(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 114989298 A
(43)申请公布日 2022.09.02

(21)申请号 202210386453.7

(22)申请日 2020.03.20

(30)优先权数据
62/822,241 2019.03.22 US
62/865,469 2019.06.24 US

(62)分案原申请数据
202080038052.1 2020.03.20

(71)申请人 反射制药有限公司
地址 美国内华达州
申请人 多伦多大学理事会

(72)发明人 P·马里纳克 K·兰德格拉夫
D·阿尔特-里彻
M·C·尤帕拉帕蒂 S·西德胡

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所 11256
专利代理师 陈文平 黄海波

(51)Int.Cl.
C07K 16/22(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 29/00(2006.01)
A61P 9/10(2006.01)
A61P 19/02(2006.01)
A61P 27/02(2006.01)
A61P 17/00(2006.01)
A61P 17/10(2006.01)
A61K 49/00(2006.01)

权利要求书2页 说明书107页 附图77页

(54)发明名称

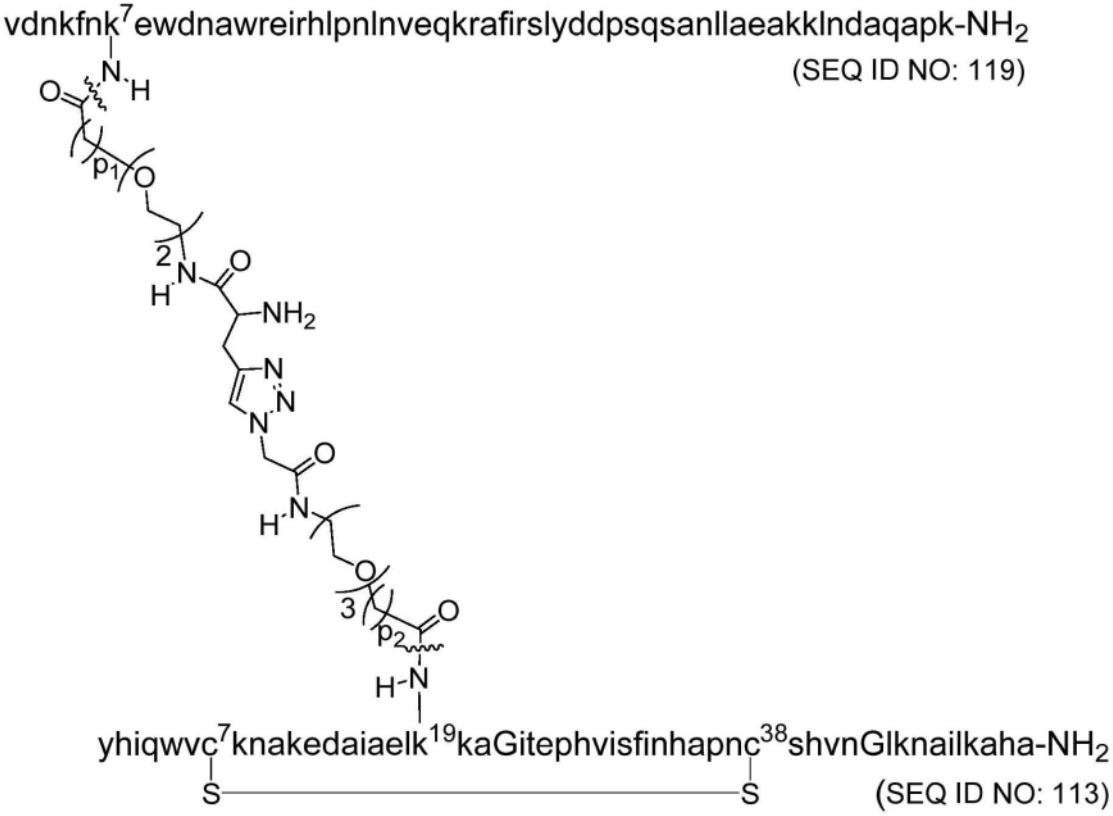
针对VEGF的D-肽化合物

(57)摘要

提供了特异性结合到VEGF的D-肽化合物。还提供了多价D-肽化合物,其包括经由连接组分连接的两个或更多个结构域。所述多价(例如,二价、三价、四价等)化合物可包括多个相异的结构域,所述结构域特异性结合到目标蛋白上的不同结合位点,以提供与VEGF目标蛋白的高亲和力结合和针对VEGF目标蛋白的强效活性。还提供了用于所述多价化合物的D-肽GA和Z结构域,所述多肽具有用于与VEGF(例如,VEGF-A)特异性结合的特异性决定基序(SDM)。由于所述目标蛋白为同二聚的(例如,VEGF-A),因此所述D-肽化合物可类似地为二聚的,且包括多价(例如,二价)D-肽化合物的二聚体。还提供了用于治疗受试者的与VEGF或血管生成相关的疾病或病况的方法,所述疾病或病况例如年龄相关黄斑变性(AMD)或癌症。

CN 114989298 A

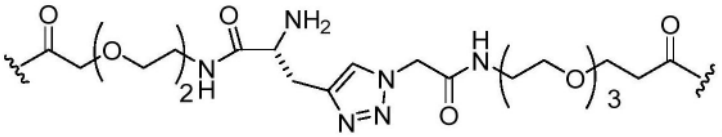
1.一种式(I)的D-肽化合物：



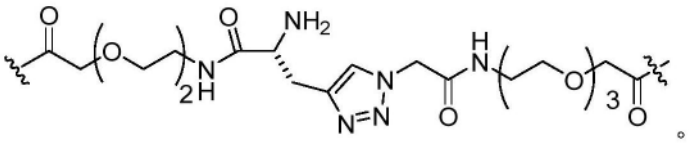
或其药学上可接受的盐，

其中p_1和p_2各自独立地为1或2。

2.根据权利要求1所述的D-肽化合物，其中在式(I)中，连接SEQ ID NO:119的k^7氨基酸残基和SEQ ID NO:113的k^{19}氨基酸残基的连接子具有下式：



3.根据权利要求1所述的D-肽化合物，其中在式(I)中，连接SEQ ID NO:119的k^7氨基酸残基和SEQ ID NO:113的k^{19}氨基酸残基的连接子具有下式：



4.一种药物组合物，其包含：

根据权利要求1至3中任一项所述的D-肽化合物，或其药学上可接受的盐；和

药学上可接受的赋形剂。

5.根据权利要求4所述的药物组合物，其中所述组合物被配制成用于治疗眼部疾病或病况。

6.一种治疗或预防受试者的与血管生成相关的疾病或病况的方法，所述方法包含向有需要的受试者施用有效量的根据权利要求1至3中任一项所述的D-肽化合物或其药学上可接受的盐。

7.根据权利要求6所述的方法，其中所述与血管生成相关的疾病或病况为癌症、发炎性疾病、动脉粥样硬化、类风湿性关节炎、黄斑变性、视网膜病变和皮肤疾病。

8.根据权利要求6所述的方法，其中所述与血管生成相关的疾病或病况是糖尿病性黄斑水肿(DME)。

9.根据权利要求6所述的方法，其中所述与血管生成相关的疾病或病况是湿性年龄相关黄斑变性(AMD)。

10.一种用于对与血管生成相关的疾病或病况进行活体内诊断或成像的方法，其包含：

向受试者施用根据权利要求1至3中任一项所述的D-肽化合物或其药学上可接受的盐；和

对所述受试者的至少一部分进行成像。

11.根据权利要求10所述的方法，其中所述成像包含PET成像，且所述施用包含向所述受试者的血管系统施用所述化合物。

12.根据权利要求10所述的方法，其进一步包含检测细胞受体对所述化合物的摄取。

13.根据权利要求10所述的方法，其进一步包含向所述受试者施用贝伐单抗，其中所述与血管生成相关的疾病或病况为癌症。

针对VEGF的D-肽化合物

[0001] 本申请是申请日为2020年3月20日、申请号为202080038052.1、名 称为“针对VEGF的D-肽化合物”的专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2019年3月22日提交的美国临时专利申请第62/822,241 号和2019年6月24日提交的美国临时专利申请第62/865,469号的权益，所述申请以全文引用的方式并入本文中。

技术领域

背景技术

[0004] 血管内皮细胞生长因子(VEGF-A)是正常和异常或病理性血管生成的 关键调控子。除了作为血管生成和血小管生成(vasculogenesis)中的血管 生成因子外,VEGF还是一种多效生长因子,在其它生理过程,例如内皮 细胞存活、血管通透性和血管舒张、单核细胞趋化性和钙内流中展现多种 生物效应。血管生成是重要的细胞事件,其中血管内皮细胞增殖以从现有 血管网形成新血管。血管生成与多种病症的发病机制有关联,所述病症例 如肿瘤、增生性视网膜病变、年龄相关黄斑变性(AMD)、类风湿性关节 炎(RA)和银屑病。血管生成对于大多数原发性肿瘤的生长和其在多种癌 症中的后续转移至关重要。

[0005] 在患有糖尿病和其它局部缺血相关视网膜病变的患者中,眼液中 VEGF-A的浓度与存在血管活跃增殖有关。此外,在患有AMD的患者中，VEGF位于脉络膜新生血管膜中。干性AMD发生在湿性AMD之前,干性 AMD的特征为视网膜下出现黄白色沉积物,以及视网膜组织不同程度的薄 化和功能障碍,不过缺乏任何异常的新血管生长。当新且异常的血管侵入视网膜时,干性AMD转变为湿性AMD。此异常新血管生长称作脉络膜血 管新生(choroidal neovascularization,CNV)。抗VEGF-A药物用于治疗湿 性AMD。

[0006] VEGF-A靶向疗法用于治疗多种癌症。然而,在一些情况下,患者最 终会对此类疗法产生抗性。目前,靶向VEGF-A和一个多个额外癌症目标 的组合疗法受到关注,例如程序性细胞死亡蛋白1(PD-1)或程序性死亡 配位体1(PD-L1)。举例来说,使用贝伐单抗(bevacizumab)和阿特珠单 抗(atezolizumab)靶向VEGF-A和PD-L1的组合疗法在PD-L1阳性转移 性肾细胞癌患者中显示出疾病进展或死亡的风险降低。

[0007] 对于基础生物学研究和治疗学与诊断学的发展两者来说,操纵例如 VEGF-A的蛋白质的相互作用的能力受到关注。蛋白质配位体可形成与目 标分子具有多个接触的大结合表面,其引起具有高特异性和亲和力的结合 事件。举例来说,抗体是一类产生针对各种目标蛋白的特异性且紧密结合 的配位体的蛋白质。另外,Mandal等人(“通过外消旋晶体学进行的异手 性{D-蛋白拮抗剂外加VEGF}蛋白质复合物的化学合成和X射线结构(Chemical synthesis and X-ray structure of a heterochiral{D-protein antagonist plus VEGF}protein complex by racemic crystallography)”,美国国家科学院 院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)109,14779-14784(2012))和Uppalapati 等人

("VEGF-A的强效D-蛋白拮抗剂在活体内不具有免疫原性,代谢稳定 且循环时间较长(A potent D-protein antagonist of VEGF-A is nonimmunogenic,metabolically stable and longer-circulating in vivo)",ACS 化学生物学(ACS Chem Biol)(2016))描述了VEGF-A的D-蛋白拮抗剂。由于所关注目标分子的多样性和蛋白质配位体的结合特性,因此具有适用 功能的结合蛋白的制备受到关注。

发明内容

[0008] 提供了与血管内皮细胞生长因子(VEGF)特异性结合的D-肽化合物。本发明化合物可包括VEGF-A结合GA结构域。本发明化合物可包括 VEGF-A结合Z结构域基序。还提供了多价化合物,其包括经由连接组分 连接的两个或更多个本发明D-肽结构域。多价(例如,二价、三价、四价 等)D-肽化合物可包括与目标蛋白上不同结合位点特异性结合的多个相异的结构域,以提供与VEGF目标蛋白的高亲和力结合和针对VEGF目标蛋 白的强效活性。还提供了用于所述多价化合物的D-肽GA和Z结构域,所 述多肽具有用于与VEGF(例如,VEGF-A)特异性结合的特异性决定基序 (SDM)。由于所述目标蛋白为同二聚的(例如,VEGF-A),因此所述D- 肽化合物可类似地为二聚的,且包括多价(例如,二价)D-肽化合物的二 聚体。本发明D-肽化合物用于需要与VEGF-A目标特异性结合的多种应用。提供了化合物的使用方法,包括用于治疗与受试者中VEGF相关或与受试 者中血管生成相关的疾病或病况的方法,例如用于治疗受试者的年龄相关 黄斑变性(AMD)或癌症的方法。

附图说明

[0009] 图1显示了与VEGF-A(空间填充图)复合的示例性化合物1.1.1(c21a) (白色杆状图)的X射线晶体结构的视图。VEGF-A的结合位点残基以粉红 色描绘。VEGF-A(8-109)结合位点残基以粗体指示:GQNHHEVV**KFMDVYQRSY**CHPIETLVDIFQEYPDEIE**YIFKPS**CVPLMRC GGCC**NDEGL**ECVPTEESNITMQ**IMRIKPHQGQHI**GEMSFLQHNKCECR PKKD(SEQ ID NO:88)。

[0010] 图2显示了与VEGF-A(空间填充图)复合的示例性化合物1.1.1(c21a) (白色杆状图)的X射线晶体结构的重叠图,示例性化合物与如Mandal等 人(美国国家科学院院刊109,14779-14784(2012))描述的D-蛋白拮抗剂 的结构(洋红色杆状图)重叠。VEGF-A的结合位点残基以粉红色描绘。结构显示化合物1.1.1(c21a)与Mandal等人的化合物在相同拮抗剂位点结 合。

[0011] 图3A-3B显示了L-蛋白GA结构域与特异性结合VEGF-A的示例性 D-肽化合物的三螺旋束结构的并排比较。图3A显示了L-蛋白GA结构域 的X射线晶体结构(蛋白质数据库(Protein Data Bank)结构1tf0)的一个 视图,和指示螺旋1-3的布置的示意图。图3B显示了与VEGF-A(在此视 图中未显示)复合的化合物1.1.1(c21a)的X射线晶体结构的相似视图,和 指示螺旋1-3的布置的示意图。

[0012] 图4显示了与VEGF-A(在此视图中未显示)复合的化合物1.1.1(c21a) 的X射线晶体结构的视图。螺旋1(201)、螺旋2(202)和螺旋3(203) 为D-肽化合物的α-螺旋区域,其与天然GA结构域的那些α-螺旋区域对应。206为位置31(f31)处的苯丙氨酸残基。205、207和210分别为位置27 (h27)、34(h34)和40(h40)处的组氨酸残基。209为位置37(y37)处 的酪

氨酸残基。204和208分别为位于位置26(p26)和36(p36)处的螺 旋2终止脯氨酸残基。

[0013] 图5描绘了获自复合物的X射线晶体结构的示例性D-肽化合物(1.1.1 (c21a);杆状图)和VEGF-A(空间填充图)之间的结合界面。化合物的残 基f31(206)在复合物的结合界面处突出到VEGF-A的结合袋(pocket) 中。位置27(205)、34(207)和40(210)处的组氨酸残基在结合界面处 与VEGF-A进行额外接触。残基y37(209)的侧链向VEGF-A表面突出，但不紧密接触。

[0014] 图6A-6D描绘了基于三螺旋束结构的本发明化合物的结构模型。图6A 显示了在天然GA结构域中三个螺旋的布置的示意图。图6B显示了D-肽 GA结构域基序中三个螺旋的布置的示意图。图6C显示了基于七肽重复(heptad repeat)单元的疏水性堆积的反向平行三股螺旋的德拉多(Degrado) 结构模型;形成螺旋区段的七残基基序(abcdefg)n在基序的特定位置处具有 特征残基。图6D显示了针对D-肽三螺旋结构域基序对德拉多七肽重复模 型进行的调适。

[0015] 图7A-7B描绘了本发明D-肽化合物的三螺旋束结构模型。图7A描绘 了如在GA结构域基序中发现的螺旋1-3的第一布置。图7B显示了本发明 化合物的三螺旋束的结构模型。

[0016] 图8A-8C描绘了基于二螺旋复合物结构的本发明化合物的结构模型。图8A以侧视图和俯视图描绘了与在GA结构域基序中发现的螺旋A-B一 致的螺旋A-B的第一布置,其中N和C表示肽化合物的N末端和C末端。图8B显示了本发明化合物的二螺旋复合物的结构七肽重复模型,包括与 VEGF-A接触的g-g面。图8C描绘了变异基序,其包括位于由螺旋A和螺 旋B界定的二螺旋复合物七肽重复模型(参见图8B)的溶剂暴露的c和g 位置(蓝色)中的选定的VEGF-A接触残基,其中h*为组氨酸或其类似物，f*为苯丙氨酸或其类似物,且u为非极性氨基酸残基。在图8C中,“_”指 示基础支架结构域的位置,且虚线指示可能的残基的螺旋间接触或连接的 位置。

[0017] 图9A-9C描绘了使化合物序列与三螺旋束结构相关的本发明化合物的 结构模型。图9A显示了示例性化合物的七肽重复模型的一部分的三维图。将化合物1.1.1(c21a)的选定残基分配给七肽重复单元模型的位置,与化合 物与VEGF-A复合的X射线晶体结构一致。由螺旋2和螺旋3界定的化合 物的VEGF-A结合面对应于七肽重复模型的g-g面。图9B显示了化合物 1.1.1(c21a)的X射线晶体结构的视图,其中七肽配准(register)的a和d 残基以红色显示,其堆积在三螺旋束结构的核心中。图9C显示了序列与三 级结构的七肽重复模型的线性比对(H1＝螺旋1;H2＝螺旋2;H3＝螺旋3)， 其中核心残基以红色指示,且选定的VEGF-A接触残基以蓝色指示。应理 解,图9A中所描绘的结构模型可扩展,以基于图9C中所示的配准显示螺 旋1-3中每一个中的所有残基。为简单起见,仅描绘了结构的一部分。

[0018] 图10A-10B提供了本发明化合物的特定和通用的七肽重复模型的进一 步描绘。图10A显示了示例性化合物1.1.1(c21a)的序列与三级结构的七肽 重复模型的比对,其中用箭头描绘了三螺旋束的螺旋之间的核心残基的疏 水接触。图10B描绘了变异基序,其包括位于由螺旋2和螺旋3界定的g-g 面的溶剂暴露的c和g位置(参见图7B和8A)中的选定VEGF-A接触残 基,其中h*为组氨酸或其类似物,f*为苯丙氨酸或其类似物,且u为非极 性氨基酸残基。在图10B中,“_”指示基础支架结构域的位置,且虚线指 示可能的三螺旋束的螺旋之间的核心残基的疏水接触。

[0019] 图11显示了示例性D-肽化合物(1.1.1(c21a))的X射线晶体结构的 一部分的放大

杆状视图，所述D-肽化合物获自与VEGF-A(未显示)的结 合复合物。片段对应于跨越位置26-45的螺旋2-连接子2-螺旋3区的一部 分。202指示螺旋2，203指示螺旋3，其由连接子2接合。螺旋2-螺旋3 分子内接触中包括位置32、35、41和44处的疏水残基。

[0020] 图12显示了L-蛋白GA结构域(1tf0)的X射线晶体结构的一部分的 放大带状视图。所述视图对应于跨越位置31-44的螺旋2到螺旋3区的一 部分。102和103分别为对应于螺旋2(202)和螺旋3(203)区的天然GA 结构域结构的α-螺旋区。连接子2为连接区。显示了在位置32、35、41和 44处的残基，其为螺旋2-螺旋3之间的分子内疏水接触的一部分，与图12 所示类似。

[0021] 图13显示了基于蛋白质G的GA结构域(例如，蛋白质数据库(PDB) 结构1tf0)的支架化库SCF32的结构描绘和基础序列(SEQ ID NO:2)，包 括用于针对VEGF-A的筛选的镜像噬菌体展示进行随机化的序列位置(粗 体)。

[0022] 图14显示了一系列所关注的GA支架结构域(SEQ ID NO:6-21)和 GA结构域共有序列(SEQ ID NO:1)的比对(Johansson等人(“细菌白蛋 白结合模块的结构、特异性和相互作用模式(Structure,Specificity,and Mode of Interaction for Bacterial Albumin-binding Modules)”，生物化学杂志(J. Biol.Chem.)，第277卷，第10期，第8114-8120页，2002)的图1，其可适 用作本发明化合物的支架结构域。

[0023] 图15显示了GA支架结构域(SEQ ID NO:2)与以下示例性VEGF-A 结合化合物的比对：1(SEQ ID NO:106)、1.1(SEQ ID NO:22)、1.1.1(SEQ ID NO:23)和1.1.1(c21a)(SEQ ID NO:24)。

[0024] 图16显示了示例性化合物1.1.1的熔融和重折叠曲线。熔融温度测定 为大约50℃。

[0025] 图17显示了示例性D-肽化合物(1.1.1(c21a)；杆状图)和VEGF-A(空 间填充图)之间的二聚复合物的X射线晶体结构的视图。

[0026] 图18A-18B描绘了相对于化合物1.1.1(c21a)具有截短的N末端的示例 性化合物((-)-TIDQW)的设计。图18A显示了示例性D-肽化合物(1.1.1 (c21a)；杆状图)与VEGF-A(空间填充图)之间的复合物的X射线晶体结 构的放大视图，其表明螺旋1的N末端残基不与螺旋2或螺旋3接触。在 一些情况下，可以从螺旋1截短所选N末端残基，而不会显著损失稳定性 或结合亲和力。图18B显示了截短(-)TIDQW与非截短(+)-TIDQW化合物1.1.1(c21a)的结构的并排比较。

[0027] 图19A-19C显示了化合物中进行亲和力成熟或并入任选选用的点突变 的一系列位置。图19A和19B描绘了获自X射线晶体结构的分离(图19A) 或与VEGF-A复合(图19B)的化合物1.1.1(c21a)的视图。图19C显示了 化合物1.1.1(c21a)的序列(SEQ ID NO:24)且标注所关注突变。

[0028] 图20显示了与VEGF-A(空间填充图)复合的化合物1.1.1(c21a)(杆 状图)的X射线晶体结构的放大视图，其中以黄色显示的位置31处的苯丙 氨酸(f)残基在复合物的结合界面处突出到VEGF-A的结合袋中。

[0029] 图21显示了突出到VEGF-A结合界面的结合袋中的f31残基侧链的放 大视图，其中苯环与相邻的VEGF-A的残基之间的选定距离以埃为单位显 示。对复合物结构的分析表明，在位置31处可容许各种苯丙氨酸类似物，例如在苯环的3、4和/或5位处包括取代基的类似

物,所述取代基可占据 VEGF-A的结合袋的可用空间(4.6至5.3埃)。

[0030] 图22显示了与VEGF-A(空间填充图)复合的化合物1.1.1(c21a)(杆 状图)的X射线晶体结构的放大视图,其中显示了选定螺旋2接触。205 和207分别为位置27和34处的组氨酸残基。所述结构显示在组氨酸34 (h34;207)的氮原子与相邻的VEGF-A的Asp90之间的弱氢键(大约4.6 埃)。209为化合物在位置37处的酪氨酸残基,所述残基向VEGF-A表面 突出。对复合物结构的分析表明,在位置27和34处可容许各种组氨酸类 似物,例如包括可占据VEGF-A表面上的可用空间和/或与相邻VEGF-A的 残基形成更强氢键(例如,长度<4.6埃)的被取代或未被取代的芳基或杂 环的类似物。

[0031] 图23显示了与VEGF-A(空间填充图)复合的化合物1.1.1(c21a)(杆 状图)的X射线晶体结构的放大视图,其中显示了选定螺旋3接触。所述 结构显示在组氨酸40(h40;210)的氮原子与相邻的VEGF-A的残基Tyr48 之间的中等强度氢键(2.9埃)。对复合物结构的分析表明,在位置40处可 容许各种组氨酸类似物,包括可占据可用空间且保留或加强与VEGF-A的 氢键的类似物。

[0032] 图24显示了与VEGF-A(蓝绿色带)复合的化合物1.1.1(c21a)(粉红 色和绿色杆状图)的X射线晶体结构的放大视图,其聚焦于连接子2的位 置37处的酪氨酸(y)残基(209)。显示了y37氧与邻近的VEGF-A表面 上的残基的氧或氮原子之间的距离,例如6.5和7.2埃,其表明在位置37 处可容许各种酪氨酸类似物,例如包括可与相邻的VEGF-A残基形成更紧密接触(例如,疏水接触和/或氢键)的被取代或未被取代的烷基-芳基或烷 基-杂芳基延伸侧链基团。

[0033] 图25显示了与VEGF-A(空间填充图)复合的化合物1.1.1(c21a)(杆 状图)的X射线晶体结构的放大视图,其聚焦于位置27处的组氨酸残基(h) (205)。对结构的分析表明,可在位置27处利用多种芳香族残基或组氨酸 类似物,以接触VEGF-A表面上的同一袋,且在一些情况下增加所需疏水 接触。还显示了[连接子1]区的位置25(e25,211)处的谷氨酸残基,其与 VEGF-A接触,包括与VEGF-A的肽主链的主链羰基的氢键(2.5埃)。

[0034] 图26显示了在针对D-VEGF-A结合子的噬菌体展示镜像筛选期间鉴别 出的所有克隆的选定位置的序列标识(logo),其中所述序列标识相比于化 合物1序列和天然GA结构域(GA-wt)的对应残基进行比对。

[0035] 图27A-27B显示了L-蛋白GA结构域(图27A)和D-化合物1.1.1(c21a) (图27B)的结构的比较,表明VEGF-A结合化合物中螺旋2与3之间的对 准角增大。

[0036] 图28A-28B显示了与VEGF-A同二聚体结合的D-肽化合物11055的X 射线晶体结构的两个描绘。图28A显示了D-肽化合物11055主要经由化合 物11055的变异GA结构域的螺旋2(H2)的结合接触而结合到VEGF-A。 图28B显示了图28A的结构,其中D-肽化合物11055以空间填充模型表示, 与结合到VEGF-A的VEGFR2(结构域2和3)的结构重叠。重叠图显示 了D-肽化合物11055阻断VEGFR2的结构域2(D2)与VEGF-A的结合。

[0037] 图29A-29B显示了亲和力成熟库的结构(图29A)和序列(图29B) 的描绘,所述亲和力成熟库被设计成筛选和鉴别使化合物11055的变异GA 结构域折叠稳定的特定位置处的残基。选择了总共7个残基用于螺旋1(H1) 与连接螺旋2(H2)和螺旋3(H3)的环之间的堆积界面处的突变。

[0038] 图30A-30C显示了筛选高亲和力的VEGF-A结合化合物的结果,所述 化合物包括在

位置7和38处具有半胱氨酸残基的共有序列标识(图30A)，和选定的所关注变异序列(图30B)(SEQ ID NO:108-113)以及其相对于亲本化合物11055,对VEGF-A的结合亲和力。图30C显示了亲本化合物11055的结构(图29A)的放大视图,其中以黄色显示的经鉴别的变异氨基酸残基位置17c和v38c彼此接近(βC到βC螺旋间距离为5.9埃),使得包括17c和v38c变异将使得在那些残基之间形成稳定化二硫键。

[0039] 图31A-31B显示了证明VEGF-A D-肽的活性的数据图。图31A显示了在VEGFR1结合ELISA中,所选化合物的VEGF-A拮抗活性。图31B显示了相对于贝伐单抗对照,所选化合物响应于VEGF信号传导对细胞增殖的抑制。

[0040] 图32A-32B显示了基于亲本Z结构域支架的噬菌体展示库的结构(图32A)和序列(图32B)的描绘。在Z结构域的螺旋1到螺旋2内选择十个位置(X),以使用孔克尔诱变(kunkel mutagenesis),用表示除半胱氨酸外的所有氨基酸的三核苷酸密码子进行随机化(图32B)。

[0041] 图33A-33B显示了使用Z结构域噬菌体展示库筛选与VEGF-A结合的镜像噬菌体展示的结构图33A显示了提供与VEGF-A结合的共有序列标识。图33B显示了选定的所关注变异Z结构域序列(SEQ ID NO:114-118)和其对天然L-VEGF-A的结合亲和力。NB是指非结合。

[0042] 图34显示了表面等离子体共振(SPR)传感图,其显示化合物978336和11055的累加结合,表明化合物978336(变异Z结构域化合物)结合到VEGF-A上与化合物11055(变异GA结构域化合物)的结合位点不重叠且独立的结合位点。

[0043] 图35A-35G显示了与VEGF-A同二聚体结合的D-肽化合物978336的X射线晶体结构的三个描绘。图35A显示了与其VEGF-A结合位点结合的两个单体D-肽化合物978336。图35B显示了图35A的结构,其中D-肽化合物978336以空间填充模型表示,与结合到VEGF-A的VEGFR2(结构域2和3)的结构重叠。重叠图显示了D-肽化合物978336阻断VEGFR2的结构域3(D3)与VEGF-A的结合。图35C显示了分离的978336的结构,其关注化合物的VEGF-A结合面,其中选自Z结构域库的变异氨基酸残基以红色显示。图35D显示了化合物978336(SEQ ID NO:117)的蛋白质与蛋白质接触(上图)和VEGF-A上的结合位点(下图)的放大视图,包括与结合位点接触的变异氨基酸的配置(上图)。图35E-35G示出了示例性VEGF-A结合化合物978336(SEQ ID NO:117)、鉴别的共有序列(SEQ ID NO:158)(图35F)和示例性化合物980181的序列(SEQ ID NO:119)的亲和力成熟研究。

[0044] 图36A-36B示出了示例性二价化合物缀合物的基于结构的设计,包括使用双马来酰亚胺PEG8连接子经由N末端半胱氨酸残基缀合的化合物11055和978336(图36A)。图36B示出了经由与双马来酰亚胺PEG8双官能团缀合而包括N末端到N末端连接的二价化合物979111的序列,其如通过SPR所测量,展现对L-VEGF-A的结合亲和力为1.7nM。

[0045] 图37A-37B显示了基于亲本GA结构域支架(SEQ ID NO:2)的噬菌体展示库(SEQ ID NO:159)的结构(图37A)和序列(图37B)的描绘。在GA结构域支架的螺旋2到螺旋3内选择十一个位置(X),以使用孔克尔诱变,用表示除半胱氨酸外的所有氨基酸的三核苷酸密码子进行随机化。

[0046] 图38A-38E示出了示例性二聚二价(即,含四结构域)化合物980870和980871的设计、合成和序列。图38A显示了与VEGF-A结合的示例性化合物11055和978336的X射线晶体结构的描述,和用于产生示例性二聚二价VEGF-A结合化合物的连接子的设计。化合物

11055的残基k19和化 合物978336的残基k7可经由其侧链氨基经由例如长度大约23埃或更长的 连接子连接。图38B显示了用于制备连接的四结构域化合物980870和 980871的合成方案。D-Pra为经由-NH-PEG2-CO-连接子与化合物980181 的k7的胺侧链连接的D-炔丙基甘氨酸残基。将叠氮基 -CH_2CONH-PEG2/3-CO-基团连接到化合物979110的k19的胺侧链，且随后使用点击化学缀合到炔丙基，形成结构域间连接子。图38C显示了经由 图38B的方案制备的示例性四结构域化合物的序列的描绘。图38D为示例 性二价化合物的示意图，其包括在GA结构域的残基x19与Z结构域的残 基x7之间的连接子L^1。图38E为示例性二聚二价化合物的示意图，其包括 在GA和Z结构域的C末端残基之间的第二连接子L^2。

[0047] 图39A-39B显示了测量与单价结构域979110和980181和贝伐单抗相 比，示例性二聚二价(即，含四结构域)化合物针对VEGF-A的活体外(图 39A)和基于细胞(图39B)的拮抗活性的分析结果的图。

[0048] 图40A-40C显示了使用镜像噬菌体展示开发的D-蛋白VEGF-A拮抗剂 的活性数据。(图40A)针对D-VEGF-A目标的GA结构域和Z结构域命中 的噬菌体滴定ELISA，显示可滴定结合。(图40B)噬菌体竞争ELISA，其 使用对应于GA结构域命中的合成L-对映异构体作为取代噬菌体与 D-VEGF-A结合的可溶性竞争物。(图40C)在VEGF-A阻断ELISA中， 合成D-蛋白RFX-11055和RFX-978336的滴定，显示相对于贝伐单抗的拮 抗活性。

[0049] 图41A-41F显示了与VEGF-A复合的D-蛋白RFX-11055和 RFX-978336的结构。(图41A和41B)与VEGF-A同二聚体(灰色)的远 端处相异的非重叠表位结合的RFX-11055(紫色)和RFX-978336(蓝色) 的概览。(图41C和41D)针对RFX-11055和RFX-978336描绘的接触VEGF-A的界面D-氨基酸侧链，其具有RFX-11055的螺旋2和3以及 RFX-978336的螺旋1和2内的选定库残基(橙色)和原始支架残基(蓝色)。VEGF-A显示为具有静电表面电位，以突出显示正性(蓝色)、负性(红色) 和中性疏水(白色)接触位点。(图41E)先前报导的与VEGFR-1受体(浅 橙色)复合的VEGF-A(灰色)的晶体结构。分离VEGFR-1的Ig结构域2 和3(D2和D3)以突出显示VEGF-A(PDB代码:5T89)受体接合中的 分子相互作用(24)。(图41F)RFX-11055和RFX-978336在 VEGF-A/VEGFR-1复合物上的重叠图，以证明与D2和D3的直接竞争为 VEGF-A阻断的机制。

[0050] 图42A-42C示出了RFX-11055和RFX-978336的结构引导的亲和力成 熟。(图42A)结合到VEGF-A(灰色)的RFX-11055(紫色)的结构，显 示作为亲和力成熟库目标以使螺旋1与螺旋2-3结合界面之间的堆积稳定 的七个残基(橙色)。(图42B)结合到VEGF-A(灰色)的RFX-978336(蓝 色)的结构，显示螺旋1-2结合界面和选择用于软随机化库的四个残基。(图42C)在VEGF阻断ELISA中，亲和力成熟D-蛋白RFX-979110和 RFX-980181的滴定，显示相对于贝伐单抗的拮抗活性。

[0051] 图43A-43B显示了D-蛋白异二聚VEGF-A拮抗剂的活体外活性。(图 43A)在VEGF-A阻断ELISA中，与贝伐单抗和VEGFR1-Fc可溶性诱饵受 体相比，亲和力成熟D-蛋白RFX-979110和高亲和力异二聚体RFX-980869 的滴定。(图43B)细胞活性分析，显示RFX-980869强效阻断经由VEGFR2 的VEGF-A信号传导，效力与贝伐单抗相当。

[0052] 图44A-44B显示了湿性AMD的兔眼模型中，D-蛋白RFX-980869的 活体内活性。(图44A)代表性的荧光素血管造影术(FA)图像，描绘在施 用相应药物后第5天和第26天时VEGF-A165诱导的血管渗漏的程度(对 照＝无药物治疗)。(图44B)在第5天和第26天时个别

FA评分的图。评分 如下:0＝大血管笔直,小血管一定程度扭曲,且无扩张;1＝大血管扭曲增 加,且一定程度扩张;2＝大血管之间的渗漏和显著扩张;3＝大血管与小血 管之间的渗漏,且小血管仍可见;4＝大血管与小血管之间的渗漏,且小血 管可见性不良或不可见。每组N＝5只兔(10只眼)。所有数据绘制为平均 值±SEM。(****p<0.0001,曼-惠特尼测试(Mann-whitney test))

[0053] 图45A-45D显示了RFX-980869的肿瘤生长抑制活性和缺乏免疫原性。(图45A)C57BL6小鼠中的MC38肿瘤生长曲线,显示RFX-980869和纳 武单抗(nivolumab)两者的剂量依赖性功效。每组N＝6只小鼠。(图45B) 第15天肿瘤体积(*p<0.05,曼-惠特尼测试)(图45C)使用针对抗原特 异性血清IgG的ELISA,在第22天血清样品中测量的来自MC38肿瘤研究 的抗药物抗体。(图45D)在BALB/c小鼠中皮下免疫接种对应药物后,从 第42天血清测量的抗药物抗体滴度。每组N＝5只小鼠。所有数据绘制为平 均值±SEM。

[0054] 图46A-46C显示了噬菌体展示库和D-蛋白的序列。(图46A)用于淘 选的GA结构域支架序列和库。将GA库中加下划线的残基用NNK密码子 进行硬随机化,以获得全氨基酸多样性。使用NNC密码子对AM库中加下 划线的残基进行硬随机化,以获得包括半胱氨酸的15个氨基酸的多样性。RFX-11055和RFX-979110的小写字母氨基酸表示D-氨基酸。从上到下的 序列:(SEQ ID NO:2;SEQ ID NO:108;SEQ ID NO:108;SEQ ID NO:108; SEQ ID NO:113)(图46B)用于淘选的Z结构域支架序列和库。针对全氨 基酸多样性,使用除半胱氨酸外各氨基酸的三核苷酸密码子对GA库中加 下划线的残基进行硬随机化。使用密码子对AM库中加下划线的残基进行 软随机化,以在各氨基酸处并入30％突变率。RFX-978336和RFX-980181 的小写字母氨基酸表示D-氨基酸。从上到下的序列:SEQ ID NO:163;SEQ ID NO:117;SEQ ID NO:117;SEQ ID NO:117;SEQ ID NO:119)。(图46C) 异二聚拮抗剂980869的全D-氨基酸序列。

[0055] 图47显示了针对D-蛋白和贝伐单抗测量的动力学结合参数的SPR传 感图。

[0056] 图48显示了RFX-978336和RFX-11055的基于SPR的表位定位。在第 一缔合步骤中,使用5μM RFX-978336使芯片表面上的VEGF-A饱和。在 第二缔合步骤中,1μM RFX-11055与5μM RFX-978336一起被包括,且展 现与VEGF-A的累加结合,表明RFX-11055的位点未由RFX-978336阻断。 两种D-蛋白均显示从VEGF-A完全解离。

[0057] 图49A-49B示出了VEGF-A/VEGFR-1接触的结构表征。(图49A)针 对与VEGFR-1(浅橙色)复合的VEGF-A(灰色)解析的先前结构,描绘 VEGF-A上的表位由VEGFR-1的D2和D3 Ig结构域接触,按元素着色(白 色碳,红色氧,蓝色氮和黄色硫)(PDB ID:5T89,24)。(图49B)(图49A) 的展开(open book)表示,其中D2和D3结构域远离VEGF-A旋转180 度,且显示两个分子的静电表面电位。圈出D2和D3结合位点,突出显示 D2相互作用的主要非极性疏水性质和D3相互作用的极性亲水性质。

[0058] 图50A-50B示出了异二聚D-蛋白RFX-980869的设计和合成。(图 50A)与VEGF-A(灰色)结合的RFX-11055(紫色)和RFX-978336(蓝 色)的结构重叠图,显示以球状表示的赖氨酸残基(RFX-11055上的K19 和RFX-978336上的K7)以及针对提出的PEG连接的距离测量值。(图50B) 使用固相肽合成,用配备有‘点击’化学官能团的肽和PEG部分产生D- 蛋白异二聚体RFX-980869的合成方案。

[0059] 图51显示了具有D-蛋白和贝伐单抗的来源于SPR的动力学结合参数 概述的表。

[0060] 图52显示了具有在非平衡ELISA中,D-蛋白和贝伐单抗阻断 VEGF-A121与VEGFR1-Fc结合的IC50值概述的表。

[0061] 图53显示了具有针对VEGF/D-蛋白复合物的数据收集与优化统计数 据的表。

[0062] 图54显示了具有在平衡结合ELISA中阻断VEGF-121A与VEGFR1-Fc 结合,和在细胞信号传导分析中对VEGF-A信号传导进行抑制的D-蛋白和 贝伐单抗的IC50值概述的表。

[0063] 图55显示了在针对D-肽Z结构域VEGF-A结合子的噬菌体展示镜像 筛选期间鉴别出的所有克隆的选定位置的序列标识,其中所述序列标识相 比于天然Z结构域(Z-wt)的对应残基进行比对。

具体实施方式

[0064] 多价D-肽结合化合物

[0065] 如上文所概述,本公开的方面包括以高亲和力与VEGF特异性结合的 多价D-肽化合物。本公开提供了一类多价化合物,其能够在目标蛋白上的 两个或更多个相异结合位点处与VEGF目标蛋白特异性结合。术语“多价” 是指化合物与目标蛋白之间的相互作用,所述相互作用可发生在目标蛋白 分子的两个或更多个分开且相异的位点处。多价D-肽化合物能够进行多种 结合相互作用,所述相互作用可协作发生以提供针对目标蛋白的高亲和力结合子,和对目标蛋白功能的强效生物效应。术语“多聚”是指包括两个 (即,二聚)、三个(即,三聚)或更多单体肽单元(例如,结构域)的化 合物。当多聚化合物为同源的时,各肽单元可具有相同结合特性,即,各 单体单元能够结合到VEGF目标蛋白分子上的相同结合位点。此类多聚化 合物用于结合以同二聚体形式天然存在或能够多聚化的目标蛋白。二聚化合物可同时结合到VEGF目标蛋白同二聚体的两个分子上的两个一致的结 合位点。在一些情况下,视目标蛋白而定,本公开的多价D-肽化合物可多 聚化,例如,二聚二价D-肽化合物可包括两个二价D-肽化合物的二聚体。 在某些情况下,多聚化合物为异源的,且各肽单元(例如,结构域或二价 单元)特异性结合不同目标位点或蛋白质。

[0066] 多价肽化合物包括至少两个肽结构域,其中各结构域具有由变异氨基 酸构成的特异性决定基序,所述变异氨基酸配置为在结合位点处提供特定 蛋白质-蛋白质相互作用的界面。当多个肽结构域连接在一起时,其可同时 接触目标蛋白,且在多个结合位点处提供多个界面。多个蛋白质-蛋白质结 合相互作用可经由亲合力(avidity)效应协作发生,以提供比单独任一个 D-肽结构域可能实现的亲和力显著更高的有效亲和力。本公开公开了使用 支架化小蛋白质结构域库的镜像噬菌体展示筛选以产生结合多个目标结合 位点的多个肽结构域的用途,且此类结构域可成功地连接以产生展现强亲 合力效应的高亲和力结合子。本发明人展现的多聚化合物在活体内具有与 对应的抗体药剂相当或更好的亲和力,且提供针对VEGF目标蛋白的有效 生物活性。

[0067] 一般来说,VEGF目标蛋白为天然存在的L-蛋白,且化合物为D-肽化 合物。应理解,对于本文所描述的D-肽化合物中的任一个,化合物的L-肽 形式也包括于本公开中,所述L-肽形式与D-VEGF目标蛋白特异性结合。通过使用针对结合到合成D-VEGF目标蛋白镜像筛选多种支架化结构域噬 菌体展示库的方法,部分地鉴别本发明肽化合物。

[0068] 与对应的L-多肽相比,D-肽化合物可为治疗应用提供许多期望特性, 例如蛋白水解稳定性、显著降低的免疫原性和长活体内半衰期。与VEGF 的抗体药剂相比,本公开的D-

肽化合物一般来说尺寸显著较小。在一些情 况下,本发明化合物的较小尺寸和特性提供了优于基于抗体的治疗剂的施 用途径、组织分布与组织渗透和剂量方案。

[0069] 本公开提供了包括至少第一和第二D-肽结构域的多价D-肽化合物。第 一和第二D-肽结构域可特异性结合到目标蛋白的相异非重叠结合位点,且 可经由连接组分(例如,如本文所描述)彼此连接。连接组分可以被配置 成允许同时或依序结合到目标蛋白。“依序结合”意味着第一D-肽结构域 与目标的结合可增加第二D-肽结构域结合发生可能性,即使结合并非同时 发生。

