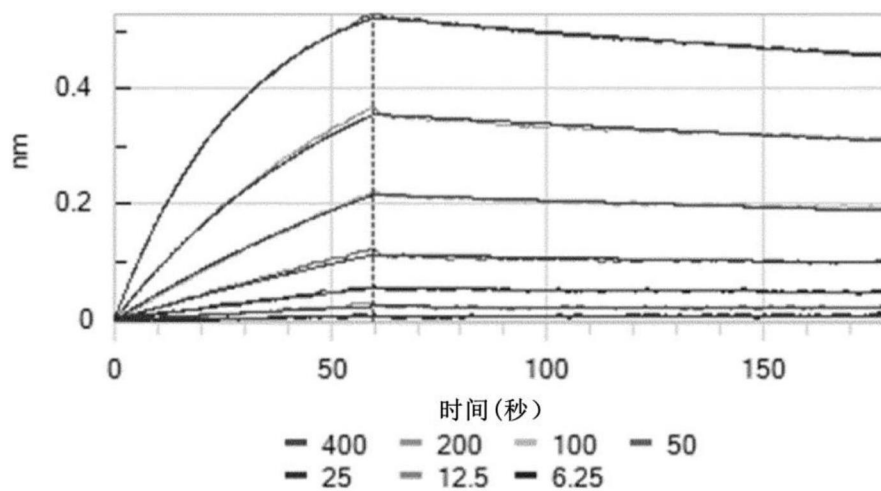


图3I

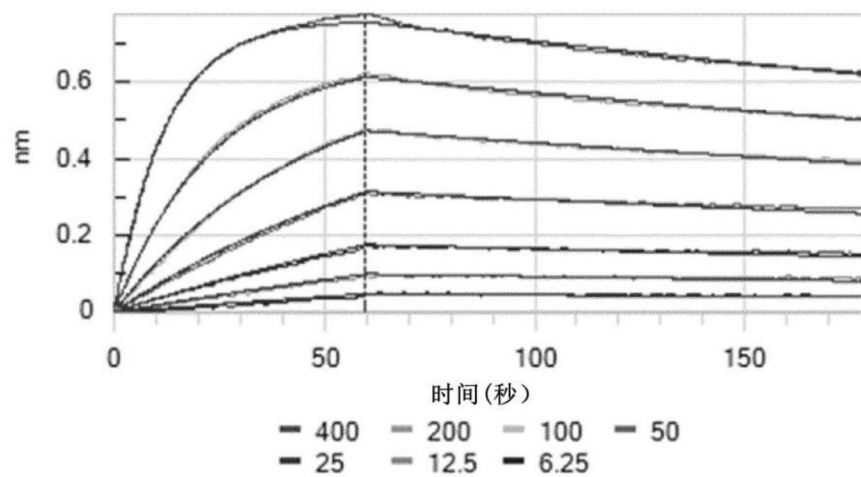


图3J

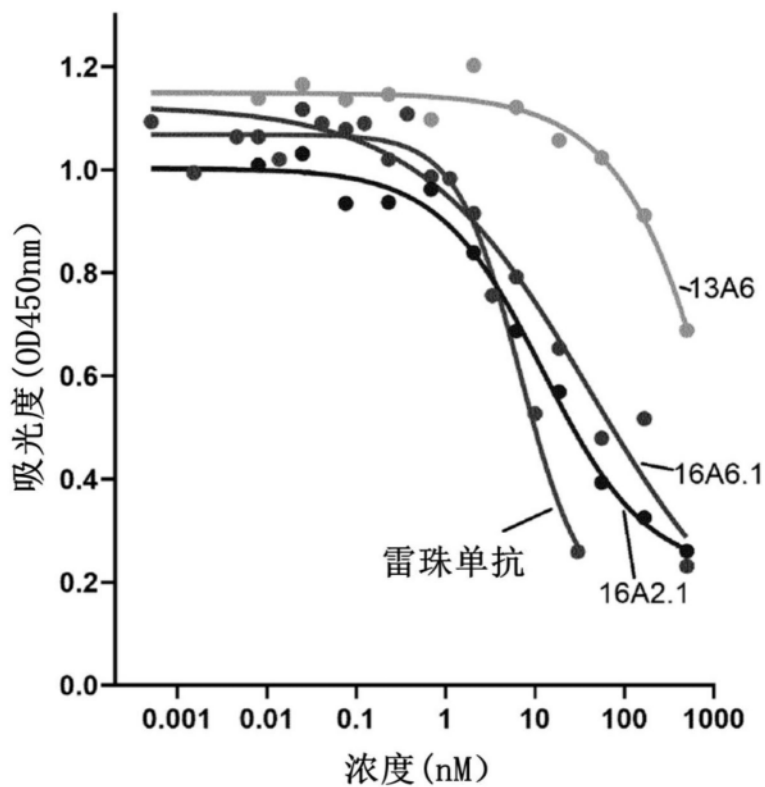


