(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 120248097 A
(43)申请公布日 2025.07.04

(21)申请号 202510314078.9

(22)申请日 2016.09.15

(30)优先权数据
62/219,063 2015.09.15 US

(62)分案原申请数据
201680052527.6 2016.09.15

(71)申请人 豪夫迈·罗氏有限公司
地址 瑞士

(72)发明人 拉米·阿努希
哈里尼·卡卢拉切基 阿龙·尼莱
卡梅伦·诺兰 张映楠 周丽娟
高新欣

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021
专利代理师 张莹 程金山

(51)Int.Cl.
C07K 14/81(2006.01)
C07K 14/00(2006.01)

权利要求书3页 说明书118页
序列表（电子公布） 附图18页

(54)发明名称

胱氨酸结支架平台

(57)摘要

本发明提供结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)。另外,提供使用结合VEGF-A的非天然存在的CKP的方法,所述方法包括诊断和治疗组合物和方法。还提供结合低密度脂蛋白受体相关蛋白6(LRP6)的非天然的CKP。

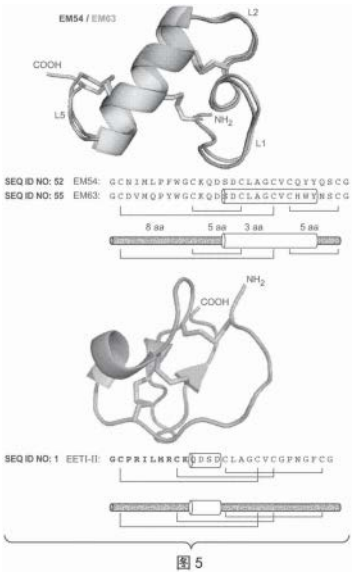


图5

CN 120248097 A

1.一种结合血管内皮生长因子A(VEGF-A)的非天然存在的肽,其中所述肽包含胱氨酸支架结构:

$Z_1C_1L1C_2L2C_3L3C_4L4C_5L5C_6Z_2$

其中:

Z_1和Z_2是任意氨基酸;

L1是环1并且具有选自由以下组成的组的结构:$X_1X_2X_3X_4X_5X_6$(SEQ ID NO:2)、$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7$(SEQ ID NO:3)、$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$(SEQ ID NO:4)、$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9$(SEQ ID NO:5)和$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}$(SEQ ID NO:6),其中$X_1$-$X_{10}$中的每一个是任意氨基酸;

L2是环2并且具有结构:$X_1X_2X_3X_4X_5$(SEQ ID NO:7),其中X_1-X_5中的每一个是任意氨基酸或非天然氨基酸;

L3是环3并且具有结构:$X_1X_2X_3$,其中X_1-X_3中的每一个是任意氨基酸或非天然氨基酸;

L4是环4并且具有结构:X_1,其中X_1是任意氨基酸或非天然氨基酸;

L5是环5并且具有结构:$X_1X_2X_3X_4X_5$(SEQ ID NO:7),其中X_1-X_5中的每一个是任意氨基酸或非天然氨基酸;

其中所述非天然氨基酸选自由以下组成的组:L-炔丙基甘氨酸-PEG_6-、L-磺基酪氨酸、L-正亮氨酸、L-1-萘基丙氨酸、L-2-萘基丙氨酸、L-2-氯代色氨酸、L-3-氟代酪氨酸、L-4-氟苯丙氨酸、γ-苄基-L-脯氨酸、γ-(4-氟-苄基)-L-脯氨酸、4-OH-L-脯氨酸、4-氟-L-脯氨酸、4-[4-(三氟甲基)-苄基]-L-脯氨酸、3,4-二氟-L-苯丙氨酸、3,4-二氯-L-苯丙氨酸、4-氯-L-苯丙氨酸、3-F,4-Cl-L-苯丙氨酸、2-吡啶酮(NH对位)-L-丙氨酸、吡啶酮(NH间位)-L-丙氨酸、3-(1-N-甲基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-乙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-异丙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(5-氮杂-吲哚)-L-丙氨酸、4-甲基-L-苯丙氨酸、2-萘基-L-丙氨酸、L-4,4'-联苯基丙氨酸、3-(3-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹喔啉基)-L-丙氨酸、4-甲基-2-吡啶基-丙氨酸、4-乙基-2-吡啶基-L-丙氨酸、苯并噻唑-L-丙氨酸、苯并噻吩-L-丙氨酸、3-异喹啉基-L-丙氨酸、叔丁基-L-丙氨酸(也称为L-新戊基甘氨酸)、3-环丁基-L-丙氨酸、环戊基-L-丙氨酸、5,5,5-三氟-L-亮氨酸、叔丁基-L-甘氨酸(也称为L-叔-亮氨酸)、L-环戊基甘氨酸、L-环丁基甘氨酸、3,4-羟基-L-苯丙氨酸、3,4-氟-L-苯丙氨酸、3-氟,4-OH-L-苯丙氨酸、2-氯-L-酪氨酸、2-甲基-L-酪氨酸、2-乙基-L-酪氨酸、4-(萘-1-酚)-L-丙氨酸、D-丝氨酸、L-β-高丝氨酸、L-β-丙氨酸、N-α-甲基甘氨酸、甘氨酰胺、丙三醇甘氨酸酯、乙二醇甘氨酸酯、氧杂环丁烷-3-基甘氨酸酯和甘氨酸吗啉酰胺;

其中所述肽以500pM或更佳的亲和力结合VEGF-A。

2.权利要求1所述的肽,其中,参照具有SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列的野生型喷瓜(Ecballium elaterium)胰蛋白酶抑制剂EETI-II蛋白,所述肽具有改变的二硫键连接;其中改变的二硫键连接是C1-C4、C2-C3和C5-C6。

3.权利要求1或2所述的肽,其中Z_1和/或Z_2是G。

4.权利要求1-3中任一项所述的肽,其中在L1中:

X_3不是I;

X_5不是M;和/或

X_6不是R。

5.根据权利要求1-4中任一项所述的肽,其中在L1中:

X_1是选自P、Q、R、T、V、D、N、K、L和X的氨基酸；

X_2是选自T、D、L、V、I、R、P、N和X的氨基酸；

X_3是选自T、P、M、L、S、F、R和X的氨基酸；

X_4是选自R、T、Q、D、W、L、E、S、K和X的氨基酸；

X_5是选自F、P、V、E、K、L、I和X的氨基酸；

X_6是选自K、N、F、P、L、Y、T、D、M和X的氨基酸；

X_7是选自Q、W、H和/X的氨基酸；和/或

X_8是选自Y、A、G、D、E、W、S和X的氨基酸，

其中X是非天然氨基酸且选自由以下组成的组：L-炔丙基甘氨酸-PEG_6-、L-磺基酪氨酸、L-正亮氨酸、L-1-萘基丙氨酸、L-2-萘基丙氨酸、L-2-氯代色氨酸、L-3-氟代酪氨酸、L-4-氟苯丙氨酸、γ-苄基-L-脯氨酸、γ-(4-氟-苄基)-L-脯氨酸、4-OH-L-脯氨酸、4-氟-L-脯氨酸、4-[4-(三氟甲基)-苄基]-L-脯氨酸、3,4-二氟-L-苯丙氨酸、3,4-二氯-L-苯丙氨酸、4-氯-L-苯丙氨酸、3-F,4-Cl-L-苯丙氨酸、2-吡啶酮(NH对位)-L-丙氨酸、吡啶酮(NH间位)-L-丙氨酸、3-(1-N-甲基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-乙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-异丙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(5-氮杂-吲哚)-L-丙氨酸、4-甲基-L-苯丙氨酸、2-萘基-L-丙氨酸、L-4,4'-联苯基丙氨酸、3-(3-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹喔啉基)-L-丙氨酸、4-甲基-2-吡啶基-丙氨酸、4-乙基-2-吡啶基-L-丙氨酸、苯并噻唑-L-丙氨酸、苯并噻吩-L-丙氨酸、3-异喹啉基-L-丙氨酸、叔丁基-L-丙氨酸(也称为L-新戊基甘氨酸)、3-环丁基-L-丙氨酸、环戊基-L-丙氨酸、5,5,5-三氟-L-亮氨酸、叔丁基-L-甘氨酸(也称为L-叔-亮氨酸)、L-环戊基甘氨酸、L-环丁基甘氨酸、3,4-羟基-L-苯丙氨酸、3,4-氟-L-苯丙氨酸、3-氟,4-OH-L-苯丙氨酸、2-氯-L-酪氨酸、2-甲基-L-酪氨酸、2-乙基-L-酪氨酸、4-(萘-1-酚)-L-丙氨酸、D-丝氨酸、L-β-高丝氨酸、L-β-丙氨酸、N-α-甲基甘氨酸、甘氨酰胺、丙三醇甘氨酸酯、乙二醇甘氨酸酯、氧杂环丁烷-3-基甘氨酸酯和甘氨酸吗啉酰胺。

6.根据权利要求5所述的肽，其中在L1中：

其中X_9是选自L、I、V、D、E和X的氨基酸，其中X是非天然氨基酸且选自由以下组成的组：L-炔丙基甘氨酸-PEG_6-、L-磺基酪氨酸、L-正亮氨酸、L-1-萘基丙氨酸、L-2-萘基丙氨酸、L-2-氯代色氨酸、L-3-氟代酪氨酸、L-4-氟苯丙氨酸、γ-苄基-L-脯氨酸、γ-(4-氟-苄基)-L-脯氨酸、4-OH-L-脯氨酸、4-氟-L-脯氨酸、4-[4-(三氟甲基)-苄基]-L-脯氨酸、3,4-二氟-L-苯丙氨酸、3,4-二氯-L-苯丙氨酸、4-氯-L-苯丙氨酸、3-F,4-Cl-L-苯丙氨酸、2-吡啶酮(NH对位)-L-丙氨酸、吡啶酮(NH间位)-L-丙氨酸、3-(1-N-甲基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-乙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-异丙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(5-氮杂-吲哚)-L-丙氨酸、4-甲基-L-苯丙氨酸、2-萘基-L-丙氨酸、L-4,4'-联苯基丙氨酸、3-(3-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹喔啉基)-L-丙氨酸、4-甲基-2-吡啶基-丙氨酸、4-乙基-2-吡啶基-L-丙氨酸、苯并噻唑-L-丙氨酸、苯并噻吩-L-丙氨酸、3-异喹啉基-L-丙氨酸、叔丁基-L-丙氨酸(也称为L-新戊基甘氨酸)、3-环丁基-L-丙氨酸、环戊基-L-丙氨酸、5,5,5-三氟-L-亮氨酸、叔丁基-L-甘氨酸(也称为L-叔-亮氨酸)、L-环戊基甘氨酸、L-环丁基甘氨酸、3,4-羟基-L-苯丙氨酸、3,4-氟-L-苯丙氨酸、3-氟,4-OH-L-苯丙氨酸、2-氯-L-酪氨酸、2-甲基-L-酪氨酸、2-乙基-L-酪氨酸、4-(萘-1-酚)-L-丙氨酸、D-丝氨酸、L-β-高丝氨酸、L-β-丙氨酸、N-α-甲基甘氨酸、甘氨酰胺、丙三醇甘氨酸酯、乙二醇甘氨酸酯、氧杂环丁烷-3-基甘氨酸酯

和甘氨酸吗啉酰胺。

7.权利要求5或6所述的肽,其中在L1中:

其中X_{10}是选自Y、T、M、N、F和X的氨基酸,其中X是非天然氨基酸且选自由以下组成的组:L-炔丙基甘氨酸-PEG_6-、L-磺基酪氨酸、L-正亮氨酸、L-1-萘基丙氨酸、L-2-萘基丙氨酸、L-2-氯代色氨酸、L-3-氟代酪氨酸、L-4-氟苯丙氨酸、γ-苄基-L-脯氨酸、γ-(4-氟-苄基)-L-脯氨酸、4-OH-L-脯氨酸、4-氟-L-脯氨酸、4-[4-(三氟甲基)-苄基]-L-脯氨酸、3,4-二氟-L-苯丙氨酸、3,4-二氯-L-苯丙氨酸、4-氯-L-苯丙氨酸、3-F,4-Cl-L-苯丙氨酸、2-吡啶酮(NH对位)-L-丙氨酸、吡啶酮(NH间位)-L-丙氨酸、3-(1-N-甲基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-乙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-异丙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(5-氮杂-吲哚)-L-丙氨酸、4-甲基-L-苯丙氨酸、2-萘基-L-丙氨酸、L-4,4'-联苯基丙氨酸、3-(3-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹喔啉基)-L-丙氨酸、4-甲基-2-吡啶基-丙氨酸、4-乙基-2-吡啶基-L-丙氨酸、苯并噻唑-L-丙氨酸、苯并噻吩-L-丙氨酸、3-异喹啉基-L-丙氨酸、叔丁基-L-丙氨酸(也称为L-新戊基甘氨酸)、3-环丁基-L-丙氨酸、环戊基-L-丙氨酸、5,5,5-三氟-L-亮氨酸、叔丁基-L-甘氨酸(也称为L-叔-亮氨酸)、L-环戊基甘氨酸、L-环丁基甘氨酸、3,4-羟基-L-苯丙氨酸、3,4-氟-L-苯丙氨酸、3-氟,4-OH-L-苯丙氨酸、2-氯-L-酪氨酸、2-甲基-L-酪氨酸、2-乙基-L-酪氨酸、4-(萘-1-酚)-L-丙氨酸、D-丝氨酸、L-β-高丝氨酸、L-β-丙氨酸、N-α-甲基甘氨酸、甘氨酰胺、丙三醇甘氨酸酯、乙二醇甘氨酸酯、氧杂环丁烷-3-基甘氨酸酯和甘氨酸吗啉酰胺。

8.根据权利要求1-7中任一项所述的肽,其中在L5中,X_1-X_5中的每一个是任意氨基酸,除了X_2不是脯氨酸(P)以外。

9.根据权利要求1-7中任一项所述的肽,其中在L5中,X_1-X_5中的每一个是任意氨基酸,除了X_4不是甘氨酸(G)以外。

10.根据权利要求1-7中任一项所述的肽,其中在L5中:

X_1是选自G、Q、H、R、L和Q的氨基酸;

X_2是选自P、M、W、Y、F、L和H的氨基酸;

X_3是选自N、F、H和Y的氨基酸;

X_4是选自G、Q、D、N、K、H、E和S的氨基酸;和/或

X_5是选自F、S和T的氨基酸。

胱氨酸结支架平台

[0001] 本申请是国际申请号PCT/US2016/052012,国际申请日2016年9月15日,中国国家阶段申请号202210278625.9,中国国家阶段申请日为2018年3月9日,发明名称为“胱氨酸结支架平台”的分案申请。

[0002] 对相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2015年9月15日提交的美国临时申请系列号62/219,063的优先权权益,其内容通过引用整体并入本文。

[0004] ASCII文本文件中的序列表的提交

[0005] ASCII文本文件中的以下提交的内容通过引用整体并入本文:序列表的计算机可读形式(CRF)(文件名:1463920268405EQLIST.txt,记录日期:2016年9月15日,大小:183KB)。

发明背景

[0007] 来自替代蛋白支架的新蛋白的设计和工程改造在最近的十年中已经成为一个新出现的领域,其具有从结构生物学和成像工具至目前正在临床试验中的治疗试剂的广泛应用范围(HK Binz等人,Nat Biotechnol 23,1257-1268,2005;HK Binz和A Pluckthun,Curr Opin Biotechnol 16,459-469,2005;SS Sidhu和S Koide,Curr Opin Struct Biol 17,481-487,2007;ASkerra,Curr Opin Biotechnol 18,295-304,2007;C Gronwall和S Stahl,J Biotechnol 140,254-269,2009;T Wurch等人,Trends Biotechnol 30,575-582,2012;S Banta等人,Annu Rev Biomed Eng 15,93-113,2013)。

[0008] 潜在替代支架分子的合乎需要的物理性能包括热折叠和解折叠的高热稳定性和可逆性。已经应用几种方法来增加蛋白和酶的表观热稳定性,包括基于与高度类似的热稳定的序列的对比的合理设计、稳定二硫键的设计、增加α-螺旋倾向的突变、盐桥的工程改造、蛋白的表面电荷的改变、定向进化和共有序列的组成(Lehmann和Wyss,Cur Open Biotechnology 12,371-375,2001)。

[0009] 胱氨酸结肽(cystine-knot peptide)来自范围广泛的来源并且展现不同的药理活性。它们长约30-50个氨基酸,并且含有六个保守的半胱氨酸残基,这些残基形成三个二硫键。二硫键中的一个穿透由另外两个二硫键及它们相互连接的主链形成的大环,由此产生具有暴露在表面上的多个环的特征性结拓扑。环被定义为位于六个保守的半胱氨酸残基侧面的氨基酸区域,并且本质上是高度可变的。此外,二硫键的独特排列使得胱氨酸结肽对热降解、蛋白水解降解和化学降解高度稳定。

[0010] 因而,需要开发用于多种治疗和诊断应用(如眼睛疾病和病症)的小的、稳定的、人造抗体-样分子。本发明满足了该需要和其它需要。

发明概述

[0012] 在某些实施方案中,本文提供了结合血管内皮生长因子A(VEGF-A)的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP),其中所述CKP包含胱氨酸支架结构:

[0013] $Z_1C_1L1C_2L2C_3L3C_4L4C_5L5C_6Z_2$

[0014] 其中：

[0015] Z_1和Z_2是任意氨基酸；

[0016] L1是环1并且具有选自由以下组成的组的结构：$X_1X_2X_3X_4X_5X_6$(SEQ ID NO:2)、$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7$(SEQ ID NO:3)、$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$(SEQ ID NO:4)、$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9$(SEQ ID NO:5)和$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}$(SEQ ID NO:6)，其中$X_1$-$X_{10}$中的每一个是任意氨基酸；

[0017] L2是环2并且具有结构：$X_1X_2X_3X_4X_5$(SEQ ID NO:7)，其中X_1-X_5中的每一个是任意氨基酸或非天然氨基酸；

[0018] L3是环3并且具有结构：$X_1X_2X_3$，其中X_1-X_3中的每一个是任意氨基酸或非天然氨基酸；

[0019] L4是环4并且具有结构：X_1，其中X_1是任意氨基酸或非天然氨基酸；

[0020] L5是环5并且具有结构：$X_1X_2X_3X_4X_5$(SEQ ID NO:7)，其中X_1-X_5中的每一个是任意氨基酸或非天然氨基酸；

[0021] 其中所述非天然氨基酸选自由以下组成的组：L-炔丙基甘氨酸-PEG_6-、L-磺基酪氨酸、L-正亮氨酸、L-1-萘基丙氨酸、L-2-萘基丙氨酸、L-2-氯代色氨酸、L-3-氟代酪氨酸和L-4-氟苯丙氨酸；并且

[0022] 其中所述CKP以500pM或更佳的亲和力结合VEGF-A。

[0023] 在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中，参照具有SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列的野生型喷瓜(Ecballium elaterium)胰蛋白酶抑制剂EETI-II蛋白，结合VEGF-A的非天然存在的(CKP)具有改变的二硫键连接(connectivity)；其中改变的二硫键连接是C1-C4、C2-C3和C5-C6。

[0024] 在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中，非天然氨基酸选自由以下组成的组：L-炔丙基甘氨酸-PEG_6-、L-磺基酪氨酸、L-正亮氨酸、L-1-萘基丙氨酸、L-2-萘基丙氨酸、L-2-氯代色氨酸、L-3-氟代酪氨酸、L-4-氟苯丙氨酸、γ-苄基-L-脯氨酸、γ-(4-氟-苄基)-L-脯氨酸、4-OH-L-脯氨酸、4-氟-L-脯氨酸、4-[4-(三氟甲基)-苄基]-L-脯氨酸、3,4-二氟-L-苯丙氨酸、3,4-二氯-L-苯丙氨酸、4-氯-L-苯丙氨酸、3-F,4-Cl-L-苯丙氨酸、2-吡啶酮(NH对位)-L-丙氨酸、吡啶酮(NH间位)-L-丙氨酸、3-(1-N-甲基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-乙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-异丙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(5-氮杂-吲哚)-L-丙氨酸、4-甲基-L-苯丙氨酸、2-萘基-L-丙氨酸、L-4,4'-联苯基丙氨酸、3-(3-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹喔啉基)-L-丙氨酸、4-甲基-2-吡啶基-丙氨酸、4-乙基-2-吡啶基-L-丙氨酸、苯并噻唑-L-丙氨酸、苯并噻吩-L-丙氨酸、3-异喹啉基-L-丙氨酸、叔丁基-L-丙氨酸(也称为L-新戊基甘氨酸)、3-环丁基-L-丙氨酸、环戊基-L-丙氨酸、5,5,5-三氟-L-亮氨酸、叔丁基-L-甘氨酸(也称为L-叔-亮氨酸)、L-环戊基甘氨酸、L-环丁基甘氨酸、3,4-羟基-L-苯丙氨酸、3,4-氟-L-苯丙氨酸、3-氟,4-OH-L-苯丙氨酸、2-氯-L-酪氨酸、2-甲基-L-酪氨酸、2-乙基-L-酪氨酸、4-(萘-1-酚)-L-丙氨酸、D-丝氨酸、L-β-高丝氨酸、L-β-丙氨酸、N-α-甲基甘氨酸、甘氨酰胺、丙三醇甘氨酸酯、乙二醇甘氨酸酯、氧杂环丁烷-3-基甘氨酸酯和甘氨酸吗啉酰胺。

[0025] 在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中，Z_1和/或Z_2是多于一个氨基酸，或非天然氨基酸。在某些实施方案中，Z_2是两个氨基酸。在某些实施方案中，Z_2是三

个氨基酸。

[0026] 在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,Z_1和/或Z_2是G。

[0027] 在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,在L1中,X_3不是I;X_5不是M;和/或X_6不是R。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,在L1中:X_1是选自P、Q、R、T、V、D、N、K、L和X的氨基酸;X_2是选自T、D、L、V、I、R、P、N和X的氨基酸;X_3是选自T、P、M、L、S、F、R和X的氨基酸;X_4是选自R、T、Q、D、W、L、E、S、K和X氨基酸;X_5是选自F、P、V、E、K、L、I和X的氨基酸;X_6是选自K、N、F、P、L、Y、T、D、M和X的氨基酸;X_7是选自Q、W、H和/X的氨基酸;和/或X_8是选自Y、A、G、D、E、W、S和X的氨基酸,其中X是非天然氨基酸且选自由以下组成的组:L-炔丙基甘氨酸-PEG_6-、L-磺基酪氨酸、L-正亮氨酸、L-1-萘基丙氨酸、L-2-萘基丙氨酸、L-2-氯代色氨酸、L-3-氟代酪氨酸和L-4-氟苯丙氨酸。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,在L1中:X_9是选自L、I、V、D、E和X的氨基酸,其中X是非天然氨基酸且选自由以下组成的组:L-炔丙基甘氨酸-PEG_6-、L-磺基酪氨酸、L-正亮氨酸、L-1-萘基丙氨酸、L-2-萘基丙氨酸、L-2-氯代色氨酸、L-3-氟代酪氨酸和L-4-氟苯丙氨酸。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,在L1中:X_{10}是选自Y、T、M、N、F和X的氨基酸,其中X是非天然氨基酸且选自由以下组成的组:L-炔丙基甘氨酸-PEG_6-、L-磺基酪氨酸、L-正亮氨酸、L-1-萘基丙氨酸、L-2-萘基丙氨酸、L-2-氯代色氨酸、L-3-氟代酪氨酸和L-4-氟苯丙氨酸。

[0028] 在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,X是非天然氨基酸且选自由以下组成的组:L-炔丙基甘氨酸-PEG_6-、L-磺基酪氨酸、L-正亮氨酸、L-1-萘基丙氨酸、L-2-萘基丙氨酸、L-2-氯代色氨酸、L-3-氟代酪氨酸、L-4-氟苯丙氨酸、γ-苄基-L-脯氨酸、γ-(4-氟-苄基)-L-脯氨酸、4-OH-L-脯氨酸、4-氟-L-脯氨酸、4-[4-(三氟甲基)-苄基]-L-脯氨酸、3,4-二氟-L-苯丙氨酸、3,4-二氯-L-苯丙氨酸、4-氯-L-苯丙氨酸、3-F,4-Cl-L-苯丙氨酸、2-吡啶酮(NH对位)-L-丙氨酸、吡啶酮(NH间位)-L-丙氨酸、3-(1-N-甲基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-乙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-异丙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(5-氮杂-吲哚)-L-丙氨酸、4-甲基-L-苯丙氨酸、2-萘基-L-丙氨酸、L-4,4'-联苯基丙氨酸、3-(3-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹喔啉基)-L-丙氨酸、4-甲基-2-吡啶基-丙氨酸、4-乙基-2-吡啶基-L-丙氨酸、苯并噻唑-L-丙氨酸、苯并噻吩-L-丙氨酸、3-异喹啉基-L-丙氨酸、叔丁基-L-丙氨酸(也称为L-新戊基甘氨酸)、3-环丁基-L-丙氨酸、环戊基-L-丙氨酸、5,5,5-三氟-L-亮氨酸、叔丁基-L-甘氨酸(也称为L-叔-亮氨酸)、L-环戊基甘氨酸、L-环丁基甘氨酸、3,4-羟基-L-苯丙氨酸、3,4-氟-L-苯丙氨酸、3-氟,4-OH-L-苯丙氨酸、2-氯-L-酪氨酸、2-甲基-L-酪氨酸、2-乙基-L-酪氨酸、4-(萘-1-酚)-L-丙氨酸、D-丝氨酸、L-β-高丝氨酸、L-β-丙氨酸、N-α-甲基甘氨酸、甘氨酰胺、丙三醇甘氨酸酯、乙二醇甘氨酸酯、氧杂环丁烷-3-基甘氨酸酯和甘氨酸吗啉酰胺。

[0029] 在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,在L5中,X_1-X_5中的每一个是任意氨基酸,除了X_2不是脯氨酸(P)以外。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,在L5中,X_1-X_5中的每一个是任意氨基酸,除了X_4不是甘氨酸(G)以外。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,在L5中:X_1是选自G、Q、H、R、L和Q的氨基酸;X_2是选自P、M、W、Y、F、L和H的氨基酸;X_3是选自N、F、H和Y的氨基酸;X_4是选自G、Q、D、N、K、H、E和S的氨基酸;和/或X_5是选自F、S和T的氨基酸。

[0030] 在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,L1具有结构$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$(SEQ ID NO:4),其中:X_1是选自P、Q和R的氨基酸;X_2是选自T、L和D的氨基酸;X_3是选自T、M和L的氨基酸;X_4是选自R、Q和D的氨基酸;X_5是选自F、P和V的氨基酸;X_6是选自K和F的氨基酸;X_7是选自Q和W的氨基酸;并且X_8是选自Y、G和D的氨基酸。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,L1具有结构$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$ X_9 X_{10}(SEQ ID NO:6),其中:X_1是选自Q、R、T和V的氨基酸;X_2是选自T和D的氨基酸;X_3是P;X_4是选自T和W的氨基酸;X_5是选自F、E、P和K的氨基酸;X_6是选自N和P的氨基酸;X_7是选自W和H的氨基酸;X_8是选自A、D、E和W的氨基酸;X_9是选自L和I的氨基酸;并且X_{10}是选自Y、T、M和N的氨基酸。

[0031] 在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,在L5中:X_1是选自G、H和Q的氨基酸;X_2是选自P、M、W和Y的氨基酸;X_3是选自N和Y的氨基酸;X_4是选自G、Q和S的氨基酸;并且X_5是选自F和S的氨基酸。

[0032] 在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,L1具有结构$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$(SEQ ID NO:4),其中:X_1是选自D、Q、N和K的氨基酸;X_2是选自V、I、R、L和P的氨基酸;X_3是选自L、S、M、T和F的氨基酸;X_4是选自Q、L和E的氨基酸;X_5是P;X_6是选自F、L和Y的氨基酸;X_7是W;并且X_8是G。

[0033] 在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,在L5中:X_3是Y;X_5是S;并且X_1、X_2和X_4各自是任意氨基酸,除了X_1不是G,X_2不是P,X_4不是G,和/或X_5不是F以外。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,在L5中:X_1是选自H、L、R和Q的氨基酸;X_2是选自W、F和Y的氨基酸;X_3是Y;X_4是选自Q、N、K、H和E的氨基酸;并且X_5是S。

[0034] 在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,L1具有结构$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$ X_9 X_{10}(SEQ ID NO:6),其中:X_1是选自K、Q、L和R的氨基酸;X_2是选自N和D的氨基酸;X_3是选自P和L的氨基酸;X_4是选自L、T、S和K的氨基酸;X_5是选自F、V、I和L的氨基酸;X_6是选自N和D的氨基酸;X_7是W;X_8是选自A和S的氨基酸;X_9是选自L、V、E和D的氨基酸;并且X_{10}是选自Y和F的氨基酸。

[0035] 在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,在L5中:X1是Q;X_2是选自L、F、M和H的氨基酸;X_3是选自F、Y和H的氨基酸;X_4是选自D、Q、N和K的氨基酸;并且X_5是选自S和T的氨基酸。

[0036] 在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,在L2中,X_1是K,X_2是Q,X_3是D,X_4是S,并且X_5是D。

[0037] 在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,L1具有结构$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$(SEQ ID NO:4),其中:X_5是P;X_7是W;X_8是G;并且其中X_1、X_2、X_3、X_4和X_6各自是任意氨基酸,除了X1不是P,X_2不是R,X_3不是I,和/或X_6不是R以外。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,L1具有结构$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$(SEQ ID NO:4),其中:X_1是选自N和D的氨基酸;X_2是选自I和V的氨基酸;X_3是选自M和L的氨基酸;X_4是选自L、Q、D和K的氨基酸;X_5是P;X_6是选自F、Y、T、L和M的氨基酸;X_7是W;并且X_8是G。

[0038] 在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,在L5中:X_1是选自Q、H、L和R的氨基酸;X_2是选自Y和W的氨基酸;X_3是Y;X_4是选自Q和N的氨基酸;并且X_5是S。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,在L5中:X_3是Y;X_5是S;并且X_1、X_2和X_4各自是任意氨基酸,除了:X_1不是G,X_2不是P,和/或X_4不是G以外。

[0039] 在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,在L2中:X_1是选自G或E的氨基酸;X_2是选自Q、L、P、R、E和M的氨基酸;X_3是选自S、D和N的氨基酸;X_4是选自F、Y、L、M和I的氨基酸;和/或X_5是选自E、D、Q、L和S的氨基酸,

[0040] 在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,在L3中,X_1是L,X_2是A,并且X_3是G。

[0041] 在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,在L4中,X1是V或F。

[0042] 在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,在L5中,X_1-X_5中的每一个是任意氨基酸,除了X_2不是脯氨酸(P)以外。

[0043] 在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,在L5中,X_1-X_5中的每一个是任意氨基酸,除了X_4不是甘氨酸(G)以外。

[0044] 在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,在L5中:X_1是除G之外的任意氨基酸;X_2是除P之外的任意氨基酸;X_3是除N之外的任意氨基酸;X_4是除G之外的任意氨基酸;和/或X_5是除F之外的任意氨基酸。

[0045] 在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,L1具有结构$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$(SEQ ID NO:4),其中X_1是选自N、D和X的氨基酸;X_2是选自I、V和X的氨基酸;X_3是M或X;X_4是选自L、Q和X的氨基酸;X_5是P或X;X_6是F、Y或X;X_7是W或X;并且X_8是G或X,其中X是选自由以下组成的组的非天然氨基酸:L-炔丙基甘氨酸-PEG_6-、L-磺基酪氨酸、L-正亮氨酸、L-1-萘基丙氨酸、L-2-萘基丙氨酸、L-2-氯代色氨酸、L-3-氟代酪氨酸和L-4-氟苯丙氨酸。

[0046] 在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,X是非天然氨基酸且选自由以下组成的组:L-炔丙基甘氨酸-PEG_6-、L-磺基酪氨酸、L-正亮氨酸、L-1-萘基丙氨酸、L-2-萘基丙氨酸、L-2-氯代色氨酸、L-3-氟代酪氨酸、L-4-氟苯丙氨酸、γ-苄基-L-脯氨酸、γ-(4-氟-苄基)-L-脯氨酸、4-OH-L-脯氨酸、4-氟-L-脯氨酸、4-[4-(三氟甲基)-苄基]-L-脯氨酸、3,4-二氟-L-苯丙氨酸、3,4-二氯-L-苯丙氨酸、4-氯-L-苯丙氨酸、3-F,4-Cl-L-苯丙氨酸、2-吡啶酮(NH对位)-L-丙氨酸、吡啶酮(NH间位)-L-丙氨酸、3-(1-N-甲基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-乙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-异丙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(5-氮杂-吲哚)-L-丙氨酸、4-甲基-L-苯丙氨酸、2-萘基-L-丙氨酸、L-4,4'-联苯基丙氨酸、3-(3-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹喔啉基)-L-丙氨酸、4-甲基-2-吡啶基-丙氨酸、4-乙基-2-吡啶基-L-丙氨酸、苯并噻唑-L-丙氨酸、苯并噻吩-L-丙氨酸、3-异喹啉基-L-丙氨酸、叔丁基-L-丙氨酸(也称为L-新戊基甘氨酸)、3-环丁基-L-丙氨酸、环戊基-L-丙氨酸、5,5,5-三氟-L-亮氨酸、叔丁基-L-甘氨酸(也称为L-叔-亮氨酸)、L-环戊基甘氨酸、L-环丁基甘氨酸、3,4-羟基-L-苯丙氨酸、3,4-氟-L-苯丙氨酸、3-氟,4-OH-L-苯丙氨酸、2-氯-L-酪氨酸、2-甲基-L-酪氨酸、2-乙基-L-酪氨酸、4-(萘-1-酚)-L-丙氨酸、D-丝氨酸、L-β-高丝氨酸、L-β-丙氨酸、N-α-甲基甘氨酸、甘氨酰胺、丙三醇甘氨酸酯、乙二醇甘氨酸酯、氧杂环丁烷-3-基甘氨酸酯和甘氨酸吗啉酰胺。

[0047] 在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,在L3中,X_1-X_3中的每一个是任意氨基酸或非天然氨基酸,除了X_1不是亮氨酸(L),X_2不是丙氨酸(A),并且X_3不是甘氨酸(G)以外,其中所述非天然氨基酸选自由以下组成的组:L-炔丙基甘氨酸-PEG_6-、L-磺基酪氨酸、L-正亮氨酸、L-1-萘基丙氨酸、L-2-萘基丙氨酸、L-2-氯代色氨酸、L-3-氟代酪

氨酸和L-4-氟苯丙氨酸。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,在L3中:X_1是选自M、F、L V和X的氨基酸;X_2是选自S、N、Q、I、Y、E、V、T和X的氨基酸;X_3是选自D、Q、T、N、E、R和X的氨基酸,其中X是选自由以下组成的组的非天然氨基酸:L-炔丙基甘氨酸-PEG_6-、L-磺基酪氨酸、L-正亮氨酸、L-1-萘基丙氨酸、L-2-萘基丙氨酸、L-2-氯代色氨酸、L-3-氟代酪氨酸和L-4-氟苯丙氨酸。

[0048] 在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,在L4中,X_1是除V之外的任意氨基酸或选自由以下组成的组的非天然氨基酸:L-炔丙基甘氨酸-PEG_6-、L-磺基酪氨酸、L-正亮氨酸、L-1-萘基丙氨酸、L-2-萘基丙氨酸、L-2-氯代色氨酸、L-3-氟代酪氨酸和L-4-氟苯丙氨酸。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,在L4中,X_1是I、L或X,其中X是选自由以下组成的组的非天然氨基酸:L-炔丙基甘氨酸-PEG_6-、L-磺基酪氨酸、L-正亮氨酸、L-1-萘基丙氨酸、L-2-萘基丙氨酸、L-2-氯代色氨酸、L-3-氟代酪氨酸和L-4-氟苯丙氨酸。

[0049] 在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,在L5中:X_3是Y或X;X_5是S或X;并且X_1、X_2和X_4各自是任意氨基酸或X,除了X_1不是G,X_2不是P,和/或X_4不是G以外,其中X是选自由以下组成的组的非天然氨基酸:L-炔丙基甘氨酸-PEG_6-、L-磺基酪氨酸、L-正亮氨酸、L-1-萘基丙氨酸、L-2-萘基丙氨酸、L-2-氯代色氨酸、L-3-氟代酪氨酸和L-4-氟苯丙氨酸。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,在L5中,X_1-X_5中的每一个是任意氨基酸,除了X_2不是脯氨酸(P)以外。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,在L5中,X_1-X_5中的每一个是任意氨基酸,除了X_4不是甘氨酸(G)以外。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,在L5中:X_1是选自Q、H和X的氨基酸;X_2是选自Y、W和X的氨基酸;X_3是Y或X;X_4是选自Q、N或X的氨基酸;X_5是S或X,其中X是选自由以下组成的组的非天然氨基酸:L-炔丙基甘氨酸-PEG_6-、L-磺基酪氨酸、L-正亮氨酸、L-1-萘基丙氨酸、L-2-萘基丙氨酸、L-2-氯代色氨酸、L-3-氟代酪氨酸和L-4-氟苯丙氨酸。

[0050] 在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,X是非天然氨基酸且选自以下组成的组:L-炔丙基甘氨酸-PEG_6-、L-磺基酪氨酸、L-正亮氨酸、L-1-萘基丙氨酸、L-2-萘基丙氨酸、L-2-氯代色氨酸、L-3-氟代酪氨酸、L-4-氟苯丙氨酸、γ-苄基-L-脯氨酸、γ-(4-氟-苄基)-L-脯氨酸、4-OH-L-脯氨酸、4-氟-L-脯氨酸、4-[4-(三氟甲基)-苄基]-L-脯氨酸、3,4-二氟-L-苯丙氨酸、3,4-二氯-L-苯丙氨酸、4-氯-L-苯丙氨酸、3-F,4-Cl-L-苯丙氨酸、2-吡啶酮(NH对位)-L-丙氨酸、吡啶酮(NH间位)-L-丙氨酸、3-(1-N-甲基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-乙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-异丙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(5-氮杂-吲哚)-L-丙氨酸、4-甲基-L-苯丙氨酸、2-萘基-L-丙氨酸、L-4,4'-联苯基丙氨酸、3-(3-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹喔啉基)-L-丙氨酸、4-甲基-2-吡啶基-丙氨酸、4-乙基-2-吡啶基-L-丙氨酸、苯并噻唑-L-丙氨酸、苯并噻吩-L-丙氨酸、3-异喹啉基-L-丙氨酸、叔丁基-L-丙氨酸(也称为L-新戊基甘氨酸)、3-环丁基-L-丙氨酸、环戊基-L-丙氨酸、5,5,5-三氟-L-亮氨酸、叔丁基-L-甘氨酸(也称为L-叔-亮氨酸)、L-环戊基甘氨酸、L-环丁基甘氨酸、3,4-羟基-L-苯丙氨酸、3,4-氟-L-苯丙氨酸、3-氟,4-OH-L-苯丙氨酸、2-氯-L-酪氨酸、2-甲基-L-酪氨酸、2-乙基-L-酪氨酸、4-(萘-1-酚)-L-丙氨酸、D-丝氨酸、L-β-高丝氨酸、L-β-丙氨酸、N-α-甲基甘氨酸、甘氨酰胺、丙三醇甘氨酸酯、乙二醇甘氨酸酯、氧杂环丁烷-3-基甘氨酸酯和甘氨酸吗啉酰胺。

[0051] 在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,在L2中:X_1是G或X;X_2是R、P或X;X_3是D或X;X_4是F、I或X;并且X_5是E、D或X,其中X是选自由以下组成的组的非天然氨基酸:L-炔丙基甘氨酸-PEG_6-、L-磺基酪氨酸、L-正亮氨酸、L-1-萘基丙氨酸、L-2-萘基丙氨酸、L-2-氯代色氨酸、L-3-氟代酪氨酸和L-4-氟苯丙氨酸。

[0052] 在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,结合血管内皮生长因子A(VEGF-A)的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含氨基酸序列GCNIMLPFWGCGRDFECLQQCICQYYQSCG(SEQ ID NO:103)。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,结合血管内皮生长因子A(VEGF-A)的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含氨基酸序列GCNIMLPFWGCGRDFECVERCICQYYQSCG(SEQ ID NO:104)。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,结合血管内皮生长因子A(VEGF-A)的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含氨基酸序列GCNIMLPFWGCGRDFECMSDCICQYYQSCG(SEQ ID NO:105)。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,结合血管内皮生长因子A(VEGF-A)的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含氨基酸序列GCNIMLPFWGCGRDFECMNQCICQYYQSCG(SEQ ID NO:106)。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,结合血管内皮生长因子A(VEGF-A)的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含氨基酸序列GCNIMLPFWGCGRDFECMQTCICQYYQSCG(SEQ ID NO:107)。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,结合血管内皮生长因子A(VEGF-A)的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含氨基酸序列GCNIMLPFWGCGRDFECVYQCICQYYQSCG(SEQ ID NO:108)。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,结合血管内皮生长因子A(VEGF-A)的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含氨基酸序列GCNIMLPFWGCGRDFECFINCICQYYQSCG(SEQ ID NO:109)。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,结合血管内皮生长因子A(VEGF-A)的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含氨基酸序列GCNIMLPFWGCGRDFECVSQCICQYYQSCG(SEQ ID NO:110)。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,结合血管内皮生长因子A(VEGF-A)的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含氨基酸序列GCNIMLPFWGCGRDFECVTECICQYYQSCG(SEQ ID NO:111)。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,结合血管内皮生长因子A(VEGF-A)的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含氨基酸序列GCNIMLPFWGCGRDFECFYECICQYYQSCG(SEQ ID NO:112)。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,结合血管内皮生长因子A(VEGF-A)的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含氨基酸序列GCNIMLPFWGCGRDFECMEQCICQYYQSCG(SEQ ID NO:113)。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,结合血管内皮生长因子A(VEGF-A)的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含氨基酸序列GCNIMLPFWGCGRDFECVYRCICQYYQSCG(SEQ ID NO:114)。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,结合血管内皮生长因子A(VEGF-A)的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含氨基酸序列GCDVMQPYWGCGPDIDCFVRCLCHWYNSCG(SEQ ID NO:139)。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,结合血管内皮生长因子A(VEGF-A)的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含氨基酸序列GCDVMQPYWGCGPDIDCLSNCICHWYNSCG(SEQ ID NO:140)。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,结合血管内皮生长因子A(VEGF-A)的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含氨基酸序列GCNIMLPYWGCGRDFECMEQCICQYYQSCG(SEQ ID NO:

142)。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,结合血管内皮生长因子A(VEGF-A)的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含氨基酸序列GCNIXLPFWGCGRDFECMSDCICQYYQSCG(SEQ ID NO:144),其中X是正亮氨酸(Nle)。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,结合血管内皮生长因子A(VEGF-A)的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含氨基酸序列GCNIXLPFWGCGRDFECVSQCICQYYQSCG(SEQ ID NO:145),其中X是正亮氨酸(Nle)。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,结合血管内皮生长因子A(VEGF-A)的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含氨基酸序列GCNIXLPYWGCGRDFECMEQCICQYYQSCG(SEQ ID NO:146),其中X是正亮氨酸(Nle)。

[0053] 在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,结合血管内皮生长因子A(VEGF-A)的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含氨基酸序列GCDVXQPYWGCGPDIDCLSNCICHWYNSCG(SEQ ID NO:224),其中X是正亮氨酸。

[0054] 在某些实施方案中,提供非天然存在的胱氨酸结肽(CKP),其包含选自由以下组成的组的氨基酸:

[0055] GCNIMLPFWGCGRDFECMEQCICQYYQSCG(SEQ ID NO:113);

[0056] GCNIMLPFWGCGRDFECVYRCICQYYQSCG(SEQ ID NO:114);

[0057] GCDVMQPYWGCGPDIDCFVRCLCHWYNSCG(SEQ ID NO:139);

[0058] GCDVMQPYWGCGPDIDCLSNCICHWYNSCG(SEQ ID NO:140);

[0059] GCNIMLPYWGCGRDFECMEQCICQYYQSCG(SEQ ID NO:142);

[0060] GCNIXLPFWGCGRDFECMSDCICQYYQSCG(SEQ ID NO:144),其中X是正亮氨酸(Nle);GCNIXLPFWGCGRDFECVSQCICQYYQSCG(SEQ ID NO:145),其中X是正亮氨酸(Nle);GCNIXLPYWGCGRDFECMEQCICQYYQSCG(SEQ ID NO:146),其中X是正亮氨酸(Nle);和GCDVXQPYWGCGPDIDCLSNCICHWYNSCG(SEQ ID NO:224),其中X是正亮氨酸。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,所述CKP包含

[0061] GCNIMLPFWGCGRDFECMEQCICQYYQSCG(SEQ ID NO:113)中所示的氨基酸序列。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,所述CKP包含GCNIMLPFWGCGRDFECVYRCICQYYQSCG(SEQ ID NO:114)中所示的氨基酸序列。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,所述CKP包含

[0062] GCDVMQPYWGCGPDIDCFVRCLCHWYNSCG(SEQ ID NO:139)中所示的氨基酸序列。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,所述CKP包含GCDVMQPYWGCGPDIDCLSNCICHWYNSCG(SEQ ID NO:140)中所示的氨基酸序列。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,所述CKP包含

[0063] GCNIMLPYWGCGRDFECMEQCICQYYQSCG(SEQ ID NO:142)中所示的氨基酸序列。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,所述CKP包含GCNIXLPFWGCGRDFECMSDCICQYYQSCG(SEQ ID NO:144)中所示的氨基酸序列,其中X是正亮氨酸(Nle)。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,所述CKP包含

[0064] GCNIXLPFWGCGRDFECVSQCICQYYQSCG(SEQ ID NO:145)中所示的氨基酸序列,其中X是正亮氨酸(Nle)。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,所述CKP包含

[0065] GCNIXLPYWGCGRDFECMEQCICQYYQSCG(SEQ ID NO:146)中所示的氨基酸序列,其中X

是正亮氨酸(Nle)。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,所述CKP包含

[0066] GCDVXQPYWGCGPDIDCLSNCICHWYNSCG(SEQ ID NO:224)中所示的氨基酸序列,其中X是正亮氨酸。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,所述CKP结合VEGF-A。

[0067] 在某些实施方案中,提供非天然存在的胱氨酸结肽(CKP),其包含选自由以下组成的组的氨基酸:

[0068] $GCDVX_1QPYWGCGPDI-D/E-CLS-N/K/X_2-CICHWYNSCG$(SEQ ID NO:534)、$GCDVX_1QPYWGCGPDI-N/K/X_2-CLS-D/E-CICHWYNSCG$(SEQ ID NO:535)、$GCNIX_1LPYWGCGRDF-D/E-CME-N/K/X_2-CICQYYQSCG$(SEQ ID NO:538)、

[0069] $GCNIX_1LPYWGCGRDF-N/K/X_2-CME-D/E-CICQYYQSCG$(SEQ ID NO:539)、$GCNIX_1LPFWGCGRDF-D/E-CVS-N/K/X_2-CICQYYQSCG$(SEQ ID NO:540)和$GCNIX_1LPFWGCGRDF-N/K/X_2-CVS-D/E-CICQYYQSCG$(SEQ ID NO:541),其中$X_1$是正亮氨酸并且$X_2$是鸟氨酸。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,所述CKP包含$GCDVX_1QPYWGCGPDI-D/E-CLS-N/K/X_2-CICHWYNSCG$(SEQ ID NO:534)中所示的氨基酸序列,其中X_1是正亮氨酸并且X_2是鸟氨酸。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,所述CKP包含GCDVXQPYWGCGPDIDCLSKCICHWYNSCG(SEQ ID NO:536)中所示的氨基酸序列,其中X是正亮氨酸。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,所述CKP包含$GCDVX_1QPYWGCGPDIDCLSX_2CICHWYNSCG$(SEQ ID NO:537)中所示的氨基酸序列,其中X_1是正亮氨酸并且X_2是鸟氨酸。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,所述CKP包含$GCDVX_1QPYWGCGPDI-N/K/X_2-CLS-D/E-CICHWYNSCG$(SEQ ID NO:535)中所示的氨基酸序列,其中X_1是正亮氨酸并且X_2是鸟氨酸。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,所述CKP包含$GCNIX_1LPYWGCGRDF-D/E-CME-N/K/X_2-CICQYYQSCG$(SEQ ID NO:538)中所示的氨基酸序列,其中X_1是正亮氨酸并且X_2是鸟氨酸。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,所述CKP包含GCNIXLPYWGCGRDFECMEKCICQYYQSCG(SEQ ID NO:543)中所示的氨基酸序列,其中X是正亮氨酸。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,所述CKP包含$GCNIX_1LPYWGCGRDFECMEX_2CICQYYQSCG$(SEQ ID NO:544)中所示的氨基酸序列,其中X_1是正亮氨酸并且X_2是鸟氨酸。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,所述CKP包含$GCNIX_1LPYWGCGRDF-N/K/X_2-CME-D/E-CICQYYQSCG$(SEQ ID NO:539)中所示的氨基酸序列,其中X_1是正亮氨酸并且X_2是鸟氨酸。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,所述CKP包含$GCNIX_1LPFWGCGRDF-D/E-CVS-N/K/X_2-CICQYYQSCG$(SEQ ID NO:540)中所示的氨基酸序列,其中X_1是正亮氨酸并且X_2是鸟氨酸。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,所述CKP包含

GCNIXLPFWGCGRDFECVSKCICQYYQSCG(SEQ ID NO:545)中所示的氨基酸序列,其中X是正亮氨酸。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,所述CKP包含$GCNIX_1LPFWGCGRDFECVSX_2CICQYYQSCG$(SEQ ID NO:546)中所示的氨基酸序列,其中X_1是正亮氨酸和X_2是鸟氨酸。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,所述CKP包含$GCNIX_1LPFWGCGRDF-N/K/X_2-CVS-D/E-CICQYYQSCG$(SEQ ID NO:541)中所示的氨基酸序列,其中X_1是正亮氨酸并且X_2是鸟氨酸。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案

中,所述CKP结合VEGF-A。

[0070] 在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,提供结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP),其中所述CKP包含胱氨酸支架结构:

[0071] $Z_1C_1L1C_2L2C_3L3C_4L4C_5L5C_6Z_2$

[0072] 其中:

[0073] Z_1和Z_2是任意氨基酸;

[0074] L1是环1并且具有选自由以下组成的组的结构:$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$、$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9$和$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}$,其中$X_1$-$X_{10}$中的每一个是任意氨基酸;

[0075] L2是环2并且具有结构:$X_1X_2X_3X_4X_5$,其中X_1-X_5中的每一个是任意氨基酸;

[0076] L3是环3并且具有结构:$X_1X_2X_3$,其中X_1-X_3中的每一个是任意氨基酸;

[0077] L4是环4并且具有结构:X_1,其中X_1是任意氨基酸;

[0078] L5是环5并且具有结构:$X_1X_2X_3X_4X_5$,其中X_1-X_5中的每一个是任意氨基酸;

[0079] 其中参照具有SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列的野生型喷瓜胰蛋白酶抑制剂EETI-II蛋白,所述CKP具有改变的二硫键连接;其中所述改变的二硫键连接是C1-C4、C2-C3和C5-C6;并且其中所述CKP具有至少20%的α螺旋含量百分比。

[0080] 在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,Z_1和Z_2是任意氨基酸、多于一个氨基酸、或非天然氨基酸。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,L1中的X_1-X_{10}中的每一个是任意氨基酸或非天然氨基酸。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,L2中的X_1-X_5中的每一个是任意氨基酸或非天然氨基酸。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,L3中的X_1-X_3中的每一个是是任意氨基酸或非天然氨基酸。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,L4中的X_1是任意氨基酸或非天然氨基酸。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,L5中的X_1-X_5中的每一个是任意氨基酸或非天然氨基酸。在某些实施方案中,所述非天然氨基酸选自由以下组成的组:L-炔丙基甘氨酸-PEG_6-、L-磺基酪氨酸、L-正亮氨酸、L-1-萘基丙氨酸、L-2-萘基丙氨酸、L-2-氯代色氨酸、L-3-氟代酪氨酸、L-4-氟苯丙氨酸、γ-苄基-L-脯氨酸、γ-(4-氟-苄基)-L-脯氨酸、4-OH-L-脯氨酸、4-氟-L-脯氨酸、4-[4-(三氟甲基)-苄基]-L-脯氨酸、3,4-二氟-L-苯丙氨酸、3,4-二氯-L-苯丙氨酸、4-氯-L-苯丙氨酸、3-F,4-Cl-L-苯丙氨酸、2-吡啶酮(NH对位)-L-丙氨酸、吡啶酮(NH间位)-L-丙氨酸、3-(1-N-甲基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-乙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-异丙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(5-氮杂-吲哚)-L-丙氨酸、4-甲基-L-苯丙氨酸、2-萘基-L-丙氨酸、L-4,4'-联苯基丙氨酸、3-(3-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹喔啉基)-L-丙氨酸、4-甲基-2-吡啶基-丙氨酸、4-乙基-2-吡啶基-L-丙氨酸、苯并噻唑-L-丙氨酸、苯并噻吩-L-丙氨酸、3-异喹啉基-L-丙氨酸、叔丁基-L-丙氨酸(也称为L-新戊基甘氨酸)、3-环丁基-L-丙氨酸、环戊基-L-丙氨酸、5,5,5-三氟-L-亮氨酸、叔丁基-L-甘氨酸(也称为L-叔-亮氨酸)、L-环戊基甘氨酸、L-环丁基甘氨酸、3,4-羟基-L-苯丙氨酸、3,4-氟-L-苯丙氨酸、3-氟,4-OH-L-苯丙氨酸、2-氯-L-酪氨酸、2-甲基-L-酪氨酸、2-乙基-L-酪氨酸、4-(萘-1-酚)-L-丙氨酸、D-丝氨酸、L-β-高丝氨酸、L-β-丙氨酸、N-α-甲基甘氨酸、甘氨酰胺、丙三醇甘氨酸酯、乙二醇甘氨酸酯、氧杂环丁烷-3-基甘氨酸酯和甘氨酸吗啉酰胺。

[0081] 在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然

存在的(CKP)以500pM或更小的亲和力与VEGF-A结合。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,结合亲和力经由表面等离子共振确定。

[0082] 在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,Z_1和/或Z_2是多于一个氨基酸,或非天然氨基酸。在某些实施方案中,Z_2是两个氨基酸。在某些实施方案中,Z_2是三个氨基酸。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,在L5中,X_1-X_5中的每一个是任意氨基酸,除了X_2不是脯氨酸(P)以外。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,在L5中,X_1-X_5中的每一个是任意氨基酸,除了X_4不是甘氨酸(G)以外。

[0083] 在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的(CKP)的C-末端羧基是经修饰的(诸如加帽的)。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的(CKP)的N-末端氨基是经修饰的(诸如加帽的)。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的(CKP)的C-末端羧基是加帽的并且结合VEGF-A的非天然存在的(CKP)的N-末端氨基是经修饰的(诸如加帽的)。

[0084] 在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的(CKP)的C-末端羧基是酰胺化的。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的(CKP)的N-末端氨基是乙酰化的。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的(CKP)的C-末端羧基是酰胺化的并且结合VEGF-A的非天然存在的(CKP)的N-末端氨基是乙酰化的。

[0085] 在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的(CKP)抑制VEGF-A活性。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,CKP以约0.5nM至约1.0nM之间的IC_{50}抑制VEGF-A活性。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,非天然存在的EETI-II支架蛋白结合人VEGF-A、小鼠VEGF-A和大鼠VEGF-A。

[0086] 在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,非天然存在的CKP与抗体G6.31竞争结合VEGF-A。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,提供非天然存在的CKP,其与以上实施方案中任一者的结合VEGF-A的非天然存在的(CKP)竞争结合VEGF-A。

[0087] 在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,结合VEGF-A上的表位的非天然存在的CKP,所述表位包括选自由以下组成的组的氨基酸残基中的至少一个:V14、V15、F17、D19、Y21、Q22、Y25、I46、K48、N62、D63、L66、M81、I83、K84、P85、H86、G88、Q89、I91、C104、R105和P106。

[0088] 在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,所述残基选自由以下组成的组:K48、N62和D63。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,所述残基选自由以下组成的组:Y21、Y25和P106。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,所述残基选自由以下组成的组:H86和Q89。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,所述残基选自由以下组成的组:M81、D19和Q22。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,所述残基选自由以下组成的组:F17、M81和I91。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,所述残基选自由以下组成的组:V14、F17、D19、Q22、M81和I91。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案

中,所述残基选自由以下组成的组:Y25。

[0089] 在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的CKP与治疗剂缀合。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的CKP与标记缀合。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,所述标记选自由放射性同位素、荧光染料和酶组成的组。

[0090] 在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,提供一种分离的核酸,其编码以上实施方案中任一者的结合VEGF-A的非天然存在的(CKP)。还提供一种表达载体,其编码以上实施方案中任一者的核酸分子。还提供一种细胞,其包含以上实施方案中任一者的表达载体的细胞。还提供一种生产以上实施方案中任一者的结合VEGF-A的非天然存在的(CKP)的方法,所述方法包括:培养以上实施方案中任一者的细胞,和从细胞培养物回收结合VEGF-A的非天然存在的(CKP)。

[0091] 还提供一种生产以上实施方案中任一者的结合VEGF-A的非天然存在的(CKP)的方法,所述方法包括化学合成结合VEGF-A的非天然存在的(CKP)。

[0092] 本文中提供一种组合物,其包含以上实施方案中任一者的结合VEGF-A的非天然存在的(CKP)和药学上可接受的载体。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,所述组合物包含一种或多种另外的化合物。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,所述另外的化合物结合选自由以下组成的组的第二生物分子:白细胞介素-6(IL-6);白细胞介素-6受体(IL-6R);PDGF;血管生成素;血管生成素2;Tie2;S1P;整合素αvβ3、αvβ5和α5β1;β细胞素(betacellulin);apelin/APJ;红细胞生成素;补体因子D;TNFα;HtrA1;VEGF受体;ST-2受体;以及与年龄相关的黄斑变性(AMD)风险有遗传关联的蛋白质,诸如补体途径组分C2、因子B、因子H、CFHR3、C3b、C5、C5a、C3a、HtrA1、ARMS2、TIMP3、HLA、白细胞介素-8(IL-8)、CX3CR1、TLR3、TLR4、CETP、LIPC、COL10A1和TNFRSF10A。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,所述另外的化合物是非天然存在的CKP。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,所述另外的化合物是其抗体或抗原-结合片段。