[0070] 第一和第二D-肽结构域可彼此异源,即,所述结构域具有不同结构域 类型。举例来说,第一D-肽结构域可为变异GA结构域,且第二D-肽结构 域可为变异Z结构域,或反过来也一样。使用两个不同支架化结构域库进 行VEGF的镜像噬菌体展示筛选提供了针对VEGF上的两个不同结合位点 的变异结构域结合子。

[0071] 当多价D-肽化合物仅包括两个此类结构域时,其可被称为二价的。三 价、四价和更高的多价也是可能的。三价D-肽化合物可包括经由两个连接 组分以线性方式或经由单个三价连接组分连接的三个D-肽结构域。三价D- 肽化合物可包括经由各D-肽化合物上两个半胱氨酸残基之间的二硫化物连 接进行连接的两个相同的D-肽化合物,和二硫化物连接的D-肽化合物中的 一者与第三D-肽化合物之间的连接组分。四价和更高的多价化合物可类似 地经由二价连接组分以线性方式连接,或经由一个或多个多价或分支连接 组分以分支配置连接。

[0072] 连接组分

[0073] 术语“连接组分”意指涵盖能够在本发明化合物的两个或更多个D-肽 结构域之间建立共价连接的多价部分。有时,连接组分为二价的。或者, 连接组分为三价或树枝状的。可在D-肽结构域多肽合成期间或合成后安置 连接组分,例如经由两个或更多个已折叠的D-肽结构域的缀合。可使用双 官能连接子经由两个D-肽结构域的缀合将连接组分安置于本发明化合物 中。也可设计连接组分,使得其可在D-肽结构域多肽合成期间并入,例如,其中连接组分本身为肽,且经由氨基酸残基序列的固相肽合成(SPPS)制 备。另外,可在多肽合成期间安置化学选择性官能团和/或连接子,以使得 可在SPPS后容易地缀合D-肽结构域。

[0074] 任何合宜的连接基团或连接子都可适合用作本发明多价化合物的连接 组分。所关注的连接基团和连接子单元包括但不限于氨基酸残基、多肽、PEG 单元、(PEG)n连接子(例如,其中n为2-50,例如2-40、2-30、2-20或2-10)、经末端修饰的PEG(例如,$-NH(CH_2)_mO[(CH_2)_2O]_n(CH_2)_pCO-$、或 $-NH(CH_2)_mO[(CH_2)_2O]_n(CH_2)_mNH-$、或$-CO(CH_2)_pO[(CH_2)_2O]_n(CH_2)_pCO-$连接 基团,其中m为2-6,p为1-6,且n为1-50,例如1-20、1-12或1-6)、C1-C6 烷基或被取代的C1-C6烷基连接子、C2-C12烷基或被取代的C2-C12烷基 连接子、琥珀酰基(例如,$-COCH_2CH_2CO-$)单元、二氨基亚乙基单元(例 如,$-NRCH_2CH_2NR-$,其中R为H、烷基或被取代的烷基)、$-CO(CH_2)_mCO-$、 $-NR(CH_2)_pNR-$、$-CO(CH_2)_mNR-$、$-CO(CH_2)_mO-$、$-CO(CH_2)_mS-$(其中m为1 至6,p为2-6,且各R独立地为H、C(1-6)烷基或被取代的C(1-6)烷基) 和其组合,例如经由例如酰胺(例如,-CONH-或-CONR-,其中R为C1-C6 烷基)、磺酰胺、氨基甲酸酯、羰基(-CO-)、醚、硫醚、酯、硫酯、氨基 (-NH-)和其类似基团的连接官能团连接。连接组分可为肽,例如,包括氨 基酸残基序列的连接子。连接组分可为式$-(L^1)_a-(L^2)_b-(L^3)_c-(L^4)_d-(L^5)_e-$的连接 子,

其中L^1到L^5各自独立地为连接子单元，且a、b、c、d和e各自独立 地为0或1，其中a、b、c、d和e的总和为1至5。如本文所描述的多聚 化合物中所示，其它连接子也是可能的。

[0075] 连接组分可包括经末端修饰的PEG连接子，其使用任何合宜的连接化 学方法与D-肽化合物连接。PEG为聚乙二醇。术语“经末端修饰的PEG” 是指任何合宜长度的聚乙二醇，其中一个或两个末端被修饰以包括适合于 缀合到例如另一连接基团部分，或肽化合物的末端或侧链的化学选择性官 能团。实例章节描述了数种示例性的具有末端马来酰亚胺官能团的经末端 修饰的PEG双官能连接子的用途，其用于化学选择性地缀合到硫醇基，例 如安置于D-肽结构域序列中的半胱氨酸残基。可在GA结构域基序的N和 /或C末端处修饰D-肽化合物，以包括一个或多个额外氨基酸残基，其可提 供特定的连接或连接化学以连接到多价连接基团，例如半胱氨酸或赖氨酸。

[0076] 可用于经由连接基团连接本发明肽化合物的化学选择性反应性官能团 包括但不限于：氨基(例如，N末端氨基或赖氨酸侧链基团)、叠氮基、炔 基、膦基、硫醇(例如，半胱氨酸残基)、C末端硫酯、芳基叠氮化物、马 来酰亚胺、碳二亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)-酯、酰肼、PFP-酯、羟 甲基膦、补骨脂素、亚氨酸酯、吡啶基二硫化物、异氰酸酯、氨氧基-、醛、酮、氯乙酰基、溴乙酰基和乙烯基砜。

[0077] 在本发明的多聚体中可利用任何合宜的多价连接子。多价意味着连接 子包括两个或更多个适合连接到本发明化合物的组分例如肽结构域的末端 或侧链基团，如本文所描述。在一些情况下，多价连接子为二价或三价的。 在一些情况下，多价连接子为树枝状聚合物(dendrimer)支架。任何合宜 的树枝状聚合物支架都可适用于本发明的多聚体。树枝状聚合物支架为分 支分子，其包括至少一个分支点，和两个或更多个适合于经由任选选用的 连接子连接到结构域的N末端或C末端的末端。可选择树枝状聚合物支架 以提供两个或更多个结构域的所需空间布置。在一些情况下，选择两个或 更多个结构域的空间布置以提供针对VEGF目标蛋白的所需结合亲和力和 亲合力。

[0078] 在一些情况下，多价连接子基团衍生自/包括化学选择性反应性官能团， 其能够与第二肽结构域上相容的官能团缀合。在某些情况下，多价连接子 基团为能够与多价结合部分(例如，抗生蛋白链菌素或抗体)特异性结合 的特异性结合部分(例如，生物素或肽标签)。在某些情况下，多价连接子 基团为能够直接与第二化合物的第二特异性结合部分形成同二聚体或异二 聚体的特异性结合部分。因此，在一些情况下，在化合物包括包含多价连 接子基团的所关注分子的情况下，化合物可为多聚体的一部分。或者，化 合物可为能够直接与一种或多种其它化合物多聚化或经由与多价结合部分 结合而间接多聚化的单体。

[0079] 示例性多价D-肽化合物

[0080] 本公开提供了结合VEGF-A的多价化合物。多价VEGF-A结合化合物 可以是二价的，并且包括经由连接组分(例如，如本文所描述)连接的两 个相异的变异结构域。本文公开了特异性结合VEGF-A的示例性单D-肽结 构域，其与目标蛋白上两个不同结合位点中的一个结合。图36A显示了同 时结合到目标VEGF-A的两个此类单结构域的晶体结构。本文描述了在 VEGF-A的第一结合位点处结合的VEGF-A特异性变异GA结构域多肽。 在一些情况下，第一结合位点由VEGF-A的氨基酸侧链F43、M44、Y47、 Y51、N88、D89、L92、I72、K74、M107、I109、Q115和I117界定。在一 些情况下，VEGF-A特异性多肽为锁定的变异GA结构域(例如，如本文所描述)。本发明VEGF-A特异性D-肽变异GA结构域多肽中的任一者可 经由连接组分连接到

第二D-肽结构域,所述第二D-肽结构域特异性结合到 目标VEGF-A的第二且相异的结合位点。在一些情况下,第二结合位点由 VEGF-A的氨基酸侧链E90、F62、D67、I69、E70、K110、P111、H112和 Q113界定。参见图36A,其显示示例性Z结构域多肽在与示例性GA结构 域多肽化合物11055相异的位点处结合。目标结合位点中的至少一个或两 个应与VEGF-A目标蛋白上的VEGFR2结合位点部分重叠,以便提供拮抗 活性。参见例如图35B。

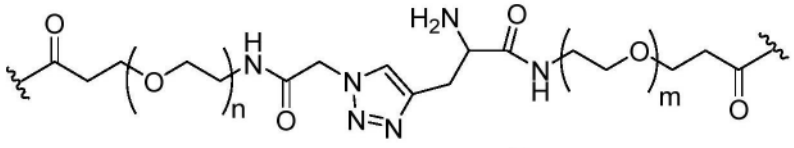
[0081] 可与D-肽变异Z结构域多肽连接以便提供VEGF-A结合二价化合物的 D-肽变异GA结构域多肽包括但不限于化合物11055、979102和 979107-979110,和其变异体(例如,如本文所描述)。

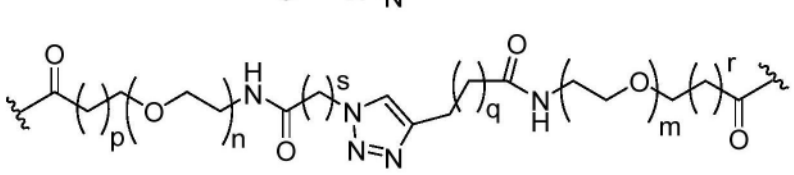
[0082] 可与D-肽变异GA结构域多肽连接以便提供VEGF-A结合二价化合物 的D-肽变异Z结构域多肽包括但不限于化合物978333至978337、980181、 980174-980180和981188-981190,和其变异体(例如,如本文所描述)。

[0083] 在图36A中,显示了连接两个D-肽结构域的N末端的一种可能的连接 组分的示意图。在一些情况下,N末端到N末端连接子为(PEG)n双官能连 接子,其中n为2-20,例如4-20或8-20(例如,n为5、6、7、8、9、10、 11或12)。任何合宜的化学选择性官能团可并入于所连接的D-肽结构域中 以便提供缀合。可在肽合成后使用相容的化学选择性官能团(例如,如本文所描述)实现结构域间连接。也可在固相肽合成(SPPS)期间将连接组 分并入到本发明多价化合物的D-肽多肽中。参见例如图50B。

[0084] 在一些情况下,可通过延伸结构域的多肽序列以并入半胱氨酸残基来 安置N末端到N末端连接子,所述半胱氨酸残基提供与包含马来酰亚胺的 同双官能PEG连接子的缀合。举例来说,化合物11055和978336两者化 学合成有额外N末端半胱氨酸残基,所述N末端半胱氨酸残基使用常规方 法与双马来酰亚胺PEG8连接子缀合,以提供N末端到N末端连接(图36A)。举例来说,表5提供了以高亲和力结合VEGF-A的示例性二价化合 物,化合物979111的细节。图50A显示了与VEGF-A结合的D-肽结构域 11055和978336的晶体结构的视图,和替代性结构域间连接子的位置,即 从变异GA结构域的k19到变异Z结构域的k7,其可用于由多种结合 VEGF-A的变异GA结构域和Z结构域多肽制备二价化合物。

[0085] 图38D显示了示例性二价化合物的通用结构,其包括在GA结构域的 残基x19与Z结构域的残基x7之间的连接子L^1。任何示例性D-肽GA结 构域(例如,如本文所描述)和D-肽Z结构域(例如,如本文所描述)可 配置有如图38D中所示的连接组分L^1。在一些实施例中,x19和x7残基各 自独立地为赖氨酸和鸟氨酸,且连接子具有以下结构中的一个:

[0086] 

[0087] 

[0088] 其中n和m独立地为1-122,例如1-6;且p、q和r各自独立地为0-3，例如0或1;且s为1-6,例如1-3。在L^1的一些情况下,n+m为2-6,例 如3、4或5。在L^1的一些情况下,n和m各自为2。在L^1的一些情况下，n和m各自为3。在L^1的一些情况下,p、q和r各自为1。在L^1的一些情 况下,p为0。在L^1的一些情况下,q为0。在L^1的一些情况下,r为0。 在L^1的一些情况下,s为2。在L^1的一些情况下,s为3。

[0089] 图38E为示例性二聚二价化合物的示意图,其包括在GA和Z结构域 的C末端残基之间的第二连接子L^2。图38B显示了示例性连接子L^2,其用 于连接2种二价化合物的Z结构域的C末端残基,且能够在SPPS期间安 置。C末端到C末端连接子可包括一个或多个氨基酸残基和一个或多个连 接单元(例如,如本文所描述)。包括至少一个残基,其提供氨基酸的分支(例如,赖氨酸)和偶联,例如与氨基侧链和α-氨基的偶联。C末端到C末 端连接子可包括一个或多个氨基酸残基和一个或多个连接单元(例如,如 本文所描述)。在一些情况下,可在SPPS期间将一个或多个残基安置在结 构域的C末端处,其提供共价连接,从而蛋白质结构域能够同时结合到 VEGF目标。

[0090] 示例性多聚多价D-肽化合物

[0091] 本公开的方面包括多聚(例如,二聚、三聚或四聚等)D-肽化合物，其包括本文所描述的本发明变异结构域多肽和/或二价化合物中的任何两种 或更多种。本公开的多聚体可指具有两个或更多个同源结构域或两种或更 多种同源二价化合物的化合物。因此,二价化合物的二聚体可包括经由连 接组分连接的本文所描述的二价化合物中的任一者的两个分子。目标分子 VEGF-A可为同二聚体,且同源二聚化合物可提供与各VEGF-A目标单体 上的类似位点的结合。举例来说,图36A显示了与VEGF-A二聚体结合的 两个结构域11055分子和两个结构域978336分子的晶体结构的重叠图。指 示了用于并入化学连接以连接四个结构域的示例性位点。在图38B和38C 中详细说明了示例性连接组分。在一些情况下,使用结构域的C末端之间 的肽连接子实现二价化合物的二聚化(11055+978336)。举例来说,表5和图38C显示了示例性VEGF-A结合二聚二价化合物980870和980871的序 列和配置,其展现在SPPS期间(参见图38B)或SPPS后(例如,如本文 所描述),任何合宜的连接基团都可连接到多肽结构域的C末端以引入二聚 化连接组分。

[0092] 肽结构域

[0093] 任何合宜的肽结构域都可用于本发明化合物中。在噬菌体展示筛选中 利用了多种小蛋白质结构域,其可适用于在针对如本文所描述的目标蛋白 进行镜像筛选的方法中使用。所关注的小肽结构域可由25至80个氨基酸 残基,例如30至70个残基、40至70个残基、40至60个残基、45至60 个残基、50至60个残基或52至58个残基的单链多肽序列组成。肽结构域 的分子量(MW)可为1至20千道尔顿(kDa),例如2至15kDa、2至10 kDa、2至8kDa、3至8kDa或4至6kDa。

[0094] 肽结构域可为三螺旋束结构域。三螺旋束结构域具有由通过环区接合 的两个平行螺旋和一个反向平行螺旋组成的结构。所关注的三螺旋束结构 域包括但不限于GA结构域、Z结构域和白蛋白结合结构域(ABD)结构 域。

[0095] 基于本公开,应理解,可修饰肽结构域基序的不位于结构的目标结合 表面处的数个氨基酸残基,而不会对所得经修饰化合物的三维结构或目标 结合活性产生显著不利影响。因此,可根据需要将数种氨基酸修饰/突变并 入到本发明化合物中,以便赋予化合物所

需特性,包括但不限于提高的水 溶性、易于化学合成、合成成本、缀合位点、螺旋间连接位点、稳定性、 等电点(pI)、抗聚集性和/或减少的非特异性结合。可选择突变的位置,以 便避免或最小化对特异性决定基序(SDM)或提供与目标蛋白的特异性结 合的目标结合结构域基序的基础三维结构的任何破坏。举例来说,可使结 构域结构与结合表面相反侧上的溶剂暴露位置发生突变,以引入所需变异 氨基酸残基,例如以提高溶解度或提供所需蛋白质pI,或并入缀合或连接 位点。在一些情况下,基于目标结合结构域基序的三维结构,可选择突变 的位置以提供提高的稳定性(例如,经由将变异氨基酸引入到结构的核心 堆积残基中),或提高的结合亲和力(例如,经由在SDM中引入变异氨基 酸)。在一些情况下,化合物在不为与VEGF目标蛋白的结合表面的一部分 的位置处包括两个或更多个,例如3个或更多个、4个或更多个、5个或更 多个、6个或更多个、7个或更多个、8个或更多个、9个或更多个、或10 个或更多个表面突变。

[0096] VEGF结合Z结构域

[0097] 本公开提供了特异性结合VEGF的D-肽Z结构域。Z结构域可包括由 位于Z结构域的位置9、10、13、14、17、24、27、28、32和/或35处的5 个或更多个变异氨基酸残基(例如,5、6、7、8、9或10个变异氨基酸残 基)界定的VEGF特异性决定基序(SDM)。应理解,多种基础Z结构域 支架或肽框架序列可用于提供Z结构域的特征三维结构。

[0098] 术语“Z结构域”是指具有与蛋白A的免疫球蛋白G结合结构域相关 的三螺旋束三级结构的肽结构域。在蛋白质数据库(PDB)中,结构2spz 提供了示例性Z结构域结构。还参见图32A和图32B,其包括天然Z结构 域结构和未经修饰天然Z结构域的一个示例性序列的描绘。术语“Z结构 域支架”是指基础Z结构域序列,其提供特征3-螺旋束结构且可适用于在本发明化合物中使用。“变异Z结构域”为在三螺旋束三级结构的所选位置 处包括变异氨基酸的Z结构域,其提供与目标蛋白的特异性结合。Z结构 域基序一般可由以下式描述:

[0099] [螺旋3]-[连接子1]-[螺旋2]-[连接子2]-[螺旋1]

[0100] 其中[连接子1]和[连接子2]独立地为1与10个残基之间的肽连接序列, 且[螺旋1]、[螺旋2]和[螺旋3]如上文针对GA结构域所描述。

[0101] 所关注的Z结构域包括但不限于Nygren(“替代结合蛋白:由小三螺 旋束支架开发的亲和抗体结合蛋白(Alternative binding proteins:Affibody binding proteins developed from a small three-helix bundle scaffold)”,欧洲生 物化学联合会杂志(FEBS Journal)275(2008)2668-2676)、US20160200772、US9,469,670所描述的结构域,和蛋白A的33残基最小化Z结构域,其由 Tjhung等人(微生物学前沿(Front.Microbiol.),2015年4月28日)描述, 文献的公开内容以全文引用的方式并入本文中。

[0102] 出于描述本公开的一些示例性VEGF-A特异性Z结构域的目的,利用 图36B的编号57残基支架序列。在一些实施例中,D-肽Z结构域为以下 结构式的三螺旋束:[螺旋1$^{(\#8\text{-}18)}$]-[连接子1$^{(\#19\text{-}24)}$]-[螺旋2$^{(\#25\text{-}36)}$]-[连接子 2$^{(\#37\text{-}40)}$]-[螺旋3$^{(\#41\text{-}54)}$]

[0103] 其中:#表示D-肽GA结构域中所包含的氨基酸残基的参考位置。应理 解,螺旋1-3可界定为包括在螺旋末端处延伸的一个或多个额外残基,且 位于此类末端处的残基可具有部分螺旋配置,和/或处于转角或环区开始处。 在一些情况下,Z结构域的螺旋1可在N末端处进一步包括一个或多个额 外氨基酸残基,例如在位置7和视情况位置6处的螺旋残基。在一些情况 下,Z结构域的螺旋1可在位置7处进一步包括氨基酸残基。在一些情况 下,Z结

构域包括位置8的N末端残基，其可提供所需特性，例如螺旋1 稳定化、三螺旋束的稳定化、额外VEGF结合接触、螺旋1延伸和与所关 注的第二结构域或部分(例如，如本文所描述)的连接。在一些情况下，Z 结构域包括位置54的C末端残基，其可提供所需特性，例如螺旋3稳定化、 三螺旋束的稳定化、额外VEGF结合接触、螺旋3延伸和与所关注的第二 结构域或部分(例如，如本文所描述)的连接。

[0104] D-肽Z结构域化合物可在由VEGF的氨基酸侧链E90、F62、D67、I69、E70、K110、P111、H112和Q113界定的结合位点处特异性结合VEGF-A。

[0105] 示例性VEGF-A结合D-肽Z结构域包括表4中所描述的结构域，和由 以下化合物的序列描述的结构域：978333至978337和980181(SEQ ID NO: 114-119)、980174-980180和981188-981190(SEQ ID NO:120-129)。鉴于 本公开中描述的结构和序列变异体，应理解，可在保留与VEGF-A特异性 结合的同时对示例性化合物的序列进行许多氨基酸取代。通过选择容许变 化而不会不利地影响Z结构域的三维架构的变异Z结构域的位置，可并入 许多氨基酸取代。

[0106] 因此，本公开包括978333至978337和980181(SEQ ID NO:114-119)、 980174-980180和981188-981190(SEQ ID NO:120-129)的序列，其具有 1-10个氨基酸取代(例如，1-8、1-6或1-5个取代，例如1、2、3、4或5 个氨基酸取代)。所述1-10个氨基酸取代可为基于氨基酸侧链的物理特性 的例如根据表6的氨基酸取代。有时，根据表6，用类似的氨基酸取代978333 至978337和980181(SEQ ID NO:114-119)、980174-980180和 981188-981190(SEQ ID NO:120-129)的序列的氨基酸。在一些情况下， 取代是关于根据表6的保守氨基酸取代或高度保守氨基酸取代。

[0107] 本公开包括VEGF-A结合D-肽Z结构域，其由与978333至978337和 980181(SEQ ID NO:114-119)、980174-980180和981188-981190(SEQ ID NO:120-129)的序列具有80％或更高序列同一性，例如85％或更高、87％ 或更高、89％或更高、91％或更高、93％或更高、94％或更高、96％或更高、 98％或更高序列同一性的序列描述。

[0108] VEGF-A结合D-肽Z结构域可在Z结构域支架的位置9、10、13、14、 17、24、27、28、32和35处具有氨基酸残基，所述位置由图33A和/或图 35F中所描绘的特异性决定基序(SDM)界定。在一些情况下，特异性决 定基序(SDM)由以下序列基序界定：

[0109] $w^{9}d^{10}$--$w^{13}x^{14}$--r^{17}------x^{24}--$k^{27}x^{28}$---x^{32}--y^{35}(SEQ ID NO:160)

[0110] 其中：x^{14}、x^{24}、x^{28}和x^{32}各自独立地为任何氨基酸残基。在SDM的 某些情况下：x^{14}选自l、r和t；x^{24}选自h、i、l、r和v；x^{28}选自G、r和v； 且x^{32}选自a、r、h、s和t。在某些情况下，特异性决定基序(SDM)为：

[0111] $w^{9}d^{10}$--$w^{13}r^{14}$--r^{17}------l^{24}--$k^{27}r^{28}$---s^{32}--y^{35}(SEQ ID NO:161)；或

[0112] $w^{9}d^{10}$--$w^{13}r^{14}$--r^{17}------v^{24}--$k^{27}r^{28}$---r^{32}--y^{35}(SEQ ID NO:162)。

[0113] 在一些实施例中，特异性结合VEGF的D-肽化合物包含D-肽Z结构 域，所述结构域包含由以下氨基酸残基界定的VEGF特异性决定基序 (SDM)：

[0114] $w^{9}d^{10}$--$w^{13}x^{14}$--r^{17}------x^{24}--$k^{27}x^{28}$---x^{32}--y^{35}(SEQ ID NO:160)

[0115] 其中：

[0116] x^{14}选自l、r和t；

[0117] x^{24}选自h、i、l、r和v；

[0118] x^{28}选自G、r和v;

[0119] x^{32}选自a、r、h、s和t;且

[0120] x^{35}选自k或y。

[0121] 在VEGF SDM的一些实施例中,x^{14}为l。在VEGF SDM的一些实施 例中,x^{14}为r。在VEGF SDM的一些实施例中,x^{14}为t。

[0122] 在VEGF SDM的一些实施例中,x^{24}为h。在VEGF SDM的一些实施 例中,x^{24}为i。在VEGF SDM的一些实施例中,x^{24}为l。在VEGF SDM的 一些实施例中,x^{24}为r。在VEGF SDM的一些实施例中,x^{24}为v。

[0123] 在VEGF SDM的一些实施例中,x^{28}为G。在VEGF SDM的一些实施 例中,x^{28}为r。在VEGF SDM的一些实施例中,x^{28}为v。

[0124] 在VEGF SDM的一些实施例中,x^{32}为a。在VEGF SDM的一些实施 例中,x^{32}为r。在VEGF SDM的一些实施例中,x^{32}为h。在VEGF SDM 的一些实施例中,x^{32}为s。在VEGF SDM的一些实施例中,x^{32}为t。

[0125] 在VEGF SDM的一些实施例中,x^{35}为k。在VEGF SDM的一些实施 例中,x^{35}为y。

[0126] 在一些实施例中,VEGF SDM由以下残基界定:

[0127] $w^{9}d^{10}$--$w^{13}r^{14}$--r^{17}------l^{24}--$k^{27}r^{28}$---s^{32}--y^{35}(SEQ ID NO:161)

[0128] 或

[0129] $w^{9}d^{10}$--$w^{13}r^{14}$--r^{17}------v^{24}--$k^{27}r^{28}$---r^{32}--y^{35}(SEQ ID NO:162)。

[0130] 在GA结构域的一些实施例中,SDM残基包含于肽框架序列中,所述 肽框架序列包含由以下氨基酸残基界定的肽框架残基:--n^{11}a--e^{15}i-h^{18}lpnln-e^{25}q--a^{29}fi-s^{33}l-。

[0131] 在一些实施例中,GA结构域包含与以下氨基酸序列具有80%或更高 (例如,85%或更高、90%或更高、或95%或更高)同一性的含SDM序列:

[0132] $w^{9}d^{10}$naw$^{13}x^{14}$eir^{17}hlpnlnx^{24}eqk$^{27}x^{28}$afix^{32}sly^{35}(SEQ ID NO:133)

[0133] 其中:

[0134] x^{14}选自l、r和t;

[0135] x^{24}选自h、i、l、r和v;

[0136] x^{28}选自G、r和v;

[0137] x^{32}选自a、r、h、s和t;且

[0138] x^{35}选自k或y。

[0139] 在含SDM序列的一些实施例中,x^{14}为l。在含SDM序列的一些实施 例中,x^{14}为r。在含SDM序列的一些实施例中,x^{14}为t。

[0140] 在含SDM序列的一些实施例中,x^{24}为h。在含SDM序列的一些实施 例中,x^{24}为i。在含SDM序列的一些实施例中,x^{24}为l。在含SDM序列 的一些实施例中,x^{24}为r。在含SDM序列的一些实施例中,x^{24}为v。

[0141] 在含SDM序列的一些实施例中,x^{28}为G。在含SDM序列的一些实施 例中,x^{28}为r。在含SDM序列的一些实施例中,x^{28}为v。

[0142] 在含SDM序列的一些实施例中,x^{32}为a。在含SDM序列的一些实施 例中,x^{32}为r。在含SDM序列的一些实施例中,x^{32}为h。在含SDM序列 的一些实施例中,x^{32}为s。在含SDM序列的一些实施例中,x^{32}为t。

[0143] 在含SDM序列的一些实施例中，x^{35}为k。在含SDM序列的一些实施 例中，x^{35}为y。

[0144] 在化合物的一些实施例中，Z结构域的螺旋$3^{(\#41-54)}$包含肽框架序列s^{41}anllaeakklnda^{54}(SEQ ID NO:134)。

[0145] 在一些实施例中，D-肽Z结构域包含C末端肽框架序列：d^{36}dpsqsanllaeakklndaqapk^{58}(SEQ ID NO:135)。

[0146] 在一些实施例中，D-肽Z结构域包含N末端肽框架序列：v^{1}dnkfnke^{8} (SEQ ID NO:136)。

[0147] VEGF结合GA结构域

[0148] 术语“GA结构域”和“GA结构域基序”是指具有与蛋白G的白蛋白 结合结构域相关的三螺旋束三级结构的肽结构域。在蛋白质数据库(PDB) 中，结构1tf0提供了示例性GA结构域结构。图3、7A-7B、10A和图10B 包括天然GA结构域结构和未经修饰天然GA结构域的一个示例性序列的 描绘。术语“GA结构域支架”是指基础肽框架序列，其提供特征3-螺旋束结构且可适用于在本发明化合物中使用。在一些情况下，GA结构域支架或 肽框架序列具有如表3中所界定的共有序列。表3提供了可适用于在本发 明化合物中使用的示例性GA结构域支架序列的列表。术语“变异GA结 构域”、“VEGF结合GA结构域”和“结合VEGF的GA结构域”可互换使 用，且是指在三螺旋束三级结构的所选位置处包括变异氨基酸的GA结构 域，所述变异氨基酸一起提供与VEGF目标蛋白的特异性结合。

[0149] GA结构域可由以下结构式描述：

[0150] [螺旋1]-[连接子1]-[螺旋2]-[连接子2]-[螺旋3]

[0151] 其中[螺旋1]、[螺旋2]和[螺旋3]为经由肽连接子[连接子1]和[连接子 2]连接的特征三螺旋束的螺旋区。在三螺旋束中，[螺旋1]、[螺旋2]和[螺 旋3]为连接的肽区，其中[螺旋2]配置成与平行的α螺旋[螺旋1]和[螺旋3] 的二螺旋复合物大体上反向平行。[连接子1]和[连接子3]可各自独立地包 括1至10个氨基酸残基的序列。在一些情况下，[连接子1]的长度比[连接 子3]更长。GA结构域可为在30与90个残基之间，例如在30与80个残基 之间、在40与70个残基之间、在45与60个残基之间、在45与60个残 基之间、或在45与55个残基之间的肽序列。在某些情况下，GA结构域基 序为在35与55个残基之间，例如在40与55个残基之间或在45与55个 残基之间的肽序列。在某些实施例中，GA结构域基序为45、46、47、48、49、50、51、52或53个残基的肽序列。

[0152] 在一些实施例中，D-肽GA结构域为以下结构式的三螺旋束：

[0153] [螺旋$1^{(\#6-21)}$]-[连接子$1^{(\#22-26)}$]-[螺旋$2^{(\#27-35)}$]-[连接子$2^{(\#36-37)}$]-[螺旋$3^{(\#38-51)}$]

[0154] 其中：#表示D-肽GA结构域中所包含的氨基酸残基的参考位置，例如 根据图9C中所示的编号方案。

[0155] 所关注的GA结构域包括由Jonsson等人(针对人类血清白蛋白的飞摩 尔亲和力结合蛋白的工程改造(Engineering of a femtomolar affinity binding protein to human serum albumin)，蛋白质工程改造、设计和选择(Protein Engineering,Design&Selection)，21(8)，2008,515-527)描述的GA结构域，所述文献的公开内容以全文引用的方式并入本文中，且包括GA结构域和 噬菌体展示库，其具有支架序列(G148-GA3)，其中库突变在支架的位置 25、27、31、34、36、37、39、40、43、44和47处。其它所关注的GA结 构域包括但不限于US6,534,628和US6,740,734中所描述的那些，其公开内 容以全文引用的方式

并入本文中。

[0156] 本公开的变异GA结构域可具有特异性决定基序(SDM)，其在选自 25、27、30、31、34、36、37、39、40和42-48的位置处包括5个或更多 个变异氨基酸残基。在一些情况下，特异性决定基序(SDM)进一步包括 GA结构域的位置28处的变异氨基酸。

[0157] 锁定的GA结构域

[0158] 本公开包括在螺旋1与螺旋3的相邻残基之间具有螺旋间连接子或桥 接子的变异GA结构域化合物。术语“锁定的变异GA结构域”和“锁定 的GA结构域”是指变异GA结构域，其包括在GA结构域的任何两个螺旋 之间的结构稳定化连接子。有时，连接的相邻残基位于螺旋1和3的端部。图29A和37A显示了GA支架结构域的结构，其示出了三螺旋束中螺旋1-3 的配置。螺旋间连接子可位于结构域的位置7(螺旋1)和38(螺旋3)处 的氨基酸残基之间，所述位置在结构域的三维结构中彼此接近。位置7和 38可视为位于螺旋端部处的面向核心的残基，其能够与结构的疏水核心稳 定接触。如在连接的氨基酸残基的α-碳之间所测量，螺旋间连接子可具有 3至7个原子长的主链。举例来说，两个半胱氨酸残基之间的二硫化物连接 提供了两个半胱氨酸氨基酸残基的α-碳之间长度为4个原子的主链 ($-CH_2-S-S-CH_2-$)。

[0159] 可在GA结构域的位置7和38处并入多种相容的天然和非天然存在的 氨基酸残基，且其能够彼此缀合以提供螺旋间连接子。相容的残基包括但 不限于经由酯或硫酯连接与丝氨酸或半胱氨酸连接的天冬氨酸或谷氨酸、经由酰胺连接与鸟氨酸或赖氨酸连接的天冬氨酸或谷氨酸。因此，螺旋间 连接子可包括一个或多个选自$C_{(1-6)}$烷基、被取代的$C_{(1-6)}$烷基、$-(CHR)_n-CONH-(CHR)_m-$和$-(CHR)_n-S-S-(CHR)_m-$的基团，其中各R独立地为 H、$C_{(1-6)}$烷基或被取代的$C_{(1-6)}$烷基，且n+m＝2、3、4或5。可利用任何合 宜的非天然存在的残基在位置7和38的氨基酸残基侧链处并入相容的化学 选择性标签，例如点击化学标签，例如叠氮化物和炔烃标签，其可在多肽 合成后彼此缀合。

[0160] 结构域内连接子的并入可提供稳定性和/或对VEGF目标蛋白的结合亲 和力的提高。在一些情况下，D-肽化合物对VEGF的结合亲和力(K_D)为 缺乏结构域内连接子的对照多肽的3倍或更强(即，K_D低3倍)，例如5 倍或更强、10倍或更强、30倍或更强，或甚至更强。下文更详细地描述特 异性结合VEGF-A的示例性锁定的变异GA结构域化合物。

[0161] 变异GA结构域多肽可包括位置1至约位置6的N末端区，其可视为 与螺旋2和螺旋3非重叠，因为此区不直接参与接触折叠的三螺旋束结构 的相邻螺旋2-环-螺旋3区(参见例如图32A)。在本发明D-肽化合物中， GA结构域的位置1-5的N末端区可视情况保留在序列中且经优化，以提供 所需特性，例如提高的水溶性、稳定性或亲和力。应理解，变异D-肽化合物的N末端区可被取代、修饰或截短，而不会显著不利地影响化合物的活 性。N末端区可被修饰以提供与所关注分子(例如，如本文所描述)或另 一D-肽结构域或多价化合物(例如，如本文所描述)的缀合或连接。在一 些情况下，N末端残基具有提供螺旋1的延伸螺旋结构的螺旋倾向。或者， N末端区可并入有使螺旋1的N末端稳定的螺旋封端残基。在一些情况下， 通过去除相对于如图32A中所示的亲本GA结构域结构的1、2、3、4或5 个残基(即，位置1-5的截短)，变异GA结构域化合物在N末端处被截短。 在此类情况下，如图32B中所示，保留本发明化合物的编号方案。类似地， 可截短螺旋3的末端处的一个、两个或三个C末端残基，而不会不利地影 响三螺旋束结构的稳定性和目标结合能力。

[0162] 图29A-29B显示了聚焦于变异GA结构域化合物的位置1-3、6、7和 37-38的示例性

亲和力成熟库的设计。图30A-30B显示了筛选结果和具有 c7-c38二硫桥且对VEGF-A具有改进的结合亲和力的变异GA结构域化合 物。在化合物的N末端区的位置1-3处容许多种变异氨基酸残基。

[0163] 在一些实施例中,D-肽GA结构域包括以下区段(I)-(II)中的一个 或多个(例如,两个):

[0164] $x^1x^2x^3qwx^6x^7$(I)(SEQ ID NO:142)

[0165] $x^{37}x^{38}$ (II)

[0166] 其中:

[0167] x^1至x^3独立地选自任何D-氨基酸残基;

[0168] x^6选自i和v;

[0169] x^{37}选自s和n;且

[0170] x^7和x^{38}为经由结构域内/螺旋间连接子连接的氨基酸残基,如在氨基 酸残基x^7和x^{38}的α-碳之间所测量,所述连接子的主链长度为3至7个原 子。在式(I)的一些实施例中,x^1至x^3独立地选自f、h、i、p、r、y、n、 s和v。在式(I)的一些实施例中,x^6为v。在式(II)的一些实施例中, x^{37}为n。

[0171] 结构域内/螺旋间连接子可由x^7和x^{38}氨基酸残基的侧链之间的二硫桥 键或连接构成。任何合宜的天然或非天然存在的含硫醇氨基酸都可用于提 供结构域内连接子。可经由二硫化物连接进行连接的氨基酸残基x^7和x^{38}包括:半胱氨酸^7-半胱氨酸^{38}二硫化物;高半胱氨酸^7-半胱氨酸^{38}二硫化 物;半胱氨酸^7-高半胱氨酸^{38}二硫化物;和高半胱氨酸^7-高半胱氨酸^{38}二 硫化物。或者,结构域内/螺旋间连接子可包括在x^7和x^{38}氨基酸残基的侧 链之间的酰胺键连接。任何合宜的天然或非天然存在的含胺和羧酸的氨基 酸都可用于提供结构域内连接子。可经由酰胺连接进行连接的氨基酸残基 x^7和x^{38}包括:Asp7-Dap38、Asp7-Dab38、Asp7-Orn38、Glu7-Dap38、 Glu7-Dap38和Glu7-Orn38,其中Dap为α,β-二氨基丙酸,Dab为α,γ-二氨 基丁酸,且Orn为鸟氨酸。x^7和x^{38}残基对可为D-氨基酸残基。任何合宜 的化学选择性官能团和其缀合物都可用于实现结构域内/螺旋间连接,包括 但不限于叠氮化物-炔烃、硫醇-马来酰亚胺、硫醇-卤乙酰基、硫醇-乙烯基 砜、酯、硫酯、酰胺、醚和硫醚。

[0172] 图13显示了GA结构域库的描述,其包括基础53残基支架序列(SEQ ID NO:2)和以粗体显示的在支架的位置25、27、28、31、34、36、37、 39、40、43、44和47处的突变位置,其界定了用于筛选的噬菌体展示库中 的一个。鉴别了衍生自支架结构域库筛选的选定命中化合物。本发明化合 物包括基础支架结构域,其呈现与目标蛋白接触且提供与VEGF-A的特异性结合的VEGF-A结合面。对来自选定GA结构域库命中的选定化合物进 行额外亲和力成熟和点突变研究(例如,如本文所描述),以评定GA结构 域基序的数个额外位置,例如位置26、29和30处的变异氨基酸。本文描 述了与VEGF-A复合的具有GA结构域支架的示例性D-肽化合物的X射线 晶体结构,其提供了本发明VEGF-A结合化合物的结构模型。

[0173] D-肽变异GA结构域化合物可在由VEGF-A的氨基酸侧链F43、M44、 Y47、Y51、N88、D89、L92、I72、K74、M107、I109、Q115和I117界定 的结合位点处特异性结合到VEGF-A(参见图28A-28B)。

[0174] 在一些情况下,VEGF-A结合基序包括彼此接触且在一起界定VEGF-A 结合面的至少两个反向平行螺旋区[螺旋A]和[螺旋B]。包括[螺旋A]和[螺 旋B]的反向平行复合物的

VEGF-A结合基序的那个部分可被称为“二螺旋 复合物”结构。图8A-8B描绘了二螺旋复合物结构的七肽重复结构模型。在一些情况下,所关注的VEGF-A接触残基可位于二螺旋复合物的表面突 变或边界突变位置,例如七肽重复的c或g位置。图8C显示了在二螺旋复 合物结构的g-g面上的VEGF-A接触残基的一种示例性布置。VEGF-A结 合面可包括4个或更多个残基,例如5个或更多个、6个或更多个、7个或 更多个、8个或更多个、9个或更多个、或10个或更多个VEGF-A接触残 基,其中所述残基包括[螺旋A]和[螺旋B]两者的残基。在某些情况下, VEGF-A接触残基独立地选自非极性、芳香族、杂环和碳环残基(例如, 如本文所描述)。可经由任何合宜的连接来连接二螺旋复合物的两个螺旋, 所述连接保留[螺旋A]和[螺旋B]的大体上反向平行配置。在一些情况下,[螺 旋A]和[螺旋B]经由C(螺旋A)到N(螺旋B)肽连接子连接。在一些情 况下,[螺旋A]和[螺旋B]经由C(螺旋A)到N(螺旋B)肽连接子连接。图8A描绘了二螺旋复合物结构的可能的末端连接(蓝色实线)。

[0175] 可通过任何合宜的方法进一步稳定二螺旋复合物,包括但不限于在溶 剂暴露位置处并入提供所需螺旋-螺旋堆积相互作用或亲水性的残基、并入 螺旋间连接、并入螺旋内连接、并入连接螺旋的受约束转角或连接子,和 连接到能够使与[螺旋A]和[螺旋B]两者的接触稳定的第三肽区。图8B-8C 描绘了可安置在任何两个合宜残基之间的各种螺旋间侧链到侧链连接(例 如,虚线)。类似地,可安置稳定的螺旋内侧链到侧链或侧链到末端连接,以为化合物的结构提供所需稳定性。用于本发明化合物的所关注螺旋间和 螺旋内连接包括但不限于Cys-Cys二硫化物连接、钉合肽(stapled peptide) 连接和非天然交联,例如通过闭环复分解制备的那些连接和由Douse等人 (ACS化学生物学(ACS Chem Biol.)2014年10月17日;9(10):2204-9)描 述的连接。

[0176] 在一些实施例中,可通过第三螺旋(螺旋C)来稳定二螺旋复合物, 所述第三螺旋在化合物的VEGF-A结合面的相反侧接触[螺旋A]和[螺旋B] 两者,且其一起界定三螺旋束。如本文所使用,术语“三螺旋束”和“三 螺旋束基序”可互换使用以指代三螺旋束,其为包括三个大体上平行或反 向平行α螺旋的小蛋白质三级结构。三个螺旋是基于三螺旋束结构中以平 行-反向平行-平行配置布置的经连接螺旋区的线性序列。

[0177] DeGrado等人(三链卷曲螺旋和三螺旋束的分析和设计(Analysis and design of three-stranded coiled coils and three-helix bundles),折叠与设计 (Folding& Design)1998,3:R29-R40)提供了三链卷曲螺旋和三螺旋束的 组装模型,其公开内容以全文引用的方式并入本文中。三螺旋束可为单链 结构,其具有连接螺旋的环,所述螺旋在非极性核心中彼此规则接触。结 构的三个螺旋可显示大约七残基重复基序,用斜体字母a-g标示,即 $(abcdefg)_n$。七肽标示a、c、d、e、f和g不对应于特定氨基酸的单字母代 码,而是对应于七肽序列中的位置。非极性残基可出现在七肽的位置a和d 处,包括堆积到结构中心的侧链基团,以提供疏水性稳定。非极性a和d 残基可堆积成层。在一些情况下,带电侧链可出现在界面e和g位置处, 其中其侧链的非极性部分可屏蔽疏水核,且极性部分可参与静电或氢键合 相互作用。在一些情况下,溶剂暴露位置b和c可由极性残基占据。在一 些情况下,位置f高度溶剂暴露,且可由极性或带电残基占据。图6D显示 了三螺旋束的D-肽七肽重复模型,显示两个平行螺旋和一个反向平行螺旋。 在一些情况下,由螺旋2和3的组合表面形成的g-g面处的残基被修饰为 包括VEGF-A接触残基,所述VEGF-A接触残基被配置成与VEGF-A的表 面相互作用且提供特异性结合。应理解,图6D中所描绘的结构模型的二螺 旋