图4

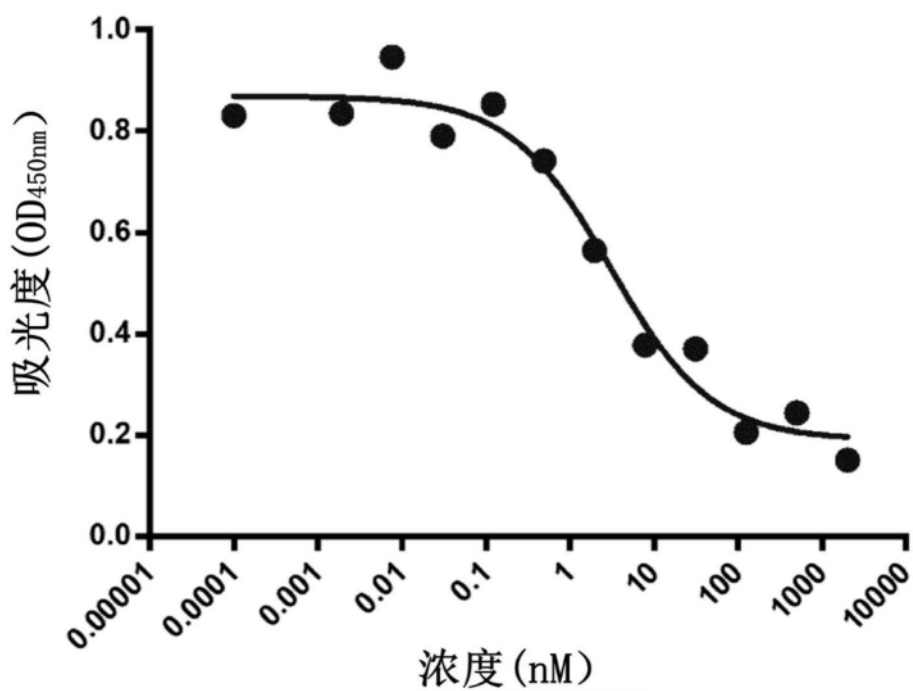


图5A

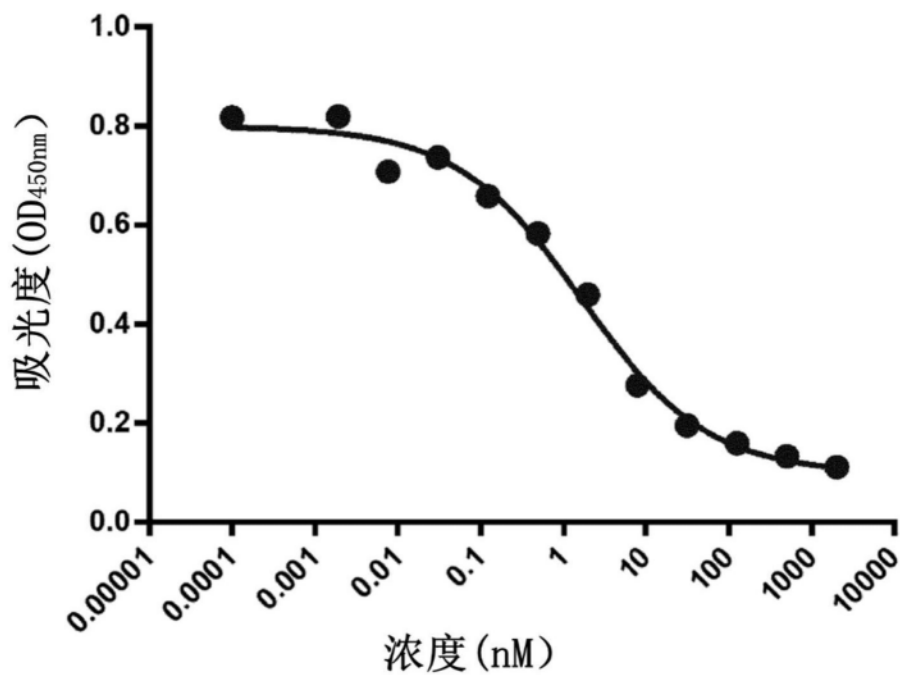


图5B