[0093] 本文中提供一种治疗受试者中以血管生成和/或血管通透性或渗漏为特征的眼部疾病的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的以上实施方案中任一者的结合VEGF-A的非天然存在的(CKP)。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,所述方法还包括施用一种或多种另外的化合物。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的CKP与一种或多种另外的化合物同时施用。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的CKP在一种或多种另外的化合物之前或之后施用。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,所述另外的化合物结合选自由以下组成的组的第二生物分子:白细胞介素-6(IL-6);白细胞介素-6受体(IL-6R);PDGF;血管生成素;血管生成素2;Tie2;S1P;整合素αvβ3、αvβ5和α5β1;β细胞素(betacellulin);apelin/APJ;红细胞生成素;补体因子D;TNFα;HtrA1;VEGF受体;ST-2受体;以及与年龄相关的黄斑变性(AMD)风险有遗传关联的蛋白质,诸如补体途径组分C2、因子B、因子H、CFHR3、C3b、C5、C5a、C3a、HtrA1、ARMS2、TIMP3、HLA、白细胞介素-8(IL-8)、CX3CR1、TLR3、TLR4、CETP、LIPC、COL10A1和TNFRSF10A。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,所述另外的化合物是非天然存在的CKP。在根

据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,所述另外的化合物是抗体或其抗原-结合片段。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,所述眼部疾病是选自由以下组成的组的眼内新生血管性疾病:增生性视网膜病、脉络膜新生血管形成(CNV)、年龄相关的黄斑变性(AMD)、糖尿病性和其它缺血相关的视网膜病、糖尿病性黄斑水肿、病理性近视、von Hippel-Lindau病、眼的组织胞浆菌病、视网膜静脉阻塞(RVO)(包括视网膜中央静脉阻塞(CRVO)和视网膜分支静脉阻塞(BRVO))、角膜新生血管形成、视网膜新生血管形成和早产儿视网膜病(ROP)。

[0094] 在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的CKP或所述组合物经由可植入装置施用至受试者。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,所述可植入装置选自由以下组成的组:眼部插入物、缓慢释放储存物、眼部插塞(plug)/储器、非生物可降解的眼部植入物或生物可降解的眼部植入物。

[0095] 在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,提供包含以上实施方案中任一者的结合VEGF-A的非天然存在的(CKP)的组合物,其用于治疗受试者中以血管生成和/或血管通透性或渗漏为特征的眼部疾病中的用途。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,所述眼部疾病是选自由以下组成的组的眼内新生血管性疾病:增生性视网膜病、脉络膜新生血管形成(CNV)、年龄相关的黄斑变性(AMD)、糖尿病性和其它缺血相关的视网膜病、糖尿病性黄斑水肿、病理性近视、von Hippel-Lindau病、眼的组织胞浆菌病、视网膜静脉阻塞(RVO)(包括视网膜中央静脉阻塞(CRVO)和视网膜分支静脉阻塞(BRVO))、角膜新生血管形成、视网膜新生血管形成和早产儿视网膜病(ROP)。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,所述组合物经由可植入装置施用至受试者。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,所述可植入装置选自由以下组成的组:眼部插入物、缓慢释放储存物、眼部插塞(plug)/储器、非生物可降解的眼部植入物或生物可降解的眼部植入物。

[0096] 在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,提供包含以上实施方案中任一者的结合VEGF-A的非天然存在的(CKP)的组合物,其用于治疗受试者中以血管生成和/或血管通透性或渗漏为特征的眼部疾病中的用途。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,所述眼部疾病是选自由以下组成的组的眼内新生血管性疾病:增生性视网膜病、脉络膜新生血管形成(CNV)、年龄相关的黄斑变性(AMD)、糖尿病性和其它缺血相关的视网膜病、糖尿病性黄斑水肿、病理性近视、von Hippel-Lindau病、眼的组织胞浆菌病、视网膜静脉阻塞(RVO)(包括视网膜中央静脉阻塞(CRVO)和视网膜分支静脉阻塞(BRVO))、角膜新生血管形成、视网膜新生血管形成和早产儿视网膜病(ROP)。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,药物经由可植入装置施用至受试者。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,所述可植入装置选自由以下组成的组:眼部插入物、缓慢释放储存物、眼部插塞(plug)/储器、非生物可降解的眼部植入物或生物可降解的眼部植入物。

[0097] 在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的(CKP)经配制用于长期作用递送。

[0098] 本文中提供一种制剂,其包含以上任意实施方案的结合VEGF-A的非天然存在的(CKP)和PLGA。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,所述PLGA是PLGA

棒(rod)。

[0099] 本文中还提供结合人低密度脂蛋白受体相关蛋白6(LRP6)的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP),其中所述CKP包含胱氨酸支架结构:

[0100] $Z_1C_1L1C_2L2C_3L3C_4L4C_5L5C_6Z_2$;

[0101] 其中:

[0102] Z_1和Z_2是任意氨基酸;

[0103] L1是环1并且具有选自由以下组成的组的结构:$X_1X_2X_3X_4X_5X_6$、$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7$、$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$、$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9$和$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}$,其中$X_1$-$X_{10}$中的每一个是任意氨基酸;

[0104] L2是环2并且具有结构:$X_1X_2X_3X_4X_5$,其中X_1-X_5中的每一个是任意氨基酸;

[0105] L3是环3并且具有结构:$X_1X_2X_3$,其中X_1-X_3中的每一个是任意氨基酸;

[0106] L4是环4并且具有结构:X_1,其中X_1是任意氨基酸;并且

[0107] L5是环5并且具有结构:$X_1X_2X_3X_4X_5$,其中X_1-X_5中的每一个是任意氨基酸。

[0108] 在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,Z_1和/或Z_2是多于一个氨基酸,或非天然氨基酸。在某些实施方案中,Z_2是两个氨基酸。在某些实施方案中,Z_2是三个氨基酸。

[0109] 在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,Z_1和/或Z_2是G。

[0110] 在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,在L1中:X_1是选自R、V、M、A、G、N、S和E的氨基酸;X_2是选自T、N、S、G、R和A的氨基酸;X_3是选自N、R、H、V、K、S、G、I和Y的氨基酸;X_4是选自R、V、N、I、K、S和T的氨基酸;X_5是选自V、R、K、I、T、S、L和N的氨基酸;并且X_6是选自K、G、A、I、R、N、S和V的氨基酸。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,在L1中:X_7是选自G、R、K、E、P和T的氨基酸。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,在L1中:X_8是选自G、R、K、Q、A和S的氨基酸。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,在L1中:X_9是选自R或G的氨基酸。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,在L1中:X_{10}是选自E、W和G的氨基酸。

[0111] 在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,在L5中:X_1是选自G、S、N、Y、A和R的氨基酸;X_2是选自P、G、S、V、E、R、F和D的氨基酸;X_3是选自N、G、S、E、P、K、H和R的氨基酸;X_4是选自G、R、H、S、Q、V和D的氨基酸;并且X_5是选自F、D、N、R、G、Y、S和T的氨基酸。

[0112] 在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,在L2中,X_1是K,X_2是Q,X_3是D,X_4是S,并且X_5是D。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,在L3中,X_1是L,X_2是A,并且X_3是G。在根据(或如应用于)以上任意实施方案的某些实施方案中,在L4中,X_1是X。

附图简述

[0114] 图1描绘EETI-II胱氨酸结蛋白的结构。

[0115] 图2A显示为了确定EGF_CKP9.54.90是否破坏VEGF-A(8-109)与KDR之间;VEGF-A(8-109)与Flt-1之间;VEGF-A165与KDR之间;VEGF-B与Flt-1之间;VEGF-C与Flt-4之间;VEGF-D与Flt-4之间;和PIGF-2与FLT-1之间的相互作用而进行的实验的结果。

[0116] 图2B显示为了确定EGF_CKP9.54.90是否破坏VEGF-A(8-109)与KDR之间;VEGF-A

(8-109)与Flt-1之间;VEGF-A 165与KDR之间;EGF与EGFR之间;PDGF与PDGFR之间;NGF与NGFR之间;和IGF与IGFR之间的相互作用而进行的实验的结果。

[0117] 图3显示为了确定VEGF_CKP9.54.90、VEGF_CKP9.54和VEGF_CKP9.63.12是否抑制胰蛋白酶蛋白酶活性而进行的实验的结果。

[0118] 图4显示为了确定VEGF_CKP9.54.90和VEGF_CKP9.63.12是否对胰蛋白酶消化具有抗性而进行的实验的结果。

[0119] 图5描绘VEGF_CKP9.54.90的结构、野生型EETI-II的结构,并且提供比较结合VEGF的CKP变体的二硫键连接模式与野生型EETI-II的二硫键连接模式的示意图。

[0120] 图6描绘VEGF_CKP9.54.90与VEGF-A复合的共晶结构。

[0121] 图7描绘显示VEGF_CKP9.54.90、抗体G6.31以及Flt-2的结构域2在VEGF-A上的结合界面的空间填充模型。

[0122] 图8描绘显示VEGF_CKP9.54.90、抗体G6.31以及Flt-2的结构域2在VEGF-A上的结合界面的带状图解模型。

[0123] 图9显示VEGF-A与VEGF_CKP9.54.90之间的相互作用表面处的VEGF-A上的接触残基。

[0124] 图10显示贝伐单抗(bevacizumab)Fab、Z-结构域和受体-阻断肽v108在VEGF-A上的结合界面。

[0125] 图11提供为了确定VEGF-A中的氨基酸取代突变对VEGF_CKP9.54.90与VEGF-A的结合和VEGF__CKP9.63.12与VEGFA的结合的影响而进行的实验的结果。相对于两个不同的y轴显示实验的结果。

[0126] 图12提供为了确定VEGF_CKP9.54.90对大鼠眼睛中的CNV的作用而进行的实验的结果。

[0127] 图13提供为了确定结合VEGF的CKP变体的IC_{50}值而进行的实验的结果。

[0128] 图14描绘VEGF_CKP9.54和VEGF_CKP9.63的结构。图14还显示VEGF_CKP9.63与VEGF-A复合的共晶结构的一部分,其显示VEGF_CKP9.63的环1内的位置8处的残基能够与VEGF-A的Gln22的侧链形成氢键。

[0129] 图15显示为了评价克隆9.54-28、9.54、9.54.1-2、9.54.1-36、9.54.1-42、9.54.1-63、9.54.1-90和9.54.1对hVEGF(8-109)的结合亲和力而进行的噬菌体竞争ELISA实验的结果。

[0130] 图16A显示为了评价克隆9.63.44-1至9.63.44-7的结合亲和力而进行的噬菌体竞争ELISA实验的结果。

[0131] 图16B显示为了评价克隆9.63.44-8至9.63.44-14的结合亲和力而进行的噬菌体竞争ELISA实验的结果。

发明详述

[0133] 提供特异性结合人VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)。这种非天然存在的CKP显示一种或多种以下特性:抑制VEGF-A活性且IC_{50}为小于约0.5nM至小于约1.0nM之间;结合人VEGF-A、小鼠VEGF-A和大鼠VEGF-A;对胰蛋白酶消化具有抗性;二硫键连接为C1-C4、C2-C3和C5-C6;至少约至少约15％至至少约50％的α螺旋含量;结合不同于被抗体G6.31结

合的表位的VEGF-A上的表位,结合不同于被贝伐单抗结合的表位的VEGF-A上的表位和/或结合不同于被Flt-1结合的表位的VEGF-A上的表位。

[0134] 还提供提供包含结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽的嵌合分子和缀合物,编码结合VEGF-A的非天然存在的CKP的核酸,以及组合物(诸如药物组合物)。还提供使用结合VEGF-A的非天然存在的CKP的方法,用于治疗由异常的(诸如过度的)血管生成和/或异常的血管通透性引起的眼部疾病和/或病症(诸如眼部血管增生性疾病和/或病症)。还提供结合VEGF-A的非天然存在的CKP在制备用于治疗眼部疾病或病症的药物中的用途。

[0135] 在相关的方面,还提供结合人低密度脂蛋白受体相关蛋白6(LRP6)的非天然存在的CKP。

[0136] 除非另有说明,本公开内容的实践采用细胞生物学、毒理学、分子生物学、生物化学、细胞培养、免疫学、肿瘤学、重组DNA的领域和有关领域中的标准方法和常规技术,这些属于本领域的技能。这样的技术描述在文献中且由此可被本领域技术人员得到。参见,例如,Alberts,B.等人,"Molecular Biology of the Cell,"第5版,Garland Science,New York,NY,2008;Voet,D.等人"Fundamentals of Biochemistry:Life at the Molecular Level,"第3版,John Wiley&Sons,Hoboken,NJ,2008;Sambrook,J.等人,"Molecular Cloning:A Laboratory Manual,"第3版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,2001;Ausubel,F.等人,"Current Protocols in Molecular Biology,"John Wiley&Sons,New York,1987和定期更新;Freshney,R.I.,"Culture of Animal Cells:A Manual of Basic Technique,"第4版,John Wiley&Sons,Somerset,NJ,2000;和系列"Methods in Enzymology,"Academic Press,San Diego,CA。

[0137] 定义

[0138] 如本文中使用的,"非天然存在的"意指例如包含未在自然界中发现的氨基酸序列的多肽,或例如包含未在自然界中发现的核苷酸序列的核酸。本文提供的"非天然存在的胱氨酸结肽"或"非天然存在的CKP"(或编码它们的核酸)不具有野生型EETI-II蛋白的氨基酸序列,即GCPRILMRCKQDSDCLAGCVCGPNGFCG(SEQ ID NO:1),其中环1(L1)是氨基酸序列PRILMR(SEQ ID NO:92),环2(L2)是氨基酸序列KQDSD(SEQ ID NO:93),环3(L3)是氨基酸序列LAG,环4(L4)是氨基酸V,并且环5(L5)是氨基酸序列GPNGF(SEQ ID NO:15)。本文提供的非天然存在的CKP能够通过基因工程方法或通过化学合成方法生产。因此,本文描述的非天然存在的CKP可以是重组的,即,由细胞或核酸或载体生产,所述细胞或核酸或载体已经通过引入异源核酸或将天然核酸改变成对于该细胞而言非天然的形式而进行修饰,或所述细胞来源于如此修饰的细胞。或者,本文描述的非天然存在的CKP可以通过化学肽合成生产。

[0139] 如本文中使用的,术语"胱氨酸结肽"或"CKP"是指长度为26-50个氨基酸的肽,其含有六个保守的半胱氨酸残基,这些残基形成三个二硫键。二硫键中的一个穿透由另外两个二硫键及它们相互连接的主链形成的大环,由此产生具有暴露在表面上的多个环的特征性结拓扑。环被定义为位于六个保守的半胱氨酸残基侧面的氨基酸区域,并且本质上是高度可变的。

[0140] 如本文中使用的,"氨基酸改变"是指在例如肽序列中至少一个氨基酸的添加、缺失或置换(诸如在WT EETI-II肽序列中以产生非天然存在的CKP,或在非天然存在的CKP中以产生另一种非天然存在的CKP)。

[0141] “分离的”非天然存在的CKP或组合物是已经经过鉴定并从它的天然环境的组分分离和/或回收的CKP或组合物。它的天然环境的污染物组分是将干扰非天然存在的CKP的诊断或治疗用途的物质,且可以包括酶、激素和其它蛋白性的或非蛋白性的溶质。在优选的实施方案中,非天然存在的CKP或组合物将被纯化(1)至大于95重量%的非天然存在的CKP,如通过Lowry方法所确定的,并且最优选为超过99重量%,(2)纯化至足以获得N-末端或内部氨基酸序列的至少15个残基的程度,如通过使用旋杯式序列分析仪,或(3)纯化至同质性,通过在还原或非还原条件下使用考马斯蓝或优选银染料的SDS-PAGE。分离的非天然存在的CKP包括在重组细胞内的原位CKP,因为CKP的天然环境的至少一种组分将是不存在的。将通过至少一个纯化步骤制备分离的非天然存在的CKP。

[0142] 相对于本文中鉴定的多肽序列的“百分比(%)氨基酸序列同一性”或“同源性”定义为在将任何保守性置换视作序列同一性的一部分来比对序列之后,与正在比较的多肽中的氨基酸残基相同的候选序列中的氨基酸残基的百分比。为了确定氨基酸序列同一性百分比的比对可以以本领域能力范围内的多种方式实现,例如,使用可公开获得的计算机软件诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员可以确定用于测量比对的适当参数,包括实现正在比较的全长序列范围内最大比对所需要的任何算法。然而,出于本文目的,使用序列比较计算机程序ALIGN-2产生氨基酸序列同一性%值。ALIGN-2序列比较计算机程序由Genentech,Inc.创作,并且源代码已经随用户文档提交至U.S.Copyright Office,Washington D.C.,20559(美国版权办公室华盛顿特区20559),其中它以美国版权登记号TXU510087登记。ALIGN-2程序从Genentech,Inc.,South San Francisco(南旧金山),California(加利福尼亚州)可公开获得。应当将ALIGN-2程序汇编用以在UNIX操作系统(优选数字式UNIX V4.0D)上使用。全部序列比较参数通过ALIGN-2程序设定并且不变动。

[0143] 如本文中使用的,术语“表位”是指能够被本文提供的非天然存在的CKP特异性结合的蛋白决定簇。表位可以包含呈立体构象的约3-10个氨基酸,其对所述表位是独特的。这些氨基酸在蛋白质内可以是线性的(即,在氨基酸序列中是连续的)或者它们可以位于蛋白质的不同部分(即,在氨基酸序列中是不连续的)。确定蛋白质内或两个蛋白质的界面处的氨基酸的立体构象的方法是本领域已知的,并且包括例如X射线晶体学和2-维核磁共振。

[0144] 术语“二硫键形成模式(disulfide bonding pattern)(DBP)”、“二硫键连接”和“二硫键模式”是指相对于WT EETI-II蛋白的半胱氨酸连接模式。WT EETI-II蛋白包含六个保守的半胱氨酸残基(编号为1-6),其形成具有连接C1-C4、C2-C5和C3-C6的三个二硫键。二硫键形成模式是拓扑上不变的,这意味着二硫键只能够通过解开一个或多个二硫键(诸如使用氧化还原条件)来改变。

[0145] 用于治疗目的“受试者”、“患者”或“个体”是指分类为哺乳动物的任何动物,包括人类、驯养的动物和农场动物、以及动物园、运动或宠物动物,诸如狗、马、猫、牛等。优选地,所述哺乳动物是人类。

[0146] 如本文公开的非天然存在的CKP(或包含这种非天然存在的CKP的组合物)的“有效量”是足以实现特别说明的目的的量。可以经验地和通过与所述目的有关的已知方法确定“有效量”。

[0147] 术语“治疗有效量”是指有效“治疗”哺乳动物(诸如人类患者)中的疾病或病症的

如本文公开的非天然存在的CKP或组合物的量。在眼部疾病或眼部病症(诸如眼部血管增生性疾病或以过度的血管生成为特征的眼部病症)的情况下,本文描述的结合VEGF-A的非天然存在的CKP(或包含这种非天然存在的结合VEGF-A的CKP的组合物)的治疗有效量是指减少、终止或防止眼部疾病的至少一种症状(诸如本文其它地方进一步详细描述的眼部疾病的症状或病症)的量。例如,有效量将被认为是这样的量:所述量足以减少或预防眼部疾病或眼部病症(诸如眼部血管增生性疾病或以过度的血管生成为特征的眼部病症)的症状,例如如通过光学相干体层摄影术(OCT)所测量的眼部疾病的完全或部分消除和/或维持或者最佳矫正视力的提高和/或维持(诸如如通过EDTRS视力表评价的大于5个字母),或者如通过荧光眼部底血管造影评价的新生血管生成或新生血管通透性的尺寸的减小。如本文使用的有效量还将包括足以防止或延缓例如黄斑水肿、增强的通透性(诸如视网膜血管通透性)、CNV病变的大小和视力丧失的发展的量。如本文使用的有效量还将包括足以防止或延缓眼部疾病症状的发展的量,改变症状疾病的过程(例如但不限于,减缓眼部疾病的症状的进展),或逆转疾病的症状。

[0148] 如本文中使用的,“治疗”是获得有益的或期望的结果(包括临床结果)的方案。为了本发明的目的,有益的或期望的临床结果包括,但不限于,以下的一种或多种:减轻由眼部疾病引起的一种或多种症状,减小眼部疾病的范围,使眼部疾病稳定(例如,防止或延缓疾病恶化),防止或延缓疾病的传播(诸如,至眼组织周围),防止或延迟眼部疾病的复发,延缓或减慢眼部疾病的进展,改善疾病状态,提供眼部疾病的减轻或消除(部分或全部),减小治疗眼部疾病所需的一种或多种其它药物的剂量,延缓眼部疾病的进展,增加或改善生活质量,和/或防止或延缓视力丧失。“治疗”也涵盖眼部疾病的病理学后果(诸如,例如,视力丧失)的减小。本文提供的方法考虑治疗的这些方面的任意一种或多种。

[0149] “病症”是将受益于使用本文描述的结合VEGF-A的非天然存在的CKP的治疗的任何病况。本文中待治疗的VEGF-A相关的病症包括眼部疾病和病症(诸如眼部血管增生性疾病或以过度的血管生成为特征的眼部病症),如本文其他地方所描述的。

[0150] 如本文中使用的,经由“药学上可接受的”或“药理学上相容的”意指不是在生物学上或在其它方面不希望的物质,例如,所述物质可以掺入施用至患者的药物组合物中,而不会造成任何显著的不希望的生物学效应或与它所在的组合物的任何其它组分以有害的方式相互作用。药学上可接受的载体或赋形剂已经优选地满足毒理学和制造试验的要求标准和/或被包括在美国食品和药品管理局(U.S.Food and Drug administration)制备的无活性成分指南(Inactive Ingredient Guide)上。

[0151] 术语“检测”旨在包括确定物质的存在或不存在,或定量物质(诸如靶配体)的量。因此,该术语是指本文提供的物质、组合物和方法用于定性和定量测定的用途。一般而言,用于检测的具体技术对于本发明的实践而言不是至关重要的。

[0152] 例如,根据本发明的“检测”可以包括:观察靶配体(包括,但不限于,人低密度脂蛋白受体相关蛋白6(LRP6)多肽或人血管内皮生长因子A(VEGF-A)多肽)的存在或不存在;靶配体的水平的变化;和/或靶配体的生物学功能/活性的变化。在某些实施方案中,“检测”可以包括检测靶配体的水平(例如,人LRP6或人VEGF的多肽水平)。检测可以包括定量与对照相比时在10%至90%之间的任何值或在30%至60%之间的任何值或超过100%的任何值的变化(增加或减少)。检测可以包括定量在2倍至10倍(包括端点)之间的任何值或更多(例

如,100倍)的变化。

[0153] 当在本文中使用时,词语“标记”是指与非天然存在的CKP直接地或间接地缀合的可检测的化合物或组合物。所述标记本身可以是本身可检测的(例如,放射性同位素标记或荧光标记),或者,在酶促标记的情况下,可以催化可检测的底物化合物或组合物的化学改变。

[0154] 关于非天然存在的CKP与靶配体的结合,术语“特异性结合特定靶配体”或“与特定靶配体特异性地结合”或“对特定靶配体具有特异性”意指在测量上不同于非特异性相互作用的结合。可以测量特异性结合,例如,通过相比于对照分子的结合确定分子的结合,所述对照分子通常是不具有结合活性的类似结构的分子。例如,通过与对照分子的竞争可以确定特异性结合,所述对照分子类似于靶标,例如,过量的未标记的靶标。在该情况下,如果标记的靶标与探针的结合被过量的未标记的靶标竞争性地抑制,则指示特异性结合。在某些实施方案中,非天然存在的CKP与“非靶”配体的结合程度将小于非天然存在的CKP与它的靶配体(诸如LRP6或VEGF-A)的结合的约10%,如通过例如荧光活化细胞分选(FACS)分析或放射免疫沉淀(RIA)所确定的。在某些实施方案中,本公开内容的非天然存在的CKP以以下解离常数(Kd)特异性地结合靶配体(诸如人低密度脂蛋白受体相关蛋白6(LRP6)或人血管内皮生长因子A(VEGF-A)):等于或低于100nM、任选地低于10nM、任选地低于1nM、任选地低于0.5nM、任选地低于0.1nM、任选地低于0.01nM或任选地低于0.005nM;在约4℃、25℃、37℃或45℃的温度测量。

[0155] 本文中对“约”某个值或参数的提及是指该技术领域中的技术人员容易知道的各个值的通常误差范围。本文中对“约”某个值或参数的提及包括(并且描述)涉及该值或参数本身的方面。例如,提及“约X”的描述包括“X”的描述。

[0156] 应当理解,本文描述的发明的方面和实施方案包括“包含”、“由...组成”和”基本上...组成”的方面和实施方案。

[0157] 本文中引用的全部参考文献,包括专利申请和出版物,通过引用整体并入本文。

[0158] 结合人血管内皮生长因子A(VEGF-A)的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)

[0159] 在某些实施方案中,本文提供了结合血管内皮生长因子A(VEGF-A)的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP),其中所述CKP包含以下胱氨酸支架结构(即,支架结构I):

[0160] $Z_1C_1L1C_2L2C_3L3C_4L4C_5L5C_6Z_2$ (I)

[0161] 其中:

[0162] Z_1和Z_2是任意氨基酸;

[0163] L1是环1并且具有选自由以下组成的组的结构:$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$、$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9$和$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}$,其中$X_1$-$X_{10}$中的每一个是任意氨基酸;

[0164] L2是环2并且具有结构:$X_1X_2X_3X_4X_5$,其中X_1-X_5中的每一个是任意氨基酸或选自由以下组成的组的非天然氨基酸:L-炔丙基甘氨酸-PEG_6-、L-磺基酪氨酸、L-正亮氨酸、L-1-萘基丙氨酸、L-2-萘基丙氨酸、L-2-氯代色氨酸、L-3-氟代酪氨酸、L-4-氟苯丙氨酸、γ-苄基-L-脯氨酸、γ-(4-氟-苄基)-L-脯氨酸、4-OH-L-脯氨酸、4-氟-L-脯氨酸、4-[4-(三氟甲基)-苄基]-L-脯氨酸、3,4-二氟-L-苯丙氨酸、3,4-二氯-L-苯丙氨酸、4-氯-L-苯丙氨酸、3-F,4-Cl-L-苯丙氨酸、2-吡啶酮(NH对位)-L-丙氨酸、吡啶酮(NH间位)-L-丙氨酸、3-(1-N-甲基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-乙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-异丙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(5-

氮杂-吲哚)-L-丙氨酸、4-甲基-L-苯丙氨酸、2-萘基-L-丙氨酸、L-4,4'-联苯基丙氨酸、3-(3-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹喔啉基)-L-丙氨酸、4-甲基-2-吡啶基-丙氨酸、4-乙基-2-吡啶基-L-丙氨酸、苯并噻唑-L-丙氨酸、苯并噻吩-L-丙氨酸、3-异喹啉基-L-丙氨酸、叔丁基-L-丙氨酸(也称为L-新戊基甘氨酸)、3-环丁基-L-丙氨酸、环戊基-L-丙氨酸、5,5,5-三氟-L-亮氨酸、叔丁基-L-甘氨酸(也称为L-叔-亮氨酸)、L-环戊基甘氨酸、L-环丁基甘氨酸、3,4-羟基-L-苯丙氨酸、3,4-氟-L-苯丙氨酸、3-氟,4-OH-L-苯丙氨酸、2-氯-L-酪氨酸、2-甲基-L-酪氨酸、2-乙基-L-酪氨酸、4-(萘-1-酚)-L-丙氨酸、D-丝氨酸、L-β-高丝氨酸、L-β-丙氨酸、N-α-甲基甘氨酸、甘氨酰胺、丙三醇甘氨酸酯、乙二醇甘氨酸酯、氧杂环丁烷-3-基甘氨酸酯和甘氨酸吗啉酰胺。

[0165] L3是环3并且具有结构:$X_1X_2X_3$,其中X_1-X_3中的每一个是任意氨基酸或选自由以下组成的组的非天然氨基酸:L-炔丙基甘氨酸-PEG_6-、L-磺基酪氨酸、L-正亮氨酸、L-1-萘基丙氨酸、L-2-萘基丙氨酸、L-2-氯代色氨酸、L-3-氟代酪氨酸、L-4-氟苯丙氨酸、γ-苄基-L-脯氨酸、γ-(4-氟-苄基)-L-脯氨酸、4-OH-L-脯氨酸、4-氟-L-脯氨酸、4-[4-(三氟甲基)-苄基]-L-脯氨酸、3,4-二氟-L-苯丙氨酸、3,4-二氯-L-苯丙氨酸、4-氯-L-苯丙氨酸、3-F,4-Cl-L-苯丙氨酸、2-吡啶酮(NH对位)-L-丙氨酸、吡啶酮(NH间位)-L-丙氨酸、3-(1-N-甲基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-乙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-异丙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(5-氮杂-吲哚)-L-丙氨酸、4-甲基-L-苯丙氨酸、2-萘基-L-丙氨酸、L-4,4'-联苯基丙氨酸、3-(3-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹喔啉基)-L-丙氨酸、4-甲基-2-吡啶基-丙氨酸、4-乙基-2-吡啶基-L-丙氨酸、苯并噻唑-L-丙氨酸、苯并噻吩-L-丙氨酸、3-异喹啉基-L-丙氨酸、叔丁基-L-丙氨酸(也称为L-新戊基甘氨酸)、3-环丁基-L-丙氨酸、环戊基-L-丙氨酸、5,5,5-三氟-L-亮氨酸、叔丁基-L-甘氨酸(也称为L-叔-亮氨酸)、L-环戊基甘氨酸、L-环丁基甘氨酸、3,4-羟基-L-苯丙氨酸、3,4-氟-L-苯丙氨酸、3-氟,4-OH-L-苯丙氨酸、2-氯-L-酪氨酸、2-甲基-L-酪氨酸、2-乙基-L-酪氨酸、4-(萘-1-酚)-L-丙氨酸、D-丝氨酸、L-β-高丝氨酸、N-α-甲基甘氨酸、甘氨酰胺、丙三醇甘氨酸酯、乙二醇甘氨酸酯、氧杂环丁烷-3-基甘氨酸酯和甘氨酸吗啉酰胺;

[0166] L4是环4并且具有结构:X_1,其中X_1是任意氨基酸或选自由以下组成的组的非天然氨基酸:L-炔丙基甘氨酸-PEG_6-、L-磺基酪氨酸、L-正亮氨酸、L-1-萘基丙氨酸、L-2-萘基丙氨酸、L-2-氯代色氨酸、L-3-氟代酪氨酸、L-4-氟苯丙氨酸、γ-苄基-L-脯氨酸、γ-(4-氟-苄基)-L-脯氨酸、4-OH-L-脯氨酸、4-氟-L-脯氨酸、4-[4-(三氟甲基)-苄基]-L-脯氨酸、3,4-二氟-L-苯丙氨酸、3,4-二氯-L-苯丙氨酸、4-氯-L-苯丙氨酸、3-F,4-Cl-L-苯丙氨酸、2-吡啶酮(NH对位)-L-丙氨酸、吡啶酮(NH间位)-L-丙氨酸、3-(1-N-甲基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-乙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-异丙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(5-氮杂-吲哚)-L-丙氨酸、4-甲基-L-苯丙氨酸、2-萘基-L-丙氨酸、L-4,4'-联苯基丙氨酸、3-(3-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹喔啉基)-L-丙氨酸、4-甲基-2-吡啶基-丙氨酸、4-乙基-2-吡啶基-L-丙氨酸、苯并噻唑-L-丙氨酸、苯并噻吩-L-丙氨酸、3-异喹啉基-L-丙氨酸、叔丁基-L-丙氨酸(也称为L-新戊基甘氨酸)、3-环丁基-L-丙氨酸、环戊基-L-丙氨酸、5,5,5-三氟-L-亮氨酸、叔丁基-L-甘氨酸(也称为L-叔-亮氨酸)、L-环戊基甘氨酸、L-环丁基甘氨酸、3,4-羟基-L-苯丙氨酸、3,4-氟-L-苯丙氨酸、3-氟,4-OH-L-苯丙氨酸、2-氯-L-酪氨酸、2-甲基-L-酪氨酸、2-乙基-L-酪氨酸、4-(萘-1-酚)-L-丙氨酸、D-丝氨酸、L-β-高丝氨酸、L-

β-丙氨酸、N-α-甲基甘氨酸、甘氨酰胺、丙三醇甘氨酸酯、乙二醇甘氨酸酯、氧杂环丁烷-3-基甘氨酸酯和甘氨酸吗啉酰胺;

[0167] L5是环5并且具有结构:$X_1X_2X_3X_4X_5$,其中X_1-X_5中的每一个是任意氨基酸或选自由以下组成的组的非天然氨基酸:L-炔丙基甘氨酸-PEG_6-、L-磺基酪氨酸、L-正亮氨酸、L-1-萘基丙氨酸、L-2-萘基丙氨酸、L-2-氯代色氨酸、L-3-氟代酪氨酸、L-4-氟苯丙氨酸、γ-苄基-L-脯氨酸、γ-(4-氟-苄基)-L-脯氨酸、4-OH-L-脯氨酸、4-氟-L-脯氨酸、4-[4-(三氟甲基)-苄基]-L-脯氨酸、3,4-二氟-L-苯丙氨酸、3,4-二氯-L-苯丙氨酸、4-氯-L-苯丙氨酸、3-F,4-Cl-L-苯丙氨酸、2-吡啶酮(NH对位)-L-丙氨酸、吡啶酮(NH间位)-L-丙氨酸、3-(1-N-甲基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-乙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-异丙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(5-氮杂-吲哚)-L-丙氨酸、4-甲基-L-苯丙氨酸、2-萘基-L-丙氨酸、L-4,4'-联苯基丙氨酸、3-(3-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹喔啉基)-L-丙氨酸、4-甲基-2-吡啶基-丙氨酸、4-乙基-2-吡啶基-L-丙氨酸、苯并噻唑-L-丙氨酸、苯并噻吩-L-丙氨酸、3-异喹啉基-L-丙氨酸、叔丁基-L-丙氨酸(也称为L-新戊基甘氨酸)、3-环丁基-L-丙氨酸、环戊基-L-丙氨酸、5,5,5-三氟-L-亮氨酸、叔丁基-L-甘氨酸(也称为L-叔-亮氨酸)、L-环戊基甘氨酸、L-环丁基甘氨酸、3,4-羟基-L-苯丙氨酸、3,4-氟-L-苯丙氨酸、3-氟,4-OH-L-苯丙氨酸、2-氯-L-酪氨酸、2-甲基-L-酪氨酸、2-乙基-L-酪氨酸、4-(萘-1-酚)-L-丙氨酸、D-丝氨酸、L-β-高丝氨酸、L-β-丙氨酸、N-α-甲基甘氨酸、甘氨酰胺、丙三醇甘氨酸酯、乙二醇甘氨酸酯、氧杂环丁烷-3-基甘氨酸酯和甘氨酸吗啉酰胺;并且

[0168] 其中所述CKP以500pM或更小的亲和力结合VEGF-A。

[0169] 在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)的C-末端是经修饰的(诸如加帽的)。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)的N-末端是经修饰的(诸如加帽的)。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)的C-和N-末端二者是经修饰的(诸如加帽的)。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)的C-末端羧基是酰胺化的。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)的N-末端胺是乙酰化的。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)的C-末端羧基是酰胺化的并且结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)的N-末端胺是乙酰化的。

[0170] 在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)具有改变的二硫键连接-参照具有SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列的野生型喷瓜胰蛋白酶抑制剂EETI-II蛋白;其中改变的二硫键连接是C1-C4、C2-C3和C5-C6。

[0171] 在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)的Z_1和/或Z_2是G。在某些实施方案中,Z_1和/或Z_2包含多于一个氨基酸。在某些实施方案中,Z_1和/或Z_2包含4个氨基酸。在某些实施方案中,Z_1和/或Z_2包含5个氨基酸。在某些实施方案中,Z_1和/或Z_2是非天然氨基酸。在某些实施方案中,所述非天然氨基酸是N-乙酰甘氨酸或甘氨酰胺。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含L1,其中X_3不是I;其中X_5不是M;和/或其中X_6不是R。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含L1,其中X_1是选自P、Q、R、T、V、D、N、K、L和X的氨基酸;其中X_2是选自T、D、L、V、I、R、P、N和X的氨基酸;其中X_3是选自T、P、M、L、S、F、R和X的氨基酸;其中X_4是选自R、T、Q、D、W、L、E、S、K和X氨基酸;其中X_5是选自F、P、V、E、K、L、I和X的氨基酸;其中X_6是选自K、N、F、P、L、Y、T、D、M和X的

氨基酸;其中X_7是选自Q、W、H和/X的氨基酸;和/或其中X_8是选自Y、A、G、D、E、W、S和X的氨基酸,其中X是非天然氨基酸且选自由以下组成的组:L-炔丙基甘氨酸-PEG_6-、L-磺基酪氨酸、L-正亮氨酸、L-1-萘基丙氨酸、L-2-萘基丙氨酸、L-2-氯代色氨酸、L-3-氟代酪氨酸、L-4-氟苯丙氨酸、γ-苄基-L-脯氨酸、γ-(4-氟-苄基)-L-脯氨酸、4-OH-L-脯氨酸、4-氟-L-脯氨酸、4-[4-(三氟甲基)-苄基]-L-脯氨酸、3,4-二氟-L-苯丙氨酸、3,4-二氯-L-苯丙氨酸、4-氯-L-苯丙氨酸、3-F,4-Cl-L-苯丙氨酸、2-吡啶酮(NH对位)-L-丙氨酸、吡啶酮(NH间位)-L-丙氨酸、3-(1-N-甲基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-乙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-异丙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(5-氮杂-吲哚)-L-丙氨酸、4-甲基-L-苯丙氨酸、2-萘基-L-丙氨酸、L-4,4'-联苯基丙氨酸、3-(3-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹喔啉基)-L-丙氨酸、4-甲基-2-吡啶基-丙氨酸、4-乙基-2-吡啶基-L-丙氨酸、苯并噻唑-L-丙氨酸、苯并噻吩-L-丙氨酸、3-异喹啉基-L-丙氨酸、叔丁基-L-丙氨酸(也称为L-新戊基甘氨酸)、3-环丁基-L-丙氨酸、环戊基-L-丙氨酸、5,5,5-三氟-L-亮氨酸、叔丁基-L-甘氨酸(也称为L-叔-亮氨酸)、L-环戊基甘氨酸、L-环丁基甘氨酸、3,4-羟基-L-苯丙氨酸、3,4-氟-L-苯丙氨酸、3-氟,4-OH-L-苯丙氨酸、2-氯-L-酪氨酸、2-甲基-L-酪氨酸、2-乙基-L-酪氨酸、4-(萘-1-酚)-L-丙氨酸、D-丝氨酸、L-β-高丝氨酸、L-β-丙氨酸、N-α-甲基甘氨酸、甘氨酰胺、丙三醇甘氨酸酯、乙二醇甘氨酸酯、氧杂环丁烷-3-基甘氨酸酯和甘氨酸吗啉酰胺。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含L1,其中X_9是选自L、I、V、D、E和X的氨基酸,其中X是非天然氨基酸且选自由以下组成的组:L-炔丙基甘氨酸-PEG_6-、L-磺基酪氨酸、L-正亮氨酸、L-1-萘基丙氨酸、L-2-萘基丙氨酸、L-2-氯代色氨酸、L-3-氟代酪氨酸、L-4-氟苯丙氨酸、γ-苄基-L-脯氨酸、γ-(4-氟-苄基)-L-脯氨酸、4-OH-L-脯氨酸、4-氟-L-脯氨酸、4-[4-(三氟甲基)-苄基]-L-脯氨酸、3,4-二氟-L-苯丙氨酸、3,4-二氯-L-苯丙氨酸、4-氯-L-苯丙氨酸、3-F,4-Cl-L-苯丙氨酸、2-吡啶酮(NH对位)-L-丙氨酸、吡啶酮(NH间位)-L-丙氨酸、3-(1-N-甲基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-乙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-异丙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(5-氮杂-吲哚)-L-丙氨酸、4-甲基-L-苯丙氨酸、2-萘基-L-丙氨酸、L-4,4'-联苯基丙氨酸、3-(3-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹喔啉基)-L-丙氨酸、4-甲基-2-吡啶基-丙氨酸、4-乙基-2-吡啶基-L-丙氨酸、苯并噻唑-L-丙氨酸、苯并噻吩-L-丙氨酸、3-异喹啉基-L-丙氨酸、叔丁基-L-丙氨酸(也称为L-新戊基甘氨酸)、3-环丁基-L-丙氨酸、环戊基-L-丙氨酸、5,5,5-三氟-L-亮氨酸、叔丁基-L-甘氨酸(也称为L-叔-亮氨酸)、L-环戊基甘氨酸、L-环丁基甘氨酸、3,4-羟基-L-苯丙氨酸、3,4-氟-L-苯丙氨酸、3-氟,4-OH-L-苯丙氨酸、2-氯-L-酪氨酸、2-甲基-L-酪氨酸、2-乙基-L-酪氨酸、4-(萘-1-酚)-L-丙氨酸、D-丝氨酸、L-β-高丝氨酸、L-β-丙氨酸、N-α-甲基甘氨酸、甘氨酰胺、丙三醇甘氨酸酯、乙二醇甘氨酸酯、氧杂环丁烷-3-基甘氨酸酯和甘氨酸吗啉酰胺。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含L1,其中X_{10}是选自Y、T、M、N、F和X的氨基酸,其中X是非天然氨基酸且选自由以下组成的组:L-炔丙基甘氨酸-PEG_6-、L-磺基酪氨酸、L-正亮氨酸、L-1-萘基丙氨酸、L-2-萘基丙氨酸、L-2-氯代色氨酸、L-3-氟代酪氨酸、L-4-氟苯丙氨酸、γ-苄基-L-脯氨酸、γ-(4-氟-苄基)-L-脯氨酸、4-OH-L-脯氨酸、4-氟-L-脯氨酸、4-[4-(三氟甲基)-苄基]-L-脯氨酸、3,4-二氟-L-苯丙氨酸、3,4-二氯-L-苯丙氨酸、4-氯-L-苯丙氨酸、3-F,4-Cl-L-苯丙氨酸、2-吡啶酮(NH对位)-L-丙氨酸、吡啶酮(NH间位)-L-丙氨酸、3-(1-N-甲基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-乙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-

异丙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(5-氮杂-吲哚)-L-丙氨酸、4-甲基-L-苯丙氨酸、2-萘基-L-丙氨酸、L-4,4'-联苯基丙氨酸、3-(3-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹喔啉基)-L-丙氨酸、4-甲基-2-吡啶基-丙氨酸、4-乙基-2-吡啶基-L-丙氨酸、苯并噻唑-L-丙氨酸、苯并噻吩-L-丙氨酸、3-异喹啉基-L-丙氨酸、叔丁基-L-丙氨酸(也称为L-新戊基甘氨酸)、3-环丁基-L-丙氨酸、环戊基-L-丙氨酸、5,5,5-三氟-L-亮氨酸、叔丁基-L-甘氨酸(也称为L-叔-亮氨酸)、L-环戊基甘氨酸、L-环丁基甘氨酸、3,4-羟基-L-苯丙氨酸、3,4-氟-L-苯丙氨酸、3-氟,4-OH-L-苯丙氨酸、2-氯-L-酪氨酸、2-甲基-L-酪氨酸、2-乙基-L-酪氨酸、4-(萘-1-酚)-L-丙氨酸、D-丝氨酸、L-β-高丝氨酸、L-β-丙氨酸、N-α-甲基甘氨酸、甘氨酰胺、丙三醇甘氨酸酯、乙二醇甘氨酸酯、氧杂环丁烷-3-基甘氨酸酯和甘氨酸吗啉酰胺。

[0172] 在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含L5,其中X_1-X_5中的每一个是任意氨基酸或选自由以下组成的组的非天然氨基酸:L-炔丙基甘氨酸-PEG_6-、L-磺基酪氨酸、L-正亮氨酸、L-1-萘基丙氨酸、L-2-萘基丙氨酸、L-2-氯代色氨酸、L-3-氟代酪氨酸、L-4-氟苯丙氨酸、γ-苄基-L-脯氨酸、γ-(4-氟-苄基)-L-脯氨酸、4-OH-L-脯氨酸、4-氟-L-脯氨酸、4-[4-(三氟甲基)-苄基]-L-脯氨酸、3,4-二氟-L-苯丙氨酸、3,4-二氯-L-苯丙氨酸、4-氯-L-苯丙氨酸、3-F,4-Cl-L-苯丙氨酸、2-吡啶酮(NH对位)-L-丙氨酸、吡啶酮(NH间位)-L-丙氨酸、3-(1-N-甲基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-乙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-异丙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(5-氮杂-吲哚)-L-丙氨酸、4-甲基-L-苯丙氨酸、2-萘基-L-丙氨酸、L-4,4'-联苯基丙氨酸、3-(3-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹喔啉基)-L-丙氨酸、4-甲基-2-吡啶基-丙氨酸、4-乙基-2-吡啶基-L-丙氨酸、苯并噻唑-L-丙氨酸、苯并噻吩-L-丙氨酸、3-异喹啉基-L-丙氨酸、叔丁基-L-丙氨酸(也称为L-新戊基甘氨酸)、3-环丁基-L-丙氨酸、环戊基-L-丙氨酸、5,5,5-三氟-L-亮氨酸、叔丁基-L-甘氨酸(也称为L-叔-亮氨酸)、L-环戊基甘氨酸、L-环丁基甘氨酸、3,4-羟基-L-苯丙氨酸、3,4-氟-L-苯丙氨酸、3-氟,4-OH-L-苯丙氨酸、2-氯-L-酪氨酸、2-甲基-L-酪氨酸、2-乙基-L-酪氨酸、4-(萘-1-酚)-L-丙氨酸、D-丝氨酸、L-β-高丝氨酸、L-β-丙氨酸、N-α-甲基甘氨酸、甘氨酰胺、丙三醇甘氨酸酯、乙二醇甘氨酸酯、氧杂环丁烷-3-基甘氨酸酯和甘氨酸吗啉酰胺;除了X_2不是脯氨酸(P)以外。

[0173] 在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含L5,其中X_1-X_5中的每一个是任意氨基酸或选自由以下组成的组的非天然氨基酸:L-炔丙基甘氨酸-PEG_6-、L-磺基酪氨酸、L-正亮氨酸、L-1-萘基丙氨酸、L-2-萘基丙氨酸、L-2-氯代色氨酸、L-3-氟代酪氨酸、L-4-氟苯丙氨酸、γ-苄基-L-脯氨酸、γ-(4-氟-苄基)-L-脯氨酸、4-OH-L-脯氨酸、4-氟-L-脯氨酸、4-[4-(三氟甲基)-苄基]-L-脯氨酸、3,4-二氟-L-苯丙氨酸、3,4-二氯-L-苯丙氨酸、4-氯-L-苯丙氨酸、3-F,4-Cl-L-苯丙氨酸、2-吡啶酮(NH对位)-L-丙氨酸、吡啶酮(NH间位)-L-丙氨酸、3-(1-N-甲基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-乙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-异丙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(5-氮杂-吲哚)-L-丙氨酸、4-甲基-L-苯丙氨酸、2-萘基-L-丙氨酸、L-4,4'-联苯基丙氨酸、3-(3-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹喔啉基)-L-丙氨酸、4-甲基-2-吡啶基-丙氨酸、4-乙基-2-吡啶基-L-丙氨酸、苯并噻唑-L-丙氨酸、苯并噻吩-L-丙氨酸、3-异喹啉基-L-丙氨酸、叔丁基-L-丙氨酸(也称为L-新戊基甘氨酸)、3-环丁基-L-丙氨酸、环戊基-L-丙氨酸、5,5,5-三氟-L-亮氨酸、叔丁基-L-甘氨酸(也称为L-叔-亮氨酸)、L-环戊基甘氨酸、L-环丁基甘氨酸、3,4-羟基-L-苯丙氨

酸、3,4-氟-L-苯丙氨酸、3-氟,4-OH-L-苯丙氨酸、2-氯-L-酪氨酸、2-甲基-L-酪氨酸、2-乙基-L-酪氨酸、4-(萘-1-酚)-L-丙氨酸、D-丝氨酸、L-β-高丝氨酸、L-β-丙氨酸、N-α-甲基甘氨酸、甘氨酰胺、丙三醇甘氨酸酯、乙二醇甘氨酸酯、氧杂环丁烷-3-基甘氨酸酯和甘氨酸吗啉酰胺;除了X_4不是甘氨酸(G)以外。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含L5,其中X_1是选自G、Q、H、R、L和Q的氨基酸;其中X_2是选自P、M、W、Y、F、L和H的氨基酸;其中X_3是选自N、F、H和Y的氨基酸;其中X_4是选自G、Q、D、N、K、H、E和S的氨基酸;和/或其中X_5是选自F、S和T的氨基酸。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含L2,其中X_1是K,X_2是Q,X_3是D,X_4是S,并且X_5是D。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含L3,其中X_1是L,X_2是A,并且X_3是G。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含L4,其中X_1是V或F。

[0174] 在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含:包含结构$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$的L1,其中:X_1是选自P、Q和R的氨基酸;X_2是选自T、L和D的氨基酸;X_3是选自T、M和L的氨基酸;X_4是选自R、Q和D的氨基酸;X_5是选自F、P和V的氨基酸;X_6是选自K和F的氨基酸;X_7是选自Q和W的氨基酸;并且X_8是选自Y、G和D的氨基酸。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含:包含结构$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$ X_9 X_{10}的L1,其中X_1是选自Q、R、T和V的氨基酸;X_2是选自T和D的氨基酸;X_3是P;X_4是选自T和W的氨基酸;X_5是选自F、E、P和K的氨基酸;X_6是选自N和P的氨基酸;X_7是选自W和H的氨基酸;X_8是选自A、D、E和W的氨基酸;X_9是选自L和I的氨基酸;并且X_{10}是选自Y、T、M和N的氨基酸。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含L5,其中X_1是选自G、H和Q的氨基酸;X_2是选自P、M、W和Y的氨基酸;X_3是选自N和Y的氨基酸;X_4是选自G、Q和S的氨基酸;并且X_5是选自F和S的氨基酸。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含L2,其中X_1是K,X_2是Q,X_3是D,X_4是S,并且X_5是D。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含L3,其中X_1是L,X_2是A,并且X_3是G。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含L4,其中X_1是V或F。

[0175] 在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含具有结构$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$的L1,其中:X_1是选自D、Q、N和K的氨基酸;X_2是选自V、I、R、L和P的氨基酸;X_3是选自L、S、M、T和F的氨基酸;X_4是选自Q、L和E的氨基酸;X_5是P;X_6是选自F、L和Y的氨基酸;X_7是W;并且X_8是G。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含L5,其中X_3是Y;X_5是S;并且其中X_1、X_2和X_4各自是任意氨基酸,除了X_1不是G,X_2不是P,X_4不是G,和/或X_5不是F以外。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含L5,其中X_1是选自H、L、R和Q的氨基酸;X_2是选自W、F和Y的氨基酸;X_3是Y;X_4是选自Q、N、K、H和E的氨基酸;并且X_5是S。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含L2,其中X_1是K,X_2是Q,X_3是D,X_4是S,并且X_5是D。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含L3,其中X_1是L,X_2是A,并且X_3是G。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含L4,其中X_1是V或F。

[0176] 在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含:包含结构$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$ X_9 X_{10}的L1,其中X_1是选自K、Q、L和R的氨基酸;X_2是选自N和D的氨基酸;X_3是选自P和L的氨基酸;X_4是选自L、T、S和K的氨基酸;X_5是选自F、V、I和L的氨基酸;X_6是选自N和D的氨基酸;X_7是W;X_8是选自A和S的氨基酸;X_9是选自L、V、E和D的氨基酸;并且X_{10}是选自Y和F

的氨基酸。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含L5,其中X_1是Q;X_2是选自L、F、M和H的氨基酸;X_3是选自F、Y和H的氨基酸;X_4是选自D、Q、N和K的氨基酸;并且X_5是选自S和T的氨基酸。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含L2,其中X_1是K,X_2是Q,X_3是D,X_4是S,并且X_5是D。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含L3,其中X_1是L,X_2是A,并且X_3是G。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含L4,其中X_1是V或F。

[0177] 在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含:包含结构$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$的L1,其中:X_5是P;X_7是W;X_8是G;并且其中X_1、X_2、X_3、X_4和X_6各自是任意氨基酸,除了X_1不是P,X_2不是R,X_3不是I,和/或X_6不是R。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含:包含结构$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$的L1,其中X_1是选自N和D的氨基酸;X_2是选自I和V的氨基酸;X_3是选自M和L的氨基酸;X_4是选自L、Q、D和K的氨基酸;X_5是P;X_6是选自F、Y、T、L和M的氨基酸;X_7是W;并且X_8是G。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含L5,其中X_1是选自Q、H、L和R的氨基酸;X_2是选自Y和W的氨基酸;X_3是Y;X_4是选自Q和N的氨基酸;并且X_5是S。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含L5,其中X_3是Y;X_5是S;并且其中X_1、X_2和X_4各自是任意氨基酸,除了X_1不是G,X_2不是P,和/或X_4不是G以外。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含L2,其中X_1是选自G或E的氨基酸;X_2是选自Q、L、P、R、E和M的氨基酸;X_3是选自S、D和N的氨基酸;X_4是选自F、Y、L、M和I的氨基酸;和/或X_5是选自E、D、Q、L和S的氨基酸。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含L3,其中X_1是L,X_2是A,并且X_3是G。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含L4,其中X_1是V或F。

[0178] 在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含L5,其中X_1-X_5中的每一个是任意氨基酸,除了X_2不是脯氨酸(P)以外。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含L5,其中X_1-X_5中的每一个是任意氨基酸,除了X_4不是甘氨酸(G)以外。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含L5,其中X_1是除G之外的任意氨基酸;X_2是除P之外的任意氨基酸;X_3是除N之外的任意氨基酸;X_4是除G之外的任意氨基酸;和/或X_5是除F之外的任意氨基酸。

[0179] 在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含:包含结构$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$的L1,其中X_1是选自N、D和X的氨基酸;X_2是选自I、V和X的氨基酸;X_3是M或X;X_4是选自L、Q和X的氨基酸;X_5是P或X;X_6是F、Y或X;X_7是W或X;并且X_8是G或X,其中X是选自由以下组成的组的非天然氨基酸:L-炔丙基甘氨酸-PEG_6-、L-磺基酪氨酸、L-正亮氨酸、L-1-萘基丙氨酸、L-2-萘基丙氨酸、L-2-氯代色氨酸、L-3-氟代酪氨酸、L-4-氟苯丙氨酸、γ-苄基-L-脯氨酸、γ-(4-氟-苄基)-L-脯氨酸、4-OH-L-脯氨酸、4-氟-L-脯氨酸、4-[4-(三氟甲基)-苄基]-L-脯氨酸、3,4-二氟-L-苯丙氨酸、3,4-二氯-L-苯丙氨酸、4-氯-L-苯丙氨酸、3-F,4-Cl-L-苯丙氨酸、2-吡啶酮(NH对位)-L-丙氨酸、吡啶酮(NH间位)-L-丙氨酸、3-(1-N-甲基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-乙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-异丙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(5-氮杂-吲哚)-L-丙氨酸、4-甲基-L-苯丙氨酸、2-萘基-L-丙氨酸、L-4,4'-联苯基丙氨酸、3-(3-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹喔啉基)-L-丙氨酸、4-甲基-2-吡啶基-丙氨酸、4-乙基-2-吡啶基-L-丙氨酸、苯并噻唑-L-丙氨酸、苯并噻吩-L-丙氨酸、3-异