复合物形式是可能的，如图8B中所示。任何合宜的稳定元件均可用于本 发明化合物(例如，如本文所描述)中，以维持两个螺旋的所需布置和提 供与VEGF-A特异性结合的VEGF-A结合残基的呈现。本发明化合物可具 有VEGF-A结合GA结构域基序，其具有其中并入变异氨基酸残基以提供 能够特异性结合到VEGF-A的结合表面的三螺旋束三级结构。图1-2描绘 了示例性肽化合物与VEGF-A之间的结合界面。图3A和图3B显示了L- 蛋白GA结构域和示例性D-肽化合物的三螺旋束X射线晶体结构的并排比 较。图3A和图3B的比较表明所述肽化合物可保留亲本GA结构域的基本 三螺旋束结构基序。在某些情况下，化合物的α-螺旋结构与天然GA支架 结构域基本上相同。修饰变异氨基酸可包括螺旋2区的末端处的螺旋终止 残基，其不存在于GA支架结构域中。螺旋2区的变异氨基酸还可包括三 个或更多个VEGF-A接触残基，例如芳香族氨基酸残基。图4描绘了示例 性VEGF-A结合化合物的螺旋2区的位置26和36处的螺旋终止脯氨酸残 基(p26;204和p36;208)，和位置31处的VEGF-A接触苯丙氨酸(f31;206)，以及位置27和34处的组氨酸残基(h27;205和h34;207)。

[0178] 在本文所描述的化合物的某些实施例中，为方便和简单起见利用编号 方案来指代化合物的结构和/或序列中的特定位置，例如所关注的特定变异 氨基酸残基并入到GA支架结构域中的位置。此编号方案是基于用于图13 中所描绘的53残基GA支架结构域的编号方案。应理解，任何合宜的比对 方法都可以用于将本发明化合物的特定实施例与图15的参考编号方案进行 比较，以便给所关注的氨基酸残基分配编号位置，例如，如本文所描述的基序或结构模型中的位置。图14显示了多种所关注GA支架结构域序列的 示例性比对，其中的任一个可充当本发明化合物的基础亲本序列。图14还 将序列参考图13的编号方案。还应理解，图13中1-53的编号方案并不意 味着在确定氨基酸残基的总数目或线性化合物序列的长度方面，或在界定 特定化合物的每个残基方面是限制性的。

[0179] 在一些情况下，本发明化合物包括相对于编号的亲本序列的一个或多 个变异，例如N末端截短(例如，从位置1)、C末端截短(例如，从位置 53)、缺失(例如，在亲本序列的任何合宜位置处的单一残基位置缺失)、插入(例如，在亲本序列的两个特定编号位置之间插入1、2、3或更多个 连续残基)。在某些情况下，并入到本发明化合物中的此类变异基本上保留 了三螺旋束的三维结构，所述结构提供了与目标的特异性结合。本发明化 合物可进一步在亲本结构或序列的一个或多个位置处，例如2个或更多个、3个或更多个、4个或更多个、5个或更多个、6个或更多个、7个或更多个、8个或更多个、9个或更多个、10个或更多个、11个或更多个、12个或更 多个、13个或更多个、14个或更多个、或15个或更多个位置处包括变异 氨基酸，例如，如以下实施例中所描述。

[0180] 如本文所描述，本发明化合物可具有三螺旋束结构，其中位于[螺旋2] 和[螺旋3]的特定位置处的特定溶剂暴露变异氨基酸可与VEGF-A形成接 触。在一些情况下，在[连接子2]和/或[连接子1]的特定残基处可发生额外 接触。图1描绘了如获自复合物的X射线晶体结构的示例性肽化合物与 VEGF-A之间的结合界面。在某些情况下，位于[螺旋2]、[螺旋3]、[连接 子2]和/或[连接子1]的额外位置处的变异氨基酸提供了经修饰的三螺旋束 结构的所需稳定化。举例来说，在图4中，显示了示例性[螺旋2]终止残基 (例如，脯氨酸残基204和208)，其在一些情况下可向[螺旋2]赋予所需的 提高的稳定性。在某些情况下，经修饰的三螺旋束的疏水核心由与亲本GA 支架结构域的氨基酸残基基本上相同的氨基酸残基界定。举例来说，图11 显示了示例性D-肽化合物的[螺旋2]-[连接子2]-[螺旋3]结构的一

部分的放 大视图，其包括[螺旋2]的相邻疏水残基i32(异亮氨酸，位置32)和a35 (丙氨酸，位置35)，和[螺旋3]的相邻疏水残基v41(缬氨酸，位置41)和 144(亮氨酸，位置44)，所述残基提供所需分子内疏水接触。图12中显示 了天然L-肽GA结构域的类似区的放大视图，其中类似残基I32(异亮氨酸， 位置32)、A35(丙氨酸，位置35)、V41(缬氨酸，位置41)和L44(亮氨酸，位置44)提供类似的所需分子内疏水接触，其为GA支架结构域三 螺旋束结构的特征。

[0181] 图6C描绘了反向平行三链螺旋结构的德拉多模型。基于重复七肽单元 的反向平行三链螺旋的德拉多模型在本文中经调适以提供使本发明化合物 序列基序与本发明化合物的经修饰三螺旋束结构相关的结构模型，所述三 螺旋束结构包括VEGF-A结合表面。三螺旋束的此结构模型与天然GA结 构域(例如，图3A)和示例性VEGF-A结合化合物(图3B)的X射线晶 体结构一致。图9A和9C显示了应用于示例性化合物1.1.1(c21a)的模型， 其中化合物序列(图9C)的氨基酸残基与七肽重复模型的各个位置相关且 在结构上对准，与X射线结构(图9B)一致。图9A中的模型同与VEGF-A 复合的化合物的X射线结构(参见例如图5和图20的视图)的比较显示了 示例性化合物的VEGF-A结合表面位于由螺旋2和螺旋3界定的g-g面处(图9A)。选定氨基酸残基可位于本发明化合物的VEGF-A结合表面处且被 配置成与VEGF-A相互作用(例如，位于由螺旋2和螺旋3界定的g-g面 的溶剂暴露c和/或g位置)。

[0182] 本发明化合物的疏水核心可包括与对应的[螺旋3]的d和a残基接触的 [螺旋2]的a和d残基。图6B和图10A显示了示例性化合物1.1.1(c21a)与 七肽重复模型的比对，其中描绘了三螺旋束的螺旋之间的核心残基的疏水 接触。这与图11中所示的[螺旋2]-[连接子2]-[螺旋3]区的部分结构一致， 包括[螺旋2]的相邻疏水残基i32(异亮氨酸，位置32)和a35(丙氨酸， 位置35)，和[螺旋3]的相邻疏水残基v41(缬氨酸，位置41)和144(亮氨 酸，位置44)，所述残基提供所需分子内疏水接触。应理解，模型(例如， 如图9A中所示)允许并非完全平行(即，>0度的螺旋间角，例如如本文 所描述和如图27中所描绘)的螺旋2和3的对准。

[0183] 如图5和27中所描绘，在一些情况下，尽管螺旋2和3相对于螺旋的 方向可具有大体上反向平行的配置，且这些螺旋确实在螺旋的长度上彼此 接触数次，但螺旋的轴可以>0度的角对准，例如约10度或更大、约15度 或更大、约20度或更大、约25度或更大、或约30度或更大。因此，在本 发明化合物的一些情况下，连接子2比连接子1短，使得螺旋2与3之间的角是根据螺旋的连接子2连接来测量。在一些情况下，离螺旋的连接子2 端最远的“a”和“d”残基更可能部分溶剂暴露和/或可用于与VEGF-A接 触。

[0184] 在某些情况下，本发明化合物包括螺旋终止残基，其提供螺旋2与3 之间的角的增加，例如增加约5度或更大，例如约10度或更大，或约15 度或更大。参见例如图27B与图27A。

[0185] 在一些实施例中，[螺旋2]包含七肽重复序列[$c^1d^1e^1f^1g^1a^2b^2c^2d^2$]，且[螺 旋3]包含七肽重复序列[$e^1f^1g^1a^2b^2c^2d^2e^2f^2g^2a^3b^3c^3d^3e^3$]，其中个别七肽重复残 基可以被编号。在[螺旋2]和[螺旋3]的此布置的某些情况下，[螺旋2]的残 基d^2、a^2和d^1与[螺旋3]的残基a^2、d^2和a^3相互作用，形成结构稳定相互 作用的网。在某些情况下，[螺旋2]的残基c^2、g^1和c^1和[螺旋3]的残基g^1各自独立地为芳香族、杂环或碳环残基，其被配置成接触VEGF-A。

[0186] 本发明化合物的VEGF-A结合表面可由位于七肽重复模型的c和g位 置处的芳香族氨基酸残基的配置界定，所述残基在表面上配置成与VEGF-A 相互作用。在一些情况下，VEGF-A结合表面包括位于七肽重复序列的c 和g位置处的2个或更多个、3个或更多个芳香

族氨基酸残基，例如4个或 更多个、或5个或更多个芳香族氨基酸残基。图8C和图10B描绘了包含 能够结合VEGF-A的[螺旋2]和[螺旋3]的c和g残基的配置的变异结构域 基序的实施例。在某些情况下，VEGF-A结合表面包括额外的非芳香族氨 基酸残基，其为在七肽重复序列的c和g位置处，例如在如图10B中所示 的螺旋3的残基c和/或g处的非极性氨基酸残基。在某些情况下，VEGF-A 结合表面包括额外的非芳香族氨基酸残基，其为能够在七肽重复序列的c 和g位置处，例如在螺旋3的c和/或g残基处进行氢键合相互作用的极性 氨基酸残基。基于本公开，应理解，可修饰GA结构域基序中不位于结构 的VEGF-A结合表面处的数个氨基酸残基，而不会对所得经修饰化合物的 VEGF-A结合活性产生不利影响。

[0187] 在式(I)的一些实施例中，[螺旋2]包含以下式的序列：

[0188] Λjxx Λjx Λj(SEQ ID NO:143)

[0189] (II)

[0190] 其中：各“Λ”独立地为D-芳香族氨基酸；各j独立地为疏水残基； 且各x独立地为氨基酸残基。用于式(II)的所关注芳香族氨基酸包括但不 限于h、f、y和w，和其被取代形式。在式(II)的一些情况下，第一个Λ 为h、f或y。第二个Λ残基可为芳香族残基，其包含芳基、杂芳基、被取 代的芳基或被取代的杂芳基环(例如，具有式-CH_2-Ar的侧链的残基，其中Ar为芳基或被取代的芳基)。在式(II)的一些情况下，第二个Λ为f或y， 或其被取代形式。第二个Λ残基可在GA结构域基序结构的结合表面上配 置成与VEGF-A蛋白相互作用，例如突出到图20和21中所描绘的VEGF-A 表面上的深袋中。在式(II)的一些情况下，第二个Λ为f或其被取代形式。 在式(II)的一些情况下，第三个Λ为芳香族残基，其包含杂芳基或被取代的杂芳基环(例如，包含能够与VEGF-A氢键合的侧链基团的芳香族残 基)。在式(II)的一些情况下，各j独立地选自v、i、a和l。在式(II) 的一些情况下，第一个j残基为缬氨酸。在式(II)的一些实施例中，[螺 旋2]包含以下式的序列：hv xxΛjxΛj。

[0191] 在式(I)和(II)的一些实施例中，[螺旋2]包含式(III)的序列：

[0192] h*jxxf*jxh*j(SEQ ID NO:151)

[0193] (III)

[0194] 其中：

[0195] 各h*独立地为组氨酸或其类似物；

[0196] f*为苯丙氨酸或其类似物；

[0197] 各j独立地为疏水残基；且

[0198] 各x独立地为氨基酸残基。

[0199] 在式(III)的一些实施例中，[螺旋2]包含以下式的序列：hvxxf*jxh*j。式(III)的残基f*可在GA结构域基序结构的结合表面上配置成与VEGF-A 蛋白相互作用，例如突出到图21中所描绘的VEGF-A表面上的深袋中。图 20显示了复合物的X射线结构的宽视图，其中标记了示例性化合物 1.1.1(c21a)的螺旋2中的残基f31(苯丙氨酸，位置31)，且显示其突出到 VEGF-A表面上的袋中。图21显示了f31的放大视图，其被配置成突出到 VEGF-A结合界面处的袋中。苯丙氨酸苯环的原子与相邻的VEGF-A残基 之间的选定距离以埃为单位显示。对晶体结构的分析表明，可在三螺旋束 结构上所述位置处利用多种芳香族残基，以与f31突出到相同深袋中，且 在一些情况下增加与VEGF-A袋的所需疏水接触。在某些情况下，苯丙氨 酸类似物包括苯环上的(多个)取代基。在式(III)的一些情况下，f*为 苯丙氨酸。

在式(III)的一些情况下,f*为苯丙氨酸的被取代衍生物。所 关注的苯丙氨酸衍生物包括但不限于被4-卤素取代的苯丙氨酸(例如,4- 氯或4-氟)、被3-卤素取代的苯丙氨酸(例如,氯、溴或氟)、被3,5-卤素 二取代的苯丙氨酸(例如,氯或氟)、被3,4-卤素二取代的苯丙氨酸(例如, 氯或氟)、被4-甲基取代的苯丙氨酸、4-三氟甲基-苯基丙氨酸和被4-乙基 取代的苯丙氨酸。制备在位置31处包括苯丙氨酸类似物的多种化合物,且 显示其具有活性。

[0200] 图22和图25显示了与VEGF-A表面接触的示例性化合物1.1.1(c21a) 的残基h27(205)的放大视图。对晶体结构的分析表明,可在三螺旋束结 构上的位置27处利用多种芳香族残基或组氨酸类似物,以与h27接触同一 表面袋,且在一些情况下增加与VEGF-A表面的所需接触。在式(III)的 一些情况下,第一个h*为组氨酸,例如位置27处的残基。在式(III)的一 些情况下,第一和/或第二个h*为组氨酸类似物(例如,具有包括烷基-环 烷基,例如-烷基-环戊基或烷基-环己基,或其被取代形式的侧链的残基)。 在式(III)的一些情况下,第一个h*为能够主要与VEGF疏水接触的芳香 族残基。在式(III)的一些情况下,第一个h*为f或y。

[0201] 图22显示了与VEGF-A表面接触的示例性化合物1.1.1(c21a)的残基 h34(207)的放大视图。对复合物结构的分析表明,在位置34处可容许各 种组氨酸类似物,例如包括可占据VEGF-A表面上的可用空间和/或与相邻 的VEGF-A的残基形成更强氢键(例如,长度<4.6埃)的被取代或未被取 代的芳基或杂环的类似物。在式(III)的一些情况下,第二个h*为组氨酸, 例如位置34处的残基。在式(III)的一些情况下,第二个h*为能够与VEGF 氢键合的芳香族残基。在式(III)的一些实施例中,第二个h*为芳香族残 基,其包含杂芳基或被取代的杂芳基环(例如,包含能够与VEGF-A氢键 合的侧链基团的芳香族残基)。

[0202] 在式(II)和(III)的某些实施例中,h^{*27}、f^{*31}和h^{*34}各自为变异残基。 在式(II)和(III)的某些实施例中,j^{28}和x^{29}各自为变异残基。在式(II) 和(III)的某些实施例中,j^{28}、x^{29}和x^{30}各自为变异残基。在式(II)和(III) 的一些情况下,各j独立地选自a、i、l和v。在式(II)和(III)的一些情 况下,第一个j残基为缬氨酸。在一些情况下,式(II)和(III)的七肽重 复配准为b′a′gfedcba。

[0203] 在式(III)的一些实施例中,[螺旋2]由来自三螺旋束的位置26至36 的以下螺旋基序描述:

[0204] $z^{26}h*jxxf*jxh*jz^{36}$(SEQ ID NO:144)

[0205] (IV)

[0206] 其中:各h*、f*、各j和各x如上文所定义;且z^{26}和^{36}各自独立地为 螺旋终止残基。应理解,在一些情况下,螺旋终止残基不被视为结构的螺 旋残基,而仅界定[螺旋2]区的终止和转角或环结构的开始。f*残基和各h* 残基可在GA结构域基序结构的结合表面上配置成与例如如本文所描述的 目标VEGF-A蛋白特异性接触。在式(IV)的一些实施例中,[螺旋2]包含 以下式的序列:$z^{26}hvxxf*jxh*jp^{36}$(SEQ ID NO:145)。

[0207] 术语“螺旋终止残基”是指相对于类似的丙氨酸残基具有用于形成螺 旋结构的高自由能损失的氨基酸残基。在一些情况下,高自由能螺旋损失 被称为螺旋倾向值,且如Pace和Scholtz的方法所定义为0.5kcal/mol或更 大,其中较高值指示增加的损失(“基于肽和蛋白质实验研究的螺旋倾向量 表(A Helix Propensity Scale Based on Experimental Studies of Peptides and Proteins)”,生物物理杂志(Biophysical

Journal)第75卷1998年7月 422-427)。在一些情况下,螺旋终止残基为具有0.5或更高(kcal/mol)的 螺旋倾向值,例如0.55或更高、0.60或更高、0.65或更高、或0.70或更高 的天然存在的残基。举例来说,脯氨酸的螺旋倾向值为3.16kcal/mol,且甘 氨酸的螺旋倾向值为1.00kcal/mol,如表1中所示。可通过使用具有作为结 构类似物的侧链基团的最接近天然存在的残基的值来估计非天然存在的螺 旋终止残基的螺旋倾向值。在式(IV)的一些情况下,螺旋终止残基z^{26}和z^{36}独立地选自d、n、G和p。在式(IV)的一些情况下,螺旋终止残基 独立地选自d、G和p。在式(IV)的一些情况下,螺旋终止残基独立地选 自G和p。在式(IV)的一些情况下,螺旋终止残基z^{26}和z^{36}各自为p。在 式(IV)的一些情况下,z^{36}为p。

[0208] 表1:天然存在的氨基酸α-螺旋倾向

[0209]

3字母	1字母	螺旋倾向值(kcal/mol)*
Ala	A	0
Arg	R	0.21
Asn	N	0.65
Asp	D	0.69
Cys	C	0.68
Glu	E	0.40
Gln	Q	0.39
Gly	G	1.00
His	H	0.61
Ile	I	0.41
Leu	L	0.21
Lys	K	0.26
Met	M	0.24
Phe	F	0.54
Pro	P	3.16
Ser	S	0.50
Thr	T	0.66
Trp	W	0.49
Tyr	Y	0.53
Val	V	0.61

[0210] *自由能的估计差异,相对于任意设定为零的丙氨酸,以α-螺旋配置中每残基kcal/mol为 单位估计。较高数值(更多的正自由能)较不利。在一些情况下,视相邻残基的身分而定, 可能与这些平均数值有偏差。

[0211] 在式(IV)的某些实施例中,z^{26}为框架残基,例如与支架结构域基序 的残基对应的残基。在式(IV)的某些情况下,z^{26}为变异残基,例如与支 架结构域基序的对应残基不同的残基,所述支架结构域基序例如SEQ ID NO:1-21中的一者或多者。在式(IV)的某些情况下,z^{36}为变异残基。在 式(IV)的某些实施例中,h^{*27}、f^{*31}和h^{*34}各自为变异残基。在式(IV) 的一些实施例中,j^{28}和x^{29}各自为变异残基。在式(IV)的一些情况下,j^{28}、x^{29}和x^{30}各自为变异残基。在式(IV)的某些实施例中,h^{*27}选自h、y和 f。在式(IV)的某些实施例中,h^{*34}选自h、y

和f。

[0212] 在化合物的一些实施例中,[螺旋2]由以下式的序列界定:

[0213] $p^{26}hjjxfjxhjp^{37}$(SEQ ID NO:93)

[0214] (V)

[0215] 其中:各j独立地为疏水残基;且各x为氨基酸残基。在某些情况下,各j为独立地选自a、i、f、l和v的残基。在某些情况下,各j为独立地选 自a、i、l和v的残基。在某些情况下,各j为独立地选自a、i和v的残基。 在式(V)的某些情况下,j^{28}为v。在式(V)的某些情况下,j^{29}为a、l 或v。在式(V)的一些实施例中,j^{29}为i。在式(V)的一些情况下,j^{32}为i。在式(V)的某些情况下,j^{36}为a。在式(V)的某些情况下,x^{30}为 极性残基。在式(V)的一些情况下,x^{33}为极性残基。在式(V)的某些实 施例中,x^{30}和x^{33}独立地选自d、e、k、n、r、s、t和q。在式(V)的某 些情况下,x^{30}和x^{33}独立地选自s和n。在式(V)的某些情况下,x^{30}为s。 在式(V)的某些情况下,x^{33}为n。在式(V)的一些实施例中,[螺旋2] 包含以下式的序列:$p^{26}hvjxfjxhjp^{37}$(SEQ ID NO:137)。

[0216] 在化合物的一些实施例中,[螺旋2]由式(VI)的序列界定:

[0217] $z^{26}hvj^{29}x^{30}fix^{33}haz^{37}$(SEQ ID NO:94)

[0218] (VI)

[0219] 其中:

[0220] z^{26}选自d、p和G;

[0221] j^{29}选自f和i;

[0222] x^{30}选自n和s;

[0223] x^{33}选自n和s;且

[0224] z^{37}选自p和G。

[0225] 在式(VI)的一些情况下,z^{26}为p。在式(VI)的一些情况下,j^{29}为 i。在式(VI)的某些情况下,x^{30}为s。在式(VI)的一些实施例中,x^{33}为n。在式(VI)的一些情况下,z^{37}为p。

[0226] 在化合物的一些情况下,[螺旋2]由选自以下的序列界定:

[0227] a)$phvj^{29}x^{30}fix^{33}hap$(VII)(SEQ ID NO:95)其中:$j^{29}$选自f和i;且 x^{30}和x^{33}独立地为极性氨基酸残基;和

[0228] b)与a)中所界定的式(VII)的序列具有80%或更高同一性,例如与 a)中所界定的序列具有90%或更高同一性的氨基酸序列。

[0229] 在a)中所界定的式(VII)的序列的一些情况下,x^{30}和x^{33}独立地选 自n、s、d、e和k。在a)中所界定的式(VII)的序列的一些情况下,j^{29}为i。在a)中所界定的式(VII)的序列的一些情况下,x^{30}为s或n。在a) 中所界定的式(VII)的序列的一些情况下,x^{33}为n。在a)中所界定的式 (VII)的序列的一些情况下,j^{29}为i;x^{30}为s或n;且x^{33}为n。

[0230] 在化合物的一些实施例中,[螺旋2]与SEQ ID NO:74的序列具有66% 同一性或更高同一性,例如与SEQ ID NO:74的序列具有77%同一性或更 高同一性、或88%同一性或更高同一性。

[0231] 在式(I)的一些实施例中,[螺旋3]包含以下式的序列:

[0232] Λjxujxxuj(SEQ ID NO:146)

[0233] (VIII)

[0234] 其中:各“Λ”独立地为D-芳香族氨基酸;各j独立地为疏水残基; 各u独立地为非极性氨基酸残基;且各x独立地为氨基酸残基。在一些情 况下,式(VIII)的七肽重复配准为edcbag′f′e′d′。在式(VIII)的一些情况 下,Λ为芳香族残基,其包含杂芳基或被取代的杂芳基环(例如,包含能 够与VEGF-A氢键合的侧链基团的芳香族残基)。在某些情况下,Λ为组氨 酸或其被取代形式。图23显示了示例性化合物的h40(210)的氮原子与相 邻的VEGF-A的Tyr48之间的中等强度氢键(2.9埃)。对复合物结构的分 析表明,在位置40处可容许各种组氨酸类似物,包括可占据可用空间且保 留或加强与VEGF-A的氢键的类似物。在式(VIII)的一些情况下,各u 独立地为具有选自H、低碳数烷基和被取代的低碳数烷基的侧链的非极性 残基。在式(VIII)的一些情况下,各u独立地选自G和a。在式(VIII) 的一些情况下,第一个u为G。在式(VIII)的一些情况下,第二个u为a。 在某些情况下,各j为独立地选自a、i、f、l和v的残基。在某些情况下, 各j为独立地选自a、i、l和v的残基。在式(VIII)的某些实施例中,j^{28}为v。在式(VIII)的某些实施例中,j^{29}为a、l或v。

[0235] 在式(I)或(VIII)的一些实施例中,[螺旋3]包含式(IX)的序列:

[0236] x^{38}xh*jxujxxujx^{49}(SEQ ID NO:96)

[0237] (IX)

[0238] 其中j、x、u如上文所定义,且h*为组氨酸或其类似物。在一些情况 下,式(IX)的七肽重复配准为gfedcbag′f′e′d′c′。在式(IX)的一些情况 下,h*为组氨酸。在式(IX)的一些情况下,h*为组氨酸类似物(例如, 具有包括烷基-环烷基,例如-烷基-环戊基或烷基-环己基,或其被取代形式 的侧链的残基)。在式(IX)的一些情况下,h*为被取代的组氨酸。在式(XI) 的一些情况下,u^{43}为G。在式(IX)的一些情况下,u^{47}为a。在式(IX) 的一些情况下,x^{38}为v。在式(IX)的一些情况下,x^{39}为s。在式(IX) 的某些情况下,各j为独立地选自a、i、f、l和v的残基。在式(IX)的某 些实施例中,j^{41}为v。在式(IX)的一些情况下,j^{44}为l。在式(IX)的一 些情况下,j^{48}为i。在式(IX)的一些情况下,x^{51}为疏水残基。在式(IX) 的一些情况下,x^{51}为a。在式(IX)的一些情况下,x^{42}为n。在式(IX) 的一些情况下,x^{45}为k或r。在式(IX)的一些情况下,x^{45}为k。在式(IX) 的一些情况下,x^{46}为n。在式(IX)的一些情况下,x^{49}为l。在式(IX)的一些情况下,螺旋3用C末端残基序列封端。在某些情况下,式(IX) 的螺旋3包括额外残基$x^{50}x^{51}$,其中x为氨基酸残基。在一些情况下,x^{50}为k或r。在式(IX)的一些情况下,x^{50}为k且x^{51}为a。在式(IX)的一 些情况下,x^{50}为e且x^{51}为d。在式(IX)的一些情况下,x^{50}为G且x^{51}为r。在某些情况下,式(IX)的螺旋3包括选自SEQ ID NO:85-87中的 一者的C末端区。在一些情况下,[螺旋3]包括七肽重复配准 gfedcbag′f′e′d′c′b′a′。应理解,可在[螺旋3]的C末端处利用多种截短(例如 1、2或3个残基的截短)和延伸(例如1、2、3个或更多个残基的延伸),而不会显著破坏例如如图9B中所描绘的三螺旋束结构或变异结构域。

[0239] 在式(IX)的一些情况下,[螺旋3]由选自以下的序列界定:

[0240] a)$x^{38}x^{39}$hvx^{42}Glx$^{45}x^{46}$aix^{49}(X)(SEQ ID NO:97)其中:x^{38}选自v、e、 k、r;x^{39}、x^{42}和x^{46}独立地选自极性氨基酸残基;且x^{45}和x^{49}独立地选自l、 k、r和e;和

[0241] b)与a)中所界定的式(X)的序列具有75%或更高同一性,例如与a) 中所界定的序列具有83%同一性或更高同一性、或91%同一性或更高同一 性的氨基酸序列。

[0242] 在式(IX)的一些情况下,[螺旋3]由选自以下的序列界定:

[0243] a)$x^{38}x^{39}$hvx^{42}Glx$^{45}x^{46}$aix$^{49}x^{50}$a(XI)(SEQ ID NO:98)其中:x^{38}选自v、 e、k、r;x^{39}、

x^{42}、x^{46}和x^{50}独立地选自极性氨基酸残基;且x^{45}和x^{49}独立 地选自l、k、r和e;和

[0244] b)与a)中所界定的式(XI)的序列具有78%或更高同一性,例如与 a)中所界定的序列具有85%同一性或更高同一性、或92%同一性或更高同 一性的氨基酸序列。

[0245] 在式(X)-(XI)的一些情况下,x^{39}、x^{42}、x^{46}和x^{50}独立地选自n、s、 d、e和k。在式(X)-(XI)的一些情况下,x^{38}为v。在式(X)-(XI) 的一些情况下,x^{45}为k。在式(X)-(XI)的一些情况下,x^{49}为l。在式 (X)-(XI)的一些情况下,x^{39}为s。在式(X)-(XI)的一些情况下,x^{42}为n。在式(X)-(XI)的一些情况下,x^{46}为n。在式(XI)的一些情况 下,x^{50}为k。

[0246] 在化合物的一些实施例中,[螺旋3]与SEQ ID NO:79的序列具有65% 同一性或更高同一性,例如与SEQ ID NO:79的序列具有75%同一性或更 高同一性、83%同一性或更高同一性、或91%同一性或更高同一性。在化 合物的一些实施例中,[螺旋3]与SEQ ID NO:82的序列具有70%同一性或 更高同一性,例如与SEQ ID NO:82的序列具有78%同一性或更高同一性、 85%同一性或更高同一性、或92%同一性或更高同一性。

[0247] 在式(I)中,[连接子2]为连接[螺旋2]和[螺旋3]的肽连接子,且其可 视情况与VEGF-A的表面进行额外接触。[连接子2]可具有任何合宜的长度。 在一些情况下,[连接子2]为比[连接子1]更短的连接子。与[螺旋2]相邻的[连 接子2]的N末端残基可视为例如如本文所描述的螺旋终止残基。在一些情 况下,与[螺旋3]相邻的[连接子2]的C末端残基可视为例如如本文所描述 的螺旋终止残基。在一些情况下,[连接子2]可包括4个氨基酸残基或更少, 例如3个或更少、或2个或更少。在一些情况下,[连接子2]具有与天然 GA支架结构域的对应螺旋连接环区相同的残基数目。在式(I)的某些实 施例中,[连接子2]为zx,其中z为螺旋2终止残基,且x为氨基酸残基。 在[连接子2]的一些情况下,z为p或G。在[连接子2]的一些情况下,z为 p。在[连接子2]的一些情况下,x为VEGF-A接触残基。在[连接子2]的一些情况下,x为芳香族残基。在[连接子2]的一些情况下,x为w或h残基 或其被取代形式。在[连接子2]的一些情况下,x为酪氨酸或其类似物。在 某些情况下,[连接子2]包括螺旋终止脯氨酸残基,其提供经修饰的螺旋2 与螺旋3螺旋间角(即,螺旋的轴之间的角),例如如本文所描述。参见图 27。

[0248] 酪氨酸类似物可在连接子2中的位置37处并入,例如包括被取代或未 被取代的烷基-芳基或烷基-杂芳基延伸侧链基团的类似物,所述侧链基团可 使得与相邻的VEGF-A的残基形成更紧密接触(例如,疏水接触和/或氢键)。图23描绘了化合物(1.1.1(c21a))与VEGF-A之间的结合界面,显示朝 VEGF-A表面突出的残基y37(209)的酚氧与相邻的VEGF-A残基相距6.5 至7.2埃。在一些情况下,x为具有以下式的侧链的酪氨酸类似物:$-(CH_2)_n-Ar$,其中n为1、2、3或4;且Ar为芳基、被取代的芳基、杂芳基 或被取代的杂芳基。在x的某些情况下,Ar为被取代的苯基。在x的某些 情况下,Ar为被取代的苯基,且n为2或3。在x的某些情况下,Ar为被 含氢键供体或受体的基团取代的苯基,所述基团被配置成与相邻的VEGF-A的残基氢结合。

[0249] 在式(I)的一些实施例中,[螺旋2]-[连接子2]-[螺旋3]包含界定VEGF-A 结合表面的式(XII)的序列:

[0250] $z^{26}h*jxxf*jxh*jzy*xxh*jxujxxujx^{49}$(SEQ ID NO:99)

[0251] (XII)

[0252] 其中:

[0253] 各z为螺旋终止残基；

[0254] y*为酪氨酸或其类似物；

[0255] 各h*独立地为组氨酸或其类似物；

[0256] f*为苯丙氨酸或其类似物；

[0257] 各u独立地为非极性残基。

[0258] 各j独立地为疏水残基；且

[0259] 各x独立地为氨基酸残基。

[0260] 在某些情况下，式(XII)的螺旋3包括额外残基$x^{50}x^{51}$，其中x为氨 基酸残基。在一些情况下，x^{50}为k或r。在延伸式(XII)的一些情况下， x^{50}为k且x^{51}为a。在延伸式(XII)的一些情况下，x^{50}为e且x^{51}为d。在 式(XII)的某些情况下，x^{50}为G且x^{51}为r。在某些情况下，式(XII)的 螺旋3包括选自SEQ ID NO:85-87中的一者的C末端区。在延伸式(XII) 的一些实施例中，x^{51}为框架残基。在延伸式(XII)的一些实施例中，x^{51}为非极性残基(u)。在延伸式(XII)的一些实施例中，x^{51}为疏水残基。

[0261] 在化合物的一些实施例中，[螺旋2]-[连接子2]-[螺旋3]与SEQ ID NO: 80的序列具有70％同一性或更高同一性，例如与SEQ ID NO:80的序列具 有75％同一性或更高同一性、83％同一性或更高同一性、87％同一性或更高 同一性、91％同一性或更高同一性、或95％同一性或更高同一性。在化合 物的一些实施例中，[螺旋2]-[连接子2]-[螺旋3]与SEQ ID NO:83的序列 具有70％同一性或更高同一性，例如与SEQ ID NO:83的序列具有80％同一性或更高同一性、84％同一性或更高同一性、88％同一性或更高同一性、 92％同一性或更高同一性、或96％同一性或更高同一性。

[0262] 在式(I)的某些情况下，[连接子1]具有以下式的序列：

[0263] $z(x)_n x'z$(SEQ ID NO:147)

[0264] (XIII)

[0265] 其中：x′为极性残基；各x为氨基酸且n为1-6的整数；且各z独立地 为螺旋终止残基，例如，第一个z为螺旋1终止残基，且第二个z为螺旋2 终止残基。在某些情况下，x′为能够与VEGF-A氢键合的极性残基。在一 些情况下，x′选自d、e、n、q、鸟氨酸、2-氨基-3-胍基丙酸和瓜氨酸。在 某些情况下，n为1、2或3。在式(XIII)的某些情况下，[连接子1]具有 式(XIV)的序列：

[0266] $z(x)_n e*z$(SEQ ID NO:148)

[0267] (XIV)

[0268] 其中：各x为氨基酸且n为1、2或3；各z独立地为螺旋终止残基； 且e*为谷氨酸或其类似物。在式(XIII)和(XIV)的一些情况下，各z选 自G和p。在式(XIII)和(XIV)的一些情况下，n为2。

[0269] 在式(I)的某些情况下，[连接子1]-[螺旋2]-[连接子2]-[螺旋3]包含 以下式的序列：

[0270] z^{22}xxe*zh*jxxf*jxh*jzy*xxh*jxujxxujxxx^{51}(SEQ ID NO:100)

[0271] (XV)

[0272] 其中：

[0273] e*为谷氨酸或其类似物；

[0274] 各z独立地为螺旋终止残基；

[0275] y*为酪氨酸或其类似物；

[0276] 各j独立地为疏水残基；

[0277] 各u独立地为非极性氨基酸残基；且

[0278] 各x独立地为氨基酸残基。

[0279] 在式(I)、(XII)和(XV)的一些情况下，[螺旋2]由式(XVI)的序 列界定：

[0280] $z^{26}hj^{28}xxfj^{32}xhj^{35}z^{36}$(SEQ ID NO:101)

[0281] (XVI)

[0282] 其中：

[0283] z^{26}选自d、p和G；

[0284] z^{36}选自p和G；

[0285] j^{28}、j^{32}和j^{35}各自独立地为疏水残基；且

[0286] 各x独立地为氨基酸残基。

[0287] 在某些情况下，j^{28}、j^{32}和j^{35}为选自SEQ ID NO:1-21的GA支架结构 域的对应残基。在一些情况下，j^{28}、j^{32}和j^{35}独立地选自a、i、l和v。

[0288] 在式(I)、(XII)、(XV)和(XVI)的一些情况下，[螺旋2]由选自以 下的序列界定：a) $phvx^{29}x^{30}fix^{33}hap$(XVII)(SEQ ID NO:102)

[0289] 其中：x^{29}选自f和i；且x^{30}和x^{33}独立地选自极性氨基酸残基；和

[0290] b)与a)中所界定的式(XVII)的序列具有80％或更高同一性(例如，90％或更高同一性)的氨基酸序列。

[0291] 在式(XVI)-(XVII)的一些情况下，x^{30}和x^{33}独立地选自n、s、d、 e和k。在式(XVI)-(XVII)的一些情况下，x^{29}为i。在式(XVI)-(XVII) 的一些情况下，x^{30}为s或n。在式(XVI)-(XVII)的一些情况下，x^{33}为 n。在式(XVI)-(XVII)的一些情况下，x^{29}为i；x^{30}为s或n；且x^{33}为n。

[0292] 在式(I)、(XII)和(XV)的一些情况下，[螺旋3]由式(XVIII)的 序列界定：

[0293] $xxhj^{41}xuj^{44}xxuj^{48}xxx^{51}$(SEQ ID NO:103)

[0294] (XVIII)

[0295] 其中：

[0296] j^{41}、j^{44}和j^{48}各自独立地为疏水残基；

[0297] 各u独立地为非极性氨基酸残基；且

[0298] 各x独立地为氨基酸残基。

[0299] 在一些情况下，x^{50}为k或r。在式(XVIII)的一些情况下，x^{50}为k且 x^{51}为a。在式(XVIII)的一些情况下，x^{50}为e且x^{51}为d。在式(XVIII) 的一些情况下，x^{50}为G且x^{51}为r。在某些情况下，式(XVIII)的螺旋3 包括选自SEQ ID NO:85-87中的一者的C末端区。在式(XVIII)的一些 实施例中，x^{51}为框架残基。在式(XVIII)的一些实施例中，x^{51}为非极性 残基(u)。在式(XVIII)的一些实施例中，x^{51}为疏水残基。在式(XVIII) 的一些实施例中，j^{41}、j^{44}和j^{48}独立地选自a、i、l和v。在式(XVIII)的 一些实施例中，j^{41}、j^{44}和j^{48}为选自SEQ ID NO:1-21的GA支架结构域的 对应残基。

[0300] 在式(I)、(XII)和(XV)的一些情况下，[螺旋3]由选自以下的序列 界定：a)

$x^{38}x^{39}hvx^{42}Glx^{45}x^{46}aix^{49}x^{50}a$(XIX)(SEQ ID NO:104)

[0301] 其中：

[0302] x^{38}选自v、e、k、r；

[0303] x^{39}、x^{42}、x^{46}和x^{50}独立地选自极性氨基酸残基；且

[0304] x^{45}和x^{49}独立地选自l、k、r和e；和

[0305] b)与a)中所界定的式(XIX)的序列具有80％或更高同一性(例如，90％或更高同一性)的氨基酸序列。

[0306] 在式(XIX)的一些情况下，x^{39}、x^{42}、x^{46}和x^{50}独立地选自n、s、d、e和k。在式(XIX)的一些情况下，x^{38}为v。在式(XIX)的一些情况下，x^{45}为k。在式(XIX)的一些情况下，x^{49}为l。在式(XIX)的一些情况下，x^{39}为s。在式(XIX)的一些情况下，x^{42}为n。在式(XIX)的一些情况下，x^{46}为n。在式(XIX)的一些情况下，x^{50}为k。

[0307] 在某些情况下，[螺旋1]包含以下共有序列：$l^{7}..a^{10}ke.ai.elk..^{21}$，其中位 置8、9、13、16、20和21处的残基由表3的GA结构域的序列的对应残 基中的任一个界定。在某些情况下，[螺旋1]包含15个残基的序列，所述 序列与以下序列具有66％或更高百分比同一性，例如73％或更高、80％或 更高、86％或更高、或93％或更高百分比同一性：$l^{6}lknakedaiaelkk^{20}$。

[0308] 在化合物的一些实施例中，[连接子1]-[螺旋2]-[连接子2]-[螺旋3]与 SEQ ID NO:81的序列具有70％同一性或更高同一性，例如与SEQ ID NO: 81的序列具有78％同一性或更高同一性、82％同一性或更高同一性、85％ 同一性或更高同一性、89％同一性或更高同一性、92％同一性或更高同一性、 或96％同一性或更高同一性。在化合物的一些实施例中，[连接子1]-[螺旋 2]-[连接子2]-[螺旋3]与SEQ ID NO:84的序列具有70％同一性或更高同一 性，例如与SEQ ID NO:84的序列具有80％同一性或更高同一性、83％同一 性或更高同一性、86％同一性或更高同一性、90％同一性或更高同一性、93％ 同一性或更高同一性、或96％同一性或更高同一性。

[0309] 所关注GA结构域的任何合宜的N末端α-螺旋区段都可适用于在本发 明化合物中使用。在一些情况下，[螺旋1]包括约位置6至约位置20的N 末端残基的序列。图18B显示了示例性化合物的N末端截短衍生物，其中 可从化合物去除残基1-5，而不会显著不利地影响稳定三螺旋束的化合物的 分子内疏水接触。在某些情况下，相对于本文所描述的编号系统1-53，本 发明化合物在N末端处截短6个或更少残基，例如5个或更少、4个或更 少、3个或更少、2个或更少、或1个残基。在某些情况下，本发明化合物 的位置1-5中的残基中的一个或多个被缺失或修饰，例如以赋予所得化合 物所需特性，例如螺旋封端、提高的水溶性或与所关注分子(例如，如本 文所描述)的连接。

[0310] 在某些情况下，[螺旋1]包含以下共有序列：$l^{7}..a^{10}ke.ai.elk..^{21}$(SEQ ID NO:105)，其中位置8、9、13、16、20和21处的残基由SEQ ID NO:2-21 的序列的对应残基中的任一者界定。在某些情况下，[螺旋1]包含15个残 基的序列，所述序列与以下序列具有66％或更高百分比同一性，例如73％ 或更高、80％或更高、86％或更高、或93％或更高百分比同一性：$l^{6}lknakedaiaelkk^{20}$(SEQ ID NO:74)。

[0311] 本文描述具有VEGF特异性决定基序(SDM)的D-肽GA结构域，所 述基序由肽框架残基的基础序列中所包含的变异氨基酸残基的配置界定。基于本公开，应理解，本公开还涵

盖SDM和肽框架残基/序列中的任一者 的变异。在一些实施例中,GA结构域包括与本文所界定的SDM残基和/ 或肽框架残基的实施例中的任一个具有50%或更高、60%或更高、65%或更 高、70%或更高、例如75%或更高、80%或更高、85%或更高、90%或更高、 或95%或更高同一性的VEGF SDM。在一些实施例中,GA结构域包括相 对于本文所界定的SDM残基和/或肽框架残基的实施例中的任一个具有1 至5,例如1至4或1至3个氨基酸残基取代(例如,1、2、3、4或5个 取代)的VEGF SDM。在某些实施例中,1至3个氨基酸残基取代选自根 据表6的类似、保守或高度保守氨基酸残基取代。

[0312] 在特异性结合VEGF的D-肽化合物的一些实施例中,D-肽GA结构域 包含由以下氨基酸残基界定的VEGF特异性决定基序(SDM):

[0313] e^{25}phvisf--h^{34}-$p^{36}x^{37}$-s^{39}h--G^{43}---a^{47}(SEQ ID NO:149)

[0314] 其中x^{37}选自s、n和y。在VEGF SDM的一些实施例中,x^{37}为s。在 VEGF SDM的一些实施例中,x^{37}为n。在VEGF SDM的一些实施例中,x^{37}为y。