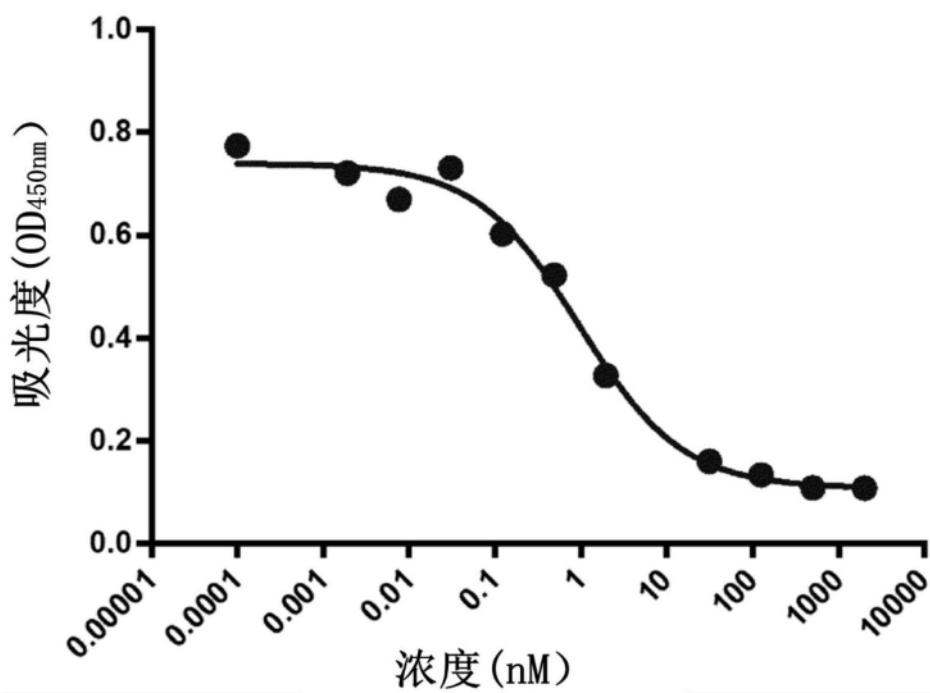


图5C

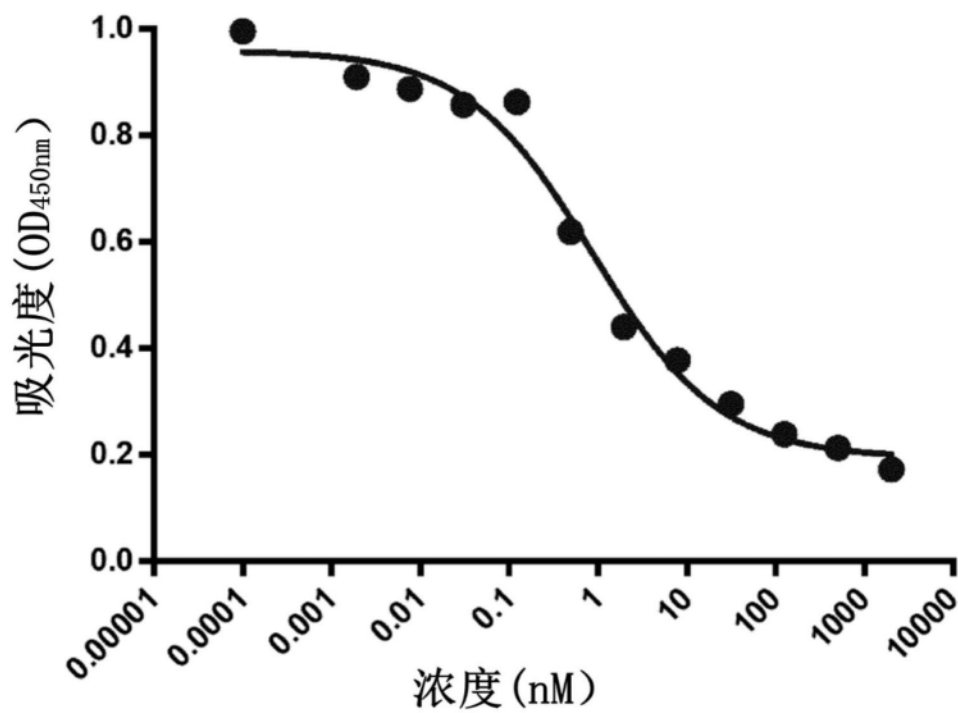


图5D

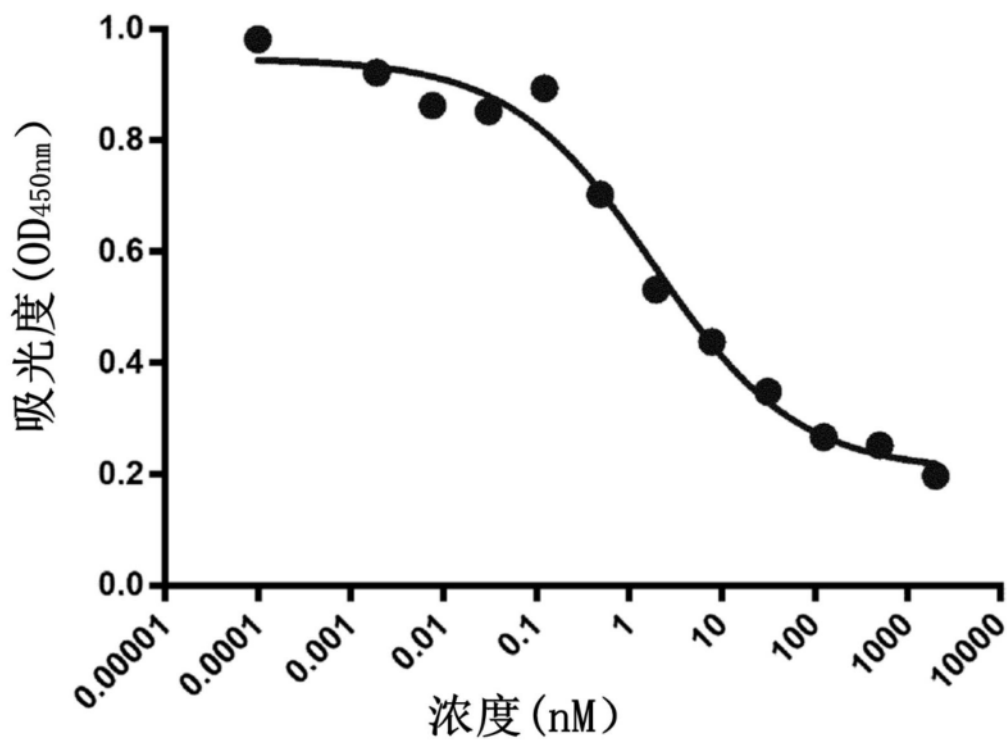