喹啉基-L-丙氨酸、叔丁基-L-丙氨酸(也称为L-新戊基甘氨酸)、3-环丁基-L-丙氨酸、环戊基-L-丙氨酸、5,5,5-三氟-L-亮氨酸、叔丁基-L-甘氨酸(也称为L-叔-亮氨酸)、L-环戊基甘氨酸、L-环丁基甘氨酸、3,4-羟基-L-苯丙氨酸、3,4-氟-L-苯丙氨酸、3-氟,4-OH-L-苯丙氨酸、2-氯-L-酪氨酸、2-甲基-L-酪氨酸、2-乙基-L-酪氨酸、4-(萘-1-酚)-L-丙氨酸、D-丝氨酸、L-β-高丝氨酸、L-β-丙氨酸、N-α-甲基甘氨酸、甘氨酰胺、丙三醇甘氨酸酯、乙二醇甘氨酸酯、氧杂环丁烷-3-基甘氨酸酯和甘氨酸吗啉酰胺。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含L3,其中X_1-X_3中的每一个是任意氨基酸或选自由以下组成的组的非天然氨基酸:L-炔丙基甘氨酸-PEG_6-、L-磺基酪氨酸、L-正亮氨酸、L-1-萘基丙氨酸、L-2-萘基丙氨酸、L-2-氯代色氨酸、L-3-氟代酪氨酸、L-4-氟苯丙氨酸、γ-苄基-L-脯氨酸、γ-(4-氟-苄基)-L-脯氨酸、4-OH-L-脯氨酸、4-氟-L-脯氨酸、4-[4-(三氟甲基)-苄基]-L-脯氨酸、3,4-二氟-L-苯丙氨酸、3,4-二氯-L-苯丙氨酸、4-氯-L-苯丙氨酸、3-F,4-Cl-L-苯丙氨酸、2-吡啶酮(NH对位)-L-丙氨酸、吡啶酮(NH间位)-L-丙氨酸、3-(1-N-甲基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-乙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-异丙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(5-氮杂-吲哚)-L-丙氨酸、4-甲基-L-苯丙氨酸、2-萘基-L-丙氨酸、L-4,4'-联苯基丙氨酸、3-(3-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹喔啉基)-L-丙氨酸、4-甲基-2-吡啶基-丙氨酸、4-乙基-2-吡啶基-L-丙氨酸、苯并噻唑-L-丙氨酸、苯并噻吩-L-丙氨酸、3-异喹啉基-L-丙氨酸、叔丁基-L-丙氨酸(也称为L-新戊基甘氨酸)、3-环丁基-L-丙氨酸、环戊基-L-丙氨酸、5,5,5-三氟-L-亮氨酸、叔丁基-L-甘氨酸(也称为L-叔-亮氨酸)、L-环戊基甘氨酸、L-环丁基甘氨酸、3,4-羟基-L-苯丙氨酸、3,4-氟-L-苯丙氨酸、3-氟,4-OH-L-苯丙氨酸、2-氯-L-酪氨酸、2-甲基-L-酪氨酸、2-乙基-L-酪氨酸、4-(萘-1-酚)-L-丙氨酸、D-丝氨酸、L-β-高丝氨酸、L-β-丙氨酸、N-α-甲基甘氨酸、甘氨酰胺、丙三醇甘氨酸酯、乙二醇甘氨酸酯、氧杂环丁烷-3-基甘氨酸酯和甘氨酸吗啉酰胺,除了X_1不是亮氨酸(L),X_2不是丙氨酸(A),并且X_3不是甘氨酸(G)以外,其中所述非天然氨基酸选自由以下组成的组:L-炔丙基甘氨酸-PEG_6-、L-磺基酪氨酸、L-正亮氨酸、L-1-萘基丙氨酸、L-2-萘基丙氨酸、L-2-氯代色氨酸、L-3-氟代酪氨酸、L-4-氟苯丙氨酸、γ-苄基-L-脯氨酸、γ-(4-氟-苄基)-L-脯氨酸、4-OH-L-脯氨酸、4-氟-L-脯氨酸、4-[4-(三氟甲基)-苄基]-L-脯氨酸、3,4-二氟-L-苯丙氨酸、3,4-二氯-L-苯丙氨酸、4-氯-L-苯丙氨酸、3-F,4-Cl-L-苯丙氨酸、2-吡啶酮(NH对位)-L-丙氨酸、吡啶酮(NH间位)-L-丙氨酸、3-(1-N-甲基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-乙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-异丙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(5-氮杂-吲哚)-L-丙氨酸、4-甲基-L-苯丙氨酸、2-萘基-L-丙氨酸、L-4,4'-联苯基丙氨酸、3-(3-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹喔啉基)-L-丙氨酸、4-甲基-2-吡啶基-丙氨酸、4-乙基-2-吡啶基-L-丙氨酸、苯并噻唑-L-丙氨酸、苯并噻吩-L-丙氨酸、3-异喹啉基-L-丙氨酸、叔丁基-L-丙氨酸(也称为L-新戊基甘氨酸)、3-环丁基-L-丙氨酸、环戊基-L-丙氨酸、5,5,5-三氟-L-亮氨酸、叔丁基-L-甘氨酸(也称为L-叔-亮氨酸)、L-环戊基甘氨酸、L-环丁基甘氨酸、3,4-羟基-L-苯丙氨酸、3,4-氟-L-苯丙氨酸、3-氟,4-OH-L-苯丙氨酸、2-氯-L-酪氨酸、2-甲基-L-酪氨酸、2-乙基-L-酪氨酸、4-(萘-1-酚)-L-丙氨酸、D-丝氨酸、L-β-高丝氨酸、L-β-丙氨酸、N-α-甲基甘氨酸、甘氨酰胺、丙三醇甘氨酸酯、乙二醇甘氨酸酯、氧杂环丁烷-3-基甘氨酸酯和甘氨酸吗啉酰胺。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含L3,其中X_1是选自M、F、L V和X的氨基酸;X_2是选自S、N、Q、I、Y、E、V、T和X的氨基酸;并且X_3是选自D、Q、T、

N、E、R和X的氨基酸，其中X是选自由以下组成的组的非天然氨基酸：L-炔丙基甘氨酸-PEG_6-、L-磺基酪氨酸、L-正亮氨酸、L-1-萘基丙氨酸、L-2-萘基丙氨酸、L-2-氯代色氨酸、L-3-氟代酪氨酸、L-4-氟苯丙氨酸、γ-苄基-L-脯氨酸、γ-(4-氟-苄基)-L-脯氨酸、4-OH-L-脯氨酸、4-氟-L-脯氨酸、4-[4-(三氟甲基)-苄基]-L-脯氨酸、3,4-二氟-L-苯丙氨酸、3,4-二氯-L-苯丙氨酸、4-氯-L-苯丙氨酸、3-F,4-Cl-L-苯丙氨酸、2-吡啶酮(NH对位)-L-丙氨酸、吡啶酮(NH间位)-L-丙氨酸、3-(1-N-甲基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-乙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-异丙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(5-氮杂-吲哚)-L-丙氨酸、4-甲基-L-苯丙氨酸、2-萘基-L-丙氨酸、L-4,4'-联苯基丙氨酸、3-(3-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹喔啉基)-L-丙氨酸、4-甲基-2-吡啶基-丙氨酸、4-乙基-2-吡啶基-L-丙氨酸、苯并噻唑-L-丙氨酸、苯并噻吩-L-丙氨酸、3-异喹啉基-L-丙氨酸、叔丁基-L-丙氨酸(也称为L-新戊基甘氨酸)、3-环丁基-L-丙氨酸、环戊基-L-丙氨酸、5,5,5-三氟-L-亮氨酸、叔丁基-L-甘氨酸(也称为L-叔-亮氨酸)、L-环戊基甘氨酸、L-环丁基甘氨酸、3,4-羟基-L-苯丙氨酸、3,4-氟-L-苯丙氨酸、3-氟,4-OH-L-苯丙氨酸、2-氯-L-酪氨酸、2-甲基-L-酪氨酸、2-乙基-L-酪氨酸、4-(萘-1-酚)-L-丙氨酸、D-丝氨酸、L-β-高丝氨酸、L-β-丙氨酸、N-α-甲基甘氨酸、甘氨酰胺、丙三醇甘氨酸酯、乙二醇甘氨酸酯、氧杂环丁烷-3-基甘氨酸酯和甘氨酸吗啉酰胺。在某些实施方案中，结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含L4，其中X_1是除V之外的任意氨基酸，或选自由以下组成的组的非天然氨基酸：L-炔丙基甘氨酸-PEG_6-、L-磺基酪氨酸、L-正亮氨酸、L-1-萘基丙氨酸、L-2-萘基丙氨酸、L-2-氯代色氨酸、L-3-氟代酪氨酸、L-4-氟苯丙氨酸、γ-苄基-L-脯氨酸、γ-(4-氟-苄基)-L-脯氨酸、4-OH-L-脯氨酸、4-氟-L-脯氨酸、4-[4-(三氟甲基)-苄基]-L-脯氨酸、3,4-二氟-L-苯丙氨酸、3,4-二氯-L-苯丙氨酸、4-氯-L-苯丙氨酸、3-F,4-Cl-L-苯丙氨酸、2-吡啶酮(NH对位)-L-丙氨酸、吡啶酮(NH间位)-L-丙氨酸、3-(1-N-甲基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-乙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-异丙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(5-氮杂-吲哚)-L-丙氨酸、4-甲基-L-苯丙氨酸、2-萘基-L-丙氨酸、L-4,4'-联苯基丙氨酸、3-(3-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹喔啉基)-L-丙氨酸、4-甲基-2-吡啶基-丙氨酸、4-乙基-2-吡啶基-L-丙氨酸、苯并噻唑-L-丙氨酸、苯并噻吩-L-丙氨酸、3-异喹啉基-L-丙氨酸、叔丁基-L-丙氨酸(也称为L-新戊基甘氨酸)、3-环丁基-L-丙氨酸、环戊基-L-丙氨酸、5,5,5-三氟-L-亮氨酸、叔丁基-L-甘氨酸(也称为L-叔-亮氨酸)、L-环戊基甘氨酸、L-环丁基甘氨酸、3,4-羟基-L-苯丙氨酸、3,4-氟-L-苯丙氨酸、3-氟,4-OH-L-苯丙氨酸、2-氯-L-酪氨酸、2-甲基-L-酪氨酸、2-乙基-L-酪氨酸、4-(萘-1-酚)-L-丙氨酸、D-丝氨酸、L-β-高丝氨酸、L-β-丙氨酸、N-α-甲基甘氨酸、甘氨酰胺、丙三醇甘氨酸酯、乙二醇甘氨酸酯、氧杂环丁烷-3-基甘氨酸酯和甘氨酸吗啉酰胺。在某些实施方案中，结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含L4，其中X_1是I、L或X，其中X是选自由以下组成的组的非天然氨基酸：L-炔丙基甘氨酸-PEG_6-、L-磺基酪氨酸、L-正亮氨酸、L-1-萘基丙氨酸、L-2-萘基丙氨酸、L-2-氯代色氨酸、L-3-氟代酪氨酸、L-4-氟苯丙氨酸、γ-苄基-L-脯氨酸、γ-(4-氟-苄基)-L-脯氨酸、4-OH-L-脯氨酸、4-氟-L-脯氨酸、4-[4-(三氟甲基)-苄基]-L-脯氨酸、3,4-二氟-L-苯丙氨酸、3,4-二氯-L-苯丙氨酸、4-氯-L-苯丙氨酸、3-F,4-Cl-L-苯丙氨酸、2-吡啶酮(NH对位)-L-丙氨酸、吡啶酮(NH间位)-L-丙氨酸、3-(1-N-甲基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-乙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-异丙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(5-氮杂-吲哚)-L-丙氨酸、4-甲基-L-苯丙氨酸、2-萘基-L-丙氨

酸、L-4,4'-联苯基丙氨酸、3-(3-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹喔啉基)-L-丙氨酸、4-甲基-2-吡啶基-丙氨酸、4-乙基-2-吡啶基-L-丙氨酸、苯并噻唑-L-丙氨酸、苯并噻吩-L-丙氨酸、3-异喹啉基-L-丙氨酸、叔丁基-L-丙氨酸(也称为L-新戊基甘氨酸)、3-环丁基-L-丙氨酸、环戊基-L-丙氨酸、5,5,5-三氟-L-亮氨酸、叔丁基-L-甘氨酸(也称为L-叔-亮氨酸)、L-环戊基甘氨酸、L-环丁基甘氨酸、3,4-羟基-L-苯丙氨酸、3,4-氟-L-苯丙氨酸、3-氟,4-OH-L-苯丙氨酸、2-氯-L-酪氨酸、2-甲基-L-酪氨酸、2-乙基-L-酪氨酸、4-(萘-1-酚)-L-丙氨酸、D-丝氨酸、L-β-高丝氨酸、L-β-丙氨酸、N-α-甲基甘氨酸、甘氨酰胺、丙三醇甘氨酸酯、乙二醇甘氨酸酯、氧杂环丁烷-3-基甘氨酸酯和甘氨酸吗啉酰胺。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含L5,其中X_3是Y或选自由以下组成的组的非天然氨基酸:L-炔丙基甘氨酸-PEG_6-、L-磺基酪氨酸、L-正亮氨酸、L-1-萘基丙氨酸、L-2-萘基丙氨酸、L-2-氯代色氨酸、L-3-氟代酪氨酸、L-4-氟苯丙氨酸、γ-苄基-L-脯氨酸、γ-(4-氟-苄基)-L-脯氨酸、4-OH-L-脯氨酸、4-氟-L-脯氨酸、4-[4-(三氟甲基)-苄基]-L-脯氨酸、3,4-二氟-L-苯丙氨酸、3,4-二氯-L-苯丙氨酸、4-氯-L-苯丙氨酸、3-F,4-Cl-L-苯丙氨酸、2-吡啶酮(NH对位)-L-丙氨酸、吡啶酮(NH间位)-L-丙氨酸、3-(1-N-甲基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-乙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-异丙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(5-氮杂-吲哚)-L-丙氨酸、4-甲基-L-苯丙氨酸、2-萘基-L-丙氨酸、L-4,4'-联苯基丙氨酸、3-(3-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹喔啉基)-L-丙氨酸、4-甲基-2-吡啶基-丙氨酸、4-乙基-2-吡啶基-L-丙氨酸、苯并噻唑-L-丙氨酸、苯并噻吩-L-丙氨酸、3-异喹啉基-L-丙氨酸、叔丁基-L-丙氨酸(也称为L-新戊基甘氨酸)、3-环丁基-L-丙氨酸、环戊基-L-丙氨酸、5,5,5-三氟-L-亮氨酸、叔丁基-L-甘氨酸(也称为L-叔-亮氨酸)、L-环戊基甘氨酸、L-环丁基甘氨酸、3,4-羟基-L-苯丙氨酸、3,4-氟-L-苯丙氨酸、3-氟,4-OH-L-苯丙氨酸、2-氯-L-酪氨酸、2-甲基-L-酪氨酸、2-乙基-L-酪氨酸、4-(萘-1-酚)-L-丙氨酸、D-丝氨酸、L-β-高丝氨酸、L-β-丙氨酸、N-α-甲基甘氨酸、甘氨酰胺、丙三醇甘氨酸酯、乙二醇甘氨酸酯、氧杂环丁烷-3-基甘氨酸酯和甘氨酸吗啉酰胺;其中X_5是S或选自由以下组成的组的非天然氨基酸:L-炔丙基甘氨酸-PEG_6-、L-磺基酪氨酸、L-正亮氨酸、L-1-萘基丙氨酸、L-2-萘基丙氨酸、L-2-氯代色氨酸、L-3-氟代酪氨酸、L-4-氟苯丙氨酸、γ-苄基-L-脯氨酸、γ-(4-氟-苄基)-L-脯氨酸、4-OH-L-脯氨酸、4-氟-L-脯氨酸、4-[4-(三氟甲基)-苄基]-L-脯氨酸、3,4-二氟-L-苯丙氨酸、3,4-二氯-L-苯丙氨酸、4-氯-L-苯丙氨酸、3-F,4-Cl-L-苯丙氨酸、2-吡啶酮(NH对位)-L-丙氨酸、吡啶酮(NH间位)-L-丙氨酸、3-(1-N-甲基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-乙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-异丙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(5-氮杂-吲哚)-L-丙氨酸、4-甲基-L-苯丙氨酸、2-萘基-L-丙氨酸、L-4,4'-联苯基丙氨酸、3-(3-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹喔啉基)-L-丙氨酸、4-甲基-2-吡啶基-丙氨酸、4-乙基-2-吡啶基-L-丙氨酸、苯并噻唑-L-丙氨酸、苯并噻吩-L-丙氨酸、3-异喹啉基-L-丙氨酸、叔丁基-L-丙氨酸(也称为L-新戊基甘氨酸)、3-环丁基-L-丙氨酸、环戊基-L-丙氨酸、5,5,5-三氟-L-亮氨酸、叔丁基-L-甘氨酸(也称为L-叔-亮氨酸)、L-环戊基甘氨酸、L-环丁基甘氨酸、3,4-羟基-L-苯丙氨酸、3,4-氟-L-苯丙氨酸、3-氟,4-OH-L-苯丙氨酸、2-氯-L-酪氨酸、2-甲基-L-酪氨酸、2-乙基-L-酪氨酸、4-(萘-1-酚)-L-丙氨酸、D-丝氨酸、L-β-高丝氨酸、L-β-丙氨酸、N-α-甲基甘氨酸、甘氨酰胺、丙三醇甘氨酸酯、乙二醇甘氨酸酯、氧杂环丁烷-3-基甘氨酸酯和甘氨酸吗啉酰胺;并且其中X_1、X_2和X_4各自是任意氨基酸或选自由以下

组成的组的非天然氨基酸:L-炔丙基甘氨酸-PEG_6-、L-磺基酪氨酸、L-正亮氨酸、L-1-萘基丙氨酸、L-2-萘基丙氨酸、L-2-氯代色氨酸、L-3-氟代酪氨酸、L-4-氟苯丙氨酸、γ-苄基-L-脯氨酸、γ-(4-氟-苄基)-L-脯氨酸、4-OH-L-脯氨酸、4-氟-L-脯氨酸、4-[4-(三氟甲基)-苄基]-L-脯氨酸、3,4-二氟-L-苯丙氨酸、3,4-二氯-L-苯丙氨酸、4-氯-L-苯丙氨酸、3-F,4-Cl-L-苯丙氨酸、2-吡啶酮(NH对位)-L-丙氨酸、吡啶酮(NH间位)-L-丙氨酸、3-(1-N-甲基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-乙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-异丙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(5-氮杂-吲哚)-L-丙氨酸、4-甲基-L-苯丙氨酸、2-萘基-L-丙氨酸、L-4,4'-联苯基丙氨酸、3-(3-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹喔啉基)-L-丙氨酸、4-甲基-2-吡啶基-丙氨酸、4-乙基-2-吡啶基-L-丙氨酸、苯并噻唑-L-丙氨酸、苯并噻吩-L-丙氨酸、3-异喹啉基-L-丙氨酸、叔丁基-L-丙氨酸(也称为L-新戊基甘氨酸)、3-环丁基-L-丙氨酸、环戊基-L-丙氨酸、5,5,5-三氟-L-亮氨酸、叔丁基-L-甘氨酸(也称为L-叔-亮氨酸)、L-环戊基甘氨酸、L-环丁基甘氨酸、3,4-羟基-L-苯丙氨酸、3,4-氟-L-苯丙氨酸、3-氟,4-OH-L-苯丙氨酸、2-氯-L-酪氨酸、2-甲基-L-酪氨酸、2-乙基-L-酪氨酸、4-(萘-1-酚)-L-丙氨酸、D-丝氨酸、L-β-高丝氨酸、L-β-丙氨酸、N-α-甲基甘氨酸、甘氨酰胺、丙三醇甘氨酸酯、乙二醇甘氨酸酯、氧杂环丁烷-3-基甘氨酸酯和甘氨酸吗啉酰胺,除了X_1不是G,X_2不是P,和/或X_4不是G以外。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含L5,其中X_1-X_5中的每一个是任意氨基酸,除了X_2不是脯氨酸(P)以外。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含L5,其中X_1-X_5中的每一个是任意氨基酸,除了X_4不是甘氨酸(G)以外。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含L5,其中X_1是选自Q、H和X的氨基酸;X_2是选自Y、W和X的氨基酸;X_3是Y或X;X_4是选自Q、N或X的氨基酸;X_5是S或X,其中X是选自由以下组成的组的非天然氨基酸:L-炔丙基甘氨酸-PEG_6-、L-磺基酪氨酸、L-正亮氨酸、L-1-萘基丙氨酸、L-2-萘基丙氨酸、L-2-氯代色氨酸、L-3-氟代酪氨酸、L-4-氟苯丙氨酸、γ-苄基-L-脯氨酸、γ-(4-氟-苄基)-L-脯氨酸、4-OH-L-脯氨酸、4-氟-L-脯氨酸、4-[4-(三氟甲基)-苄基]-L-脯氨酸、3,4-二氟-L-苯丙氨酸、3,4-二氯-L-苯丙氨酸、4-氯-L-苯丙氨酸、3-F,4-Cl-L-苯丙氨酸、2-吡啶酮(NH对位)-L-丙氨酸、吡啶酮(NH间位)-L-丙氨酸、3-(1-N-甲基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-乙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-异丙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(5-氮杂-吲哚)-L-丙氨酸、4-甲基-L-苯丙氨酸、2-萘基-L-丙氨酸、L-4,4'-联苯基丙氨酸、3-(3-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹喔啉基)-L-丙氨酸、4-甲基-2-吡啶基-丙氨酸、4-乙基-2-吡啶基-L-丙氨酸、苯并噻唑-L-丙氨酸、苯并噻吩-L-丙氨酸、3-异喹啉基-L-丙氨酸、叔丁基-L-丙氨酸(也称为L-新戊基甘氨酸)、3-环丁基-L-丙氨酸、环戊基-L-丙氨酸、5,5,5-三氟-L-亮氨酸、叔丁基-L-甘氨酸(也称为L-叔-亮氨酸)、L-环戊基甘氨酸、L-环丁基甘氨酸、3,4-羟基-L-苯丙氨酸、3,4-氟-L-苯丙氨酸、3-氟,4-OH-L-苯丙氨酸、2-氯-L-酪氨酸、2-甲基-L-酪氨酸、2-乙基-L-酪氨酸、4-(萘-1-酚)-L-丙氨酸、D-丝氨酸、L-β-高丝氨酸、L-β-丙氨酸、N-α-甲基甘氨酸、甘氨酰胺、丙三醇甘氨酸酯、乙二醇甘氨酸酯、氧杂环丁烷-3-基甘氨酸酯和甘氨酸吗啉酰胺。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)包含L2,其中X_1是G或X;X_2是R、P或X;X_3是D或X;X_4是F、I或X;并且X_5是E、D或X,其中X是选自由以下组成的组的非天然氨基酸:L-炔丙基甘氨酸-PEG_6-、L-磺基酪氨酸、L-正亮氨酸、L-1-萘基丙氨酸、L-2-萘基丙氨酸、L-2-氯代色氨酸、L-3-氟代酪氨酸、L-4-氟苯丙氨酸、γ-苄基-L-脯氨酸、γ-(4-氟-苄

基)-L-脯氨酸、4-OH-L-脯氨酸、4-氟-L-脯氨酸、4-[4-(三氟甲基)-苄基]-L-脯氨酸、3,4-二氟-L-苯丙氨酸、3,4-二氯-L-苯丙氨酸、4-氯-L-苯丙氨酸、3-F,4-Cl-L-苯丙氨酸、2-吡啶酮(NH对位)-L-丙氨酸、吡啶酮(NH间位)-L-丙氨酸、3-(1-N-甲基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-乙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(1-N-异丙基吲哚)-L-丙氨酸、3-(5-氮杂-吲哚)-L-丙氨酸、4-甲基-L-苯丙氨酸、2-萘基-L-丙氨酸、L-4,4'-联苯基丙氨酸、3-(3-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹啉基)-L-丙氨酸、3-(2-喹喔啉基)-L-丙氨酸、4-甲基-2-吡啶基-丙氨酸、4-乙基-2-吡啶基-L-丙氨酸、苯并噻唑-L-丙氨酸、苯并噻吩-L-丙氨酸、3-异喹啉基-L-丙氨酸、叔丁基-L-丙氨酸(也称为L-新戊基甘氨酸)、3-环丁基-L-丙氨酸、环戊基-L-丙氨酸、5,5,5-三氟-L-亮氨酸、叔丁基-L-甘氨酸(也称为L-叔-亮氨酸)、L-环戊基甘氨酸、L-环丁基甘氨酸、3,4-羟基-L-苯丙氨酸、3,4-氟-L-苯丙氨酸、3-氟,4-OH-L-苯丙氨酸、2-氯-L-酪氨酸、2-甲基-L-酪氨酸、2-乙基-L-酪氨酸、4-(萘-1-酚)-L-丙氨酸、D-丝氨酸、L-β-高丝氨酸、L-β-丙氨酸、N-α-甲基甘氨酸、甘氨酰胺、丙三醇甘氨酸酯、乙二醇甘氨酸酯、氧杂环丁烷-3-基甘氨酸酯和甘氨酸吗啉酰胺。

[0180] 在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)的C-末端是经修饰的(诸如加帽的)。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)的N-末端是经修饰的(诸如加帽的)。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)的C-和N-末端是经修饰的(诸如加帽的)。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)的C-末端羧基是酰胺化的。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)的N-末端胺是乙酰化的。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)的C-末端羧基是酰胺化的并且结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)的N-末端胺是乙酰化的。

[0181] 本文中还提供结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP),其中所述CKP包含如下提供的胱氨酸支架结构(即,支架结构I):

[0182] $Z_1C_1L1C_2L2C_3L3C_4L4C_5L5C_6Z_2$(I)

[0183] 其中:

[0184] Z_1和Z_2是任意氨基酸;

[0185] L1是环1并且具有选自由以下组成的组的结构:$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$、$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9$和$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}$,其中$X_1$-$X_{10}$中的每一个是任意氨基酸;

[0186] L2是环2并且具有结构:$X_1X_2X_3X_4X_5$,其中X_1-X_5中的每一个是任意氨基酸;

[0187] L3是环3并且具有结构:$X_1X_2X_3$,其中X_1-X_3中的每一个是任意氨基酸;

[0188] L4是环4并且具有结构:X_1,其中X_1是任意氨基酸;

[0189] L5是环5并且具有结构:$X_1X_2X_3X_4X_5$,其中X_1-X_5中的每一者是任意氨基酸;其中,

[0190] 参照具有SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列的野生型喷瓜胰蛋白酶抑制剂EETI-II蛋白,所述CKP具有改变的二硫键连接;其中所述改变的二硫键连接是C1-C4、C2-C3和C5-C6;并且其中所述CKP具有至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%或至少约50%的α螺旋含量百分比,包括介于这些数值之间的任何范围。

[0191] 在某些实施方案中,非天然存在的CKP以500pM或更小的亲和力结合VEGF-A。

[0192] 在某些实施方案中,非天然存在的CKP对VEGF-A的结合亲和力经由例如表面等离

子共振或以下实施例中详细描述的其它测定确定。

[0193] 在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)的Z_1和/或Z_2是G。在某些实施方案中,Z_1和/或Z_2包含多于一个氨基酸。在某些实施方案中,Z_1和/或Z_2包含4个氨基酸。在某些实施方案中,Z_1和/或Z_2包含5个氨基酸。在某些实施方案中,Z_1和/或Z_2是非天然氨基酸。在某些实施方案中,所述非天然氨基酸是N-乙酰甘氨酸或甘氨酰胺。

[0194] 在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)的C-末端是经修饰的(诸如加帽的)。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)的N-末端是经修饰的(诸如加帽的)。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)的C-和N-末端是经修饰的(诸如加帽的)。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)的C-末端羧基是酰胺化的。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)的N-末端胺是乙酰化的。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)的C-末端羧基是酰胺化的并且结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)的N-末端胺是乙酰化的。

[0195] 在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的CKP包含L5,其中X_1-X_5中的每一个是任意氨基酸,除了X_2不是脯氨酸(P)以外。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的CKP包含L5,X_1-X_5中的每一个是任意氨基酸,除了X_4不是甘氨酸(G)以外。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的CKP以约0.5nM至约1.0nM的IC_{50}抑制VEGF-A活性。在某些实施方案中,抑制程度是经由细胞IC_{50}测定确定的,如以下实施例中进一步详细描述的。

[0196] 在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的CKP包含:包含以下氨基酸序列的L1:HMMYDY(SEQ ID NO:231)或

[0197] K/P/Q/R-K/T/L/D-W/T/M/L-Q/R/D-W/F/P/V-W/K/F-Y/Q/W-M/Y/G/D(SEQ ID NO:115)或

[0198] E/G/P/Q/R/T/V-T/E/A/D-D/T/I/P-W/V/Q/T/W-Y/F/N/E/P/K-P/E/W/N/P-H/Q/K/W/H-Q/F/E/A/D/W-I/L/H-D/W/P/Y/T/M/N(SEQ ID NO:232),参照上述支架结构I。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的CKP还包含:包含氨基酸序列KQDSD(SEQ ID NO:93)的L2。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的CKP还包含:包含氨基酸序列LAG的L3。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的CKP包含:包含V或F的L4。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的CKP还包含:包含氨基酸序列G/E/Y/Q/H-P/M/W/Y-N/Y/W-G/D/T/Q/R/S-F/A/E/S(SEQ ID NO:20)或SWWPSL(SEQ ID NO:237)的L5。

[0199] 在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的CKP包含:包含选自由SEQ ID NO:8-14和225-230组成的组的氨基酸序列的L1,参照上述支架结构I。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的CKP还包含:包含氨基酸序列KQDSD(SEQ ID NO:93)的L2。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的CKP还包含:包含氨基酸序列LAG的L3。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的CKP包含:包含V或F的L4。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的CKP还包含:包含选自由SEQ ID NO:15-18和233-238)组成的组的氨基酸序列的L5。在如下表1中提供SEQ ID NO 8-18、225-230和233-238的氨基酸序列。

[0200] 表1

[0201]

ETDWYPHQID (SEQ ID NO: 225)	GPNGF (SEQ ID NO:233)
GETVFEQFLW (SEQ ID NO:226)	GPNGF (SEQ ID NO:234)
HMMYDY (SEQ ID NO:227)	EMYDA (SEQ ID NO:235)
KKWQWWYM (SEQ ID NO:228)	YPWTE (SEQ ID NO:236)
PAIQNWKEHP (SEQ ID NO:229)	SWWPSL (SEQ ID NO:237)
PTTRFKQY (SEQ ID NO:8)	GPNGF (SEQ ID NO:15)

[0202]

QDPTFNWALY (SEQ ID NO:9)	QMYQS (SEQ ID NO:16)
QLMHPFWG (SEQ ID NO:230)	HWYRS (SEQ ID NO:238)
QLMQPFWG (SEQ ID NO:10)	HWYQS (SEQ ID NO:17)
RDLDVKWD (SEQ ID NO:11)	QYYSS (SEQ ID NO:18)
RTPWEPHDIT (SEQ ID NO:12)	GPNGF (SEQ ID NO:19)
TTPWPPHEIM (SEQ ID NO:13)	
VTPWKPHWIN (SEQ ID NO:14)	

[0203] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含SEQ ID NO:21-17和239-244中任一个的氨基酸序列。在如下表2中提供SEQ ID NO:21-17和239-244的氨基酸序列。

[0204] 表2

[0205]

GCETDWYPHQIDCKQDSDCLAGCVCGPNGFCG (SEQ ID NO: 239)
GCGETVFEQFLWCKQDSDCLAGCVCGPNGFCG (SEQ ID NO:240)
GCHMMYDYCKQDSDCLAGCVCEMYDACG (SEQ ID NO:241)
GCKKWQWWYMCKQDSDCLAGCVCYPWTECG (SEQ ID NO:242)
GCPAIQNWKEHPCKQDSDCLAGCVCSWWPSLCG (SEQ ID NO:243)
GCPTTRFKQYCKQDSDCLAGCVCGPNGFCG (SEQ ID NO:21)
GCQDPTFNWALYCKQDSDCLAGCVCQMYQSCG (SEQ ID NO:22)
GCQLMHPFWGCKQDSDCLAGCVCHWYRSCG (SEQ ID NO:244)
GCQLMQPFWGCKQDSDCLAGCVCHWYQSCG (SEQ ID NO:23)
GCRDLDVKWDCKQDSDCLAGCFCQYYSSCG (SEQ ID NO:24)
GCRTPWEPHDITCKQDSDCLAGCVCGPNGFCG (SEQ ID NO:25)
GCTTPWPPHEIMCKQDSDCLAGCVCGPNGFCG (SEQ ID NO:26)
GCVTPWKPHWINCKQDSDCLAGCVCGPNGFCG (SEQ ID NO:27)

[0206] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含:包含氨基酸序列Q/H/E/

N/D-L/V/R/P/I-M/F/L-Q/E/R/L-P-F/A/L/S-W-G(SEQ ID NO:358)的L1,参照上述支架结构I。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸序列KQDSD(SEQ ID NO:93)的L2。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸序列LAG的L3。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸V的L4。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸序列HWYQS(SEQ ID NO:17)的L5。

[0207] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含:包含选自由SEQ ID NO 33、36和245-253组成的组的氨基酸序列的L1,参照支架结构I。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸序列KQDSD(SEQ ID NO:93)的L2。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸序列LAG的L3。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸V的L4。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸序列HWYQS(SEQ ID NO:17)的L5。在如下表3中提供SEQ ID NO 33、36和245-253的氨基酸序列。

[0208] 表3

[0209]

HLFEPLWG(SEQ ID NO:245)
QVMRPFWG(SEQ ID NO:246)
QVMQPAWG(SEQ ID NO:247)
HRLQPLWG(SEQ ID NO:248)
ELLQPSWG(SEQ ID NO:249)
NPMLPFWG(SEQ ID NO:368)
NVLLPLWG(SEQ ID NO:250)
DIMQPLWG(SEQ ID NO:36)
DLMQPLWG(SEQ ID NO:251)
NPMLPLWG(SEQ ID NO:252)
QVLQPSWG(SEQ ID NO:253)

[0210] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含SEQ IDNO:265-275中任一个的氨基酸序列。在如下表4中提供SEQ ID NO:265-275的氨基酸序列。

[0211] 表4

[0212]

GCHLFEPLWGCKQDSDCLAGCVCHWYQSCG (SEQ ID NO: 265)

[0213]

GCQVMRPFWGCKQDSDCLAGCVCHWYQSCG (SEQ ID NO:266)
GCQVMQPAWGCKQDSDCLAGCVCHWYQSCG (SEQ ID NO:267)
GCHRLQPLWGCKQDSDCLAGCVCHWYQSCG (SEQ ID NO:268)
GCELLQPSWGCKQDSDCLAGCVCHWYQSCG (SEQ ID NO:269)
GCNPMLPFWGCKQDSDCLAGCVCHWYQSCG (SEQ ID NO:270)
GCNVLLPLWGCKQDSDCLAGCVCHWYQSCG (SEQ ID NO:271)
GCDIMQPLWGCKQDSDCLAGCVCHWYQSCG (SEQ ID NO:272)
GCDLMQPLWGCKQDSDCLAGCVCHWYQSCG (SEQ ID NO:273)
GCNPMLPLWGCKQDSDCLAGCVCHWYQSCG (SEQ ID NO:58)
GCQVLQPSWGCKQDSDCLAGCVCHWYQSCG (SEQ ID NO:275)

[0214] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸序列QLMQPFWG(SEQ ID NO:10)的L1,参照支架结构I。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸序列KQDSD(SEQ ID NO:93)的L2。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸序列LAG的L3。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸V的L4。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含:包含氨基酸序列R/H-W-Y-N/Q/H-S(SEQ ID NO:359)的L5。

[0215] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸序列QLMQPFWG(SEQ ID NO:10)的L1,参照上述支架结构I。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸序列KQDSD(SEQ ID NO:93)的L2。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸序列LAG的L3。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸V的L4。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含选自由HWYQS(SEQ ID NO:17)、RWYHS(SEQ ID NO:43)和RWYNS(SEQ ID NO:133)组成的组的氨基酸序列的L5。

[0216] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含选自由SEQ ID NO:23、276和278组成的组的氨基酸序列。在如下表5中提供SEQ ID NO 23、276和278。

[0217] 表5

[0218]

GCQLMQPFWGCKQDSDCLAGCVCRWYNSCG(SEQ ID NO:276)
GCQLMQPFWGCKQDSDCLAGCVCHWYQSCG(SEQ ID NO:23)
GCQLMQPFWGCKQDSDCLAGCVCRWYHSCG(SEQ ID NO:278)

[0219] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含:包含氨基酸序列

[0220] Q/D/K/N/A/R/H-L/V/I/R/P/V/-M/L/S/T/F-Q/E/L/H-P-F/L/M/Y/S-W-G(SEQID NO:40)的L1,参照支架结构I。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸序列KQDSD(SEQ ID NO:93)的L2。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸序列LAG的L3。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸V的L4。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸序列

[0221] H/L/R/Q/-W/F/Y-Y-Q/N/K/H/D/E-S(SEQ ID NO:360)的L5。

[0222] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含:包含选自由SEQ ID NO 28-39和254-261组成的组的氨基酸序列的L1,参照支架结构I。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸序列KQDSD(SEQ ID NO:93)的L2。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸序列LAG的L3。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸V的L4。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含选自由SEQ ID NO:17、41-46、133、262-264和567组成的组的氨基酸序列的L5。在如下表6中提供SEQ ID NO:17、28-39、41-46、133、254-264和567的氨基酸序列。

[0223] 表6

[0224]

DVLQPFWG (SEQ ID NO: 28)	HWYQS (SEQ ID NO:17)
QISQPFWG (SEQ ID NO:29)	HFYNS (SEQ ID NO:41)
DRMQPLWG (SEQ ID NO:30)	LWYKS (SEQ ID NO:42)

[0225]

QLLEPMWG (SEQ ID NO:254)	HWYNS (SEQ ID NO:46)
KLLQPMWG (SEQ ID NO:255)	QWYKS (SEQ ID NO:262)
DRMQPYWG (SEQ ID NO:256)	RWYHS (SEQ ID NO:43)
NLMLPFWG (SEQ ID NO:31)	RWYQS (SEQ ID NO:44)
QRTQPFWG (SEQ ID NO:32)	LWYDS (SEQ ID NO:263)
KIMQPLWG (SEQ ID NO:257)	QYYQS (SEQ ID NO:45)
NLMHPFWG (SEQ ID NO:258)	RWYNS (SEQ ID NO:133)
NIMLPFWG (SEQ ID NO:33)	QWYQS (SEQ ID NO:264)
DPMQPFWG (SEQ ID NO:34)	NPMLPLWG (SEQ ID NO:38)
DVMQPYWG (SEQ ID NO:35)	KLFEPLWG (SEQ ID NO:39)
DIMQPLWG (SEQ ID NO:36)	RWYES (SEQ ID NO:567)
ALLQPLWG (SEQ ID NO:259)	
QLLQPLWG (SEQ ID NO:37)	
RLLEPSWG (SEQ ID NO:260)	
HLLLPLWG (SEQ ID NO:261)	

[0226] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含选自由SEQ ID NO:47-59和279-286组成的组的氨基酸序列。在如下表7中提供SEQ ID NO:47-59和279-286的氨基酸序列。

[0227] 表7

[0228]

GCDVLQPFWGCKQDSDCLAGCVCHWYQSCG (SEQ ID NO: 47)
GCQISQPFWGCKQDSDCLAGCVCHFYNSCG (SEQ ID NO:48)
GCDRMQPLWGCKQDSDCLAGCVCLWYKSCG (SEQ ID NO:49)
GCQLLEPMWGCKQDSDCLAGCVCHWYNSCG (SEQ ID NO:279)
GCKLLQPMWGCKQDSDCLAGCVCRWYQSCG (SEQ ID NO:280)
GCDRMQPYWGCKQDSDCLAGCVCQWYKSCG (SEQ ID NO:281)
GCNLMLPFWGCKQDSDCLAGCVCRWYHSCG (SEQ ID NO:50)
GCQRTQPFWGCKQDSDCLAGCVCRWYQSCG (SEQ ID NO:51)
GCKIMQPLWGCKQDSDCLAGCVCLWYDSCG (SEQ ID NO:282)
GCNLMHPFWGCKQDSDCLAGCVCHWYQSCG (SEQ ID NO:283)

[0229]

GCNIMLPFWGCKQDSDCLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO:52)
GCNPMLPFWGCKQDSDCLAGCVCHWYQSCG (SEQ ID NO:53)
GCDPMQPFWGCKQDSDCLAGCVCRWYQSCG (SEQ ID NO:54)
GCDVMQPYWGCKQDSDCLAGCVCHWYNSCG (SEQ ID NO:55)
GCDIMQPLWGCKQDSDCLAGCVCHWYQSCG (SEQ ID NO:56)
GCALLQPLWGCKQDSDCLAGCVCRWYNSCG (SEQ ID NO:284)
GCQLLQPLWGCKQDSDCLAGCVCRWYQSCG (SEQ ID NO:57)
GCRLLEPSWGCKQDSDCLAGCVCQWYQSCG (SEQ ID NO:285)
GCHLLLPLWGCKQDSDCLAGCVCRWYHSCG (SEQ ID NO:286)
GCNPMLPLWGCKQDSDCLAGCVCHWYQSCG (SEQ ID NO:58)
GCKLFEPLWGCKQDSDCLAGCVCRWYESCG (SEQ ID NO:59)

[0230] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含:包含氨基酸序列

[0231] Q/D/K/W/E/L/R-D/N-P/R/L/T-T/S/L/K-F/V/L/I-N/D-W-A/S/G-L/V/E/T/Q/D-F/Y(SEQ ID NO:70)的L1,参照支架结构I。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸序列KQDSD(SEQ ID NO:93)的L2。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸序列LAG的L3。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸V的L4。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸序列

[0232] Q/R-M/L/F/H-Y/F/H-D/Q/N/K-S/T(SEQ ID NO:80)的L5。

[0233] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含:包含选自由SEQ ID NO:60-69和287-291组成的组的氨基酸序列的L1。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸序列KQDSD(SEQ ID NO:93)的L2。在某些实施方案中,非天然存

在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸序列LAG的L3。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸V的L4。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含选自由SEQ ID NO:16、71-79、274和292组成的组的氨基酸序列的L5。在如下表8中提供SEQ ID NO:16、60-69、71-79、274和287-292的氨基酸序列。

[0234] 表8

[0235]

DDPSFDWSVY (SEQ ID NO: 287)	RMYDS (SEQ ID NO:292)
KNPLFNWALY (SEQ ID NO:60)	QLFDS (SEQ ID NO:71)
QDPTVNWAVY (SEQ ID NO:61)	QFYQS (SEQ ID NO:72)
QDPTFNWAEY (SEQ ID NO:62)	QLYQS (SEQ ID NO:73)
WDPTFNWALY (SEQ ID NO:288)	QMYDS (SEQ ID NO:76)
QDPTLNWATY (SEQ ID NO:289)	QMYQS (SEQ ID NO:16)
EDPTVDWAQY (SEQ ID NO:290)	QMHQS (SEQ ID NO:74)
QDPSLNWADY (SEQ ID NO:63)	QMYNS (SEQ ID NO:75)
LDRTLNWALY (SEQ ID NO:64)	QLYQS (SEQ ID NO:73)
LDPSFNWSLY (SEQ ID NO:65)	QHYKT (SEQ ID NO:77)
RDLTINWALF (SEQ ID NO:66)	QLFNS (SEQ ID NO:78)
KDTTFNWGLF (SEQ ID NO:291)	QLYNS (SEQ ID NO:79)
LDPTVNWALF (SEQ ID NO:67)	QMFNS (SEQ ID NO:274)
QDPKLNWAVY (SEQ ID NO:68)	
LDPSFDWALY (SEQ ID NO:69)	

[0236] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含选自由SEQ ID NO:81-91和293-297组成的组的氨基酸序列。在如下表9中提供SEQ ID NO:81-91和293-297的氨基酸序列。

[0237] 表9

[0238]

GCDDPSFDWSVYCKQDSDCLAGCVCRMYDSCG (SEQ ID NO: 293)
GCKNPLFNWALYCKQDSDCLAGCVCQLFDSCG (SEQ ID NO:81)
GCQDPTVNWAVYCKQDSDCLAGCVCQFYQSCG (SEQ ID NO:82)
GCQDPTFNWAEYCKQDSDCLAGCVCQLYQSCG (SEQ ID NO:83)
GCWDPTFNWALYCKQDSDCLAGCVCQMYDSCG (SEQ ID NO:294)
GCQDPTFNWAEYCKQDSDCLAGCVCQMYQSCG (SEQ ID NO:84)
GCQDPSLNWADYCKQDSDCLAGCVCQMHQSCG (SEQ ID NO:85)
GCQDPTLNWATYCKQDSDCLAGCVCQMYQSCG (SEQ ID NO:295)
GCEDPTVDWAQYCKQDSDCLAGCVCQMYQSCG (SEQ ID NO:296)

[0239]

GCLDRTLNWALYCKQDSDCLAGCVCQMYNSCG (SEQ ID NO:86)
GCLDPSFNWSLYCKQDSDCLAGCVCQMYDSCG (SEQ ID NO:87)
GCRDLTINWALFCKQDSDCLAGCVCQMFNSCG (SEQ ID NO:88)
GCKDTTFNWGLFCKQDSDCLAGCVCQLYQSCG (SEQ ID NO:297)
GCLDPTVNWALFCKQDSDCLAGCVCQHYKTCG (SEQ ID NO:89)
GCQDPKLNWAVYCKQDSDCLAGCVCQLFNSCG (SEQ ID NO:90)
GCLDPSFDWALYCKQDSDCLAGCVCQLYNSCG (SEQ ID NO:91)

[0240] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含:包含氨基酸序列NIMLPFWG(SEQ ID NO:33)的L1,参照支架结构I。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸序列

[0241] K/G/Q/S/N-Q/L/P/A/V/T/R/W/K/G/Y-D/S/E/N-S/F/Y/L/F/Q/M-D/E/N/A/L/F/H/Q(SEQ ID NO:98)的L2。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸序列LAG的L3。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸V的L4。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸序列QYYQS(SEQ ID NO:45)的L5。

[0242] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含:包含氨基酸序列NIMLPFWG(SEQ ID NO:33)的L1,参照支架结构I。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含选自由SEQ ID NO:94-97和298-309组成的组的氨基酸序列的L2。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸序列LAG的L3。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸V的L4。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸序列QYYQS(SEQ ID NO:45)的L5。在如下表10中提供SEQ ID NO:94-97和298-309的氨基酸序列。

[0243] 表10

[0244]

GQSFE (SEQ ID NO: 94)	GWDQF (SEQ ID NO:304)
GLDYD (SEQ ID NO:95)	GKDFH (SEQ ID NO:305)
GPELN (SEQ ID NO:298)	GPDLQ (SEQ ID NO:96)

[0245]

QADYA (SEQ ID NO:299)	SGDFA (SEQ ID NO:306)
GVDYL (SEQ ID NO:300)	GKELN (SEQ ID NO:307)
GTNFL (SEQ ID NO:301)	GWSMD (SEQ ID NO:308)
SRDFD (SEQ ID NO:302)	GYDLQ (SEQ ID NO:309)
NRDFL (SEQ ID NO:303)	GRDFE (SEQ ID NO:97)

[0246] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含选自由SEQ ID NO:99-102和310-321组成的组的氨基酸序列。在如下表11中提供SEQ ID NO:99-102和310-321的氨基酸序列。

[0247] 表11

[0248]

GCNIMLPFWGCGQSFECLAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:99)
GCNIMLPFWGCGLDYDCLAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:100)
GCNIMLPFWGCGPELNCLAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:310)
GCNIMLPFWGCQADYACLAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:311)
GCNIMLPFWGCGVDYLCLAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:312)
GCNIMLPFWGCGTNFLCLAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:313)
GCNIMLPFWGCSRDFDCLAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:314)
GCNIMLPFWGCNRDFLCLAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:315)
GCNIMLPFWGCGWDQFCLAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:316)
GCNIMLPFWGCGKDFHCLAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:317)
GCNIMLPFWGCGPDLQCLAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:101)
GCNIMLPFWGCSGDFACLAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:318)
GCNIMLPFWGCGKELNCLAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:319)
GCNIMLPFWGCGWSMDCLAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:320)
GCNIMLPFWGCGYDLQCLAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:321)
GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:102)

[0249] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含:包含氨基酸序列N-I-M/L-L/S/T/Q/N/E/D-P-F/Y/S-WG(SEQ ID NO:454)的L1,参照支架结构I。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含:包含氨基酸序列NIMLPFWG(SEQ ID NO:33)的L1,参照支架结构I。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸序列GRDFE(SEQ ID NO:97)的L2。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸序列L/V/M/F-A/Q/E/S/N/Y/I/T-G/Q/R/D/T/N/E的L3。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸V或I的L4。在某些实施方案中,非天然存在的

结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸序列QYYQS(SEQ ID NO:45)的L5。

[0250] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含:包含选自由以下组成的组的氨基酸序列的L1:NIMLPFWG(SEQ ID NO:33)、NILLPFWG(SEQ ID NO:396)、NILLPYWG(SEQ ID NO:397)、NIMSPFWG(SEQ ID NO:398)、NIMTPFWG(SEQ ID NO:399)、NIMQPFWG(SEQ ID NO:400)、NIMNPFWG(SEQ ID NO:401)、NIMEPFWG(SEQ ID NO:402)、NIMDPFWG(SEQ ID NO:403)、NIMLPSWG(SEQ ID NO:414)和NIMLPYWG(SEQ ID NO:141),参照支架结构I。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含:包含氨基酸序列NIMLPFWG(SEQ ID NO:33)的L1,参照支架结构V或I。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸序列GRDFE(SEQ ID NO:97)的L2。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含选自由以下组成的组的氨基酸序列的L3:LQQ、VER、MSD、MNQ、MQT、VYQ、FIN、VSQ、VTE、FYE、MEQ和VYR。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸I的L4。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸序列QYYQS(SEQ ID NO:45)的L5。

[0251] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含选自由SEQ ID NO:103-114组成的组的氨基酸序列。在如下表12中提供SEQ ID NO:103-114的氨基酸序列。

[0252] 表12

[0253]

GCNIMLPFWGCGRDFECLQQCICQYYQSCG (SEQ ID NO: 103)
GCNIMLPFWGCGRDFECVERCICQYYQSCG (SEQ ID NO:104)
GCNIMLPFWGCGRDFECMSDCICQYYQSCG (SEQ ID NO:105)
GCNIMLPFWGCGRDFECMNQCICQYYQSCG (SEQ ID NO:106)

[0254]

GCNIMLPFWGCGRDFECMQTCICQYYQSCG (SEQ ID NO:107)
GCNIMLPFWGCGRDFECVYQCICQYYQSCG (SEQ ID NO:108)
GCNIMLPFWGCGRDFECFINCICQYYQSCG (SEQ ID NO:109)
GCNIMLPFWGCGRDFECVSQCICQYYQSCG (SEQ ID NO:110)
GCNIMLPFWGCGRDFECVTECICQYYQSCG (SEQ ID NO:111)
GCNIMLPFWGCGRDFECFYECICQYYQSCG (SEQ ID NO:112)
GCNIMLPFWGCGRDFECMEQCICQYYQSCG (SEQ ID NO:113)
GCNIMLPFWGCGRDFECVYRCICQYYQSCG (SEQ ID NO:114)
GCDVLQPYWGCGPDIDCLSNCICHWYNSCG (SEQ ID NO:386)
GCNILLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO:405)
GCNILLPYWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO:406)
GCNIMSPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO:407)
GCNIMTPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO:408)
GCNIMQPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO:409)
GCNIMNPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO:410)
GCNIMEPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO:411)
GCNIMDPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO:412)
GCNIMLPSWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO:415)
GCNIMLPFWGCGRDFECLSGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO:421)
GCNIMLPFWGCGRDFECLTGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO:422)
GCNIMLPFWGCGRDFECLEGCVCQYYQSCG (SEQ ID NO:423)
GCNIMLPYWGCGRDFECLAGCLCQYYQSCG (SEQ ID NO:424)
GCNIMLPYWGCGRDFECLAGCICQYYQSCG (SEQ ID NO:425)
GCNIMLPYWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCS (SEQ ID NO:431)
GCNILLPYWGCGRDFECMEQCICQYYQSCG (SEQ ID NO:435)

[0255] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含:包含氨基酸序列DVMQPYWG(SEQ ID NO:35)的L1,参照支架结构I。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸序列K/G/D/A/E-Q/E/R/V/P/D/M/G/N/L/A/F-D/N/Y/S-S/F/L/I/M/Y/V/N/E-D/L/Q/S/E/T/L/A/N(SEQ ID NO:121)的L2。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸序列LAG的L3。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸V的L4。在某些实施方案中,非天然存在的结合

VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸序列HWYNS(SEQ ID NO:46)的L5。

[0256] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含:包含氨基酸序列DVMQPYWG(SEQ ID NO:35)的L1,参照支架结构I。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含选自由SEQ ID NO:117-120、211和322-339组成的组的氨基酸序列的L2。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸序列LAG的L3。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸V的L4。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸序列HWYNS(SEQ ID NO:46)的L5。在如下表13中提供SEQ ID NO:117-120、211和322-339的氨基酸序列。

[0257] 表13

[0258]

GENFL (SEQ ID NO: 117)	DGDFD (SEQ ID NO:331)
GRDLQ (SEQ ID NO:322)	AGDFE (SEQ ID NO:332)
GVDLS (SEQ ID NO:323)	EMDFD (SEQ ID NO:120)
GPDID (SEQ ID NO:118)	GNSFE (SEQ ID NO:333)
GDDLE (SEQ ID NO:324)	GQDLT (SEQ ID NO:334)
GVDMT (SEQ ID NO:325)	GENLA (SEQ ID NO:335)
GMDIE (SEQ ID NO:326)	GQDYN (SEQ ID NO:336)
DGDYQ (SEQ ID NO:327)	GADLS (SEQ ID NO:337)
GNDVS (SEQ ID NO:328)	GFDMD (SEQ ID NO:338)
GRDMD (SEQ ID NO:119)	GESLS (SEQ ID NO:211)
AGDEL (SEQ ID NO:329)	DLNYE (SEQ ID NO:339)
GLDEE (SEQ ID NO:330)	

[0259] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含选自由SEQ ID NO:122-126和340-357组成的组的氨基酸序列。在如下表14中提供SEQ ID NOs:SEQ ID NOs:122-126和340-357的氨基酸序列。

[0260] 表14

[0261]

GCDVMQPYWGCGENFLCLAGCVCHWYNSCG(SEQ ID NO:122)
GCDVMQPYWGCGRDLQCLAGCVCHWYNSCG(SEQ ID NO:340)
GCDVMQPYWGCGVDLSCLAGCVCHWYNSCG(SEQ ID NO:341)
GCDVMQPYWGCGPDIDCLAGCVCHWYNSCG(SEQ ID NO:123)
GCDVMQPYWGCGDDLECLAGCVCHWYNSCG(SEQ ID NO:342)
GCDVMQPYWGCGVDMTCLAGCVCHWYNSCG(SEQ ID NO:343)
GCDVMQPYWGCGMDIECLAGCVCHWYNSCG(SEQ ID NO:344)
GCDVMQPYWGCDGDYQCLAGCVCHWYNSCG(SEQ ID NO:345)
GCDVMQPYWGCGNDVSCLAGCVCHWYNSCG(SEQ ID NO:346)

GCDVMQPYWGCGRDMDCLAGCVCHWYNSCG(SEQ ID NO:124)
GCDVMQPYWGCAGDELCLAGCVCHWYNSCG(SEQ ID NO:347)
GCDVMQPYWGCGLDEECLAGCVCHWYNSCG(SEQ ID NO:348)
GCDVMQPYWGCDGDFDCLAGCVCHWYNSCG(SEQ ID NO:349)
GCDVMQPYWGCAGDFECLAGCVCHWYNSCG(SEQ ID NO:350)
GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCVCHWYNSCG(SEQ ID NO:125)
GCDVMQPYWGCGNSFECLAGCVCHWYNSCG(SEQ ID NO:351)
GCDVMQPYWGCGQDLTCLAGCVCHWYNSCG(SEQ ID NO:352)
GCDVMQPYWGCGENLACLAGCVCHWYNSCG(SEQ ID NO:353)
GCDVMQPYWGCGQDYNCLAGCVCHWYNSCG(SEQ ID NO:354)
GCDVMQPYWGCGADLSCLAGCVCHWYNSCG(SEQ ID NO:355)
GCDVMQPYWGCGFDMDCLAGCVCHWYNSCG(SEQ ID NO:356)
GCDVMQPYWGCGESLSCLAGCVCHWYNSCG(SEQ ID NO:126)
GCDVMQPYWGCDLNYECLAGCVCHWYNSCG(SEQ ID NO:357)

[0262] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含:包含氨基酸序列D-V-M/L-Q/K/D-P-Y/M/T/L-W-G(SEQ ID NO:130)的L1,参照支架结构I。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:

[0263] 包含氨基酸序列KQDSD(SEQ ID NO:93)的L2。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸序列LAG的L3。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸V的L4。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸序列H/L/Q/R-W-Y-N-S(SEQ ID NO:134)的L5。

[0264] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含:包含选自SEQ ID NO:127-129的氨基酸序列的L1,参照支架结构I。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸序列KQDSD(SEQ ID NO:93)的L2。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸序列LAG的L3。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸V的L4。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含选自由SEQ ID NO:131-133组成的组的氨基酸序列的L5。在如下表15中提供SEQ ID NO:127-129和131-133的氨基酸序列:

[0265] 表15

[0266]

DVMKPMWG(SEQ ID NO:127)	QWYNS(SEQ ID NO:131)
DVLDPTWG(SEQ ID NO:128)	LWYNS(SEQ ID NO:132)
DVLQPLWG(SEQ ID NO:129)	RWYNS(SEQ ID NO:133)

[0267] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含选自由SEQ ID NO:135-137组成的组的氨基酸序列。在如下表16中提供SEQ ID NO:135-127的氨基酸序列:

[0268] 表16

[0269]

GCDVMKPMWGCKQDSDCLAGCVCQWYNSCG(SEQ ID NO:135)
GCDVLDPTWGCKQDSDCLAGCVCLWYNSCG(SEQ ID NO:136)
GCDVLQPLWGCKQDSDCLAGCVCRWYNSCG(SEQ ID NO:137)

[0270] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含:包含氨基酸序列

DVMQPYWG(SEQ ID NO:35)的L1,参照支架结构I。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸序列GPDID(SEQ ID NO:118)的L2。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸序列L/F-A/V/S-G/R/N的L3。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含选自V、I和L的氨基酸的L4。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸序列HWYNS(SEQ ID NO:46)的L5。

[0271] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含:包含氨基酸序列DVMQPYWG(SEQ ID NO:35)的L1,参照支架结构I。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸序列GPDID(SEQ ID NO:118)的L2。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸序列FVR和LSN的L3。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含选自V、I和L的氨基酸的L4。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸序列HWYNS(SEQ ID NO:46)的L5。

[0272] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCDVMQPYWGCGPDIDCFVRCLCHWYNSCG(SEQ ID NO:139)。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCDVMQPYWGCGPDIDCLSNCICHWYNSCG(SEQ ID NO:140)。