[0315] 在一些实施例中,VEGF SDM进一步由以下残基界定:

[0316] c^{7}----------e^{25}phvisf--h^{34}-$p^{36}x^{37}c^{38}$sh--G^{43}---a^{47}(SEQ ID NO:150)

[0317] 其中x^{37}选自s和n。在VEGF SDM的一些实施例中,x^{37}为s。在VEGF SDM的一些实施例中,x^{37}为n。

[0318] 在GA结构域的一些实施例中,螺旋$1^{(\#6-21)}$包含肽框架序列:$x^{6}x^{7}$knakedaiaelkka^{21}(SEQ ID NO:138)

[0319] 其中:x^{6}选自l、v和i;且x^{7}选自l和c。

[0320] 在螺旋1的一些实施例中,x^{6}为l。在螺旋1的一些实施例中,x^{6}为v。 在螺旋1的一些实施例中,x^{6}为i。

[0321] 在一些实施例中,GA结构域包含N末端肽框架序列:

[0322] $x^{1}x^{2}x^{3}$qw$x^{6}x^{7}$knakedaiaelkkaGit^{24}(SEQ ID NO:139)

[0323] 其中:

[0324] x^{1}选自t、y、f、i、p和r;

[0325] x^{2}选自i、h、n、p和s;

[0326] x^{3}选自d、i和v;

[0327] x^{6}选自l、v和i;且

[0328] x^{7}选自l和c。

[0329] 在肽框架序列的一些实施例中,x^{1}为t。在肽框架序列的一些实施例中, x^{1}为y。在肽框架序列的一些实施例中,x^{1}为f。在肽框架序列的一些实施 例中,x^{1}为i。在肽框架序列的一些实施例中,x^{1}为p。在肽框架序列的一 些实施例中,x^{1}为r。

[0330] 在肽框架序列的一些实施例中,x^{2}为i。在肽框架序列的一些实施例中, x^{2}为h。在肽框架序列的一些实施例中,x^{2}为n。在肽框架序列的一些实施 例中,x^{2}为p。在肽框架序列的一些实施例中,x^{2}为s。

[0331] 在肽框架序列的一些实施例中,x^{3}为d。在肽框架序列的一些实施例中, x^{3}为i。在肽框架序列的一些实施例中,x^{3}为v。

[0332] 在肽框架序列的一些实施例中,x^{6}为l。在肽框架序列的一些实施例中, x^{6}为v。在肽框架序列的一些实施例中,x^{6}为i。

[0333] 在肽框架序列的一些实施例中,x^7为l。在肽框架序列的一些实施例中，x^7为c。

[0334] 在一些实施例中,D-肽GA结构域包含C末端肽框架序列:ilkaha(SEQ ID NO:140)。

[0335] 在一些实施例中,D-肽GA结构域包含以下序列：

[0336] $x^1x^2x^3qwx^6x^7knakedaiaelkkagitephvisfinhapx^{37}x^{38}shvnGlknailkaha^{53}$(SEQ ID NO:141)

[0337] 其中：

[0338] x^1选自t、y、f、i、p和r；

[0339] x^2选自i、h、n、p和s；

[0340] x^3选自d、i和v；

[0341] x^6选自l、v和i；

[0342] x^7选自l和c；

[0343] x^{37}选自t、y、n和s；

[0344] x^{38}选自v和c；

[0345] x^{39}选自e和s；

[0346] x^{40}选自h和e；

[0347] x^{43}选自g和a;且

[0348] x^{47}选自a和e。

[0349] 在一些实施例中,x^1为t。在一些实施例中,x^1为y。在一些实施例中，x^1为f。在一些实施例中,x^1为i。在一些实施例中,x^1为p。在一些实施 例中,x^1为r。在一些实施例中,x^2为i。在一些实施例中,x^2为h。在一 些实施例中,x^2为n。在一些实施例中,x^2为p。在一些实施例中,x^2为s。 在一些实施例中,x^3为d。在一些实施例中,x^3为i。在一些实施例中,x^3为v。在一些实施例中,x^6为l。在一些实施例中,x^6为v。在一些实施例 中,x^6为i。在一些实施例中,x^7为l。在一些实施例中,x^7为c。在一些实 施例中,x^{37}为t。在一些实施例中,x^{37}为y。在一些实施例中,x^{37}为n。 在一些实施例中,x^{37}为s。在一些实施例中,x^{38}为v。在一些实施例中,x^{38}为c。在一些实施例中,x^{39}为e。在一些实施例中,x^{39}为s。在一些实 施例中,x^{40}为h。在一些实施例中,x^{40}为e。在一些实施例中,x^{43}为g。 在一些实施例中,x^{43}为a。在一些实施例中,x^{47}为a。在一些实施例中， x^{47}为e。

[0350] 在一些实施例中,D-肽化合物包含选自化合物11055、979102和 979107-979110(SEQ ID NO:108-113)中的一者的序列。

[0351] 在一些实施例中,D-肽化合物包含与化合物11055、979102和 979107-979110(SEQ ID NO:108-113)中的一者具有80％或更高(例如，90％或更高)同一性的序列。

[0352] 在一些实施例中,D-肽化合物包含相对于化合物11055、979102和 979107-979110(SEQ ID NO:108-113)中的一者具有1至10个氨基酸残基 取代(例如,1至9、1至8、1至7、1至6、1至5、1至4、1至3,例如 1或2个氨基酸残基取代)的序列。在某些实施例中,1至10个氨基酸残 基取代选自例如根据表6的类似、保守和高度保守氨基酸残基取代。

[0353] GA支架结构域

[0354] 基于本公开,应理解,可修饰GA结构域基序中不位于结构的VEGF-A 结合表面处的数个氨基酸残基,而不会对所得经修饰化合物的VEGF-A结 合活性产生不利影响。因此,可将任何合宜的氨基酸并入到本发明化合物 中以赋予所需特性,包括但不限于提高的水溶

性、易于化学合成、成本、 生物缀合位点、稳定性、pI、聚集、减少的非特异性结合和/或与第二目标 蛋白的特异性结合。可选择突变的位置，以便使对VEGF-A结合GA结构 域基序的结构或与目标VEGF-A蛋白的特异性结合的任何破坏降至最低， 例如，通过选择所述结构与VEGF-A结合表面相反的侧上的位置。在一些 情况下，化合物在不为与目标VEGF-A蛋白的结合表面的一部分的位置处 包括两个或更多个，例如3个或更多个、4个或更多个、5个或更多个、6 个或更多个、7个或更多个、8个或更多个、9个或更多个、或10个或更多 个表面突变。

[0355] 举例来说，在一些情况下，可修饰螺旋1的c、f和b残基以及螺旋2 和3的c和f残基中的一个或多个，因为那些残基不直接参与VEGF-A结 合和溶剂暴露(参见图3B的七肽模型)。在某些情况下，可根据已知氨基 酸在类似位置处，例如在已知天然存在的蛋白质中的出现百分率，选择变 异氨基酸残基以便在特定七肽重复位置处并入到本发明化合物中。表2提 供了可用于选择变异氨基酸残基，例如出现百分率为2％或更高，例如5％ 或更高、10％或更高或甚至更高的氨基酸残基的三链卷曲螺旋七肽位置的 氨基酸出现百分率的列表。在一些情况下，表面突变包括使残基突变为极 性残基，例如赋予化合物所需溶解度的残基。在一些情况下，表面突变包 括使残基突变为带电残基，例如赋予化合物所需溶解度的残基。在一些情 况下，表面突变包括使残基突变为碱性残基(例如，k或h)。在一些情况下，表面突变包括使残基突变为酸性残基(例如，d或e)，例如赋予化合 物所需pI的残基。

[0356] 表2:三链卷曲螺旋七肽位置的氨基酸出现百分率*

[0357]

氨基酸	a	b	c	d	e	f	g	M
Ala	**19.9**	**7.4**	8.2	**18.8**	**5.1**	9.4	**6.3**	192
Cys	0	0.8	0.8	0	0	0	0.8	6
Asp	**1.5**	7.8	**10.2**	**1.6**	3.9	**9.8**	**9.0**	112
Glu	**0.8**	**17.6**	**18.8**	**1.6**	**17.6**	9.8	13.3	203
Phe	**0**	0.8	1.6	1.6	**2.7**	0.4	1.6	22
Gly	0.8	**2.7**	**2.7**	**0**	1.6	1.6	0.8	26
His	0.8	1.2	2.0	1.2	1.6	2.3	2.7	30
Ile	**16.0**	**1.6**	**1.2**	**12.5**	**1.2**	**1.6**	3.9	97
Lys	**0.8**	9.8	7.0	**3.1**	**12.5**	10.5	**12.5**	144
Leu	**25.0**	**3.1**	**2.3**	**30.1**	9.4	**5.1**	12.9	225
Met	2.3	1.2	2.0	**3.9**	2.7	2.7	0.8	40
Asn	**1.6**	5.5	**12.1**	**1.6**	7.8	**9.0**	7.0	114
Pro	0.4	**0.8**	0.4	0.4	0	0	0	5
Gln	3.9	**10.9**	6.6	**1.6**	7.8	8.6	4.7	113
Arg	**0.4**	6.3	6.6	**0.4**	7.8	**10.2**	3.9	91
Ser	5.1	8.6	**9.4**	**2.3**	8.2	8.2	4.7	119
Thr	3.9	**8.2**	3.9	4.7	5.1	5.9	7.4	100
Val	**14.8**	**3.1**	**3.1**	**13.7**	**2.7**	4.3	5.1	120
Trp	0.4	0.4	0	0	0.8	0	0.8	6
Tyr	1.5	2.3	1.2	1.2	1.6	0.8	2.0	27
总计	100	100	100	100	100	100	100	1792
N	256	256	256	256	256	256	256	

[0358] *M为在七肽位置处发现特定氨基酸的总次数。N为在所述七肽位置处计数的残基总数目。 参见DeGrado等人的表3。

[0359] 在一些情况下，基于GA支架结构域从噬菌体展示库选择本发明肽化 合物，且进一步开发(例如，经由额外亲和力成熟和/或点突变)，以包括与 GA支架结构域整合的数种变异氨基酸。变异基序包含变异氨基酸，且可界 定本发明化合物的VEGF-A结合表面。SEQ ID NO:25显示了示例性化合物 1.1.1(c21a)的变异基序。上文描述了本发明化合物的VEGF-A结合表面的各 方面。应理解，在本发明化合物中可利用多种基础GA支架结构域序列， 以提供其中并入有变异结构域的三螺旋束支架结构。本发明化合物的结构 可由变异和框架结构域的组合界定。本发明化合物的序列可由变异和框架 残基的组合界定。因此，在一些情况下，结构或序列基序的框架残基可由 支架结构域结构或序列的对应残基界定。

[0360] 举例来说,支架SCF32(SEQ ID NO:2)与化合物1.1.1(c21a)(SEQ ID NO:24)的比较提供变异基序(SEQ ID NO:25)和框架结构域(SEQ ID NO: 26)。本文描述了变异基序的各方面。应理解,可将多种修饰并入到框架结 构域中,而对三螺旋束结构或VEGF-A结合表面没有显著不良影响。图3 和4显示了示例性序列和基序与本发明化合物的七肽重复结构模型的比对。 溶剂暴露且不参与疏水核心相互作用的螺旋1的残基可为任何合宜的氨基酸残基,包括但不限于极性残基。在一些情况下,可改变本发明化合物的 螺旋1的b、c和/或f残基(参见例如图6B),而不会不利地影响化合物的 VEGF-A结合活性,且在某些情况下提供所需特性。在一些情况下,还可 改变螺旋1的e和g残基。在某些实施例中,可改变螺旋2和/或螺旋3的 f残基,而不会不利地影响化合物的VEGF-A结合活性,且在某些情况下提 供所需特性。在某些情况下,螺旋3中可包括C末端修饰,例如截短或延 伸(例如,位于螺旋3的位置50-53处的残基,参见图10A)。本发明化合 物可具有如由SEQ ID NO:2-21中的一者所界定的框架结构域基序。在一些 情况下,化合物的框架结构域基序由SEQ ID NO:1界定。

[0361] 在一些情况下,较不期望对与GA支架结构域的疏水核心接触的残基 (例如,如图7B中所描绘的七肽重复模型的a和d残基)进行修饰,因为 这些残基涉及稳定三螺旋束的螺旋到螺旋疏水接触。然而,可在本发明化 合物的三螺旋束的疏水核心中使用多种非极性或疏水残基。图9A-9C显示 了示例性化合物的序列和结构,其中可形成螺旋间疏水相互作用的七肽重 复模型的a和d残基的配置以红色指示。在某些情况下,可修饰位于螺旋 区末端处的螺旋3七肽重复序列的C末端e残基,例如以提供螺旋封端、螺旋截短或延伸到连接基团。在某些情况下,可修饰位于螺旋区末端处的 螺旋1七肽重复序列的N末端残基(例如,图10A的N末端残基)中的一 个、两个或更多个,例如以提供螺旋封端、螺旋截短或延伸到连接基团。 在某些实施例中,本发明化合物的a和d残基可选自SEQ ID NO:1-21中的 任一者的对应疏水核心残基。

[0362] 在某些情况下,[螺旋2]的各a和d残基为能够赋予本发明化合物的经 修饰三螺旋束结构稳定性的残基。在某些情况下,本发明化合物的a和d 残基中的一者或多者,例如在[螺旋2]的位置28、32和35处的残基提供分 子内接触,其部分界定化合物的疏水核心。在[螺旋2]的某些实施例中,各 a和d残基独立地为疏水残基。在[螺旋2]的某些情况下,各a和d残基选 自a、i、f、m、l和v。在[螺旋2]的一些实施例中,各a和d残基选自a、 i、f、l和v。在[螺旋2]的某些情况下,各a和d残基选自a、i、l和v。在 [螺旋2]的一些情况下,位置32和35处的a和d残基为支架结构域的一部 分(例如,与支架结构域基序的对应残基具有相同身分的框架残基)。

[0363] 在某些情况下,与接触VEGF-A的结构的g-g面最接近的[螺旋2]和[螺 旋3]的“d”残基可与蛋白质接触。在此类情况下,接触VEGF-A的“d” 残基可被称为边界残基。应理解,

[0364] 表3列出了所关注的示例性支架结构域、示例性化合物和示例性化合 物区结构域的序列的列表。在式(I)-(XIX)的一些实施例中,残基对应 于位于表3中所列的SEQ ID NO:22-71中的一者的相同位置的残基。在式 (I)的某些实施例中,化合物包含与SEQ ID NO:22-71中的一者具有85% 或更高百分比同一性,例如88%或更高、90%或更高、92%或更高、94%或 更高、96%或更高、或98%或更高百分比同一性的残基序列。在一些情况 下,序列同一性比较是基于具有相同长度的序列区域,例如长度为48个残 基、49个残基、50个残基、51个残基、52个残基或53个残基。这些本发 明化合物可进一步突变,以在不参与接触目

标VEGF-A蛋白的GA结构域 基序的表面位置处并入残基。可选择残基以赋予所得经修饰化合物所需特 性(例如,如本文所描述)。

[0365] 表3:所关注的支架和化合物的序列

[0366]

支架名称	序列	SEQ ID NO:
GA 结构域共有序列	.....l[7]..a[10]ke.ai.elk.[20].Gi.sd.y..[30].inkaktve.[40]v.alk.eil[49]....	1
SCF32	t[1]idqwllknakedaiaelkkaGitsdfyfnainkaktveevnalkneilkaha[53]	2
SCF32 固定结构域 1	tidqwllknakedaiaelkkaGit.d..fn.in.a..v..vn..kn.ilkaha	3
SCF32 固定结构域 2	tidqwllknakedaiaelkk.Git.....in.a..v..vn..kn.ilkaha	4
SCF32 固定结构域 3	tidqwllkna[10]kedaiaelkk[20]aGit.....[30].in.a..v..[40]vn.lkn.ilkaha	5
ALB8-GA	t[1]idqwll[7]knakedaiaelkkaGitsdfyfnainkaktveevnalkneilkaha[53]	6
ALB1-GA	l[7]knakedaiaelkkaGitsdfyfnainkaktveGanalkneilka[51]	7
ALB8-uGA	l[7]kltkeeaekalkklGitsefilnqidkatsreGleslvqtikqs[51]	8
ALB1B-uGA	l[7]qeakdkaiqeakanGltsklllknienaktpesaksfaeeliks[51]	9
L3316-GA1	l[7]knakeeaikelkeaGitsdlyfslinkaktveGvealkneilka[51]	10
L3316-GA2	l[7]knakedaikelkeaGissdiyfdainkaktveGvealkneilka[51]	11
L3316-GA3	l[7]knakeaaikelkeaGitaeylfnlinkaktveGveslkneilka[51]	12
L3316-GA4	l[7]knakedaikelkeaGitsdiyfdainkaktieGvealkneilka[51]	13
G148-GA1	l[7]akakadalkefnkyGv-sdyyknlinnaktveGvkdlqaqvves[51]	14
G148-GA2	l[7]aeakvlanreldkyGv-sdyhknlinnaktveGvkdlqaqvves[51]	15
G148-GA3	l[7]aeakvlanreldkyGv-sdyyknlinnaktveGvkalideilaalp[53]	16
DG12-GA1	l[7]dnaknaalkefdryGv-sdyyknlinkaktveGimelqaqvves[51]	17
DG12-GA2	l[7]seakemaireldanGv-sdfykdkiddaktveGvvalkdlilns[51]	18
MAG-GA1	l[7]aklaadtdldldvakiind-yttkvenaktaedvkkifee--sq[51]	19
MAG-GA2	l[7]akakadaieilkkyGi-GdyyiklinnGktaeGvtalkdeil--[51]	20

ZAG-GA	l[7]leakeaainelkqyGi-sdyyvtlinkaktveGvnalkaeilsa[51]	21
化合物名称	序列	SEQ ID NO:
1	tidqwllknakedaiaelkkaGitsdhvfnfinyapyvsdvnalkneilkaha	107
1.1	tidqwllknakedaiaelkkaGitedhvfnfinhapyvshvnGlknailkaha	22
1.1.1	tidqwllknakedaiaelkkcGitephvisfinhapyvshvnGlknailkaha	23
1.1.1(c21a)	tidqwllkna[10]kedaiaelkk[20]aGitephvis[30]finhapyvsh[40]vnGlknailk[50]aha	24
1.1.1(c21a)变异基序	---------[10]----------[20]----ephvis[30]f--h-py-sh[40]--G---a---[50]---	25
1.1.1(c21a)框架结构域	tidqwllkna[10]kedaiaelkk[20]aGit……[30].in.a..v..[40]vn.lkn.ilk[50]aha	26
1.1.1(c21a)框架结构域 N/C 截短型	llkna[10]kedaiaelkk[20]aGit……[30].in.a..v..[40]vn.lkn.ilk[50]a	27
1.1.1(c21a)变异基序+GA 结构域共有序列	------l[7]--a[10]ke-ai-elk-[20]-Gi-ephvis[30]finhapyvsh[40]v-Glk-ail[49]----	28
1.1.1(c21a)截短(-)TIDQW	llkna[10]kedaiaelkk[20]aGitephvis[30]finhapyvsh[40]vnGlknailk[50]aha	29
1.1.1(c21a): Ile15 突变为疏水残基（f、i、l、m 或 v）	llkna[10]keda-aelkk[20]aGitephvis[30]finhapyvsh[40]vnGlknailk[50]aha	30
1.1.1(c21a): Ile29 突变为疏水残基（f、i、l、m 或 v）	llkna[10]kedaiaelkk[20]aGitephv-s[30]finhapyvsh[40]vnGlknailk[50]aha	31
1.1.1(c21a): Ile15/29 突变为疏水残基（f、i、l、m 或 v）	llkna[10]keda-aelkk[20]aGitephv-s[30]finhapyvsh[40]vnGlknailk[50]aha	32
1.1.1(c21a): Trp5 突变（NNK）	tidq-llkna[10]kedaiaelkk[20]aGitephvis[30]finhapyvsh[40]vnGlknailk[50]aha	33
1.1.1(c21a): Tyr37 软随机	tidqwllkna[10]kedaiaelkk[20]aGitephvis[30]finhap-vsh[40]vnGlknailk[50]aha	34

[0367]

化（NNK）		
1.1.1(c21a): Trp5 和 Tyr 突变	tidq-llkna[10]kedaiaelkk[20]aGitephvis[30]finhap-vsh[40]vnGlknailk[50]aha	35
1.1.1(c21a): 截短(-) TID	qwllkna[10]kedaiaelkk[20]aGitephvis[30]finhapyvsh[40]vnGlknailk[50]aha	36
1.1.1(c21a): Gln4 用 AVC 突变为（t、n 或 s）	-wllkna[10]kedaiaelkk[20]aGitephvis[30]finhapyvsh[40]vnGlknailk[50]aha	37
1.1.1(c21a): Trp5 突变（NNK）	--llkna[10]kedaiaelkk[20]aGitephvis[30]finhapyvsh[40]vnGlknailk[50]aha	38
1.1.1(c21a): Ile15 突变为疏水残基（f、i、l、m 或 v）	--llkna[10]keda-aelkk[20]aGitephvis[30]finhapyvsh[40]vnGlknailk[50]aha	39
1.1.1(c21a): Ile29 突变为疏水残基（f、i、l、m 或 v）	--llkna[10]kedaiaelkk[20]aGitephv-s[30]finhapyvsh[40]vnGlknailk[50]aha	40
1.1.1(c21a): His27 突变	llkna[10]kedaiaelkk[20]aGitep-vis[30]finhapyvsh[40]vnGlknailk[50]aha	41
1.1.1(c21a): His34 突变	llkna[10]kedaiaelkk[20]aGitephvis[30]fin-apyvsh[40]vnGlknailk[50]aha	42
1.1.1(c21a): His40 突变	llkna[10]kedaiaelkk[20]aGitephvis[30]finhapyvs-[40]vnGlknailk[50]aha	43
1.1.1(c21a): His27、His 34 和/或 His 40 突变	llkna[10]kedaiaelkk[20]aGitep-vis[30]fin-apyvs-[40]vnGlknailk[50]aha	44
1.1.1(c21a): Phe31 突变为 Phe 类似物（*）	llkna[10]kedaiaelkk[20]aGitephvis[30]f*inhapyvsh[40]vnGlknailk[50]aha	45
1.1.1(c21a): Tyr37 突变为 Tyr 类似物（*）	llkna[10]kedaiaelkk[20]aGitephvis[30]finhapy*vsh[40]vnGlknailk[50]aha	46

[0368]

[0369]

1.1.1(c21a): Phe31 + Tyr37 突变为类似物（*）	llkna[10]kedaiaelkk[20]aGitephvis[30]f*inhapy*vsh[40]vnGlknailk[50]aha	47
1.1.1.2	tidqwllknakedaiaelkkaGitedhvfnfinhapyvshvnGlknailGrtvp	48
1.1.1.2（pis）	tidqwllknakedaiaelkkaGitephvisfinhapyvshvnGlknailGrtvp	49
1.1.1.2（pis，asc）	tidqwllknakedaiaelkkaGitephvisfinhapyvshvnGlknailGrtvpasc	50
1.1.1.2（pa，pis）	pallknakedaiaelkkaGitephvisfinhapyvshvnGlknailGrtvp	51
1.1.1.2（ pa，pis，asc）	pallknakedaiaelkkaGitephvisfinhapyvshvnGlknailGrtvpasc	52
1.1.1.3	tidqwllknakedaiaelkkaGitedhvfnfinhapyvshvnGlknailedwyl	53
1.1.1.3（pis）	tidqwllknakedaiaelkkaGitephvisfinhapyvshvnGlknailedwyl	54
1.1.1.3（pis，asc）	tidqwllknakedaiaelkkagitephvisfinhapyvshvnglknailedwylasc	55
1.1.1.3（-tidqw/pa，pis）	pallknakedaiaelkkagitephvisfinhapyvshvnglknailedwyl	56
1.1（-kaha，adfl）	tidqwllknakedaiaelkkaGitedhvfnfinhapyvshvnGlknailadfl	57
1.1（-kaha，edyl）	tidqwllknakedaiaelkkaGitedhvfnfinhapyvshvnGlknailedyl	58
1.1（-kaha，Grtvp）	tidqwllknakedaiaelkkaGitedhvfnfinhapyvshvnGlknailGrtvp	59
1.1（-kaha，edwyl）	tidqwllknakedaiaelkkaGitedhvfnfinhapyvshvnGlknailedwyl	60
1.1（-kaha，GehGsp）	tidqwllknakedaiaelkkaGitedhvfnfinhapyvshvnGlknailGehGsp	61
1.1.1(c21a)（-kaha，Grtvp）	tidqwllknakedaiaelkkaGitephvisfinhapyvshvnGlknailGrtvp	62
1.1.1(c21a)（-tidqw，-kaha，Grtvp）	llknakedaiaelkkaGitephvisfinhapyvshvnGlknailGrtvp	63
1.1.1(c21a)（-tidqw，pa，-kaha，Grtvp）	pallknakedaiaelkkaGitephvisfinhapyvshvnGlknailGrtvp	64
1.1.1(c21a)	pallknakedaiaelkkaGitephvisfinhapyvshvnGlknailGrtvpasc	65

	(-tidqw，pa，-kaha，Grtvpasc)		
	1.1.1(c21a)(-kaha，edwyl)	tidqwllknakedaiaelkkaGitephvisfinhapyvshvnGlknailedwyl	66
	1.1.1(c21a)(-tidqw，-kaha，edwyl)	llknakedaiaelkkaGitephvisfinhapyvshvnGlknailedwyl	67
	1.1.1(c21a)(-tidqw，pa，-kaha，edwyl)	pallknakedaiaelkkaGitephvisfinhapyvshvnGlknailedwyl	68
	1.1.1(c21a)(-kaha，edwylasc)	tidqwllknakedaiaelkkaGitephvisfinhapyvshvnGlknailedwylasc	69
	1.1.1(c21a)(p26d)	tidqwllknakedaiaelkkaGitedhvisfinhapyvshvnGlknailkaha	70
	1.1.1(c21a)(c(Ac)54)	tidqwllknakedaiaelkkaGitephvisfinhapyvshvnGlknailkahac(acetyl)	71
[0370]	式(I)的化合物区域	序列	SEQ ID NO:
	N末端	$t^{1}idqw^{5}$	72
	N末端	$q^{4}w^{5}$	73
	螺旋1	$l^{6}lknakedaiaelkka^{21}$	74
	连接子1	$G^{22}itep^{26}$	75
	螺旋2	$h^{27}visfinha^{35}$	76
	封端的螺旋2	$p^{26}hvisfinhap^{36}$	77
	连接子2	$p^{36}y^{37}$	78
	螺旋3	$v^{38}shvnGlknail^{49}$	79
	[螺旋2]-[连接子2]-[螺旋3]	$h^{27}visfinhapyvshvnGlknail^{49}$	80
	[连接子1]-[螺旋2]-[连接子2]-[螺旋3]	$G^{22}itephvisfinhapyvshvnGlknail^{49}$	81
	螺旋3	$v^{38}shvnGlknailka^{51}$	82
	[螺旋2]-[连	$h^{27}visfinhapyvshvnGlknailka^{51}$	83

[0371]

接子 2]-[螺旋 3]		
[连接子 1]-[螺旋 2]-[连接子 2]-[螺旋 3]	G^{22}itephvisfinhapyvshvnGlknailka^{51}	84
C 末端	k^{50}aha^{53}	85
C 末端	e^{50}dwyl^{54}	86
C 末端	G^{50}rtvp^{54}	87

[0372] 表4:结合VEGF的示例性D-肽Z和GA结构域

化合物编号	序列	VEGF 结合亲和力（K_D，nM）	SEQ ID NO:
GA 结构域 wt	tidqwllknakedaiaelkkaGitsdfyfnainkaktveevnalkneilkaha	无结合	2
11055	tidqwllknakedaiaelkkaGitephvisfinhapyvshvnGlknailkaha	43	108
979102	fniqwicknakedaiaelkkaGitephvisfinhapscshvnGlknailkaha	5.2	109
979107	ipiqwvcknakedaiaelkkaGitephvisfinhapscshvnGlknailkaha	5.2	110
979108	psvqwicknakedaiaelkkaGitephvisfinhapscshvnGlknailkaha	5.8	111
979109	rniqwvcknakedaiaelkkaGitephvisfinhapncshvnGlknailkaha	3.7	112
979110	yhiqwvcknakedaiaelkkaGitephvisfinhapncshvnGlknailkaha	2.3	113
978333	vdnkfnkewdnawleirhlpnlnheqkrafisslyddpsqsanllaeakklndaqapk	2430	114
978334	vdnkfnkewdnawreirhlpnlnheqkrafisslyddpsqsanllaeakklndaqapk	1050	115
978335	vdnkfnkewdnawreirhlpnlnleqkGafiaslyddpsqsanllaeakklndaqapk	3010	116
978336	vdnkfnkewdnawreirhlpnlnleqkrafisslyddpsqsanllaeakklndaqapk	168	117
978337	vdnkfnkewdnawteirhlpnlnreqkvafitslyddpsqsanllaeakklndaqapk	1360	118

[0374]

980174	vdnkfnkewdnawkeirhlpnlnveqkrafihslyddpsqsanllaeakklndaqapk	138	120
980175	vdnkfnkewdnawreirhlpnlnieqkrafihslyddpsqsanllaeakklndaqapk	110	121
980176	vdnkfnkewdnawreirhlpnlnieqkrafirslyddpsqsanllaeakklndaqapk	86	122
980177	vdnkfnkewdnawreirhlpnlnieqkrafiyslyddpsqsanllaeakklndaqapk	118	123
980178	vdnkfnkewdnawreirhlpnlnleqkrafirslyddpsqsanllaeakklndaqapk	102	124
980179	vdnkfnkewdnawreirhlpnlnreqklafihslyddpsqsanllaeakklndaqapk	87	125
980180	vdnkfnkewdnawreirhlpnlnveqkrafikslyddpsqsanllaeakklndaqapk	120	126
980181	vdnkfnkewdnawreirhlpnlnveqkrafirslyddpsqsanllaeakklndaqapk	17.6	119
981188	vdnkfdkewdnawreirrlpnlnleqkrafisslyddpsqsanllaeakklndaqapk	61	127
981189	vdnkfnkewdnawreirrlpnlnleqkrafisslyddpsqsanllaeakklndaqapk	50	128
981190	vdnkfnkewdnawreirrlpnlnveqkrafisslyddpsqsanllaeakklndaqapk	59	129

[0375] 表5:示例性多价VEGF结合D-肽化合物

[0376]

化合物编号	结构域1	连接组分	结构域2	VEGF结合亲和力(K_D, nM)
979111	11055N末端半胱氨酸	马来酰亚胺-PEG8-马来酰亚胺 N末端到N末端，经由半胱氨酸-马来酰亚胺缀合	978336N末端半胱氨酸	0.47
980870	979110伴随与980181的k19连接	{[yhiqwvcknakedaiaelk[19](叠氮基乙酰基-PEG2)kaGitephvisfinhapncshvnGlknailkaha-NH_2(c到c二硫桥键)]-结构域间点击-[vdnkfnk[7](*D*-Pra-PEG2)ewdnawreirhlpnlnveqkrafirslyddpsqsanllaeakklndaqapk]}$_2$-ak(-)NH_2	980181伴随与979110的k7连接。经由-ak(-)NH_2末端残基二聚化。	0.31
980871	979110伴随与	{[yhiqwvcknakedaiaelk[19](叠氮基乙酰基-PEG3)kaGitephvisfinhapncshvnGlknailka	980181伴随与979110的	0.42

[0377]

化合物编号	结构域1	连接组分	结构域2	VEGF结合亲和力(K_D, nM)
	980181的k19连接	ha-NH_2(c到c二硫桥键)]-结构域间-[vdnkfnk^7(*D*-Pra-PEG2)ewdnawreirhlpnlnveqkrafirslyddpsqsanllaeakklndaqapk]}$_2$-ak(-)NH_2	k7连接。经由-ak(-)NH_2末端残基二聚化。	
980868	979110伴随与980181的k19连接	[yhiqwvcknakedaiael-k^{19}(叠氮基乙酰基-PEG2)kaGitephvisfinhapncshvnGlknailkaha-NH2(c到c二硫桥键)]-结构域间-[vdnkfn-k^7(DPra-PEG2)-ewdnawreirhlpnlnveqkrafirslyddpsqsanllaeakklndaqapk-NH_2]	980181伴随与979110的k7连接	0.1
980869	979110伴随与980181的k19连接	[yhiqwvcknakedaiael-k^{19}(叠氮基乙酰基-PEG3)kaGitephvisfinhapncshvnGlknailkaha-NH2(c到c二硫桥键)]-结构域间-[vdnkfn-k^7(DPra-PEG2)-ewdnawreirhlpnlnveqkrafirslyddpsqsanllaeakklndaqapk-NH_2]	980181伴随与979110的k7连接	0.07

[0378] 本公开的方面包括化合物(例如,如本文所描述)、其盐(例如,药学 上可接受的盐)和/或其溶剂合物或水合物形成。应了解,本公开意图涵盖 盐、溶剂合物和水合物的所有排列。在一些实施例中,本发明化合物以药 学上可接受的盐的形式提供。含有胺和/或含氮杂芳基的化合物本质上可为 碱性的,因此可与任何数量的无机和有机酸反应,从而形成药学上可接受 的酸加成盐。通常用于形成这类盐的酸包括无机酸,例如盐酸、氢溴酸、 氢碘酸、硫酸和磷酸;以及有机酸,例如对甲苯磺酸、甲烷磺酸、草酸、 对溴苯基磺酸、碳酸、丁二酸、柠檬酸、苯甲酸和乙酸;以及相关的无机 和有机酸。此类药学上可接受的盐因此包括硫酸盐、焦硫酸盐、硫酸氢盐、 亚硫酸盐、亚硫酸氢盐、磷酸盐、单氢磷酸盐、二氢磷酸盐、偏磷酸盐、 焦磷酸盐、氯化物、溴化物、碘化物、乙酸盐、丙酸盐、癸酸盐、辛酸盐、 丙烯酸盐、甲酸盐、异丁酸盐、癸酸盐、庚酸盐、丙炔酸盐、草酸盐、丙 二酸盐、丁二酸盐、辛二酸酯、癸二酸盐、富马酸盐、马来酸盐、丁炔-1,4- 二酸盐、己炔-1,6-二酸盐、苯甲酸盐、氯苯甲酸盐、甲基苯甲酸盐、二硝基 苯甲酸盐、羟基苯甲酸盐、甲氧基苯甲酸盐、邻苯二甲酸盐、对苯二甲酸 盐、磺酸盐、二甲苯磺酸盐、苯乙酸酯、苯丙酸盐、苯丁酸盐、柠檬酸盐、 乳酸盐、β-羟基丁酸盐、乙醇酸盐、马来酸盐、酒石酸盐、甲烷磺酸盐、 丙烷磺酸盐、萘-1-磺酸盐、萘-2-磺酸盐、扁桃酸盐、马尿酸盐、葡糖酸盐、 乳糖酸盐和类似盐。在某些特定实施例中,药学上可接受的酸加成盐包括 与矿物酸,例如盐酸和氢溴酸形成的那些酸加成盐,以及与有机酸,例如 富马酸和马来酸形成的那些酸加成盐。

[0379] 化合物特性

[0380] 本发明多价化合物的变异D-肽结构域可以界定适合尺寸的结合表面 积,以形成

高功能性亲和力(例如平衡解离常数(K_D))和特异性(例如 300nM或更小,例如100nM或更小、30nM或更小、10nM或更小、3nM 或更小、1nM或更小、300pM或更小或甚至更小)的蛋白质-蛋白质相互 作用。变异D-肽结构域可各自包括600与1800 Å^{2}之间,例如800与1600 Å^{2}之间、1000与1400 Å^{2}之间、1100与1300 Å^{2}之间或约1200 Å^{2}的表面积。

[0381] 在一些情况下,多价D-肽化合物以如下结合亲和力(K_D)特异性结合 目标蛋白,所述结合亲和力是单独的第一和第二D-肽结构域对目标蛋白的 各结合亲和力的10倍或更强,例如30倍或更强、100倍或更强、300倍或 更强、1000倍或更强,或甚至更强。肽化合物对目标蛋白的亲和力可通过 任何合宜的方法确定,例如使用SPR结合分析或ELISA结合分析(例如, 如本文所描述)。在某些情况下,多价D-肽化合物对目标蛋白的结合亲和 力(K_D)为3nM或更低,例如1nM或更低、300pM或更低、100pM或 更低,且单独的第一和第二D-肽结构域对目标蛋白的结合亲和力各自独立 地为100nM或更高,例如200nM或更高、300nM或更高、400nM或更 高、500nM或更高、或1μM或更高。可以优化多价D-肽化合物整体的有 效结合亲和力以提供所需生物效力和/或其它特性,例如活体内半衰期。通 过选择对个别D-肽结构域的目标结合位点具有特定个别亲和力的个别D- 肽结构域,可以按需要优化多价D-肽化合物的总体功能性亲和力。

[0382] 化合物的效力可使用任何合宜的分析评定,例如经由如本文实验章节 中所描述的测量IC50的ELISA分析。在一些情况下,本发明多价化合物 对目标蛋白具有活体外拮抗活性,比单独的第一和第二D-肽结构域各自的 效力强效至少10倍,例如强效至少30倍、至少100倍、至少300倍、至 少1000倍。

[0383] 在某些实施例中,本发明肽化合物以高亲和力特异性结合到VEGF-A 目标蛋白,例如如通过SPR结合分析或ELISA分析所测定。本发明化合物 可展现对VEGF-A的亲和力为1μM或更低,例如300nM或更低、100nM 或更低、30nM或更低、10nM或更低、5nM或更低、2nM或更低、1nM 或更低、600pM或更低、300pM或更低、或甚至更低。

[0384] 本发明D-肽化合物可展现对VEGF-A的特异性,例如如将化合物对 VEGF-A蛋白的亲和力与对参考蛋白(例如,白蛋白)的亲和力进行比较 所确定,其为5:1或更高、10:1或更高,例如30:1或更高、100:1或更高、 300:1或更高、1000:1或更高、或甚至更高。在一些情况下,特异性可为结 合亲和力差异系数为10^3或更高,例如10^4或更高、10^5或更高、10^6或更高、或甚至更高。在一些情况下,可针对任何所需特性,例如蛋白质折叠、蛋 白酶稳定性、热稳定性、与药物配制物的相容性等,对肽化合物进行优化。可使用任何合宜的方法来选择D-肽化合物,例如,结构-活性关系(SAR) 分析、亲和力成熟方法或噬菌体展示方法。

[0385] 还提供了具有高热稳定性的D-肽化合物。在一些情况下,具有高热稳 定性的化合物的熔融温度为50℃或更高,例如60℃或更高、70℃或更高、 80℃或更高、或甚至90℃或更高。还提供了具有高蛋白酶稳定性的D-肽化 合物。本发明D-肽化合物对蛋白酶具有抗性,且可具有长的血清和/或唾液 半衰期。还提供了具有长的活体内半衰期的D-肽化合物。如本文所用,“半 衰期”是指化合物的测量参数,如效力、活性和有效浓度降到其原始水平 的一半,例如其在时间零处的原始效力、活性或有效浓度的一半,所需的 时间。因此,一般随时间推移而测量多肽分子的参数,例如效力、活性或 有效浓度。出于本文的目的,半衰期可以在活体外或活体内测量。在一些 情况下,肽化合物的半衰期为1小时或更长,例如2小时

或更长、6小时或 更长、12小时或更长、1天或更长、2天或更长、7天或更长、或甚至更长。可通过任何合宜的方法测量人类血液中的稳定性，例如通过将化合物在人 类EDTA血液或血清中培育指定时间，淬灭混合物样品且针对化合物的量 和/或活性分析样品，例如通过HPLC-MS，通过活性分析，例如如本文所 描述。

[0386] 还提供了具有低免疫原性，例如非免疫原性的D-肽化合物。在某些实 施例中，与L-肽化合物相比，D-肽化合物具有低免疫原性。在某些实施例 中，在免疫原性分析，例如Dintzis等人，“一对对映异构蛋白的免疫原性 的比较(A Comparison of the Immunogenicity of a Pair of Enantiomeric Proteins)”，蛋白质:结构、功能和遗传学(Proteins:Structure,Function,and Genetics)16:306-308(1993)所描述的免疫原性分析中，与L-肽化合物相比， D-肽化合物的免疫原性为10％或更低、20％或更低、30％或更低、40％或更 低、50％或更低、70％或更低、或90％或更低。

[0387] 还提供了通过亲和力成熟针对与VEGF-A的结合亲和力和特异性进行 优化的D-肽化合物，例如基于与VEGF-A结合的亲本化合物的第二代D- 肽化合物。在一些实施例中，本发明化合物的亲和力成熟可包括将变异氨 基酸位置的一部分保持为固定位置，同时改变其余的变异氨基酸位置以选 择各位置处的最优氨基酸。可选择亲本D-肽化合物作为亲和力成熟化合物 的支架。在一些情况下，制备许多亲和力成熟化合物，其包括在亲本的变 异氨基酸位置的有限子集处的突变，而其余的变异位置保持为固定位置。可将突变位置贯穿支架序列铺设以产生一系列化合物，从而表示每一变异 位置处的突变，且不同范围的氨基酸(例如，所有20种天然存在的氨基酸) 在每一位置处被取代。包括一个或多个氨基酸的缺失或插入的突变也可以 包括在亲和力成熟化合物的变异位置处。亲和力成熟化合物可使用任何合 宜的方法，例如噬菌体展示库筛选来制备和筛选，以鉴别具有改进特性的 第二代化合物，例如提高的对目标分子的结合亲和力、蛋白质折叠、蛋白 酶稳定性、热稳定性、与药物配制物的相容性等。

[0388] 在一些实施例中，本发明化合物的亲和力成熟可包括将亲本化合物的 可变区中大部分或所有变异氨基酸位置保持为固定位置，且在与这些可变 区相邻的位置处引入连续突变。此类突变可在亲本化合物中先前被视为原 始GA支架结构域中的固定位置的位置处引入。此类突变可用于针对任何 所需特性使化合物变异体优化，所述所需特性例如蛋白质折叠、蛋白酶稳 定性、热稳定性、与药物配制物的相容性等。

[0389] 本公开的方面包括化合物(例如，如本文所描述)、其盐(例如，药学 上可接受的盐)和/或其溶剂合物、水合物和/或前药形式。应了解，盐、溶 剂合物、水合物和前药的所有排列意图由本公开涵盖。

[0390] 在一些实施例中，本发明化合物或其前药形式以药学上可接受的盐形 式提供。含有胺或含氮杂芳基的化合物本质上可为碱性的，因此可与任何 数量的无机和有机酸反应，从而形成药学上可接受的酸加成盐。通常用于 形成这类盐的酸包括无机酸，例如盐酸、氢溴酸、氢碘酸、硫酸和磷酸； 以及有机酸，例如对甲苯磺酸、甲烷磺酸、草酸、对溴苯基磺酸、碳酸、 丁二酸、柠檬酸、苯甲酸和乙酸；以及相关的无机和有机酸。此类药学上 可接受的盐因此包括硫酸盐、焦硫酸盐、硫酸氢盐、亚硫酸盐、亚硫酸氢 盐、磷酸盐、单氢磷酸盐、二氢磷酸盐、偏磷酸盐、焦磷酸盐、氯化物、 溴化物、碘化物、乙酸盐、丙酸盐、癸酸盐、辛酸盐、丙烯酸盐、甲酸盐、 异丁酸盐、癸酸盐、庚酸盐、丙炔酸盐、草酸盐、丙二酸盐、丁二酸盐、 辛二