图5E

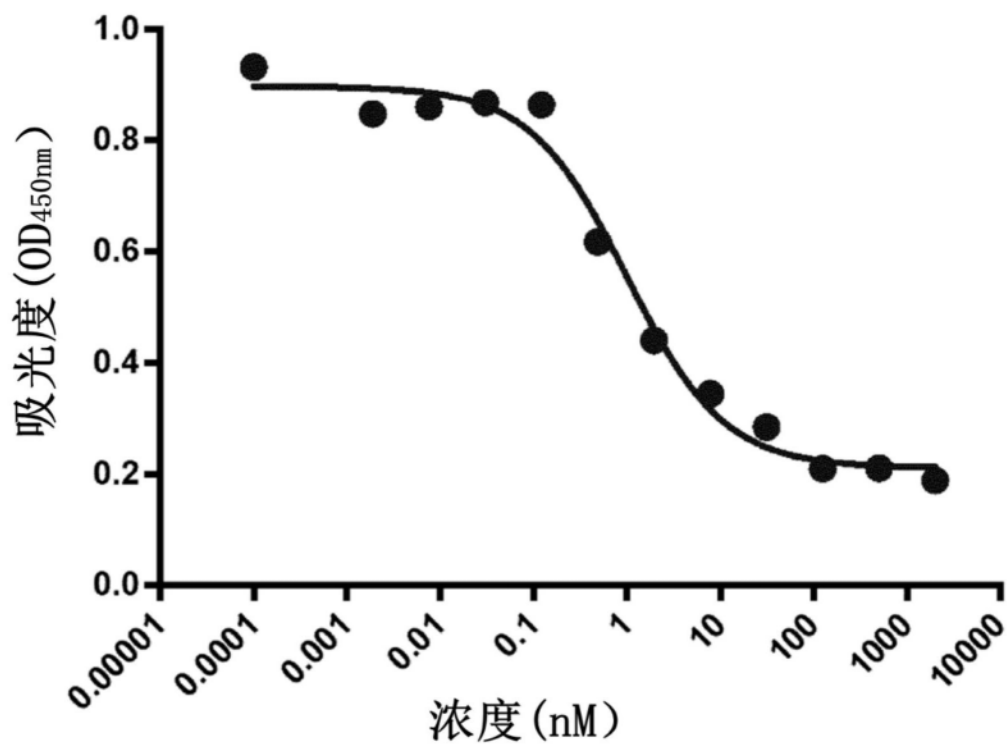


图5F

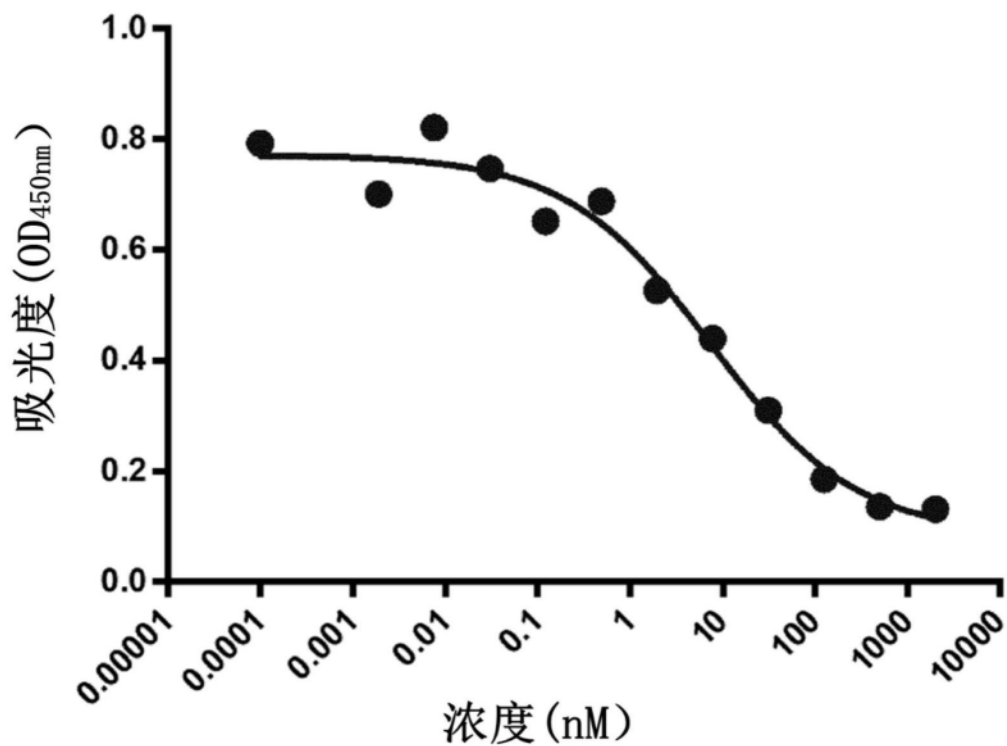


图5G