[0273] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含本文公开的非天然存在的结合VEGF-A的CKP中的任一个的L1、L2、L3、L4和/或L5。因此,在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含:包含选自由SEQ ID NO:8-14、28-39、60-69、127-129、141、225-230、245-261、287-291、396-403和414组成的组的氨基酸序列的L1,参照支架结构I。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含选自由SEQ ID NO:93-97、117-120、211、298-309和322-339组成的组的氨基酸序列的L2。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含选自由以下组成的组的氨基酸序列的L3:LAG、LQQ、VER、MSD、MNQ、MQT、VYQ、FIN、VSQ、VTE、FYE、MEQ和VYR、FVR和LSN。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含氨基酸V、F、I或L的L4。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP还包含:包含选自由SEQ ID NO:15-18、41-46、71-79、131-133、233-238、262-264和292组成的组的氨基酸序列的L5。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)的C-末端是经修饰的(诸如加帽的)。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)的N-末端是经修饰的(诸如加帽的)。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)的C-和N-末端是经修饰的(诸如加帽的)。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)的C-末端羧基是酰胺化的。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)的N-末端胺是乙酰化的。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)的C-末端羧基是酰胺化的并且结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)的N-末端胺是乙酰化的。

[0274] 在某些实施方案中,从本文提供的结合VEGF-A的CKP中缺失至少一个氨基酸。在某些实施方案中,从N-末端缺失至少一个氨基酸。在某些实施方案中,从C-末端缺失至少一个氨基酸。在某些实施方案中,从N-末端和C-末端缺失至少一个氨基酸。在某些实施方案中,缺失至少一个内部氨基酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列CNIMLPYWGCGRDFECLAGCVCQYYQSC(SEQ ID NO:217)。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)的C-末端是经修饰的(诸如加帽的)。在某些实施方案中,结

合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)的N-末端是经修饰的(诸如加帽的)。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)的C-和N-末端二者是经修饰的(诸如加帽的)。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)的C-末端羧基是酰胺化的。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)的N-末端胺是乙酰化的。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)的C-末端羧基是酰胺化的并且结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)的N-末端胺是乙酰化的。

[0275] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含至少一个氨基酸添加。在某些实施方案中,至少一个氨基酸添加至N-末端。在某些实施方案中,至少一个氨基酸添加至C-末端。在某些实施方案中,至少一个氨基酸添加至N-末端和C-末端。

[0276] 在某些实施方案中,将两个氨基酸添加至本文提供的非天然存在的结合VEGF-A的CKP的N-末端。在某些实施方案中,将两个氨基酸添加至非天然存在的结合VEGF-A的CKP的N-末端,所述CKP为

[0277] GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:102)中所示。在某些实施方案中,添加至SEQ ID NO:102的N-末端的两个氨基酸是F/I/G/T/V/L-H/A/S/R。在某些实施方案中,添加至SEQ ID NO:102的N-末端的两个氨基酸选自由以下组成的组:FH、IA、GS、TR、VH和LS。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含

[0278] GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGFH(SEQ ID NO:379)中所示的氨基酸序列。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGIA(SEQ ID NO:380)中所示的氨基酸序列。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGGS(SEQ ID NO:381)中所示的氨基酸序列。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGTR(SEQ ID NO:382)中所示的氨基酸序列。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGVH(SEQ ID NO:383)中所示的氨基酸序列。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含

[0279] GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGLS(SEQ ID NO:384)中所示的氨基酸序列。

[0280] 在某些实施方案中,将两个氨基酸添加至非天然存在的结合VEGF-A的CKP的N-末端,所述CKP为

[0281] GCDVLQPYWGCGPDIDCLSNCICHWYNSCG(SEQ ID NO:386)中所示。在某些实施方案中,添加至SEQ ID NO:102的N-末端的两个氨基酸是R/W/P/D/Q/E/S-T/K/E/F/Q/L/S。在某些实施方案中,添加至SEQ ID NO:102的N-末端的两个氨基酸选自由以下组成的组:RT、WK、PL、DE、QF、EQ、PT、RL和SL。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含GCDVLQPYWGCGPDIDCLSNCICHWYNSCGRT(SEQ ID NO:387)中所示的氨基酸序列。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含GCDVLQPYWGCGPDIDCLSNCICHWYNSCGWK(SEQ ID NO:388)中所示的氨基酸序列。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含

[0282] GCDVLQPYWGCGPDIDCLSNCICHWYNSCGPL(SEQ ID NO:389)中所示的氨基酸序列。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含GCDVLQPYWGCGPDIDCLSNCICHWYNSCGDE(SEQ ID NO:390)中所示的氨基酸序列。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含GCDVLQPYWGCGPDIDCLSNCICHWYNSCGQF(SEQ ID NO:391)中所示的氨基酸序列。在某

些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含GCDVLQPYWGCGPDIDCLSNCICHWYNSCGEQ(SEQ ID NO:392)中所示的氨基酸序列。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含GCDVLQPYWGCGPDIDCLSNCICHWYNSCGPT(SEQ ID NO:393)中所示的氨基酸序列。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含

[0283] GCDVLQPYWGCGPDIDCLSNCICHWYNSCGRL(SEQ ID NO:394)中所示的氨基酸序列。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含GCDVLQPYWGCGPDIDCLSNCICHWYNSCGSL(SEQ ID NO:395)中所示的氨基酸序列。

[0284] 在某些实施方案中,将三个氨基酸添加至本文提供的非天然存在的结合VEGF-A的CKP的N-末端。在某些实施方案中,将两个氨基酸添加至非天然存在的结合VEGF-A的CKP的N-末端,所述CKP为

[0285] GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:102)中所示。在某些实施方案中,添加至SEQ ID NO:102的N-末端的三个氨基酸是P/N/T/D/E/Y/W-L/Y/F/H/D/P-I/Q/V/K/S/Y/H。在某些实施方案中,添加至SEQ ID NO:102的N-末端的三个氨基酸选自由以下组成的组:PLI、NYQ、PLQ、TFQ、DLV、EHK、YLS、WDY、WPH和PHQ。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含

[0286] GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGPLI(SEQ ID NO:369)中所示的氨基酸序列。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGNYQ(SEQ ID NO:370)中所示的氨基酸序列。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGPLQ(SEQ ID NO:371)中所示的氨基酸序列。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGTFQ(SEQ ID NO:372)中所示的氨基酸序列。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含

[0287] GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGDLV(SEQ ID NO:373)中所示的氨基酸序列。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGEHK(SEQ ID NO:374)中所示的氨基酸序列。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGYLS(SEQ ID NO:375)中所示的氨基酸序列。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含

[0288] GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGWDY(SEQ ID NO:376)中所示的氨基酸序列。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGWPH(SEQ ID NO:377)中所示的氨基酸序列。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGPHQ(SEQ ID NO:378)中所示的氨基酸序列。

[0289] 在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)的C-末端是经修饰的(诸如加帽的)。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)的N-末端是经修饰的(诸如加帽的)。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)的C-和N-末端二者是经修饰的(诸如加帽的)。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)的C-末端羧基是酰胺化的。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)的N-末端胺是乙酰化的。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)的C-末端羧基是酰胺化的并且结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)的N-末端胺是乙酰化的。

[0290] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP是本文描述的非天然存在的结合VEGF-A的CKP的变体。在某些实施方案中,这种变体包含在以下序列中所示的一个或多个序列中的至少1个、至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个或至少10个氨基酸置换:SEQ ID NO:8-14、28-39、60-69、127-129、141、225-230、245-261、287-291、396-403和414;SEQ ID NO:93-97、117-120、211、298-309和322-339;氨基酸序列LAG、LQQ、VER、MSD、MNQ、MQT、VYQ、FIN、VSQ、VTE、FYE、MEQ、和VYR、FVR和LSN;和/或15-18、41-46、71-79、131-133、233-238、262-264和292。在某些实施方案中,氨基酸置换是保守性氨基酸置换。在某些实施方案中,氨基酸置换不实质上降低非天然存在的结合VEGF-A的CKP结合人VEGF-A的能力。例如,可以做出不实质上降低VEGF-A结合亲和力的保守性改变(例如,如本文中提供的保守性置换)。使用以下实施例中描述的方法,可以评价非天然存在的结合VEGF-A的CKP的变体的结合亲和力。

[0291] 在如下表17中在“保守性置换”的标题下显示了保守性置换。在表17中在“示例性置换”的标题下提供了更实质性的变化,并且如下文基于氨基酸侧链类别进一步描述的。可以将氨基酸置换引入到非天然存在的结合VEGF-A的CKP的变体中并且针对所需活性(例如,保留的/改善的VEGF-A结合)筛选产物。

[0292] 表17:保守性置换

[0293]

原始残基	示例性置换	优选置换
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg

[0294]

Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸	Leu

[0295] 非保守性置换将需要将这些类别之一的成员交换为另一个类别的成员。

[0296] 示例性的置换变体是亲和力成熟的非天然存在的结合VEGF-A的CKP,其可以例如使用基于噬菌体展示的亲和力成熟技术(诸如本文描述的那些)便利地产生。简而言之,改变(即,添加、缺失或置换)L1、L2、L3、L4和/或L5中的一个或多个残基,并且将变体的结合VEGF-A的CKP在噬菌体上展示并针对VEGF-A结合亲和力进行筛选。在亲和力成熟的某些实施方案中,通过多种方法(例如,易错PCR、环改组或寡核苷酸定向诱变)中的任一种,将多样性引入到为成熟而选择的可变基因中。随后建立次级文库。随后筛选该文库以鉴定对VEGF-A具有所需亲和力的任何非天然存在的CKP变体。在某些实施方案中,引入多样性涉及针对环的方案,其中将L1、L2、L3、L4和/或L5中的几个残基(例如,一次约5个、约4-6个或约6-10个残基)随机化。可以鉴定参与结合靶配体的L1、L2、L3、L4和/或L5残基,例如,使用丙氨酸扫描诱变或建模。

[0297] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMLPYWGCGQSFECLAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:215)。

[0298] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMLPYWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:216)。

[0299] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMLPYWGCGRDFECLAKCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:542)。

[0300] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMLPYWGCGRDFECMSDCICQYYQSCG(SEQ ID NO:363)。

[0301] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMLPYWGCGRDFECMSDCICQYYQSCG(SEQ ID NO:364)。

[0302] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMLPYWGCGRDFECMNQCICQYYQSCG(SEQ ID NO:222)。

[0303] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMLPYWGCGRDFECFYECICQYYQSCG(SEQ ID NO:223)。

[0304] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMLPYWGCGRDFECMEQCICQYYQSCG(SEQ ID NO:142)。

[0305] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列

GCNILLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:405)。

[0306] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNILLPYWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:406)。

[0307] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMSPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:407)。

[0308] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMTPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:408)。

[0309] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMQPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:409)。

[0310] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMNPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:410)。

[0311] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMEPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:411)。

[0312] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMDPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:412)。

[0313] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMLPSWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:415)。

[0314] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMLPFWGCGRDFECLSGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:421)。

[0315] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMLPFWGCGRDFECLTGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:422)。

[0316] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMLPFWGCGRDFECLEGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:423)。

[0317] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMLPYWGCGRDFECLAGCLCQYYQSCG(SEQ ID NO:424)。

[0318] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMLPYWGCGRDFECLAGCICQYYQSCG(SEQ ID NO:425)。

[0319] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMLPYWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCS(SEQ ID NO:431)。

[0320] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNILLPYWGCGRDFECMEQCICQYYQSCG(SEQ ID NO:435)。

[0321] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCDVLQPYWGCGPDIDCLSNCICHWYNSCG(SEQ ID NO:386)。

[0322] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNILLPFWGCGRDFECVSQCICQYYQSCG(SEQ ID NO:547)。

[0323] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNILQPFWGCGRDFECVSQCICQYYQSCG(SEQ ID NO:548)。

[0324] 在某些实施方案中,本文提供的非天然存在的结合VEGF-A的CKP的序列中的一个或多个氨基酸被非天然氨基酸置换。在某些实施方案中,所述一个或多个氨基酸被相同的

非天然氨基酸置换。在某些实施方案中,所述一个或多个氨基酸各自被不同的非天然氨基酸置换。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP在L1、L2、L3、L4和/或L5中的任意氨基酸位置处包含非天然氨基酸,参照支架结构I。

[0325] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMLPYWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:216),其中N-末端甘氨酸用C(=O)-氧杂环丁烷-3基加帽。

[0326] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMLPYWGCGRDFECLAXCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:568,其中X是鸟氨酸。

[0327] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列XCNIMLPYWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:361),其中X是N-乙酰甘氨酸。

[0328] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMLPXWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:362),其中X是磺基酪氨酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMLPXWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:362),其中X是3,4-二氟-L-苯丙氨酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMLPXWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:362),其中X是3,4-二氯-L-苯丙氨酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMLPXWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:362),其中X是4-氯-L-苯丙氨酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMLPXWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:362),其中X是3-F,4-Cl-L-苯丙氨酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMLPXWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:362),其中X是2-吡啶酮(NH对位)-L-丙氨酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMLPXWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:362),其中X是吡啶酮(NH间位)-L-丙氨酸。

[0329] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIXLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:218),其中X是正亮氨酸。

[0330] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMLPFXGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:219),其中X是1-萘基丙氨酸。

[0331] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMLPFXGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:219),其中X是2-萘基丙氨酸。

[0332] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列XCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:221),其中X是PEG6-炔丙基甘氨酸。

[0333] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIXLPYWGCGRDFECMSDCICQYYQSCG(SEQ ID NO:365),其中X是正亮氨酸。

[0334] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIXLPFWGCGRDFECMSDCICQYYQSCG(SEQ ID NO:144),其中X是正亮氨酸。

[0335] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIXLPFWGCGRDFECVSQCICQYYQSCG(SEQ ID NO:145),其中X是正亮氨酸。

[0336] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIX_1LPFWGCGRDF-D/E-CVS-N/K/X_2-CICQYYQSCG(SEQ ID NO:540),其中X_1是正亮氨酸并且

X_2是鸟氨酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列

[0337] GCNIXLPFWGCGRDFECVSKCICQYYQSCG(SEQ ID NO:545),其中X是正亮氨酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIX$_1$LPFWGCGRDFECVSX$_2$CICQYYQSCG(SEQ ID NO:546),其中X_1是正亮氨酸并且X_2是鸟氨酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列

[0338] GCNIX$_1$LPFWGCGRDF-N/K/X$_2$-CVS-D/E-CICQYYQSCG(SEQ ID NO:541),其中X_1是正亮氨酸并且X_2是鸟氨酸。

[0339] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIXLPFWGCGRDFKCVS-D/E-CICQYYQSCG(SEQ ID NO:561,此处X是正亮氨酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列CNIXLPFWGCGRDFKCVSDCICQYYQSCG(SEQ ID NO:562,此处X是正亮氨酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列

[0340] CNIXLPFWGCGRDFKCVSECICQYYQSCG(SEQ ID NO:563,此处X是正亮氨酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIX1LPFWGCGRDFX2CVS-D/E-CICQYYQSCG(SEQ ID NO:564,此处X1是正亮氨酸并且X2是鸟氨酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列

[0341] GCNIX1LPFWGCGRDFX2CVSDCICQYYQSCG(SEQ ID NO:565,此处X1是正亮氨酸并且X2是鸟氨酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列

[0342] GCNIX1LPFWGCGRDFX2CVSECICQYYQSCG(SEQ ID NO:566,此处X1是正亮氨酸并且X2是鸟氨酸。

[0343] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIXLPYWGCGRDFECMEQCICQYYQSCG(SEQ ID NO:146),其中X是正亮氨酸。

[0344] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIX1LPYWGCGRDF-D/E-CME-N/K/X2-CICQYYQSCG(SEQ ID NO:538),其中X1是正亮氨酸并且X2是鸟氨酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列

[0345] GCNIXLPYWGCGRDFECMEKCICQYYQSCG(SEQ ID NO:543),其中X是正亮氨酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIX1LPYWGCGRDFECMEX2CICQYYQSCG(SEQ ID NO:544),其中X1是正亮氨酸并且X2是鸟氨酸。

[0346] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIX1LPYWGCGRDF-N/K/X2-CME-D/E-CICQYYQSCG(SEQ ID NO:539),其中X1是正亮氨酸并且X2是鸟氨酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列

[0347] GCNIXLPYWGCGRDFKCME-D/E-CICQYYQSCG(SEQ ID NO:555),其中X是正亮氨酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIXLPYWGCGRDFKCMEDCICQYYQSCG(SEQ ID NO:556),其中X是正亮氨酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列

[0348] GCNIXLPYWGCGRDFKCMEECICQYYQSCG(SEQ ID NO:557),其中X是正亮氨酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIX1LPYWGCGRDFX2CME-D/E-CICQYYQSCG(SEQ ID NO:558),其中X1是正亮氨酸并且X2是鸟氨酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列

[0349] GCNIX1LPYWGCGRDFX2CMEDCICQYYQSCG(SEQ ID NO:559),其中X1是正亮氨酸并且X2是鸟氨酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列

[0350] GCNIX1LPYWGCGRDFX2CMEECICQYYQSCG(SEQ ID NO:560),其中X1是正亮氨酸并且X2是鸟氨酸。

[0351] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCDVX1QPYWGCGPDI-D/E-CLS-N/K/X2-CICHWYNSCG(SEQ ID NO:534),其中X1是正亮氨酸并且X2是鸟氨酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列

[0352] GCDVXQPYWGCGPDIDCLSKCICHWYNSCG(SEQ ID NO:536),其中X是正亮氨酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCDVX1QPYWGCGPDIDCLSX2CICHWYNSCG(SEQ ID NO:537),其中X1是正亮氨酸并且X2是鸟氨酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列

[0353] GCDVX1QPYWGCGPDI-N/K/X2-CLS-D/E-CICHWYNSCG(SEQ ID NO:535),其中X1是正亮氨酸并且X2是鸟氨酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列

[0354] GCDVXQPYWGCGPDIDCLSNCICHWYNSCG(SEQ ID NO:224),其中X是正亮氨酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCDVXQPYWGCGPDIKCLS-D/E-CICHWYNSCG(SEQ ID NO:549),其中X是正亮氨酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列

[0355] GCDVXQPYWGCGPDIKCLSDCICHWYNSCG(SEQ ID NO:550),其中X是正亮氨酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列
GCDVXQPYWGCGPDIKCLSECICHWYNSCG(SEQ ID NO:551),其中X是正亮氨酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列

[0356] GCDVX1QPYWGCGPDIX2CLS-D/E-CICHWYNSCG(SEQ ID NO:552),其中X1是正亮氨酸并且X2是鸟氨酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列

[0357] GCDVX1QPYWGCGPDIX2CLSDCICHWYNSCG(SEQ ID NO:553),其中X1是正亮氨酸并且X2是鸟氨酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列

[0358] GCDVX1QPYWGCGPDIX2CLSECICHWYNSCG(SEQ ID NO:554),其中X1是正亮氨酸并且X2是鸟氨酸。

[0359] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMLXFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:413),其中X是γ-苄基-L-脯氨酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列
GCNIMLXFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:413),其中X是γ-(4-氟-苄基)-L-脯氨酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列

[0360] GCNIMLXFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:413),其中X是4-OH-L-脯氨酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMLXFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:413),其中X是4-氟-L-脯氨酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列

[0361] GCNIMLXFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:413),其中X是4-[4-(三氟甲基)苄基]-L-脯氨酸。

[0362] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMLPYXGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:417),其中X是N-甲基吲哚。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMLPYXGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:417),其中X是N-乙基吲哚。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列

[0363] GCNIMLPYXGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:417),其中X是N-异丙基吲哚。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMLPYXGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG(SEQ IDNO:417),其中X是5-氮杂-吲哚。

[0364] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMLPYWGCGRDXECLAGCVCQYYQSCG(SED ID NO:419),其中X是4-甲基-L-苯丙氨酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列

[0365] GCNIMLPYWGCGRDXECLAGCVCQYYQSCG(SED ID NO:419),其中X是2-萘基-L-丙氨酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMLPYWGCGRDXECLAGCVCQYYQSCG(SED ID NO:419),其中X是2-喹啉基-丙氨酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列

[0366] GCNIMLPYWGCGRDXECLAGCVCQYYQSCG(SED ID NO:419),其中X是4,4'-联苯基-L-丙氨酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMLPYWGCGRDXECLAGCVCQYYQSCG(SED ID NO:419),其中X是3-(3-喹啉基)-L-丙氨酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列

[0367] GCNIMLPYWGCGRDXECLAGCVCQYYQSCG(SED ID NO:419),其中X是3-(2-喹啉基)-L-丙氨酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMLPYWGCGRDXECLAGCVCQYYQSCG(SED ID NO:419),其中X是3-(2-喹喔啉基)-L-丙氨酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMLPYWGCGRDXECLAGCVCQYYQSCG(SED ID NO:419),其中X是4-甲基-2-吡啶基-丙氨酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列

[0368] GCNIMLPYWGCGRDXECLAGCVCQYYQSCG(SED ID NO:419),其中X是4-乙基-2-吡啶基-L-丙氨酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列

[0369] GCNIMLPYWGCGRDXECLAGCVCQYYQSCG(SED ID NO:419),其中X是苯并噻唑-L-丙氨酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMLPYWGCGRDXECLAGCVCQYYQSCG(SED ID NO:419),其中X是苯并噻吩-L-丙氨酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列

[0370] GCNIMLPYWGCGRDXECLAGCVCQYYQSCG(SED ID NO:419),其中X是3-(3-异喹啉基)-L-丙氨酸。

[0371] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMLPYWGCGRDFECXAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:420),其中X是叔丁基-L-丙氨酸(也称为L-新戊基甘氨酸)。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列

[0372] GCNIMLPYWGCGRDFECXAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:420),其中X是3-环丁基-L-丙氨酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMLPYWGCGRDFECXAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:420),其中X是3-环戊基-L-丙氨酸。在某些

实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列

[0373] GCNIMLPYWGCGRDFECXAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:420),其中X是5,5,5-三氟-L-亮氨酸。

[0374] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMLPYWGCGRDFECLAGCXCQYYQSCG(SEQ ID NO:426),其中X是L-叔-亮氨酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMLPYWGCGRDFECLAGCXCQYYQSCG(SEQ ID NO:426),其中X是叔丁基-L-丙氨酸(也称为L-新戊基甘氨酸)。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMLPYWGCGRDFECLAGCXCQYYQSCG(SEQ ID NO:426),其中X是L-环戊基甘氨酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMLPYWGCGRDFECLAGCXCQYYQSCG(SEQ ID NO:426),其中X是3-环戊基-L-丙氨酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列

[0375] GCNIMLPYWGCGRDFECLAGCXCQYYQSCG(SEQ ID NO:426),其中X是L-环丁基-L-甘氨酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMLPYWGCGRDFECLAGCXCQYYQSCG(SEQ ID NO:426),其中X是3-环丁基-L-丙氨酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列

[0376] GCNIMLPYWGCGRDFECLAGCXCQYYQSCG(SEQ ID NO:426),其中X是5,5,5-三氟-L-亮氨酸。

[0377] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMLPYWGCGRDFECLAGCVCQXYQSCG(SEQ ID NO:428),其中X是2-吡啶酮。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMLPYWGCGRDFECLAGCVCQXYQSCG(SEQ ID NO:428),其中X是3,4-羟基-L-苯丙氨酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列

[0378] GCNIMLPYWGCGRDFECLAGCVCQXYQSCG(SEQ ID NO:428),其中X是3,4-氟苯丙氨酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMLPYWGCGRDFECLAGCVCQXYQSCG(SEQ ID NO:428),其中X是3-氟,4-OH-L-苯丙氨酸。

[0379] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMLPYWGCGRDFECLAGCVCQYXQSCG(SEQ ID NO:430),其中X是2-氯-L-酪氨酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列

GCNIMLPYWGCGRDFECLAGCVCQYXQSCG(SEQ ID NO:430),其中X是2-甲基-L-酪氨酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列

[0380] GCNIMLPYWGCGRDFECLAGCVCQYXQSCG(SEQ ID NO:430),其中X是2-乙基-L-酪氨酸或4-(萘-1-酚-)-L-丙氨酸。

[0381] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMLPYWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCX(SEQ ID NO:432),其中X是D-丝氨酸、L-β-高丝氨酸、L-β-丙氨酸、N-α-甲基甘氨酸、其羧基末端转换成丙三醇酯的甘氨酸、其羧基末端转换成乙二醇酯的甘氨酸、其羧基末端转换成氧杂环丁醇酯的甘氨酸、或甘氨酸吗啉酰胺。

[0382] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIXQPYWGCGRDFECMEQCICQYYQSCG(SEQ ID NO:436),其中X是正亮氨酸。

[0383] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIX$_1$LPYW

GCGRDFECX$_2$EQCICQYYQSCG(SEQ ID NO:437)。在某些实施方案中,X$_1$和X$_2$是相同的非天然氨基酸。在某些实施方案中,X$_1$和X$_2$是不同的非天然氨基酸。在某些实施方案中,X$_1$和X$_2$是正亮氨酸。在某些实施方案中,X$_1$是正亮氨酸并且X$_2$是3-环丁基-L-丙氨酸。

[0384] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIXLPYWGCGRDFECLEQCICQYYQSCG(SEQ ID NO:438),其中X是正亮氨酸。

[0385] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIX$_1$LPYWGCGRDFECX$_2$EQCX$_3$CQYYQSCG(SEQ ID NO:439)。在某些实施方案中,X$_1$、X$_2$和/或X$_3$是相同的非天然氨基酸。在某些实施方案中,X$_1$、X$_2$和/或X$_3$不是相同的非天然氨基酸。在某些实施方案中,X$_1$是正亮氨酸,X$_2$是3-环丁基-L-丙氨酸,并且X$_3$是环丁基-L-甘氨酸。在某些实施方案中,X$_1$是正亮氨酸,X$_2$是3-环丁基-L-丙氨酸,并且X$_3$是3-环丁基-L-丙氨酸。在某些实施方案中,X$_1$是正亮氨酸,X$_2$是3-环丁基-L-丙氨酸,并且X$_3$是正亮氨酸。

[0386] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列CNIX$_1$QPYWGCGRDFECX$_2$EQCX$_3$CQYYQSCG(SEQ ID NO:440)。在某些实施方案中,X$_1$、X$_2$和/或X$_3$是相同的非天然氨基酸。在某些实施方案中,X$_1$、X$_2$和/或X$_3$不是相同的非天然氨基酸。在某些实施方案中,X$_1$是正亮氨酸,X$_2$是3-环丁基-L-丙氨酸,并且X$_3$是环丁基-L-甘氨酸。在某些实施方案中,X$_1$是正亮氨酸,X$_2$是3-环丁基-L-丙氨酸,并且X$_3$是3-环丁基-L-丙氨酸。

[0387] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNILLPYWGCGRDFECXEQCICQYYQSCG(SEQ ID NO:441),其中X是3-环丁基-L-丙氨酸或叔丁基-L-丙氨酸(也称为L-新戊基甘氨酸)。

[0388] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNILLPYWGCGRDFECMEQCXCQYYQSCG(SEQ ID NO:442),其中X是环丁基-L-甘氨酸或3-环丁基-L-丙氨酸。

[0389] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列X$_1$CNIX$_2$LPYWGCGRDFECMEQCICQYYQSCX$_3$(SEQ ID NO:443)。在某些实施方案中,X$_1$、X$_2$和/或X$_3$是相同的非天然氨基酸。在某些实施方案中,X$_1$、X$_2$和/或X$_3$不是相同的非天然氨基酸。在某些实施方案中,X$_1$是N-乙酰甘氨酸,X$_2$是正亮氨酸,并且X$_3$是甘氨酰胺。

[0390] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列X$_1$CNILLPYWGCGRDFECMEQCICQYYQSCX$_2$(SEQ ID NO:444)。在某些实施方案中,X$_1$和X$_2$是相同的非天然氨基酸。在某些实施方案中,X$_1$和X$_2$是不同的非天然氨基酸。在某些实施方案中,X$_1$是N-乙酰甘氨酸并且X$_2$是甘氨酰胺。

[0391] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列X$_1$CNILQPYWGCGRDFECMEQCICQYYQSCX$_2$(SEQ ID NO:445)。在某些实施方案中,X$_1$和X$_2$是相同的非天然氨基酸。在某些实施方案中,X$_1$和X$_2$是不同的非天然氨基酸。在某些实施方案中,X$_1$是N-乙酰甘氨酸并且X$_2$是甘氨酰胺。

[0392] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列X$_1$CNILQPYWGCGRDFECLEQCICQYYQSCX$_2$(SEQ ID NO:446)。在某些实施方案中,X$_1$和X$_2$是相同的非天然氨基酸。在某些实施方案中,X$_1$和X$_2$是不同的非天然氨基酸。在某些实施方案中,X$_1$是N-乙酰甘氨酸并且X$_2$是甘氨酰胺。

[0393] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列

GCDVLQPYWGCGPDIDCXSNCICHWYNSCG(SEQ ID NO:447),其中X是3-环丁基-L-丙氨酸或叔丁基-L-丙氨酸(L-新戊基甘氨酸)。

[0394] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCDVLQPYWGCGPDIDCLSNCXCHWYNSCG(SEQ ID NO:448),其中X是环丁基-L-甘氨酸。

[0395] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCDVX$_1$QPYWGCGPDIDCX$_2$SNC2X$_3$CHWYNSCG(SEQ ID NO:449)。在某些实施方案中,X$_1$、X$_2$和/或X$_3$是相同的非天然氨基酸。在某些实施方案中,X$_1$、X$_2$和/或X$_3$不是相同的非天然氨基酸。在某些实施方案中,X$_1$是正亮氨酸、X$_2$是3-环丁基-L-丙氨酸,并且X$_3$是环丁基-L-甘氨酸。在某些实施方案中,X$_1$是正亮氨酸,X$_2$是3-环丁基-L-丙氨酸,并且X$_3$是3-环丁基-L-丙氨酸。

[0396] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCDVLQPYWGCGPDIDCX$_1$SNC2X$_2$CHWYNSCG(SEQ ID NO:450)。在某些实施方案中,X$_1$和X$_2$是相同的非天然氨基酸。在某些实施方案中,X$_1$和X$_2$是不同的非天然氨基酸。在某些实施方案中,X$_1$是3-环丁基-L-丙氨酸,并且X$_2$是环丁基-L-甘氨酸。在某些实施方案中,X$_1$是3-环丁基-L-丙氨酸,并且X$_2$是3-环丁基-L-丙氨酸。

[0397] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列X$_1$CDVLQPYWGCGPDIDCX$_2$SNC2X$_3$CHWYNSCX$_4$(SEQ ID NO:451)。在某些实施方案中,X$_1$、X$_2$、X$_3$和/或X$_4$是相同的非天然氨基酸。在某些实施方案中,X$_1$、X$_2$、X$_3$和/或X$_4$不是相同的非天然氨基酸。在某些实施方案中,X$_1$是N-乙酰甘氨酸,X$_2$是3-环丁基-L-丙氨酸,X$_3$是环丁基-L-甘氨酸,并且X$_4$是甘氨酰胺。在某些实施方案中,X$_1$是乙酰甘氨酸,X$_2$是环丁基-L-丙氨酸,X$_3$是环丁基-L-丙氨酸,并且X$_4$是甘氨酰胺。

[0398] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列X$_1$CDVX$_2$QPYWGCGPDIDCLSNCICHWYNSCX$_3$(SEQ ID NO:452)。在某些实施方案中,X$_1$、X$_2$和/或X$_3$是相同的非天然氨基酸。在某些实施方案中,X$_1$、X$_2$和/或X$_3$不是相同的非天然氨基酸。在某些实施方案中,X$_1$是N-乙酰甘氨酸,X$_2$是正亮氨酸,并且X$_3$是甘氨酰胺。

[0399] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列X$_1$CDVLQPYWGCGPDIDCLSNCICHWYNSCX$_2$(SEQ ID NO:453)。在某些实施方案中,X$_1$和X$_2$是相同的非天然氨基酸。在某些实施方案中,X$_1$和X$_2$是不同的非天然氨基酸。在某些实施方案中,X$_1$是N-乙酰甘氨酸并且X$_2$是甘氨酰胺。

[0400] 在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)的C-末端是经修饰的(诸如加帽的)。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)的N-末端是经修饰的(诸如加帽的)。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)的C-和N-末端是经修饰的(诸如加帽的)。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)的C-末端羧基是酰胺化的。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)的N-末端胺是乙酰化的。在某些实施方案中,结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)的C-末端羧基是酰胺化的并且结合VEGF-A的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)的N-末端胺是乙酰化的。

[0401] 结构特性

[0402] 在某些实施方案中,本文提供的非天然存在的结合VEGF-A的CKP的结构具有不同于WT EETI-II蛋白的二硫键连接,即,不同于WT EETI-II的C1-C4、C2-C5和C3-C6二硫键模

式特征。在某些实施方案中,本文提供的非天然存在的结合VEGF-A的CKP具有C1-C4、C2-C3和C5-C6的二硫键连接。确定例如非天然存在的结合VEGF-A的CKP的二硫键连接的方法包括,例如,通过解出和分析非天然存在的结合VEGF-A的CKP与VEGF-A复合的共晶结构,在部分还原烷基化后经由质谱,或在蛋白水解消化后经由质谱,如Sampoli等人(2000)Proteins Struct Funct Gen.40,168-174等中描述的进行结构计算。

[0403] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP具有至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%或至少约50%的α螺旋含量,包括介于这些数值之间的任何范围。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP的至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个或至少18个氨基酸形成α螺旋。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP具有C1-C4、C2-C3和C5-C6的二硫键连接以及至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%或至少约50%的α螺旋含量,包括介于这些数值之间的任何范围。在某些实施方案中,在部分还原烷基化后经由质谱,或在蛋白水解消化后经由质谱,通过解出和分析非天然存在的结合VEGF-A的CKP与VEGF-A复合的共晶结构,通过例如圆二色性(CD)、旋光色散(ORD)、核磁共振(NMR),确定非天然存在的结合VEGF-A的CKP的α螺旋含量。

[0404] 在某些实施方案中,本文提供的非天然存在的结合VEGF-A的CKP与第二种非天然存在的结合VEGF-A的CKP竞争结合VEGF-A,其中所述第二种非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含:包含氨基酸序列

[0405] NIMLPFWG(SEQ ID NO:33)的L1;包含氨基酸序列KQDSD(SEQ ID NO:93)的L2;包含氨基酸序列LAG的L3;包含氨基酸V的L4,和包含氨基酸序列QYYQS(SEQ ID NO:45)的L5,参照支架结构I。在某些实施方案中,本文提供的非天然存在的结合VEGF-A的CKP与第二种非天然存在的结合VEGF-A的CKP竞争结合VEGF-A,其中所述第二种非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列

[0406] GCNIMLPFWGCKQDSDCLAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:52)。

[0407] 在某些实施方案中,本文提供的非天然存在的结合VEGF-A的CKP结合被第二种非天然存在的结合VEGF-A的CKP结合的相同的VEGF-A上的表位,其中所述第二种非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含:包含氨基酸序列NIMLPFWG(SEQ ID NO:33)的L1;包含氨基酸序列KQDSD(SEQ ID NO:93)的L2;包含氨基酸序列LAG的L3;包含氨基酸V的L4,和包含氨基酸序列QYYQS(SEQ ID NO:45)的L5,参照支架结构I。在某些实施方案中,本文提供的非天然存在的结合VEGF-A的CKP结合被第二种非天然存在的结合VEGF-A的CKP结合的相同的VEGF-A上的表位,其中所述第二种非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMLPFWGCKQDSDCLAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:52)。

[0408] 在某些实施方案中,本文提供的非天然地结合VEGF-A的CKP与第二种非天然存在的结合VEGF-A的CKP竞争结合VEGF-A,其中所述第二种结合VEGF-A的CKP包含:包含氨基酸序列NIMLPFWG(SEQ ID NO:33)的L1;包含氨基酸序列GRDFE(SEQ ID NO:97)的L2;包含氨基酸序列LAG的L3;包含氨基酸V的L4,和包含氨基酸序列QYYQS(SEQ ID NO:45)的L5,参照支架结构I。在某些实施方案中,本文提供的非天然存在的结合VEGF-A的CKP与第二种非天然存在的结合VEGF-A的CKP竞争结合VEGF-A,其中所述第二种非天然存在的结合VEGF-A的CKP

包含氨基酸序列GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:102)。

[0409] 在某些实施方案中,本文提供的非天然存在的结合VEGF-A的CKP结合被第二种非天然存在的结合VEGF-A的CKP结合的相同的VEGF-A上的表位,其中所述第二种非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含:包含氨基酸序列NIMLPFWG(SEQ ID NO:33)的L1;包含氨基酸序列GRDFE(SEQ ID NO:97)的L2;包含氨基酸序列LAG的L3;包含氨基酸V的L4,和包含氨基酸序列QYYQS(SEQ ID NO:45)的L5,参照支架结构I。在某些实施方案中,本文提供的非天然存在的结合VEGF-A的CKP结合被第二种非天然存在的结合VEGF-A的CKP结合的相同的VEGF-A上的表位,其中所述第二种非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:102)。

[0410] 在某些实施方案中,本文提供的非天然存在的结合VEGF-A的CKP与第二种非天然存在的结合VEGF-A的CKP竞争结合VEGF-A,其中所述第二种非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含:包含氨基酸序列

[0411] DVMQPYWG(SEQ ID NO:35)的L1;包含氨基酸序列KQDSD(SEQ ID NO:93)的L2;包含氨基酸序列LAG的L3;包含氨基酸V的L4,和包含氨基酸序列HWYNS(SEQ ID NO:46)的L5,参照支架结构I。在某些实施方案中,本文提供的非天然存在的结合VEGF-A的CKP与第二种非天然存在的结合VEGF-A的CKP竞争结合VEGF-A,其中所述第二种非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列

[0412] GCDVMQPYWGCKQDSDCLAGCVCHWYNSCG(SEQ ID NO:55)。

[0413] 在某些实施方案中,本文提供的非天然存在的结合VEGF-A的CKP结合被第二种非天然存在的结合VEGF-A的CKP结合的相同的VEGF-A上的表位,其中所述第二种非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含:包含氨基酸序列DVMQPYWG(SEQ ID NO:35)的L1;包含氨基酸序列KQDSD(SEQ ID NO:93)的L2;包含氨基酸序列LAG的L3;包含氨基酸V的L4,和包含氨基酸序列HWYNS(SEQ ID NO:46)的L5,参照支架结构I。在某些实施方案中,本文提供的非天然存在的结合VEGF-A的CKP结合被第二种非天然存在的结合VEGF-A的CKP结合的相同的VEGF-A上的表位,其中所述第二种非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCDVMQPYWGCKQDSDCLAGCVCHWYNSCG(SEQ ID NO:55)。

[0414] 在某些实施方案中,本文提供的非天然存在的结合VEGF-A的CKP蛋白与第二种非天然存在的结合VEGF-A的CKP竞争结合VEGF-A,其中所述第二种结合VEGF-A的CKP包含:包含氨基酸序列DVMQPYWG(SEQ ID NO:35)的L1;包含氨基酸序列GPDID(SEQ ID NO:118)的L2;包含氨基酸序列LAG的L3;包含氨基酸V的L4,和包含氨基酸序列

[0415] HWYNS(SEQ ID NO:46)的L5,参照支架结构I。在某些实施方案中,本文提供的非天然存在的结合VEGF-A的CKP与第二种非天然存在的结合VEGF-A的CKP竞争结合VEGF-A,其中所述第二种非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列

[0416] GCDVMQPYWGCGPDIDCLAGCVCHWYNSCG(SEQ ID NO:123)。

[0417] 在某些实施方案中,本文提供的非天然存在的结合VEGF-A的CKP结合被第二种非天然存在的结合VEGF-A的CKP结合的相同的VEGF-A上的表位,其中所述第二种非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含:包含氨基酸序列DVMQPYWG(SEQ ID NO:35)的L1;包含氨基酸序列GPDID(SEQ ID NO:118)的L2;包含氨基酸序列LAG的L3;包含氨基酸V的L4,和包含氨基酸序列HWYNS(SEQ ID NO:46)的L5,参照支架结构I。在某些实施方案中,本文提供的非天然存在

的结合VEGF-A的CKP结合被第二种非天然存在的结合VEGF-A的CKP结合的相同的VEGF-A上的表位,其中所述第二种非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCDVMQPYWGCGPDIDCLAGCVCHWYNSCG(SEQ ID NO:123)。

[0418] 在某些实施方案中,本文提供的非天然存在的结合VEGF-A的CKP结合VEGF-A的表位,所述表位包含选自由以下组成的组的至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个、至少十个或多于十个氨基酸:V14、V15、F17、D19、Y21、Q22、Y25、I46、K48、N62、D63、L66、M81、I83、K84、P85、H86、Q87、G88、Q89、I91、C104、R105和P106。在某些实施方案中,本文提供的非天然存在的结合VEGF-A的CKP结合VEGF-A的表位,所述表位包含K48、N62和D63。在某些实施方案中,本文提供的非天然存在的结合VEGF-A的CKP结合VEGF-A的表位,所述表位包含H86。在某些实施方案中,本文提供的非天然存在的结合VEGF-A的CKP结合VEGF-A的表位,所述表位包含Y21、Y25和P106。在某些实施方案中,本文提供的非天然存在的结合VEGF-A的CKP结合VEGF-A的表位,所述表位包含M81、D19和Q22。在某些实施方案中,本文提供的非天然存在的结合VEGF-A的CKP结合VEGF-A的表位,所述表位包含F17、M81和I91。在某些实施方案中,本文提供的非天然存在的结合VEGF-A的CKP结合VEGF-A的表位,所述表位包含V14、F17、D19、Q22、M81和I91。在某些实施方案中,本文提供的非天然存在的结合VEGF-A的CKP结合VEGF-A的表位,所述表位包含Q22和Y25。

[0419] 在某些实施方案中,本文提供的非天然存在的结合VEGF-A的CKP结合VEGF-A上的表位,所述表位与被抗-VEGF-A抗体G6.31结合的VEGF-A的表位重叠(Fuh等人(2006)J.Biol.Chem.281,6625-6631)。在某些实施方案中,本文提供的非天然存在的结合VEGF-A的CKP结合VEGF-A上的表位,所述表位与被Flt-1结合的VEGF-A的表位重叠。在某些实施方案中,本文提供的非天然存在的结合VEGF-A的CKP结合VEGF-A上的表位,所述表位与被贝伐单抗结合的VEGF-A的表位重叠。

[0420] 功能特性

[0421] 在某些实施方案中,“特异性结合”VEGF-A(诸如人VEGF-A、小鼠VEGF-A和/或大鼠VEGF-A)的非天然存在的CKP具有不超过约1×10^{-7}M、优选不超过约1×10^{-8}且最优选不超过约1×10^{-9}M)的结合亲和力(Kd)值,但是对VEGF-A的同系物或其它生长因子的结合亲和力是其对VEGF-A的结合亲和力的至少约50倍弱、或至少约500倍弱、或至少约1000倍弱。

[0422] 在某些实施方案中,本文提供的非天然存在的结合VEGF-A的CKP与例如非靶蛋白(例如,VEGFA的同系物,诸如VEGF-B、VEGF-C和VEGF-D)或其它生长因子(诸如P1GF、EGF、NGF、IGF和PDGF)的结合程度小于非天然存在的结合VEGF-A的CKP与VEGF-A的结合的约10%,如通过本领域已知的方法诸如ELISA、荧光活化细胞分选(FACS)分析或放射免疫沉淀(RIA)所确定的。可以测量特异性结合,例如,通过相比于对照分子的结合确定分子的结合,所述对照分子通常是不具有结合活性的类似结构的分子。例如,通过与对照分子的竞争可以确定特异性结合,所述对照分子类似于靶标,例如,过量的未标记的靶标。在该情况下,如果标记的靶标与探针的结合被过量的未标记的靶标竞争性地抑制,则指示特异性结合。评价“特异性结合”VEGF-A的非天然存在的CKP的结合的其它方法在实施例中描述。

[0423] 如本文使用的,术语“特异性结合”特定多肽或特定多肽靶标上的表位、或“与”特定多肽或特定多肽靶标上的表位“特异性结合”、或“对”特定多肽或特定多肽靶标上的表位“具有特异性”可以通过例如这样的分子来展现:所述分子对靶标具有至少约10^{-4}M、或者至

少约10^{-5}M、或者至少约10^{-6}M、或者至少约10^{-7}M、或者至少约10^{-8}M、或者至少约10^{-9}M、或者至少约10^{-10}M、或者至少约10^{-11}M、或者至少约10^{-12}M或更大的Kd。在一个实施方案中,术语"特异性结合"是指这样的分子:其中所述分子结合特定多肽或特定多肽上的表位而不实质上结合任何其它多肽或多肽表位。

[0424] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP以约1pM至约500nM的Kd结合VEGF-A。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP以约1pM至约50pM、约50pM至约250pM、约250pM至约500pM、约500pM至750pM、约750pM至约1nM、约1nM至约25nM、约25nM至约50nM、50nM至约100nM、约100nM至约250nM或约250nM至约500nM的Kd结合VEGF-A。

[0425] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP结合人VEGF-A、小鼠VEGF-A和/或大鼠VEGF-A。在某些实施方案中,结合人VEGF-A、小鼠VEGF-A和大鼠VEGF-A的非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含:包含氨基酸序列NIMLPFWG(SEQ ID NO:33)的L1;包含氨基酸序列KQDSD(SEQ ID NO:93)的L2;包含氨基酸序列LAG的L3;包含氨基酸V的L4,和包含氨基酸序列QYYQS(SEQ ID NO:45)的L5,参照支架结构I。在某些实施方案中,结合人VEGF-A、小鼠VEGF-A和大鼠VEGF-A的非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列GCNIMLPFWGCKQDSDCLAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:52)。

[0426] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP结合人VEGF-A、小鼠VEGF-A和大鼠VEGF-A,其包含:包含氨基酸序列

[0427] NIMLPFWG(SEQ ID NO:33)的L1;包含氨基酸序列GRDFE(SEQ ID NO:97)的L2;包含氨基酸序列LAG的L3;包含氨基酸V的L4,和包含氨基酸序列QYYQS(SEQ ID NO:45)的L5,参照支架结构I。在某些实施方案中,结合人VEGF-A、小鼠VEGF-A和大鼠VEGF-A的非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列

[0428] GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG(SEQ ID NO:102)。

[0429] 在某些实施方案中,结合人VEGF-A、小鼠VEGF-A和大鼠VEGF-A的非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含:包含氨基酸序列DVMQPYWG(SEQ ID NO:35)的L1;包含氨基酸序列KQDSD(SEQ ID NO:93)的L2;包含氨基酸序列LAG的L3;包含氨基酸V的L4,和包含氨基酸序列HWYNS(SEQ ID NO:46)的L5,参照支架结构I。在某些实施方案中,结合人VEGF-A、小鼠VEGF-A和大鼠VEGF-A的非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列

[0430] GCDVMQPYWGCKQDSDCLAGCVCHWYNSCG(SEQ ID NO:55)。

[0431] 在某些实施方案中,结合人VEGF-A、小鼠VEGF-A和大鼠VEGF-A的非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含:包含氨基酸序列DVMQPYWG(SEQ ID NO:35)的L1;包含氨基酸序列GPDID(SEQ ID NO:118)的L2;包含氨基酸序列LAG的L3;包含氨基酸V的L4,和包含氨基酸序列HWYNS(SEQ ID NO:46)的L5,参照支架结构I。在某些实施方案中,结合人VEGF-A、小鼠VEGF-A和大鼠VEGF-A的非天然存在的结合VEGF-A的CKP包含氨基酸序列

[0432] GCDVMQPYWGCGPDIDCLAGCVCHWYNSCG(SEQ ID NO:123)。

[0433] 在某些实施方案中,本文描述的非天然存在的结合VEGF-A的CKP具有小于约0.5nM、小于约0.6nM、小于约0.7nM、小于约0.8nM、小于约0.9nM或小于约1.0nM的IC_{50}值,包括介于这些值之间的任何范围。

[0434] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP不抑制胰蛋白酶蛋白酶活性,如肽底物切割测定(例如实施例中描述的肽底物切割测定)。

[0435] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP对胰蛋白酶消化具有抗性。在某些实施方案中,与胰蛋白酶在37℃温育24h之后,约30%或更少、约25%或更少、或约20%或更少的非天然存在的结合VEGF-A的CKP在环2内的Arg13处被切割。

[0436] 还考虑编码本文描述的非天然存在的结合VEGF-A的CKP的核酸分子,包含编码非天然存在的结合VEGF-A的CKP的核酸分子的表达载体,和包含所述核酸分子的细胞。本文还提供通过培养所述细胞、表达非天然存在的结合VEGF-A的CKP并从细胞培养物回收非天然存在的结合VEGF-A的CKP来生产本文描述的非天然存在的结合VEGF-A的CKP的方法。

[0437] 在某些实施方案中,经由体外翻译生产非天然存在的结合VEGF-A的CKP,如本文其它地方所描述的。

[0438] 在某些实施方案中,经由化学肽合成产生非天然存在的结合VEGF-A的CKP,例如通过将化学合成的L1、L2、L3、L4和/或L5肽移植到支架框架(诸如支架结构I)上,或通过化学合成整个非天然存在的结合VEGF-A的CKP。

[0439] 结合人低密度脂蛋白受体(LDL)相关蛋白6(LRP6)的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)

[0440] LDL受体是在受体介导的脂蛋白和蛋白配体的胞吞作用中涉及的跨膜细胞表面蛋白。人LDL受体相关蛋白6(LRP6)(登录号:NM_002336(mRNA)和NP_002327(蛋白);UniProtKB:075581)作为受体起作用,或与Frizzled(Wnt的共受体)一起起作用,并且由此传递规范的Wnt/β-联蛋白信号传导级联(Katoh等人(2007)Clin Cancer Res 13:4042-4045)。通过它与Wnt/β-联蛋白信号传导级联的相互作用,LRP6在细胞分化、增殖和迁移的调节中以及在许多癌症类型的发展中起作用(Li等人(2004)Oncogene23:9129-9135;Tung等人(2012)PLoS ONE 7(5):e36565.