酸酯、癸二酸盐、富马酸盐、马来酸盐、丁炔-1,4-二酸盐、己炔-1,6-二 酸盐、苯甲酸盐、氯苯甲酸盐、甲基苯甲酸盐、二硝基苯甲酸盐、羟基苯 甲酸盐、甲氧基苯甲酸盐、邻苯二甲酸盐、对苯二甲酸盐、磺酸盐、二甲 苯磺酸盐、苯乙酸酯、苯丙酸盐、苯丁酸盐、柠檬酸盐、乳酸盐、β-羟基 丁酸盐、乙醇酸盐、马来酸盐、酒石酸盐、甲烷磺酸盐、丙烷磺酸盐、萘-1-磺酸盐、萘-2-磺酸盐、扁桃酸盐、马尿酸盐、葡糖酸盐、乳糖酸盐和类 似盐。在某些特定实施例中,药学上可接受的酸加成盐包括与矿物酸,例 如盐酸和氢溴酸形成的那些酸加成盐,以及与有机酸,例如富马酸和马来 酸形成的那些酸加成盐。

[0391] 多聚化合物

[0392] 任何合宜的D-肽化合物(例如,如本文所描述)可多聚化,以提供D- 肽化合物的多聚体。在某些实施例中,多聚体包括两种或更多种D-肽化合 物,例如2种(例如,二聚体)、3种(例如,三聚体)或4种或更多种化 合物(例如,四聚体或树枝状聚合物等)。在一些情况下,多聚体由以下式 描述:

[0393] $Y-(GA)_n$

[0394] 其中:Y为多价连接基团;n为大于一的整数;且GA为包含GA结构 域基序(例如,如本文所描述)的D-肽化合物。在某些情况下,n为2。 在某些情况下,n为3。

[0395] 在某些情况下,多聚体为以下式中的一者的二聚体:

[0396] 

[0397] 其中各GA独立地为D-肽化合物(例如,如本文所描述);且Y为连 接到化合物的N末端(N-GA)或C末端(GA-C)的连接子。在某些情况 下,二聚体为各自特异性结合VEGF-A的两个相同GA结构域基序的同二 聚体。在某些情况下,二聚体为异二聚体。异二聚体可为各自特异性结合 VEGF-A的两个相异GA结构域基序的二聚体,或为本发明D-肽化合物与 第二D-肽结合结构域的二聚体。

[0398] 任何合宜的连接基团均可用于本发明多聚体中。术语“连接子”、“连 接”和“连接基团”可互换使用,且是指共价连接两种或更多种化合物的 连接部分。在一些情况下,连接子为二价的。在某些情况下,连接子为分 支或三价连接基团。在一些情况下,连接子的直链或分支链主链的长度为 200个原子或更少(例如100个原子或更少、80个原子或更少、60个原子 或更少、50个原子或更少、40个原子或更少、30个原子或更少、或甚至 20个原子或更少)。连接部分可为连接两个基团的共价键或长度在1与200 个原子之间,例如长度为约1、2、3、4、5、6、8、10、12、14、16、18、 20、30、40、50、100、150或200个碳原子的直链或分支链,其中连接子 可为直链、分支链、环状或单个原子。在某些情况下,连接子主链的一个、 两个、三个、四个或五个或更多个碳原子可视情况被硫、氮或氧杂原子取 代。在某些情况下,当连接子包括PEG基团时,连接子主链的所述区段每 隔两个原子被氧取代。主链原子之间的键可为饱和或不饱和的,通常连接 子主链中将存在不超过一个、两个或三个不饱和键。连接子可包括一个或 多个取代基,例如烷基、芳基或烯基。连接子可包括但不限于寡聚(乙二醇)、醚、硫醚、二硫化物、酰胺、碳酸酯、氨基甲酸酯、叔胺、烷基,烷基可 为直链或分支链的,例如甲基、乙基、正丙基、1-甲基乙基(异丙基)、正 丁基、正戊基、1,1-二甲基乙基(叔丁基)等等。连接子主链可包括环状基 团,例如芳基、杂环或环烷基,其中主链中包括环状基

团的2个或更多个 原子,例如2、3或4个原子。连接子可为可裂解或不可裂解的。连接子可为肽,例如残基的连接序列。

[0399] Y可包括任何合宜的基团或连接子单元,包括但不限于氨基酸残基、PEG、经修饰PEG(例如,-NH$(CH_2)_m$O[$(CH_2)_2$O]$_n$$(CH_2)_p$CO-连接基团,其 中m为2-6,p为1-6且n为1-50,例如1-12或1-6)、C2-C12烷基连接子、 -CO-CH2CH2CO-单元和其组合(例如,经由例如酰胺键、磺酰胺键、氨基 甲酸酯、醚键、酯键或-NH-的官能团连接)。在一些情况下,Y为肽。

[0400] 在一些实施例中,Y为包含-(L1)a-(L2)b-(L3)c-(L4)d-(L5)e-的连接子, 其中L1、L2、L3、L4和L5各自为连接子单元,且a、b、c、d和e各自 独立地为0或1,其中a、b、c、d和e的总和为1至5。如本文所描述的 多聚化合物中所示,其它连接子也是可能的。

[0401] 在一些情况下,Y包含经修饰的PEG连接子,其使用任何合宜的连接 化学连接到D-肽化合物。PEG为聚乙二醇或经修饰的聚乙二醇。经修饰的 PEG意指任何合宜长度的聚乙二醇,其中末端中的一个或两个经修饰以包 括适合于缀合到例如另一连接基团部分或缀合到肽化合物的末端或侧链的 化学选择性官能团。表9和实例章节描述了经由化合物的N末端或C末端 连接的化合物1.1.1(c21a)的数种示例性同二聚体。可在GA结构域基序的 N和/或C末端处修饰D-肽化合物,以包括一个或多个额外氨基酸残基,其 可提供特定的键或连接化学以连接到Y基团,例如半胱氨酸或赖氨酸。

[0402] 可用于经由连接基团连接本发明肽化合物的化学选择性反应性官能团 包括但不限于:氨基(例如,N末端氨基或赖氨酸侧链基团)、叠氮基、炔 基、膦基、硫醇(例如,半胱氨酸残基)、C末端硫酯、芳基叠氮化物、马 来酰亚胺、碳二亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)-酯、酰肼、PFP-酯、羟 甲基膦、补骨脂素、亚氨酸酯、吡啶基二硫化物、异氰酸酯、氨氧基-、醛、酮、氯乙酰基、溴乙酰基和乙烯基砜。

[0403] 在本发明的多聚体中可利用任何合宜的多价连接子。多价意味着连接 子包括两个或更多个适合连接到例如如本文所描述的本发明化合物的末端 基团。在一些情况下,多价连接子为二价或三价的。在一些情况下,多价 连接子Y为树枝状聚合物支架。任何合宜的树枝状聚合物支架都可适用于 本发明的多聚体。树枝状聚合物支架为分支分子,其包括至少一个分支点 以及两个或更多个适合于经由任选连接子连接到GA结构域基序的N末端 或C末端的末端。可选择树枝状聚合物支架以提供两个或更多个GA结构 域基序的所需空间布置。在一些情况下,选择两个或更多个GA结构域基 序的空间布置以提供针对目标蛋白的所需结合亲和力和亲合力。图17显示 了化合物1.1.1(c21a)的X射线晶体结构,其包括包含两个VEGF-A分子和 两种化合物的复合物。在所描绘结构的视图中,N末端(约60埃)与C末 端(约70埃)之间的距离由虚线标记。在一些情况下,二聚体包括N-N连 接的Y基团,其长度为约60埃或更长。在一些情况下,二聚体包括C-C 连接的Y基团,其长度为约70埃或更长。

[0404] 在一些情况下,D-肽化合物各自独立地包括特异性结合部分(例如, 生物素或肽标签),其中D-肽化合物可经由特异性结合特定结合部分的多 价结合部分(例如,抗生蛋白链菌素、抗生物素蛋白或抗体)彼此结合。 在一些实施例中,例如如上文所描述的两种或更多种D-肽化合物各自包括 特异性结合部分,其为生物素部分。在某些实施例中,特异性结合部分为 经由任选连接子连接到化合物的N末端或C末端的末端生物素部分。在某 些情况下,末端生物素部分为生物素-$(Gly)_n$-,其中n为1至6,或生物素-Ahx- (Ahx=6-氨基己酸残基)。

[0405] 经修饰化合物

[0406] 任何合宜的所关注分子或部分都可以连接到本发明D-肽化合物。所关 注分子可以是肽或非肽的、天然存在或合成的。适合结合本发明化合物使 用的所关注分子包括但不限于额外蛋白质结构域;多肽或氨基酸残基;肽 标签;特异性结合部分;聚合部分,例如聚乙二醇(PEG)、碳水化合物、 葡聚糖或聚丙烯酸酯;连接子;半衰期延长部分;药物;毒素;可检测标 记;以及固体支持物。在一些情况下,所关注分子可赋予所得肽化合物增 强和/或经修改的特性和功能,包括但不限于提高的水溶性、易于化学合成、 成本、生物缀合位点、稳定性、等电点(pI)、聚集、减少的非特异性结合 和/或与例如如本文所描述的第二目标蛋白的特异性结合。

[0407] 在本文所描述的VEGF-A结合GA结构域基序序列中的任一个的一些 实施例中,基序可延伸以在序列的N末端和/或C末端处包括一个或多个额 外残基,例如两个或更多个、三个或更多个、四个或更多个、五个或更多 个、6个或更多个、或甚至更多个额外残基。即使此类额外残基不提供 VEGF-A结合相互作用,其也可视为GA结构域基序的一部分。可在VEGF-A 结合GA结构域基序的N末端和/或C末端处包括任何合宜的残基,以提供 所需特性或基团,例如经由水溶性基团提高溶解度、用于二聚化或多聚化 的键、用于连接到标记或特异性结合部分的键。

[0408] 在一些情况下,本发明的经修饰化合物由以下式描述:

[0409] X-L-Z

[0410] 其中X为VEGF-A结合GA结构域基序(例如,如本文所描述);L为 任选的连接基团;且Z为所关注分子,其中L在任何合宜的位置(例如, N末端、C末端或经由不涉及与目标结合的表面残基的侧链)连接到X。

[0411] D-肽化合物可包括一个或多个所关注分子,例如N末端部分和/或C末 端部分。在一些情况下,所关注分子经由N末端残基的α-氨基共价连接, 或共价连接到C末端残基的α-羧酸基。在其它情况下,所关注分子经由残 基的侧链基团(例如,经由c、k、d或e残基)连接到基序。

[0412] 所关注分子可以包括多肽或蛋白质结构域。所关注多肽和蛋白质结构 域包括但不限于:gD标签、c-Myc表位、FLAG标签、His标签、荧光蛋白 (例如,GFP)、β-半乳糖苷酶蛋白、GST、白蛋白、免疫球蛋白、Fc结构域 或类似抗体样片段、亮氨酸拉链基序、卷曲螺旋结构域、疏水区、亲水区、 包含在两个或更多个多聚化结构域之间形成分子间二硫键的游离硫醇基的 多肽、“腔内突起(protuberance-into-cavity)”结构域、β-乳球蛋白或其片段。

[0413] 所关注分子可以包括半衰期延长部分。术语“半衰期延长部分”是指 与本发明化合物共价连接或缀合的药学上可接受的部分、结构域或“媒剂”, 与本发明化合物的非缀合形式相比,其阻止或减少本发明化合物的活体内 蛋白水解降解或其它降低活性的化学修饰、延长半衰期或提高其它药物动 力学特性(例如,吸收率)、降低毒性、提高溶解度、提高本发明化合物相 对于所关注目标的生物活性和/或目标选择性、提高可制造性和/或降低本发 明化合物的免疫原性。

[0414] 在某些实施例中,半衰期延长部分为结合血清蛋白,例如免疫球蛋白 (例如,IgG)或血清白蛋白(例如,人类血清白蛋白(HSA))的多肽。聚 乙二醇是适用的半衰期延长部分的实例。示例性的半衰期延长部分包括聚 亚烷基二醇部分(例如,PEG)、血清白蛋白或其片

段、转铁蛋白受体或其 转铁蛋白结合部分，和包含延长活体内半衰期的多肽的结合位点的部分、 乙二醇共聚物、丙二醇共聚物、羧甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3- 二氧杂环戊烷、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯/马来酸酐共聚物、聚氨基酸(例如， 聚赖氨酸)、葡聚糖N-乙烯基吡咯烷酮、聚N-乙烯基吡咯烷酮、丙二醇均 聚物、环氧丙烷聚合物、环氧乙烷聚合物、聚氧乙烯多元醇、聚乙烯醇、 直链或分支链糖基化链、聚唾液酸、聚缩醛、长链脂肪酸、长链疏水性脂 肪族基、免疫球蛋白Fc结构域(参见例如美国专利第6,660,843号)、白蛋 白(例如，人类血清白蛋白；参见例如美国专利第6,926,898号和US 2005/0054051；美国专利第6,887,470号)、运甲状腺素蛋白(TTR；参见例 如US 2003/0195154；2003/0191056)或甲状腺素结合球蛋白(TBG)。

[0415] 还可经由本发明化合物的控制释放或持续释放剂型实现延长的半衰 期，例如如Gilbert S.Banker和Christopher T.Rhodes，持续释放和控制释放 药物递送系统(Sustained and controlled release drug delivery system)，现代 药剂学(Modern Pharmaceutics)，第四版，修订和扩增，Marcel Dekker，纽 约，2002，11所描述。这可经由多种配制物，包括脂质体和药物-聚合物缀合 物来实现。

[0416] 在某些实施例中，半衰期延长部分是脂肪酸。任何合宜的脂肪酸都可 用于本发明的经修饰化合物中。参见例如Chae等人，“用于抗2型糖尿病 治疗剂的脂肪酸缀合的肠促胰岛素类似物-4类似物(The fatty acid conjugated exendin-4analogs for type 2antidiabetic therapeutics)”，控制释放 杂志(J.Control Release.)2010年5月21日；144(1):10-6。

[0417] 在某些实施例中，化合物经修饰以包括特异性结合部分。特异性结合 部分为能够特异性结合到与其互补的第二部分的部分。在一些情况下，特 异性结合部分以至少10^{-7}M的亲和力(例如，如由100nM或更低，例如 30nM或更低、10nM或更低、3nM或更低、1nM或更低、300pM或更 低、或100pM或甚至更低的K_D所测量)结合到互补的第二部分。特异性 结合部分的互补结合部分对包括但不限于配位体和受体、抗体和抗原、互 补多核苷酸、互补蛋白同二聚体或异二聚体、适体和小分子、多聚组氨酸 标签和镍，以及化学选择性反应性基团(例如，硫醇)和亲电子基团(例 如，反应性硫醇基可与其进行迈克尔加成(Michael addition))。特异性结 合对可包括原始特异性结合成员的类似物、衍生物和片段。举例来说，针 对蛋白质抗原的抗体也可识别肽片段、化学合成经标记蛋白质、衍生化蛋 白质等，只要存在表位即可。可用作特异性结合部分的所关注蛋白质结构 域包括但不限于Fc结构域或类似抗体样片段、亮氨酸拉链基序、卷曲螺旋 结构域、疏水区、亲水区、包含在两个或更多个多聚化结构域之间形成分 子间二硫键的游离硫醇的多肽或“腔内突起”结构域(参见例如WO 94/10308；美国专利第5,731,168号，Lovejoy等人(1993)，科学(Science) 259:1288-1293；Harbury等人(1993)，科学262:1401-05；Harbury等人 (1994)，自然(Nature) 371:80-83；Hakansson等人(1999)，结构(Structure) 7:255-64。

[0418] 在某些实施例中，所关注分子为特异性结合目标蛋白的连接的特异性 结合部分。连接的特异性结合部分可为抗体、抗体片段、适体或第二D-肽 结合结构域。连接的特异性结合部分可特异性结合任何合宜的目标蛋白， 例如在本发明的治疗方法中期望与VEGF-A结合靶向的目标蛋白。所关注 的目标蛋白包括但不限于PDGF(例如，PDGF-B)、VEGF-B、VEGF-C、 VEGF-D、EGF、EGFR、Her2、PD-1、PD-L1、OX-40和LAG3。在某些情 况下，连接的特异

性结合部分为靶向PDGF-B的第二D-肽结合结构域。

[0419] 在某些实施例中,特异性结合部分为亲和标签,例如生物素部分。示 例性的生物素部分包括生物素、脱硫生物素、氧生物素、2'-亚氨基生物素、二氨基生物素、生物素亚砜、生胞素等。在一些情况下,生物素部分能够 以高亲和力特异性结合到含有固定的抗生物素蛋白、中性抗生物素蛋白或 抗生蛋白链菌素的色谱支持物。生物素部分可以至少10^{-8}M的亲和力结合 到抗生蛋白链菌素。在一些情况下,单体抗生物素蛋白支持物可用于以中等亲和力特异性结合含生物素的化合物,从而允许结合的化合物稍后在未 经生物素标记的多肽已被洗涤掉之后从支持物竞争性洗脱(例如,用2mM 生物素溶液)。在某些情况下,生物素部分能够与溶液中的抗生物素蛋白、中性抗生物素蛋白或抗生蛋白链菌素结合以形成多聚化合物,例如D-肽化 合物与抗生物素蛋白、中性抗生物素蛋白或抗生蛋白链菌素的二聚或四聚 复合物。生物素部分还可包括连接子,例如-LC-生物素、-LC-LC-生物素、-SLC-生物素或-PEG_n-生物素,其中n为3-12(可从Pierce Biotechnology购 得)。

[0420] 在某些实施例中,化合物经修饰以包括可检测标记。可检测标记的实 例包括允许直接和间接测量本发明肽化合物的存在的标记。允许直接测量 化合物的标记的实例包括放射性标记、荧光团、染料、珠粒、纳米粒子(例 如,量子点)、化学发光剂、胶态粒子、顺磁性标记等。放射性标记可包括 放射性同位素,例如^{35}S、^{14}C、^{125}I、^{3}H、^{64}Cu和^{131}I。本发明化合物可使用 任何合宜的技术,例如免疫学最新方案(Current Protocols in Immunology), 第1卷和第2卷,Coligen等人编,怀利-跨学科(Wiley-Interscience),纽约 州纽约出版(1991)中所描述的技术用放射性同位素标记,且可使用闪烁计 数或正电子发射来测量放射性。允许间接测量经修饰化合物的存在的可检 测标记的实例包括酶,其中底物可提供有色或荧光产物。举例来说,化合 物可包括能够在添加适合底物之后提供可检测产物信号的共价结合酶。代 替将酶共价结合到化合物,化合物可包括特异性结合对的第一成员,其与缀合到酶的特异性结合对的第二成员特异性结合,例如化合物可共价结合 到生物素和与抗生蛋白链菌素缀合的酶。适用于缀合物的酶的实例包括辣 根过氧化酶、碱性磷酸酶、苹果酸脱氢酶等。在不可商购的情况下,这类 酶缀合物可以通过任何合宜的技术容易地产生。

[0421] 在某些实施例中,可检测标记为荧光团。术语"荧光团"是指在用具 有所选波长的光激发时发射不同波长的光的分子,所述分子可以在激发后 立即或延迟地发射光。荧光团包括但不限于荧光素染料,例如5-羧基荧光 素(5-FAM)、6-羧基荧光素(6-FAM)、2',4',1,4,-四氯荧光素(TET)、2',4',5',7',1,4-六氯荧光素(HEX)和2',7'-二甲氧基-4',5'-二氯-6-羧基荧光素 (JOE);花青染料,例如Cy3、CY5、Cy5.5、QUASARTM染料等;丹磺酰 基(dansyl)衍生物;若丹明(rhodamine)染料,例如6-羧基四甲基若丹 明(TAMRA)、CAL FLUOR染料、四丙-6-羧基若丹明(ROX)。BODIPY 荧光团、ALEXA染料、俄勒冈绿(Oregon Green)、芘、菲、苯并芘、方酸 染料、香豆素染料、发光过渡金属和镧系元素络合物等。术语荧光团包括 这类染料的准分子(excimer)和激态络合物(exciplex)。

[0422] 在一些实施例中,化合物包括可检测标记,例如放射性标记。在某些 实施例中,放射性标记适合用于PET、SPECT和/或MR成像。在某些实施 例中,放射性标记为PET成像标记。在某些情况下,化合物经^{18}F、^{64}Cu、^{68}Ga、^{111}In、^{99}mTc或^{86}Y放射性标记。

[0423] 可检测标记可以在任何合宜的位置处且经由任何合宜的化学方法连接 到肽化合

物。所关注的方法和材料包括但不限于以下描述的那些:USP 8,545,809;Meares等人,1984,化学研究评述(Acc Chem Res)17:202-209; Scheinberg等人,1982,科学215:1511-13;Miller等人,2008,应用化学国际 版(Angew Chem Int Ed)47:8998-9033;Shirrmacher等人,2007,生物缀 合化学(Bioconj Chem)18:2085-89;Hohne等人,2008,生物缀合化学19:1871-79;Ting等人,2008,氟化学(Fluorine Chem)129:349-58,Poethko 等人(核医学杂志(J.Nucl.Med.)2004;45:892-902)的标记方法,其中 首先合成并纯化4-[18F]氟苯甲醛(Wilson等人,标记化合物和放射性药物 杂志(J.Labeled Compounds and Radiopharm.)1990;XXVIII:1189-1199), 随后与肽缀合,用[18F]氟苯甲酸琥珀酰亚胺酯(SFB)标记(例如 Vaidyanathan等人,1992,国际放射应用与仪器杂志(Int.J.Rad.Appl.Instrum.)B 19:275);其它酰基化合物(Tada等人,1989,标记化合物与放 射性药物杂志XXVII:1317;Wester等人,1996,核医学与生物学(Nucl.Med. Biol.)23:365;Guhlke等人,1994,《核医学与生物学》21:819);或点击 化学加成物(Li等人,2007,生物缀合化学18:1987)。

[0424] 任何合宜的合成方法或生物缀合方法均可用于制备本发明的经修饰D- 肽化合物。在某些情况下,可检测标记经由任选的连接子连接到化合物。在某些实施例中,可检测标记连接到化合物的N末端。在某些实施例中, 可检测标记连接到化合物的C末端。在某些实施例中,可检测标记例如经 由侧链部分连接到化合物的非末端残基。在某些实施例中,可检测标记经 由任选的连接子连接到化合物的N末端肽延伸部分。在一些情况下,N末 端肽延伸部分经修饰以包括能够与含放射性标记的部分的相容官能团反应 的反应性官能团。可利用任何合宜的反应性官能团、化学物质和含放射性 标记的部分将可检测标记连接到化合物,包括但不限于点击化学、叠氮化 物、炔烃、环辛炔、无铜点击化学、硝酮、螯合基(例如,选自DOTA、 TETA、NOTA、NODA、(叔丁基)$_2$NODA、NETA、C-NETA、L-NETA、S-NETA、 NODA-MPAA和NODA-MPAEM)、炔丙基-甘氨酸残基等。

[0425] 在某些情况下,所关注分子为第二活性剂,例如可在本发明治疗方法 中用于与靶向VEGF-A结合使用的活性剂或药物。在某些情况下,所关注 分子为小分子、化学治疗剂、抗体、抗体片段、适体或L-蛋白。在一些实 施例中,化合物经修饰以包括适用作药物的部分(例如,蛋白质、核酸、 有机小分子等)。示例性的药物蛋白包括例如细胞因子、抗体、趋化因子、 生长因子、白介素、细胞表面蛋白、细胞外结构域、细胞表面受体、细胞 毒素等。示例性的小分子药物包括小分子毒素或治疗剂。

[0426] 可将任何合宜的治疗剂或诊断剂(例如,如本文所描述)缀合到D-肽 化合物。包括但不限于抗癌剂、抗增殖剂、细胞毒性剂和化学治疗剂的多 种治疗剂在以下标题为[组合疗法]的章节中描述,其中任一者均可适用于本 发明的经修饰化合物。所关注的示例性化学治疗剂包括例如吉西他滨 (Gemcitabine)、多西他赛(Docetaxel)、博莱霉素(Bleomycin)、埃罗替尼 (Erlotinib)、吉非替尼(Gefitinib)、拉帕替尼(Lapatinib)、伊马替尼 (Imatinib)、达沙替尼(Dasatinib)、尼罗替尼(Nilotinib)、伯舒替尼 (Bosutinib)、克唑替尼(Crizotinib)、色瑞替尼(Ceritinib)、曲美替尼 (Trametinib)、贝伐单抗(Bevacizumab)、舒尼替尼(Sunitinib)、索拉非尼 (Sorafenib)、曲妥珠单抗(Trastuzumab)、曲妥珠单抗-恩他新偶联物 (Ado-trastuzumab emtansine)、利妥昔单抗(Rituximab)、伊匹木单抗 (Ipilimumab)、雷帕霉素(Rapamycin)、坦西莫司

(Temsirolimus)、依维莫 司(Everolimus)、甲氨蝶呤(Methotrexate)、阿霉素(Doxorubicin)、白蛋 白结合型紫杉醇(Abraxane)、氟非林(Folfirinox)、顺铂(Cisplatin)、卡 铂(Carboplatin)、5-氟尿嘧啶、替苏莫(Teysumo)、太平洋紫杉醇(Paclitaxel)、 泼尼松(Prednisone)、左甲状腺素(Levothyroxine)、培美曲塞(Pemetrexed)、 纳维托克(navitoclax)、ABT-199。用于ADC的任何示例性细胞毒性剂均 可适用于本发明的经修饰D-肽化合物。所关注的细胞毒性剂包括但不限于 奥瑞他汀(auristatin)(例如,MMAE、MMAF)、美登素(maytansine)、 海兔毒素(dolastatin)、卡奇霉素(calicheamicin)、倍癌霉素(duocarmycin)、 吡咯并苯并二氮呯(pyrrolobenzodiazepine;PBD)、新坦霉素(centanamycin) (ML-970;吲哚甲酰胺)、阿霉素、α-鹅膏菌素(α-Amanitin)以及其衍生 物和类似物。在某些实施例中,化合物可包括细胞穿透肽(例如,tat)。细 胞穿透肽可以促进分子的细胞摄取。可以使用任何合宜的标签多肽和其相 应抗体。实例包括多聚组氨酸(poly-his)或多聚组氨酸-甘氨酸(poly-his-gly)标签;流感HA标签多肽和其抗体12CA5[Field等人,分子与细胞生物学 (Mol.Cell.Biol.)8:2159-2165(1988)];c-myc标签和针对其的8F9、3C7、 6E10、G4、B7和9E10抗体[Evan等人,分子与细胞生物学5:3610-3616 (1985)];以及单纯疱疹病毒糖蛋白D(gD)标签和其抗体[Paborsky等人,蛋 白质工程(Protein Engineering)3(6):547-553(1990)]。其它标签多肽包括 Flag-肽[Hopp等人,生物技术(BioTechnology)6:1204-1210(1988)];KT3 表位肽[Martin等人,科学255:192-194(1992)];微管蛋白表位肽[Skinner 等人,生物化学杂志266:15163-15166(1991)];以及T7基因10蛋白肽标签 [Lutz-Freyermuth等人,美国国家科学院院刊87:6393-6397(1990)]。

[0427] 在某些实施例中,化合物可包括细胞穿透肽(例如,tat)。细胞穿透肽 可以促进分子的细胞摄取。可以使用任何合宜的标签多肽和其相应抗体。 实例包括多聚组氨酸(poly-his)或多聚组氨酸-甘氨酸(poly-his-gly)标签; 流感HA标签多肽和其抗体12CA5[Field等人,分子与细胞生物学 8:2159-2165(1988)];c-myc标签和针对其的8F9、3C7、6E10、G4、B7和 9E10抗体[Evan等人,分子与细胞生物学5:3610-3616(1985)];以及单纯疱 疹病毒糖蛋白D(gD)标签和其抗体[Paborsky等人,蛋白质工程 3(6):547-553(1990)]。其它标签多肽包括Flag-肽[Hopp等人,生物技术 6:1204-1210(1988)];KT3表位肽[Martin等人,科学255:192-194(1992)]; 微管蛋白表位肽[Skinner等人,生物化学杂志266:15163-15166(1991)];以 及T7基因10蛋白肽标签[Lutz-Freyermuth等人,美国国家科学院院刊 87:6393-6397(1990)]。

[0428] 所关注的分子可经由任何合宜的方法连接到本发明的经修饰化合物。在一些情况下,所关注分子经由共价缀合连接到末端氨基酸残基,例如在 氨基末端处或在羧酸末端处。所关注分子可经由单键或适合连接子,例如 PEG连接子、包括一个或多个氨基酸的肽连接子或饱和烃连接子,连接到 肽GA结构域基序。多种连接子(例如,如本文所描述)用于本发明的经 修饰化合物。可使用任何合宜的试剂和方法来在本发明的GA结构域基序 中包括所关注分子,例如如G.T.Hermanson,“生物缀合技术(Bioconjugate Techniques)”学术出版社(Academic Press),第2版,2008中所描述的缀 合方法、固相肽合成方法或融合蛋白表达方法。可用于经由任选的连接子 共价结合结构域而产生经修饰化合物的官能团包括:羟基、硫醇基、氨基 等。所关注分子和/或GA结构域基序上的某些部分可使用合宜的阻隔基保

护,参见例如Green和Wuts,有机合成中的保护基(Protective Groups in Organic Synthesis)(约翰威立(John Wiley&Sons))第3版(1999)。可选 择特定所关注分子和与GA结构域基序的连接位点,从而基本上不会不利 地干扰例如针对目标VEGF-A蛋白的所需结合活性。

[0429] 所关注分子可为肽。应理解,所关注分子可进一步包括一个或多个非 肽基团,包括但不限于生物素部分和/或连接子。任何合宜的蛋白质结构域 均可适用于本发明的经修饰肽化合物中并且用作其中的所关注分子。所关 注的蛋白质结构域包括但不限于任何合宜的血清蛋白、血清白蛋白(例如, 人类血清白蛋白;参见例如美国专利第6,926,898号和US 2005/0054051; 美国专利第6,887,470号)、转铁蛋白受体或其转铁蛋白结合部分、免疫球 蛋白(例如,IgG)、免疫球蛋白Fc结构域(参见例如美国专利第6,660,843 号)、运甲状腺素蛋白(TTR;参见例如US 2003/0195154;2003/0191056)、甲状腺素结合球蛋白(TBG)或其片段。

[0430] 多聚化基团为能够例如通过介导两种或更多种化合物之间的结合(例 如,直接或经由多价结合部分间接),或通过经由共价键连接两种或更多种 化合物而形成多聚体(例如,二聚体、三聚体或树枝状聚合物)的任何合 宜的基团。在一些情况下,多聚化基团Z为与第二D-肽化合物上的相容性 官能团缀合的化学选择性反应性官能团。在其它情况下,多聚化基团为特 异性结合到多价结合部分(例如,抗生蛋白链菌素或抗体)的特异性结合 部分(例如,生物素或肽标签)。在一些情况下,化合物包括多聚化基团且 为尚未经多聚化的单体。

[0431] 用于包括于本发明的肽化合物中的化学选择性反应性官能团包括但不 限于:叠氮基、炔基、膦基、半胱氨酸残基、C末端硫酯、芳基叠氮化物、 马来酰亚胺、碳二亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)-酯、酰肼、PFP-酯、 羟甲基膦、补骨脂素、亚氨酸酯、吡啶基二硫化物、异氰酸酯、氨氧基-、 醛、酮、氯乙酰基、溴乙酰基和乙烯基砜。

[0432] 多核苷酸

[0433] 还提供了编码对应于如本文所描述的本发明肽化合物的序列的多核苷 酸。多核苷酸可编码与D-VEGF-A目标蛋白特异性结合的L-肽化合物。

[0434] 在一些实施例中,多核苷酸编码包括30与80个残基之间、40与70 个残基之间、45与60个残基之间、45与60个残基之间、或45与55个残 基之间的肽化合物。在某些情况下,多核苷酸编码35与55个残基,例如 40与55个残基之间或45与55个残基之间的肽化合物序列。在某些实施例 中,多核苷酸编码45、46、47、48、49、50、51、52或53个残基的肽化 合物序列。

[0435] 在某些实施例中,多核苷酸为包括编码可在蛋白质表达系统中表达的 L-肽化合物的核酸序列的可复制表达载体。在某些实施例中,多核苷酸为 可复制的表达载体,其包括编码基因融合体的核酸序列,其中所述基因融 合体编码包括融合到病毒外壳蛋白的全部或一部分的L-肽化合物的融合蛋 白。

[0436] 在某些实施例中,本发明多核苷酸能够在基于细胞或无细胞展示系统 中表达且展示。可使用任何合宜的展示方法来展示由本发明多核苷酸编码 的L-肽化合物,例如基于细胞的展示技术和无细胞展示技术。在某些实施 例中,基于细胞的展示技术包括噬菌体展示、细菌展示、酵母展示和哺乳 动物细胞展示。在某些实施例中,无细胞展示技术包括mRNA展示和核糖 体展示。

[0437] 方法

[0438] 本文所描述的化合物可以用于多种方法中。一种此类方法包括使本发 明化合物与VEGF-A目标蛋白在适合于VEGF-A的结合的条件下接触以产 生复合物。在一些实施例中，所述方法包括向受试者施用D-肽化合物，其 中所述化合物与受试者中的VEGF-A结合。

[0439] 本发明化合物可将其VEGF-A目标的至少一种活性抑制在10％至100％ 范围内，例如抑制10％或更高、20％或更高、30％或更高、40％或更高、50％ 或更高、60％或更高、70％或更高、80％或更高、或90％或更高。在某些分 析中，本发明化合物可以1×10^{-5}M或更低(例如，1×10^{-6}M或更低、1×10^{-7} M或更低、1×10^{-8}M或更低、1×10^{-9}M或更低、1×10^{-10}M或更低、或1×10^{-11} M或更低)的IC_{50}抑制其VEGF-A目标。在某些分析中，本发明化合物可 以1×10^{-6}M或更低(例如，500nM或更低、200nM或更低、100nM或更 低、30nM或更低、10nM或更低、3nM或更低、或1nM或更低)的IC_{20}抑制其VEGF-A目标。在某些分析中，本发明化合物可以1×10^{-6}M或更低 (例如，500nM或更低、200nM或更低、100nM或更低、30nM或更低、 10nM或更低、3nM或更低、或1nM或更低)的IC_{10}抑制其VEGF-A目 标。在使用小鼠的分析中，本发明化合物可具有小于1μg/小鼠(例如，1ng/ 小鼠至约1μg/小鼠)的ED_{50}。

[0440] 在一些实施例中，本发明方法为活体外方法，其包括使样品与以高亲 和力特异性结合到目标分子的本发明化合物接触。在某些实施例中，样品 疑似含有目标分子，且本发明方法进一步包含评估化合物是否特异性结合 到目标分子。在某些实施例中，目标分子为天然存在的L-蛋白，且化合物 为D-肽。在某些实施例中，本发明化合物为包括标记，例如荧光标记的经 修饰化合物，且本发明方法进一步包括例如使用光学检测来检测样品中存 在的标记。在某些实施例中，用支持物修饰化合物，使得可去除不结合到 化合物的任何样品(例如，通过洗涤)。然后，可使用任何合宜的手段，例 如使用经标记目标特异性探针的结合或使用荧光蛋白反应性试剂，来检测 存在的特异性结合目标蛋白。在本发明方法的另一实施例中，已知样品含 有目标蛋白。在某些实施例中，目标VEGF-A蛋白为合成D-蛋白，且化合物为L-肽。在某些实施例中，目标VEGF-A蛋白为L-蛋白，且化合物为 D-肽。

[0441] 在某些实施例中，可使本发明化合物与细胞在VEGF-A存在下接触， 且监测细胞的VEGF-A反应表型。示例性的VEGF-A分析包括在无细胞系 统中使用经分离蛋白质的分析，在活体外使用经培养细胞的分析或活体内 分析。示例性的VEGF-A分析包括但不限于受体酪氨酸激酶抑制分析(参 见例如癌症研究(Cancer Research)2006年6月15日;66:6025-6032)、活 体外HUVEC增殖分析(美国生物实验学学会联合会会刊(FASEB Journal) 2006;20:2027-2035;Wells等人，生物化学(Biochemistry)1998,37, 17754-17764)、活体内实体肿瘤疾病分析(USPN 6,811,779)和活体内血管 生成分析(美国生物实验学学会联合会会刊2006;20:2027-2035)。这些分 析的描述在此以引用的方式并入。这些方法中可采用的方案很多，且包括 但不限于无细胞分析，例如结合分析;测量细胞表型的细胞分析，例如基因表达分析;和涉及特定动物(在某些实施例中，所述动物可为与目标相 关的病况的动物模型)的活体内分析。在某些情况下，分析可为血管形成 分析。在某些实施例中，目标蛋白为VEGF-A，且本发明化合物抑制VEGF-A 依赖性血管生成。在某些实施例中，目标蛋白为VEGF-A，且本发明化合 物抑制VEGF-A依赖性细胞增殖。在某些情况下，目标蛋白为VEGF-A，且化合物抑制VEGFR2磷酸化。

[0442] 在一些实施例中，本发明方法为活体内的，且包括向受试者施用以高 亲和力特异

性结合到目标分子的D-肽化合物。在某些实施例中，化合物以 药物制剂形式施用。可根据本发明方法治疗各种受试者。一般来说，此类 受试者为“哺乳动物”或“哺乳动物类”，其中这些术语被广泛地用于描述 哺乳纲(class mammalia)内的生物体，包括食肉目(carnivore)(例如，狗 和猫)、啮齿目(rodentia)(例如，小鼠、天竺鼠和大鼠)和灵长目(primate) (例如，人类、黑猩猩和猴)。在一些实施例中，受试者为人类。受试者可 为需要预防或治疗受试者的与血管生成相关的疾病或病况的受试者(例如， 如本文所描述)。

[0443] 本发明化合物可结合到且抑制VEGF-A，且因此适用于与血管生成相 关的疾病和病况的治疗、活体内诊断和成像。术语“与血管生成相关的疾 病和病况”包括但不限于本文所提及的那些疾病和病况。在此方面还参考 WO 98/47541。与血管生成相关的疾病和病况包括不同形式的癌症和转移， 例如乳癌、皮肤癌、结肠直肠癌、胰脏癌、前列腺癌、肺癌或卵巢癌。与 血管生成相关的其它疾病和病况为发炎(例如，慢性发炎)、动脉粥样硬化、 类风湿性关节炎和牙龈炎。与血管生成相关的其它疾病和病况为动静脉畸 形、星形细胞瘤、绒毛膜癌、成胶质细胞瘤、神经胶质瘤、血管瘤(儿童、 毛细血管)、肝癌、增生性子宫内膜、心肌缺血、子宫内膜异位、卡波西氏 肉瘤(Kaposi sarcoma)、黄斑变性、黑素瘤、成神经细胞瘤、阻塞性周边 动脉疾病、骨关节炎、银屑病、视网膜病变(糖尿病、增生性)、硬皮病、 精原细胞瘤和溃疡性结肠炎。在一些情况下，与血管生成相关的疾病或病 况为癌症(例如，乳癌、皮肤癌、结肠直肠癌、胰脏癌、前列腺癌、肺癌 或卵巢癌)、发炎性疾病、动脉粥样硬化、类风湿性关节炎、黄斑变性和视 网膜病变。糖尿病性黄斑水肿(DME)或年龄相关黄斑变性(AMD)的治 疗尤其受关注。

[0444] 结合VEGF-A的本发明化合物适用于治疗各种赘生性和非赘生性疾病 和病症。适于治疗的肿瘤和相关病况包括乳癌、肺癌、胃癌、食道癌、结 肠直肠癌、肝癌、卵巢癌、卵泡膜细胞瘤、男性细胞瘤(arrhenoblastoma)、 子宫颈癌、子宫内膜癌、子宫内膜增生、子宫内膜异位、纤维肉瘤、绒毛 膜癌、头颈癌、鼻咽癌、喉癌、成肝细胞瘤、卡波西氏肉瘤、黑素瘤、皮 肤癌、血管瘤、海绵状血管瘤、成血管细胞瘤、胰脏癌、成视网膜细胞瘤、 星形细胞瘤、成胶质细胞瘤、神经鞘瘤、少突神经胶质瘤、成神经管细胞 瘤、成神经细胞瘤、横纹肌肉瘤、成骨性肉瘤、平滑肌肉瘤、泌尿道癌、 甲状腺癌、威尔姆氏肿瘤(Wilm’s tumor)、肾细胞癌、前列腺癌、与母斑 病(phakomatose)相关的异常血管增生、水肿(例如与脑肿瘤相关的水肿)和梅格斯氏综合征(Meigs’syndrome)。

[0445] 适于治疗的非赘生性病况包括类风湿性关节炎、银屑病、动脉粥样硬 化、糖尿病和其它增生性视网膜病变，包括早产儿视网膜病变、晶状体后 纤维组织形成、新生血管性青光眼、年龄相关黄斑变性、甲状腺增生(包 括格雷夫斯氏病(Grave’s disease))、角膜和其它组织移植、慢性发炎、肺 部发炎、肾病综合征、先兆子痫、腹水、心包积液(例如与心包炎相关的 积液)和肋膜积液。

[0446] 如本文所用，术语“治疗(treating/treatment)”意味着对患者，例如哺 乳动物(例如人类)的疾病或医学病况的治疗，其包括：(a)预防疾病或 医学病况发生，例如对受试者的防治性治疗；(b)改善疾病或医学病况， 例如消除患者的疾病或医学病况或引起患者的疾病或医学病况消退；(c) 抑制疾病或医学病况，例如通过减慢或遏制患者的疾病或医学病况的发展；或(d)减轻患者的疾病或医学病况的症状。因此，治疗还包括以下情况， 其中病理性病况或至少与之相关的症状得到完全抑制，例如防止发生或停 止，例如终止，使

得受试者不再罹患病理性病况或至少为病理性病况特征 的症状。治疗还可以调节例如如上文所描述的疾病病况的替代标记物的形 式表现。

[0447] 本公开的方面包括预防或治疗AMD,例如湿性年龄相关黄斑变性 (AMD)的方法。年龄相关黄斑变性(AMD)为老年人口严重视力损失的 主要原因。AMD的渗出形式的特征为脉络膜血管新生和视网膜色素上皮细 胞脱离。由于脉络膜血管新生与预后的急剧恶化相关,因此本发明VEGF 结合化合物用于降低AMD的严重程度。在某些情况下,受试者为患有干 性AMD的患者,且根据本发明方法施用化合物预防受试者中湿性AMD的 发生或降低其严重程度。

[0448] 在某些实施例中,本发明方法包括施用化合物,例如VEGF-A结合化 合物,且然后在其结合到目标蛋白后检测化合物。在一些方法中,相同的 化合物既可充当治疗性化合物也可充当诊断性化合物。

[0449] 本公开的VEGF-A结合化合物在治疗学上适用于治疗通过去除、抑制 或减少VEGF-A蛋白或其片段而改进、改善、抑制或预防的任何疾病或病 况。

[0450] 在一些实施例中,本发明方法为调节受试者的血管生成的方法,所述 方法包含向受试者施用有效量的本发明化合物,所述化合物以高亲和力特 异性结合到VEGF-A蛋白。在某些实施例中,所述方法进一步包含诊断受 试者中疾病病况的存在。在某些实施例中,疾病病况为可通过增强血管生 成来治疗的病况。在某些实施例中,疾病病况为可通过减少血管生成来治 疗的病况。在某些实施例中,本发明方法为抑制血管生成的方法,且化合 物为VEGF-A拮抗剂。

[0451] 在一些实施例中,本发明方法为治疗患有细胞增生性疾病病况的受试 者的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的本发明化合物,所述化合 物以高亲和力特异性结合到VEGF-A蛋白,从而治疗受试者的细胞增生性 疾病病况。