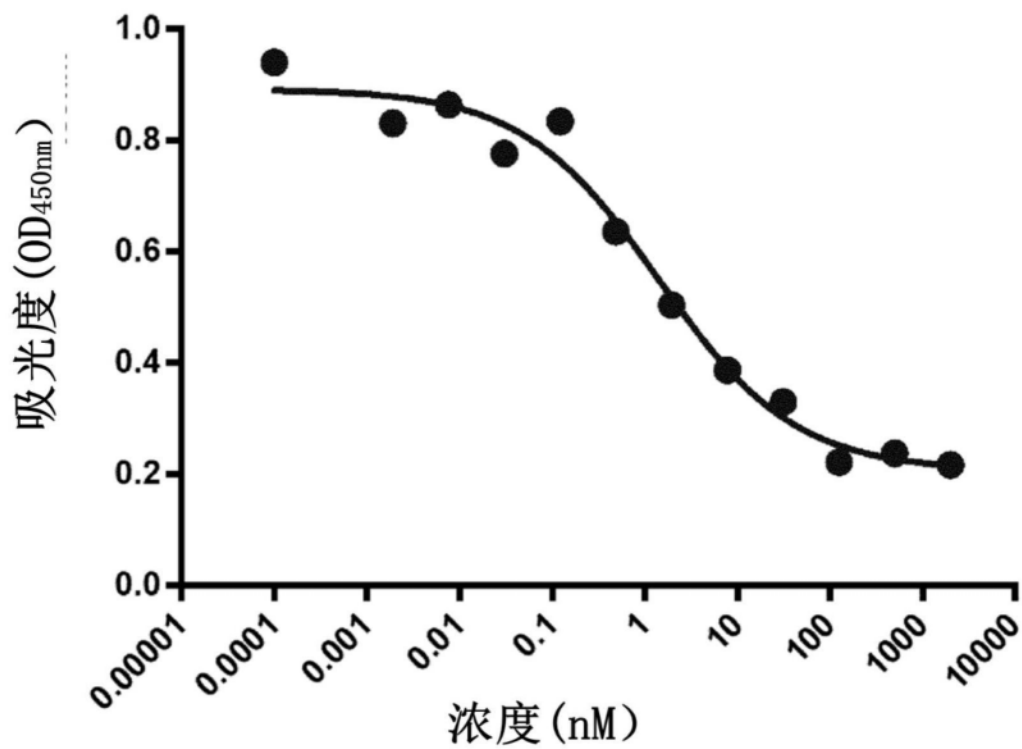


图5H

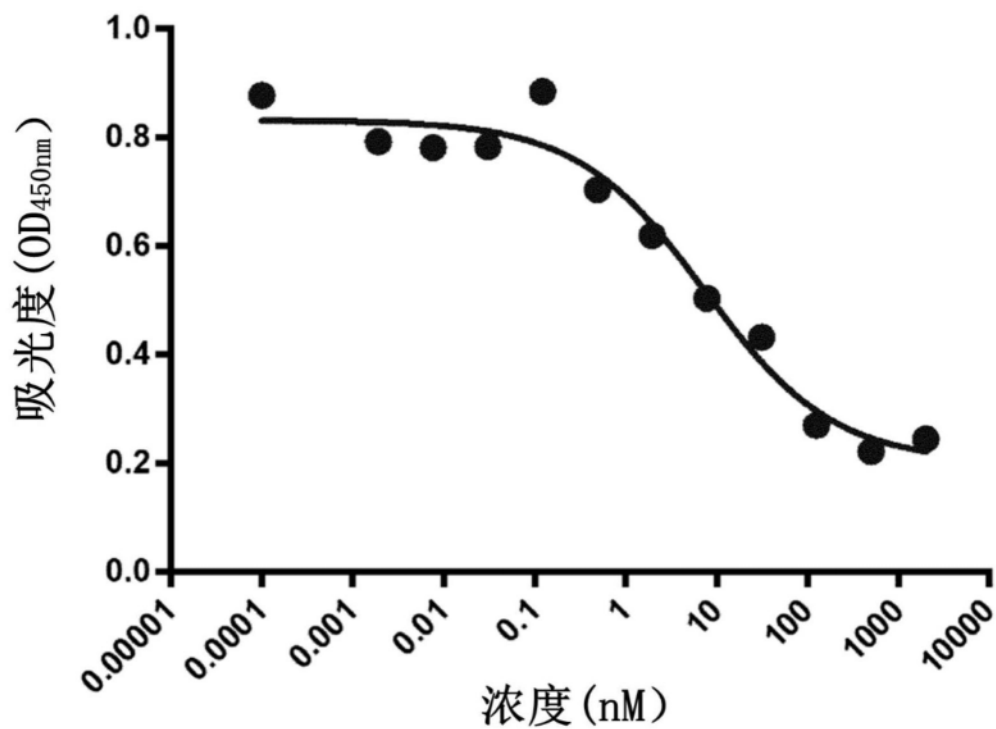


图5I

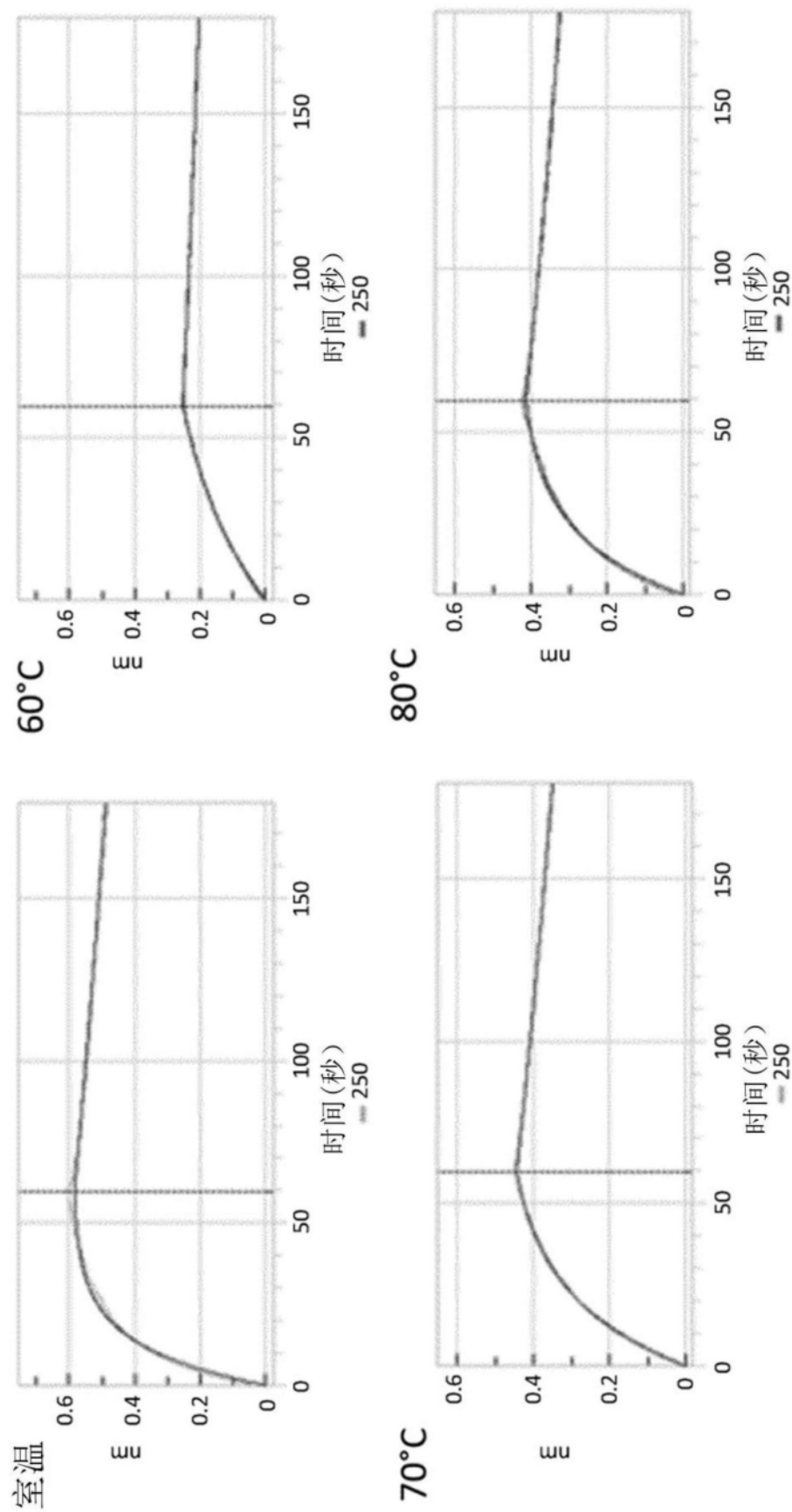