[0441] doi:10.1371/journal.pone.0036565;Liu等人(2010)Proc Natl Acad Sci USA 107:5136-5141)。

[0442] Wnt信号传导参与许多生物学途径。就疾病而言,它与癌症和转移性疾病、骨质疏松症和其它骨代谢和疾病、神经元和神经变性疾病、类风湿性关节炎和其它炎性疾病有关。LRP6的阻断对Wnt信号传导的这种抑制可能具有宽范围的治疗效用。骨丢失是一个严重的医学问题,不仅存在于绝经后骨质疏松症过程中,而且存在于类风湿性关节炎中。在多发性骨髓瘤中和在骨转移中发生骨降解。因此,目的在于强化骨、骨折预防或恢复受损伤的骨的治疗策略具有非常高的重要性(Kawai等人(2011)Nat.Rev.Drug Discov.10,141-156;Mason和Williams(2010)J.Osteoporosis,vol.2010,文章ID 460120,9页;doi:10.4061/2010/460120)。由于它们在抑制新骨形成中的作用,所以Wnt途径抑制剂DKK1和SOST被视作非常有前途的治疗靶标;具有中和SOST的功能的抗体表现出显著的临床前活性(Ominsky等人(2010)J.Bone Miner.Res.25,948-959)且现在处于人临床试验中(Padhi等人(2011)J.Bone Miner.Res.26,19-26)。

[0443] 错误调节的Wnt信号传导涉及从骨质疏松症至癌症的疾病(Clevers(2006)Cell 127:469-80;MacDonald等人2009.Dev Cell 17:9-26;Nusse(2008)Cell Res 18:523-7;Polakis(2007)Curr Opin Genet Dev 17:45-51)。该清单已经被扩展以包括代谢病症(Mani等人(2007)Science 315:1278-82和神经变性(Caricasole等人(2004)J Neurosci 24:6021-7;De Ferrari等人(2007)Proc Natl Acad Sci USA 104:9434-9)。在蛋白腺瘤性

结肠息肉病(APC)的突变(其阻止β-联蛋白水平的有效调节)和结直肠癌之间存在特别清楚的联系(Polakis(2007)Curr Opin Genet Dev 17:45-51)。还应特别注意LRP5和骨体内稳态之间的强遗传关系。LRP5中的功能缺失突变会造成常染色体隐性病症骨质疏松症-假神经胶质瘤综合征(OPPG),其特征在于低骨量、眼部缺陷和骨折倾向(Gong等人(2001)Cell 107:513-23。

[0444] 本文提供结合人低密度脂蛋白受体相关蛋白6(LRP6)的非天然存在的CKP,其中非天然的CKP包含以下胱氨酸支架结构(即,支架结构I):

[0445] $Z_1C_1L1C_2L2C_3L3C_4L4C_5L5C_6Z_2$(I)

[0446] 其中:

[0447] Z_1和Z_2是任意氨基酸;

[0448] L1是环1并且具有选自由以下组成的组的结构:$X_1X_2X_3X_4X_5X_6$、$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7$、$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$、$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9$和$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}$,其中$X_1$-$X_{10}$中的每一个是任意氨基酸;

[0449] L2是环2并且具有结构:$X_1X_2X_3X_4X_5$,其中X_1-X_5中的每一个是任意氨基酸;

[0450] L3是环3并且具有结构:$X_1X_2X_3$,其中X_1-X_3中的每一个是任意氨基酸;

[0451] L4是环4并且具有结构:X_1,其中X_1是任意氨基酸;并且

[0452] L5是环5并且具有结构:$X_1X_2X_3X_4X_5$,其中X_1-X_5中的每一个是任意氨基酸。

[0453] 在某些实施方案中,结合LRP6的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)的Z_1和/或Z_2是G。在某些实施方案中,Z_1和/或Z_2包含多于一个氨基酸。在某些实施方案中,Z_1和/或Z_2包含4个氨基酸。在某些实施方案中,Z_1和/或Z_2包含5个氨基酸。

[0454] 在某些实施方案中,非天然存在的结合LRP6的CKP包含L1,其中X_1是选自R、V、M、A、G、N、S和E的氨基酸;其中X_2是选自T、N、S、G、R和A的氨基酸;其中X_3是选自N、R、H、V、K、S、G、I和Y的氨基酸;其中X_4是选自R、V、N、I、K、S和T的氨基酸;其中X_5是选自V、R、K、I、T、S、L和N的氨基酸;并且其中X_6是选自K、G、A、I、R、N、S和V的氨基酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合LRP6的CKP包含L1,其中X_7是选自G、R、K、E、P和T的氨基酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合LRP6的CKP包含L1,其中X_8是选自G、R、K、Q、A和S的氨基酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合LRP6的CKP包含L1,其中X_9是选自R或G的氨基酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合LRP6的CKP包含L1,其中X_{10}是选自E、W和G的氨基酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合LRP6的CKP包含L5,其中X_1是选自G、S、N、Y、A和R的氨基酸;其中X_2是选自P、G、S、V、E、R、F和D的氨基酸;其中X_3是选自N、G、S、E、P、K、H和R的氨基酸;其中X_4是选自G、R、H、S、Q、V和D的氨基酸;并且其中X_5是选自F、D、N、R、G、Y、S和T的氨基酸。在某些实施方案中,非天然存在的结合LRP6的CKP包含L2,其中X_1是K,X_2是Q,X_3是D,X_4是S,并且X_5是D。在某些实施方案中,非天然存在的结合LRP6的CKP包含L3,其中X_1是L,X_2是A,并且X_3是G。在某些实施方案中,非天然存在的结合LRP6的CKP包含L4,其中X_1是V。

[0455] 在某些实施方案中,非天然存在的结合LRP6的CKP竞争性地抑制竞争分子与人LRP6的结合。在某些实施方案中,所述竞争分子是抗-LRP6抗体。在某些实施方案中,所述竞争分子是第二种非天然存在的结合LRP6的CKP。

[0456] 可以通过竞争性抑制/结合测定鉴定结合靶标上重叠或类似区域的非天然存在的结合LRP6的CKP。这种测定是本领域众所周知的,并且描述于例如S.J.Mather(编)

1996.Current Directions in Radiopharmaceutical Research and Development,169-179,Kluwer Academic Publishers;Zettner(1973)Clin.Chem.19,699-705;Gao(2012)Analytical Methods 4,3718-3723。

[0457] 在某些实施方案中,非天然存在的结合LRP6的CKP结合被第二种非天然存在的结合LRP6的CKP结合的相同的人LRP6表位,所述第二种非天然存在的结合LRP6的CKP包含:包含氨基酸序列

[0458] V/R/N/S/E/G-N/S/G/R-R/V/K/S/N/I/Y-V/N/I/R/S/T-R/K/I/N-G/I/R/K/S/A(SEQ ID NO:185)或

[0459] A/R/M/V/G/S-N/T/S/A-R/N/H-V/R/K-K/V/I-R/K/A/N/S/V-T/G/R/K/P-S/G/R/A(SEQ ID NO:186)或

[0460] R/A/Q-S/A-G/S/N/I-N/K-T/S/L/R-I/R/V-R/E/K-K/Q/A/R-R/G/Q-E/W/G/R(SEQ ID NO:187)的L1;包含氨基酸序列KQDSD(SEQ ID NO:93)的L2;包含氨基酸序列LAG的L3;包含氨基酸V的L4;和包含氨基酸序列G/S/N/Y/A/R-P/G/S/V/E/R/F/D-N/G/S/E/P/K/H/R-G/R/H/S/Q/V/D-F/D/N/R/G/Y/S/T(SEQ ID NO:188)的L5,参照支架结构I。

[0461] 在某些实施方案中,非天然存在的结合LRP6的CKP包含:包含氨基酸序列

[0462] V/R/N/S/E/G-N/S/G/R-R/V/K/S/N/I/Y-V/N/I/R/S/T-R/K/I/N-G/I/R/K/S/A(SEQ ID NO:185)或

[0463] A/R/M/V/G/S-N/T/S/A-R/N/H-V/R/K-K/V/I-R/K/A/N/S/V-T/G/R/K/P-S/G/R/A(SEQ ID NO:186)或R/A-S-G/S/N-N/K-T/S/L-I/R-R/E-K/Q/A-R/G-E/W/G(SEQ ID NO:187)的L1。在某些实施方案中,非天然存在的结合LRP6的CKP还包含:包含氨基酸序列KQDSD(SEQ ID NO:93)的L2。在某些实施方案中,非天然存在的结合LRP6的CKP还包含:包含氨基酸序列LAG的L3。在某些实施方案中,非天然存在的结合LRP6的CKP还包含:包含氨基酸V的L4。在某些实施方案中,非天然存在的结合LRP6的CKP还包含:包含氨基酸序列

[0464] G/S/N/Y/A/R-P/G/S/V/E/R/F/D-N/G/S/E/P/K/H/R-G/R/H/S/Q/V/D-F/D/N/R/G/Y/S/T(SEQ ID NO:188)的L5。

[0465] 在某些实施方案中,非天然存在的结合LRP6的CKP包含本文公开的非天然存在的结合LRP6的CKP中的任一个的L1和/或L5。在某些实施方案中,非天然存在的结合LRP6的CKP包含:包含SEQ ID NO:147-168和367中任一个所示的氨基酸序列的L1,参照支架结构I。在某些实施方案中,非天然存在的结合LRP6的CKP还包含:包含SEQ ID NO:93中所示的氨基酸序列的L2。在某些实施方案中,非天然存在的结合LRP6的CKP还包含:包含氨基酸序列LAG的L3。在某些实施方案中,非天然存在的结合LRP6的CKP还包含:包含氨基酸V的L4。在某些实施方案中,非天然存在的结合LRP6的CKP还包含:包含SEQ ID NO:19和169-184中任一个所示的氨基酸序列的L5。

[0466] 在如下表18中提供以上描述的L1和L5氨基酸序列:

[0467] 表18

[0468]

RTNRVKGG (SEQ ID NO: 147)	GPNGF (SEQ ID NO: 19)
VNRVRG (SEQ ID NO: 148)	SGGRD (SEQ ID NO: 169)
MNHVKARR (SEQ ID NO: 149)	GPNGF (SEQ ID NO: 19)
RSVNKI (SEQ ID NO: 150)	GSSRN (SEQ ID NO: 170)
VNKIKG (SEQ ID NO: 151)	GVEGR (SEQ ID NO: 171)
RNSIKR (SEQ ID NO: 152)	SVGHG (SEQ ID NO: 172)
VSNRVNKG (SEQ ID NO: 153)	GPNGF (SEQ ID NO: 19)
RGNIIK (SEQ ID NO: 154)	NESRG (SEQ ID NO: 173)
RSGNTIRKRE (SEQ ID NO: 155)	GGPGG (SEQ ID NO: 174)
ASSNSIRQGW (SEQ ID NO: 156)	GPKSN (SEQ ID NO: 175)

[0469]

RSNRIR (SEQ ID NO: 157)	YGHGD (SEQ ID NO: 176)
RSNKLREARG (SEQ ID NO: 158)	GSRQD (SEQ ID NO: 177)
VNSVKR (SEQ ID NO: 159)	SRGVN (SEQ ID NO: 178)
GSNKIRPR (SEQ ID NO: 160)	GPNDF (SEQ ID NO: 179)
NRIRNS (SEQ ID NO: 161)	GRGDY (SEQ ID NO: 180)
SRNSIK (SEQ ID NO: 162)	ASGSS (SEQ ID NO: 181)
SNYVKR (SEQ ID NO: 163)	SPGGR (SEQ ID NO: 182)
RANRVSGR (SEQ ID NO: 164)	GPNGF (SEQ ID NO: 19)
SNRVKVRA (SEQ ID NO: 165)	GPNGF (SEQ ID NO: 19)
ENRTKG (SEQ ID NO: 166)	GFRGT (SEQ ID NO: 183)
GNKIRA (SEQ ID NO: 167)	RDRVG (SEQ ID NO: 184)
ANRVKRTS (SEQ ID NO: 168)	GPNGF (SEQ ID NO: 19)
QAINRVKRQR (SEQ ID NO: 367)	
V/R/N/S/E/G-N/S/G/R-R/V/K/S/N/I/Y-V/N/I/R/S/T-R/K/I/N-G/I/R/K/S/A (SEQ ID NO: 185)	A/R/M/V/G/S-N/T/S/A-R/N/H-V/R/K-K/V/I-R/K/A/N/S/V-T/G/R/K/P-S/G/R/A (SEQ ID NO: 186)
R/A-S-G/S/N-N/K-T/S/L-I/R-R/E-K/Q/A-R/G-E/W/G (SEQ ID NO: 187)	G/S/N/Y/A/R-P/G/S/V/E/R/F/D-N/G/S/E/P/K/H/R-G/R/H/S/Q/V/D-F/D/N/R/G/Y/S/T (SEQ ID NO: 188)

[0470] 在某些实施方案中,非天然存在的结合LRP6的CKP包含:包含氨基酸序列RTNRVKGG(SEQ ID NO:147)的L1;包含氨基酸序列KQDSD(SEQ ID NO:93)的L2;包含氨基酸序列LAG的L3;包含氨基酸V的L4;和包含氨基酸序列GPNGF(SEQ ID NO:19)的L5,根据参照支架结构I。

[0471] 在某些实施方案中,非天然存在的结合LRP6的CKP包含:包含氨基酸序列VNRVRG(SEQ ID NO:148)的L1;包含氨基酸序列KQDSD(SEQ ID NO:93)的L2;包含氨基酸序列LAG的L3;包含氨基酸V的L4;和包含氨基酸序列SGGRD(SEQ ID NO:169)的L5,根据参照支架结构I。

[0472] 在某些实施方案中,非天然存在的结合LRP6的CKP包含:包含氨基酸序列MNHVKARR(SEQ ID NO:149)的L1;包含氨基酸序列KQDSD(SEQ ID NO:93)的L2;包含氨基酸序列LAG的L3;包含氨基酸V的L4;和包含氨基酸序列GPNGF(SEQ ID NO:19)的L5,参照支架结构I。

[0473] 在某些实施方案中,非天然存在的结合LRP6的CKP包含:包含氨基酸序列RSVNKI(SEQ ID NO:150)的L1;包含氨基酸序列KQDSD(SEQ ID NO:93)的L2;包含氨基酸序列LAG的L3;包含氨基酸V的L4;和包含氨基酸序列GSSRN(SEQ ID NO:170)的L5,参照支架结构I。

[0474] 在某些实施方案中,非天然存在的结合LRP6的CKP包含:包含氨基酸序列VNKIKG(SEQ ID NO:151)的L1;包含氨基酸序列KQDSD(SEQ ID NO:93)的L2;包含氨基酸序列LAG的L3;包含氨基酸V的L4;和包含氨基酸序列GVEGR(SEQ ID NO:29)的L5,参照支架结构I。

[0475] 在某些实施方案中,非天然存在的结合LRP6的CKP包含:包含氨基酸序列RNSIKR(SEQ ID NO:152)的L1;包含氨基酸序列KQDSD(SEQ ID NO:93)的L2;包含氨基酸序列LAG的L3;包含氨基酸V的L4;和包含氨基酸序列SVGHG(SEQ ID NO:172)的L5,参照支架结构I。

[0476] 在某些实施方案中,非天然存在的结合LRP6的CKP包含:包含氨基酸序列VSNRVNKG(SEQ ID NO:153)的L1;包含氨基酸序列KQDSD(SEQ ID NO:93)的L2;包含氨基酸序列LAG的L3;包含氨基酸V的L4;和包含氨基酸序列GPNGF(SEQ ID NO:19)的L5,参照支架结构I。

[0477] 在某些实施方案中,非天然存在的结合LRP6的CKP包含:包含氨基酸序列RGNIIK(SEQ ID NO:154)的L1;包含氨基酸序列KQDSD(SEQ ID NO:93)的L2;包含氨基酸序列LAG的L3;包含氨基酸V的L4;和包含氨基酸序列NESRG(SEQ ID NO:173)的L5,参照支架结构I。

[0478] 在某些实施方案中,非天然存在的结合LRP6的CKP包含:包含氨基酸序列RSGNTIRKRE(SEQ ID NO:155)的L1;包含氨基酸序列KQDSD(SEQ ID NO:93)的L2;包含氨基酸序列LAG的L3;包含氨基酸V的L4;和包含氨基酸序列GGPGG(SEQ ID NO:174)的L5,参照支架结构I。

[0479] 在某些实施方案中,非天然存在的结合LRP6的CKP包含:包含氨基酸序列ASSNSIRQGW(SEQ ID NO:156)的L1;包含氨基酸序列KQDSD(SEQ ID NO:93)的L2;包含氨基酸序列LAG的L3;包含氨基酸V的L4;和包含氨基酸序列GPKSN(SEQ ID NO:175)的L5,参照支架结构I。

[0480] 在某些实施方案中,非天然存在的结合LRP6的CKP包含:包含氨基酸序列RSNRIR(SEQ ID NO:157)的L1;包含氨基酸序列KQDSD(SEQ ID NO:93)的L2;包含氨基酸序列LAG的L3;包含氨基酸V的L4;和包含氨基酸序列YGHGD(SEQ ID NO:176)的L5,参照支架结构I。

[0481] 在某些实施方案中,非天然存在的结合LRP6的CKP包含:包含氨基酸序列RSNKLREARG(SEQ ID NO:158)的L1;包含氨基酸序列KQDSD(SEQ ID NO:93)的L2;包含氨基酸序列LAG的L3;包含氨基酸V的L4;和包含氨基酸序列GSRQD(SEQ ID NO:177)的L5,参照支

架结构I。

[0482] 在某些实施方案中,非天然存在的结合LRP6的CKP包含:包含氨基酸序列VNSVKR(SEQ ID NO:159)的L1;包含氨基酸序列KQDSD(SEQ ID NO:93)的L2;包含氨基酸序列LAG的L3;包含氨基酸V的L4;和包含氨基酸序列SRGVN(SEQ ID NO:178)的L5,参照支架结构I。

[0483] 在某些实施方案中,非天然存在的结合LRP6的CKP包含:包含氨基酸序列GSNKIRPR(SEQ ID NO:160)的L1;包含氨基酸序列KQDSD(SEQ ID NO:93)的L2;包含氨基酸序列LAG的L3;包含氨基酸V的L4;和包含氨基酸序列GPNDF(SEQ ID NO:179)的L5,参照支架结构I。

[0484] 在某些实施方案中,非天然存在的结合LRP6的CKP包含:包含氨基酸序列NRIRNS(SEQ ID NO:161)的L1;包含氨基酸序列KQDSD(SEQ ID NO:93)的L2;包含氨基酸序列LAG的L3;包含氨基酸V的L4;和包含氨基酸序列GRGDY(SEQ ID NO:180)的L5,参照支架结构I。

[0485] 在某些实施方案中,非天然存在的结合LRP6的CKP包含:包含氨基酸序列SRNSIK(SEQ ID NO:162)的L1;包含氨基酸序列KQDSD(SEQ ID NO:93)的L2;包含氨基酸序列LAG的L3;包含氨基酸V的L4;和包含氨基酸序列ASGSS(SEQ ID NO:181)的L5,参照支架结构I。

[0486] 在某些实施方案中,非天然存在的结合LRP6的CKP包含:包含氨基酸序列SNYVKR(SEQ ID NO:163)的L1;包含氨基酸序列KQDSD(SEQ ID NO:93)的L2;包含氨基酸序列LAG的L3;包含氨基酸V的L4;和包含氨基酸序列SPGGR(SEQ ID NO:182)的L5,参照支架结构I。

[0487] 在某些实施方案中,非天然存在的结合LRP6的CKP包含:包含氨基酸序列RANRVSGR(SEQ ID NO:164)的L1;包含氨基酸序列KQDSD(SEQ ID NO:93)的L2;包含氨基酸序列LAG的L3;包含氨基酸V的L4;和包含氨基酸序列GPNGF(SEQ ID NO:19)的L5,参照支架结构I。

[0488] 在某些实施方案中,非天然存在的结合LRP6的CKP包含:包含氨基酸序列SNRVKVRA(SEQ ID NO:165)的L1;包含氨基酸序列KQDSD(SEQ ID NO:93)的L2;包含氨基酸序列LAG的L3;包含氨基酸V的L4;和包含氨基酸序列GPNGF(SEQ ID NO:19)的L5,参照支架结构I。

[0489] 在某些实施方案中,非天然存在的结合LRP6的CKP包含:包含氨基酸序列ENRTKG(SEQ ID NO:166)的L1;包含氨基酸序列KQDSD(SEQ ID NO:93)的L2;包含氨基酸序列LAG的L3;包含氨基酸V的L4;和包含氨基酸序列GFRGT(SEQ ID NO:183)的L5,根据参照支架结构I。

[0490] 在某些实施方案中,非天然存在的结合LRP6的CKP包含:包含氨基酸序列GNKIRA(SEQ ID NO:167)的L1;包含氨基酸序列KQDSD(SEQ ID NO:93)的L2;包含氨基酸序列LAG的L3;包含氨基酸V的L4;和包含氨基酸序列RDRVG(SEQ ID NO:184)的L5,参照支架结构I。

[0491] 在某些实施方案中,非天然存在的结合LRP6的CKP包含:包含氨基酸序列ANRVKRTS(SEQ ID NO:168)的L1;包含氨基酸序列KQDSD(SEQ ID NO:93)的L2;包含氨基酸序列LAG的L3;包含氨基酸V的L4;和包含氨基酸序列GPNGF(SEQ ID NO:19)的L5,参照支架结构I。

[0492] 在某些实施方案中,非天然存在的结合LRP6的CKP包含:包含氨基酸序列QAINRVKRQR(SEQ ID NO:367)的L1;包含氨基酸序列KQDSD(SEQ ID NO:93)的L2;包含氨基酸序列LAG的L3;包含氨基酸V的L4;和包含氨基酸序列GPNGF(SEQ ID NO:19)的L5,参照支架结构I。

[0493] 在某些实施方案中,非天然存在的结合LRP6的CKP包含SEQ ID NO:189-210和366中任一个所示的氨基酸序列。在下面提供SEQ ID NO:189-210和366。

GCRTNRVKGGCKQDSDCLAGCVCGPNGFCG (SEQ ID NO:189)

[0494] GCVNRVRGCKQDSDCLAGCVCSGGRDCG (SEQ ID NO:190)

GCMNHVKARRCKQDSDCLAGCVCGPNGFCG (SEQ ID NO:191)

GCRSVNKICKQDSDCLAGCVCGSSRNCG (SEQ ID NO:192)

GCVNKIKGCKQDSDCLAGCVCGVEGRCG (SEQ ID NO:193)

GCRNSIKRCKQNSDCLAGCVCSVGHGCG (SEQ ID NO:194)

GCVSNRVNKGCKQDSDCLAGCVCGPNGFCG (SEQ ID NO:195)

GCRGNIIKCKQDSDCLAGCVCNESRGCG (SEQ ID NO:196)

GCRSGNTIRKRECKQDSDCLAGCVCGGPGGCG (SEQ ID NO:197)

GCASSNSIRQGWCKQDSDCLAGCVCGPKSNCG (SEQ ID NO:198)

GCRSNRIRCKQDSDCLAGCVCYGHGDCG (SEQ ID NO:199)

GCRSNKLREARGCKQDSDCLAGCVCGSRQDCG (SEQ ID NO:200)

[0495] GCVNSVKRCKQDSDCLAGCVCSRGVNCG (SEQ ID NO:201)

GCGSNKIRPRCKQDSDCLAGCVCGPNDFCG (SEQ ID NO:202)

GCNRIRNSCKQDSDCLAGCVCGRGDYCG (SEQ ID NO:203)

GCSRNSIKCKQDSDCLAGCVCASGSSCG (SEQ ID NO:204)

GCSNYVKRCKQDSDCLAGCVCSPGGRCG (SEQ ID NO:205)

GCRANRVSGRCKQDSDCLAGCVCGPNGFCG (SEQ ID NO:206)

GCSNRVKVRACKQDSDCLAGCVCGPNGFCG (SEQ ID NO:207)

GCENRTKGCKQDSDCLAGCVCGFRGTCG (SEQ ID NO:208)

GCGNKIRACKQDSDCLAGCVCRDRVGCG (SEQ ID NO:209)

GCANRVKRTSCKQDSDCLAGCVCGPNGFCG (SEQ ID NO:210)

GCQAINRVKRQRCKQDSDCLAGCVCGPNGFCG (SEQ ID NO:366)

[0496] 在某些实施方案中,非天然存在的结合LRP6的CKP是本文描述的非天然存在的结合LRP6的CKP的变体。在某些实施方案中,这种变体包含在SEQ ID NO:19、93、147-168、169-184和189-210中所示的一个或多个序列中和/或在氨基酸序列LAG中的至少1个、至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个或至少10个氨基酸置换。在某些实施方案中,氨基酸置换是保守性氨基酸置换。在某些实施方案中,氨基酸置换不实质上降低非天然存在的结合LRP6的CKP结合人LRP6的能力。例如,可以做出不实质上降低LRP6结合亲和力的保守性改变(例如,如本文中提供的保守性置换)。使用以下实施例中描述的方法,可以评价非天然存在的结合LRP6的CKP的变体的结合亲和力。

[0497] 在上述表17中在“保守性置换”的标题下显示了保守性置换。在表17中在“示例性

置换”的标题下提供了更实质性的变化,并且如下文基于氨基酸侧链类别进一步描述的。可以将氨基酸置换引入到非天然存在的结合LRP6的CKP的变体中并且针对所需活性(例如,保留的/改善的LRP6结合)筛选产物。

[0498] 非保守性置换将需要将这些类别之一的成员交换为另一个类别的成员。示例性的置换变体是亲和力成熟的非天然存在的结合LRP6的CKP,所述CKP可以例如使用基于噬菌体展示的亲和力成熟技术(诸如本文描述的那些)便利地产生。简而言之,改变(即,添加、缺失或置换)L1、L2、L3、L4和/或L5中的一个或多个残基,并且将变体的结合LRP6的CKP在噬菌体上展示并针对LRP6结合亲和力进行筛选。在亲和力成熟的某些实施方案中,通过多种方法(例如,易错PCR、环改组(shuffling)或寡核苷酸定向诱变)中的任一种,将多样性引入到为成熟而选择的可变基因中。随后建立次级文库。随后筛选该文库以鉴定对LRP6具有所需亲和力的任何非天然存在的CKP变体。在某些实施方案中,引入多样性涉及针对环(loop-directed)的方案,其中将L1、L2、L3、L4和/或L5中的几个残基(例如,一次约5个、约4-6个或约6-10个残基)随机化。可以鉴定参与结合靶配体的L1、L2、L3、L4和/或L5残基,例如,使用丙氨酸扫描诱变或建模。

[0499] 在某些实施方案中,非天然存在的CKP“特异性结合”人LRP6(即,具有不超过约1×10^{-7}M、优选不超过约1×10^{-8}且最优选不超过约1×10^{-9}M的结合亲和力(Kd)值),但是对另一种LRP蛋白的结合亲和力是其对LRP6的结合亲和力的至少约50倍弱、或至少约500倍弱、或至少约1000倍弱。

[0500] 在某些实施方案中,非天然存在的结合LRP6的CKP与非靶蛋白(例如,LRP6同系物,诸如LRP1、LRP1B、LRP2、LRP3、LRP4、LRP5、LRP8、LRP10、LRP11和LRP12)的结合程度小于非天然存在的结合LRP6的CKP与人LRP6的结合的约10%,如通过本领域已知的方法诸如ELISA、荧光活化细胞分选(FACS)分析或放射免疫沉淀(RIA)所确定的。可以测量特异性结合,例如,通过相比于对照分子的结合确定分子的结合,所述对照分子通常是不具有结合活性的类似结构的分子。例如,通过与对照分子的竞争可以确定特异性结合,所述对照分子类似于靶标,例如,过量的未标记的靶标。在该情况下,如果标记的靶标与探针的结合被过量的未标记的靶标竞争性地抑制,则指示特异性结合。如本文使用的,术语“特异性结合”特定多肽或特定多肽靶标上的表位、或“与”特定多肽或特定多肽靶标上的表位“特异性结合”、或“对”特定多肽或特定多肽靶标上的表位“具有特异性”可以通过例如这样的分子来展现:所述分子对靶标具有至少约10^{-4}M、或者至少约10^{-5}M、或者至少约10^{-6}M、或者至少约10^{-7}M、或者至少约10^{-8}M、或者至少约10^{-9}M、或者至少约10^{-10}M、或者至少约10^{-11}M、或者至少约10^{-12}M或更大的Kd。在一个实施方案中,术语“特异性结合”是指这样的分子:其中所述分子结合特定多肽或特定多肽上的表位而不实质上结合任何其它多肽或多肽表位。

[0501] 在某些实施方案中,非天然存在的结合LRP6的CKP以约1pM至约500nM的Kd结合人LRP6。在某些实施方案中,特异性结合LRP6的非天然存在的结合LRP6的CKP蛋白以约1pM至约50pM、约50pM至约250pM、约250pM至约500pM、约500pM至750pM、约750pM至约1nM、约1nM至约25nM、约25nM至约50nM、50nM至约100nM、约100nM至约250nM或约250nM至约500nM的Kd结合人LRP6,包括介于这些值之间的任何范围。

[0502] 在某些实施方案中,非天然存在的结合LRP6的CKP抑制Wnt1信号传导,例如如使用在以下实施例中描述的方法所确定的。

[0503] 还考虑编码所述非天然存在的结合LRP6的CKP的核酸分子,包含编码非天然存在的结合LRP6的CKP的核酸分子的表达载体,和包含所述核酸分子的细胞。本文还提供通过培养所述细胞、表达非天然存在的结合LRP6的CKP并从细胞培养物回收非天然存在的结合LRP6的CKP来生产非天然存在的结合LRP6的CKP的方法。

[0504] 在某些实施方案中,经由体外翻译生产非天然存在的结合LRP6的CKP,如本文其它地方所描述的。

[0505] 如本文其它地方所描述的,经由化学肽合成产生非天然存在的结合LRP6的CKP,例如通过将化学合成的L1、L2、L3、L4和/或L5肽移植到EETI-II框架上,或通过化学合成整个非天然存在的结合LRP6的CKP。

[0506] 在某些实施方案中,非天然存在的结合LRP6的CKP在其中涉及过度LRP6活性的疾病或病况的治疗中用作治疗剂。

[0507] 生产方法

[0508] 在某些实施方案中,通过基因工程产生非天然存在的结合VEGF-A的CKP或非天然存在的结合LRP6的CKP。先前已经描述了多种用于诱变的方法(与适当的筛选或选择方法一起)。这样的诱变方法包括,但不限于,例如,易错PCR、环改组或寡核苷酸定向诱变、随机核苷酸插入或在重组之前的其它方法。关于这些方法的其它细节描述在,例如,Abou-Nadler等人(2010)Bioengineered Bugs 1,337-340;Firth等人(2005)Bioinformatics 21,3314-3315;Cirino等人(2003)Methods Mol Biol 231,3-9;Pirakitikulr(2010)Protein Sci 19,2336-2346;Steffens等人(2007)J.Biomol Tech 18,147-149;和其它文献中。因此,在某些实施方案中,提供通过基因工程技术产生的非天然存在的结合VEGF-A的CKP或非天然存在的结合LRP6的CKP。

[0509] 在某些实施方案中,通过体外翻译产生非天然存在的结合VEGF-A的CKP或非天然存在的结合LRP6的CKP。简言之,体外翻译需要将一个或多个蛋白质编码序列克隆到含有启动子的载体中,通过用RNA聚合酶转录克隆的一个或多个序列来生产mRNA,以及通过在体外翻译该mRNA来合成蛋白,例如,使用无细胞的提取物。通过改变克隆的蛋白质编码序列可以简单地产生所需的变体蛋白。可以在麦胚提取物中或在兔网织红细胞裂解物中有效地翻译许多mRNA。关于体外翻译的其它细节描述在,例如,Hope等人(1985)Cell 43,177-188;Hope等人(1986)Cell 46,885-894;Hope等人(1987)EMBO J.6,2781-2784;Hope等人(1988)Nature 333,635-640;和Melton等人(1984)Nucl.Acids Res.12,7057-7070中。

[0510] 因此,提供了编码本文描述的非天然存在的结合VEGF-A的CKP或非天然存在的结合LRP6的CKP的核酸分子。还提供了可操作地连接至核酸分子的表达载体,所述核酸分子编码非天然存在的结合VEGF-A的CKP或非天然存在的结合LRP6的CKP。还提供了宿主细胞(包括,例如,原核宿主细胞诸如大肠杆菌(E.coli),真核宿主细胞诸如酵母细胞、哺乳动物细胞、CHO细胞等),其包含编码非天然存在的结合VEGF-A的CKP或非天然存在的结合LRP6的CKP的核酸。

[0511] 在某些实施方案中,通过体外翻译产生非天然存在的结合VEGF-A的CKP或非天然存在的结合LRP6的CKP。简言之,体外翻译需要将一个或多个蛋白质编码序列克隆到含有启动子的载体中,通过用RNA聚合酶转录克隆的一个或多个序列来生产mRNA,以及通过在体外翻译该mRNA来合成蛋白,例如,使用无细胞的提取物。通过改变克隆的蛋白质编码序列可以

简单地产生所需的突变蛋白。可以在麦胚提取物中或在兔网织红细胞裂解物中有效地翻译许多mRNA。关于体外翻译的其它细节描述在,例如,Hope等人(1985)Cell 43,177-188;Hope等人(1986)Cell 46,885-894;Hope等人(1987)EMBO J.6,2781-2784;Hope等人(1988)Nature 333,635-640;和Melton等人(1984)Nucl.Acids Res.12,7057-7070中。

[0512] 在某些实施方案中,通过化学产生非天然存在的结合VEGF-A的CKP或非天然存在的结合LRP6的CKP。在某些实施方案中,将化学合成的L1、L2、L3、L4和/或L5肽移植到基于EETI-II的框架(诸如支架结构I)上以产生非天然存在的结合VEGF-A的CKP或非天然存在的结合LRP6的CKP。在某些实施方案中,整个非天然存在的结合VEGF-A的CKP或整个非天然存在的结合LRP6的CKP是化学合成的。固相和液相肽合成的方法是本领域众所周知的,并且详细描述在,例如,Methods of Molecular Biology,35,Peptide Synthesis Protocols,(M.W.Pennington和B.M.Dunn编),Springer,1994;Welsch等人(2010)Curr Opin Chem Biol 14,1-15;Methods of Enzymology,289,Solid Phase Peptide Synthesis,(G.B.Fields编),Academic Press,1997;Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins,(P.Lloyd-Williams,F.Albericio和E.Giralt编),CRC Press,1997;Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis,APractical Approach,(W.C.Chan,P.D.White编),Oxford University Press,2000;Solid Phase Synthesis,APractical Guide,(S.F.Kates,F Albericio编),Marcel Dekker,2000;P.Seneci,Solid-Phase Synthesis and Combinatorial Technologies,John Wiley&Sons,2000;Synthesis of Peptides and Peptidomimetics(M.Goodman,总编辑,A.Felix,L.Moroder,C.Tmiolo编),Thieme,2002;N.L.Benoiton,Chemistry of Peptide Synthesis,CRC Press,2005;Methods in Molecular Biology,298,Peptide Synthesis and Applications,(J.Howl编)Humana Press,2005;和Amino Acids,Peptides and Proteins in Organic Chemistry,第3卷,Building Blocks,Catalysts and Coupling Chemistry,(A.B.Hughs编)Wiley-VCH,2011中。

[0513] 包含非天然存在的EETI-II蛋白的嵌合分子

[0514] 如果有利的话,还可以以形成嵌合分子的方式修饰本文描述的非天然存在的CKP(诸如非天然存在的结合VEGF-A的CKP或非天然存在的结合LRP6的CKP),所述嵌合分子包含与另一种异源多肽或氨基酸序列融合(例如,重组地融合)的非天然存在的CKP。在某些实施方案中,这种嵌合分子包含本文描述的非天然存在的CKP(诸如非天然存在的结合VEGF-A的CKP或非天然存在的结合LRP6的CKP)与抗体的融合体以形成例如二价分子或双特异性分子。

[0515] 在某些实施方案中,嵌合分子包含本文描述的非天然存在的CKP(诸如非天然存在的结合VEGF-A的CKP或非天然存在的结合LRP6的CKP)与第二部分(诸如蛋白转导结构域)的融合体,所述第二部分使所述嵌合分子靶向以递送至不同组织,或例如跨越血脑屏障,其中使用例如人免疫缺陷病毒TAT蛋白的蛋白转导结构域(Schwarze等人,1999,Science 285:1569-72)。

[0516] 在某些实施方案中,本文提供的非天然存在的CKP可以以多聚体形式用作双或多特异性的(针对不同的靶配体或相同靶配体上的不同表位)。例如,二聚的双特异性的非天然存在的CKP具有对第一靶蛋白或表位具有特异性的一个亚基和对第二靶蛋白或表位具有

特异性的第二亚基。非天然存在的CKP蛋白亚基可以以多种构象连接,所述构象可以增加效价并从而增加与靶配体的结合的亲合力。

[0517] 在某些实施方案中,本文提供的嵌合分子包含两个或更多个(诸如三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或超过十个)非天然存在的CKP蛋白。在某些实施方案中,可以将核酸工程改造成编码单个非天然存在的CKP的两个或更多个拷贝,所述拷贝串联地转录和翻译以产生相同亚基的共价连接的多聚体。在某些实施方案中,可以将核酸工程改造成编码两个或更多个不同的非天然存在的CKP,所述拷贝串联地转录和翻译以产生不同亚基的共价连接的多聚体,所述不同亚基结合例如单个靶配体的不同表位或例如不同靶配体。

[0518] 在另一个实施方案中,这种嵌合分子包含本文描述的非天然存在的CKP(诸如非天然存在的结合VEGF-A的CKP或非天然存在的结合LRP6的CKP)与标签多肽的融合体,所述标签多肽提供抗-标签抗体可以选择性地结合的表位。所述表位标签通常位于非天然存在的CKP的氨基-或羧基-末端。使用针对标签多肽的抗体,可以检测非天然存在的CKP蛋白的这种表位标记的形式的存在。并且,所述表位标签的提供使得非天然存在的CKP通过亲和纯化容易地纯化,所述亲和纯化使用抗-标签抗体或另一类结合表位标签的亲和基质。多种标签多肽和它们各自的抗体是本领域已知的。实例包括:聚-组氨酸(聚-His)或聚-组氨酸-甘氨酸(聚-His-Gly)标签;流感HA标签多肽和它的抗体12CA5(Field等人(1988)Mol.Cell.Biol.8,2159-2165);c-myc标签和针对它们的8F9、3C7、6E10、G4、B7和9E10抗体(Evan等人(1985)Mol.Cell.Biol.5,3610-3616];和单纯疱疹病毒糖蛋白D(gD)标签和它的抗体(Paborsky等人(1990)Protein Eng.,3,547-553)。其它标签多肽包括Flag-肽(Hopp等人(1988)BioTechnology,6,1204-1210);KT3表位肽(Martin等人(1992)Science,255,192-194];α-微管蛋白表位肽(Skinner等人(1991)J.Biol.Chem.266,15163-15166);和T7基因10蛋白肽标签(Lutz-Freyermuth等人(1990)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87,6393-6397]。

[0519] 在某些实施方案中,所述嵌合分子可以包含本文描述的非天然存在的CKP蛋白(诸如非天然存在的结合VEGF-A的CKP或非天然存在的结合LRP6的CKP)与免疫球蛋白或免疫球蛋白的特定区域的融合体。对于二价形式的嵌合分子(例如,“免疫粘附素”),这种融合体可以针对IgG分子的Fc区。本文提供的Ig融合体包括在Ig分子内的至少一个可变区的地方包含人的约或仅残基94-243、残基33-53或残基33-52的多肽。在特别优选的实施方案中,所述免疫球蛋白融合体包括IgG1分子的铰链、CH2和CH3、或者铰链、CH1、CH2和CH3区域。关于免疫球蛋白融合体的生产,也参见,1995年6月27日授权的美国专利号5,428,130。在某些实施方案中,本文描述的非天然存在的CKP(诸如非天然存在的结合VEGF-A的CKP或非天然存在的结合LRP6的CKP)例如在N或C末端处与IgG的恒定区(Fc)融合。在某些实施方案中,非天然存在的CKP/Fc融合分子活化免疫应答的补体组分。在某些实施方案中,非天然存在的CKP/Fc融合蛋白增加非天然存在的CKP的治疗价值。在某些实施方案中,本文描述的非天然存在的CKP蛋白(诸如非天然存在的结合VEGF-A的CKP或非天然存在的结合LRP6的CKP)例如在N或C末端处与补体蛋白(诸如Clq)融合(诸如重组地融合)。多种出版物描述了获得非天然存在的蛋白的方法,其半衰期如下改变:通过将FcRn结合多肽引入所述分子中(WO 1997/43316,US 5869046,US 5747035,WO 1996/32478,WO 1991/14438),或通过使所述蛋白与抗体融合,所述抗体的FcRn结合亲合力被保留,但是对其它Fc受体的亲和力已经极大地减小

(WO 1999/43713),或与抗体的FcRn结合结构域融合(WO 2000/09560,US 4703039)。在US 7083784中也可以找到增加生理学上有活性的分子(例如,非天然存在的CKP)的半衰期的具体技术和方法。在某些实施方案中,本文提供的非天然存在的CKP蛋白(诸如非天然存在的结合VEGF-A的CKP或非天然存在的结合LRP6的CKP)与包含以下氨基酸残基突变(按照Kabat中的EU索引编号)的来自IgG的Fc区融合:M252Y/S254T/T256E或H433K/N434F/Y436H。

[0520] 在某些实施方案中,本文描述的非天然存在的CKP蛋白(诸如非天然存在的结合VEGF-A的CKP或非天然存在的结合LRP6的CKP)与增加或延长体内或血清半衰期的分子融合。在某些实施方案中,本文描述的非天然存在的CKP(诸如非天然存在的结合VEGF-A的CKP或非天然存在的结合LRP6的CKP)与白蛋白(诸如人血清白蛋白(HSA))、聚乙二醇(PEG)、多糖、免疫球蛋白分子(IgG)、补体、血红蛋白、结合肽、脂蛋白或其它因子融合以增加它在血流中的半衰期和/或它的组织穿透。

[0521] 通过基因改组、基序改组、外显子改组和/或密码子改组(被统称为“DNA改组”)的技术,可以产生包含非天然存在的结合VEGF-A的CKP或非天然存在的结合LRP6的CKP的另外嵌合分子。可以采用DNA改组来改变非天然存在的CKP的活性(例如,具有较高亲和力和较低解离速率的非天然存在的CKP)。通常,参见,US 5605793,US5811238,US 5830721,US 5834252,US 5837458,Patten等人(1997)Curr.Opinion Biotechnol.8,724-33;Harayama (1998)Trends Biotechnol.16,76-82;Hansson等人,(1999)J.Mol.Biol.287,265-76;和Lorenzo和Blasco,(1998)Biotechniques 24,308-313。

[0522] 在某些实施方案中,通过易错PCR、随机核苷酸插入或在重组之前的其它方法进行随机诱变,改变本文提供的非天然存在的结合VEGF-A的CKP或非天然存在的结合LRP6的CKP。可以使编码结合特定靶标的支架的多核苷酸的一个或多个部分与一种或多种异源分子的一个或多个组分、基序、段、部分、结构域、片段等重组。

[0523] 通过标准技术,例如,通过由使用公众可获得的基因序列构建的重组融合基因表达融合蛋白或通过化学肽合成,可以产生这些融合体中的任一种。

[0524] 包含非天然存在的结合VEGF-A的CKP或非天然存在的结合LRP6的CKP的缀合物。

[0525] 本文提供了免疫缀合物,其包含与细胞毒性剂诸如化学治疗剂、毒素(例如,细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素,或其片段)或放射性同位素(即,放射性缀合物)缀合的本文描述的非天然存在的CKP(诸如非天然存在的结合VEGF-A的CKP或非天然存在的结合LRP6的CKP)。

[0526] 可以使用的酶活性毒素及其片段包括白喉A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素A链(来自铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa))、蓖麻毒蛋白(ricin)A链、相思豆毒蛋白(abrin)A链、蒴莲根毒蛋白(modeccin)A链、α-帚曲霉素(alpha-sarcin)、油桐(Aleurites fordii)蛋白、香石竹毒蛋白(dianthin)蛋白、美洲商陆(Phytolaca americana)蛋白(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜(Momordica charantia)抑制剂、麻疯树毒蛋白(curcin)、巴豆毒蛋白(crotin)、肥皂草(Saponaria officinalis)抑制剂、多花白树毒蛋白(gelonin)、丝林霉素(mitogellin)、局限曲菌素(restrictocin)、酚霉素(phenomycin)、依诺霉素(enomycin)和单端孢霉烯(tricothecenes)。其它毒素包括美坦生(maytansine)和美坦生类化合物(maytansinoids)、加利车霉素(calicheamicin)和其它细胞毒性剂。多种放射性核素可用于生产放射性缀合的非天然存在的CKP。实例包括^{212}Bi、

^{131}I、^{131}In、^{90}Y和^{186}Re。

[0527] 使用多种双功能的蛋白偶联剂制备本文描述的非天然存在的CKP(诸如非天然存在的结合VEGF-A的CKP或非天然存在的结合LRP6的CKP)与例如细胞毒性剂的缀合物,所述蛋白偶联剂诸如N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫醇)丙酸酯(SPDP)、亚氨基硫杂环戊烷(iminothiolane)(IT)、亚氨酸酯的双功能衍生物(诸如已二亚氨酸二甲酯HCl)、活性酯(诸如辛二酸二琥珀酰亚胺基酯)、醛(诸如戊二醛)、二-叠氮基化合物(诸如二(对-叠氮基苯甲酰基)已二胺)、二重氮鎓衍生物(诸如二-(对-重氮鎓苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(诸如2,6-二异氰酸亚甲苯基酯)和双活性的氟化合物(诸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如,如在Vitetta等人,Science,238:1098(1987)中所描述的制备蓖麻毒蛋白免疫毒素。碳-14-标记的1-异硫氰酰基苄基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)是用于将放射性核素缀合至本文提供的非天然存在的CKP的示例性螯合剂。参见WO94/11026。

[0528] 在另一个实施方案中,可以将本文描述的非天然存在的CKP(诸如非天然存在的结合VEGF-A的CKP或非天然存在的结合LRP6的CKP)缀合至用于在眼部“预靶向(pre-targeting)”中使用的“受体”(诸如链霉抗生物素蛋白(链霉抗生物素蛋白)),其中将非天然存在的EETI-II支架蛋白-受体缀合物施用至眼部患者,随后使用清除剂从循环中除去未结合的缀合物,然后施用与细胞毒性剂(例如,放射性核素)或治疗剂缀合的“配体”(例如,抗生物素蛋白)。

[0529] 在某些实施方案中,本文提供的非天然存在的CKP(诸如非天然存在的结合VEGF-A的CKP或非天然存在的结合LRP6的CKP)可以以多聚体形式用作双或多特异性的(针对不同的靶配体或相同靶配体上的不同表位)。连接可以是共价的或非共价的。例如,二聚的双特异性的非天然存在的CKP具有对第一靶蛋白或表位具有特异性的一个亚基和对第二靶蛋白或表位具有特异性的第二亚基。非天然存在的CKP亚基可以以多种构象连接,所述构象可以增加效价并从而增加与靶配体的结合的亲合力或结合多个靶配体。

[0530] 在某些实施方案中,将本文提供的非天然存在的CKP工程改造成提供用于缀合的反应基团。在某些实施方案中,N-末端和/或C-末端也可以用于提供用于缀合的反应基团。在某些实施方案中,将N-末端缀合至一个部分(例如,但不限于PEG),而将C-端缀合至另一个部分(例如,但不限于生物素),或反之亦然。

[0531] 提供与一个或多个部分缀合的本文描述的非天然存在的CKP(诸如非天然存在的结合VEGF-A的CKP或非天然存在的结合LRP6的CKP),所述部分包括但不限于,肽、多肽、蛋白质、融合蛋白、核酸分子、小分子、模拟剂、合成药物、无机分子和有机分子。还提供与异源蛋白或多肽(或其片段,与至少10个、至少20个、至少30个、至少40个、至少50个、至少60个、至少70个、至少80个、至少90个或至少100个氨基酸的多肽)化学缀合(包括共价和非共价缀合二者)的本文描述的非天然存在的CKP(诸如非天然存在的结合VEGF-A的CKP或非天然存在的结合LRP6的CKP)的用途。所述融合不一定需要是直接的,而是可以通过本文描述的接头序列发生。

[0532] 在某些实施方案中,本文描述的非天然存在的CKP(诸如非天然存在的结合VEGF-A的CKP或非天然存在的结合LRP6的CKP)或其类似物或衍生物可以缀合至诊断或可检测试剂。这种非天然存在的CKP缀合物可以用于监测或预测疾病的发展或进展作为临床试验操作的一部分,诸如确定特定疗法的效力。这样的诊断和检测可以通过将非天然存在的CKP与

可检测的物质偶联来完成,所述可检测的物质包括但不限于:各种酶,诸如但不限于辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;辅基,诸如但不限于链霉抗生物素蛋白生物素和抗生物素蛋白/生物素;荧光物质,诸如但不限于伞形酮、荧光素、荧光素异硫氰酸酯、罗丹明、二氯三嗪基胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白;发光材料,诸如但不限于鲁米诺;生物发光材料,诸如但不限于萤光素酶、萤光素和水母发光蛋白(aequorin);放射性物质,诸如但不限于碘(^{131}I、^{125}I、^{123}I、^{121}I)、碳(^{14}C)、硫(^{35}S)、氚(^{3}H)、铟(^{115}In、^{113}In、^{112}In、^{111}In)和锝(^{99}Tc)、铊(^{201}Ti)、镓(^{68}Ga,^{67}Ga)、钯(^{103}Pd)、钼(^{99}Mo)、氙(^{133}Xe)、氟(^{18}F)、^{153}Sm、^{177}Lu、^{159}Gd、^{149}Pm、^{140}La、^{175}Yb、^{166}Ho、^{90}Y、^{47}Sc、^{186}Re、^{188}Re、^{142}Pr、^{105}Rh、^{97}Ru、^{68}Ge、^{57}Co、^{65}Zn、^{85}Sr、^{32}P、^{153}Gd、^{169}Yb、^{51}Cr、^{54}Mn、^{75}Se、^{113}Sn和^{117}Tn;使用各种正电子发射体层摄影术的发射正电子的金属,非放射性的顺磁金属离子,和放射性标记的或缀合至特定放射性同位素的分子。

[0533] 还提供与治疗部分缀合的非天然存在的CKP(诸如非天然存在的结合VEGF-A的CKP或非天然存在的结合LRP6的CKP)。在某些实施方案中,非天然存在的CKP可以缀合至治疗部分诸如细胞毒素,例如,细胞生长抑制的或杀细胞的试剂,治疗剂或放射性的金属离子,例如,α-发射物。细胞毒素或细胞毒性剂包括对细胞有害的任何试剂。

[0534] 在某些实施方案中,将本文描述的非天然存在的CKP(诸如非天然存在的结合VEGF-A的CKP或非天然存在的结合LRP6的CKP缀合至治疗部分,诸如放射性的金属离子诸如α-发射物(诸如^{213}Bi)或者可用于将射电金属离子(包括但不限于,^{131}In、^{131}Lu、^{131}Y、^{131}Ho、^{131}Sm)缀合至多肽的大环螯合剂。在某些实施方案中,所述大环螯合剂是1,4,7,10-四氮杂环十二烷-N,N',N",N"'-四-乙酸(DOTA),其可以通过接头分子连接至非天然存在的CKP。这样的接头分子通常是本领域已知的,并且描述于,例如,Denardo等人(1998)Clin Cancer Res.4,2483-90;Peterson等人(1999)Bioconjug.Chem.10,553-557;和Zimmerman等人(1999)Nucl.Med.Biol.26,943-50。

[0535] 用于将治疗部分缀合至抗体的技术是众所周知的,并且可以应用于本文公开的非天然存在的CKP,参见,例如,Amon等人,"Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy,"Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy,Reisfeld等人(编),pp.243-56.(Alan R.Liss,Inc.1985);Hellstrom等人,"Antibodies For Drug Delivery",Controlled Drug Delivery(第2版),Robinson等人(编),pp.623-53(Marcel Dekker,Inc.1987);Thorpe,"Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy:AReview",Monoclonal Antibodies 84:Biological And Clinical Applications,Pinchera等人(编),pp.475-506(1985);"Analysis,Results,And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radio labeled Antibody In Cancer Therapy",Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy,Baldwin等人(编),pp.303-16(Academic Press 1985),和Thorpe等人,1982,Immunol.Rev.62:119-58。类似的方案可以适合与本文提供的非天然存在的CKP一起使用。

[0536] 应当选择与本文描述的非天然存在的CKP(诸如非天然存在的结合VEGF-A的CKP或非天然存在的结合LRP6的CKP)缀合的治疗部分或药物以实现针对受试者中的特定病症的所需的预防或治疗效果。当决定将哪种治疗部分或药物缀合至支架时,临床医师或其它医护人员应当考虑以下方面:疾病的性质,疾病的严重程度,和受试者的状况。

[0537] 在某些实施方案中,还可以将本文描述的非天然存在的CKP(诸如非天然存在的结合VEGF-A的CKP或非天然存在的结合LRP6的CKP)连接至固体支持物,所述固体支持物对于靶抗原的免疫测定或纯化而言是特别有用的。这样的固体支持物包括,但不限于,玻璃、纤维素、聚丙烯酰胺、尼龙、聚苯乙烯、聚氯乙烯或聚丙烯。

[0538] 共价修饰

[0539] 还考虑本文描述的非天然存在的CKP(诸如非天然存在的结合VEGF-A的CKP或非天然存在的结合LRP6的CKP)的共价修饰。一类共价修饰包括使非天然存在的CKP的靶向氨基酸残基与有机衍生化试剂反应,所述有机衍生化试剂能够与非天然存在的CKP的选定侧链或N-或C-末端残基反应。使用双功能试剂的衍生化可用于例如将非天然存在的CKP与在纯化靶配体的方法中使用的不溶于水的支持物基质或表面交联,且反之亦然。常用的交联剂包括,例如,1,1-双(重氮基乙酰基)-2-苯乙烷、戊二醛、N-羟基琥珀酰亚胺酯(例如,与4-叠氮基水杨酸形成的酯)、同双功能的亚氨酸酯(包括二琥珀酰亚胺基酯诸如3,3'-二硫代双(琥珀酰亚胺基-丙酸酯))、双功能的马来酰亚胺诸如二-N-马来酰亚胺基-1,8-辛烷和试剂诸如甲基-3-[(对-叠氮基苯基)-二硫代]丙亚氨酸酯(propioimidate)。

[0540] 其它修饰包括谷氨酰胺酰基和天冬酰胺酰基残基分别脱酰胺化成为对应的谷氨酰基和天冬氨酰基残基,脯氨酸和赖氨酸的羟基化,丝氨酰基或苏氨酰基残基的羟基的磷酸化,赖氨酸、精氨酸和组氨酸侧链的α-氨基的甲基化(T.E.Creighton,Proteins:Structure and Molecular Properties,W.H.Freeman&Co.,San Francisco,pp.79-86(1983)),N-末端胺的乙酰化,和任何C-末端羧基的酰胺化。

[0541] 非天然存在的CKP的另一类共价修饰包括,以在US 4640835、US4496689、US 4301144、US 4670417、US 4791192或US 4179337中阐述的方式,将非天然存在的CKP连接至多种非蛋白性的聚合物(例如,聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇或聚氧化烯)之一。

[0542] 术语"聚乙二醇"或"PEG"意指聚乙二醇化合物或其衍生物,具有或没有偶联剂、偶联或活化部分(例如,具有硫醇、三氟甲基磺酸酯(triflate)、三氟乙基磺酸酯(tresylate)、氮丙啶、氧杂环丙烷、N-羟基琥珀酰亚胺或马来酰亚胺部分)。术语"PEG"旨在表示500至150,000Da的分子量的聚乙二醇,包括其类似物,其中例如末端OR-基团已经被甲氧基替代(被称作mPEG)。

[0543] 在某些实施方案中,本文描述的非天然存在的CKP(诸如非天然存在的结合VEGF-A的CKP或非天然存在的结合LRP6的CKP)用聚乙二醇(PEG)衍生化。PEG是具有两个末端羟基的环氧乙烷重复单元的直链水溶性聚合物。PEG按照它们的分子量分类,所述分子量通常在约500道尔顿至约40,000道尔顿的范围内。在目前优选的实施方案中,采用的PEG具有在5,000道尔顿至约20,000道尔顿的范围内的分子量。与本文中提供的非天然存在的CKP偶联的PEG可以是分支的或未分支的(例如,Monfardini,C.等人1995Bioconjugate Chem 6:62-69)。PEG可商购得自Nektar Inc.,Sigma Chemical Co.和其它公司。这样的PEG包括,但不限于,单甲氧基聚乙二醇(MePEG-OH)、单甲氧基聚乙二醇-琥珀酸酯(MePEG-S)、单甲氧基聚乙二醇-琥珀酰亚胺基琥珀酸酯(MePEG-S-NHS)、单甲氧基聚乙二醇-胺(MePEG-NH2)、单甲氧基聚乙二醇-三氟乙基磺酸酯(MePEG-TRES)和单甲氧基聚乙二醇-咪唑基-羰基(MePEG-IM)。

[0544] 在某些实施方案中,采用的亲水聚合物(例如,PEG)在一端用非反应性基团(诸如

甲氧基或乙氧基)加帽。此后,通过与合适的活化剂诸如氰尿酰卤化物(例如,氰尿酰氯、氰尿酰溴或氰尿酰氟)、二咪唑(diimadozle)、酸酐试剂(例如,二卤代琥珀酸酐,诸如二溴琥珀酸酐)、酰叠氮、对-重氮鎓苄基醚、3-(对-重氮鎓苯氧基)-2-羟丙基醚)等反应,在另一端将聚合物活化。然后使活化的聚合物与本文中的非天然存在的CKP(诸如非天然存在的结合VEGF-A的CKP或非天然存在的结合LRP6的CKP)反应以生产被聚合物衍生化的非天然存在的CKP。可替换地,可以活化本文提供的非天然存在的CKP中的官能团用于与聚合物反应,或可以使用已知的偶联方法在计划的(concerted)偶联反应中连接两个基团。容易理解,使用本领域技术人员已知的和使用的许多其它反应方案,可以用PEG衍生化本文中提供的非天然存在的CKP。

[0545] 脂质体

[0546] 还可以将本文公开的非天然存在的CKP(诸如非天然存在的结合VEGF-A的CKP或非天然存在的结合LRP6的CKP)配制为脂质体。通过本领域已知的方法,诸如在Epstein等人,Proc Natl Acad Sci USA,82:3688(1985);Hwang等人,Proc Natl Acad Sci USA,77:4030(1980);和美国专利号4,485,045和4,544,545中描述的方法,制备含有本文描述的非天然存在的EETI-II支架蛋白的脂质体。在美国专利号5,013,556中公开了具有增加的循环时间的脂质体。

[0547] 通过反相蒸发方法用包含磷脂酰胆碱、胆固醇和PEG-衍生化的磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)的脂质组合物可以产生特别有用的脂质体。将脂质体穿过确定孔径的过滤器挤出以产生具有所需直径的脂质体。在脂质体中还任选地含有第二治疗剂。参见Gabizon等人,J.National Cancer Inst.,81(19):1484(1989)。包含结合人血管内皮生长因子A(VEGF-A)的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)的药物组合物和制剂。

[0548] 在某些实施方案中,本文提供包含非天然存在的结合VEGF-A的CKP和药学上可接受的赋形剂的药物组合物。在某些实施方案中,组合物还可以含有缓冲剂、载体、稳定剂、防腐剂和/或填充剂(bulking agent),以使组合物适用于眼部施用至患者以实现所需效果或结果。在某些实施方案中,药物组合物包含一种或多种渗透增强剂,其允许非天然存在的结合VEGF-A的CKP穿透角膜。这种渗透增强剂的实例包括,例如,表面活性剂、胆汁酸、螯合剂、防腐剂、环糊精(即,与亲脂性药物形成复合物的具有亲水性外表面和亲脂性内表面的圆柱形寡核苷酸)等。这种渗透增强剂增加化学稳定性和生物利用度并减少局部刺激。在某些实施方案中,本文提供的药物组合物另外包含增加非天然存在的结合VEGF-A的CKP在各种眼部隔室中的吸收和分布的药剂。在某些实施方案中,本文提供的药物组合物包含交联聚丙烯酸,借助于其粘膜粘附性质可以提高眼部生物利用度。在某些实施方案中,本文提供的药物组合物包含生物粘附性聚合物。

[0549] 在某些实施方案中,将本文提供的药物组合物配制为原位胶凝系统,例如当组合物接触泪液时由于特定物理化学参数(粒子强度、温度、pH或溶剂交换)的变化而在眼表面上展现溶胶至凝胶相转移的基于粘性聚合物的液体。在某些实施方案中,将本文提供的药物组合物配制为眼喷雾剂。在某些实施方案中,将提供的药物组合物配制为脂质体。在某些实施方案中,将本文提供的药物组合物配制为泡囊(niosomes)(即,含有例如胆固醇作为赋形剂的基于非离子表面活性剂的囊泡)。在某些实施方案中,将本文提供的药物组合物配制为药质体(即,由两亲性药物形成的囊泡)。在某些实施方案中,将本文提供的药物组合物配

制为微乳剂。关于各种眼部药物制剂的其它细节提供于,例如,Gaikwad等人(2013)Indo Amer J Pharm Res.3,3216-3232;Achouri等人(2012)Drug Dev Indust Pharm.39,1599-1617;Lu(2010)Recent Pat Drug Deliv Formul.4,49-57;Baranowski等人(2014)Sci World J.doi.org/10.1155/2014/861904;Lang(1995)Adv Drug Deliv Rev.16,39-43;Short(2008)Toxicologic Path.36,49-62;和其它文献中。

[0550] 在某些实施方案中,包含本文描述的非天然存在的结合VEGF-A的CKP的药物组合物在室温下(诸如在约20-25℃下)可稳定约0.5周、约1.0周、约1.5周、约2.0周、约2.5周、3.5周、约4.0周、约1个月、约2个月、约3个月、约4个月、约5个月、约6个月或多于6个月,包含介于这些值之间的任何范围。在某些实施方案中,包含本文描述的非天然存在的结合VEGF-A的CKP的药物组合物在加速条件下(诸如在约37℃下储存)可稳定约0.5周、约1.0周、约1.5周、约2.0周、约2.5周、3.5周、约4.0周、约1个月、约2个月、约3个月、约4个月、约5个月、约6个月或多于6个月,包含介于这些值之间的任何范围。

[0551] 使用结合血管内皮生长因子A(VEGF-A)的非天然存在的胱氨酸结肽(CKP)的治疗方法

[0552] 血管内皮生长因子(VEGF-A),即一种约40kDa的二聚糖蛋白,是有效的内皮细胞分裂素,其刺激增殖、迁移和管形成,引起新血管的血管生成生长和血管通透性增加。视网膜和角膜中的低氧条件诱导血管内皮生长因子(VEGF-A)的表达,并且渗漏的血管的异常的(诸如过度的或在其它方面不适当的)生长促成若干衰竭性(debilitating)眼部疾病的病理,所述眼部疾病包括例如糖尿病性失明、视网膜病、原发性糖尿病性视网膜病、年龄相关的黄斑变性(AMD)、增生性糖尿病性视网膜病(PDR)、早产儿视网膜病(ROP)、脉络膜新生血管形成(CNV),糖尿病性黄斑水肿、病理性近视、von Rippel-Lindau病、眼的组织胞浆菌病、视网膜静脉阻塞(RVO)(视网膜分支静脉阻塞(BRVO)和视网膜中央静脉阻塞(CRVO)二者)、角膜新生血管生成、视网膜新生血管生成和发红。VEGF-A诱导的心血管形成是有害的,并且视网膜、小梁间或角膜新生血管生成最终可以导致视力丧失。

[0553] 在某些实施方案中,本文提供治疗受试者中的眼部疾病或病症的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的本文描述的非天然存在的结合VEGF-A的CKP或本文描述的包含非天然存在的结合VEGF-A的CKP的组合物(诸如药物组合物)。在某些实施方案中,提供包含本文描述的非天然存在的结合VEGF-A的CKP的组合物(诸如药物组合物),用于治疗受试者中的眼部疾病或病症中的用途。在某些实施方案中,提供本文描述的非天然存在的结合VEGF-A的CKP(或包含这种非天然存在的CKP组合物)在制备用于治疗受试者中的眼部疾病和病症的药物中的用途。

[0554] 在某些实施方案中,待治疗的受试者是哺乳动物(例如,人、非人灵长类动物、大鼠、小鼠、牛、马、猪、羊、山羊、狗、猫等)。在某些实施方案中,所述受试者是人。在某些实施方案中,所述受试者是临床患者、临床试验志愿者、实验动物等。在某些实施方案中,所述受试者被怀疑患有以异常血管生成和/或异常血管通透性为特征的眼部疾病或病症(诸如本文描述的那些)或者处于患有所述眼部疾病或病症的风险中。在某些实施方案中,所述受试者已经被诊断为患有以异常血管生成和/或异常血管通透性为特征的眼部疾病或病症(诸如本文描述的那些)。

[0555] 在某些实施方案中,眼部疾病或病症是眼部血管增生性疾病,诸如选自由以下组

成的组的眼部血管增生性疾病:糖尿病性失明、视网膜病、原发性糖尿病性视网膜病、年龄相关的黄斑变性(AMD)、增生性糖尿病性视网膜病(PDR)、早产儿视网膜病(ROP)、脉络膜新生血管形成(CNV),糖尿病性黄斑水肿、病理性近视、von Rippel-Lindau病、眼的组织胞浆菌病、视网膜静脉阻塞(RVO)(视网膜分支静脉阻塞(BRVO)和视网膜中央静脉阻塞(CRVO)二者)、角膜新生血管生成、视网膜新生血管生成和发红。在某些实施方案中,角膜新生血管生成导致眼睛感染、眼睛炎症、眼睛创伤(包括化学灼伤)或角膜缘干细胞屏障丧失。在某些实施方案中,角膜新生血管生成由疱疹性角膜炎、沙眼或盘尾丝虫病引起。