[0452] 在一些实施例中,本发明方法为抑制受试者内肿瘤生长的方法,所述 方法包含向受试者施用有效量的本发明化合物,所述化合物以高亲和力特 异性结合到VEGF-A蛋白。在某些实施例中,肿瘤为实体肿瘤。在某些实 施例中,肿瘤为非实体肿瘤。

[0453] 可使用任何合宜的方法确定所施用的化合物的量是与药学上可接受的 稀释剂、载剂或媒剂结合足以产生所需效果的量。本公开的单位剂型的规 格将视所采用的特定化合物和要实现的效果,以及与受试者中各化合物相 关的药效学而定。

[0454] 在一些实施例中,本发明化合物的有效量为在约50ng/ml至约50μg/ml (例如,约50ng/ml至约40μg/ml、约30ng/ml至约20μg/ml、约50ng/ml 至约10μg/ml、约50ng/ml至约1μg/ml、约50ng/ml至约800ng/ml、约 50ng/ml至约700ng/ml、约50ng/ml至约600ng/ml、约50ng/ml至约500 ng/ml、约50ng/ml至约400ng/ml、约60ng/ml至约400ng/ml、约70ng/ml 至约300ng/ml、约60ng/ml至约100ng/ml、约65ng/ml至约85ng/ml、约 70ng/ml至约90ng/ml、约200ng/ml至约900ng/ml、约200ng/ml至约800 ng/ml、约200ng/ml至约700ng/ml、约200ng/ml至约600ng/ml、约200ng/ml 至约500ng/ml、约200ng/ml至约400ng/ml、或约200ng/ml至约300ng/ml) 范围内的量。

[0455] 在一些实施例中,本发明化合物的有效量为在约10pg至约100mg, 例如约10pg至约50pg、约50pg至约150pg、约150pg至约250pg、约 250pg至约500pg、约500pg至约750pg、约750pg至约1ng、约1ng 至约10ng、约10ng至约50ng、约50ng至约150ng、约150ng至约250 ng、

约250ng至约500ng、约500ng至约750ng、约750ng至约1μg、 约1μg至约10μg、约10μg至约50μg、约50μg至约150μg、约150μg 至约250μg、约250μg至约500μg、约500μg至约750μg、约750μg至 约1mg、约1mg至约50mg、约1mg至约100mg、或约50mg至约100mg 范围内的量。所述量可为单次剂量的量或可为总日量。总日量可在10pg 至100mg范围内,或可在100mg至约500mg范围内,或可在500mg至 约1000mg范围内。

[0456] 在一些实施例中,施用单次剂量的本发明化合物。在其它实施例中, 施用多次剂量的本发明化合物。在一段时间内施用多次剂量的情况下,D- 肽化合物是在一段时间内每天两次(qid)、每天一次(qd)、每隔一天一次 (qod)、每隔两天一次、每周三次(tiw)或每周两次(biw)施用。举例来 说,在一天至约2年或更长的时间内,qid、qd、qod、tiw或biw施用化合 物。举例来说,以前述频率中的任一个施用化合物一周、两周、一个月、 两个月、六个月、一年或两年或更长时间,视各种因素而定。

[0457] 可以使用多种方法中的任一种来确定治疗方法是否有效。举例来说, 可以分析从已经用本发明方法治疗的个体获得的生物样品的血管生成的存 在和/或程度。受试者治疗方法的有效性的评定可以包括在治疗之前、期间 和/或之后使用任何合宜的方法对受试者进行评定。本发明方法的各方面进 一步包括评定受试者对治疗的治疗反应的步骤。

[0458] 在一些实施例中,所述方法包括评定受试者的病况,包括诊断或评定 受试者的一个或多个与所治疗的所关注疾病或病况(例如,如本文所描述) 相关的症状。在一些实施例中,所述方法包括从受试者获得生物样品,以 及例如针对与所关注的疾病或病况(例如,如本文所描述)相关的血管生 成的存在分析所述样品。样品可为细胞样品。在一些情况下,样品为活体 组织切片。可使用任何合宜的方法,在施用本发明化合物之前、期间和/或 在之后一次或多次地进行本发明方法的评定步骤。

[0459] 在一些情况下,例如如本文所界定的本发明化合物或其盐可用于医学, 尤其用于与血管生成相关的疾病或病况的活体内诊断或成像,例如通过 PET进行。在某些实施例中,化合物为包括可检测标记的经修饰化合物, 且方法进一步包括检测受试者中的标记。标记的选择取决于检测手段。任 何合宜的标记和检测系统均可用于本发明方法中,参见例如Baker,“全景 (The whole picture)”,自然,463,2010,第977-980页。在某些实施例中, 化合物包括适合于光学检测的荧光标记。在某些实施例中,化合物包括用 于使用正电子发射断层扫描(PET)或单光子发射计算机断层扫描(SPECT) 进行检测的放射性标记。在一些情况下,化合物包括适合于断层扫描检测 的顺磁性标记。如上文所描述,本发明化合物可经标记,不过在一些方法 中,化合物未经标记,且使用二级标记剂进行成像。在某些实施例中,本 发明方法包括通过将经标记基因座的数目、大小和/或强度与对应的基线值 进行比较来诊断受试者的疾病病况。基线值可代表未患病的受试者群体中 的平均水平,或同一受试者中测定的先前水平。

[0460] 在一些情况下,放射性标记化合物可以足以产生所需信号的量向受试 者施用以便进行PET成像。在某些情况下,根据70kg体重足够的放射性 核素剂量为0.01至100mCi,例如0.1至50mCi或1至20mCi。因此,可 使用任何合宜的生理学上可接受的载剂或赋形剂来配制放射性标记化合物 以便施用。举例来说,化合物可以任选地添加药学上可接受的赋形剂而悬 浮或溶解于水性介质中,随后对所得溶液或悬浮液灭菌。还提供了如本文 所描述的放射性标记化合物或其盐的用途,其用于制造在如下方法中使用 的放射性药物:活体内成

像,例如PET成像,例如与血管生成相关的疾病 或病况的成像;涉及向人体或动物身体施用放射性药物和产生所述身体的 至少一部分的图像。

[0461] 在一些实施例中,所述方法为用于对与血管生成相关的疾病或病况进 行活体内诊断或成像的方法,其涉及向所述身体施用放射性药物,例如施 用到血管系统中,且使用PET产生所述放射性药物所分布到的所述身体的 至少一部分的图像,其中所述放射性药物包含放射性标记化合物或其盐。

[0462] 在一些实施例中,所述方法为监测用药物,例如细胞毒性剂来治疗人 类或动物身体以对抗与血管生成相关的病况,例如癌症的效果的方法,所 述方法包含向所述身体施用放射性标记的化合物或其盐,且检测细胞受体, 例如内皮细胞受体,例如α.v.β.3受体,对化合物的摄取,施用和检测任选 地重复进行,例如在用所述药物治疗之前、期间和之后。

[0463] 在一些实施例中,所述方法为用于对与血管生成相关的疾病或病况进 行活体内诊断或成像的方法,包含向受试者施用D-肽化合物且对受试者的 至少一部分进行成像。在某些实施例中,成像包含PET成像,且施用包含 向受试者的血管系统施用化合物。在一些情况下,所述方法进一步包含检 测细胞受体对化合物的摄取。在某些情况下,目标为VEGF-A,且受试者 为人类。在某些实施例中,所述方法包括向受试者施用治疗性抗体,例如 癌思停(avastin),其中疾病或病况为与癌症相关的病况。

[0464] 本发明方法可为用于在活体外或活体内检测目标蛋白在特定细胞、组 织或血清中的表达的诊断方法。在一些情况下,本发明方法为用于对受试 者中的目标蛋白进行活体内成像的方法。所述方法可包括向呈现与目标蛋 白相关的疾病病况的症状的受试者施用化合物。在一些情况下,受试者无 症状。本发明方法可进一步包括监测先前已诊断患有疾病的受试者的疾病 进展和/或治疗反应。

[0465] 本发明的VEGF-A结合化合物可用作亲和纯化剂。在此过程中,可使 用任何合宜的方法将化合物固定在固相,例如葡聚糖凝胶(Sephadex)树 脂或滤纸上。使本发明的VEGF-A结合化合物与含有待纯化的VEGF-A蛋 白(或其片段)的样品接触,且其后用适合溶剂洗涤支持物,所述溶剂将 去除样品中除与固定的化合物结合的VEGF蛋白外的基本上所有材料。最 后,用另一适合溶剂,例如甘氨酸缓冲液pH 5.0来洗涤支持物,所述溶剂 将VEGF-A蛋白从固定的化合物中释放。

[0466] 本发明的VEGF-A结合化合物也可适用于VEGF-A蛋白的诊断分析, 例如检测其在特定细胞、组织或血清中的表达。此类诊断方法可适用于癌 症诊断。对于诊断应用,可如上文所描述修饰本发明化合物。

[0467] 组合疗法

[0468] 在一些实施例中,本发明化合物可与一种或多种额外活性剂或疗法组 合施用。可利用任何合宜的药剂,包括适用于治疗本发明方法所靶向的疾 病的化合物。术语“药剂”、“化合物”和“药物”在本文中可以互换使用。额外活性剂或疗法包括但不限于小分子;抗体;抗体片段;适体;L-蛋白; 第二目标结合分子,例如第二D-肽化合物;化学治疗剂;手术;导液管装 置;和放射。组合疗法包括施用含有本发明化合物和一种或多种额外药剂 的单一药学剂量配制物;以及将本发明化合物和一种或多种额外药剂以其 自身单独药学剂量配制物施用。举例来说,本发明化合物和细胞毒性剂、化学治疗剂或生长抑制剂可在单剂量组合物,例如组合配制物中一起向患 者施用,或各药剂可以单独剂量配制物施用。在使

用单独剂量配制物的情 况下,本发明化合物和一种或多种额外药剂可并行施用,或在分开交错时 间例如依序施用。

[0469] 术语“共同施用”和“与…组合”包括在无特定时间限制内同时、并 行或依序施用两种或更多种治疗剂(例如,D-肽化合物和第二药剂)。在一 个实施例中,药剂同时存在于细胞中或个体体内,或同时发挥其生物或治 疗效应。在一个实施例中,治疗剂呈同一组合物或单位剂型。在其它实施 例中,治疗剂呈单独的组合物或单位剂型。在某些实施例中,可以在施用 第二治疗剂之前(例如之前数分钟、15分钟、30分钟、45分钟、1小时、 2小时、4小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时、 1周、2周、3周、4周、5周、6周、8周或12周)、同时或之后(例如之 后5分钟、15分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时、1周、2周、3周、4周、5 周、6周、8周或12周),施用第一药剂(例如,D-肽化合物)。

[0470] 已知治疗药物与本公开的药物组合物的“同时施用”意味着在已知药 物和本公开的组合物都将具有治疗效果的时间施用D-肽化合物和第二药 剂。此类同时施用可涉及相对于本发明D-肽化合物的施用并行(即同时)、 在其之前或随后施用药物。两种药剂的施用途径可不同,其中下文更详细 地描述代表性施用途径。所属领域的一般技术人员应不难确定施用特定药 物和本公开化合物的适当时机、顺序和剂量。

[0471] 在一些实施例中,将化合物(例如,本发明D-肽化合物和第二药剂) 在彼此二十四小时内,例如在彼此12小时内、在彼此6小时内、在彼此3 小时内、或在彼此1小时内向受试者施用。在某些实施例中,化合物在彼 此1小时内施用。在某些实施例中,化合物大体上同时施用。大体上同时 施用意味着化合物在彼此约10分钟或更短时间,例如在彼此5分钟或更短 时间或者1分钟或更短时间内向受试者施用。

[0472] 还提供了本发明化合物和第二活性剂的药物制剂。在药物剂型中,化 合物可以其药学上可接受的盐的形式施用,或其也可单独或以与其它药学 活性化合物的适当缔合以及组合使用。

[0473] 在代表性实施例中,大约每天每公斤体重约0.01mg至约140mg的剂 量水平适用,或者,每天每位患者约0.5mg至约7g的剂量水平适用。所 属领域的技术人员将容易了解到,剂量水平可以根据特定化合物、症状的 严重程度和受试者对副作用的敏感性而变化。给定化合物的剂量可由所属 领域的技术人员通过多种手段容易地确定。

[0474] 可与载剂材料组合以产生单一剂型的活性成分的量将视所治疗的主体 和特定施用模式而变化。举例来说,预期用于人类经口施用的配制物可含 有0.5mg至5g活性剂,其与适当且合宜量的载剂材料混配,所述载剂材 料可在总组合物的约5%至约95%之间变化。单位剂型一般将含有约1mg 至约500mg之间的活性成分,例如25mg、50mg、100mg、200mg、300mg、400mg、500mg、600mg、800mg或1000mg。

[0475] 然而,应理解,针对任何特定患者的特定剂量水平将视多种因素而定, 所述因素包括年龄、体重、一般健康、性别、饮食、施用时间、施用途径、 排泄率、药物组合和经历疗法的特定疾病的严重程度。

[0476] 任何合宜的第二药剂用于本发明方法中。在一些情况下,第二活性剂 特异性结合选自以下的目标蛋白:血小板衍生生长因子(PDGF)、VEGF-B、 VEGF-C、VEGF-D、EGF、EGFR、Her2、PD-1、PD-L1、OX-40、LAG3、 Ang2、IL-1、IL-6和IL-17。所关注的第二活性剂包括但不

限于派勒兰尼 (pegpleranib)(福维斯塔(Fovista))、兰尼单抗(ranibizumab)(乐舒晴(Lucentis))、曲妥珠单抗(贺癌平(Herceptin))、贝伐单抗(癌思停)、阿 柏西普(采视明(Eylea))、纳武单抗、阿特珠单抗、德瓦鲁单抗(Durvalumab)、 吉非替尼、埃罗替尼和派姆单抗。

[0477] 为了治疗癌症,可将本发明化合物与选自由以下组成的群组的化学治 疗剂组合施用:紫杉烷、核苷类似物、类固醇、蒽环霉素、甲状腺激素替 代药物、胸苷酸靶向药物、嵌合抗原受体/T细胞疗法、嵌合抗原受体/NK 细胞疗法、凋亡调控子抑制剂(例如,B细胞CLL/淋巴瘤2(BCL-2)类 BCL-2蛋白1(BCL-XL)抑制剂)、CARP-1/CCAR1(细胞分裂周期和凋亡 调控子1)抑制剂、集落刺激因子-1受体(CSF1R)抑制剂、CD47抑制剂、 癌症疫苗(例如,诱导Th17的树突状细胞疫苗)和其它细胞疗法。特定化 学治疗剂包括例如吉西他滨、多西他赛、博莱霉素、埃罗替尼、吉非替尼、 拉帕替尼、伊马替尼、达沙替尼、尼罗替尼、伯舒替尼、克唑替尼、色瑞 替尼、曲美替尼、贝伐单抗、舒尼替尼、索拉非尼、曲妥珠单抗、曲妥珠 单抗-恩他新偶联物、利妥昔单抗、伊匹木单抗、雷帕霉素、坦西莫司、依 维莫司、甲氨蝶呤、阿霉素、白蛋白结合型紫杉醇、氟非林、顺铂、卡铂、 5-氟尿嘧啶、替苏莫、太平洋紫杉醇、泼尼松、左甲状腺素、培美曲塞、 纳维托克、ABT-199。

[0478] 为了治疗癌症(例如,黑素瘤、非小细胞肺癌或淋巴瘤,例如霍奇金 氏淋巴瘤),可将本发明化合物与免疫检查点抑制剂组合施用。可利用任何 合宜的检查点抑制剂,包括但不限于细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4 (CTLA-4)抑制剂、程序性死亡1(PD-1)抑制剂和PD-L1抑制剂。所关 注的示例性检查点抑制剂包括但不限于伊匹木单抗、派姆单抗和纳武单抗。 在某些实施例中,为了治疗癌症和/或发炎性疾病,可将本发明化合物与集 落刺激因子-1受体(CSF1R)抑制剂组合施用。所关注的CSF1R抑制剂包 括但不限于艾玛图单抗(emactuzumab)。

[0479] 任何合宜的癌症疫苗疗法和药剂均可与本发明的免疫调节多肽组合物 和方法组合使用。为了治疗癌症,例如卵巢癌,可将本发明化合物与疫苗 接种疗法组合施用,所述疫苗接种疗法例如促进Th1/Th17免疫的树突状细 胞(DC)疫苗接种剂。Th17细胞浸润与卵巢癌患者中总存活期显著延长相 关。在一些情况下,免疫调节多肽可与诱导Th17的疫苗接种组合用作佐剂 治疗。

[0480] 还关注的是作为以下的药剂:CARP-1/CCAR1(细胞分裂周期和凋亡 调控子1)抑制剂,包括但不限于Rishi等人,生物医学纳米技术杂志(Journal of Biomedical Nanotechnology),第11卷,第9期,2015年9月,第 1608-1627(20)页所描述的抑制剂;和CD47抑制剂,包括但不限于抗CD47 抗体药剂,例如Hu5F9-G4。

[0481] 效用

[0482] 例如如上文所描述的本发明化合物用于多种应用中。所关注的应用包 括但不限于:治疗应用、研究应用和筛选应用。现将在下文中更详细地评 述这些不同应用中的每一个。

[0483] 治疗应用

[0484] 本发明化合物用于多种治疗应用中。所关注的治疗应用包括其中目标 的活性为疾病进展的原因或复合因素的那些应用。因此,本发明化合物用 于治疗多种不同病况,其中需要调节主体中的目标活性。

[0485] 本发明化合物适用于治疗与其目标VEGF-A相关的病症。上文描述了 可用本发明化合物治疗的疾病病况的实例。

[0486] 在某些实施例中,疾病病况包括但不限于:癌症、抑制血管生成和转 移、骨关节炎疼痛、慢性下背痛、癌症相关疼痛、年龄相关黄斑变性(AMD)、 糖尿病性黄斑水肿(DME)、特发性肺纤维化(IPF)和移植角膜的移植物 存活。

[0487] 在一个实施例中,本公开提供了一种治疗受试者的VEGF-A相关病况 的方法。所述方法一般涉及以有效治疗VEGF-A相关病症的至少一种症状 的量向具有VEGF-A相关病症的受试者施用本发明化合物。VEGF-A相关 病况的特征一般为过度血管内皮细胞增殖、血管通透性、水肿或发炎,例 如与损伤、中风或肿瘤相关的脑水肿;与发炎性病症相关的水肿,所述发 炎性病症例如银屑病或关节炎,包括类风湿性关节炎;哮喘;与烧伤相关 的全身性水肿;与肿瘤、发炎或外伤相关的腹水和肋膜积液;慢性气道发 炎;毛细血管渗漏综合征;败血症;与蛋白质泄漏增加相关的肾病;和眼 部病症,例如年龄相关黄斑变性和糖尿病性视网膜病变。此类病况包括乳 癌、肺癌、结肠直肠癌和肾癌。

[0488] 研究应用

[0489] 本发明化合物和方法用于多种研究应用中。本发明化合物和方法可用 于分析目标蛋白在调节各种生物过程中的作用,所述生物过程包括但不限 于血管生成、发炎、细胞生长、代谢、转录调控和磷酸化调控。其它目标 蛋白结合分子,例如抗体,在生物学研究的类似领域中也同样适用。参见 例如Sidhu和Fellhouse,“合成治疗抗体(Synthetic therapeutic antibodies)”, 自然:化学生物学(Nature Chemical Biology),2006,2(12),682-688。可容 易地修改此类方法以用于本发明化合物和方法的多种研究应用。

[0490] 诊断应用

[0491] 本发明化合物和方法用于多种诊断应用,包括但不限于临床诊断的开 发,例如活体外诊断或活体内肿瘤成像剂。此类应用适用于诊断疾病病况 或其易感性,或者确认对其的诊断。所述方法还适用于监测先前已诊断患 有疾病的患者的疾病进展和/或治疗反应。

[0492] 所关注的诊断应用包括疾病病况的诊断,所述疾病病况例如上文所描 述的那些病况,包括但不限于:癌症、抑制血管生成和转移、骨关节炎疼 痛、慢性下背痛、癌症相关疼痛、年龄相关黄斑变性(AMD)、糖尿病性 黄斑水肿(DME)、特发性肺纤维化(IPF)和移植角膜的移植物存活。在 一些方法中,相同的化合物既可充当治疗试剂,也可充当诊断试剂。

[0493] 其它目标蛋白结合分子,例如适体和抗体,也可用于临床诊断的开发。可容易地修改此类方法以用于本发明化合物和方法的多种诊断应用,参见 例如Jayasena,“适体:在诊断中与抗体匹敌的新兴类别分子(Aptamers:An Emerging Class of Molecules That Rival Antibodies in Diagnostics)”,临床化 学(Clinical Chemistry),1999,45,1628-1650。

[0494] 药物制剂

[0495] 还提供了药物制剂。药物制剂为包括存在于药学上可接受的媒剂中的 化合物(单独或在一种或多种额外活性剂存在下)的组合物。术语“药学 上可接受的”意味着经联邦政府或州政府的监管机构批准或在美国药典 (U.S.Pharmacopeia)或其它一般公认的药典中列出适用于哺乳动物,例如 人类。术语“媒剂”是指稀释剂、佐剂、赋形剂或载剂,本发明化合物与 其一起配制以便向哺乳动物施用。此类药物媒剂可为液体,例如水和油, 包括石

油、动物、植物或合成来源的那些，例如花生油、大豆油、矿物油、 芝麻油等。药物媒剂可为盐水、阿拉伯胶、明胶、淀粉糊、滑石、角蛋白、 胶态二氧化硅、尿素等。另外，可使用助剂、稳定剂、增稠剂、润滑剂和 着色剂。在向哺乳动物施用时，本发明的化合物和组合物以及药学上可接 受的媒剂、赋形剂或稀释剂可以是无菌的。在一些情况下，当静脉内施用 本发明的化合物时，将水性介质用作媒剂，例如水、盐水溶液以及右旋糖 水溶液和甘油溶液。

[0496] 药物组合物可采取胶囊、片剂、丸剂、团粒、口含片、粉剂、颗粒、 糖浆、酏剂、溶液、悬浮液、乳液、栓剂或其持续释放配制物形式，或适 合于向哺乳动物施用的任何其它形式。在一些情况下，药物组合物针对根 据常规程序的施用配制成适于向人类经口或静脉内施用的药物组合物。适 合药物媒剂的实例和其配制方法描述于雷明顿:药物科学与实践(Remington:The Science and Practice of Pharmacy)，Alfonso R.Gennaro编， 马克出版公司(Mack Publishing Co.)，宾夕法尼亚州伊斯顿(Easton,Pa.)， 第19版，1995，第86、87、88、91和92章，其以引用的方式并入本文中。

[0497] 赋形剂的选择将部分地由特定化合物以及用于施用组合物的特定方法 决定。因此，存在本发明的药物组合物的广泛多种适合配制物。

[0498] 本公开的化合物的施用可为全身或局部的。在某些实施例中，向哺乳 动物施用将引起本发明化合物的全身释放(例如，进入血流)。施用方法可 包括肠内途径，例如经口、经颊、舌下和经直肠;外用施用，例如经皮和 皮内;以及肠胃外施用。适合的肠胃外途径包括经由皮下针或导管注射， 例如静脉内、肌内、皮下、皮内、腹膜内、动脉内、室内、鞘内和前房内 注射，以及非注射途径，例如阴道内、经直肠或经鼻施用。在某些实施例 中，本发明的化合物和组合物经口施用。在某些实施例中，可能需要向需 要治疗的区域局部施用本发明的一种或多种化合物。举例来说，这可通过 以下来实现:在手术期间进行局部输注;外用施用，例如与手术后的伤口 敷料结合;通过注射;借助于导管;借助于栓剂;或借助于植入物，所述 植入物为多孔、无孔或胶状材料，包括膜，例如硅橡胶膜，或纤维。

[0499] 本发明化合物可通过以下配制成注射用制剂:将本发明化合物在水性 或非水性溶剂，例如植物油或其它类似油、合成脂肪族酸甘油酯、高碳脂 肪族酸的酯或丙二醇中溶解、悬浮或乳化;且必要时含有常规添加剂，例 如增溶剂、等渗剂、悬浮剂、乳化剂、稳定剂和防腐剂。

[0500] 在一些实施例中，适合于经口施用的配制物可包括:(a)液体溶液， 例如溶解在例如水或盐水的稀释剂中的有效量的化合物;(b)胶囊、药囊 或片剂，各自含有预定量的呈固体或颗粒形式的活性成分;(c)于适当液 体中的悬浮液;以及(d)适合乳液。片剂形式可包括以下中的一种或多种: 乳糖、甘露糖醇、玉米淀粉、马铃薯淀粉、微晶纤维素、阿拉伯胶、明胶、 胶态二氧化硅、交联羧甲纤维素钠、滑石、硬脂酸镁、硬脂酸以及其它赋 形剂、着色剂、稀释剂、缓冲剂、湿润剂、防腐剂、调味剂和药理学上相 容的赋形剂。口含片形式可包括调味剂，通常蔗糖和阿拉伯胶或黄蓍胶中 的活性成分，以及锭剂，其在惰性基质，例如明胶和甘油，或蔗糖和阿拉 伯胶、乳液、凝胶等中包括活性成分，所述惰性基质除了含有活性成分以 外，还含有如本文所描述的赋形剂。

[0501] 可将本发明配制物制成气溶胶配制物，以经由吸入施用。可将这些气 溶胶配制物置于例如二氯二氟甲烷、丙烷、氮气等可接受的加压推进剂中。 其也可配制为用于非加压制剂的药物，例如用于喷雾器或雾化器中。

[0502] 在一些实施例中，适合于肠胃外施用的配制物包括可含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使配制物与预期接受者血液等渗的溶质的水性和非水性 等渗无菌注射溶液；和可包括悬浮剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂和防腐剂 的水性和非水性无菌悬浮液。配制物可呈现于单位剂量或多剂量密封容器， 例如安瓿和小瓶中，且可在冷冻干燥(冻干)条件下存储，仅需要在即将 使用之前添加注射用无菌液体赋形剂，例如水。可从前述种类的无菌粉剂、颗粒和片剂制备即用型注射溶液和悬浮液。

[0503] 适合于外用施用的配制物可呈现为乳膏、胶凝、糊剂或泡沫，其除了 含有活性成分外，还含有适当的载剂。在一些实施例中，外用配制物含有 一种或多种选自规整剂、增稠剂或胶凝剂和润肤剂或润滑剂的组分。长采 用的规整剂包括长链醇，例如硬脂醇，和甘油醚或酯和寡聚(环氧乙烷)醚或 其酯。增稠剂和胶凝剂包括例如丙烯酸或甲基丙烯酸和其酯的聚合物、聚 丙烯酰胺和天然存在的增稠剂，例如琼脂、角叉菜胶、明胶和瓜尔胶。润 肤剂的实例包括三酸甘油酯、脂肪酸酯和酰胺；蜡，例如蜂蜡、鲸蜡或巴 西棕榈蜡；磷脂，例如卵磷脂；以及固醇和其脂肪酸酯。外用配制物可进 一步包括其它组分，例如收敛剂、芳香剂、颜料、皮肤渗透增强剂、防晒 剂(sunscreen)(例如，遮阳剂(sunblocking agent))等。

[0504] 本公开的化合物还可以调配用于经口施用。对于经口药物配制物，适 合的赋形剂包括药物级载剂，例如甘露糖醇、乳糖、葡萄糖、蔗糖、淀粉、 纤维素、明胶、硬脂酸镁、糖精钠和/或碳酸镁。为了用于经口液体配制物， 组合物可制备为溶液、悬浮液、乳液或糖浆，以适合于在水性载剂中水合 的固体或液体形式供应，所述水性载剂例如盐水溶液、右旋糖水溶液、甘 油或乙醇，优选水或生理盐水。必要时，组合物还可含有少量无毒辅助物 质，例如润湿剂、乳化剂或缓冲剂。本发明的化合物还可并入到例如常规 可获得的现有营养药物调配物中，其还可包括草药提取物。

[0505] 可提供用于经口或经直肠施用的单位剂型，例如糖浆、酏剂和悬浮液， 其中各剂量单位，例如一茶匙量、一汤匙量、片剂或栓剂，含有预定量的 含有一种或多种抑制剂的组合物。类似地，用于注射或静脉内施用的单位 剂型可以于无菌水、生理盐水或另一药学上可接受的载剂中的溶液形式在 组合物中包括抑制剂。

[0506] 如本文所用，术语“单位剂型”是指适用作人类和动物受试者的单位 剂量的物理离散单位，各单位含有预定量的本发明化合物，所述计算量足 以与药学上可接受的稀释剂、载剂或媒剂结合产生所需效果。本发明新颖 单位剂型的规格取决于所用特定化合物和要达到的效果以及与主体中的每 种化合物相关的药效学。

[0507] 剂量水平可以随特定化合物、递送媒剂的性质等变化。可以通过多种 手段容易地确定给定化合物的所需剂量。

[0508] 在本发明的情形下，向动物，尤其人类施用的剂量应足以在合理的时 间范围内在动物中实现防治性或治疗性反应，例如如下文更详细地描述。 剂量将取决于各种因素，包括所用特定化合物的强度、动物的状况和动物 的体重，以及疾病的严重程度和疾病的阶段。剂量大小也将由可能伴随特 定化合物的施用的任何不良副作用的存在、性质和程度决定。

[0509] 在药物剂型中，化合物可以游离碱、其药学上可接受的盐形式施用， 或者其也可单独使用或以与其它药学活性化合物的适当缔合以及组合使 用。

[0510] 在一些实施例中，药物组合物包括以高亲和力特异性结合到目标蛋白 的本发明

化合物以及药学上可接受的媒剂。在某些实施例中，目标蛋白为 VEGF蛋白，且本发明化合物为VEGF拮抗剂。

[0511] 试剂盒

[0512] 还提供了包括本公开的化合物的试剂盒。本公开的试剂盒可以包括一 种或多种剂量的化合物以及任选的一种或多种剂量的一种或多种额外活性 剂。合宜地，配制物可以按单位剂型提供。在此类试剂盒中，除含有例如 单位剂量的配制物的容器以外，为描述本发明配制物在本发明方法中的用 途的信息性药品说明书，例如使用本发明单位剂量治疗与致病性血管生成 相关的细胞病况的说明书。术语试剂盒是指经过包装的活性剂或药剂。在 一些实施例中，本发明系统或试剂盒包括呈可有效治疗受试者的与血管生 成相关的疾病或病况(例如，如本文所描述)的量的本发明化合物(例如， 如本文所描述)剂量和第二活性剂(例如，如本文所描述)剂量。

[0513] 除上文所提及的组分外，本发明试剂盒可进一步包括使用试剂盒的组 分，例如以实践本发明方法的说明书。说明书一般被记录在适合的记录介 质上。举例来说，说明书可以打印在例如纸或塑料等的基材上。因此，说 明书可以药品说明书形式存在于试剂盒中，存在于试剂盒或其组件的容器 的标签中(即，与包装或子包装相关)等。在其它实施例中，说明书以呈 现于例如CD-ROM、磁盘、硬盘驱动器(HDD)、便携闪存驱动器等的适 合计算机可读存储媒体上的电子存储数据文件的形式存在。在其它实施例 中，试剂盒中不存在实际的说明书，但提供了用于例如经由因特网从远程 源获得说明书的方式。此实施例的一个实例是包括网址的试剂盒，在所述 网址上可以查看说明书和/或可以从所述网址下载说明书。与说明书一样， 这种用于获得说明书的手段记录在适合的基材上。

[0514] 在一些实施例中，试剂盒包括第一剂量的本发明药物组合物和第二剂 量的本发明药物组合物。在某些实施例中，试剂盒还包括第二血管生成调 节剂。

[0515] 应理解，本发明不限于所描述的特定实施例，因为这些实施例当然可 能变化。还应理解，本文所用的术语仅出于描述特定实施例的目的，而并 不旨在进行限制，因为本发明的范围仅由所附权利要求书限制。

[0516] 在提供值范围的情况下，应理解，本发明涵盖在所述范围的上限与下 限之间的每个中间值，除非上下文清楚地另外指明，否则到下限单位的十 分之一，以及在所陈述范围内的任何其它所陈述的值或中间值。这些更小 范围的上限和下限可以独立地包括在更小范围中并且也涵盖在本发明内， 受所述范围内的任何具体排除的限值的约束。在所陈述的范围包括限值中 的一个或两个的情况下，排除那些包括的限值中的任一个或两个的范围也 包括在本发明中。

[0517] 本文呈现了在数值前面有术语“约”的某些范围。术语“约”在本文 用于为其后面出现的精确数字以及接近或靠近所述术语后面的数字的数字 提供字面支持。在确定数字是否接近或靠近具体叙述的数字时，接近或靠 近的未叙述的数字可以是如下数字，其在出现的上下文中，提供具体叙述 的数字的基本等同形式。

[0518] 除非另外定义，否则本文所用的所有技术术语和科学术语具有与本发 明所属领域的普通技术人员通常所理解的含义相同的含义。尽管类似于或 等同于本文中所描述的方法和材料的任何方法和材料也可以用于本发明的 实践或测试，但是现在将对代表性说明方法和材料进行描述。

[0519] 本说明书中所引用的所有出版物和专利以引用的方式并入本文,就像 每个单独的出版物或专利被具体且单独地指示为以引用方式并入并且以引 用方式并入以便结合所引用的出版物来公开和描述所述方法和/或材料。对 任何出版物的引用是针对其在提交日之前的公开内容并且不应被解释为承 认本发明因先前的发明而无权先于此类出版物。此外,所提供的出版日期 可以与实际公开日期不同,所述实际公开日期可能需要独立确认。

[0520] 应注意,如本文以及所附权利要求书中所用,除非上下文另外明确指 示,否则单数形式“一(a/an)”和“所述(the)”包括复数指代物。还 要注意,权利要求书可以被撰写为排除任何任选要素。因此,此陈述旨在 充当结合权利要求要素的叙述使用如“单独(solely)”、“仅(only)” 等排它性术语或使用“否定(negative)”限制的前置基础。

[0521] 如所属领域的技术人员在阅读本公开后将清楚的是,本文所描述和示 出的个别实施例中的每个实施例都具有离散的组成部分和特征,这些组成 部分和特征可以在不偏离本发明的范围或精神的情况下易于与任何其它几 个实施例的特征分离或组合。任何所叙述方法均可以所叙述事件的次序或 以逻辑上可能的任何其它次序来进行。

[0522] 尽管已经或者将为了语法流动性而以功能解释对设备和方法进行描 述,但应明确地理解,除非根据35U.S.C.§112明确制定,否则权利要求书 不应被解释为一定以任何方式受构造“手段”或“步骤”限制的限制,而 是应按照等同物的司法原则符合权利要求书所提供的定义的含义和等同物 的完整范围,并且在根据35U.S.C.§112明确指定权利要求书的情况下,应 符合根据35U.S.C.§112的全部法定等同内容。

[0523] 定义

[0524] 术语“肽”是指主要由连接在一起作为多肽的氨基酸残基构成的部分。术语“肽”意味着包括其中常规多肽序列的一个、两个或更多个残基已被 肽模拟物替换的化合物。肽模拟物为经设计以模拟肽或氨基酸残基的小有 机基团。肽部分的肽模拟物基团可包括与常规多肽主链连接的非天然存在 或合成主链基团,和模拟任何合宜的所关注氨基酸残基的侧链基团的任选 侧链基团。在一些实施例中,主要由氨基酸残基构成的肽化合物中每10个 亲本多肽序列氨基酸残基中有2个残基或更少残基被肽模拟物部分替换。任何合宜的肽模拟物基团和化学物质均可用于本发明肽化合物中。术语肽 还意味着包括其中两种或更多种所关注肽化合物共价连接的多聚肽化合 物。术语肽还意味着包括其中非蛋白质部分已与化合物共价连接的经修饰 肽化合物。

[0525] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”可互换使用以指代任何长度的氨基 酸的聚合形式。除非另有明确指示,否则“多肽”、“肽”和“蛋白质”可 包括基因编码和非编码氨基酸、化学或生物化学修饰或衍生的氨基酸,和 具有经修饰肽主链的多肽。所述术语包括其中一种或多种常规氨基酸已被 非天然存在或合成氨基酸替换的多肽。多肽可具有任何长度,例如2个或 更多个氨基酸、4个或更多个氨基酸、10个或更多个氨基酸、20个或更多 个氨基酸、30个或更多个氨基酸、40个或更多个氨基酸、50个或更多个氨 基酸、60个或更多个氨基酸、100个或更多个氨基酸、300个或更多个氨基 酸、500个或更多个氨基酸、或1000个或更多个氨基酸。

[0526] 对于本文中描绘的多肽序列和基序,除非另外指出,否则大写字母代 码是指L-氨基酸残基,且小写字母代码是指D-氨基酸残基。氨基酸残基甘 氨酸表示为G或Gly。“a”是丙氨酸。“c”是半胱氨酸。“d”是天冬氨酸。 “e”是谷氨酸。“f”是苯丙氨酸。“h”是组氨酸。“i”是

异亮氨酸。“k”是 赖氨酸。“l”是亮氨酸。“m”是甲硫氨酸。“n”是天冬酰胺。“o”是鸟氨 酸。“p”是脯氨酸。“q”是谷氨酰胺。“r”是精氨酸。“s”是丝氨酸。“t” 是苏氨酸。“v”是缬氨酸。“w”是色氨酸。“y”是酪氨酸。应理解,对于 本文所描述的序列及基序中的任一个,例如界定特异性结合VEGF-A的肽 化合物的序列,还涵盖特异性结合到VEGF-A的镜像的镜像化合物。本公 开意图涵盖本发明化合物的两种形式,例如,特异性结合D-VEGF-A的L- 肽化合物和特异性结合L-VEGF-A的D-肽化合物。应理解,D-VEGF-A蛋 白可主要在多种活体外应用中被靶向,而L-VEGF-A蛋白可针对多种活体 外和/或活体内应用而被靶向。

[0527] 术语氨基酸残基的“类似物”是指具有作为参考氨基酸残基的侧链基 团的结构和/或功能类似物的侧链基团的残基。在一些情况下,氨基酸类似 物共享一种或多种天然氨基酸的主链结构和/或侧链结构,其中差异为分子 中的一个或多个经修饰基团。这类修饰可包括但不限于原子(例如N)取 代为相关原子(例如S)、添加基团(例如甲基或羟基等)或原子(例如F、 Cl或Br等)、缺失基团、取代共价键(单键取代为双键等)或其组合。举 例来说,氨基酸类似物可包括α-羟基酸和α-氨基酸等。在一些情况下,氨 基酸残基类似物是氨基酸的被取代形式。术语氨基酸残基的“被取代形式” 是指具有侧链基团的残基,所述侧链基团上包括不存在于参考氨基酸残基 的侧链中的一个或多个额外取代基。

[0528] 术语“芳香族氨基酸”和“芳香族残基”可互换使用以指代其中侧链 基团包括芳基、被取代的芳基、杂芳基或被取代的杂芳基的氨基酸残基。 在一些情况下,侧链基团为芳基-烷基、被取代的芳基-烷基、杂芳基-烷基 或被取代的杂芳基-烷基。所述术语意图包括天然存在和非天然存在的α-氨 基酸。所关注的天然存在的芳香族残基包括苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸和 组氨酸。

[0529] 术语“碳环氨基酸”和“碳环残基”可互换使用以指代其中侧链基团 包括芳基或饱和碳环基的氨基酸残基。在一些情况下,侧链基团为环烷基- 烷基或被取代的环烷基-烷基。所关注的非天然存在的侧链基团包括但不限 于环己基-CH_2-、环戊基-CH_2、环己基-$(CH_2)_2$-和环戊基-$(CH_2)_2$-。

[0530] 术语“杂环氨基酸”和“杂环残基”可互换使用以指代其中侧链基团 包括杂环基,例如杂芳基或饱和杂环基的氨基酸残基。在一些情况下,侧 链基团为杂环-烷基或被取代的杂环-烷基。所述术语意图包括天然存在和非 天然存在的α-氨基酸。所关注的天然存在的杂环残基包括色氨酸和组氨酸。

[0531] 术语“非极性氨基酸残基”和“非极性残基”是指包括为氢(即,G) 或非极性基团的侧链的氨基酸残基。在一些情况下,非极性氨基酸侧链为 疏水基团。所述术语意图包括天然存在和非天然存在的α-氨基酸。所关注 的天然存在的非极性氨基酸残基包括天然存在的疏水残基。

[0532] 术语“疏水氨基酸”和“疏水残基”可互换使用以指代其中侧链基团 为疏水基团的氨基酸残基。所述术语意图包括天然存在和非天然存在的α- 氨基酸。所关注的天然存在的疏水残基包括丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、 苯丙氨酸、脯氨酸和缬氨酸。

[0533] 术语“极性氨基酸”和“极性残基”可互换使用以指代其中侧链基团 包括极性基团或带电基团的氨基酸残基。在某些情况下,极性基团能够为 氢键供体或受体。所述术语意图包括天然存在和非天然存在的α-氨基酸。 所关注的天然存在的极性残基包括精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、组氨酸、 赖氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、甲硫氨酸、谷氨酸、

谷氨 酰胺和色氨酸。

[0534] 术语“支架”和“支架结构域”可互换使用,且是指参考肽框架基序,本发明肽化合物由所述参考肽框架基序产生,或针对所述参考肽框架基序 能够例如经由序列或结构比对方法比较本发明肽化合物。支架结构域的结 构基序可基于天然存在的蛋白质结构域结构。对于特定蛋白质结构域结构 基序,可以有几个相关的基础序列,其中任何一个可提供支架结构域的特 定三维结构。支架结构域可根据特征共有序列基序界定。图14显示了基于16个相关的天然存在的蛋白质结构域序列的比对和比较的GA支架结构域 的一个可能的共有序列,所述蛋白质结构域序列提供了GA支架结构域的 三螺旋束结构基序。

[0535] 术语“亲本氨基酸序列”、“亲本序列”和“亲本多肽”是指包含氨基 酸序列的多肽,变异肽化合物由所述氨基酸序列产生且针对所述氨基酸序 列比较所述变异肽化合物。亲本多肽缺乏本文所公开的修饰或变异氨基酸 中的一或多者,且与如本文所公开的变异肽化合物相比可在功能上有所不 同。亲本多肽可为天然结构域序列(例如,SEQ ID NO:2-21)、具有预先存 在的氨基酸序列修饰(例如已知赋予所述结构域所需物理特性,例如提高的稳定性或溶解性的任何合宜的点突变或截短)的天然结构域支架序列,或非天然存在的共有序列(例如,基于数个所关注的天然结构域的共有基 序的序列,参见例如图14)。

[0536] 术语“对应残基”和“对应于…的残基”用于指位于变异和亲本序列 的等效位置的氨基酸残基,例如,如图13中所示的GA结构域编号方案所 界定。应理解,图13的编号方案并不意味着界定本发明化合物的序列中必 须包括的最小或最大残基数目。基于53残基编号方案的本发明化合物可包 括足以保留三螺旋束结构基序的任何合宜数目的残基。在一些情况下,本 发明化合物包括少于53个残基,包括N末端和/或C末端截短序列(例如,如本文所描述)。

[0537] 术语“变异氨基酸”和“变异残基”可互换使用以指代通过与基础支 架结构域相比经修饰或突变的本发明化合物的特定残基。变异残基涵盖那 些经选择(例如经由镜像筛选、亲和力成熟和/或点突变)以提供与目标特 异性结合的所需结构域基序结构的残基。当与支架结构域相比,化合物在 特定位置处包括氨基酸突变或修饰时,位于那些特定位置处的肽化合物的 氨基酸残基被称为“变异氨基酸”。此类变异氨基酸可赋予所得肽化合物不同的功能,例如与目标蛋白的特异性结合、提高的水溶性、易于化学合成、代谢稳定性等。本公开的方面包括肽化合物,其选自基于GA支架结构域 的噬菌体展示库且经进一步开发(例如,经由额外亲和力成熟和/或点突变),且因此包括与GA支架结构域整合的数种变异氨基酸。