图6A

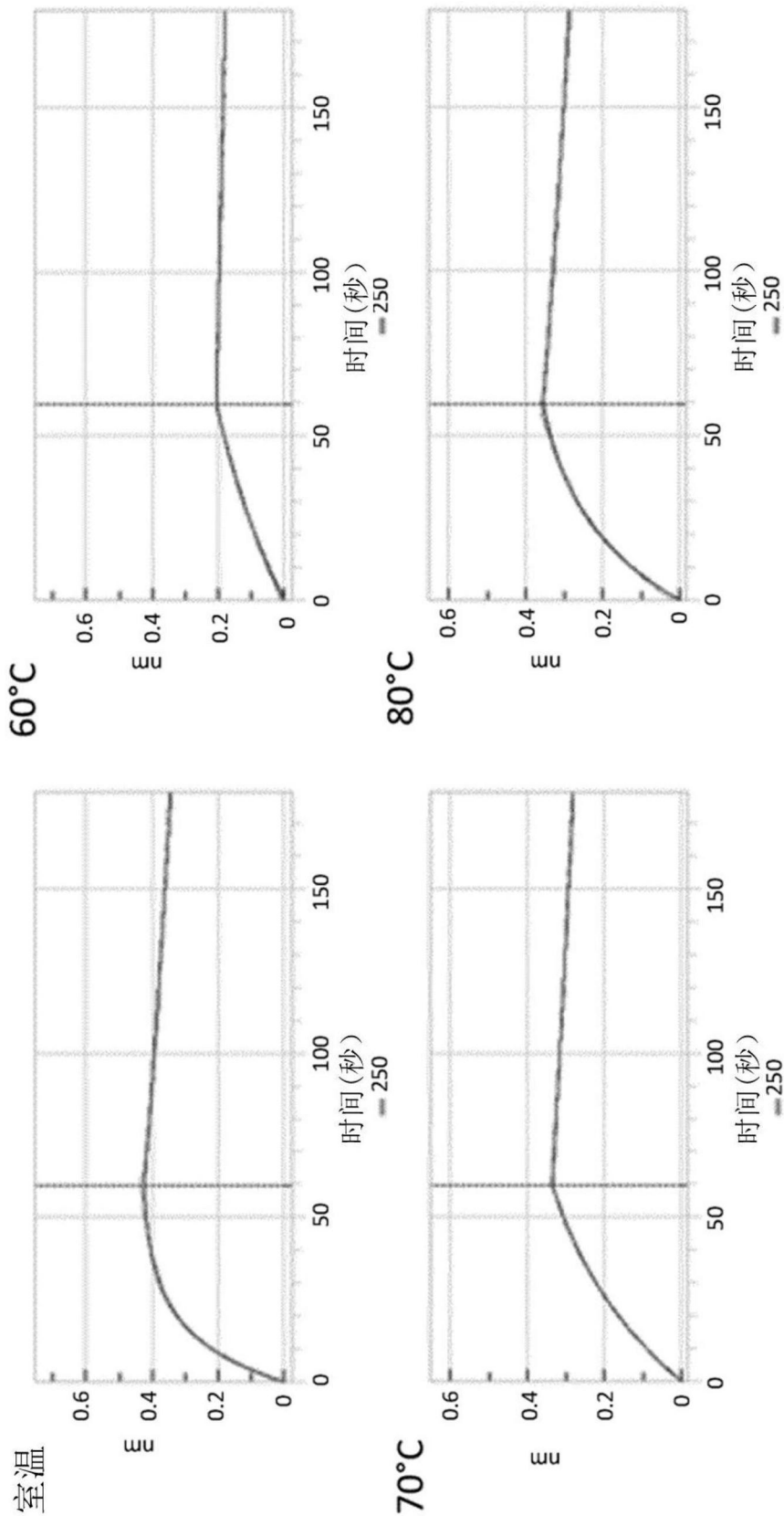


图6B

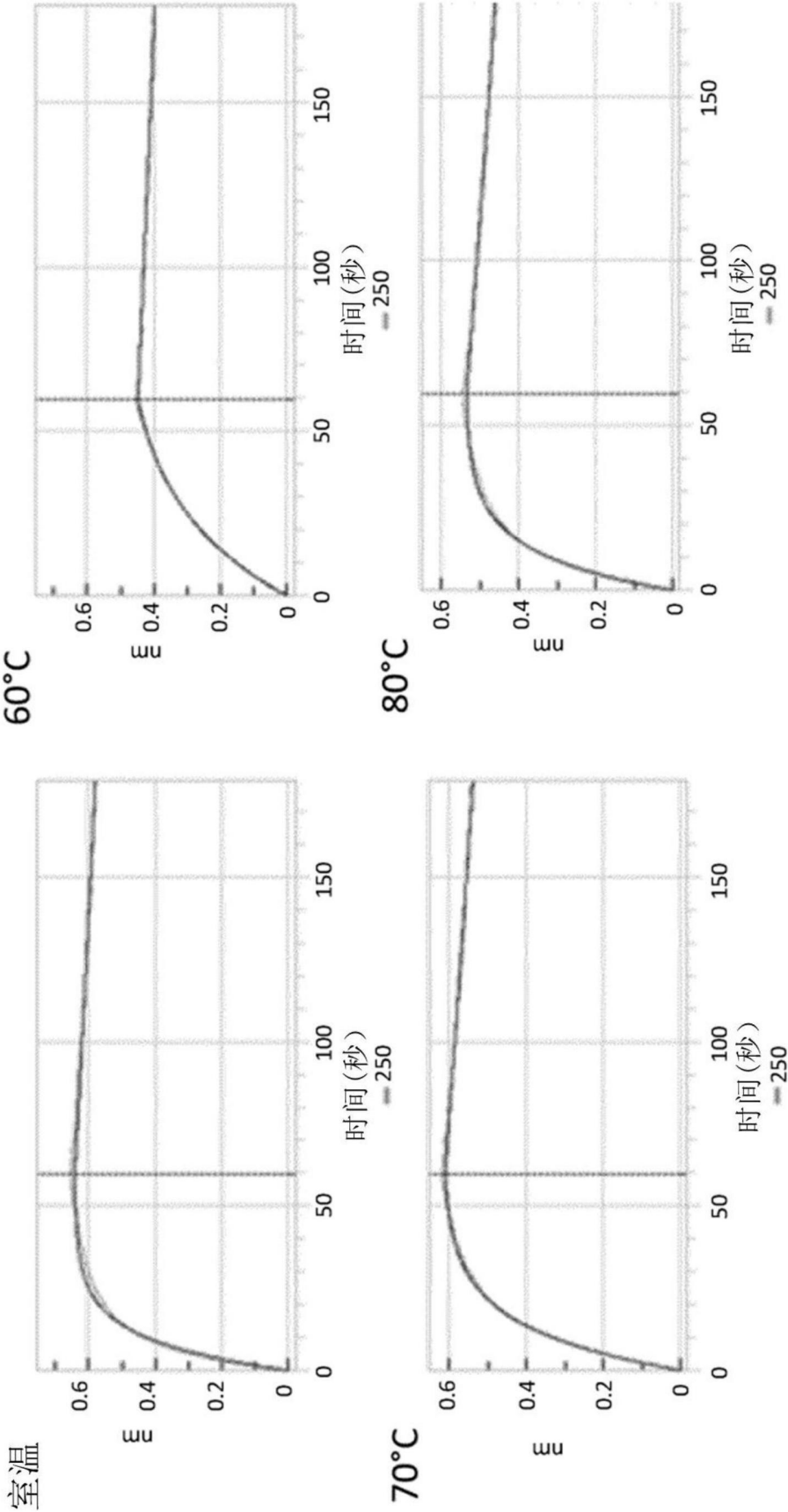


图6C