[0556] 在某些实施方案中,将有效量的本文描述的非天然存在的结合VEGF-A的CKP(或包含这种本文描述的非天然存在的结合VEGF-A的CKP的组合物)直接施用至受试者的眼睛(诸如经玻璃体内或局部地),如本文其它地方进一步详细描述的。

[0557] 在某些实施方案中,本文描述的非天然存在的结合VEGF-A的CKP(或包含这种非天然存在的CKP的组合物)与第二药剂组合施用。对于其眼部疾病或病症由炎性反应触发的患者,可以考虑使用抗炎剂的组合疗法。例如,组合使用类固醇与本文描述的非天然存在的结合VEGF-A的CKP(或包含这种非天然CKP的组合物)以分别减轻炎症并防止新血管形成在存在例如角膜新生血管生成的患者中可以是特别有利的。患有继发于细菌、病毒、真菌或棘阿米巴(acanthamoebal)感染的眼部疾病或病症的患者可以受益于施用本文描述的非天然存在的结合VEGF-A的CKP(或包含这种非天然存在的CKP的组合物)与抗微生物剂和任选地抗炎剂的组合。由于眼部疾病或病症而存在角膜基质血管的患者在角膜移植之后处于免疫排斥的肿大风险下。因此,在角膜移植之前(和任选地也在之后)施用本文描述的非天然存在的结合VEGF-A的CKP(或包含这种非天然存在的CKP的组合物)对存在角膜基质血管的患者可能是特别有益的,因为成功减少角膜血管化将降低移植排斥的风险。在某些实施方案中,本文描述的非天然存在的结合VEGF-A的CKP(或包含这种非天然存在的CKP的组合物)与第二抗血管生成剂组合施用。在某些实施方案中,本文描述的非天然存在的结合VEGF-A的CKP(或包含这种非天然存在的CKP的组合物)与基质金属蛋白酶(MMP)抑制剂组合施用。

[0558] 在某些实施方案中,本文描述的非天然存在的结合VEGF-A的CKP(或包含这种非天然存在的CKP的组合物)与第二疗法组合施用。在某些实施方案中,第二疗法是激光光凝疗法(LPT)。LPT使用激光以造成视网膜的受控损伤,从而产生有益的治疗效果。短脉冲的激光可以密封渗漏的血管,破坏异常血管,密封视网膜裂孔,或破坏眼后部的异常组织。其快速、不具有侵袭性,并且通常不需要除麻醉用滴眼剂之外的麻醉。LPT技术和装置对于眼科医师而言是容易获得的(参见Lock等人(2010)Med J Malaysia65:88-94)。关于LPT的其它细节可以见于例如WO 2014/033184。

[0559] 在某些实施方案中,第二疗法是光动力疗法(PDT)。PDT使用光活化分子以对新生血管内皮造成局部损伤,导致血管阻塞。使用适合的眼科放大镜经由纤维光缆和裂隙灯将光作为单一圆斑递送至视网膜(激光处理)。在激光处理之前将光活化化合物注入循环中,并且在受新生血管形成困扰的区域中通过化合物的光活化施以损伤。一种常用的光活化化合物是维替泊芬(Visudyne®)。维替泊芬主要通过脂蛋白在血浆中输送。一旦维替泊芬在氧的存在下由光活化,则产生高反应性的短寿命的单线态氧和反应性氧自由基,由此损伤血管周围的内皮。已知受损的内皮经由脂加氧酶(白细胞三烯)和环加氧酶(类花生酸,诸如血栓素(thromboxane))途径释放促凝血因子和血管活性因子,导致血小板聚集、纤维蛋白

凝块形成和血管收缩。维替泊芬看似在某种程度上优先积聚在新生血管组织中。用于光活化化合物的光活化的激光波长可以取决于所使用的特定光活化化合物而变化。关于PDT的其它细节可以见于例如WO 2014/033184。

[0560] 在某些实施方案中,第二疗法是透热疗法和烧灼术,其中通过经由单极透热疗法单元施加凝固电流或通过使用插入角膜缘处的补给血管(feeder vessel)中的电解针进行热烧灼来阻塞血管。

[0561] 施用

[0562] 在某些实施方案中,例如通过注射(例如结膜下注射、角膜内注射或玻璃体内注射)施用非天然存在的结合VEGF-A的CKP(或包含这种非天然存在的CKP的组合物)。水性形式的施用通常具有20-150μl(例如,40-60μl或50μl)的典型体积。注射可以经由30-号(gauge)×1/2-英寸(12.7mm)的针。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP(或包含这种非天然存在的CKP的组合物)提供于准备用于施用的预填充的无菌注射器中。在某些实施方案中,所述注射器具有低硅酮含量或者是不含硅酮的。所述注射器可以由玻璃制造。使用预填充的注射器进行递送所具有的优势在于可以避免施用前对无菌拮抗剂溶液的任何污染。预填充的注射器还为眼科医师提供更容易处理的施用。关于玻璃体内施用的其它细节,参见例如WO 2014/033184,Fagan等人(2013)Clin Exp Ophthalmol.41,500-507;Avery等人(2014)Retina.34Suppl 12,S1-S18;和Doshi等人(2015)Seminar Ophthalmol.26,104-113。

[0563] 在某些实施方案中,局部地(例如以滴眼剂形式)施用非天然存在的结合VEGF-A的CKP(或包含这种非天然存在的CKP的组合物)。关于对眼睛进行局部药物递送的其它细节见于,例如Loftsson等人(2012)Acta Ophthalmologica.90,603-608;Patel等人(2013)World J.Pharmacol.2,47-64;Freeman等人(2009)Exp Rev Ophthalmol.4,59-64;和Boddu等人(2014)Recent Patents on Drug Delivery and Formulation.8,27-36。

[0564] 在某些实施方案中,使用玻璃体内装置将非天然存在的结合VEGF-A的CKP(或包含这种非天然存在的CKP的组合物)连续递送至眼睛中。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP(或包含这种非天然存在的CKP的组合物)经由眼部插入物(包括,但不限于,例如Ocusert、Lactiser、可溶性眼部药物插入物(SODI)、Minidisc、接触镜、膜、滤纸条、人工泪液插入物和胶原罩)施用。参见例如Gaikwad等人(2013)Indo Amer J Pharm Res.3,3216-3232)。在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP(或包含这种非天然存在的CKP的组合物)作为缓慢释放储存物、眼部插塞/储器、眼部植入物(诸如巩膜或玻璃体植入物)施用。各种巩膜和玻璃体内递送系统是本领域已知的。这些递送系统通常是非生物可降解的,并且可以是主动或被动的。例如,WO 2010/088548描述了一种使用被动扩散递送治疗剂的具有刚性体的递送系统。WO 2002/100318公开了一种允许经由压力差进行主动施用的具有柔性体的递送系统。或者,可以通过可植入的微型泵实现主动递送。使用微型泵递送治疗剂的玻璃体内递送系统的实例是由Replenish,Inc.销售的Ophthalmic MicroPump System™,其可以经程序化以递送设定量的治疗剂达预定次数。在某些实施方案中,将非天然存在的结合VEGF-A的CKP(或包含这种非天然存在的CKP的组合物)装入小胶囊样容器(例如,硅酮弹性体杯)中。通常将所述容器植入眼中虹膜上方。所述容器包括释放开口。可以通过位于非天然存在的结合VEGF-A的CKP(或包含这种非天然存在的CKP的组合物)与开口之

间的膜或借助于与所述容器连接的微型泵来控制非天然存在的结合VEGF-A的CKP(或包含这种非天然存在的CKP的组合物)的释放。或者,可以将非天然存在的结合VEGF-A的CKP(或包含这种非天然存在的CKP的组合物)沉积在缓慢释放基质中,其防止拮抗剂从所述容器中快速扩散出去。优选地,玻璃体内装置经设计以便以在第一个月中较高的初始速率释放非天然存在的结合VEGF-A的CKP(或包含这种非天然存在的CKP的组合物)。释放速率例如在植入之后的头一个月的过程中缓慢降低至比初始速率低约50%的速率。所述容器可以具有这样的尺寸:所述尺寸足以容纳持续约四至六个月的非天然存在的结合VEGF-A的CKP(或包含这种非天然存在的CKP的组合物)的供应量。由于当连续施用时减小剂量的非天然存在的结合VEGF-A的CKP(或包含这种非天然存在的CKP的组合物)可能足以实现有效治疗,所以所述容器中的供应量可以持续一年或更久,优选约两年,更优选约三年。因为仅需要小手术来植入递送系统并且避免了玻璃体内注射,所以可以避免重复玻璃体内注射的患者顺应性问题。非天然存在的结合VEGF-A的CKP(或包含这种非天然存在的CKP的组合物)的玻璃体内浓度降低,并且因此由于非天然存在的结合VEGF-A的CKP(或包含这种非天然存在的CKP的组合物)进入循环引起的潜在副作用风险得以降低。

[0565] 在某些实施方案中,通过离子电渗疗法施用非天然存在的结合VEGF-A的CKP(或包含这种非天然存在的CKP的组合物)。离子电渗疗法是非侵袭性技术,其中施加小电流以增强电离的药物向组织中的渗透(参见例如Myles等人(2005)Adv Drug Deliv Rev 57,2063-79和Eljarrat-Binstock等人(2006)J Controlled Release 110,479-89)。用携带与药物相同的电荷的电极来施用药物,并且将具有相反电荷接地电极置于身体上的其它位置以完成电路。药物充当通过组织的电流的导体。

[0566] 关于向眼睛施用药物的其它细节提供于,例如Kuno等人(2011)Polymers 3,193-221;Short(2008)Toxicologic Path.36,49-62;Ghate等人(2006)Expert Opin Drug Deliv 3,275-87;Davis等人(2004)Curr Opin Mol Therap 6,195-205;Gaudana等人(2010)AAPS J.12,348-360;和其它文献中。

[0567] 缓慢释放/长期作用递送制剂

[0568] 在某些实施方案中,非天然存在的结合VEGF-A的CKP(或包含这种非天然存在的CKP的组合物)作为缓慢释放制剂提供。通常通过将治疗剂与生物可降解聚合物混合或将其囊封到微粒中来获得缓慢释放制剂。

[0569] 根据本发明的缓慢释放制剂通常包含非天然存在的结合VEGF-A的CKP(或包含这种非天然存在的CKP的组合物)、聚合载体和用于调节非天然存在的结合VEGF-A的CKP(或包含这种非天然存在的CKP的组合物)从聚合载体的释放速率的释放调节剂。通过改变基于聚合物的递送组合物的制备条件,可以调节所得组合物的释放动力学性质。聚合载体通常包含一种或多种生物可降解聚合物或共聚物或其组合。例如,聚合载体可以选自聚乳酸(PLA)、聚乙醇酸(PGA)、聚乳酸-共-乙交酯(PLGA)、聚酯、聚(原酸酯)、聚(膦嗪)、聚(磷酸酯)、聚己内酯或其组合。

[0570] 在某些实施方案中,所述聚合载体是PLGA。释放调节剂通常是长链脂肪醇,优选包含10至40个碳原子。常用的释放调节剂包括辛醇、壬醇、癸醇、月桂醇、肉豆蔻醇、鲸蜡醇、棕榈油醇、硬脂醇、异硬脂醇、反油醇、油醇、亚油基醇、多不饱和反亚油基醇,多不饱和亚油基醇,反亚油基醇,多不饱和蓖麻油醇、花生醇、二十二醇、瓢儿菜醇、二十四醇、蜡醇、褐煤醇、

二十八醇、蜂花醇、蜂蜡醇和三十四醇。

[0571] 在某些实施方案中,将非天然存在的结合VEGF-A的CKP(或包含这种非天然存在的CKP的组合物)并入基于微球体的持续释放组合物。在某些实施方案中,所述微球体由PLGA制备。可以通过改变用于制备微球体的条件来控制并入微球体中的非天然存在的结合VEGF-A的CKP(或包含这种非天然存在的CKP的组合物)的量和非天然存在的结合VEGF-A的CKP(或包含这种非天然存在的CKP的组合物)的释放速率。用于生产这种缓慢释放制剂的方法描述于US2005/0281861和US2008/0107694。

[0572] 在某些实施方案中,将非天然存在的结合VEGF-A的CKP(或包含这种非天然存在的CKP的组合物)并入生物可降解的植入物(诸如显微针)中。基质植入物(诸如显微针)通常用于治疗眼部疾病,其需要负荷剂量,随后是在1天至6个月时间段期间逐渐减小的药物剂量(Davis等人(2004)Curr Opin Mol Therap 6,195-205)。它们最通常由将降解成水和二氧化碳的共聚物聚乳酸(PLA)和/或聚-乳酸-乙醇酸(PLGA)制成。可以通过改变丙交酯(缓慢)和乙交酯(快速)的相对浓度、改变聚合物重量比、添加另外的聚合物涂层或使用疏水性不溶性药物来降低药物从植入物中释放的速率和程度。药物的释放一般遵循一级动力学,其中药物释放的初始爆发之后是药物水平的快速下降。不需要移除生物可降解的植入物,因为它们随时间而溶解(Hsu(2007)Curr Opin Ophthalmol 18,235-9)。生物可降解的植入物还允许剂量和治疗的灵活性,从短持续时间(数周)至较长持续时间(数月至一年),取决于聚合物PLA/PLGA比率,这是针对疾病进展定制药物递送的另一个益处,因为剂量和治疗要求可能随时间而变化。关于制备和植入用于眼部施用的生物可降解的植入物(诸如PLGA或PLA植入物)的其它细节提供于例如WO 2006/093758、US2006/0182783、WO 2009/026461、US2008/0181929、US2009/0263460、US2010/0015158、US2011/0207653和US2014/0154321。关于用于眼部药物递送的显微针的其它细节提供于例如Donnelly等人(2010)Drug Deliv 14,187-207;USP7918814,Yavux等人(2013)Sci World J.doi.org/10.1155/2013/732340,和其它文献。

[0573] 制造品或试剂盒

[0574] 在某些实施方案中,提供含有本文描述的非天然存在的结合VEGF-A的CKP和可用于治疗眼部疾病或病症(诸如眼部血管增生性疾病或以过度的血管生成为特征的眼部病症)的材料的制造品。所述制造品可以包括容器和在所述容器上或与所述容器相结合的标签或包装插页。合适的容器包括,例如,瓶、小药瓶、注射器等。容器可以由多种材料诸如玻璃或塑料制成。在某些实施方案中,所述容器容纳可有效地治疗眼部疾病或病症(诸如眼部血管增生性疾病或以过度的血管生成为特征的眼部病症)的组合物,并且可以具有植入缓慢释放眼部或眼内药物递送系统所需要的一整要物品,包括但不限于注射装置、局部和可注射药物、手术器械、缝线和缝合针以及眼罩。在某些实施方案中,所述容器容纳无菌的单位剂量包装。组合物中的至少一种活性剂是本文描述的非天然存在的结合VEGF-A的CKP。所述标签或包装插页表明所述组合物用于治疗眼部疾病或病症(诸如眼部血管增生性疾病或以过度的血管生成为特征的眼部病症)。所述标签或包装插页还将包括关于将非天然存在的结合VEGF-A的CKP(或包含这种非天然存在的CKP的组合物)施用至患者的使用说明。还考虑包含本文描述的联合疗法的制造品和试剂盒。

[0575] 包装插页是指通常包含在治疗产品的商品包装中的使用说明,其含有关于涉及此

类治疗产品的使用的适应症、用法、剂量、施用、禁忌症和/或警告的信息。在某些实施方案中,所述包装插页表明包含非天然存在的结合VEGF-A的CKP的组合物用于治疗眼部疾病或病症(诸如眼部血管增生性疾病或以过度的血管生成为特征的眼部病症)。

[0576] 还提供了可用于多种目的(例如用于分离或检测VEGF-A)试剂盒,所述试剂盒任选地与所述制造品组合。为了分离和纯化VEGF-A,所述试剂盒可以含有与珠(例如琼脂糖珠)偶联的、本文描述的非天然存在的结合VEGF-A的CKP。可以提供含有本文描述的非天然存在的结合VEGF-A的CKP的试剂盒,用于在体外(例如在ELISA或印迹中)检测和定量VEGF-A。与制造品一样,所述试剂盒包括容器和在所述容器上或与所述容器相结合的标签或包装插页。例如,所述容器容纳包含至少一种本文描述的非天然存在的结合VEGF-A的CKP的组合物。可以包括另外的容器,其含有例如稀释剂和缓冲剂、对照抗体等。所述标记或包装插页可以提供组合物的描述以及用于预期的体外或诊断用途的使用说明。

实施例

[0577] 实施例1:用于实施例2-3的材料和方法

[0578] 在M13噬菌体上展示EETI-II。

[0579] 通过改造先前描述的噬菌粒pS2202b(Skelton,N.J.,Koehler,M.F.,Zobel,K.,Wong,W.L.,Yeh,S.,Pisabarro,M.T.,Yin,J.P.,Lasky,L.A.和Sidhu,S.S.(2003)Origins of PDZ domain ligand specificity.Structure determination and mutagenesis of the Erbin PDZ domain.J Biol Chem 278,7645-7654)在M13细菌噬菌体的表面上展示EETI-II。使用标准分子生物学技术,用编码EETI-II的DNA片段置换编码Erbin PDZ结构域的pS2202d的片段。所得噬菌粒(p8EETI-II)含有编码麦芽糖结合蛋白分泌信号、随后是gD标签和EETI-II并且以M13主要外壳蛋白p8结束的开放阅读框。用M13-KO7辅助噬菌体对含有p8EETI-II的大肠杆菌进行共感染,并且使培养物在补充有50μg/ml羧苄青霉素(Carbenecillin)和25μg/ml卡那霉素的30ml 2Yt培养基中在30℃生长过夜。根据标准方案纯化繁殖的噬菌体(Tonikian,R.,Zhang,Y.,Boone,C.和Sidhu,S.S.(2007)Identifying specificity profiles for peptide recognition modules from phage-displayed peptide libraries.Nat Protoc 2,1368-1386),并且再悬浮于1ml PBT缓冲液(PBS、0.5%BSA和0.1%TWEEN®20)中,这导致囊封p8EETI-IIDNA并展示EETI-II的噬菌体颗粒的生产。使用噬菌体ELISA分析展示水平。

[0580] 文库构建和分选。

[0581] 遵循Kunkel诱变方法构建EETI-II文库(Kunkel,T.A.,Roberts,J.D.和Zakour,R.A.(1987)Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection.Methods Enzymol 154,367-382)。构建三个文库:文库1,其中用编码除Cys以外的所有天然氨基酸的简并密码子以6、8或10个氨基酸的长度使环1(3-8)随机化;或文库2,其中用同一组简并密码子以5个氨基酸的固定长度使环5(22-26)随机化;或文库3,其中同时用编码19个氨基酸的简并密码子以6、8和10个氨基酸使环1随机化且以5个氨基酸使环5随机化。使用编码19个氨基酸的三聚亚磷酰胺在等摩尔浓度下的定制混合物来合成用于诱变的寡核苷酸。(Glen Research,Sterling,VA)。终止模板是在3-26区域中含有三个终止密码子的p8EETI-II的单链DNA,并且用于构建所有三个文库。三个文库池含有约3×10^{10}个独

特成员,并且遵循标准方案循环通过针对捕获在平板上的hVEGF(8-109)的数轮结合选择(四轮)(Tonikian,R.,Zhang,Y.,Boone,C.和Sidhu,S.S.(2007)Identifying specificity profiles for peptide recognition modules from phage-displayed peptide libraries.Nat Protoc 2,1368-1386),其中变化之处在于使用25ug/ml的hVEGF(8-109)包被平板并且通过使过夜培养物在30℃生长来繁殖洗脱的噬菌体。

[0582] 斑点噬菌体ELISA。

[0583] 在四轮结合选择之后,挑选个别噬菌体克隆并且接种到96孔板中含有50μg/ml羧苄青霉素和M13-KO7辅助噬菌体的450μl 2YT培养基中,使其在37℃生长过夜。如下利用斑点噬菌体ELISA分析上清液:将hVEGF(8-109)或BSA包被在384孔MAXISORP™免疫平板上,并且将用PBT缓冲液稀释(1:3)的噬菌体上清液添加至各孔。洗涤平板并且用抗M13-HRP、随后是TMB底物来检测结合的噬菌体。在这些测定中,平行测试结合单独BSA的噬菌体以评价背景结合。对hVEGF-A(8-109)的结合信号与对BSA(背景)相比超过3倍高的克隆被视为阳性。对阳性克隆进行DNA序列分析。

[0584] 结晶学。

[0585] 为了形成稳定复合物,将VEGF-A浓缩至7mg/ml并且与6倍摩尔过量的VEGF_CKP9.54.90变体一起温育。使用2:1蛋白质:储备溶液的滴量比,通过悬滴蒸汽扩散法使原始单斜空间群$P12_11$的VEGFA/VEGF_CKP9.54.90晶体在19℃下生长。储备溶液含有100mM HEPES pH7.4和26% PEG 3350。在数据收集之前,在补充有25% PEG 200的储备溶液中对晶体进行低温保护并且在液氮中快速冷冻。

[0586] 数据收集和结构确定。

[0587] 在先进光子源(Advanced Photon Source)上以光束线21IDF针对1.64Å收集X-射线衍射数据。使用iMosflm处理数据。使用Phenix中的Phaser,用先前公开的apo VEGF-A结构(PDB:1VPF)(作为检索模型)和不对称单元中的一个VEGF-A二聚体进行分子置换来解析结构。VEGF_CKP9.54.90变体存在明显的F_o-F_c密度,因此使用Coot将该变体的结构手动地构建成密度,并且然后使用Phenix和Coot进行数轮迭代精修和重建。

[0588] 确定细胞IC_{50}的KDR-CHO VEGF测定

[0589] 使KDR-CHO细胞(用gD标记的KDR稳定转染的CHO细胞)在细胞生长培养基(DMEM/Ham's F-12、10%经透析过滤的FBS(GIBCO目录号26400)、25mM HEPES、2mM L-GLUTAMAX™)中生长。对于VEGF刺激测定,将5×10^4个细胞/孔铺板于96孔组织培养板中的100μl的细胞铺板培养基(DMEM/Ham's F-12、0.2% BSA、0.25%经透析过滤的FBS、25mM HEPES、2mM L-GLUTAMAX™)中,并且在37℃温育过夜。将该培养基替换为100μl的无血清细胞刺激培养基(DMEM/Ham's F-12、0.5% BSA、25mM HEPES)并且将细胞在37℃温育2小时。在刺激之前一小时,将该培养基替换为50μl的无血清细胞刺激培养基。同时,在50μl的无血清细胞刺激培养基中将VEGF(对于hVEGF,50ng/ml;对于mVEGF和rVEGF,100ng/ml)与滴定量的CKP或抗-VEGF在37℃预温育1小时,并且添加至细胞。将细胞在37C刺激15min并且移除培养基。用130μl的冰冷细胞裂解缓冲液(150mM NaCl、50mM HEPES、0.5% Triton-X 100、HALT蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合物(ThermoFisher Scientific,Inc.目录号78444)、5mM EDTA)裂解细胞。通过基于ELISA的测定确定KDR的VEGF介导的Tyr磷酸化。简言之,在4℃用100μl的在PBS中稀释的抗-gD抗体(1μg/ml)包被MAXISORP™96孔平板(ThermoFisher Scientific,Inc.目

录号439454)过夜,并且用洗涤缓冲液(PBS、0.05％TWEEN®20,pH 7.4)洗涤三次。在室温下用300μl的封闭缓冲液(PBS、0.5％ BSA)封闭平板1小时,随后用洗涤缓冲液洗涤三次。将上述KDR-CHO细胞裂解物(100μl)添加至各孔并且在室温温育2小时。用洗涤缓冲液将平板洗涤四次,随后在封闭缓冲液中与100μl的0.5μg/ml生物素缀合的抗-磷酸酪氨酸(克隆4G10,Millipore目录号16-103)在室温温育2小时。在洗涤四次之后,在封闭缓冲液中将平板与100μl的HRP缀合的链霉抗生物素蛋白在室温温育30min。在洗涤四次之后,将平板用100μl的TMB底物(BD Biosciences)在室温下显色20至30min,并且通过添加50μl的H_2SO_4溶液终止。使用设定至450nm的酶标仪确定各孔的光学密度。

[0590] 竞争ELISA

[0591] 通过竞争ELISA确定各个肽的结合特异性。首先,通过在PBS中在4℃将VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、PlGf-2、NGF、EGF、PDGF-ββ或IGF-1以2或5μg/mL涂覆在MAXISORP™平板中过夜来证实各生长因子与其对应受体以平板-ELISA格式的结合。在室温下用封闭缓冲液(具有0.5％ BSA和0.05％TWEEN®20的PBS)封闭2小时之后,使用测定缓冲液(具有0.5％ BSA和0.05％TWEEN®20的PBS)连续稀释受体-Fc融合物或生物素化的受体,并且在室温温育1小时。通过分别与抗人Fc-HRP(Life Technologies)或高亲和力链霉抗生物素蛋白-HRP(ThermoFisher Scientific,Inc.)温育30min来检测结合的受体-Fc或生物素化的受体的量。以如以上描述的相同方式进行竞争ELISA,除了在封闭之后,添加含有恒定浓度的受体-Fc融合物或生物素化的受体的系列稀释肽混合物(受体浓度设定至EC_{60})并且温育1小时。所有重组人类蛋白质和抗体均购自R&D Systems(Minneapolis,MN)。

[0592] SPR结合测定。

[0593] 在BIACORE™3000仪器(GE Healthcare)上,在37℃使用含有0.1％DMSO(v/v)的HBS-EP缓冲液(10mM HEPES pH 7.4、150mM NaCl、3mM EDTA和0.005％v/v表面活性剂P20)使用表面等离子共振技术来评价VEGF-A抑制剂的结合动力学和亲和力。取决于测定的格式,如以下所描述的利用链霉抗生物素蛋白传感器(SA)或葡聚糖涂覆(CM5)传感器。

[0594] 对于与SA传感器一起使用时,首先通过在冰上将蛋白质与EZ-连接NHS-PEG4-生物素(Pierce)分别以1:1.5摩尔比在PBS中温育2小时将VEGF-A生物素化(不超过2个生物素/VEGF-A)。然后通过添加10倍摩尔过量的甘氨酸pH 8.0来猝灭反应,并且使用Amicon 0.5mL 3000MWCO超离心过滤器(EMD Millipore)将样品缓冲液交换至PBS中。通过LC-MS分析来验证蛋白质的生物素化状态。然后在表面上捕获生物素化的VEGF-A直至约～400的共振单位(RU)信号。为了将VEGF-A固定在CM5传感器上,首先根据供应商说明书用N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐和N-羟基琥珀酰亚胺(EDC/NHS)活化表面。然后将VEGF-A稀释至偶联缓冲液(0.1M乙酸盐缓冲液,pH 5.0)中并且注入直至信号达到约～400RU,随后用1M乙醇胺pH 8.0洗涤以猝灭剩余的活化位点。

[0595] 在捕获步骤之后,在具有相匹配的DMSO浓度的HBS-EP缓冲液中制备一系列肽浓度(至0.1％),并且以80μL/min的流速注入。然后使用Scrubber2.0(BioLogic Software),使用1:1结合模型来分析所得传感图以获得动力学数据和亲和力。

[0596] CKP合成和折叠。

[0597] 将线性前体LRP6肽溶解于DMSO(0.5mg/mL)、0.1M碳酸氢铵(pH 9),1mM还原谷胱甘肽(50％DMSO中)中,并且在振荡的同时在室温温育24h。在C18柱上通过RP-HPLC纯化折叠的

CKP,并且通过质谱分析收集的馏分,合并且冻干,然后使用。

[0598] 细胞培养和转染。

[0599] 将用萤火虫荧光素酶Wnt报告子(Gong等人(2010)PLoS ONE 5,9:e12682)和pRL-SV40海肾荧光素酶(Promega)稳定转染HEK293细胞在补充有10％ FBS、2mM GLUTAMAX™和40μg/ml潮霉素的DMEM:F12(50:50)中生长至90％会合。将细胞在5％ CO_2湿润培养箱中在37℃温育24h。在温育之后,将细胞胰蛋白酶化(PBS中的0.05％ Gibco 15400-54),然后在补充有10％ FBS、2mM GLUTAMAX™的DMEM:F12(50:50)中稀释至4×10^5个细胞/ml。将20,000个细胞装载到白色microtest 96孔optilux平板(目录号353947)的单个孔中并且温育约24h。使用FUGENE® HD用Wnt1-pCDNA3.2(5ng/孔)或Wnt3a-pCDNA3.2(25ng/孔)转染各孔,然后生长24h。将所有结合LRP6的变体稀释于DMSO中,并且以0、0.1、0.1、1.0、10和100μM的肽浓度添加至细胞,最终DMSO浓度为1％,持续6小时。对于刺激,在PBS中将重组Wnt3a(5036-WN-010/CF,R&D Systems)稀释至50ng/mL,并且添加至具有指定CKP的培养基中。

[0600] 然后,根据制造商说明书但使用各试剂的一半体积,用Promega的DUAL-GLO®试剂盒测量所有测定中的荧光素酶响应。在Perkin Elmer ENVISION™多标记读数器上测量萤火虫发光和海肾发光。计算萤火虫发光:海肾发光的比率并且针对在表达所指示的Wnt蛋白或经所指示的Wnt蛋白处理的对照细胞中的比率进行标准化。在Prism Graphpad中使用对数(抑制剂)相对于标准化反应,使用标准化数据计算抑制常数-可变斜率Y＝100/(1+10^((LogIC_{50}-X)*HillSlope))。使用Holm-Sidak方法在α＝5.000％的情况下确定统计显著性。计算假设所有行均是来自具有相同离散度(scatter)(SD)的群体的样品,并且使用额外平方和F检验(其中当显著时P<0.05)将IC_{50}鉴定为显著不同的。

[0601] 实施例2A:结合VEGF-A的非天然存在的EETI-II变体的产生

[0602] 选择EETI-II(图1)作为骨架用于展示在M13细菌噬菌体的表面上。将EETI-II融合至M13主要外壳蛋白p8的N末端。此外,gD-标签为EETI-II序列的工程改造的N末端,以便验证展示水平。如下基于EETI-II框架产生了三个肽噬菌体文库:文库I,其中使环1氨基酸残基随机化并且环长度是变化的(6个、8个、10个残基);文库II,其中使环5氨基酸残基随机化并且天然环长度是固定的;和文库III,其中同时使环1和环5二者的氨基酸内容物随机化并且环1长度从6个氨基酸残基至10个氨基酸残基变化而环5长度是固定的。总而言之,三个文库含有3×10^{10}个独特成员并且循环通过针对VEGF-A的数轮选择。

[0603] 针对VEGF-A的淘选产生了与$hVEGF_{8-109}$结合的十三个独特变体(参见表19)。这些变体在环1中或在环1和环5二者中同时含有氨基酸组成变化。此外,相比于EETI-II中存在的天然环,许多变体具有更长的环。保守的YXS基序也可见于环5中。我们产生了对应于这些独特变体中的七个的可溶性折叠胱氨酸结肽,并且它们在噬菌体竞争ELISA中全部展现出结合hVEGF-A(表19)。此外,我们在细胞测定中评价了一些变体,并且它们以低μM的IC_{50}展现出对人、小鼠和大鼠VEGF-A活性的跨物种抑制。

[0604] 表19:针对hVEGF-A的基于EETI-II的结合剂

[0605]

变体	环 1	环 5	n	ELISA	S/N*
EETI-II	PRILMR (SEQ ID NO:92)	GPNGF (SEQ ID NO:15)		0.01	1.11
VEGF_CKP1	ETDWYPHQID (SEQ ID NO:225)	GPNGF (SEQ ID NO:15)	2	0.9	16.9
VEGF_CKP2	GETVFEQFLW (SEQ ID NO:226)	GPNGF (SEQ ID NO:15)	2	3.2	48.1
VEGF_CKP3	HMMYDY (SEQ ID NO:227)	EMYDA (SEQ ID NO:235)	2	3.1	42.9
VEGF_CKP4	KKWQWWYM (SEQ ID NO:228)	YPWTE (SEQ ID NO:236)	5	2.6	35.3
VEGF_CKP5	PAIQNWKEHP (SEQ ID NO:229)	SWWPSL (SEQ ID NO:237)	2	1.9	28.4
VEGF_CKP6	PTTRFKQY (SEQ ID NO:8)	GPNGF (SEQ ID NO:15)	28	3.5	51.9

[0606]

VEGF_CKP7	QDPTFNWALY (SEQ ID NO:9)	QMYQS (SEQ ID NO:16)	2	3.4	54.5
VEGF_CKP8	QLMHPFWG (SEQ ID NO:230)	HWYRS (SEQ ID NO:238)	2	3.9	59.4
VEGF_CKP9	QLMQPFWG (SEQ ID NO:10)	HWYQS (SEQ ID NO:17)	11	3.3	36.0
VEGF_CKP10	RDLDVKWD (SEQ ID NO:11)	QYYSS (SEQ ID NO:18)	3	3.2	43.7
VEGF_CKP11	RTPWEPHDIT (SEQ ID NO:12)	GPNGF (SEQ ID NO:15)	16	4.1	57.5
VEGF_CKP12	TTPWPPHEIM (SEQ ID NO:13)	GPNGF (SEQ ID NO:15)	75	3.5	55.2
VEGF_CKP13	VTPWKPHWIN (SEQ ID NO:14)	GPNGF (SEQ ID NO:15)	2	3.5	56.3

[0607] *S/N＝相比于BSA对照的信噪比

[0608] 表20:针对hVEGF-A的可溶性基于EETI-II的结合剂的噬菌体竞争ELISA和细胞抑制活性

[0609]

变体	体外 $IC_{50}(\mu M)$	细胞测定		
		hVEGF-A (25 ng/ml)	mVEGF (50 ng/ml)	rVEGF (50 ng/ml)
VEGF_CKP6	3	47	169	711.2 (部分)
VEGF_CKP7	12	18	39	7
VEGF_CKP9	0.6	12	10	1
VEGF_CKP10	1	45	ND*	18
VEGF_CKP11	80	ND*	ND*	ND*
VEGF_CKP12	60	102	243	1220 (部分)
VEGF_CKP13	80	ND*	ND*	ND*

[0610] *ND＝未测得

[0611] 为了进一步改善这些变体的效力,我们对VEGF_CKP7和VEGF_CKP9继续跟进。对VEGF-CKP7框架内的环1和环5进行软(soft)随机化,得到与人VEGF-A结合的16个独特变体(参见如下表21)。

[0612] 表21:针对hVEGF-A的CKP_7亲和力成熟的结合剂

[0613]

变体	环 1	环 5	n	ELISA	S/N*
VEGF_CKP7	QDPTFNWALY (SEQ ID NO:9)	QMYQS (SEQ ID NO:16)	1	0.1	1.3
VEGF_CKP7.2	DDPSFDWSVY (SEQ ID NO:287)	RMYDS (SEQ ID NO:292)	1	1.2	21.5
VEGF_CKP7.8	KNPLFNWALY (SEQ ID NO:60)	QLFDS SEQ ID NO:71)	2	0.5	7.5
VEGF_CKP7.17	QDPTVNWAVY (SEQ ID NO:61)	QFYQS (SEQ ID NO:72)	1	0.8	13.4
VEGF_CKP7.19	QDPTFNWAEY (SEQ ID NO:62)	QLYQS (SEQ ID NO:73)	2	0.6	11.1
VEGF_CKP7.24	WDPTFNWALY (SEQ ID NO:288)	QMYDS (SEQ ID NO:76)	2	0.8	13.4
VEGF_CKP7.35	QDPTFNWAEY (SEQ ID NO:62)	QMYQS (SEQ ID NO:16)	3	0.6	10.6
VEGF_CKP7.43	QDPTLNWATY (SEQ ID NO:289)	QMYQS (SEQ ID NO:16)	1	0.5	6.3
VEGF_CKP7.46	EDPTVDWAQY (SEQ ID NO:290)	QMYQS (SEQ ID NO:16)	1	0.3	4.9
VEGF_CKP7.50	QDPSLNWADY (SEQ ID NO:63)	QMHQS (SEQ ID NO:74)	1	0.8	14.3
VEGF_CKP7.54	LDRTLNWALY (SEQ ID NO:64)	QMYNS (SEQ ID NO:75)	1	0.5	9.3
VEGF_CKP7.57	LDPSFNWSLY (SEQ ID NO:65)	QMYDS (SEQ ID NO:76)	2	1.0	17.4
VEGF_CKP7.73	RDLTINWALF	QMFNS	1	1.2	19.2

[0614]

	(SEQ ID NO:66)	(SEQ ID NO:274)			
VEGF_CKP7.78	KDTTFNWGLF (SEQ ID NO:291)	QLYQS (SEQ ID NO:73)	1	0.7	11.8
VEGF_CKP7.81	LDPTVNWALF (SEQ ID NO:67)	QHYKT (SEQ ID NO:77)	1	1.1	18.6
VEGF_CKP7.88	QDPKLNWAVY (SEQ ID NO:68)	QLFNS (SEQ ID NO:78)	2	0.5	7.7
LRP6_CKP7.89	LDPSFDWALY (SEQ ID NO:69)	QLYNS (SEQ ID NO:79)	1	0.5	8.1

[0615] *S/N＝相比于BSA对照的信噪比

[0616] 对VEGF-CKP9框架内的环1和环5进行软随机化,得到与人VEGF-A结合的16个独特变体(参见如下表22-24)。

[0617] 表22:针对VEGF-A的VEGF_CKP9环1亲和力成熟的变体

[0618]

变体	L1 序列	n	ELISA	S/N*
VEGF_CKP9	QLMQPFWG (SEQ ID NO:10)		0.4	7.4
VEGF_CKP9.L1.2	HLFEPLWG (SEQ ID NO:245)	17	1.6	12.5
VEGF_CKP9.L1.7	QVMRPFWG (SEQ ID NO:246)	3	1.5	8.9
VEGF_CKP9.L1.8	QVMQPAWG (SEQ ID NO:247)	1	1.2	12.8
VEGF_CKP9.L1.19	HRLQPLWG (SEQ ID NO:248)	3	1.4	11.6
VEGF_CKP9.L1.26	ELLQPSWG (SEQ ID NO:249)	4	1.7	11.9
VEGF_CKP9.L1.57	NPMLPFWG (SEQ ID NO:368)	3	3.7	31.8
VEGF_CKP9.L1.64	NVLLPLWG	1	2.3	19.9

[0619]

	(SEQ ID NO:250)			
VEGF_CKP9.L1.68	DIMQPLWG (SEQ ID NO:36)	1	2.0	23.2
VEGF_CKP9.L1.76	DLMQPLWG (SEQ ID NO:251)	2	2.5	17.4
VEGF_CKP9.L1.78	NPMLPLWG (SEQ ID NO:252)	1	3.0	25.1
VEGF_CKP9.L1.79	QVLQPSWG (SEQ ID NO:253)	1	1.2	10.0

[0620] *S/N＝相比于BSA对照的信噪比

[0621] 表23:针对VEGF-A的VEGF_CKP9环5亲和力成熟的变体

[0622]

变体	L5 序列	n	ELISA	S/N*
VEGF_CKP9	HWYQS (SEQ ID NO:17)		0.9	11.6
VEGF_CKP9.L5.7	RWYNS (SEQ ID NO:133)	11	1.4	18.9
VEGF_CKP9.L5.18	HWYQS (SEQ ID NO:17)	1	1.6	20.4
VEGF_CKP9.L5.43	RWYHS (SEQ ID NO:43)	2	0.9	13.6

[0623] *S/N＝相比于BSA对照的信噪比

[0624] 表24:针对VEGF-A的VEGF_CKP9环1/环5亲和力成熟的变体

[0625]

变体	环 1	环 5	n	ELISA	S/N*
VEGF_CKP9	QLMQPFWG (SEQ ID NO:10)	HWYQS (SEQ ID NO:17)		0.4	7.4
VEGF_CKP9.2	DVLQPFWG (SEQ ID NO:28)	HWYQS (SEQ ID NO:17)	20	2.4	31.1
VEGF_CKP9.3	QISQPFWG	HFYNS	1	1.6	24.5

[0626]

	(SEQ ID NO:29)	(SEQ ID NO:41)			
VEGF_CKP9.4	DRMQPLWG (SEQ ID NO:30)	LWYKS (SEQ ID NO:42)		N/D	N/D
VEGF_CKP9.9	QLLEPMWG (SEQ ID NO:254)	HWYNS (SEQ ID NO:46)	1	1.1	19.7
VEGF_CKP9.14	KLLQPMWG (SEQ ID NO:255)	RWYQS (SEQ ID NO:44)	1	2.0	30.1
VEGF_CKP9.11	DRMQPYWG (SEQ ID NO:256)	QWYKS (SEQ ID NO:262)	1	1.1	14.1
VEGF_CKP9.20	NLMLPFWG (SEQ ID NO:31)	RWYHS (SEQ ID NO:43)	1	1.7	13.3
VEGF_CKP9.22	QRTQPFWG (SEQ ID NO:32)	RWYQS (SEQ ID NO:44)	1	1.2	17.2
VEGF_CKP9.47	KIMQPLWG (SEQ ID NO:257)	LWYDS (SEQ ID NO:263)	1	1.0	14.6
VEGF_CKP9.51	NLMHPFWG (SEQ ID NO:258)	HWYQS (SEQ ID NO:17)	1	1.0	11.0
VEGF_CKP9.54	NIMLPFWG (SEQ ID NO:33)	QYYQS (SEQ ID NO:45)	1	2.1	28.4
VEGF_CKP9.59	DPMQPFWG (SEQ ID NO:34)	RWYQS (SEQ ID NO:44)		N/D	N/D
VEGF_CKP9.63	DVMQPYWG (SEQ ID NO:35)	HWYNS (SEQ ID NO:46)	1	2.0	29.7
VEGF_CKP9.69	ALLQPLWG (SEQ ID NO:259)	RWYNS (SEQ ID NO:133)	1	1.0	14.3
VEGF_CKP9.71	QLLQPLWG (SEQ ID NO:37)	RWYQS (SEQ ID NO:44)	1	1.0	16.5
VEGF_CKP9.72	RLLEPSWG (SEQ ID NO:260)	QWYQS (SEQ ID NO:264)	1	0.6	10.0
VEGF_CKP9.76	HLLLPLWG	RWYHS	1	1.3	15.5

[0627]

	(SEQ ID NO:261)	(SEQ ID NO:43)			
VEGF_CKP9.96	KLFEPLWG (SEQ ID NO:39)	RWYES (SEQ ID NO:567)	1	1.2	18.4

[0628] *S/N＝相比于BSA对照的信噪比

[0629] 选择这些克隆以在噬菌体滴定测定中进一步证实,并且产生对应于这些序列中的十个的可溶性折叠形式用于进一步的体外评价(参见如下表25)。在这组变体中,相比于亲本VEGF-CKP9,VEGF_CKP9.2、VEGF_CKP9.54和VEGF_CKP9.63在体外和细胞测定中对VEGF-A展现出改善的效力,IC_{50}在100-200nM的范围内(参见表25)。

[0630] 表25:噬菌体竞争ELISA和VEGF-A-KDR相互作用ELISA中的抑制活性

[0631]

变体	噬菌体ELISA IC_{50}(μM)	细胞 IC_{50}(nM)
VEGF_CKP9	1.36	11700
VEGF_CKP9.2	0.168	270
VEGF_CKP9.3	1.50	N/D
VEGF_CKP9.4	1.95	N/D
VEGF_CKP9.20	1.34	N/D
VEGF_CKP9.22	>100	N/D
VEGF_CKP9.54	0.45	188
VEGF_CKP9.59	5.82	N/D
VEGF_CKP9.63	0.146	140
VEGF_CKP9.96	49.00	N/D

[0632] 为了提高效力,我们选择了先导9.54和9.63分子并且基于这些框架产生了新噬菌体文库,其中使环2随机化。针对hVEGF-A淘选新文库并且产生许多环2变体,相比于亲本9.54和9.63分子,所述变体对VEGF-A显示出显著改善的效力(分别参见如下表26和27),其中最有效的分子展现0.5-2nM范围内的IC_{50}(参见如下表28)。

[0633] 表26:基于9.54框架的亲和力成熟的结合VEGF-A的环2变体

[0634]

变体	环 1	环 2	环 5	n	ELISA	S/N*
VEGF_CKP 9	QLMQPFWG (SEQ ID NO:10)	KQDSD (SEQ ID NO:93)	HWYQS (SEQ ID NO:17)			
VEGF_CKP 9.54	NIMLPFWG (SEQ ID NO:33)	KQDSD (SEQ ID NO:93)	QYYQS (SEQ ID NO:45)			
VEGF_CKP 9.54.1	NIMLPFWG (SEQ ID NO:33)	GQSFE (SEQ ID NO:94)	QYYQS (SEQ ID NO:45)	80	2.4	29.9
VEGF_CKP 9.54.2	NIMLPFWG (SEQ ID NO:33)	GLDYD (SEQ ID NO:95)	QYYQS (SEQ ID NO:45)	1	0.1	26
VEGF_CKP 9.54.12	NIMLPFWG (SEQ ID NO:33)	GPELN (SEQ ID NO:298)	QYYQS (SEQ ID NO:45)	1	2.4	38.8
VEGF_CKP 9.54.14	NIMLPFWG (SEQ ID NO:33)	QADYA (SEQ ID NO:299)	QYYQS (SEQ ID NO:45)	1	2.5	23.5
VEGF_CKP 9.54.16	NIMLPFWG (SEQ ID NO:33)	GVDYL (SEQ ID NO:300)	QYYQS (SEQ ID NO:45)	1	2.4	30.8
VEGF_CKP 9.54.31	NIMLPFWG (SEQ ID NO:33)	GTNFL (SEQ ID NO:301)	QYYQS (SEQ ID NO:45)	1	2.3	32.5
VEGF_CKP 9.54.44	NIMLPFWG (SEQ ID NO:33)	SRDFD (SEQ ID NO:302)	QYYQS (SEQ ID NO:45)	1	2.4	34.4
VEGF_CKP	NIMLPFWG	NRDFL	QYYQS	1	2.5	34.9

[0635]

9.54.48	(SEQ ID NO:33)	(SEQ ID NO:303)	(SEQ ID NO:45)			
VEGF_CKP 9.54.51	NIMLPFWG (SEQ ID NO:33)	GWDQF (SEQ ID NO:304)	QYYQS (SEQ ID NO:45)	1	2.5	44.5
VEGF_CKP 9.54.56	NIMLPFWG (SEQ ID NO:33)	GKDFH (SEQ ID NO:305)	QYYQS (SEQ ID NO:45)	1	2.3	35.8
VEGF_CKP 9.54.59	NIMLPFWG (SEQ ID NO:33)	GPDLQ (SEQ ID NO:96)	QYYQS (SEQ ID NO:45)	1	2.3	35.4
VEGF_CKP 9.54.64	NIMLPFWG (SEQ ID NO:33)	SGDFA (SEQ ID NO:306)	QYYQS (SEQ ID NO:45)	1	2.2	22.4
VEGF_CKP 9.54.69	NIMLPFWG (SEQ ID NO:33)	GKELN (SEQ ID NO:307)	QYYQS (SEQ ID NO:45)	1	2.5	21.7
VEGF_CKP 9.54.76	NIMLPFWG (SEQ ID NO:33)	GWSMD (SEQ ID NO:308)	QYYQS (SEQ ID NO:45)	1	2.7	42.2
VEGF_CKP 9.54.87	NIMLPFWG (SEQ ID NO:33)	GYDLQ (SEQ ID NO:309)	QYYQS (SEQ ID NO:45)	1	2.4	26.1
VEGF_CKP 9.54.90	NIMLPFWG (SEQ ID NO:33)	GRDFE (SEQ ID NO:97)	QYYQS (SEQ ID NO:45)	1	2.3	29.5

[0636] *S/N＝相比于BSA对照的信噪比

[0637] 表27:基于VEGF_CKP9.63框架的亲和力成熟的结合VEGF-A的环2变体

[0638] *S/N＝相比于BSA对照的信噪比

[0639]

变体	环 1	环 2	环 5	ELISA	S/N*
VEGF_CKP9	QLMQPFWG (SEQ ID NO:10)	GRDLQ (SEQ ID NO:322)	HWYQS (SEQ ID NO:17)		
VEGF_CKP9 .63	DVMQPYWG (SEQ ID NO:35)	GVDLS (SEQ ID NO:323)	HWYNS (SEQ ID NO:46)		
VEGF_CKP9 .63.1	DVMQPYWG (SEQ ID NO:35)	GPDID (SEQ ID NO:118)	HWYNS (SEQ ID NO:46)	2.0	25.2
VEGF_CKP9 .63.2	DVMQPYWG (SEQ ID NO:35)	GDDLE (SEQ ID NO:324)	HWYNS (SEQ ID NO:46)	2.0	15.0
VEGF_CKP9 .63.3	DVMQPYWG (SEQ ID NO:35)	GVDMT (SEQ ID NO:325)	HWYNS (SEQ ID NO:46)	1.7	20.7
VEGF_CKP9 .63.12	DVMQPYWG (SEQ ID NO:35)	GMDIE (SEQ ID NO:326)	HWYNS (SEQ ID NO:46)	2.6	39.9
VEGF_CKP9 .63.14	DVMQPYWG (SEQ ID NO:35)	DGDYQ (SEQ ID NO:327)	HWYNS (SEQ ID NO:46)	1.5	21.3
VEGF_CKP9 .63.15	DVMQPYWG (SEQ ID NO:35)	GNDVS (SEQ ID NO:328)	HWYNS (SEQ ID NO:46)	1.5	21.4
VEGF_CKP9 .63.16	DVMQPYWG (SEQ ID	GRDMD (SEQ ID	HWYNS (SEQ ID	2.2	10.3

[0640]

	NO:35)	NO:119)	NO:46)		
VEGF_CKP9.63.18	DVMQPYWG (SEQ ID NO:35)	AGDEL (SEQ ID NO:329)	HWYNS (SEQ ID NO:46)	2.3	17.3
VEGF_CKP9.63.24	DVMQPYWG (SEQ ID NO:35)	GLDEE (SEQ ID NO:330)	HWYNS (SEQ ID NO:46)	1.6	20.4
VEGF_CKP9.63.27	DVMQPYWG (SEQ ID NO:35)	DGDFD (SEQ ID NO:331)	HWYNS (SEQ ID NO:46)	2.1	26.0
VEGF_CKP9.63.30	DVMQPYWG (SEQ ID NO:35)	AGDFE (SEQ ID NO:332)	HWYNS (SEQ ID NO:46)	2.0	26.0
VEGF_CKP9.63.37	DVMQPYWG (SEQ ID NO:35)	EMDFD (SEQ ID NO:120)	HWYNS (SEQ ID NO:46)	0.6	8.6
VEGF_CKP9.63.39	DVMQPYWG (SEQ ID NO:35)	GNSFE (SEQ ID NO:333)	HWYNS (SEQ ID NO:46)	1.6	18.9
VEGF_CKP9.63.42	DVMQPYWG (SEQ ID NO:35)	GQDLT (SEQ ID NO:334)	HWYNS (SEQ ID NO:46)	1.7	23.1
VEGF_CKP9.63.44	DVMQPYWG (SEQ ID NO:35)	GENLA (SEQ IDNO:335	HWYNS (SEQ ID NO:46)	1.7	19.5
VEGF_CKP9.63.47	DVMQPYWG (SEQ ID NO:35)	GQDYN (SEQ ID NO:336)	HWYNS (SEQ ID NO:46)	1.7	20.7
VEGF_CKP9.63.50	DVMQPYWG (SEQ ID	GADLS (SEQ ID	HWYNS (SEQ ID	0.9	12.7

[0641]

	NO:35)	NO:337)	NO:46)		
VEGF_CKP9.63.54	DVMQPYWG (SEQ ID NO:35)	GFDMD (SEQ ID NO:338)	HWYNS (SEQ ID NO:46)	1.4	19.9
VEGF_CKP9.63.56	DVMQPYWG (SEQ ID NO:35)	GESLS (SEQ ID NO:211)	HWYNS (SEQ ID NO:46)	1.8	8.4
VEGF_CKP9.63.62	DVMQPYWG (SEQ ID NO:35)	DLNYE (SEQ ID NO:339)	HWYNS (SEQ ID NO:46)	1.8	25.4
VEGF_CKP9.63.65	DVMQPYWG (SEQ ID NO:35)	GRDLQ (SEQ ID NO:322)	HWYNS (SEQ ID NO:46)	2.0	27.1
VEGF_CKP9.63.69	DVMQPYWG (SEQ ID NO:35)	GVDLS (SEQ ID NO:323)	HWYNS (SEQ ID NO:46)	2.9	23.7
VEGF_CKP9.63.87	DVMQPYWG (SEQ ID NO:35)	GPDID (SEQ ID NO:118)	HWYNS (SEQ ID NO:46)	0.9	8.6

[0642] 表28.VEGF_CKP9.54-和VEGF_CKP9.63-衍生的环2变体对VEGF-A的抑制活性

[0643]

变体	环 1	环 2	环 5	KDR-VEGF IC_{50} (nM)	细胞 IC_{50} (nM)
VEGF_CKP9	QLMQPFWG (SEQ ID NO:10)	KQDSD (SEQ ID NO:93)	HWYQS (SEQ ID NO:17)	569	11700
VEGF_CKP9.54	NIMLPFWG (SEQ ID	KQDSD (SEQ ID	QYYQS (SEQ ID	5.8	188

[0644]

	NO:33)	NO:93)	NO:45)		
VEGF_CKP9.54.1	NIMLPFWG (SEQ ID NO:33)	GQSFE (SEQ ID NO:94)	QYYQS (SEQ ID NO:45)	0.2	1.47
VEGF_CKP9.54.2	NIMLPFWG (SEQ ID NO:33)	GLDYD (SEQ ID NO:95)	QYYQS (SEQ ID NO:45)	0.2	4.3
VEGF_CKP9.54.59	NIMLPFWG (SEQ ID NO:33)	GPDLQ (SEQ ID NO:96)	QYYQS (SEQ ID NO:45)	0.5	3.06
VEGF_CKP9.54.90	NIMLPFWG (SEQ ID NO:33)	GRDFE (SEQ ID NO:97)	QYYQS (SEQ ID NO:45)	0.2	1.35
VEGF_CKP9.63	DVMQPYWG (SEQ ID NO:35)	KQDSD (SEQ ID NO:93)	HWYNS (SEQ ID NO:46)	10.8	140
VEGF_CKP9.63.1	DVMQPYWG (SEQ ID NO:35)	GENFL (SEQ ID NO:117)	HWYNS (SEQ ID NO:46)	0.4	0.49
VEGF_CKP9.63.27	DVMQPYWG (SEQ ID NO:35)	GRDMD (SEQ ID NO:119)	HWYNS (SEQ ID NO:46)	0.3	5.28
VEGF_CKP9.63.44	DVMQPYWG (SEQ ID NO:35)	EMDFD (SEQ ID NO:120)	HWYNS (SEQ ID NO:46)	0.2	2.05
VEGF_CKP9.63.69	DVMQPYWG (SEQ ID NO:35)	GESLS (SEQ ID NO:211)	HWYNS (SEQ ID NO:46)	2.1	26.4
VEGF_CKP9.63.1	DVMQPYWG (SEQ ID	GPDID (SEQ ID	HWYNS (SEQ ID	0.7	1.83

[0645]

2	NO:35)	NO:118)	NO:46)		

[0646] VEGF_CKP9.63.1、VEGF_CKP9.63.27、VEGF_CKP9.63.44、VEGF_CKP9.63.69和VEGF_

CKP9.63.12对hVEGF-A(8-109)的亲和力/效力显示于如下表29中。

[0647] 表29

[0648]

变体	k_a	k_d	K_D
EM63	0.16±0.03	1.6±0.5	100±9nM
L2.9.63.1	6±1	0.37±0.13	5.8±1.2
L2.9.63.12	8±1	0.10±0.04	1.1±0.2
L2.9.63.27	11±4	0.15±0.04	1.4±0.2
L2.9.63.44	10±2	0.11±0.02	1.2±0.2
L2.9.63.69	3±1	0.20±0.04	6.9±0.7

[0649] 变体VEGF_CKP9.54.90(参见表26的第2行)和VEGF_CKP9.63.12(参见表27的第6行)以及亲本变体VEGF_CKP9.54(参见表24的第12行)和VEGF_CKP9.63(参见表24的第15行)以相似的亲和力结合人、小鼠、大鼠和兔VEGF-A,如通过表面等离子共振所确定的。参见如下表30。

[0650] 表30:VEGF_CKP9.54.90、VEGF_CKP9.63.12、VEGF_CKP9.54和VEGF_CKP9.63对多种VEGF同种型的结合动力学和亲和力。

[0651]

变体	**VEGF 同种型**	**ka**	**ka (误差)**	**kd**	**kd (误差)**	**KD (nM)**	**KD (误差)**
9.54	人 8-109	$1.26x10^6$	$1.10x10^5$	$2.18x10^{-1}$	$1.19x10^{-2}$	175.88	18.21
	人 165	$8.23x10^5$	$1.11x10^5$	$1.49x10^{-1}$	$1.29x10^{-2}$	189.67	34.57
	小鼠 164	$8.26x10^5$	$2.93x10^4$	$2.07x10^{-1}$	$2.44x10^{-2}$	249.87	21.19
	大鼠	$1.93x10^6$	$8.91x10^5$	$2.96x10^{-1}$	$9.36x10^{-2}$	175.64	26.27
	兔	$2.10x10^6$	$7.12x10^5$	$2.74x10^{-1}$	$9.14x10^{-2}$	133.22	9.47
9.54.90	人 8-109	$5.15x10^7$	$1.62x10^7$	$4.05x10^{-2}$	$8.77x10^{-3}$	0.87	0.13
	人 165	$1.58x10^7$	$3.87x10^6$	$1.33x10^{-2}$	$1.70x10^{-3}$	0.89	0.10
	小鼠 164	$8.71x10^6$	$2.79x10^6$	$1.01x10^{-2}$	$2.12x10^{-3}$	1.31	0.24
	大鼠	$1.72x10^7$	$7.43x10^6$	$1.35x10^{-2}$	$3.33x10^{-3}$	0.90	0.14