[0538] 术语“变异结构域”和“变异基序”是指并入在支架结构域的特定位 置处的变异氨基酸的布置。变异基序可涵盖残基的连续和/或不连续序列。变异基序可涵盖位于化合物结构的一个面处的变异氨基酸。变异结构域可 视为并入到基础支架结构域结构或序列中或与其整合。在本发明化合物中,支架结构域可提供例如天然存在的蛋白质结构域的稳定三维蛋白质结构基 序,而变异结构域可由能够特异性结合目标蛋白的结构的经修饰表面处特 征最小数目的变异残基的布置界定。

[0539] 术语“框架残基”是指不为变异氨基酸的肽化合物的支架结构域的残 余氨基酸残基。因此,由框架残基构成的结构或序列基序由基础支架结构 域结构或序列的残基的对应布置界定。本发明化合物的序列和结构可由变 异和框架残基的组合界定。

[0540] 术语“突变”是指相对于参考序列,例如支架序列,氨基酸残基或核 苷酸残基的缺失、插入或取代。

[0541] 术语“结构域”是指氨基酸残基的连续或不连续序列。结构域可包括 一个或多个区或区段。术语“区”和“区段”可互换使用以指代氨基酸残 基的连续序列,其在一些情况下可界定特定二级结构特征。

[0542] 术语“非核心突变”是指肽化合物的氨基酸突变,其位于结构中不为 所述结构的疏水核心的一部分的位置处。肽化合物的疏水核心中的氨基酸 残基未显著溶剂暴露,而是倾向于形成分子内疏水接触。用于指定疏水核 心残基的方法由Dahiyat等人(“探测堆积特异性在蛋白质设计中的作用 (Probing the role of packing specificity in protein design)”,美国国家科学院 院刊,1997,94,10172-10177)描述,其中使用PDB结构来计算哪些侧链将 其表面积的少于10%暴露于溶剂。在一些情况下,德拉多七肽重复模型(DeGrado等人“三链卷曲螺旋和三螺旋束的分析和设计”,折叠与设计 1998,3:R29-R40)可用于界定疏水核心的“a”和“d”残基,如图6中所 描绘。可修改此类方法以与GA结构域支架一起使用。

[0543] 术语“表面突变”是指支架结构域中位于结构的溶剂暴露位置处的氨 基酸突变。在D-肽化合物的表面位置处的此类变异氨基酸残基可能够直接 与目标分子相互作用,而无论此类相互作用是否发生。在一些情况下,可 利用德拉多七肽重复模型来界定高度溶剂暴露的“c”和“g”残基,如图6 中所描绘。

[0544] 术语“边界突变”是指支架中的氨基酸突变,其位于结构中疏水核心 与溶剂暴露表面之间的边界位置处。在肽化合物的边界位置处的此类变异 氨基酸残基可部分地接触疏水核心残基和/或部分地溶剂暴露,且能够与目 标分子进行一定相互作用,而无论此类相互作用是否发生。描述结构的核 心、表面和边界残基的一个准则由Mayo等人自然:结构生物学(Nature Structural Biology),5(6),1998,470-475描述。在一些情况下,可利用德拉 多七肽重复模型来界定至少部分溶剂暴露的“c”和“g”残基,如图6和 7B中所描绘。可修改此类方法和准则以与本发明化合物一起使用。

[0545] 术语“连接序列”是指氨基酸残基或其类似物的连续序列,所述序列 连接两个肽基序或区。在某些情况下,连接序列为连接两个反向平行螺旋 区的环或转角区(例如,如本文所描述)。

[0546] 术语“稳定”是指能够在某一温度下维持在生理条件下的折叠状态, 使得其保留至少一种其正常功能活性例如与目标蛋白的结合的化合物。化 合物的稳定性可使用标准方法确定。举例来说,化合物的“热稳定性”可 通过测量热熔融(“Tm”)温度来确定。Tm是一半化合物变成非折叠的温 度,以℃为单位。在一些情况下,Tm越高,化合物越稳定。

[0547] 术语“类似”、“保守”和“高度保守”氨基酸取代如下表6中所示界 定。对氨基酸残基取代是否类似、保守或高度保守的确定可基于氨基酸残 基的侧链而非多肽主链。

[0548] 表6:氨基酸取代的分类

[0549]

本发明多肽中的氨基酸	类似氨基酸取代	保守氨基酸取代	高度保守氨基酸取代
甘氨酸(G)	A,S,N	A	n/a
丙氨酸(A)	S,G,T,V,C,P,Q	S,G,T	S
丝氨酸(S)	T,A,N,G,Q	T,A,N	T,A

苏氨酸(T)	S,A,V,N,M	S,A,V,N	S
半胱氨酸(C)	A,S,T,V,I	A	n/a
脯氨酸(P)	A,S,T,K	A	n/a
甲硫氨酸(M)	L,I,V,F	L,I,V	L,I
缬氨酸(V)	I,L,M,T,A	I,L,M	I
亮氨酸(L)	M,I,V,F,T,A	M,I,V,F	M,I
异亮氨酸(I)	V,L,M,F,T,C	V,L,M,F	V,L,M
苯丙氨酸(F)	W,Y,L,M,I,V	W,L	n/a
酪氨酸(Y)	F,W,H,L,I	F,W	F
色氨酸(W)	F,L,V	F	n/a
天冬酰胺(N)	Q	Q	Q
谷氨酰胺(Q)	N	N	N
天冬氨酸(D)	E	E	E
谷氨酸(E)	D	D	D
组氨酸(H)	R,K	R,K	R,K
赖氨酸(K)	R,H,O	R,H,O	R,O
精氨酸(R)	K,H,O	K,H,O	K,O
鸟氨酸(O)	R,H,K	R,H,K	K,R

[0550] “特异性决定基序”是指在变异支架结构域的特定位置处并入的变异氨 基酸的布置,其提供变异结构域与目标蛋白的特异性结合。基序可以涵盖 残基的连续和/或非连续序列。基序可涵盖位于化合物结构的一个面处且能 够与目标蛋白接触的变异氨基酸,或可涵盖不提供与目标的接触,而是提 供增强与目标的结合的对天然结构域结构的修饰的变异残基。基序可以视 为并入基础支架结构域结构或序列,例如天然存在的GA或Z结构域的三 螺旋束中,或与三螺旋束整合。

[0551] “特异性结合”到目标蛋白的表位或结合位点的化合物为所属领域中所 熟知的术语,且确定此类特异性或优先结合的方法也为所属领域中所熟知 的。如果与替代细胞或物质相比,化合物与特定细胞或物质(目标蛋白) 的缔合更频繁、更迅速、具有更长持续时间和/或具有更大亲和力,那么所 述化合物展现“特异性结合”。如果D-肽化合物相比于其与其它物质结合, 以更大亲和力、亲合力、更容易和/或以更长持续时间结合,那么其“特异性结合”到目标。举例来说,与VEGF表位或位点特异性或优先结合的化 合物是相比于其与其它VEGF表位或非VEGF表位结合,以更大亲和力、亲合力、更容易和/或以更长持续时间结合此表位或位点的抗体。通过阅读 此定义还应理解,例如特异性或优先结合到第一目标的化合物可或可不特 异性或优先结合到第二目标。因此,“特异性结合”不一定需要(不过可包 括)排它性结合。通常但不一定,提及结合意味着特异性结合。

[0552] 化合物可含有一个或多个不对称中心并且可能因此产生对映异构体、非对映异构体和其它立体异构形式,其可以根据绝对立体化学定义为(R)-或(S)-或针对氨基酸和多肽定义为(D)-或(L)-。本公开意图包括所 有这类可能的异构体以及其外消旋、非对映异构和光学纯形式。当本文所 描述的化合物含有烯烃双键或其它几何不对称中心时,并且除非另外规定, 否则预期化合物包括E和Z几何异构体两者。同样地,还打算包括所有互 变异

构形式。

[0553] 术语“目标蛋白”是指目标家族的全部成员,以及其片段和对映异构 体,以及其蛋白质模拟物。除非另外明确描述,否则本文中描述的所关注 的目标蛋白旨在包括目标家族的全部成员,以及其片段和对映异构体,以 及其蛋白质模拟物。目标蛋白可以是任何所关注的蛋白,例如治疗性或诊 断性目标。术语“目标蛋白”旨在包括重组和合成分子,其可以使用任何 合宜的重组表达方法或使用任何合宜的合成方法制备或商业购买;以及含 有目标分子的融合蛋白,以及合成L-蛋白或D-蛋白。

[0554] 如本文所用,术语“VEGF”或其非缩写形式“血管内皮生长因子”是 指由VEGF基因编码的蛋白质产物。术语VEGF包括VEGF家族的全部成 员,例如VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E以及其片段和 对映异构体。术语VEGF旨在包括重组和合成VEGF分子,其可以使用任 何合宜的重组表达方法或使用任何合宜的合成方法制备或商业购买(例如R &D Systems,目录号210-TA,明尼苏达州明尼阿波利斯(Minneapolis, Minn.));以及含有VEGF分子的融合蛋白以及合成L-蛋白或D-蛋白。VEGF 参与血小管生成(胚胎循环系统的从头形成)和血管生成(现有脉管的血 管生长),并且还可以在称为淋巴管生成的过程中参与淋巴管生长。VEGF 家族的成员通过结合到细胞表面上的酪氨酸激酶受体(VEGFR)来刺激细 胞反应,使得其二聚合且经由转磷酸化而被活化。VEGF受体具有含有7 个免疫球蛋白样结构域的胞外部分、单一跨膜横跨区和含有分裂的酪氨酸 激酶结构域的胞内部分。VEGF-A结合到VEGFR-1(Flt-1)和VEGFR-2 (KDR/Flk-1)。VEGFR-2似乎介导对VEGF的几种细胞反应。VEGF、其生 物活性和其受体得到充分研究,且描述于Matsumoto等人(VEGF受体信 号转导Sci STKE.(VEGF receptor signal transduction Sci STKE.) 2001:RE21)和Marti等人(缺血性疾病中的血管生成(Angiogenesis in ischemic disease),血栓与止血(Thromb Haemost),1999增刊1:44-52)。示例性VEGF的氨基酸序列见于NCBI的Genbank数据库中,且VEGF蛋 白和其在各种疾病和病况中的作用的完整说明见于NCBI的线上人类孟德 尔遗传数据库(Online Mendelian Inheritance in Man database)。

[0555] 示例性实施例

[0556] 本公开的各方面体现在下文阐述的条项和示例性实施例中。

[0557] 条项1.一种D-肽化合物,其特异性结合VEGF-A,条件是所述化 合物不包含GB1结构域支架。

[0558] 条项2.根据条项1所述的D-肽化合物,其包含:VEGF-A结合二 螺旋复合物,所述复合物包含在一起界定VEGF-A结合面的至少两个反向 平行螺旋区[螺旋A]和[螺旋B],所述VEGF-A结合面包含六个或更多个独 立地选自非极性、芳香族、杂环和碳环残基的VEGF-A接触残基。

[0559] 条项3.根据条项2所述的D-肽化合物,其中[螺旋A]和[螺旋B] 各自包含七肽重复序列$(abcdefg)_n$,且其中所述六个或更多个VEGF-A接触 残基位于七肽重复序列的c和g位置处。

[0560] 条项4.根据条项1所述的D-肽化合物,其包含:

[0561] VEGF-A结合三螺旋束,其包含螺旋区[螺旋1]、[螺旋2]和[螺旋3], 所述螺旋区各自包含七肽重复序列$(abcdefg)_n$,并且被配置成界定基本上包 含a和d残基的疏水核心;

[0562] 其中[螺旋2]和[螺旋3]彼此反向平行配置,且在一起界定所述三螺 旋束的VEGF-

A结合g-g面，所述VEGF-A结合g-g面包含六个或更多个 独立地选自非极性、芳香族、杂环和碳环残基的VEGF-A接触残基。

[0563] 条项5.根据条项4所述的D-肽化合物，其中所述三螺旋束为式(I) 的GA结构域基序：

[0564] [螺旋1]-[连接子1]-[螺旋2]-[连接子2]-[螺旋3]

[0565] (I)

[0566] 其中[连接子1]和[连接子2]独立地为1与10个残基之间的肽连接序列。

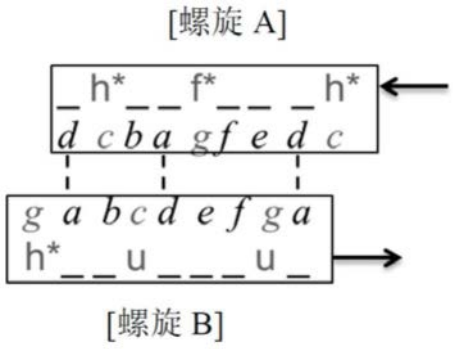
[0567] 条项6.根据条项4至5中任一项所述的D-肽化合物，其中所述六个 或更多个VEGF-A接触氨基酸残基包含四个或更多个芳香族氨基酸残基，所述芳香族氨基酸残基被配置成接触VEGF-A且位于所述g-g面的c和g 溶剂暴露位置处。

[0568] 条项7.根据条项4至6中任一项所述的D-肽化合物，其中[螺旋2] 包含七肽重复序列[$c^1d^1e^1f^1g^1a^2b^2c^2d^2$]，且[螺旋3]包含七肽重复序列 [$e^1f^1g^1a^2b^2c^2d^2e^2f^2g^2a^3b^3c^3d^3e^3$]，其中：

[0569] [螺旋2]的残基d^2、a^2和d^1与[螺旋3]的残基a^2、d^2和a^3相互作用；且

[0570] [螺旋2]的残基c^2、g^1和c^1和[螺旋3]的残基g^1各自独立地为芳香族、杂环或碳环残基。

[0571] 条项8.根据条项2至7中任一项所述的D-肽化合物，其中所述 VEGF-A结合表面包含位于螺旋A和螺旋B的七肽重复序列的c和g位置 处的VEGF-A接触残基的以下配置：

[0572] 

[0573] 其中：

[0574] 各h*独立地为组氨酸或其类似物；

[0575] f*为苯丙氨酸或其类似物；且

[0576] 各u独立地为非极性氨基酸残基。

[0577] 条项9.根据条项4至5中任一项所述的D-肽化合物，其中：

[0578] [螺旋2]包含以下式的序列：

[0579] h*jxxf*jxh*j(SEQ ID NO:151)

[0580] [螺旋3]包含以下式的序列：

[0581] h*jxujxxuj(SEQ ID NO:152)

[0582] 其中：

[0583] 各h*独立地为组氨酸或其类似物；

[0584] f*为苯丙氨酸或其类似物；

[0585] 各u独立地为非极性氨基酸残基。

[0586] 各j独立地为疏水残基;且

[0587] 各x独立地为氨基酸残基。

[0588] 条项10.根据条项9所述的D-肽化合物,其中[螺旋2]由以下式的序列 界定:

[0589] zh*jxxf*jxh*jz(SEQ ID NO:153)

[0590] 其中各z独立地为螺旋终止残基。

[0591] 条项11.根据条项10所述的D-肽化合物,其中各螺旋终止残基(z) 独立地选自d、p和G。

[0592] 条项12.根据条项5至11中任一项所述的D-肽化合物,其中[连接子 2]的长度为2个氨基酸残基或更少,且包含酪氨酸残基或其类似物。

[0593] 条项13.根据条项5至12中任一项所述的D-肽化合物,其中[螺旋 2]-[连接子2]-[螺旋3]包含以下式的序列:

[0594] zh*jxxf*jxh*jzy*xxh*jxujxxujx(SEQ ID NO:154)

[0595] 其中:

[0596] y*为酪氨酸或其类似物;

[0597] 各h*独立地为组氨酸或其类似物;

[0598] f*为苯丙氨酸或其类似物;

[0599] 各u独立地为非极性氨基酸残基。

[0600] 各j独立地为疏水残基;且

[0601] 各x独立地为氨基酸残基。

[0602] 条项14.根据条项5至13中任一项所述的D-肽化合物,其中[连接 子1]具有以下式的序列

[0603] $z(x)_n e*z$(SEQ ID NO:148)

[0604] 其中:

[0605] 各x为氨基酸且n为1、2或3;

[0606] 各z独立地为螺旋终止残基(例如,G或p);且

[0607] e*为谷氨酸或其类似物。

[0608] 条项15.根据条项5至14中任一项所述的D-肽化合物,其中[连接 子1]-[螺旋2]-[连接子2]-[螺旋3]包含以下式的序列:

[0609] zxxe*zh*jxxf*jxh*jzy*xxh*jxujxxujx(SEQ ID NO:155)

[0610] 其中:

[0611] e*为谷氨酸或其类似物;

[0612] 各z独立地为螺旋终止残基;

[0613] y*为酪氨酸或其类似物;

[0614] 各j独立地为疏水残基;

[0615] 各u独立地为非极性氨基酸残基;且

[0616] 各x独立地为氨基酸残基。

[0617] 条项16.根据条项4至15中任一项所述的D-肽化合物,其中[螺旋2]由以下式的序列界定:

[0618] $z^{26}hj^{28}xxfj^{32}xhj^{35}z^{36}$(SEQ ID NO:101)。

[0619] 其中：

[0620] z^{26}选自d、p和G；

[0621] z^{36}选自p和G；

[0622] j^{28}、j^{32}和j^{35}各自独立地为疏水残基；且

[0623] 各x独立地为氨基酸残基。

[0624] 条项17.根据条项16所述的D-肽化合物，其中j^{28}、j^{32}和j^{35}独立地 选自a、i、l和v。

[0625] 条项18.根据条项17所述的D-肽化合物，其中j^{28}、j^{32}和j^{35}为选自 2019年6月24日提交的U.S.62/865,469的SEQ ID NO:1-21中的任一者的 GA支架结构域的对应残基。

[0626] 条项19.根据条项4至18中任一项所述的D-肽化合物，其中[螺旋 2]由选自以下的序列界定：

[0627] a)phv$x^{29}x^{30}fix^{33}$hap(SEQ ID NO:102)

[0628] 其中：

[0629] x^{29}选自f和i；

[0630] x^{30}和x^{33}独立地选自极性氨基酸残基；和

[0631] b)与a)中所界定的序列具有80％或更高同一性(例如，2个残基变 化)的氨基酸序列。

[0632] 条项20.根据条项19所述的D-肽化合物，其中：

[0633] x^{29}为i；

[0634] x^{30}为s或n；且

[0635] x^{33}为n。

[0636] 条项21.根据条项4至20中任一项所述的D-肽化合物，其中[螺旋 3]由以下式的序列界定：

[0637] xxhj^{41}xuj^{44}xxuj^{48}xxx(SEQ ID NO:103)

[0638] 其中：

[0639] j^{41}、j^{44}和j^{48}各自独立地为疏水残基；

[0640] 各u独立地为非极性氨基酸残基；且

[0641] 各x独立地为氨基酸残基。

[0642] 条项22.根据条项21所述的D-肽化合物，其中j^{41}、j^{44}和j^{48}独立地选 自a、i、l和v。

[0643] 条项23.根据条项21所述的D-肽化合物，其中j^{41}、j^{44}和j^{48}为选自2019 年6月24日提交的U.S.62/865,469的SEQ ID NO:1-21的GA支架结构域 的对应残基。

[0644] 条项24.根据条项21所述的D-肽化合物，其中[螺旋3]由选自以下的 序列界定：

[0645] a)$x^{38}x^{39}$hvx^{42}Glx$^{45}x^{46}$aix$^{49}x^{50}$a(SEQ ID NO:98)

[0646] 其中：

[0647] x^{38}选自v、e、k、r；

[0648] x^{39}、x^{42}、x^{46}和x^{50}独立地选自亲水氨基酸残基(例如，n、s、d、e和 k)；且

[0649] x^{45}和x^{49}独立地选自l、k、r和e；和

[0650] b)与a)中所界定的序列具有80％或更高同一性(例如，2个残基变 化)的氨基酸序列。

[0651] 条项25.根据条项24所述的D-肽化合物，其中：x^{38}为v；x^{39}为s；x^{42}为n；x^{45}为k，x^{46}为

n;x^{49}为l;且x^{50}为k。

[0652] 条项26.根据条项4至25中任一项所述的D-肽化合物,其中所述化合 物的VEGF-A结合结构域相对于参考GA支架序列包含6个或更多个变异 氨基酸残基,其中所述6个或更多个变异氨基酸选自:位置25处的e;位 置26处的p;位置27处的h;位置28处的v;位置29处的i;位置30处 的s;位置31处的f;位置34处的h;位置36处的p;位置37处的y;位 置39处的s;位置40处的h;位置43处的G;和位置47处的a。

[0653] 条项27.根据条项26所述的D-肽化合物,其中所述化合物包含位置 26处的p、位置31处的f和位置36处的p。

[0654] 条项28.根据条项26所述的D-肽化合物,其中所述化合物包含以下变 异氨基酸:位置26处的p、位置29处的i和位置30处的s。

[0655] 条项29.根据条项26至28中任一项所述的D-肽化合物,其中所述化 合物包含位置27、34和40处的h。

[0656] 条项30.根据条项26至29中任一项所述的D-肽化合物,其中所述化 合物包含位置43处的G;和位置47处的a。

[0657] 条项31.根据条项26至30中任一项所述的D-肽化合物,其中所述化 合物包含位置28处的v。

[0658] 条项32.根据条项1至31中任一项所述的D-肽化合物,其中所述化 合物包含选自以下的氨基酸序列:

[0659] a)llknakedaiaelkkcGitephvisfinhapyvshvnGlknailka;和

[0660] b)与a)中所界定的序列具有85%或更高同一性的氨基酸序列。

[0661] 条项33.根据条项4至32中任一项所述的D-肽化合物,其中[螺旋1] 包含选自以下的序列:a)l^{6}lknakedaiaelkka^{21}(SEQ ID NO:74);和b)与a) 中所界定的序列具有75%或更高同一性的氨基酸序列。

[0662] 条项34.根据条项1至33中任一项所述的D-肽化合物,其中所述化合 物包含选自以下的序列:a)G^{22}itephvisfinhapyvshvnGlknailka^{51}(SEQ ID NO: 84);和b)与a)中所界定的序列具有75%或更高同一性的氨基酸序列。

[0663] 条项35.根据条项1至34中任一项所述的D-肽化合物,其中所述化合 物包含选自以下的肽框架序列:a) l^{6}lknakedaiaelkkaGit……in.a..v..vn..kn.ilka^{51}(SEQ ID NO:156);和b)与a) 中所界定的序列具有88%或更高同一性的氨基酸序列。

[0664] 条项36.根据条项1至35中任一项所述的D-肽化合物,其中所述化合 物包含选自以下的肽框架序列:a) t^{1}idqwllknakedaiaelkkaGit……in.a..v..vn..kn.ilkaha^{53}(SEQ ID NO:157);和 b)与a)中所界定的序列具有90%或更高同一性的氨基酸序列。

[0665] 条项37.根据条项1至36中任一项所述的D-肽化合物,其中所述化合 物包含选自2019年6月24日提交的U.S.62/865,469的SEQ ID NO:22-71 的序列。

[0666] 条项38.根据条项1至37中任一项所述的D-肽化合物,其进一步包含 连接的非蛋白质聚合物部分。

[0667] 条项39.根据条项1至37中任一项所述的D-肽化合物,其进一步包含 连接的特异性结合部分。

[0668] 条项40.根据条项39所述的D-肽化合物,其中所述连接的特异性结合 部分为第二

D-肽结合结构域。

[0669] 条项41.根据条项39-40中任一项所述的D-肽化合物,其中所述化合 物包含VEGF结合GA结构域的多聚配置。

[0670] 条项42.根据条项40至41中任一项所述的D-肽化合物,其中化合物 为同二聚体且包含两个连接的VEGF-A结合GA结构域。

[0671] 条项43.根据条项42所述的D-肽化合物,其中所述VEGF-A结合GA 结构域通过N末端残基经由聚合连接子连接。

[0672] 条项44.根据条项42所述的D-肽化合物,其中VEGF-A结合GA结构 域基序通过N末端残基经由肽连接子连接。

[0673] 条项45.根据条项40至41中任一项所述的D-肽化合物,其中所述化 合物为异二聚体。

[0674] 条项46.根据条项45所述的D-肽化合物,其中所述第二D-肽结合结 构域特异性结合选自以下的目标蛋白:PDGF、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、 EGF、EGFR、Her2、Her3、PD-1、PD-L1、CTLA4、OX-40、DR3、Ang-2、 LAG3、HSA和Ig。

[0675] 条项47.根据条项1至46中任一项所述的D-肽化合物,其中所述化合 物以100nM或更低(例如,30nM或更低、10nM或更低、3nM或更低、 1nM或更低等)的K_D值特异性结合到VEGF-A蛋白。

[0676] 条项48.根据条项1至47中任一项所述的D-肽化合物,其中所述 VEGF结合GA结构域包含45个与60个之间的残基(例如,46个与55个 之间的残基、50个与54个之间的残基等)。

[0677] 条项49.一种药物组合物,其包含根据条项1至48中任一项所述的 D-肽化合物或其药学上可接受的盐以及药学上可接受的赋形剂。

[0678] 条项50.根据条项49所述的药物组合物,其中所述组合物被配制成用 于治疗眼部疾病或病况。

[0679] 条项51.一种治疗或预防受试者的与血管生成相关的疾病或病况的方 法,所述方法包含向有需要的受试者施用有效量的根据条项1至48中任一 项所述的化合物,或有效量的根据条项49至50中任一项所述的药物组合 物。

[0680] 条项52.根据条项51所述的方法,其中所述与血管生成相关的疾病或 病况为癌症(例如,乳癌、皮肤癌、结肠直肠癌、胰脏癌、前列腺癌、肺 癌或卵巢癌)、发炎性疾病、动脉粥样硬化、类风湿性关节炎、黄斑变性、 视网膜病变和皮肤疾病(例如,红斑痤疮(rosacea))。

[0681] 条项53.根据条项51所述的方法,其中所述与血管生成相关的疾病或 病况为糖尿病性黄斑水肿(DME)。

[0682] 条项54.根据条项51所述的方法,其中所述与血管生成相关的疾病或 病况为湿性年龄相关黄斑变性(AMD)。

[0683] 条项55.根据条项51至54中任一项所述的方法,其进一步包含向所 述受试者施用有效量的第二活性剂。

[0684] 条项56.根据条项55所述的方法,其中所述第二活性剂为D-肽化合 物。

[0685] 条项57.根据条项55所述的方法,其中所述第二活性剂为小分子、化 学治疗剂、抗体、抗体片段、适体或L-蛋白。

[0686] 条项58.根据条项55至57中任一项所述的方法,其中所述第二活性 剂特异性结合选自以下的目标蛋白:血小板衍生生长因子(PDGF)、 VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、EGF、EGFR、Her2、Her3、PD-1、PD-L1、 CTLA4、OX-40、DR3、LAG3、Ang2、IL-1、IL-6和IL-17。

[0687] 条项59.根据条项55所述的方法,其中所述第二活性剂特异性结合 PDGF-B。

[0688] 条项60.根据条项55所述的方法,其中所述第二活性剂选自:派勒兰 尼(福维斯塔)、兰尼单抗(乐舒晴)、曲妥珠单抗(贺癌平)、贝伐单抗(癌 思停)、阿柏西普(采视明)、纳武单抗、阿特珠单抗、德瓦鲁单抗、吉非 替尼、埃罗替尼和派姆单抗。

[0689] 条项61.一种用于对与血管生成相关的疾病或病况进行活体内诊断或 成像的方法,其包含向受试者施用根据条项1至49中任一项所述的D-肽 化合物,以及对所述受试者的至少一部分进行成像。

[0690] 条项62.根据条项61所述的方法,其中所述成像包括PET成像,且所 述施用包括向所述受试者的血管系统施用所述化合物。

[0691] 条项63.根据条项61所述的方法,其进一步包含检测细胞受体对所述 化合物的摄取。

[0692] 条项64.根据条项61所述的方法,其进一步包含向所述受试者施用癌 思停,其中所述疾病或病况为与癌症相关的病况。

[0693] 以下实例通过说明而非限制的方式提供。

[0694] 实例

[0695] 提出以下实例以便向本领域普通技术人员提供如何制造和使用本发明 的完整公开内容和描述,并且不旨在限制诸位发明人考虑作为其发明的范 围,也不旨在表示以下实验是进行的全部或仅有的实验。已努力确保关于 所使用的数字(例如量、温度等)的准确性,但应当考虑到存在一些实验 性误差和偏差。除非另外指明,否则份数是重量份,分子量是重量平均分 子量,温度以摄氏度计,并且压力是大气压或接近大气压。

[0696] 分子和细胞生物化学中的通用方法可见于例如以下标准教科书:分子 克隆:实验指南(Molecular Cloning:A Laboratory Manual),第3版 (Sambrook等人,Harbor Laboratory Press 2001);分子生物学简明方案(Short Protocols in Molecular Biology),第4版(Ausubel等人编,约翰威立1999); 蛋白质方法(Protein Methods)(Bollag等人,约翰威立1996);用于基 因疗法的非病毒载体(Nonviral Vectors for Gene Therapy)(Wagner等人编, 学术出版社(Academic Press)1999);病毒载体(Viral Vectors)(Kaplift 和Loewy编,学术出版社1995);免疫学方法手册(Immunology Methods Manual)(I.Lefkovits编,学术出版社1997);以及细胞和组织培养:生 物技术实验室程序(Cell and Tissue Culture:Laboratory Procedures in Biotechnology)(Doyle和Griffiths,约翰威立1998),这些文献的公开内 容以引用方式并入本文中。用于本公开中所提及的方法或与本公开相关的 方法的试剂、克隆载体、细胞和试剂盒可获自商业供应商,例如伯乐 (BioRad)、安捷伦科技(Agilent Technologies)、赛默飞世尔科技(Thermo Fisher Scientific)、西格玛奥德里奇(Sigma-Aldrich)、新英格兰生物实验 室(New England Biolabs;NEB)、宝生物美国公司(Takara Bio USA,Inc.) 等,以及存储库,例如Addgene,Inc.、美国菌种保藏中心(American Type Culture Collection;ATCC)等。

[0697] 实例1:D-肽化合物的选择

[0698] 使用如由Uppalapati等人在WO2014/140882中所描述的方法，经由针 对与合成D-VEGF-A目标蛋白的结合对支架化GA结构域噬菌体展示库进 行镜像筛选，鉴别本发明化合物。图13显示了GA结构域库的描述，其包 括基础53残基支架序列(SEQ ID NO:2)和以粗体显示的在支架的位置25、 27、28、31、34、36、37、39、40、43、44和47处的突变位置，所述位置界定了噬菌体展示库中的变异。

[0699] 简单来说，将5μg/ml D-VEGFA涂布在NUNC Maxisorp板中。阻断后， 将包括GA结构域库的8个支架库的池在空孔上耗乏后添加到板上。洗脱 结合的噬菌体，且在OmniMax2 T1R细胞中扩增过夜。对于第3轮和第4 轮，与约1×10^{13}cfu/ml的标准浓度相比，使用扩增噬菌体池的较低浓度(约 5×10^{11}cfu/ml)，因为在第2轮中的洗脱浓度过高。自各种库中获得了数次 命中，包括来自GA结构域库的17种不同序列。基于克隆之间的序列同一 性，选择包括化合物1的3种代表性克隆(参见图15)用于进一步优化。 克隆到p3融合载体中进行亲和力成熟后，化合物1保持与D-VEGFA的结 合。

[0700] 对于第一轮亲和力成熟，利用软随机化策略(Fairbrother等人，1998)， 其中编码随机化位置25、27、28、31、34、36、37、39、40、43、44和47 中的每一者的多核苷酸掺杂有手工混合的碱基，使得以70％偏向天然核苷 酸，且其它三种核苷酸以10％频率出现。这使得有40％的机会在这些位置 中的每一个中保留在化合物1的亲本序列中发现的氨基酸。通过定点诱变 方案(Fellouse等人)，使用以下寡核苷酸和来自GA结构域原始序列的 ssDNA作为模板，构建亲和力成熟库。

[0701] AAGGCTGGTATCACC(N4)(N2)(N4)GAC(N2)(N1)(N4)(N3)(N4)(N4) TTCAAC(N4)(N4)(N4)ATCAAT(N4)(N1)(N4)GCG(N2)(N2)(N4) (N4)(N1)(N4)GTG(N4)(N2)(N4)(N3)(N1)(N4)GTTAAC(N3)(N2)(N1) (N2)(N4)(N3)AAGAAC(N3)(N1)(N3)ATCCTGAAAGCTCAC(SEQ ID NO:130)

[0702] 其中N1为70％A、10％C、10％G和10％T的混合物

[0703] N2为10％A、70％C、10％G和10％T的混合物

[0704] N3为10％A、10％C、70％G和10％T的混合物

[0705] N4为10％A、10％C、10％G和70％T的混合物

[0706] 使用标准程序(Fellouse等人)针对D-VEGFA淘选亲和力成熟库。分 析了来自第3轮的24个克隆，且进行竞争性ELISA以按亲和力对其进行 分级。自此列表中选择化合物1.1作为所关注克隆。所有克隆的选定位置的 序列标识显示在图26中，与化合物1和天然GA结构域(GA-wt)进行比 较。在此项研究中，位置27、28、31、36和44在所有克隆中均高度保守或保留为His27、Val28、Phe31、Pro36和Leu44。位置34中芳香族残基 His、Tyr和Phe占主导。位置40中His或Asp残基占主导。位置47中Glu 或Ala占主导。

[0707] 进行第二轮亲和力成熟以提高化合物1.1的亲和力和稳定性。鉴于Pro 残基在位置36中在很大程度上保守，主链构形的变化可改变螺旋2相对于 核心残基的定向，且可能影响选定化合物1.1的稳定性。此外，C末端附近 的表面暴露残基可形成额外接触。因此，选择了包括核心和表面暴露位置 的以下位置以进行进一步优化：位置15、18、19、21、23、25、26、28、 29、30、47、48、49、50、51和52。再次将软随机策略与以下寡核苷酸一 起用于定点诱变

[0708] GCGAAAGAAGATGCT(N1)(N4)(N4)GCAGAA(N2)(N4)(N2) (N1)(N1)(N1)AAG(N2)(N2)

(N4)GGT(N1)(N4)(N2)ACC(N2)(N1)(N1) (N2)(N1)(N2)CAT(N2)(N4)(N4)(N4)(N4)(N2)(N1)(N1)(N2) TTTATCAATCACGCGC(SEQ ID NO:131)

[0709] GTTAACGGGCTGAAGAAC(N2)(N2)(N2)(N1)(N4)(N2)(N2)(N4)(N2) (N1)(N1)(N1)(N2)(N2)(N4)(N2)(N1)(N2)GCCGGGAGCTCTGGAG(SEQ ID NO:132)

[0710] 构建库且使用经修改方案针对D-VEGFA进行淘选。鉴于D-VEGF-A 高度稳定且即使在3M盐酸胍(GuHCl)下还保持折叠,假设在低中浓度 的变性剂存在下选择结合子可选择同时具有提高的亲和力和稳定性的克 隆。在此程序中,使库或扩增的噬菌体库再悬浮于PBT缓冲液(PBS,0.2% BSA,0.05%Tween20)中,且每轮选择使用不同浓度的变性剂盐酸胍(GuHCl)。噬菌体在37℃下培育2小时以便平衡。选择也在37℃下进行。每一轮使用以下条件。

[0711]

	D-VEGFA 涂层	缓冲液中的 GuHCl 浓度	洗涤
第 1 轮	5 μg/ml	0.5 M	8
第 2 轮	5 μg/ml	1 M	8
第 3 轮	5 μg/ml	1 M	8
第 4 轮	5 μg/ml	1.5 M	8

[0712] 四轮亲和力成熟后,对数个克隆进行测序,且经由利用竞争性ELISA 分析评定,选择化合物1.1.1作为所关注克隆。Cys21经鉴别为旁观者突变, 且恢复为Ala(例如,以消除二硫化物二聚化的可能性),得到所关注的主 导化合物,化合物1.1.1(C21A)。

[0713] 另外,针对与合成D-VEGF-A目标蛋白的结合筛选由Uppalapati等人 在WO2014/140882中所描述的多种支架化噬菌体展示库。数个支架化结构 域库在噬菌体展示筛选研究期间产生命中克隆,表明特异性结合VEGF-A 的本发明D-肽化合物可具有多种基础支架结构域中的一种。最初,从GA 结构域支架化库中选择命中克隆进行进一步研究。

[0714] 表7:产生针对D-VEGFA的命中的支架列表

[0715] SCF2-DGCR8二聚化结构域-56aa

[0716] SCF3-Get5 C末端结构域-41aa

[0717] SCF7-KorB C末端结构域-58aa

[0718] SCF8-Lsr2二聚化结构域-55aa

[0719] SCF15-Symfoil 4P(设计的β-三叶(beta-trefoil))-42aa

[0720] SCF24-Golgin245的GRIP结构域-51aa

[0721] SCF28-Ku的C末端结构域-51aa

[0722] SCF 32-蛋白G的GA结构域-53aa

[0723] SCF29-Cue2的Cue结构域-49aa

[0724] SCF37-PEM1样蛋白-44aa

[0725] SCF40-核苷酸交换因子C末端结构域-60aa

[0726] SCF42-转录因子抗终止蛋白-59aa

[0727] SCF44-This蛋白-65aa

[0728] SCF53-Rhodnin kazal抑制子-51aa

[0729] SCF55-抗TRAP-48aa

[0730] SCF56-TNF受体17(BCMA)-39aa

[0731] SCF63-Fyn SH3-61aa

[0732] SCF64-E3泛素-蛋白连接酶UBR5-65aa

[0733] SCF65-DNA修复核酸内切酶XPF-63aa

[0734] SCF66-rad23 hom.B,xpcb结构域-61aa

[0735] SCF70-伊默菌素(Emerin)的LEM结构域-47aa

[0736] SCF75-GspC-68aa

[0737] SCF95-蛋白Z-58aa

[0738] SCF96-蛋白G的B1结构域(GB1)-55aa

[0739] 实例2:D-肽化合物的合成和折叠

[0740] 使用常规的Fmoc固相肽合成方法来合成且纯化选定化合物。在一些情 况下,包括额外点突变,例如如本文所描述。如本文所描述,将化合物在 缓冲液中折叠且评定VEGF-A抑制活性。

[0741] 实例3:VEGF-A复合物的X射线晶体结构

[0742] 获得与L-VEGF-A复合的化合物1.1.1(C A)的X射线晶体结构。图1 表示了与VEGF-A(空间填充图)复合的示例性化合物1.1.1(c21a)(白色杆 状图)的X射线晶体结构的视图。复合物为二聚的。在图1和2中,与化 合物接触的VEGF-A的结合位点残基以粉红色描绘。VEGF-A(8-109)结 合位点残基以粗体指示:GQNHHEVV**KFMDVYQRSY**CH PIETLVDIFQEYPDEIE**YIFKP**SCVPLMRCGGCC**NDEGL**ECVPTEESNITM **QIMRIKPHQGQHI**GEMSFLQHNKCECRPKKD(SEQ ID NO:88);

[0743] 其中二聚体中的单个结合位点由以下残基界定:

[0744] 链A:KFMDVYQRSY(SEQ ID NO:89)和NDEGL(SEQ ID NO:90);和

[0745] 链B:YIFKP(SEQ ID NO:91)和IMRIKPHQGQHI(SEQ ID NO:92)。

[0746] 实例4:评定选定化合物的效力

[0747] 使用表面等离子体共振(SPR)分析测量所关注化合物对VEGF-A的 结合亲和力。

[0748] 表8:示例性L-肽化合物的D-VEGF-A结合亲和力

[0749]

化合物	K_d(M)
1.1	1.4×10^{-7}
1.1 (-tidqw)	4.5×10^{-7}

[0750] 在竞争性噬菌体ELISA分析中针对VEGF-A结合评定所关注化合物。

[0751] 表9:示例性L-肽化合物的D-VEGF-A结合活性

[0752]

化合物	IC_{50}（nM）
1.1	100-105
1.1.1	20-34
1.1（-kaha，adfl）	12
1.1（-kaha，edyl）	5
1.1（-kaha，Grtvp）	1-1.1
1.1（-kaha，edwyl）	5-5.4
1.1（-kaha，GehGsp）	14
1.1.1 (c21a)	7
1.1.1(c21a)（-kaha，Grtvp）	0.27-0.30
1.1.1(c21a)（-tidqw，-kaha，Grtvp）	0.42-0.66

[0753]

1.1.1(c21a)（-kaha，edwyl）	0.31-0.66
1.1.1(c21a)（-tidqw，-kaha，edwyl）	0.86-1.1

[0754] 在Octet分析中针对VEGF-A:VEGFR1的抑制评定所关注化合物。示 例性条件:10nM的VEGF-A,nM浓度的抑制剂;VEGF-A:VEGFR1 K_d＝25 pM。

[0755] 表10:VEGF-A:示例性D-肽化合物的VEGFR1抑制活性

[0756]

化合物	Octet分析IC_{50}效力(nM)
1.1	105
1.1.1	9

[0757] 表11:VEGF-A:示例性D-肽化合物的VEGFR1抑制活性

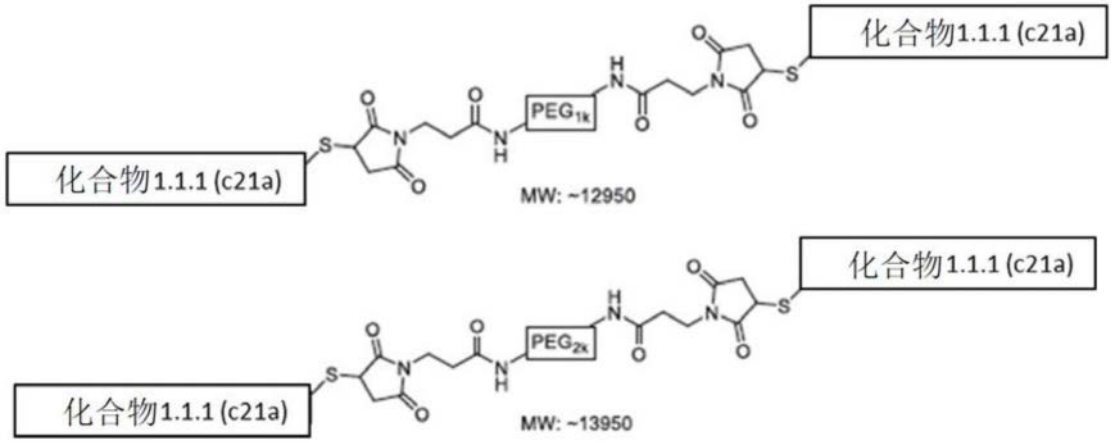
[0758]

化合物	80nM化合物下的抑制%
1.1.1(c21a)(c(Ac)54)	68
1.1.1(c21a)(-kaha,Grtvp)	27
1.1.1.2(pis)	27
1.1.1.2(pa,pis)	18
1.1.1.3(pis)	23

[0759] 实例5:二聚化合物的制备和评估

[0760] 通过使用半胱氨酸马来酰亚胺或二硫化物缀合化学将多种基于PEG的 连接子缀合到化合物的N或C末端,制备具有各种长度连接子的一系列经 修饰化合物1.1.1(c21a)的二聚体。在化合物的C末端或N末端处并入半胱 氨酸残基,且经由半胱氨酸-马来酰亚胺缀合化学利用双官能经修饰PEG连 接子实现二聚化。示例性二聚化合物的结构显示如下：

[0761]



[0762] 在octet分析中针对VEGF-A抑制活性分析所得二聚化合物。

[0763] 表12:通过Octet分析测量的对VEGF-A与VEGFR1受体结合的抑制

[0764]