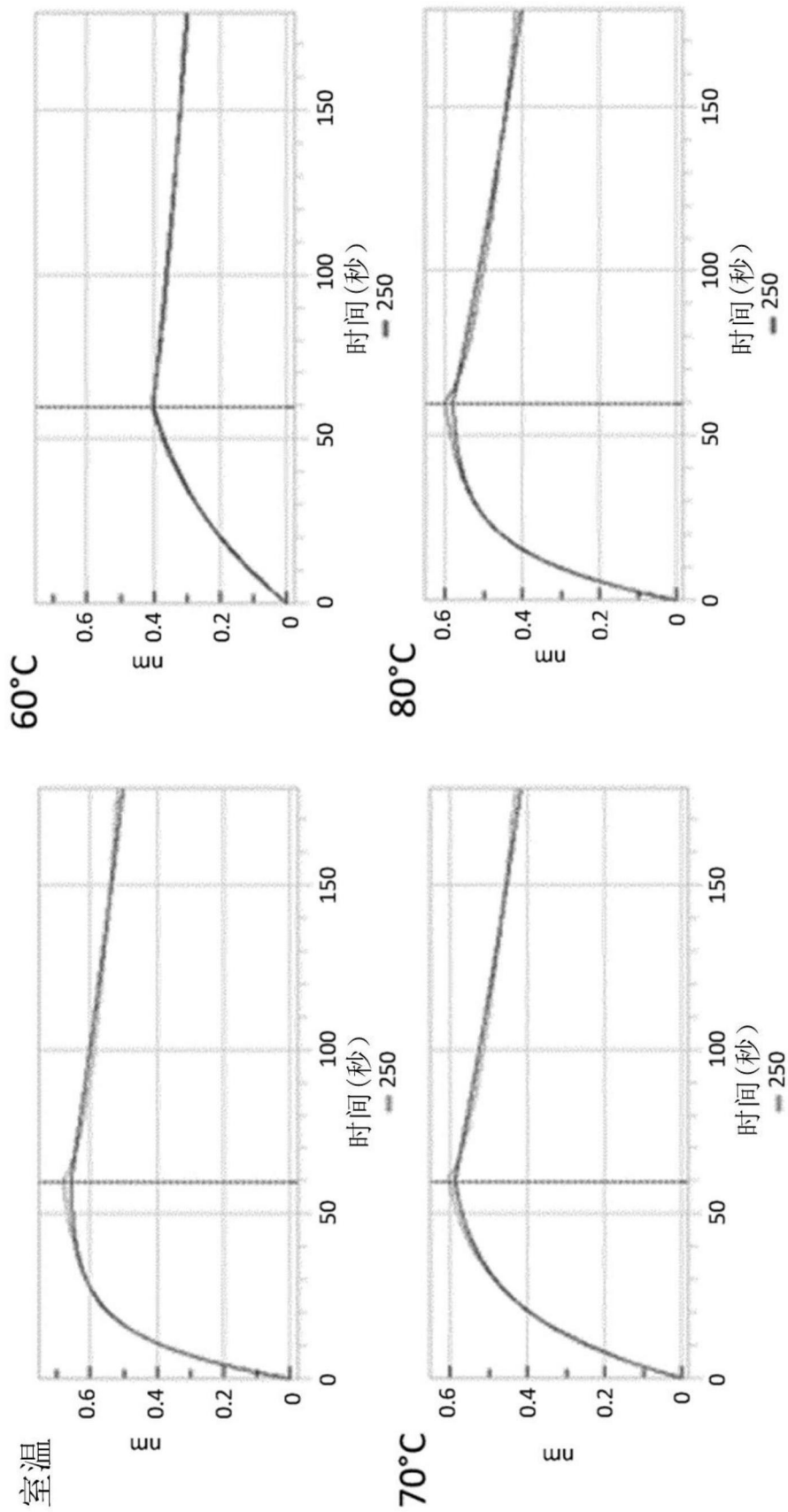


图6D

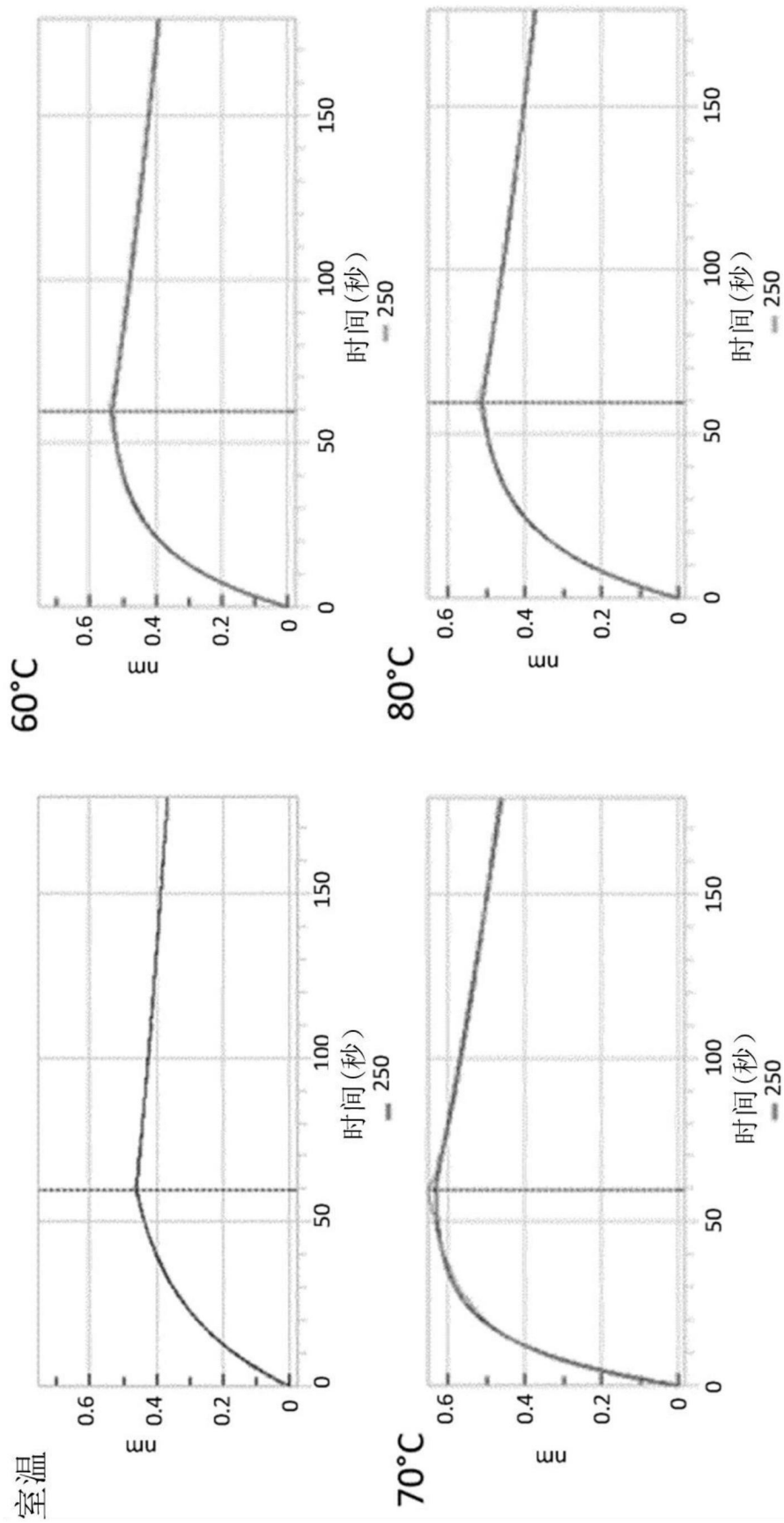


图6E

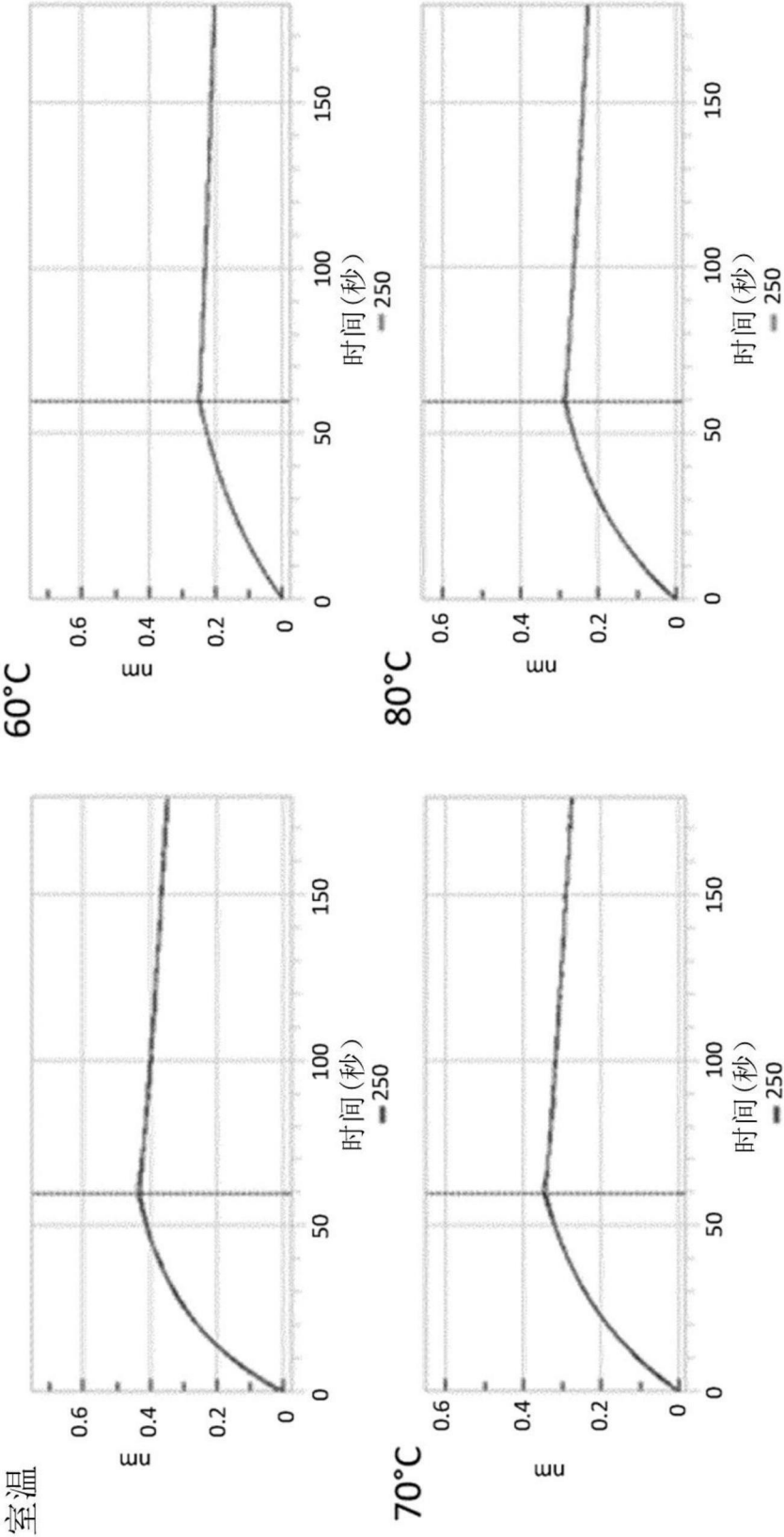