[0652]

	兔	$5.15x10^{7}$	$1.36x10^{7}$	$6.75x10^{-2}$	$8.99x10^{-3}$	1.14	0.18
9.63	人 8-109	$6.62x10^{5}$	$9.83x10^{4}$	$1.81x10^{-1}$	$2.56x10^{-2}$	281.44	43.53
	人 165	$3.40x10^{5}$	$2.79x10^{4}$	$1.30x10^{-1}$	$1.33x10^{-2}$	381.89	19.15
	小鼠 164	$5.57x10^{5}$	$4.60x10^{4}$	$1.60x10^{-1}$	$1.35x10^{-2}$	288.75	11.08
	大鼠	$4.56x10^{5}$	$1.49\ x10^{5}$	$2.46x10^{-1}$	$9.23x10^{-2}$	523.93	25.06
	兔	$4.24x10^{5}$	$3.22x10^{4}$	$1.30x10^{-1}$	$1.95x10^{-2}$	311.43	52.25
9.63.12	人 8-109	$6.54x10^{6}$	$7.25x10^{5}$	$2.50x10^{-2}$	$3.45x10^{-3}$	3.20	0.22
	人 165	$4.65x10^{6}$	$8.39x10^{5}$	$2.01x10^{-2}$	$3.95x10^{-3}$	4.32	0.15
	小鼠 164	$1.04x10^{6}$	$2.81x10^{5}$	$1.32x10^{-2}$	$3.04x10^{-3}$	13.07	1.74
	大鼠	$6.44x10^{6}$	$3.87x10^{6}$	$2.59x10^{-2}$	$1.01x10^{-2}$	5.74	1.54
	兔	$6.91x10^{6}$	$1.35x10^{6}$	$1.78x10^{-2}$	$4.46x10^{-3}$	2.54	0.40

[0653] VEGF_CKP9.54.90还对VEGF-A具有高选择性并且不结合其他VEGF同种型(诸如VEGF-B、VEGF-C和VEGF-D)或其他生长因子(诸如P1GF、EGF、NGF、IGF和PDGF)或抑制其活性。如图2A和2B中所示,变体VEGF_CKP9.54.90破坏VEGF-A与KDR之间的相互作用以及VEGF-A与Flt-1之间的相互作用,但是不破坏VEGF-B与Flt-1之间、VEGF-C与Flt-4之间、VEGF-D与Flt-4之间、PIGF-2与Flt-1之间、EGF与EGFR之间、PDGF与PDGFR之间、NGF与NGFR之间或IGF与IGFR之间的相互作用。

[0654] 不同于EETI-II,VEGF_CKP9.54.90、VEGF_CKP9.54和VEGF_CKP9.63.12不抑制胰蛋白酶活性,如肽底物切割测定中测量的(Stanger等人(2014)FEBS Lett.588(23),4487-96)。参见图3。然而,VEGF_CKP9.54.90和VEGF_CKP9.63.12维持一定程度的对胰蛋白酶消化的抗性(参见图4)。在与胰蛋白酶在37℃温育24h之后,约20%的VEGF_CKP9.54.90在环2内的Arg13处切割。

[0655] VEGF_CKP9.54、VEGF_CKP9.63和VEGF_CKP9.54.90各自大致含有3个转角的α-螺旋并且各自采用与野生型EETI-II不同的二硫键特征(VEGF_CKP9.54.90的C1-C4、C2-C3、C5-C6相对于野生型EETI-II的C1-C4、C2-C5、C3-C6)。参见图5。在螺旋的一侧上,VEGF_CKP9.54.90形成由两个二硫键(C1-C4和C2-C3)桥接的稠合二环结构,涵盖环1、2和3以及α-螺旋的约1.5个转角。环5形成在螺旋的相对侧上并且受C5-C6二硫键约束。

[0656] 获得VEGF_CKP9.54、VEGF_CKP9.63和VEGF_CKP9.54.90与VEGF-A复合的共晶结构。VEGF_CKP9.54、VEGF_CKP9.63和VEGF_CKP9.54.90与VEGF-A复合的共晶结构高度相似。关于VEGF_CKP9.54与VEGF-A复合的共晶结构,参见图5和6。鉴于VEGF_CKP9.54、VEGF_CKP9.63和VEGF_CKP9.54.90的结构高度相似(参见图5和6),用VEGF_CKP9.54.90进行进一步研究。由VEGF_CKP9.54.90的残基Phe15-Tyr26限定的螺旋与VEGF-A表面形成广泛疏水性和极性相互作用(参见如下表31)。另外,存在主链H键的网络,其在约3个转角的α-螺旋内形成并且使其稳定。一般而言,VEGF_CKP9.54.90展现由分子内极性和疏水性接触(包括主链-主链、侧链-主链和侧链-侧链相互作用)稳定的紧凑且刚性的结构(表32)。接触VEGF-A的VEGF_CKP9.54.90的表面本质上主要是疏水性的,具有极少的极性侧链(表31),而不与VEGF-A相

互作用的肽的相对表面是暴露于溶剂的并且本质上主要是极性的。

[0657] 表31:处于VEGF-A二聚体的4Å内的VEGF_CKP9.54.90残基

[0658]

处于 VEGF-A 二聚体的 4Å 内的 VEGF_CKP9.54.90 残基	
VEGF_CKP9.54.90 (链 1)	VEGF_CKP9.54.90 (链 2)
I4	I4
M5	M5
L6	L6
P7	P7
F8	F8
W9	W9
R13	R13
D14	D14

[0659]

F15	F15
L18	L18
A19	A19
V22	V22
C23	C23
Y25	Y25
Y26	Y26
Q27	Q27
S28	S28
G30	G30

[0660] 表32:VEGF_CKP9.54.90分子内相互作用的总结

[0661]

残基 1	残基 2	备注
Cys2	Cys21	二硫键
Asn3	Trp9	主链 H 键
Asn3	Met5	Asp3 与 M5 主链氮形成 H 键
Asn3	Leu6	主链 H 键
Leu6	Trp9	主链 H 键
Pro7	Gly10	主链 H 键
Phe8	Cys11	主链 H 键
Phe8	Leu18	范德瓦尔斯相互作用
Trp9	Ile4、Leu18、Val22、Tyr25、Tyr26	核心 Trp 形成范德瓦尔斯相互作用的网络
Cys11	Cys17	二硫键
Gly12	Asp14	主链 H 键
Asp14	Glu16、C17	Asp14 与螺旋的 N 末端形成稳定 H 键
Phe15	Leu18、Ala19	使螺旋稳定的范德瓦尔斯相互作用
Leu18	Val22	使螺旋稳定的范德瓦尔斯相互作用
Val22	Tyr26	使螺旋稳定的范德瓦尔斯相互作用
Phe15 – Tyr26		使约 3 个转角的螺旋稳定的主链 H 键形式的网络

[0662]

Cys23	Cys29	二硫键
Tyr25	Tyr26	使螺旋稳定的范德瓦尔斯相互作用
Gln27	Cys23	主链 H 键
Ser28	Cys23	主链 H 键

[0663] VEGF_CKP9.54.90在VEGF-A上的结合界面与天然受体和G6.31抗体的结合界面重叠(图7和8)。VEGF-A上处于肽界面中的接触残基总结于表33中并且显示于图9。VEGF-A上的VEGF_CKP9.54.90结合表位与雷珠单抗(ranibizumab)和贝伐单抗不同(图10),这两种单抗不结合小鼠或大鼠VEGF-A,因为它们与人VEGF-A的相互作用依赖于关键Gly88残基,其在啮齿动物中被Ser取代。VEGF_CKP9.54.90的结合模式表明其实质上不依赖于Gly88,并且该观点以下观察证实:所述肽有效地结合人和啮齿动物VEGF-A二者。利用定点突变诱变来证实从晶体结构观察到的蛋白质-肽界面中的许多接触。正如预期的,VEGF-A上的Y21A、Q89A和

F17A/M81A突变导致VEGF_CKP9.54.90在VEGF-A上的结合减少。参见图11。然而,K48A突变使VEGF_CKP9.54.90的结合增强约2-3倍,该性能类似于使用G6.31抗体所观察到的(Fuh等人(2006)J.Biol.Chem.281,6625-6631)。参见如下表34和图11。

[0664] 表33.处于VEGF_CKP9.54.90的4Å内的VEGF-A二聚体残基

[0665]

处于 VEGF_CKP9.54.90 的 4Å 内的 VEGF-A 二聚体残基	
VEGF-A (二聚体链 A)	VEGF-A (二聚体链 B)
	V14
	V15
F17	F17
M18	M18
	D19
Y21	Y21
Q22	Q22
Y25	Y25
I46	I46
K48	K48
N62	N62
D63	D63
L66	L66
M81	M81
I83	I83
K84	K84
P85	P85
H86	H86
Q87	Q87
G88	G88
Q89	Q89
I91	
	C104
	R105
P106	P106

[0666] 表34:VEGF_CKP9.54.90、VEGF_CKP9.63.12、VEGF_CKP9.54和VEGF_CKP9.63对于多种hVEGF-A变体的结合动力学和亲和力。

[0667]

变体	VEGF 突变体	ka	ka (误差)	kd	kd (误差)	KD (nM)	KD (误差)
9.54.90	WT	$7.81x10^{7}$	$1.86x10^{7}$	0.0300	$9.79x10^{-3}$	0.37	0.09
	Y21A	$3.72x10^{7}$	$1.30x10^{7}$	0.1202	$2.44x10^{-2}$	3.50	0.30
	K48A	$6.04x10^{7}$	$2.12x10^{7}$	0.0116	$3.77x10^{-3}$	0.19	0.02
	Q89A	$1.71x10^{7}$	$8.38x10^{6}$	0.1458	$5.99x10^{-2}$	8.80	0.45
	F17A/M81A						
9.63.12	WT	$8.43x10^{6}$	$1.47x10^{6}$	0.0096	0.0035	1.07	0.20
	Y21A	$1.99x10^{7}$	$6.84x10^{6}$	$1.48x10^{-1}$	$3.13x10^{-2}$	9.84	4.41
	K48A	$5.30x10^{7}$	$3.77x10^{7}$	0.017	0.013	0.33	0.01
	Q89A	$7.43x10^{6}$	$2.09x10^{6}$	0.47	$2.71x10^{-1}$	36.49	1.62
	F17A/M81A						
9.54	WT	$4.10x10^{6}$	$8.59x10^{5}$	0.2349	0.0778	55	7
	Y21A	$6.63x10^{5}$	$6.39x10^{3}$	0.2101	0.0389	317	56
	K48A	$2.64x10^{6}$	$2.24x10^{5}$	0.0587	0.0010	22	3
	Q89A	$3.37x10^{5}$	$1.41x10^{5}$	0.7932	0.5101	1882	460
	F17A/M81A						
9.63	WT	$1.57x10^{6}$	$3.14x10^{5}$	0.1624	0.05	100.34	9.40
	Y21A	$7.52x10^{5}$	$2.45x10^{5}$	0.4814	$2.13x10^{-1}$	584.85	112.171
	K48A	$5.72x10^{5}$	$1.75x10^{5}$	0.02	$5.24x10^{-3}$	28.4	4.8
	Q89A	$2.66x10^{5}$	$8.01x10^{4}$	0.51	$1.22x10^{-1}$	1999.8	127.5
	F17A/M81A						

[0668] 接下来,评价VEGF-A结合变体VEGF_CKP9.54.90、VEGF_CKP9.63.12和VEGF_CKP9.63.44在脉络膜新生血管生成的VEGF-A驱动模型中的体内效力。在大鼠眼睛中产生激光灼伤斑,并且在14天周期之后在存在或不存在以不同间隔经玻璃体内施用的肽的情况下检测新血管形成。肽VEGF_CKP9.54.90显示对大鼠眼睛中的激光诱导的脉络膜新生血管生成的有效抑制,如通过与对照眼睛相比在经肽治疗的新生血管面积上的显著降低所测量的。参见图12。

[0669] VEGF_CKP9.54.90与VEGF-A复合的共晶结构揭示:环3和4中的天然氨基酸残基就结合VEGF-A而言不必需呈最佳取向(参见图9),并且可以经修饰以增强其与VEGF-A表面的相互作用或在肽内引发能够改善肽折叠和稳定性的分子内相互作用。因此,在进一步改善先导分子的效力和性能的目标下,基于9.54、54.1和9.63、63.12的序列构建新噬菌体文库,其中仅使环3和4随机化。尽管稍弱于先导分子,但是仍选择这些特定框架以便在分析中允许充分的动态范围以检测亲和力的改善。鉴定了仅在环3和4中含有变化的许多新克隆,其

显示对VEGF-A的改善的结合。选择所得序列中的十四个并且将其移植到先导VEGF_CKP9.54.90或VEGF_CKP9.63.12分子内的环3和4上,并且随后产生呈折叠形式的对应可溶性分子。十四个亲和力成熟的变体的氨基酸序列提供于如下表35中。表35:基于VEGF_CKP9.54.90或VEGF_CKP9.63.12框架的亲和力成熟的结合VEGF-A的环3/环4变体

[0670]

变体	环 1	环 2	环 3	环 4	环 5
9.54.90.7	NIMLPFWG (SEQ ID NO:33)	GRDFE (SEQ ID NO:97)	LQQ	I	QYYQS (SEQ ID NO:45)
9.54.90.10	NIMLPFWG (SEQ ID NO:33)	GRDFE (SEQ ID NO:97)	VER	I	QYYQS (SEQ ID NO:45)
9.54.90.12	NIMLPFWG (SEQ ID NO:33)	GRDFE (SEQ ID NO:97)	MSD	I	QYYQS (SEQ ID NO:45)
9.54.90.13	NIMLPFWG (SEQ ID NO:33)	GRDFE (SEQ ID NO:97)	MNQ	I	QYYQS (SEQ ID NO:45)
9.54.90.25	NIMLPFWG (SEQ ID NO:33)	GRDFE (SEQ ID NO:97)	MQT	I	QYYQS (SEQ ID NO:45)
9.54.90.31	NIMLPFWG (SEQ ID NO:33)	GRDFE (SEQ ID NO:97)	VYQ	I	QYYQS (SEQ ID NO:45)
9.54.90	NIMLPFWG	GRDFE	FIN	I	QYYQS

[0671]

.44	(SEQ ID NO:33)	(SEQ ID NO:97)			(SEQ ID NO:45)
9.54.90 .53	NIMLPFWG (SEQ ID NO:33)	GRDFE (SEQ ID NO:97)	VSQ	I	QYYQS (SEQ ID NO:45)
9.54.90 .55	NIMLPFWG (SEQ ID NO:33)	GRDFE (SEQ ID NO:97)	VTE	I	QYYQS (SEQ ID NO:45)
9.54.90 .62	NIMLPFWG (SEQ ID NO:33)	GRDFE (SEQ ID NO:97)	FYE	I	QYYQS (SEQ ID NO:45)
9.54.90 .67	NIMLPFWG (SEQ ID NO:33)	GRDFE (SEQ ID NO:97)	MEQ	I	QYYQS (SEQ ID NO:45)
9.54.90 .71	NIMLPFWG (SEQ ID NO:33)	GRDFE (SEQ ID NO:97)	VYR	I	QYYQS (SEQ ID NO:45)
9.63.12 .8	DVMQPYWG (SEQ ID NO:35)	GPDID (SEQ ID NO:118)	FVR	L	HWYNS (SEQ ID NO:46)
9.63.12 .12	DVMQPYWG (SEQ ID NO:35)	GPDID (SEQ ID NO:118)	LSN	I	HWYNS (SEQ ID NO:46)

[0672] 含有L3/L4变化的所有可溶性分子在细胞测定中均显示出相对于54.90或63.12.12的改善的效力。三个先导分子,VEGF_CKP9.54.90.67、VEGF_CKP9.54.90.53和VEGF_CKP9.63.12.12,具有在约0.5至约1nM的范围内的细胞IC_{50}值。参见图13和如下表36。

[0673] 表36:表35中的变体的IC_{50}值

[0674]

变体	细胞 IC_{50} (nM)	相对于变体 9.54.90 的倍数提高
9.54.90	1.35	1
9.54.90.12	1.20	1.125
9.54.90.13	0.96	1.41
9.54.90.25	1.26	1.07
9.54.90.44	1.16	1.16
9.54.90.62	0.92	1.47
9.54.90.67	1.10	1.23

[0675]

9.63.12	1.83	0.74
9.63.12.8	N/D	
9.63.12.12	0.56	2.41

[0676] VEGF_CKP9.63与VEGF-A复合的共晶结构揭示:环1内的位置8处的Tyr残基能够与VEGF-A上的Gln22的侧链形成氢键。参见图14。在来源于VEGF_CKP9.54的变体(诸如表35中的变体)中,位置8处的氨基酸是Phe。因此,我们设法在表35中的一些变体中将Phe8突变成Tyr I,目的在于改善所得F8Y变体的亲和力和/或溶解度。F8Y突变显示对一些分子(例如VEGF_CKP9.54.1.F8Y、VEGF_CKP9.54.90.F8Y和VEGF_CKP9.54.90.67.F8Y)的亲和力/效力的适度改善,而在极少的其它情况中,其显示极小的或略微负面的效应(例如VEGF_CKP9.54.90.13.F8Y和VEGF_CKP9.54.90.62.F8Y)。参见表37,其中比较某些变体的结合亲和力(如通过表面等离子共振所确定的),以及表38,其中比较某些变体的效力(如通过细胞IC_{50}所确定的)。F8Y取代有助于将VEGF_CKP9.54.90.67.F8Y的溶解度提高约2mg/ml。选择VEGF_CKP9.54.90.67.F8Y用于进一步的跟进研究。

[0677] 表37:VEGF_CKP9.54.1.F8Y、VEGF_CKP9.54.90.F8Y、

[0678] VEGF_CKP9.54.90.67.F8Y、VEGF_CKP9.54.90.13.F8Y和

[0679] VEGF_CKP9.54.90.62.F8Y对VEGF-A的结合动力学和亲和力

[0680]

变体	k_a	k_d	K_D
VEGF_CKP9	1.2±0.3	40±20	5±1μM
VEGF_CKP9.54	3.4±0.2	2.3±0.8	44±6nM
VEGF_CKP9.54.1	15±2	0.36±0.17	2.2±0.7nM
VEGF_CKP9.54.1.F8Y	53±12	0.38±0.06	0.78±0.11nM
VEGF_CKP9.54.90	63±16	0.17±0.05	0.40±0.08nM
VEGF_CKP9.54.90.F8Y	70±10	0.27±0.01	0.40±0.05nM
VEGF_CKP9.54.90-Alkyn	50±0.3	0.27±0.004	0.49±0.05nM

[0681] 如下分析各种CKP变体的氧化稳定性:将5μL含有11mM AAPH(Calbiochem目录号100110)的水添加至50uL的变体肽样品(制备为20mM组氨酸乙酸盐(pH 5.5)中的1mg/mL肽),并且将混合物在40℃温育16小时。在温育结束时,通过添加27.5uL的40mM甲硫氨酸来猝灭样品,随后添加160ul的20mM组氨酸盐酸盐、100mM蔗糖(pH 5.5)以稀释样品。通过LC-MS分析反应物。

[0682] 据观察,VEGF_CKP9.54.90在环1内的Met5处经历了约30%的氧化。用非天然氨基酸正亮氨酸置换Met 5使得VEGF_CKP9.54.90具有完全的抗氧化性。用正亮氨酸置换Met5还对结合效率具有良好效应(约2倍提高)。产生变体VEGF_CKP9.54.90.67F8Y M5Nle、VEGF_CKP9.54.90.53M5Nle和VEGF_CKP9.63.12.12M5Nle。Met5Nle变体的所有三个Met5Nle均显示与其亲本分子相比细胞效力上适度提高约1.5-2倍。

[0683] 接下来,评价VEGF_CKP9.54.90的环1中的Trp9处的基于萘的氨基酸取代对VEGF-A结合亲和力的影响。VEGF_CKP9.54.90与VEGF复合的晶体结构表明VEGF_CKP9.54.90(及来源于此的变体)的Trp9残基与VEGF-A表面相互作用,而剩余空间可能允许较大的环系统融入。为了测试该假设,我们产生了VEGF_CKP9.54.90的可溶性变体,其中用1-或2-萘基异构体置换Trp9的吲哚环。这些分子显示出相对于亲本VEGF_CKP9.54.90的细胞效力降低。关于包含F8Y取代和/或非天然氨基酸取代的来源于VEGF_CKP9.54.90的变体的功效的其它数据提供在表38中:

[0684] 表38:包含F8Y取代和/或非天然氨基酸取代的来源于VEGF_CKP9.54.90的变体的

IC_{50}值。

[0685]

变体	细胞 IC_{50} (nM)	相对于变体 9.54.90 的提高倍数
9.54.90	1.35	1
9.54.90.F8Y	1.58	0.85
9.54.90.F7Y.Δ2G	3.01	0.44
9.54.90.M5.Nle	1.95	0.69
9.54.90.Naph1	5.42	0.24

[0686]

9.54.90.Naph2	17.1	0.08
9.54.90.13	0.96	1.41
9.54.90.13.F8Y	2.02	0.67
9.54.90.62	0.92	1.47
9.54.90.62.F8Y	1.14	1.18
9.54.90.67	1.1	1.23
9.54.90.67.F8Y	0.66	2.05

[0687] 通过剪除N-和C-末端处的两个甘氨酸残基使先导VEGF_CKP9.54.90.F8Y缩短以产生变体VEGF_CKP9.54.90F7YΔ2G),导致细胞效力相对于VEGF_CKP9.54.90略微降低。参见如上表38。

[0688] 实施例2B:包含C-末端氨基酸延伸的结合VEGF-A的非天然存在的EETI-II变体的产生

[0689] 为了鉴定对VEGF-A具有增强的亲和力的其它肽变体,我们选择了9.54(SEQ ID NO:52)、9.54.1(SEQ ID NO:99)分子并且产生了基于这些框架的新噬菌体文库,其中将两个另外的氨基酸添加至其C-末端。

[0690] 从9.54文库中,鉴定了对hVEGF-A(8-109)的结合信号与对BSA(背景)相比为3倍高以上的二十二个克隆(表39)。这些中选者在环2内、在环2和环4内或在环2、环4和环5内含有氨基酸组成变化。

[0691] 表39:基于9.54的C-末端二残基延伸变体

[0692]

克隆 ID	氨基酸序列	SEQ ID NO
9.54	GCNIMLPFWGCKQDSDCLAGCVCQYYQSCG	52
9.54-28	GCNIMLPFWGCKQDFDCLAGCICQYYQSCGFH	455
9.54-39	GCNIMLPFWGCKQDFDCLAGCICQYYQSCGGE	457
9.54-10	GCNIMLPFWGCKQDSDCLVGCICQYYQSCGSI	458
9.54-32	GCNIMLPFWGCKQDFDCLAGCVCQYYQSCGGR	459

[0693]

9.54-13	GCNIMLPFWGCKQDFDCLAGCVCQYYQSCGRP	460
9.54-6	GCNIMLPFWGCKQDFDCLAGCVCQYYQSCGQY	461
9.54-24	GCNIMLPFWGCKQDSDCLAGCVCQYYQSCGEN	462
9.54-34	GCNIMLPFWGCKQDFDCLAGCVCQYYQSCGDT	463
9.54-9	GCNIMLPFWGCKQDFDCLAGCVCQYYQSCGQH	464
9.54-12	GCNIMLPFWGCKQDSDCLAGCICQYYQSCGQN	465
9.54-17	GCNIMLPFWGCKQDSDCLAGCVCQYYQSCGEE	466
9.54-19	GCNIMLPFWGCKQDSDCLAGCVCQYYQSCGDD	467
9.54-43	GCNIMLPFWGCKQDSDCLAGCVCQYYQSCGDG	468
9.54-5	GCNIMLPFWGCKQDFDCLAGCVCQYYQSCGLE	469
9.54-1	GCNIMLPFWGCKQDSDCLAGCVCQYYQSCGTD	470
9.54-4	GCNIMLPFWGCKQDSDCLAGCVCQYYQSCGSE	471
9.54-15	GCNIMLPFWGCKQDSDCLAGCVCQYYQSCGPE	472
9.54-42	GCNIMLPFWGCKQDSDCLAGCVCQYYQSCGTN	473
9.54-27	GCNIMLPFWGCKQDSDCLAGCVCQYYQSCGPH	474
9.54-2	GCNIMLPFWGCKQDSDCLAGCVCQYYQSCGMD	475
9.54-21	GCNIMLPFWGCKQDSDCLAGCVCQYYQSCGSD	476

[0694] 从9.54.1文库中,鉴定对hVEGF-A(8-109)的结合信号与对BSA(背景)相比为3倍高以上的克隆(表40)。

[0695] 表40:基于9.54.1的C-末端二残基延伸变体

[0696]

克隆 ID	氨基酸序列	SEQ ID NO
9.54.1	GCNIMLPFWGCGQSFECLAGCVCQYYQSCG	99
9.54.1-2	GCNIMLPFWGCGQSFECLAGCICQYYQSCGIA	477
9.54.1-63	GCNIMLPFWGCGQSFECLAGCICQYYQSCGGS	478
9.54.1-36	GCNIMLPFWGCGQSFECLAGCICQYYQSCGTR	479
9.54.1-42	GCNIMLPFWGCGQSFECLAGCICQYYQSCGLS	533
9.54.1-90	GCNIMLPFWGCGQSFECLAGCICQYYQSCGVH	480

[0697] 相比于9.54,克隆9.54-28(表39中)显示对hVEGF-A(8-109)的结合亲和力提高约10倍,如噬菌体竞争ELISA(如上所述)所确定的。(参见图15)。相比于9.54.1,克隆9.54.1-2、9.54.1-36、9.54.1-42、9.54.1-63和9.54.1-90(表40中)还显示对hVEGF-A(8-109)的结合亲和力提高约10倍,如噬菌体竞争ELISA所确定的。(参见图15)。

[0698] 选择肽9.63(SEQ ID NO:55)和9.63.44(SEQ ID NO:125)用于如以上所描述的进一步修饰。产生基于这些框架的新噬菌体文库,其中将两个另外的氨基酸添加至其C-末端。

[0699] 从9.63文库中,鉴定了对hVEGF-A(8-109)的结合信号与对BSA(背景)相比为3倍高以上的28个克隆(表41)。这些中选者在环2和环4内含有氨基酸组成变化。

[0700] 表41:基于9.63的C-末端二残基延伸变体

[0701]

克隆 ID	氨基酸序列	SEQ ID NO
9.63	GCDVMQPYWGCKQDSDCLAGCVCHWYNSCG	55
9.63-1	GCDVMQPYWGCKQDFDCLAGCVCHWYNSCGPS	481
9.63-4	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCICHWYNSCGFS	482
9.63-7	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCVCHWYNSCGGK	483
9.63-10	GCDVMQPYWGCKQDFDCLAGCICHWYNSCGYL	484
9.63-16	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCVCHWYNSCGDL	485
9.63-17	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCVCHWYNSCGEK	486
9.63-19	GCDVMQPYWGCKQDSDCLAGCICHWYNSCGTD	487
9.63-20	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCICHWYNSCGQV	488
9.63-21	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCVCHWYNSCGRL	489
9.63-22	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCICHWYNSCGYA	490
9.63-23	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCICHWYNSCGAS	491
9.63-25	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCICHWYNSCGSR	492
9.63-30	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCICHWYNSCGPT	493
9.63-36	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCVCHWYNSCGSL	456

[0702]

9.63-40	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCVCHWYNSCGWD	494
9.63-45	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCVCHWYNSCGSM	495
9.63-61	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCICHWYNSCGTR	496
9.63-62	GCDVMQPYWGCKQDSDCLAGCVCHWYNSCGEN	497
9.63-65	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCVCHWYNSCGNN	498
9.63-66	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCICHWYNSCGPE	499
9.63-67	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCVCHWYNSCGGI	500
9.63-68	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCVCHWYNSCGVE	501
9.63-70	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCVCHWYNSCGPL	503
9.63-72	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCICHWYNSCGTS	527
9.63-74	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCICHWYNSCGRP	504
9.63-77	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCVCHWYNSCGND	505
9.63-79	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCICHWYNSCGLQ	506
9.63-93	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCICHWYNSCGDE	507

[0703] 从9.63.44文库中,鉴定对hVEGF-A(8-109)的结合信号与对BSA(背景)相比为3倍

高以上的17个克隆(表42)。这些中选者在环4内含有氨基酸组成变化。克隆9.63.44-55在环2内含有氨基酸组成变化,并且克隆9.63.44-10在环3内含有氨基酸组成变化。有趣的是,表42中的克隆9.63.44-12和表41中的克隆9.63-70具有相同的氨基酸序列。

[0704] 表42:基于9.63.44的C-末端二残基延伸变体

[0705]

克隆 ID	氨基酸序列	SEQ ID NO
9.63.44	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCVCHWYNSCG	125
9.63.44-2-A	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCICHWYNSCGRT	508
9.63.44-55	GCDVMQPYWGCEIDFDCLAGCVCHWYNSCGQV	509
9.63.44-10-A	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCVCHWYNSCGGI	510
9.63.44-54	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCVCHWYNSCGYM	511
9.63.44-19	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCVCHWYNSCGGQ	512
9.63.44-44	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCVCHWYNSCGTP	513

[0706]

9.63.44-14	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCVCHWYNSCGVN	514
9.63.44-73	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCVCHWYNSCGFN	515
9.63.44-16	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCVCHWYNSCGEP	516
9.63.44-80	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCVCHWYNSCGNS	517
9.63.44-41	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCVCHWYNSCGST	518
9.63.44-82	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCVCHWYNSCGRY	519
9.63.44-1	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCICHWYNSCGFS	520
9.63.44-2	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCICHWYNSCGQV	521
9.63.44-3	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCICHWYNSCGYA	522
9.63.44-4	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCICHWYNSCGSR	523
9.63.44-5	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCICHWYNSCGPT	524
9.63.44-6	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCVCHWYNSCGSM	525
9.63.44-7	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCVCHWYNSCGGI	526
9.63.44-8	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCICHWYNSCGTS	527
9.63.44-9	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCICHWYNSCGLQ	528
9.63.44-10	GCDVMQPYWGCEMDFDCLVGCVCHWYNSCGDE	529
9.63.44-11	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCVCHWYNSCGDL	530
9.63.44-12	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCVCHWYNSCGPL	503
9.63.44-13	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCVCHWYNSCGQF	531
9.63.44-14	GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCICHWYNSCGWK	532

[0707] 相比于9.63.44,克隆9.63.44-1至9.63.44-14(表42中)显示对hVEGF-A(8-109)的改善的结合亲和力,如噬菌体竞争ELISA所确定的。(参见图16A和16B)。

[0708] 总而言之,以上结果表明,通过向其C-末端添加两个氨基酸来延伸先导肽9.54(SEQ ID NO:52)、9.54.1(SEQ ID NO:99)、9.63(SEQ ID NO:55)和9.63.44产生了对hVEGF-A9(8-109)具有约10倍高的结合亲和力的变体。

[0709] 接下来,选择肽9.54.90(SEQ ID NO:102)和63.12.12.M5L(SEQ ID NO:386)用于如以上所描述的进一步修饰。简言之,产生基于9.54.90的新噬菌体文库,其中在C-末端添加两个另外的氨基酸、三个另外的氨基酸或四个另外的氨基酸。产生基于63.12.12.M5L的第二组文库,其中在C-末端添加两个另外的氨基酸。

[0710] 从包含2个氨基酸的C-末端延伸的9.54.90文库中,鉴定对hVEGF-A(8-109)的结合信号与对BSA(背景)相比为3倍高以上的6个克隆(表43)。

[0711] 表43:基于9.54.90的C-末端二残基延伸变体

[0712]

克隆 ID	氨基酸序列	SEQ ID NO
9.54.90	GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG	102
9.54.90-2x28	GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGFH	379
9.54.90-2x2	GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGIA	380
9.54.90-2x63	GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGGS	381
9.54.90-2x36	GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGTR	382
9.54.90-2x90	GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGVH	383
9.54.90-2x42	GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGLS	384

[0713] 从包含3个氨基酸的C-末端延伸的9.54.90文库中,鉴定对hVEGF-A(8-109)的结合信号与对BSA(背景)相比为3倍高以上的10个克隆(表44)。

[0714] 表44:基于9.54.90的C-末端三残基延伸变体

[0715]

克隆 ID	氨基酸序列	SEQ ID NO
9.54.90	GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG	102
9.54.90-3X83	GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGPLI	369
9.54.90-3X50	GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGNYQ	370
9.54.90-3x49	GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGPLQ	371
9.54.90-3x10	GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGTFQ	372
9.54.90-3x91	GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGDLV	373

[0716]

9.54.90-3x42	GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGEHK	374
9.54.90-3x88	GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGYLS	375
9.54.90-3x9	GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGWDY	376
9.54.90-3x13	GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGWPH	377
9.54.90-3x33	GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCGPHQ	378

[0717] 包含4个氨基酸的C-末端延伸的来自9.54.90文库的所有肽均含有3个氨基酸的C-末端延伸。

[0718] 从包含2个氨基酸的C-末端延伸的63.12.12.M5L文库中,鉴定对hVEGF-A(8-109)的结合信号与对BSA(背景)相比为3倍高以上的9个克隆(表45)。

[0719] 表45:基于63.12.12.M5L的C-末端二残基延伸变体

[0720]

克隆 ID	氨基酸序列	SEQ ID NO
63.12.12.M5L	GCDVLQPYWGCGPDIDCLSNCICHWYNSCG	386
63.12.12.M5L.2x2	GCDVLQPYWGCGPDIDCLSNCICHWYNSCGRT	387
63.12.12.M5L.2x77	GCDVLQPYWGCGPDIDCLSNCICHWYNSCGWK	388
63.12.12.M5L.2x48	GCDVLQPYWGCGPDIDCLSNCICHWYNSCGPL	389
63.12.12.M5L.2x25	GCDVLQPYWGCGPDIDCLSNCICHWYNSCGDE	390
63.12.12.M5L.2x69	GCDVLQPYWGCGPDIDCLSNCICHWYNSCGQF	391
63.12.12.M5L.2x12	GCDVLQPYWGCGPDIDCLSNCICHWYNSCGEQ	392
63.12.12.M5L.2x30	GCDVLQPYWGCGPDIDCLSNCICHWYNSCGPT	393
63.12.12.M5L.2x21	GCDVLQPYWGCGPDIDCLSNCICHWYNSCGRL	394
63.12.12.M5L.2x29	GCDVLQPYWGCGPDIDCLSNCICHWYNSCGSL	395

[0721] 实施例2C:包含C-末端氨基酸延伸的结合VEGF-A的非天然存在的EETI-II变体的表征

[0722] 经由如上描述的噬菌体竞争ELISA,测定如上表43-45中提供的变体,以鉴定对hVEGF-A(8-109)具有较大结合亲和力的变体。

[0723] 然后选择对hVEGF(8-109)显示较大亲和力的克隆(例如,诸如表39-45中提供的那些),包括例如9.54.1-2、9.54.1-36、9.54.1-42、9.54.1-63和9.54.1-90以及9.63.44-1至9.63.44-14,用于如以上所描述的进一步体外评价,诸如在噬菌体竞争ELISA和VEGF-KDR相互作用ELISA中的抑制活性。

[0724] 然后经由表面等离子共振分析克隆以确定其对多种VEGF同种型(包括hVEGF-A(8-109)、hVEGF-A165、小鼠VEGF-A164、大鼠VEGF-A和兔VEGF-A)的亲和力。

[0725] 进行进一步分析以评价对VEGF-A的克隆特异性。例如,如以上所描述的用VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、PlGf-2、NGF、EGF、PDGF-β或IGF-1进行竞争ELISA。

[0726] 还测定克隆抑制胰蛋白酶活性的能力,如肽底物切割测定中测量的(Stanger等人(2014)FEBS Lett.588(23),4487-96)。

[0727] 如以上所描述的确定克隆对多种hVEGF突变体(包括例如Y21A、K48A、Q89A和F17A/M81A)的结合动力学和亲和力。

[0728] 接下来,如以上所描述的,在脉络膜新生血管形成的VEGF-A驱动模型中评价克隆的体内效力。

[0729] 如以上所描述的测定变体的氧化稳定性。

[0730] 实施例3:结合LRP6的非天然存在的EETI-II变体的产生

[0731] 实施例2A中描述的幼稚(naïve)EETI-II文库循环通过针对LRP6E1E2蛋白的数轮选择。鉴定出与LRP6 E1E2结合的二十二个独特克隆(表46)。这些初始中选者在环1和环5内含有氨基酸内含物变化。在若干变体中,相比于天然EETI-II框架,环1展现更长的长度。值得注意的是,与LRP6结合的新进化的序列在环1中含有共有基序(NXI),其类似于作为内源性LRP6配体的天然Dkk1分子内存在的基序(NAI)。新进化的变体概括了天然配体中出现的基序。

[0732] 表46:针对LRP6 E1E2的基于EETI-II的结合剂

[0733]

变体	环 1	环 5	ELISA	S/N*
LRP6_CKP1	RTNRVKGG (SEQ ID NO:147)	GPNGF (SEQ ID NO:19)	3.23	45.49
LRP6_CKP2	VNRVRG (SEQ ID NO:148)	SGGRD (SEQ ID NO:169)	3.41	41.62
LRP6_CKP3	MNHVKARR (SEQ ID NO:149)	GPNGF (SEQ ID NO:19)	2.93	40.18
LRP6_CKP4	RSVNKI (SEQ ID NO:150)	GSSRN (SEQ ID NO:170)	2.82	25.39
LRP6_CKP5	VNKIKG (SEQ ID NO:151)	GVEGR (SEQ ID NO:171)	3.04	35.71
LRP6_CKP6	RNSIKR (SEQ ID NO:152)	SVGHG (SEQ ID NO:172)	3.10	37.36
LRP6_CKP7	VSNRVNKG (SEQ ID NO:153)	GPNGF (SEQ ID NO:19)	3.30	28.96
LRP6_CKP8	RGNIIK (SEQ ID NO:154)	NESRG (SEQ ID NO:173)	3.23	37.56
LRP6_CKP9	RSGNTIRKRE (SEQ ID NO:155)	GGPGG (SEQ ID NO:174)	2.97	37.62
LRP6_CKP10	ASSNSIRQGW (SEQ ID NO:156)	GPKSN (SEQ ID NO:175)	3.29	37.38
LRP6_CKP11	RSNRIR (SEQ ID NO:157)	YGHGD (SEQ ID NO:176)	2.65	36.76
LRP6_CKP12	RSNKLREARG (SEQ ID NO:158)	GSRQD (SEQ ID NO:177)	0.60	6.78
LRP6_CKP13	VNSVKR (SEQ ID NO:159)	SRGVN (SEQ ID NO:178)	3.28	37.75
LRP6_CKP14	GSNKIRPR (SEQ ID NO:160)	GPNDF (SEQ ID NO:179)	3.18	43.53

[0734]

LRP6_CKP15	NRIRNS (SEQ ID NO:161)	GRGDY (SEQ ID NO:180)	2.03	26.31
LRP6_CKP16	SRNSIK (SEQ ID NO:162)	ASGSS (SEQ ID NO:181)	3.36	31.11
LRP6_CKP17	SNYVKR (SEQ ID NO:163)	SPGGR (SEQ ID NO:182)	3.09	35.88
LRP6_CKP18	RANRVSGR (SEQ ID NO:164)	GPNGF (SEQ ID NO:19)	1.67	18.32
LRP6_CKP19	SNRVKVRA (SEQ ID NO:165)	GPNGF (SEQ ID NO:19)	3.27	41.96
LRP6_CKP20	ENRTKG (SEQ ID NO:166)	GFRGT (SEQ ID NO:183)	3.10	38.69
LRP6_CKP21	GNKIRA (SEQ ID NO:167)	RDRVG (SEQ ID NO:184)	2.80	33.69
LRP6_CKP22	ANRVKRTS (SEQ ID NO:168)	GPNGF (SEQ ID NO:19)	3.43	42.86

[0735] *S/N＝相比于BSA对照的信噪比

[0736] LRP6的细胞外结构域由与卷曲(Frizzled)受体和Wnt蛋白相互作用以传播Wnt信号传导的四个螺旋桨结构域(E1-E4)组成。利用模块化方法,LRP6分别经由其E1-E2或E3-E4结构域与特定Wnt同种型的选择性结合来区分Wnt1或Wnt3a信号传导(Hannoush等人(2010)J.Biol.Chem.285,9172-9179)。为了在药理学上描绘Wnt1和Wnt3a信号传导臂,我们设法鉴定出选择性地结合LRP6 E1-E2的配体。

[0737] 在鉴定的序列中,产生呈可溶性折叠形式的R1、LRP6_CKP6和LRP6_CKP19以便测试其对Wnt1或Wnt3a信号传导的药理学活性。如以下表47和48中所示,在基于细胞的信号传导报告子测定中,通过R77并未观察到对Wnt1或Wnt3a的显著选择性。在另一方面,如在荧光素酶报告子测定中所测量的,相对于Wnt3a,R1和R19显示出对Wnt1信号传导的选择性抑制(Wnt1相对于Wnt3a,分别为160倍和11倍),这支持了这些变体不靶向LRP6 E3-E4结构域的观点(IC_{50}>44μM)。总而言之,数据突出显示了新进化的变体的特异性及其在模拟天然配体中出现的基序的效应。更重要的是,鉴定的变体提供了查询Wnt1和Wnt3信号传导的药理学手段。

[0738] 表47:结合LRP6的CKP变体对Wnt1信号传导的抑制活性

[0739]

Lrp6-CKP (n=4)	对 Wnt1(5ng/孔)的最佳拟合 IC_{50} (nM)	95%置信区间(nM)
R1 F1	241.7	185.8 至 314.5
R1 F2	193.8	140.1 至 268.2
LRP6_CKP6 F1	22,866	13,593 至 38,463
LRP6_CKP6 F2	23,760	14,458 至 39,046
LRP6_CKP6 F3	4,625	3,037 至 7,044
LRP6_CKP19 F1	23,132	15,397 至 34,754
LRP6_CKP19 F2	49,330	31,391 至 77,520

[0740] 表48:结合LRP6的CKP变体对Wnt3a信号传导的抑制活性

[0741]

Lrp6-CKP (n=4)	对 Wnt3a(25ng/孔)的最佳拟合 IC_{50}(nM)	95%置信区间(nM)
R1 F1	38,594	16,093 至 92,554
R1 F2	16,596	9,037 至 30,478
LRP6_CKP6 F1	350,240	11840 至 $1.036x10^7$
LRP6_CKP6 F2	275,584	24,695 至 $3.075x10^6$
LRP6_CKP6 F3	不收敛	不收敛
LRP6_CKP19 F1	59,287	32,600 至 107,823
LRP6_CKP19 F2	69,827	26,179 至 186,252

[0742] 表47和48中的F1、F2和F3是指分别在R1、LRP6_CKP6和LRP6_CKP19的纯化期间获得的峰馏分1、2和3。

[0743] 前述实施例仅出于说明性目的而提供,并且不旨在以任何方式限制本发明的范围。根据以上描述,除本文中显示和描述的那些修改之外的本发明的各种修改对本领域技术人员将是明显的,并且落入所附权利要求书的范围内。

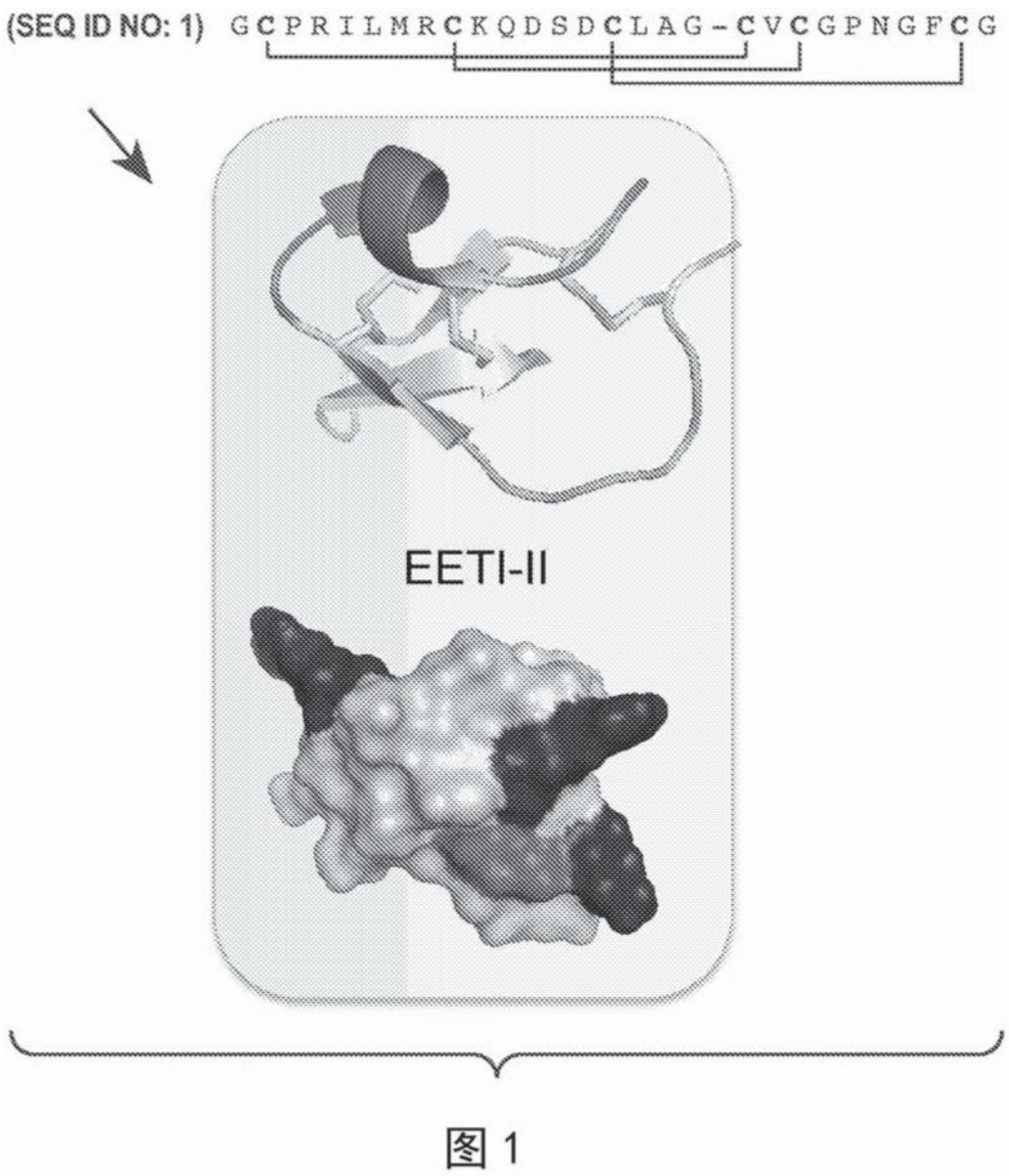


图 1

图1

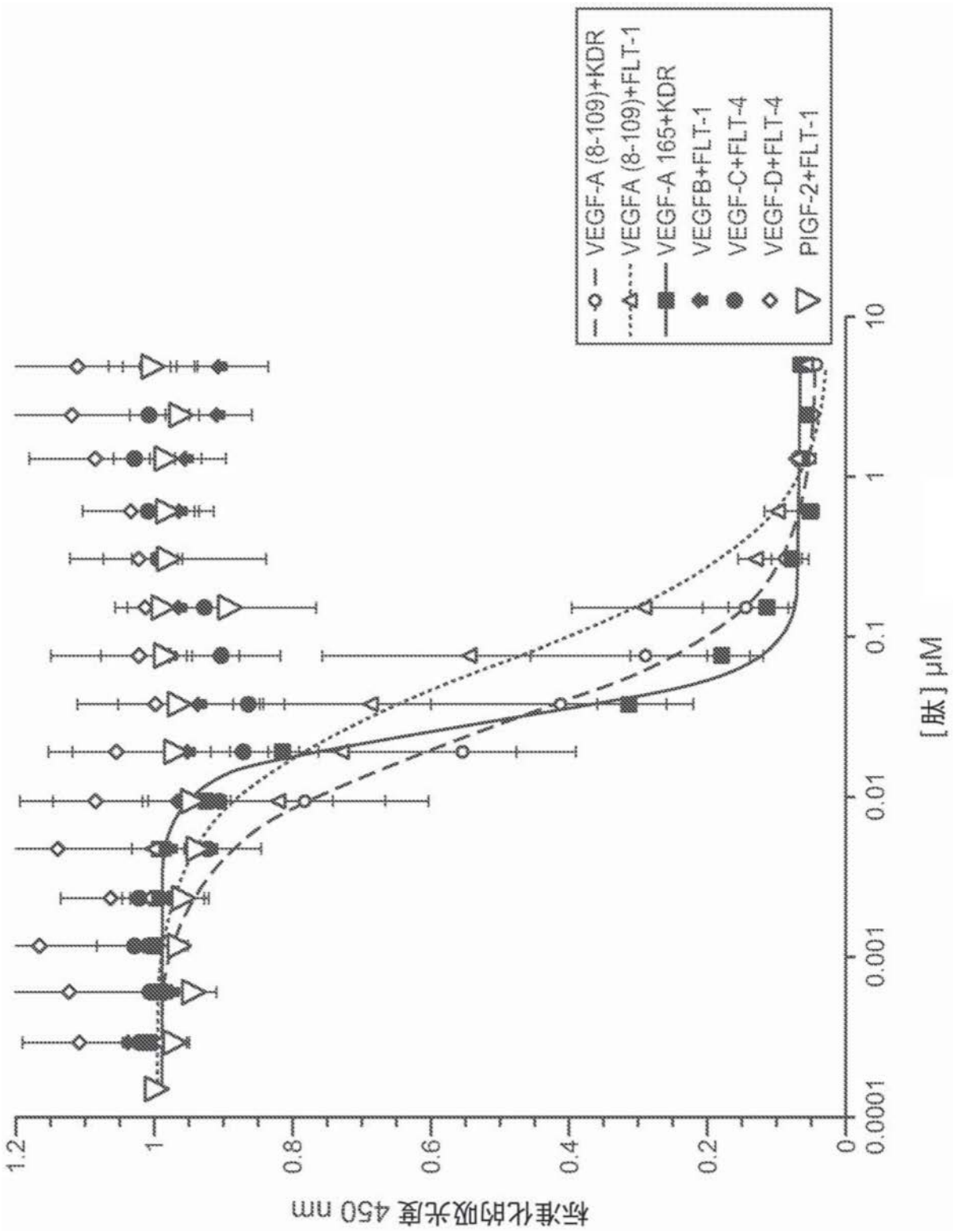

VEGF-A (8-109)+KDR
VEGFA (8-109)+FLT-1
VEGF-A 165+KDR
VEGFB+FLT-1
VEGF-C+FLT-4
VEGF-D+FLT-4
PIGF-2+FLT-1
标准化的吸光度 450 nm
[肽] μM
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
1.2
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10

图2A

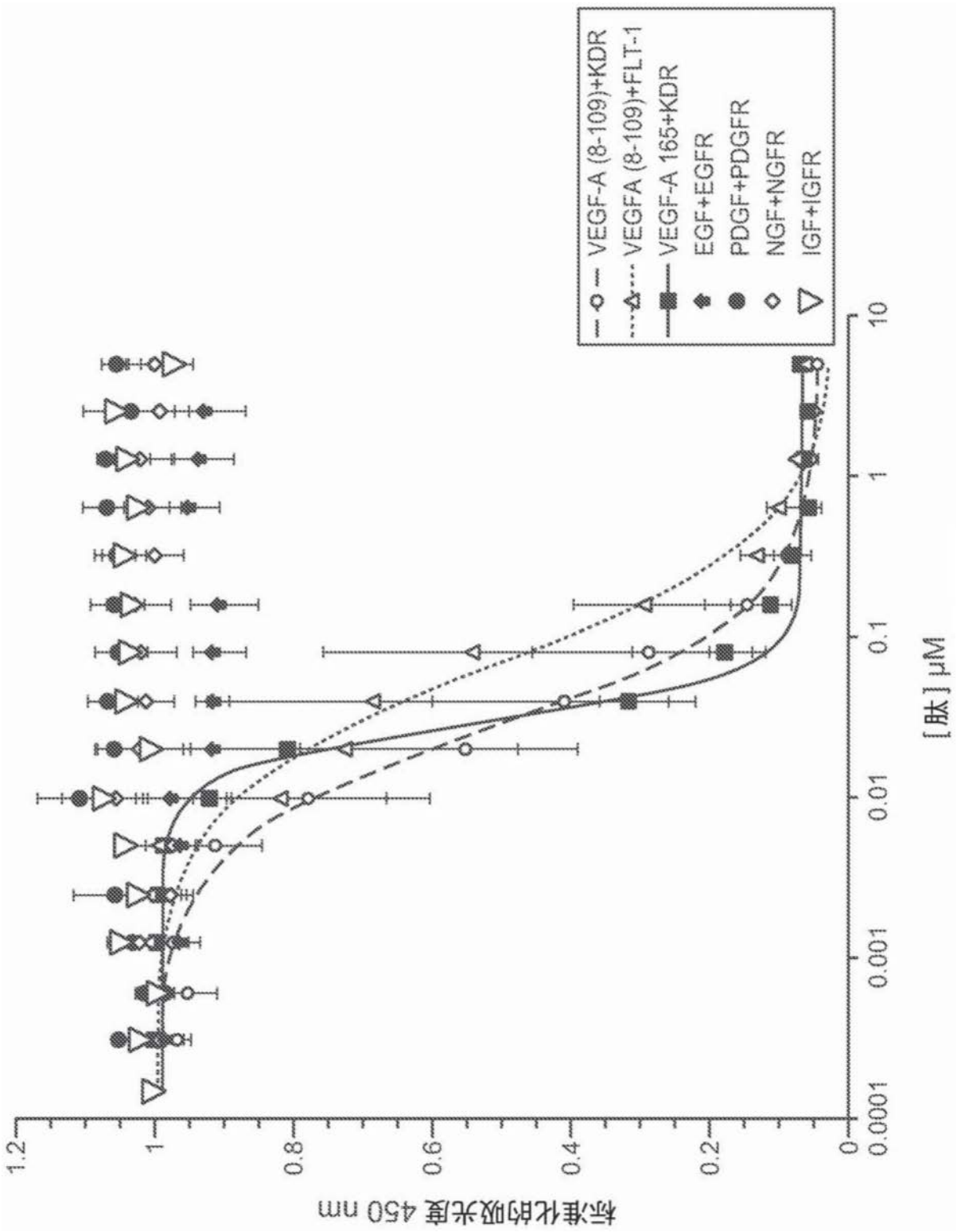

VEGF-A (8-109)+KDR
VEGFA (8-109)+FLT-1
VEGF-A 165+KDR
EGF+EGFR
PDGF+PDGFR
NGF+NGFR
IGF+IGFR
标准化的吸光度 450 nm
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
[肽] μM

图2B

CKP	环 1	环 2	环 5	
WT EETI	GCPRILMR	CKQDSDCLAGCVCGPNGFCG		SEQ ID NO: 1
E9	GCQLMQPFWGCKQDSDCLAGCVCHWYQSCG			SEQ ID NO: 23
EM54	GCNIMLPFWGCKQDSDCLAGCVCQYYQSCG			SEQ ID NO: 52
V_L2.9.54.90	GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG			SEQ ID NO: 102

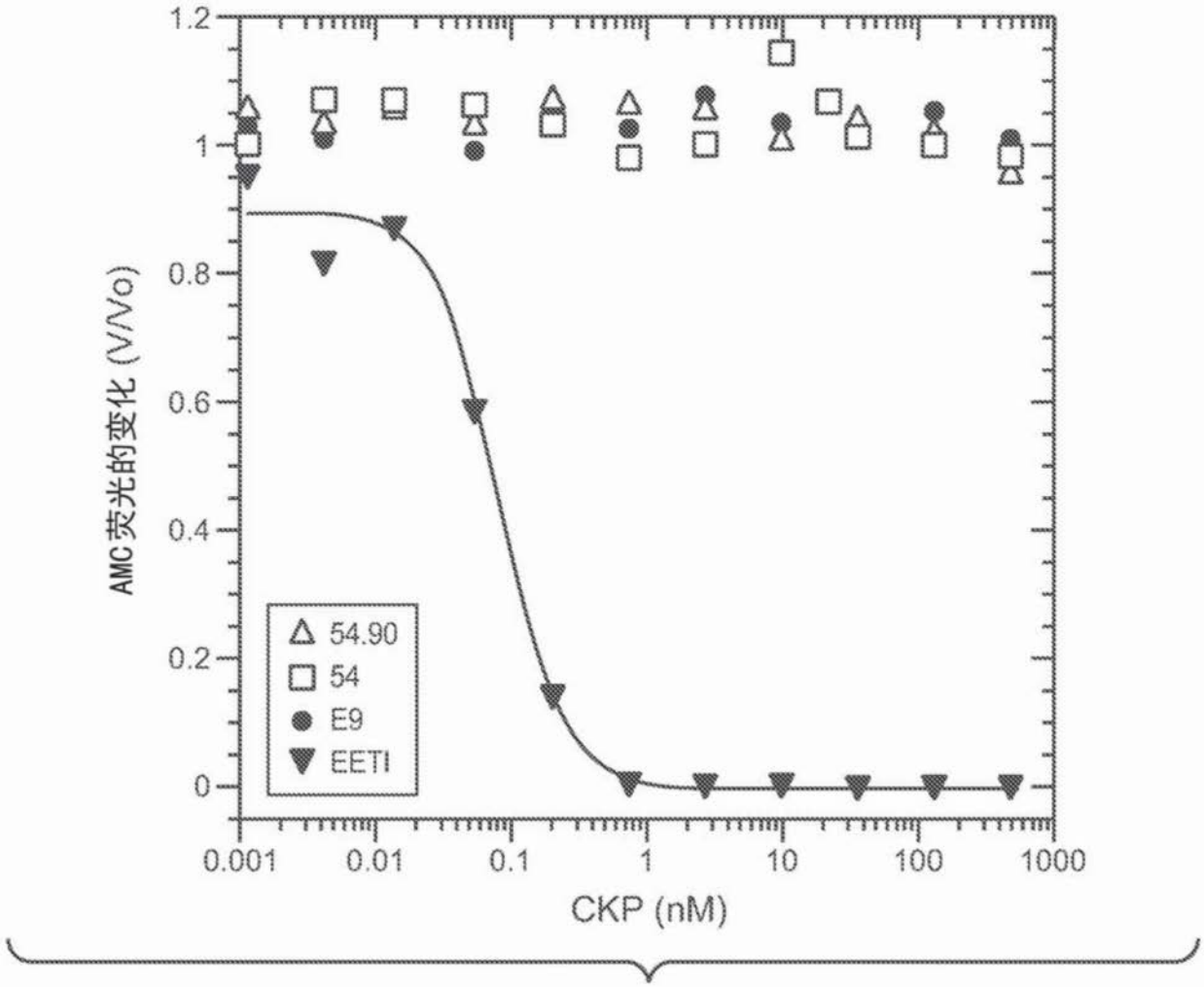


图 3

图3

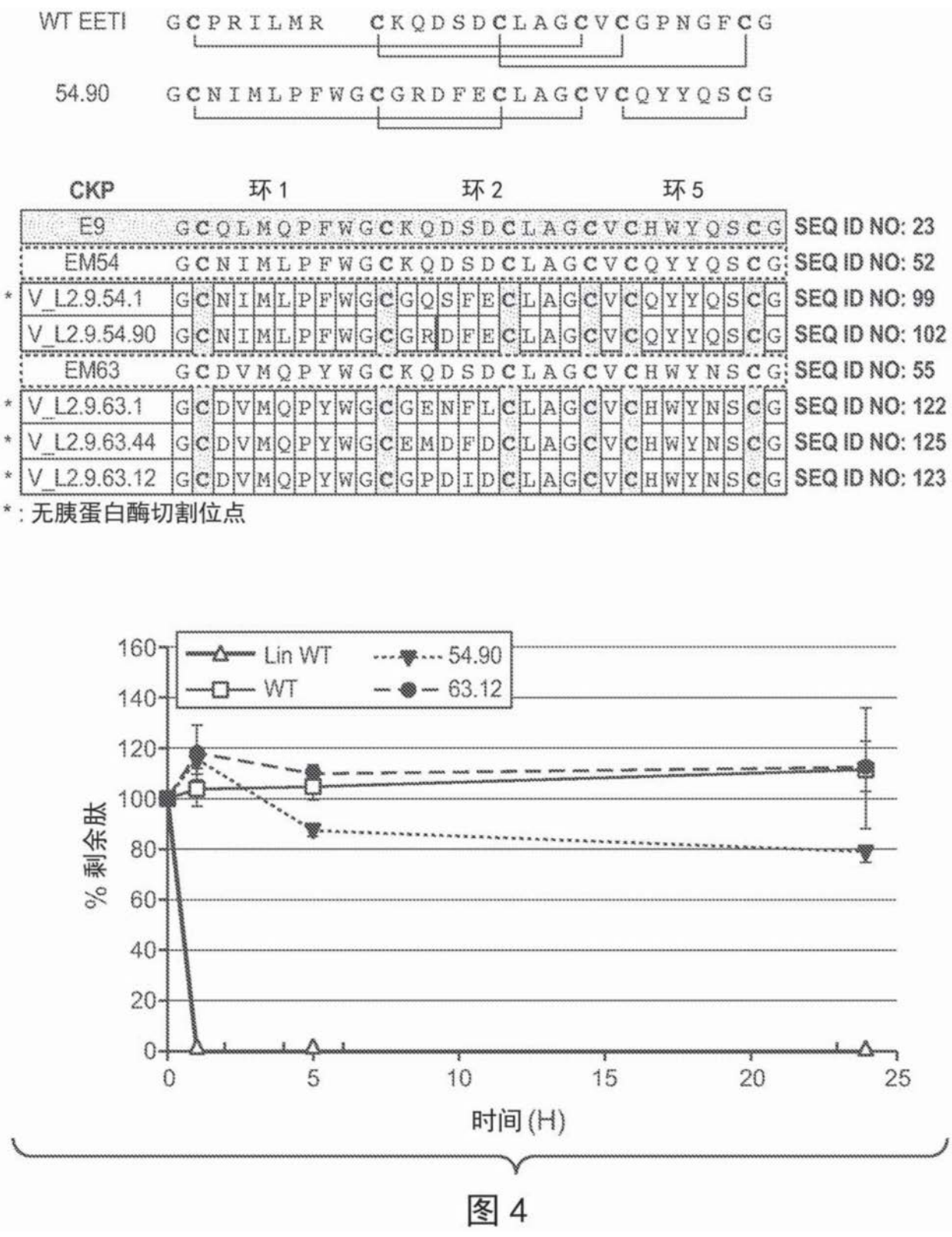

WT EETI GCPRILMR CKQDSDCLAGCVCGPNGFCG
54.90 GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG
CKP 环 1 环 2 环 5
E9 GCQLMQPFWGCKQDSDCLAGCVCHWYQSCG SEQ ID NO: 23
EM54 GCNIMLPFWGCKQDSDCLAGCVCQYYQSCG SEQ ID NO: 52
* V_L2.9.54.1 GCNIMLPFWGCGQSFECLAGCVCQYYQSCG SEQ ID NO: 99
V_L2.9.54.90 GCNIMLPFWGCGRDFECLAGCVCQYYQSCG SEQ ID NO: 102
EM63 GCDVMQPYWGCKQDSDCLAGCVCHWYNSCG SEQ ID NO: 55
* V_L2.9.63.1 GCDVMQPYWGCGENFLCLAGCVCHWYNSCG SEQ ID NO: 122
* V_L2.9.63.44 GCDVMQPYWGCEMDFDCLAGCVCHWYNSCG SEQ ID NO: 125
* V_L2.9.63.12 GCDVMQPYWGCGPDIDCLAGCVCHWYNSCG SEQ ID NO: 123
*：无胰蛋白酶切割位点
Lin WT
WT
54.90
63.12
% 剩余肽
时间 (H)
0
20
40
60
80
100
120
140
160
0
5
10
15
20
25

图 4

图4

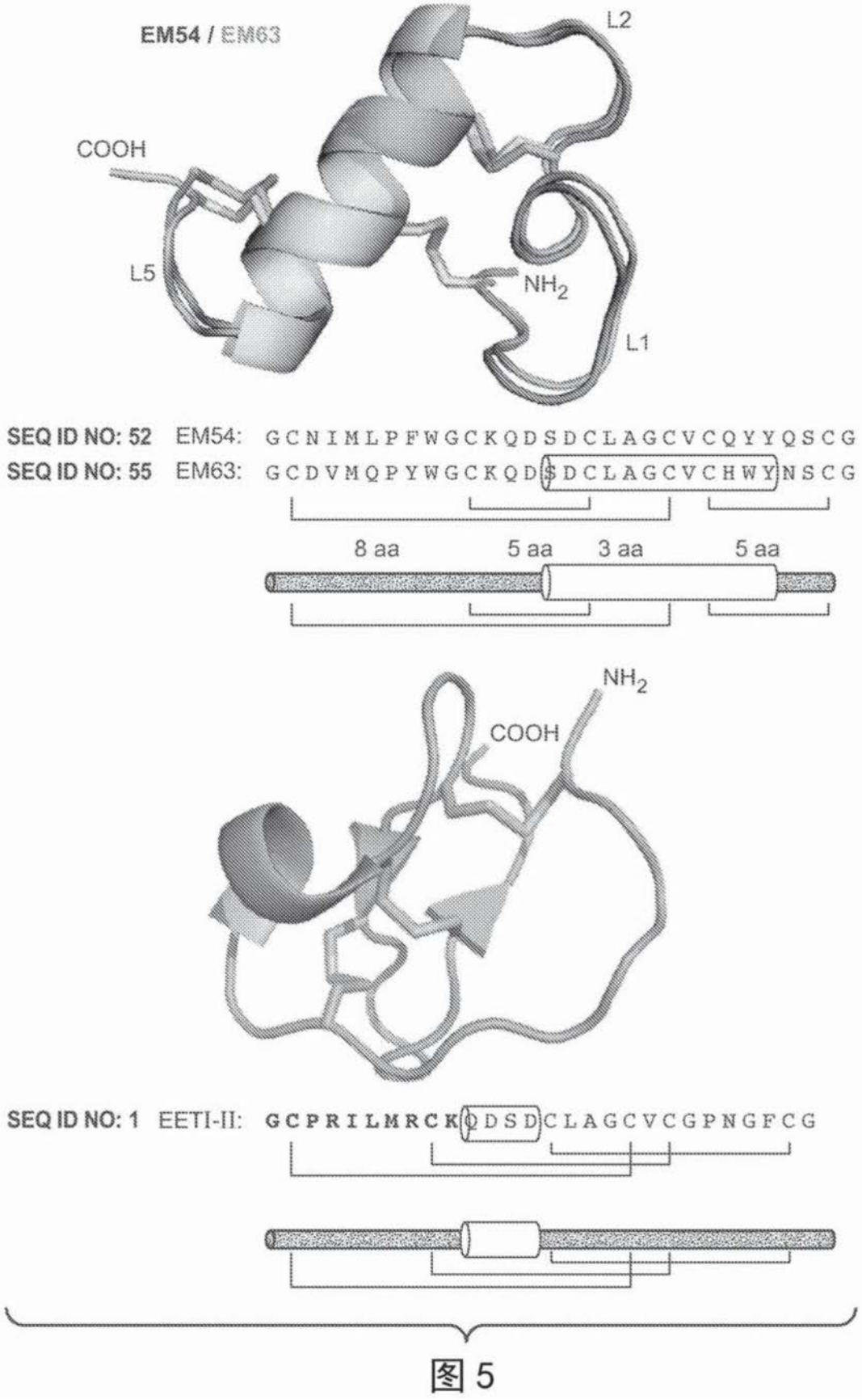

EM54 / EM63
L2
COOH
L5
NH2
L1
SEQ ID NO: 52 EM54: GCNIMLPFWGCKQDSDCLAGCVCQYYQSCG
SEQ ID NO: 55 EM63: GCDVMQPYWGCKQDSDCLAGCVCHWYNSCG
8 aa
5 aa
3 aa
5 aa
NH2
COOH
SEQ ID NO: 1 EETI-II: GCPRILMRCKQDSDCLAGCVCGPNGFCG

图 5

图5

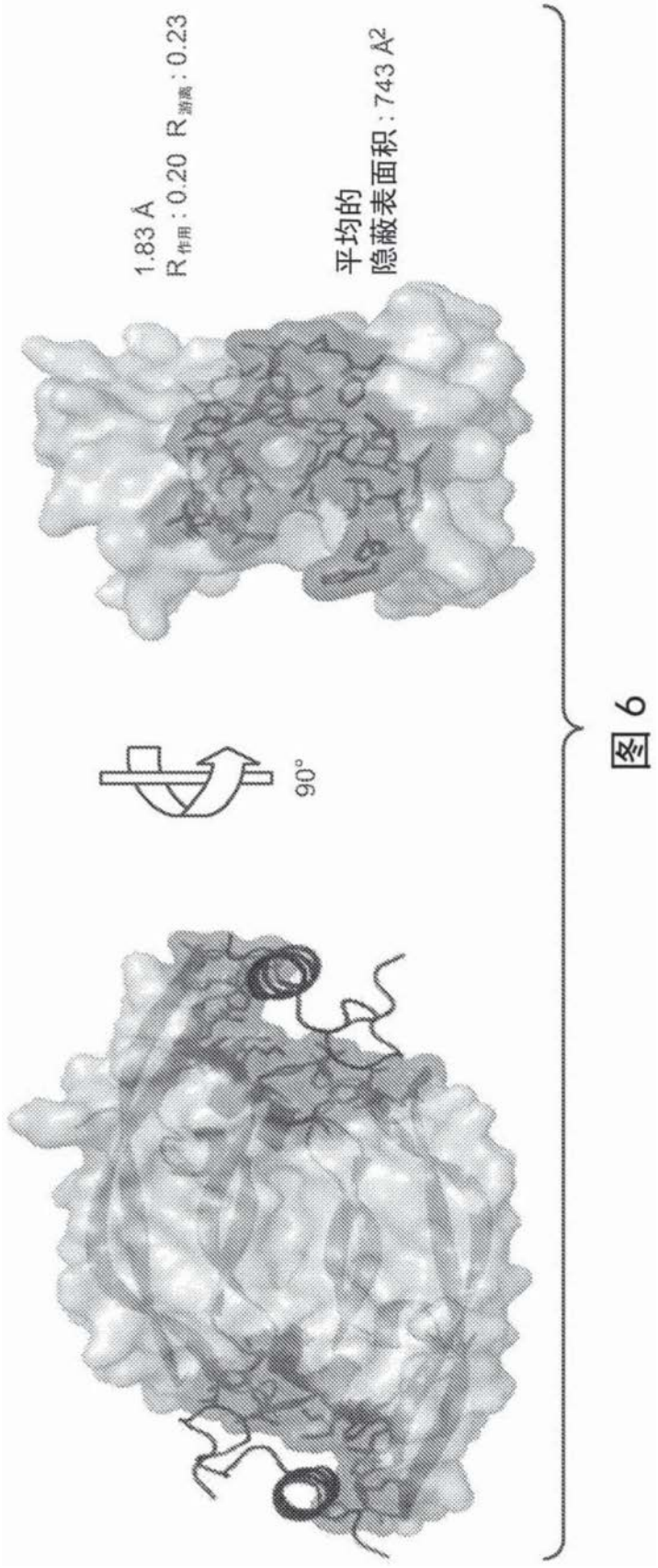


图6

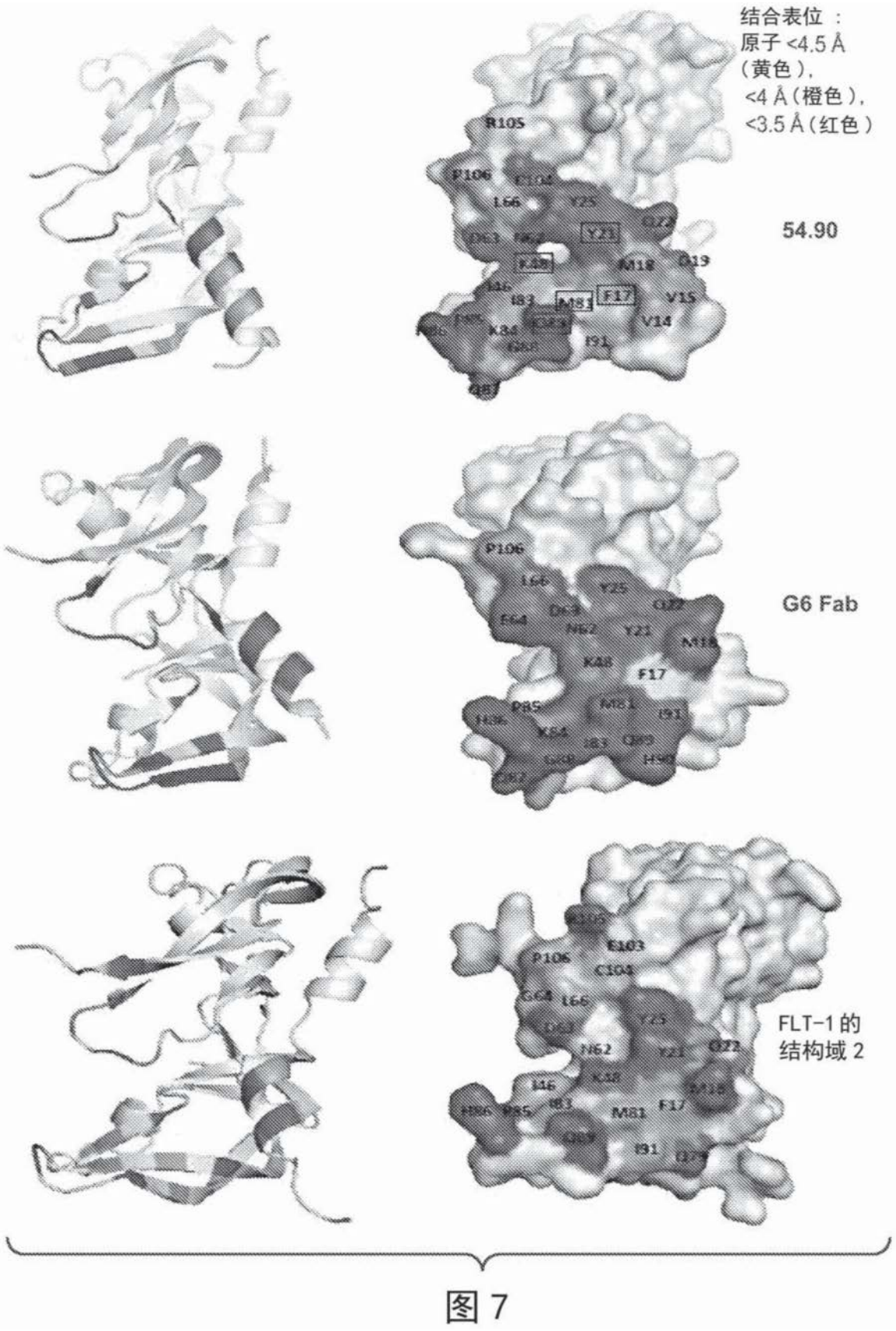


图 7

图7

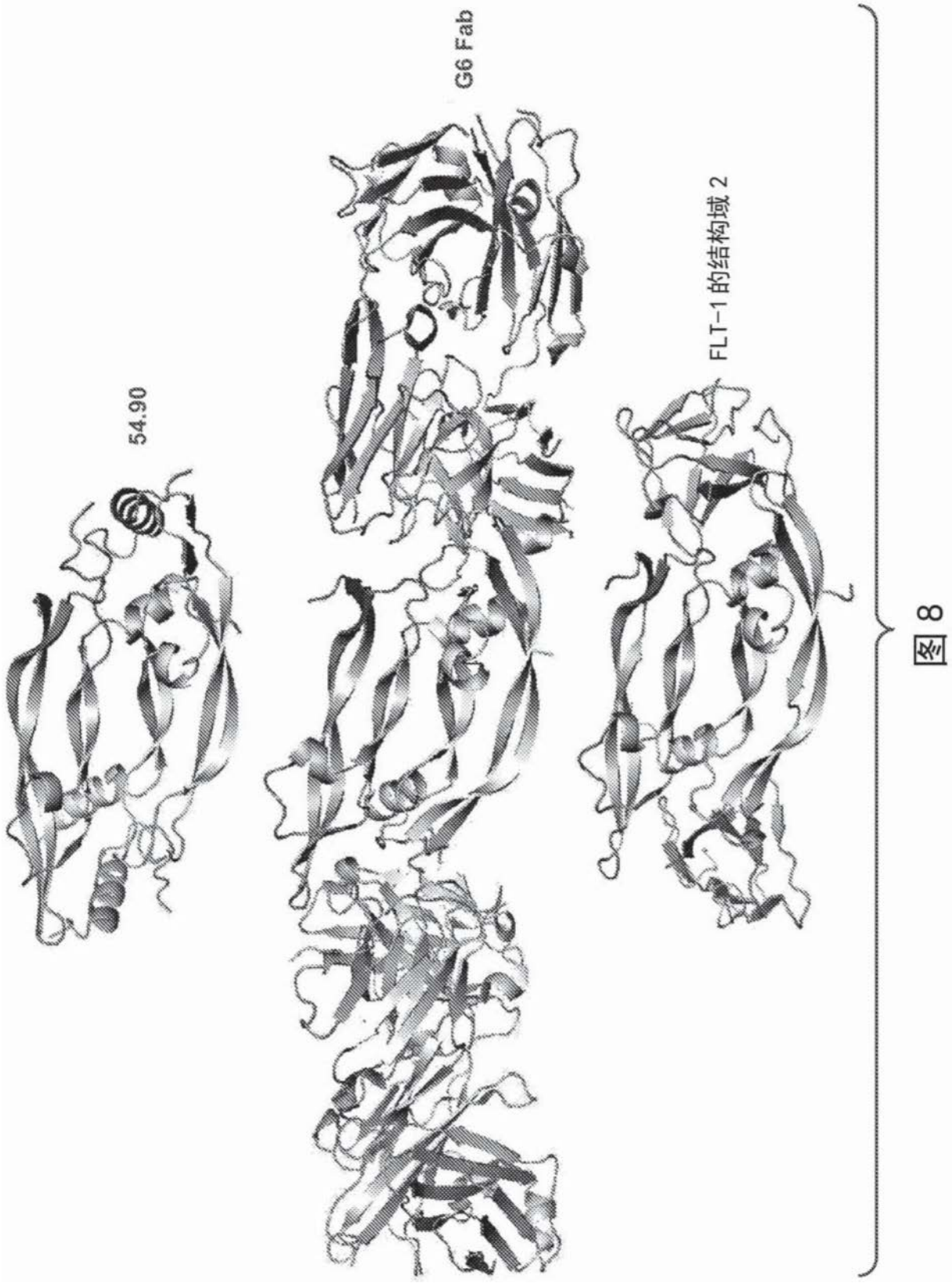


图8

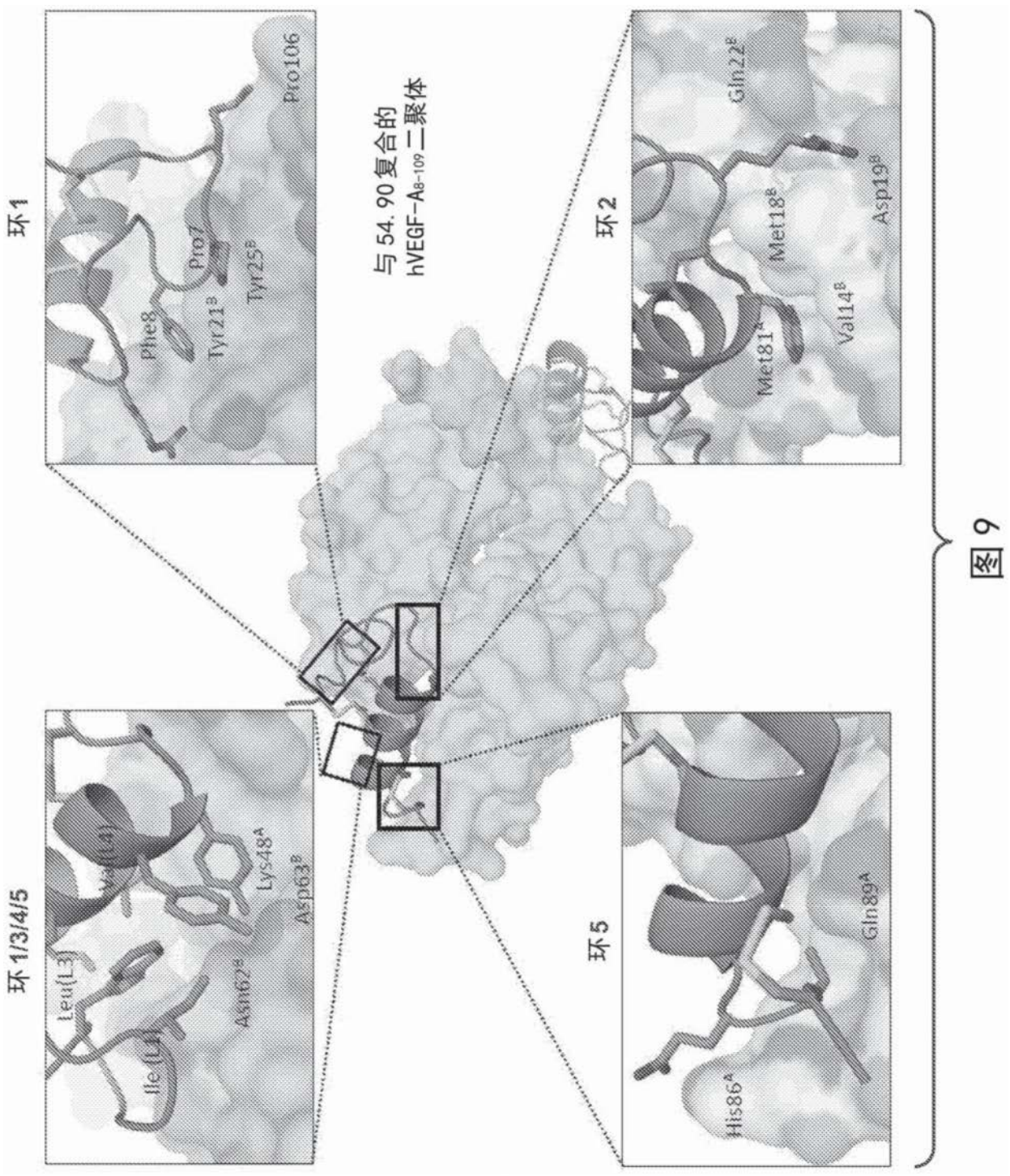

环1
Phe8
Pro7
Tyr21B
Tyr25B
Pro106
与54.90复合的
hVEGF-A8-109二聚体
环2
Gln22E
Met18E
Met81A
Val14B
Asp19E
环1/3/4/5
Leu(L3)
Ile(L1)
Asn62B
Lys48A
Asp63B
环5
His86A
Gln89A

图 9

图9

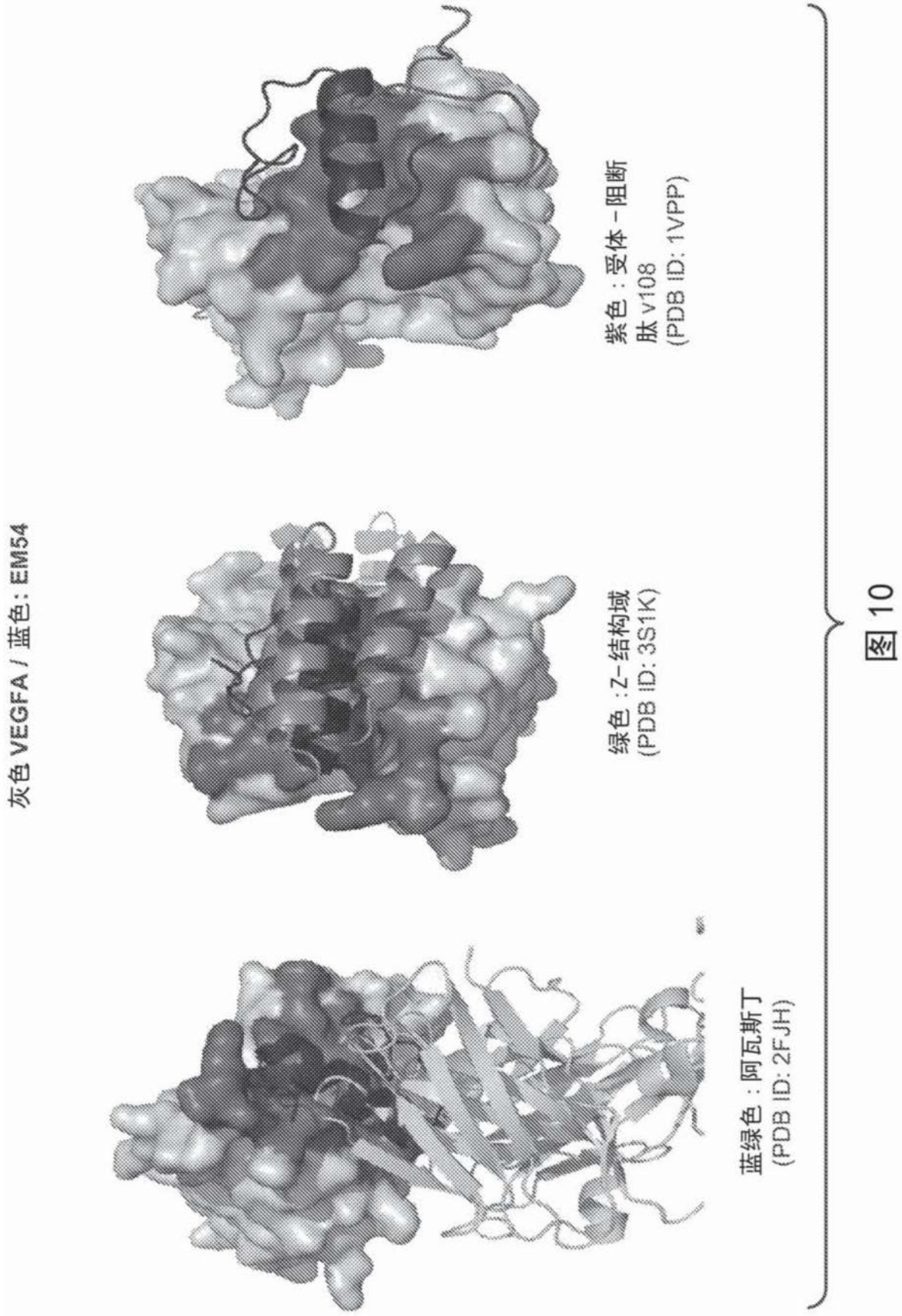

灰色 VEGFA / 蓝色: EM54
紫色 : 受体 – 阻断
肽 V108
(PDB ID: 1VPP)
绿色 : Z-结构域
(PDB ID: 3S1K)
蓝绿色 : 阿瓦斯丁
(PDB ID: 2FJH)

图 10

图10

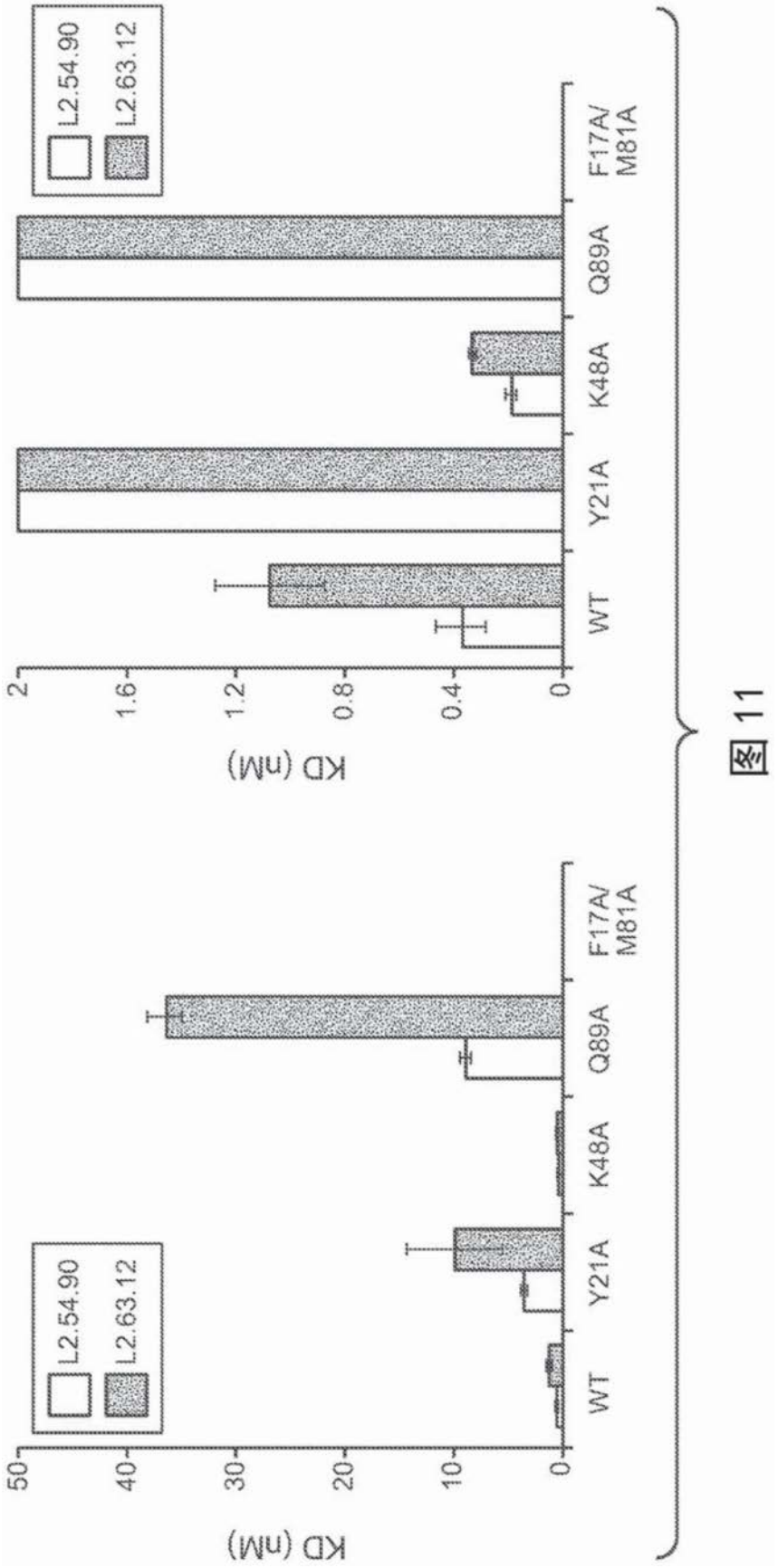

L2.54.90
L2.63.12
KD (nM)
0
10
20
30
40
50
WT
Y21A
K48A
Q89A
F17A/
M81A
KD (nM)
0
0.4
0.8
1.2
1.6
2
WT
Y21A
K48A
Q89A
F17A/
M81A

图 11

图11

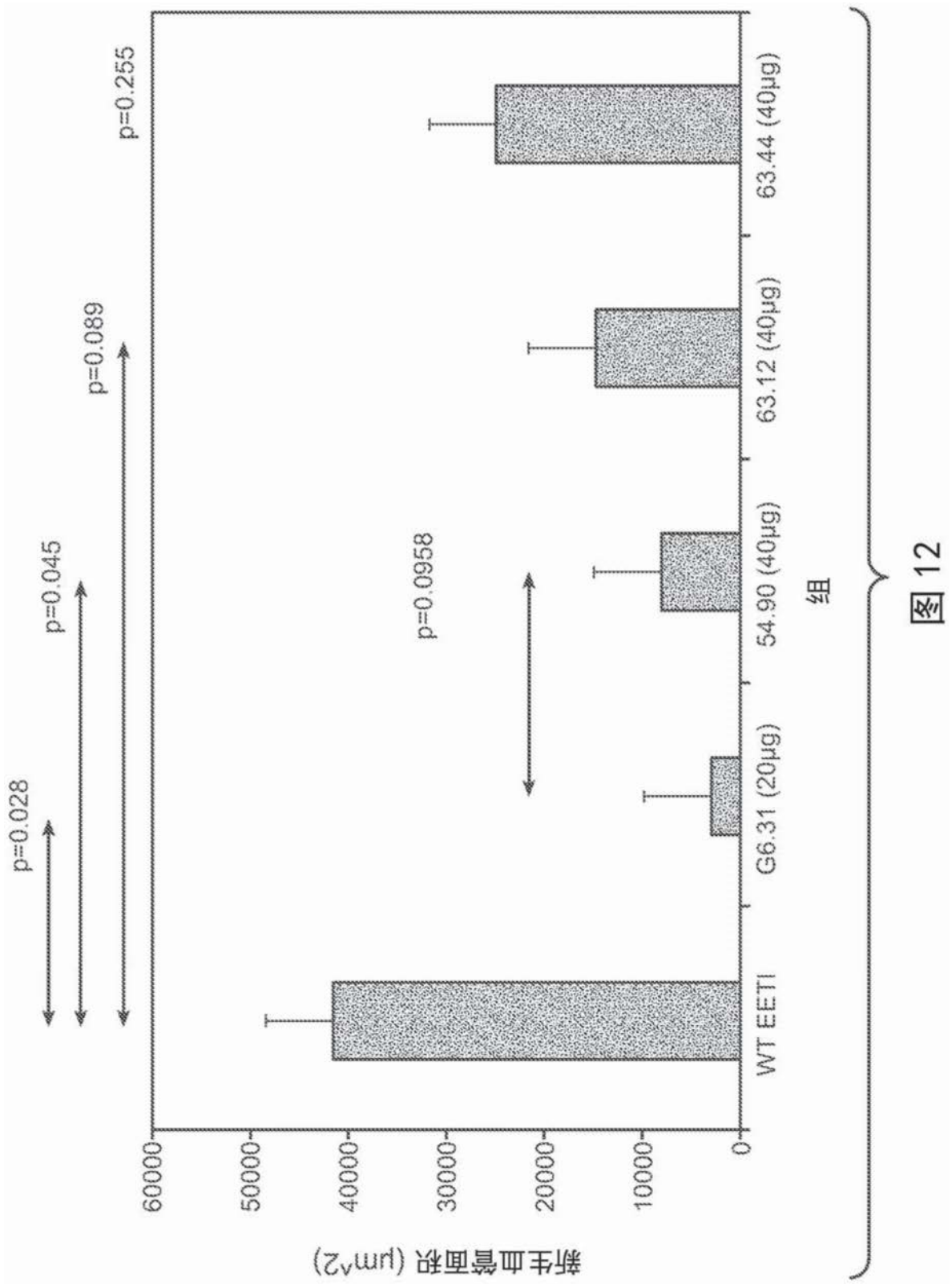

新生血管面积 (μm^2)
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
WT EETI
G6.31 (20μg)
54.90 (40μg)
63.12 (40μg)
63.44 (40μg)
组
p=0.028
p=0.045
p=0.089
p=0.255
p=0.0958

图12

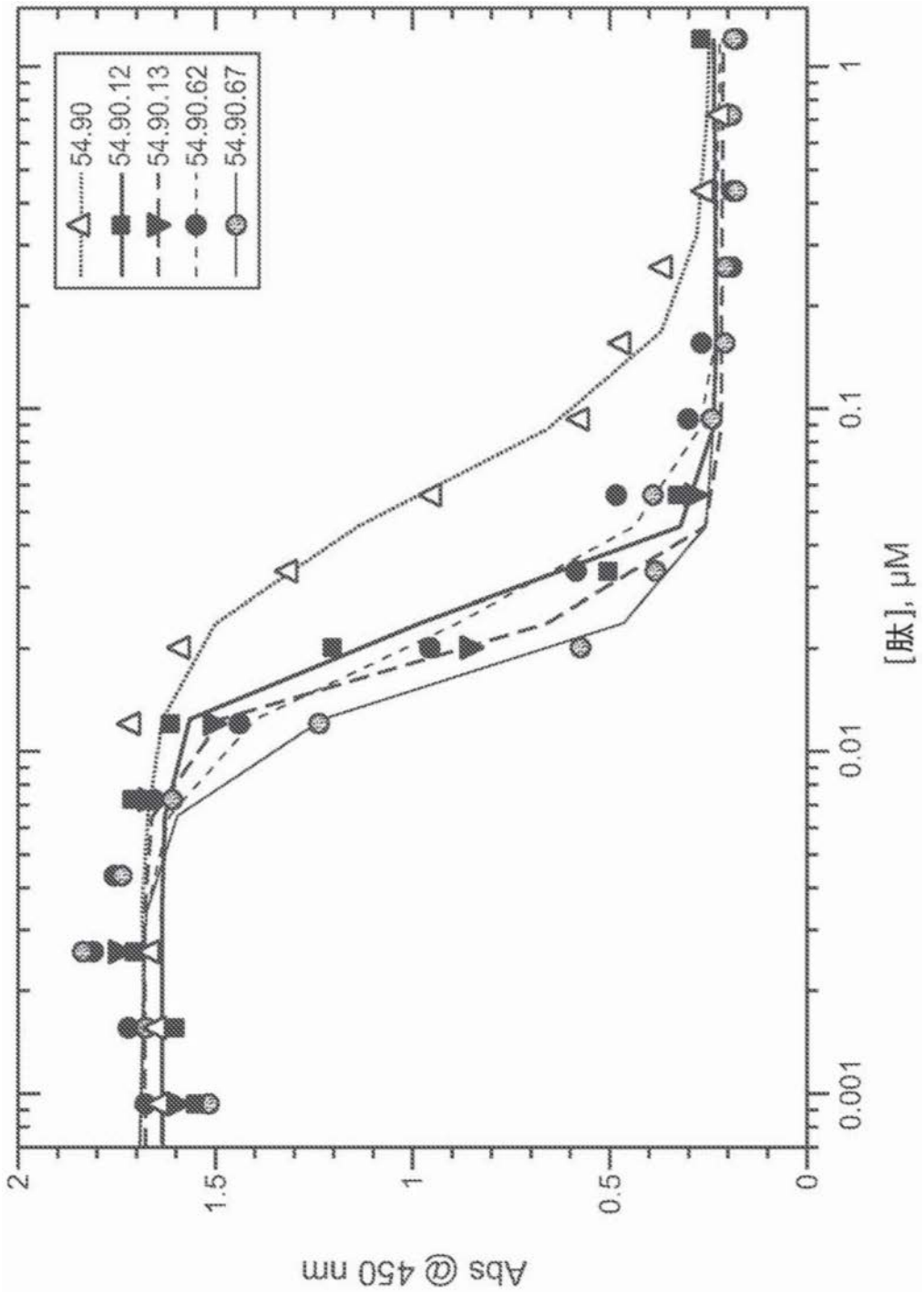

54.90
54.90.12
54.90.13
54.90.62
54.90.67
Abs @ 450 nm
[肽], μM
0
0.5
1
1.5
2
0.001
0.01
0.1
1

图13

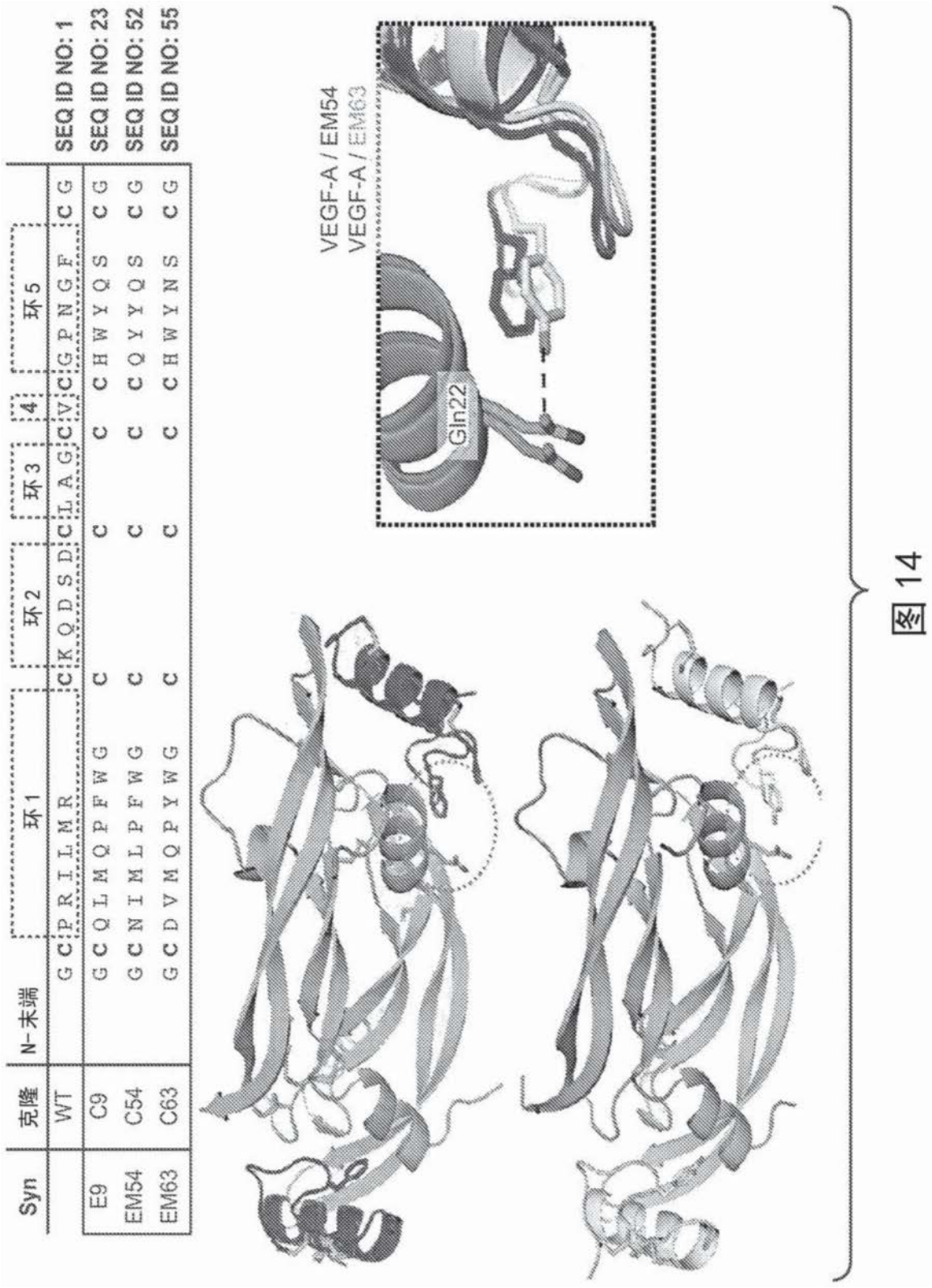

Syn
克隆
N-末端
环1
环2
环3
4
环5
SEQ ID NO: 1
SEQ ID NO: 23
SEQ ID NO: 52
SEQ ID NO: 55
WT
C9
C54
C63
E9
EM54
EM63
VEGF-A / EM54
VEGF-A / EM63
Gln22

图14

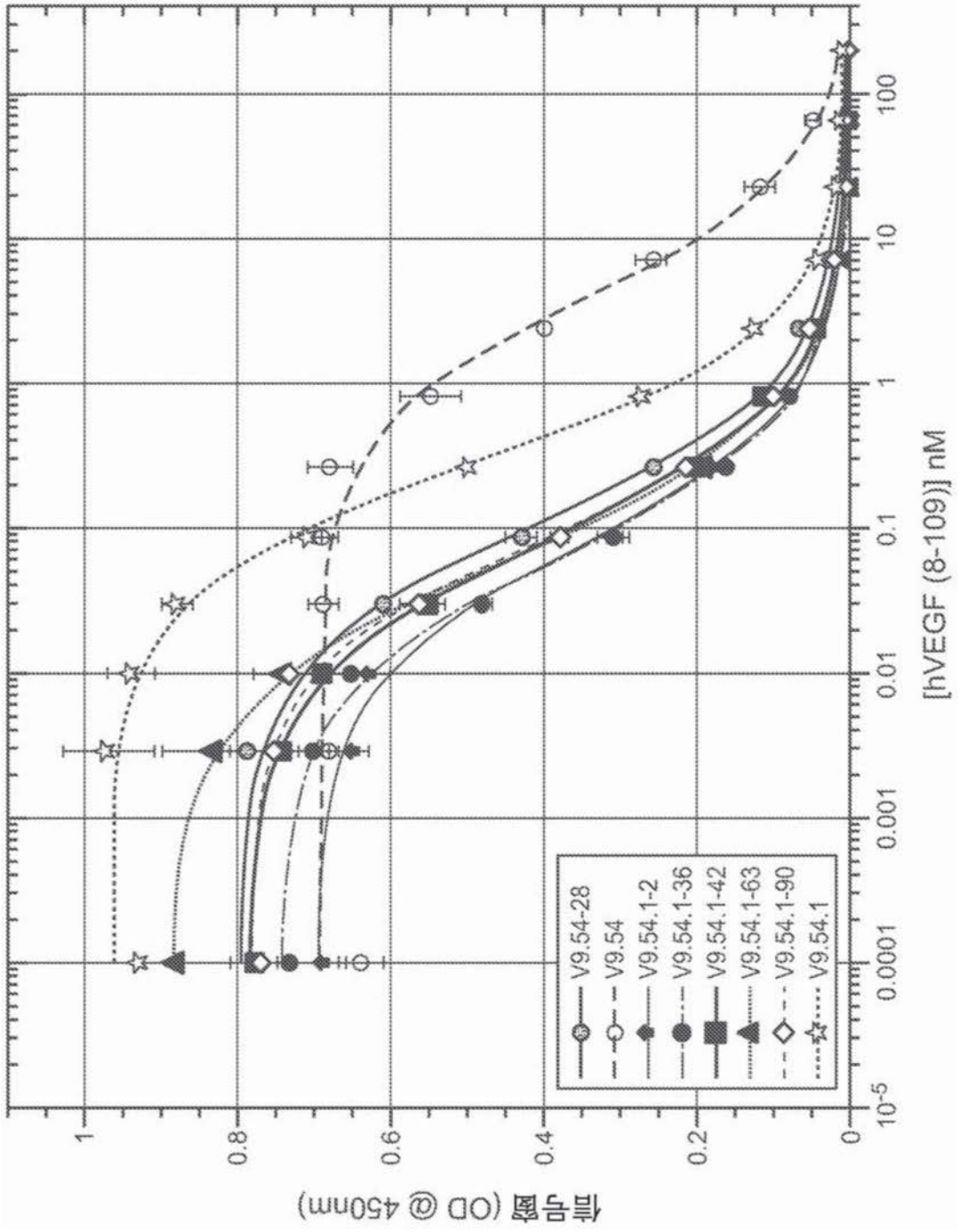

信号窗 (OD @ 450nm)
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
[hVEGF (8-109)] nM
10-5
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
V9.54-28
V9.54
V9.54.1-2
V9.54.1-36
V9.54.1-42
V9.54.1-63
V9.54.1-90
V9.54.1

图15

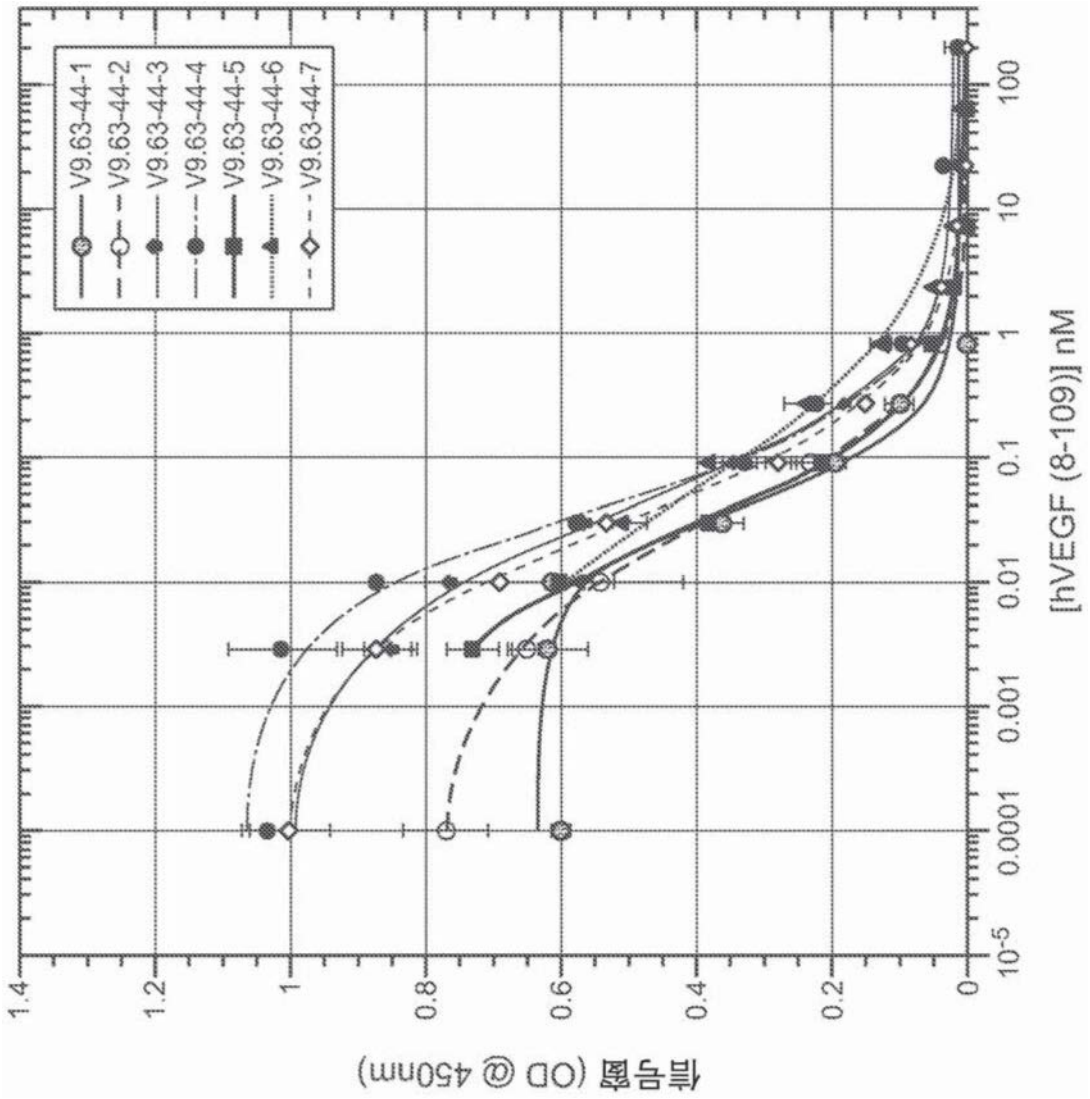

V9.63-44-1
V9.63-44-2
V9.63-44-3
V9.63-44-4
V9.63-44-5
V9.63-44-6
V9.63-44-7
信号窗 (OD @ 450nm)
[hVEGF (8-109)] nM
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
10-5
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100

图16A

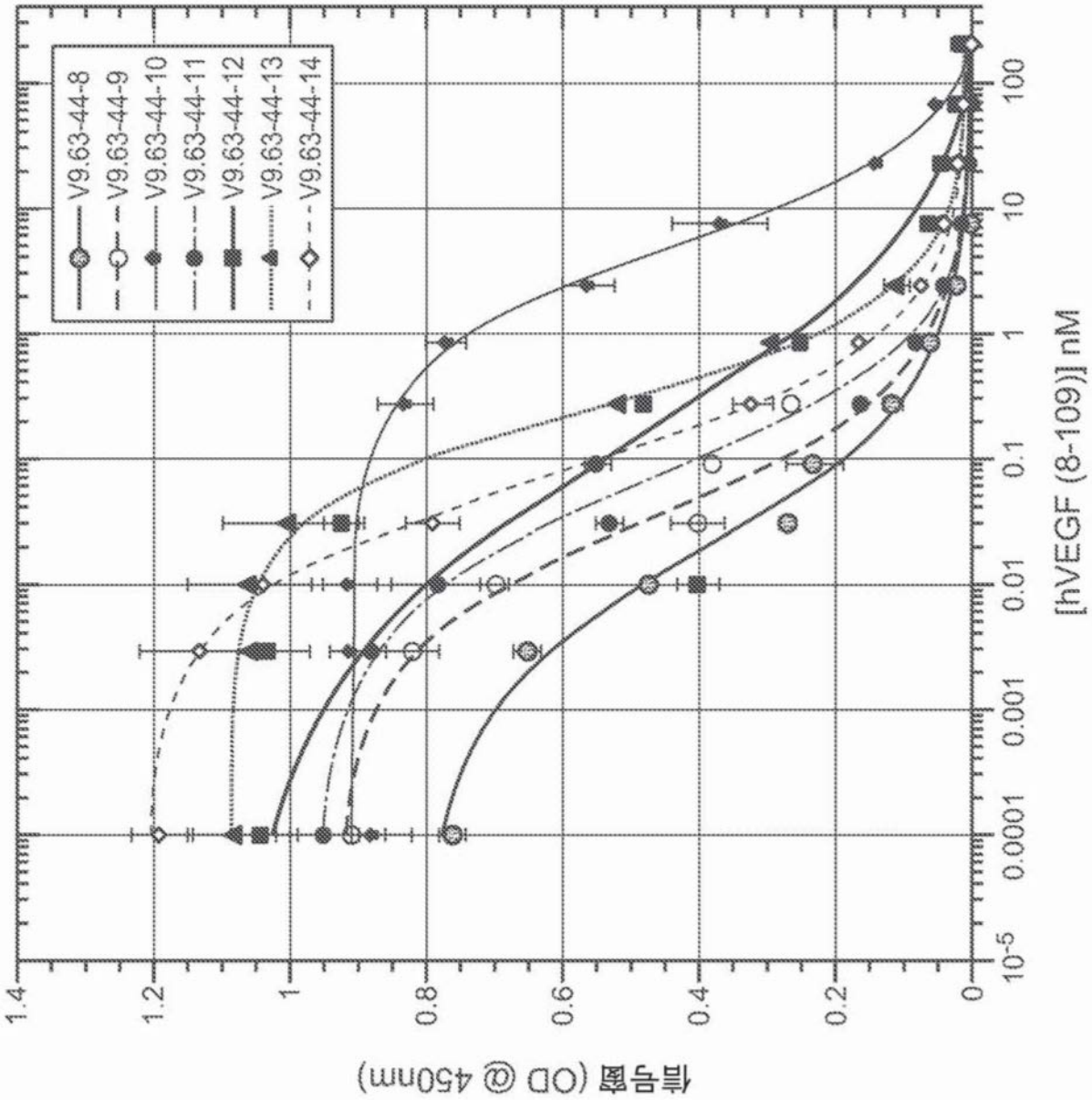

V9.63-44-8
V9.63-44-9
V9.63-44-10
V9.63-44-11
V9.63-44-12
V9.63-44-13
V9.63-44-14
信号值 (OD @ 450nm)
[hVEGF (8-109)] nM
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
10-5
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100

图16B