图6F

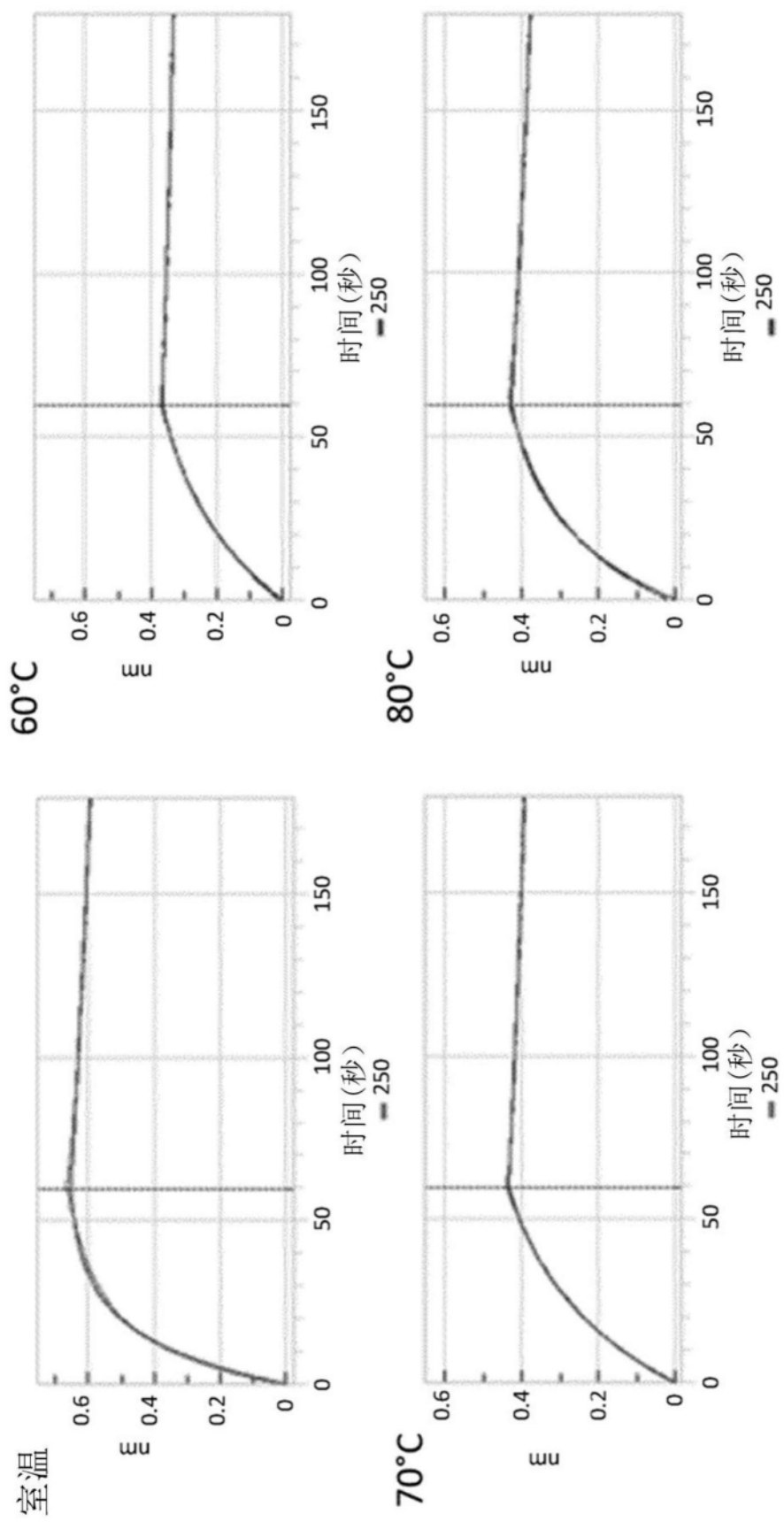


图6G

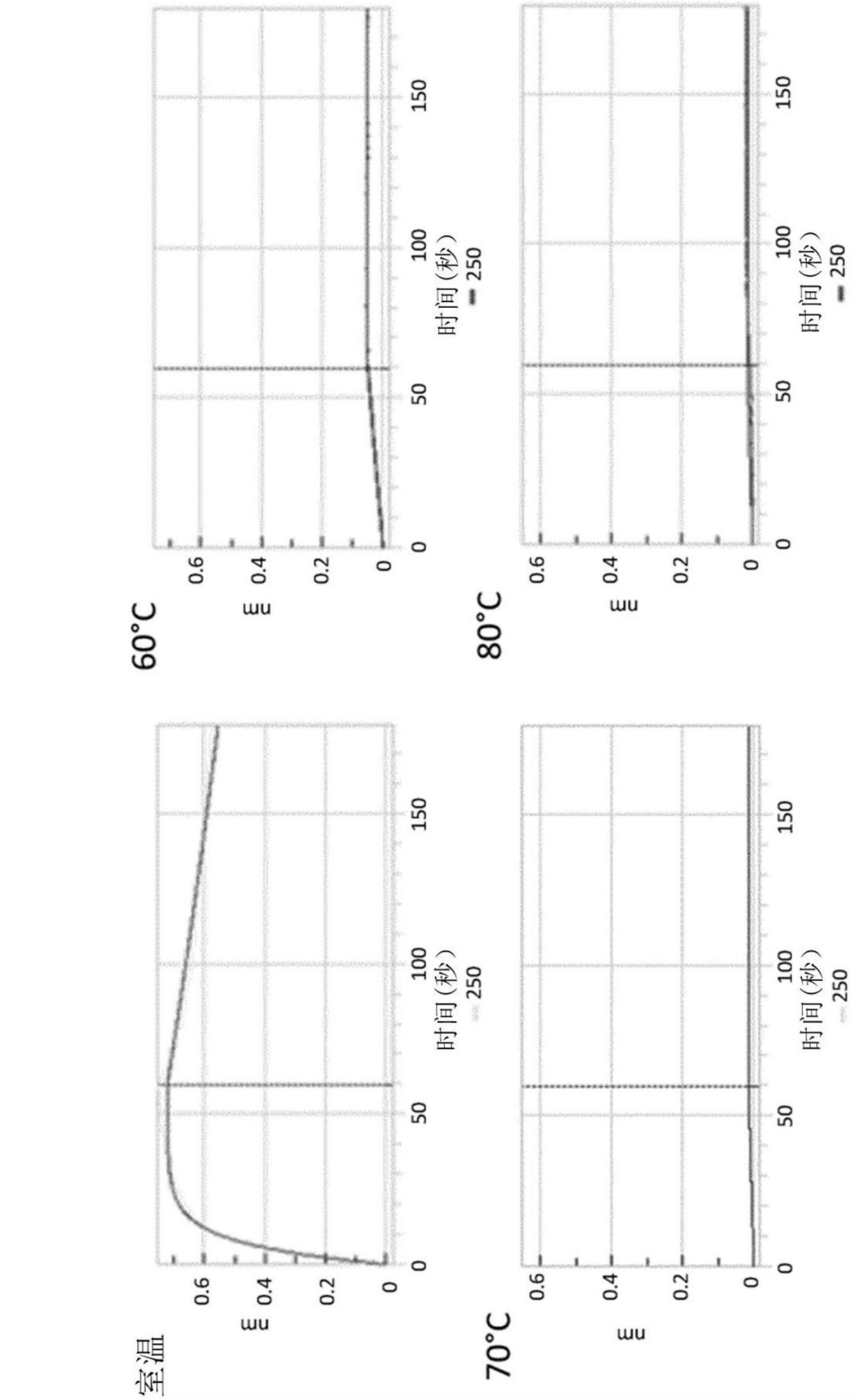


图6H