连接子	N-N 二聚化	C-C 二聚化
二硫化物		35.3
PEG（3 个单元）	93.4	102.7
PEG（6 个单元）	95.7	101.7
PEG（11 个单元）（约 60 Å 长）	95.6*	95.4*
PEG（1000K MW）（约 100 Å 长）	94.3*	67.8*
PEG（2000K MW）（约 180 Å 长）	95.7*	98.9*

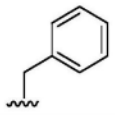
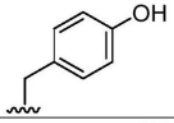
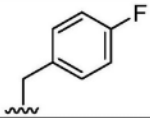
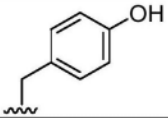
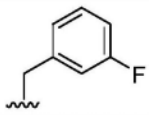
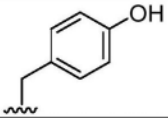
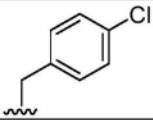
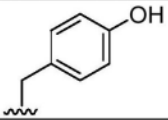
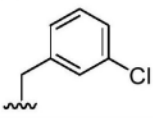
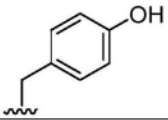
[0765] 条件:10nM的VEGF-A,20nM(或25nM*)的抑制剂;VEGF-A:VEGFR1 K_d=25pM。100%=100nM经PEG11连接子C-C连接的(1.1.1(c21a))二聚体

[0766] 实例6:包括苯丙氨酸31和/或酪氨酸37氨基酸类似物的合成点突变的制备和评估

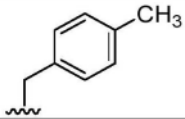
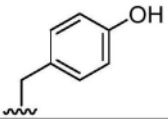
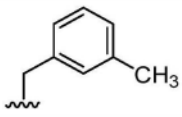
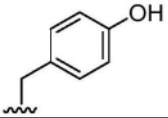
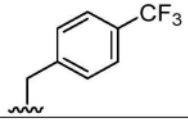
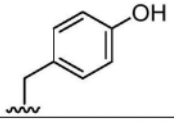
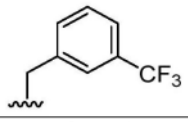
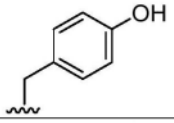
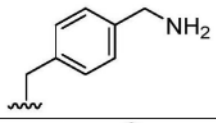
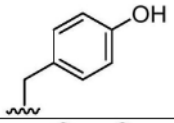
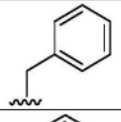
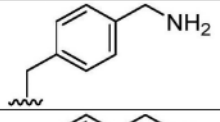
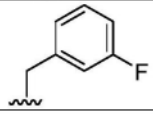
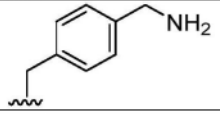
[0767] 基于对如图21和24中所示的X射线晶体结构的分析,选择苯丙氨酸 31和酪氨酸37的多种非天然存在的氨基酸类似物用于并入到示例性化合 物1.1.1(c21a)中。根据本文所描述的方法制备化合物1.1.1(c21a)-PEG6 N到 N连接的二聚体的一系列类似物。在以下条件下的抑制分析中评定化合物 的活性。表13显示了相对于20nM的参考化合物1.1.1(c21a)-PEG6 N到N 连接的二聚体,在20nM化合物,10nM VEGF-A下的抑制%。

[0768] 表13:具有合成点突变的1.1.1(c21a)-PEG6 N到N二聚体类似物化合 物的活性

[0769]

1.1.1(c21a)-PEG6 N 到 N 二聚体	位置 31 侧链	位置 37 侧链	抑制%
对照化合物			58
f31[(4-氟)f]			22
f31[(3-氟)f]			95
f31[(4-氯)f]			66
f31[(3-氯)f]			40

[0770]

f31[(4-甲基)f]			8
f31[(3-甲基)f]			48
f31[(4-CF_3)f]			0
f31[(3-CF_3)f]			2
f31[(4-氨基甲基)f]			0
y37[(4-氨基甲基)f]			87
f31[(3-氟)f]和 y37[(4-氨基甲基)f]			未测定

[0771] 实例7:VEGF-A的D-肽拮抗剂的亲和力优化

[0772] 使用GA结构域库的镜像噬菌体展示筛选来鉴别D-肽VEGF-A拮抗剂。参见Uppalapati等人于2018年6月21日提交且名称为“D-肽VEGF-A结 合化合物和其使用方法(D-Peptidic VEGF-A Binding Compounds and Methods for Using the Same)”的US 62/688,272。如通过表面等离子体共振 (SPR)所测定,示例性化合物11055(图3B)展现31nM的VEGF-A结合 亲和力。此显著弱于贝伐单抗(癌思停),一种经临床批准的VEGF-A拮抗 剂,贝伐单抗展现与VEGF-A的亚纳摩尔结合,且能够在活体内阻断其生 物活性。本公开描述了基

于噬菌体展示的亲和力成熟的用途,其用于提供 11055的高亲和力变异体,所述变异体为VEGF-A的强效拮抗剂。

[0773] 为了工程改造11055的高亲和力变异体,基于对与VEGF-A结合的化 合物11055的X射线晶体结构的分析,设计了pIII融合噬菌体展示库。使 用悬滴法解析与VEGF-A复合的11055的2.3埃分辨率结构。使衍射质量 晶体在0.1M Tris pH 8.5、0.2M氯化钙,18%w/v PEG 4000中生长。通过 分子置换来解析结构。晶体结构显示了与VEGF-A同二聚体结合的两个 11055分子,其在VEGF-A单体上占据相同结合位点,这些位点与VEGF-A 的VEGFR2受体结合位点重叠(图28A和28B)。

[0774] 基于此结构,设计库以进一步稳定变异GA结构域三螺旋结构。选择 总共7个氨基酸残基用于在螺旋1(H1)与连接螺旋2(H2)和螺旋3(H3) 的环之间的堆积界面处随机化(图29A)。使用孔克尔诱变来制备库,且同 时将各选定残基用代表15种可能的AA取代的NNC简并密码子进行随机 化(图29B)。所得噬菌体库含有>1×10^{10}种个别变异体,且使用镜像噬菌体展示方法针对与重折叠的D-VEGF-A目标的结合进行筛选。参见例如 Mandal等人,美国国家科学院院刊(PNAS)(2012),109(37),14779-14784。 简单来说,针对经生物素标记的D-VEGF-A目标进行4轮淘选。对于每一 轮,将噬菌体库与目标一起在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中培育,且将目标结 合的噬菌体在经抗生蛋白链菌素涂布的珠粒上捕获,洗涤,且洗脱以用于 下一轮感染和噬菌体扩增。在每一轮期间,使结合的噬菌体克隆暴露于越 来越严格的温度和洗涤条件下,以增加选择性压力,以便产生针对目标的 高亲和力结合子。在第四轮选择后,对个别噬菌体克隆进行测序且鉴别优 选的共有基序,其在变异GA结构域的位置7和38处含有两个固定的半胱 氨酸残基,且在位置1、2、3、6和37处含有优选的氨基酸残基(图30A)。

[0775] 基于上文所描述的X射线晶体结构(图29A),位置7和38处的半胱 氨酸突变似乎将侧链硫醇基置于足够接近的近程内以形成分子内二硫键 (图30C)。此对三维结构的分析与在共有基序结果中显示的在位置7和38 处的成对半胱氨酸的固定保守一致(图30A)。以D-对映异构体形式合成五 种代表性变异体(SEQ ID NO:21-25),且使用SPR测量其与天然L-VEGF-A 的结合亲和力(图30B)。变异体979110具有最高的VEGF-A亲和力,测 得的平衡解离常数(K_D)为3.6nM。因此,亲和力优化改进VEGF结合, 超过11055几乎10倍。

[0776] 在VEGF-A阻断ELISA中对亲和力成熟的D-肽化合物进行表征,以便 测量其拮抗活性。此处,将VEGFR1-Fc融合体在PBS中以1μg/mL在 Maxisorp板上涂布过夜。将1nM经生物素标记的VEGF-A与拮抗剂滴定 液混合,且用抗生蛋白链菌素-HRP检测经生物素标记的VEGF-A与 VEGFR1-Fc的结合。变异化合物979110阻断VEGF-A与VEGFR1的结合, 且在此分析中展现3.5nM的抑制常数(IC50),比11055(52nM)好14.8 倍,与提高的结合亲和力一致(图31A)。

[0777] 使用HUVEC细胞增殖分析来评定D-肽化合物阻断VEGF-A信号传导 的能力。此处,在重组VEGF-A存在下,HUVEC细胞增殖增加,且阻断 VEGF-A信号传导的拮抗剂化合物减少HUVEC细胞增殖。在HUVEC分析 中,化合物979110的表观IC_{50}为131nM,其比亲本化合物11055的效力 强4倍,但仍比贝伐单抗(癌思停)弱185倍(图31B)。这些数据表明, 相对于11055,979110的结合亲和力的提高可能不足够以与贝伐单抗(癌 思停)相当的效力在活体内阻断VEGF-A生物活性。

[0778] 实例8A:工程改造针对VEGF-A上非重叠表位的D-肽拮抗剂

[0779] 可获得与VEGF受体VEGFR1和VEGFR2复合的VEGF-A结构,且其 展现VEGFR1或VEGFR2的Ig样结构域与VEGF-A同二聚体上的两个相 同结合位点之间的多价相互作用(Markovic-Mueller等人,结构(2017),25, 341-352)(Brozzo等人,血液(Blood)(2012),119(7),1781-1788)。化合 物11055/VEGF-A复合物结构与VEGFR2的重叠图突出显示了11055结合 表位与VEGFR2的Ig样结构域之一(结构域2,D2)之间的显著重叠(参 见图28B),与11055的拮抗活性一致(图31A)。然而,VEGFR2的第二 Ig样结构域(结构域3,D3)结合到VEGF-A上与11055结合位点分开的 额外结合位点(图28B)。我们试图工程改造第二D-肽拮抗剂,其将与 VEGF-A上的VEGFR2 D3结合位点结合,从而阻断独立于11055的额外受 体结合位点。

[0780] 以与M13噬菌体的pVIII融合体形式产生基于Z结构域支架的新噬菌 体展示库。在Z结构域内选择十个位置,以使用孔克尔诱变,用表示除半 胱氨酸外的所有氨基酸的三核苷酸密码子进行随机化(图32A和32B)。使 用镜像噬菌体展示方法针对与重折叠的D-VEGF-A目标的结合筛选所得 库。简单来说,在越来越严格的洗涤条件下进行3轮针对经生物素标记的 D-VEGF-A的淘选。第3轮之后,将噬菌体池转移到pIII融合体,以减少 在噬菌体颗粒上的拷贝数,且使转移的噬菌体经历另外2轮淘选。在对P3 进行最后一轮选择后,对个别噬菌体克隆进行测序,且鉴别优选的共有基 序,其在位置9、10、13、17、27和35处分别含有固定的氨基酸W、D、 W、R、K和Y(图33A)。合成五种代表性变异D-肽化合物(SEQ ID NO: 26-31),且使用SPR测量其与天然L-VEGF-A的结合亲和力(图33B)。变 异体978336具有最高的VEGF-A亲和力,测量的K_D为500nM。使用SPR 进行表位定位以确定化合物978336和化合物11055是否结合VEGF-A上的 非重叠结合位点。此处,将经生物素标记的VEGF-A在SPR芯片上捕获, 且在第一缔合步骤中结合5μM化合物978336,以使其结合位点饱和。在 第二缔合步骤中,将5μM化合物978336与1μM 11055混合,且测量稳态 结合的变化。传感图数据显示归因于化合物11055结合的反应单元增加, 其高于化合物978336的饱和反应水平,表明化合物978336和11055的累 加结合(图34)。最终,在VEGF-A阻断ELISA中,化合物978336可以935nM的测得IC_{50}拮抗VEGF-A与VEGFR1之间的相互作用(图31A)。这些数据表明978336结合到独立于11055位点的非重叠表位,且为VEGF-A 拮抗剂。

[0781] 为了进一步表征化合物978336的VEGF-A结合位点,解析与978336 复合的L-VEGF-A的2.9埃分辨率晶体结构。使用悬滴法,使衍射质量晶体 在0.1M Bis-Tris pH 5.5、0.15M氯化镁、25%w/v PEG 3350中生长。通过 分子置换来解析结构。将两个978336分子结合到单个VEGF-A同二聚体上 的相同结合位点(图35A)。结构展现化合物978336与VEGF-A上的D3结合位点直接重叠(图35B),且证实11055和978336具有分别直接阻断 VEGF-A上的D2和D3位点两者的非重叠表位(图28B和35B)。

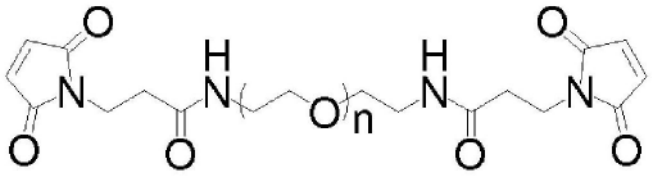
[0782] 实例8B:化合物978336的亲和力成熟筛选

[0783] 使用基于结构的亲和力成熟方法来提高化合物978336的VEGF-A结合 亲和力。基于图6A中所界定的VEGF-A结合多肽的共有序列,四个残基 位置(14、24、28和32)缺乏强共有性且展现显著变异(即,r14、l24、 r28和s32)。在与VEGF-A结合的978336的晶体结构中(图35E),这四个 残基不为掩埋的界面接触点,但通常似乎进行较弱的未优化相互作用。具体来说,残基r14和s28不与VEGF直接接触,l24为位于酸性小片附近的 疏水侧链,且r28与任何酸性侧链相距过远而不能形成最优盐桥(小于4 埃)。选择这些位点用于使用孔克尔诱

变进行软随机化(参见图35G中的x 位置)。使用如上文所描述的类似高严格性条件淘选所得pIII噬菌体库(SEQ ID NO:158),以鉴别针对D-VEGF-A的改进的结合子。第三轮选择后,鉴 别出优选的共有基序,其相比于亲本化合物978336(SEQ ID NO:117)含 有两种主导突变,L24V和S32R(图35F)。代表性克隆,变异Z结构域980181 (图35G;SEQ ID NO:119)作为新的D-蛋白结合子合成,且如通过SPR 所测量展现66nM的VEGF-A亲和力(图35G)。因此,亲和力优化使VEGF 结合亲和力相比于亲本化合物978336提高大约8倍。

[0784] 实例9:VEGF-A的二价D-肽拮抗剂

[0785] 鉴于D-肽拮抗剂化合物11055和978336与VEGF-A上的非重叠表位 结合且直接阻断D2和D3结合位点两者,我们工程改造化合物11055和 978336的化学连接缀合物,以便评定对与目标结合和拮抗活性的整体影响。化合物11055和978336两者化学合成有额外N末端半胱氨酸残基,所述N 末端半胱氨酸残基使用常规方法与双马来酰亚胺PEG8连接子缀合,以提 供N末端到N末端连接(图36A)。

[0786] 

[0787] 双-Mal-PEG(n)双官能连接子,其中n为3、6或8

[0788] 如通过SPR测量,新的异二聚体化合物979111展现1.7nM的VEGF-A 结合亲和力(图9B)。这与亲合力效应一致,其中将两个独立的结合子连 接成单一异二聚体可产生亲和力高于任一单独结合子的分子。重要的是, 在HUVEC细胞增殖分析中,异二聚体979111展现与癌思停相似的VEGF-A 阻断活性。响应于VEGF信号传导,抑制细胞增殖的IC50对于979111为1.1nM,且对于癌思停为0.7nM,代表相比于11055>500倍的提高(图31B)。 这些结果共同显示,VEGF-A的异二聚D-肽拮抗剂可在基于细胞的分析中 有效阻断信号传导活性,且具有作为VEGF拮抗剂的治疗潜能。

[0789] 实例10:VEGF-A的四结构域D-肽拮抗剂

[0790] 为了进一步提高D-肽化合物的亲和力和效力,设计了一种方案,以便 将单体D-蛋白拮抗剂化学连接成二聚二价拮抗剂。在概念上,两个980181 多肽经由其碳末端相互系栓,且然后将多肽979110位点特异性缀合到二聚 体中的各980181多肽,以提供可模拟VEGF受体接合的四结构域D-蛋白。图38A显示了与VEGF-A二聚体结合的化合物11055和978336两者的结 构的重叠图,其中使用PEG-衍生物指示用于结构域的化学连接的示例性位 点(图38A)。具体来说,978336碳末端彼此在约15埃内,且两个赖氨酸 侧链,11055中的k19和978336中的k7在约23埃内。

[0791] 开发出一种合成策略,其中将使用固相肽合成方法并行合成两种组分, 且单一点击缀合步骤将组装完整的四结构域化合物以供最终纯化(图38B)。 以单体形式合成D-蛋白979110,其含有从赖氨酸19延伸的PEG2-叠氮化 物或PEG3-叠氮化物衍生物,和在c7-c38之间的经氧化分子内二硫键。980181由碳末端偶联的连接子树脂合成,在合成期间产生同二聚体。另外, 在赖氨酸7处并入PEG2-炔烃衍生物以促进与979110的缀合。在最终缀合 步骤中,使用点击化学将两个979110拷贝与980181同二聚体连接,得到 具有PEG2/PEG2(980870)或PEG3/PEG2(980871)组合连接子长度的四 结构域D-蛋白衍生物(图38C)。四聚

D-蛋白的SPR滴定展现超高结合亲 和力,K_D量测值对于980870为0.32nM,且对于980871为0.42nM。

[0792] 由于D-蛋白四结构域化合物能够与VEGF-A进行亚纳摩尔结合,因此 可在VEGF-A/VEGFR1阻断ELISA中,使用亚纳摩尔浓度的VEGF-A和长 培育平衡结合条件,获得对其拮抗活性的更精确表征。具体来说,将150pM VEGF-A与拮抗剂滴定液培育过夜,然后在板涂布的VEGFR1-Fc上培育5 小时,以使任何游离VEGF-A结合受体。在这些条件下,亲和力成熟单体979110的IC50为7nM,而D-蛋白四结构域化合物展现128pM(980870) 和163pM(980871)的强效IC_{50},与其亚纳摩尔结合亲和力一致(图39A)。 重要的是,D-蛋白四结构域化合物的效力比IC50为701pM的贝伐单抗强 约4倍,也比可溶性诱饵VEGFR1-Fc(IC50为220pM)略好。

[0793] 为了将这些结果转换为VEGF信号传导阻断,我们在293荧光素酶报 告体细胞系中使用针对VEGFR2信号传导的基于细胞的分析。此处, VEGF-A活化293细胞中的VEGFR2信号传导,产生作为功能读出的荧光 素酶表达。此系统中对VEGF-A信号传导的抑制引起荧光素酶信号损失。为了模拟ELISA条件,使用150pM VEGF-A来诱发可测量的荧光素酶信 号,且滴定拮抗剂以阻断此活性。此处,979110显示6.1nM的IC50,而 四结构域D-蛋白显示180pM(980870)和90pM(980871)的亚纳摩尔IC_{50}, 与活体外ELISA结果非常一致(图39B)。此外,在此情况下,D-蛋白四结 构域化合物在阻断VEGF活性方面的效力比贝伐单抗(IC_{50}为530pM)强 3-6倍,证明合成D-蛋白实现抗体样活性的潜能。

[0794] 实例11:血管内皮生长因子的强效非免疫原性D-蛋白拮抗剂预防视网膜血管渗漏且抑制肿瘤生长

[0795] 化学合成的D-蛋白以抗体样效力阻断VEGF信号传导,在眼科和肿瘤 学疾病模型中展现功效,且规避体液抗药物抗体反应。

[0796] 使用镜像噬菌体展示和结构指导的优化来工程改造全合成D-蛋白,其 使用受体模拟机制拮抗VEGF-A。针对镜像D-VEGF-A进行噬菌体淘选产 生了结合典型受体相互作用位点的独立蛋白质。晶体结构指导亲和力成熟 和化学连接的设计,以产生紧密结合天然VEGF-A的异二聚D-蛋白,以皮 摩尔浓度抑制信号传导活性。通过全化学合成制备的本文所描述的D-蛋白 VEGF拮抗剂,预防湿性年龄相关黄斑变性的兔眼模型中的血管渗漏,减 缓MC38同系小鼠肿瘤模型中的肿瘤生长,且在治疗期间或皮下免疫接种 之后为非免疫原性的。

[0797] 正文:

[0798] D-蛋白为完全由D-氨基酸和非手性氨基酸甘氨酸构成的镜像分子。D- 蛋白抵抗由内源性蛋白酶进行的消化,避免碎片化为免疫呈现所需的肽(1、 4、8),且据报导即使在强佐剂中乳化且通过皮下注射重复施用,也不会刺 激免疫反应(1、2)。

[0799] 如本文所描述的VEGF拮抗剂能够在湿性AMD的兔眼模型中完全阻 断由VEGF-A诱导的血管渗漏。此外,针对人类和鼠类VEGF-A的跨物种 活性使得能够证明在MC38同系小鼠模型中抑制肿瘤生长,且在治疗后不 具有免疫原性。另外,用在佐剂中乳化的我们的D-蛋白拮抗剂重复皮下免 疫接种后,完全不存在体液抗体反应。

[0800] 镜像蛋白质噬菌体展示

[0801] 为了开发多价D-蛋白拮抗剂,鉴别针对VEGF-A上非重叠表位的蛋白 结合子。分别来源于细菌蛋白G和蛋白A的53残基GA结构域和58残基 Z结构域蛋白(22、23)由于其具有高

稳定性、小尺寸且易于化学合成而 选为用于噬菌体展示的两种不同3-螺旋束支架。针对Z和GA结构域支架 产生M13噬菌体展示库,其分别含有10和12个硬随机化库位置(图 46A-46C)。通过全化学合成制备目标D-VEGF-A(8-109)的生物素标记形 式,且在越来越严格的目标浓度和洗涤条件下针对D-VEGF-A-生物素分别 淘选各噬菌体库(补充方法)。在定性结合ELISA中,代表GA和Z结构 域两者的共有命中的噬菌体克隆以浓度依赖性方式与D-VEGF-A结合(图 40A)。将GA结合子合成为L-蛋白,且在噬菌体竞争ELISA中用作竞争物, 以在将命中合成为D-蛋白之前确认可逆结合。GA结合子以280nM的IC50 直接阻断其亲本噬菌体克隆与D-VEGF-A结合,但对Z结构域噬菌体克隆 的结合没有影响(图40B),表明两种蛋白质靶向VEGF-A上的独立表位。

[0802] GA和Z结构域命中均合成为D-蛋白(分别RFX-11055和 RFX-978336),以进一步表征为针对VEGF-A的天然L-蛋白形式的结合子。使用表面等离子体共振(SPR)针对L-VEGF-A进行的D-蛋白结合子滴定 展现,GA结构域结合子RFX-11055的结合亲和力为43nM,且Z结构域 结合子RFX-978336的结合亲和力为168nM(图47和图51),证明D-对映 异构体保留特异性结合活性。此外,基于SPR的表位定位研究显示 RFX-11055和RFX-978336能够同时且累加结合到VEGF-A(图48),证实 其结合到独立且不重叠的表位。

[0803] VEGF-A信号传导的拮抗剂需要阻断VEGF受体与对称VEGF-A同二 聚体界面处形成的两个结合位点相互作用(16、24)。为了评定VEGF拮抗 作用,采用非平衡VEGF-A121阻断ELISA,其测量经生物素标记的VEGF-A 同功异型物121(VEGF-A121-biot)与涂布在板上的VEGFR1-Fc的结合(补 充方法)。RFX-11055和RFX-978336均展现对VEGF-A121与VEGFR1结合的抑制,表观IC50值分别为52nM和935nM(图40C和图52)。这些 D-蛋白显示明显的抑制活性。

[0804] D-蛋白VEGF-A拮抗剂的结构指导亲和力成熟

[0805] 为了指导D-蛋白拮抗剂的进一步优化,分别解析与RFX-11055和 RFX-978336复合的VEGF-A在2.3 Å和2.9 Å下的两种独立晶体结构(图 53)。在两种情况下,D-蛋白均与VEGF-A远端的结合位点对称相互作用(图 41A和图41B)。RFX-11055主要利用经由淘选选择的疏水残基和极性残基 (h27、v28、f31、h34、p36、y37、h40、l44和a47)与VEGF-A上的约800A2表面积相互作用(图41C)。相比之下,D-蛋白RFX-978336除了数个极 性接触点(w9、w13和y35)外,采用高度碱性的接触点(r14、r17、k27 和r28)以与VEGF-A上的酸性小片相互作用,最终包含约450A2的较小 表面积(图41D)。VEGF-A与VEGFR1和VEGFR2的复合结构和同二聚多Ig结构域受体与VEGF-A之间形成的相互作用的细节已得到描述(16、 24)。具体来说,受体Ig样结构域2和3(D2和D3)结合具有C2对称性 的同二聚VEGF-A蛋白分子的远端上的两个相同位点(图41E)。具有结合 的RFX-11055和RFX-978336的VEGF-A/VEGFR1结构的重叠图突出显示 了VEGFR1的D2和D3与D-蛋白之间的直接重叠,展现受体结合抑制的 竞争机制(图41F)。引起关注地,RFX-11055主要使用疏水接触,且 RFX-978336主要使用极性接触,紧密模拟了D2和D3与VEGF-A的特异 性相互作用的性质(图49A-49B)。

[0806] 基于RFX-11055的3-螺旋束结构,设计七残基软随机化库以稳定N末 端螺旋1与螺旋2-3环之间的堆积(图42A)。使用孔克尔诱变,同时将各 选定的残基用NNC简并密码子随机化,所述密码子代表15种可能的取代, 包括半胱氨酸。使用L-RFX-11055作为竞争蛋白针对D-VEGF-A进行四轮 高严格性淘选后,鉴别出一个共有基序,其在L7和V38位置处含有两

个 固定的半胱氨酸残基(图46A-46C)。位置7和38处的保守半胱氨酸突变 似乎将侧链硫醇基置于附近以形成分子内二硫键。合成为具有经氧化二硫 键的D-蛋白的共有变异体RFX-979110通过SPR测量具有2.3nM的结合亲 和力,代表相比于RFX-11055,亲和力提高19倍(图47和图51)。

[0807] RFX-978336的亲和力成熟涉及从最初淘选中选择显示极小保守性的 VEGF-A接触残基,以便使用软随机化进一步询问(interrogation)。选择总 共4个残基,且使用孔克尔诱变来对各残基进行软随机化(图42B和图 46A-46C)。使用合成L-RFX-978336作为竞争物,采用类似的高严格性淘 选方法。3轮选择后,鉴别含有L24V和S32R突变的优选共有基序(图42B)。Z结构域共有变异体RFX-980181合成为D-蛋白,且展现18nM的测量结 合亲和力,代表相比于RFX-978336,亲和力提高9倍(图47和图51)。

[0808] 在非平衡VEGF-A121阻断ELISA中评估亲和力成熟D-蛋白,以测量 其拮抗活性。RFX-979110以3.5nM的IC50阻断VEGF-A121与VEGFR1-Fc 结合,相比于RFX-11055提高15倍,且接近贝伐单抗的效力,贝伐单抗在 此分析中的IC50为1.8nM(图42C和图52)。与RFX-979110相反, RFX-980181的提高的结合亲和力未显示对其拮抗活性的影响(IC50为 1,658nM,在相同分析中测量的初始前导RFX-978336的实验不确定度内 (图52))。鉴于先前研究显示VEGF-A的VEGFR1结合主要由高亲和力D2 结构域(15)驱动,一种可能的解释为D3结构域位点的阻断对整体受体接 合具有辅助作用。

[0809] VEGF-A信号传导的异二聚D-蛋白拮抗剂的全化学合成\

[0810] 通过将D-蛋白化学连接在一起,重演VEGF受体D2和D3结构域与 VEGF-A之间的相互作用,增强单体D-蛋白的亲和力和效力。基于与 VEGF-A结合的RFX-11055和RFX-978336的结构,和其与RFX-979110和 RFX-980181的相似性,使用点击反应产生经设计以模拟天然受体接合的异 二聚D-蛋白构建体,分别经由化学修饰的赖氨酸侧链K19和K7在其之间 进行位点特异性连接(图50A和图50B)。通过采用全化学合成,将 RFX-979110合成为含有从Lys19的侧链延伸的PEG3-叠氮化物衍生物的单 体,在Cys7-Cys38之间具有分子内二硫键。合成D-蛋白RFX-980181,PEG2- 炔烃衍生物在Lys7的侧链上并入RFX-980181内,以促进与装备PEG-叠氮 化物的RFX-979110的缀合。在最终连接步骤中,使用点击化学使 RFX-979110与RFX-980181反应,得到具有PEG3/PEG2连接子的13kDa 异二聚D-蛋白(RFX-980869)(补充方法,图46C和50B)。RFX-980869 通过LC/MS谱表征,以便进行以下化学合成和纯化。

[0811] 异二聚D-蛋白RFX-980869的SPR滴定展现超高结合亲和力,KD测 量值为0.07nM,类似于贝伐单抗在0.16nM下的亲和力(图47和图51)。 在类似条件下滴定贝伐单抗抗体,且得出结论,达到精确确定亚纳摩尔浓 度范围内的亲和力的测量极限。观测到的非常高的结合亲和力与由个别D- 蛋白化学连接成异二聚体实现的多价相互作用一致。

[0812] 为了进一步表征其拮抗活性,采用VEGF-A121/VEGFR1阻断ELISA, 其在长培育平衡结合条件下,使用亚纳摩尔浓度的VEGF-A121(补充方法)。 在这些条件下,亲和力成熟单体RFX-979110显示IC50为7.6nM,而D- 蛋白异二聚体展现IC50值为0.31nM,与通过SPR所测量的亲和力合理一 致(图43A和图54)。值得注意地,D-蛋白异二聚体的IC50值低于贝伐单抗(IC50为0.70nM),与IC50值为0.23nM的可溶性诱饵受体VEGFR1-Fc 相似。在分析中,合成异二聚体和可溶性诱饵受体的测量IC50值接近 VEGF-A121的浓度,表明其效力可能高于此

分析中测得的值。

[0813] 为了证明这些D-蛋白拮抗剂对VEGF信号传导的影响,使用了基于细 胞的荧光素酶报告体分析,其由VEGFR2受体活化驱动。在此分析中,150 pM的VEGF-A活化VEGFR2信号传导,引起荧光素酶表达提高,而抑制 VEGF-A引起荧光素酶表达降低。在阻断VEGFR2信号传导方面,单体D- 蛋白RFX-979110的IC50为6.1nM,而异二聚D-蛋白RFX-980869展现0.49 nM的亚纳摩尔IC50值,等效于贝伐单抗(IC50为0.53nM)(图43B和图 54)。综上所述,这些数据表明,使用全化学合成,单体D-蛋白的化学连 接产生异二聚体,其能够干扰VEGF-A与其受体之间的极高亲和力相互作 用。

[0814] RFX-980869展现活体内强效活性且为非免疫原性的

[0815] 为了展现分别在眼科及肿瘤学中的应用,在湿性AMD的兔眼模型和 同系小鼠肿瘤模型中探索RFX-980869的活性。在湿性AMD的兔眼模型中, 用外源性VEGF-A165进行玻璃体内攻击诱导视网膜血管渗漏,其可使用荧 光素血管造影(FA)监测。VEGF-A阻断可阻止荧光素弥漫性渗漏进入眼 内,此充当疗效的量度。此处,我们测试了RFX-980869与阿柏西普相比的 剂量依赖性功效和持久性。以每只眼0.25mg或1.0mg单次玻璃体内施用 RFX-980869后,兔在1个月时段内经外源性VEGF-A攻击两次(第2天和 第23天),且三天后(第5天和第26天)检查其眼。值得注意地,在两次 VEGF攻击之后,0.25mg或1mg的单次剂量RFX-980869能够显著阻断在 对照眼中观测到的血管渗漏(图44A)。此外,在第26天,1.0mg剂量的 RFX-980869完全阻断血管渗漏,与1.0mg阿柏西普相当,而0.25mg剂量 显示功效降低,其特征在于荧光素渗漏和血管扭曲增加(图44A)。这些结 果由在第26天时从研究中涉及的所有眼的FA图像的详细检查和评分证实 (图44A-44B),且证明用RFX-980869治疗的明确剂量依赖性耐久性。

[0816] 为了评定RFX-980869的肿瘤生长抑制潜能,研究了RFX-980869与小 鼠VEGF-A的交叉反应性(数据未显示),且使用同系MC38小鼠肿瘤模型。 在针对人类PD-1转基因的C57BL6小鼠中建立MC38结肠癌肿瘤,且在治 疗起始前达到82mm3。纳武单抗用作阳性对照,因为我们无法在同系MC38 肿瘤模型中找到VEGF-A拮抗剂的功效的已发表优先顺序。以6mg/kg每 天给药RFX-980869持续2周显示出类似于以3mg/kg每两周给药的纳武单 抗的肿瘤生长抑制(图44A)。相对于媒剂对照组,2mg/kg的RFX-980869 和1mg/kg的纳武单抗均未能显示肿瘤生长抑制,证实此情况下两种治疗 均具有剂量依赖性功效。在每日RFX-980869给药终止后第15天时,对于 6mg/kg的RFX-980869,肿瘤生长抑制为31%,且对于3mg/kg的纳武单 抗,肿瘤生长抑制为48%(图44B)。

[0817] 为了突出显示我们的异二聚D-蛋白拮抗剂的非免疫原性潜能,在肿瘤 研究终止时针对抗药物抗体(ADA)分析小鼠血清。在此类具有完全免疫 活性(immuno-competent)的小鼠肿瘤模型中,来自低剂量和高剂量 RFX-980869治疗组的血浆均展现完全不具有针对RFX-980869的IgG滴度 反应,而纳武单抗治疗组具有饱和水平的IgG滴度(图45C)。因此,尽管 两种药剂均为完全外来抗原,但只有纳武单抗诱发强ADA反应。鉴于其抑 制肿瘤生长的机制不同,因此进行了一项独立研究,重复皮下注射佐剂中 乳化的RFX-980869、纳武单抗或贝伐单抗直接对小鼠进行免疫接种,以确 定非免疫原性是否为RFX-980869的固有特性。在第42天后,用单克隆抗 体免疫接种产生了强IgG滴度,而RFX-980869完全规避了体液抗体反应 (图45D)。综合来说,活体内结果不仅证明了我们的合成VEGF-A拮抗剂 在眼科和肿

瘤学背景下的强效活性,而且就其不具有免疫原性来说,还显 示与单克隆抗体的明显差异。

[0818] 论述

[0819] 使用镜像蛋白质噬菌体展示和结构指导的优化使两种不同的3-螺旋束 独立成熟为D-蛋白拮抗剂,其占据VEGF-A上的D2和D3结合位点(图 41F)。经由单体的侧链选择性化学连接,所得13kDa D-蛋白能够结合大约 1,250 Å2的

[0820] VEGF-A表面积,实现皮摩尔亲和力,同时复制与VEGF受体结合紧 密相似的机制。通过阻断VEGF-A上所有四个受体相互作用位点,在活体 内周转和清除的时间尺度上,所得VEGF-A中和可能为不可逆的。如同利 用受体诱饵机制来阻断VEGF-A的阿柏西普(25、26),本文所描述的异二 聚D-蛋白VEGF拮抗剂尽管呈小得多的化学合成D-蛋白形式,但也使用受 体模拟,阻断VEGF-A上的所有VEGF受体结合位点。

[0821] 本文所描述的异二聚D-蛋白VEGF拮抗剂的大小为布卢西单抗 (brolucizumab)的一半,易溶于PBS(pH 7.4),且适合于高剂量配制物。其小尺寸可使得能够更好地穿透视网膜且在离开眼后快速全身清除。此外, 其特性包括提高的蛋白水解稳定性和缺乏免疫原性,在治疗反应持久性、较低发炎和长期慢性治疗中不存在ADA方面提供进一步的优势。

[0822] 参考文献:

[0823] 1.H.M.Dintzis,D.E.Symer,R.Z.Dintzis,L.E.Zawadzke,J.M.Berg, 一对对映异构蛋白的免疫原性的比较.蛋白质:结构、功能和生物信息 (Proteins Struct.Funct.Bioinforma.)16,306-308(1993).

[0824] 2.M.Uppalapati等人,VEGF-A的强效D-蛋白拮抗剂在活体内不具有 免疫原性,代谢稳定且循环时间较长.ACS化学生物学11,1058-1065 (2016).

[0825] 3.L.Zhao,W.Lu,镜像蛋白(Mirror-image proteins).化学生物学当 前观点(Curr.Opin.Chem.Biol.)22,56-61(2014).

[0826] 4.M.Sauerborn,V.Brinks,W.Jiskoot,H.Schellekens,针对重组人类蛋 白质治疗剂的免疫反应下的免疫机制(Immunological mechanism underlying the immune response to recombinant human protein therapeutics).药理学趋势 31,53-59(2010).

[0827] 5.M.Krishna,S.G.Nadler,对生物治疗剂的免疫原性-抗药物免疫复 合物的作用(Immunogenicity to biotherapeutics-The role of anti-drug immune complexes).免疫学前沿(Front.Immunol.)7(2016),数字对象标识 符:10.3389/fimmu.2016.00021.

[0828] 6.F.A.Harding,M.M.Stickler,J.Razo,R.DuBridge,人类化及完全人 类抗体的免疫原性(The immunogenicity of humanized and fully human antibodies).单抗(MAbs).2,256-265(2010).

[0829] 7.R.Dingman,S.V.Balu-Iyer,蛋白质药物的免疫原性 (Immunogenicity of Protein Pharmaceuticals).药物科学杂志(J.Pharm. Sci.),1-18(2019).

[0830] 8.R.C.Milton,S.C.Milton,S.B.Kent,D-酶的全化学合成:HIV-1蛋 白酶的对映异构体显示相互的手性底物特异性(Total chemical synthesis of a D-enzyme:the enantiomers of HIV-1protease show reciprocal chiral substrate specificity)[校正].科学.256,1445-8(1992).

[0831] 9.T.Katoh,K.Tajima,H.Suga,D-氨基酸在翻译中的连续伸长 (Consecutive Elongation of D-Amino Acids in Translation).细胞:化学生物 学(Cell Chem.Biol.)24,46-54(2017).

[0832] 10.T.N.Schumacher等人,经由镜像噬菌体展示鉴别D-肽配位体(Identification of D-peptide ligands through mirror-image phage display).科学.271,1854-7(1996).

[0833] 11.D.M.Eckert,V.N.Malashkevich,L.H.Hong,P.A.Carr,P.S.Kim, 抑制HIV-1进入:靶向gp41卷曲螺旋袋的D-肽抑制剂的发现(Inhibiting HIV-1entry:Discovery of D-peptide inhibitors that target the gp41 coiled-coil pocket).细胞(Cell).99,103-115(1999).

[0834] 12.T.Van Groen等人,通过D3,一种通过镜像噬菌体展示鉴别的D- 对映异构肽,减少转基因小鼠中阿尔茨海默病淀粉样蛋白斑负荷(Reduction of Alzheimer's disease amyloid plaque load in transgenic mice by D3,a D-enantiomeric peptide identified by mirror-image phage display).药物化学 (ChemMedChem).3,1848-1852(2008).

[0835] 13.M.Liu等人,用于恶性赘瘤的靶向分子疗法的p53-MDM2相互作用 的D-肽抑制剂(D-peptide inhibitors of the p53-MDM2 interaction for targeted molecular therapy of malignant neoplasms).美国国家科学院院刊107, 14321-14326(2010).

[0836] 14.B.D.Welch,A.P.VanDemark,A.Heroux,C.P.Hill,M.S.Kay,HIV-1 进入的强效D-肽抑制剂(Potent D-peptide inhibitors of HIV-1entry).美国 国家科学院院刊104,16828-16833(2007).

[0837] 15.C.Wiesmann等人,与Flt-1受体的结构域2复合的VEGF在1.7A 分辨率下的晶体结构(Crystal structure at 1.7A resolution of VEGF in complex with domain 2of the Flt-1receptor).细胞.91,695-704(1997).

[0838] 16.M.S.Brozzo等人,别构调节的VEGFR-2二聚化的热力学和结构描 述(Thermodynamic and structural description of allosterically regulated VEGFR-2dimerization).血液.119,1781-1788(2012).

[0839] 17.L.G.Presta等人,用于实体瘤和其它病症的疗法的抗血管内皮生长 因子单克隆抗体的人类化(Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders).癌症研究57,4593-9(1997).

[0840] 18.Y.Chen等人,优化的抗VEGF抗体的选择和分析:与抗原复合的亲 和力成熟Fab的晶体结构(Selection and analysis of an optimized Anti-VEGF antibody:Crystal structure of an affinity-matured Fab in complex with antigen). 分子生物学杂志(J.Mol.Biol.)293,865-881(1999).

[0841] 19.P.E.Dawson,T.W.Muir,I.Clark-Lewis,S.B.Kent,通过天然化学 连接合成蛋白质(Synthesis of proteins by native chemical ligation).科学. 266,776-9(1994).

[0842] 20.K.Mandal,S.B.H.Kent,生物活性血管内皮生长因子的全化学合 成(Total

chemical synthesis of biologically active vascular endothelial growth factor).应用化学国际版50,8029-8033(2011).

[0843] 21.K.Mandal等人,通过外消旋晶体学进行的异手性{D-蛋白拮抗剂外 加血管内皮生长因子}蛋白复合物的化学合成和X射线结构(Chemical synthesis and X-ray structure of a heterochiral{D-protein antagonist plus vascular endothelial growth factor}protein complex by racemic crystallography).美国国家科学院院刊109,14779-14784(2012).

[0844] 22.S.Lejon,I.M.Frick,L. Björck,M. Wikström,S.Svensson,与人类血 清白蛋白复合的细菌白蛋白结合模块的晶体结构和生物学意义(Crystal structure and biological implications of a bacterial albumin binding module in complex with human serum albumin).生物化学杂志279,42924-42928 (2004).

[0845] 23.M.Tashiro等人,葡萄球菌蛋白A的Z结构域的高分辨率溶液NMR 结构(High-resolution solution NMR structure of the Z domain of staphlococcal protein A).分子生物学杂志272,573-590(1997).

[0846] 24.S.Markovic-Mueller等人,与VEGF-A复合的全长VEGFR-1细胞外 结构域的结构(Structure of the Full-length VEGFR-1Extracellular Domain in Complex with VEGF-A).结构.25,341-352(2017).

[0847] 25.J.Holash等人,VEGF-Trap:一种具有强效抗肿瘤效应的VEGF阻断 剂(VEGF-Trap:A VEGF blocker with potent antitumor effects).美国国家科 学院院刊99,11393-11398(2002).

[0848] 26.E.S.Kim等人,强效VEGF阻断引起成神经细胞瘤模型中充塞血管 的消退(Potent VEGF blockade causes regression of coopted vessels in a model of neuroblastoma).美国国家科学院院刊99,11399-11404(2002).

[0849] 27.T.W.Olsen等人,视网膜/玻璃体临床指南开发过程和参与者 (Retina/Vitreous Preferred Practice Pattern Development Process and Participants) (2015).

[0850] 28.M.Van Lookeren Campagne,J.Lecouter,B.L.Yaspan,W.Ye,年龄相 关黄斑变性的机制和治疗机会(Mechanisms of age-related macular degeneration and therapeutic opportunities).病理学杂志(J.Pathol.)232, 151-164(2014).

[0851] 29.J.Tietz等人,RTH258(ESBA1008),一种用于治疗视网膜病症的新 颖血管内皮生长因子A抑制剂的亲和力和滴度(Affinity and Potency of RTH258(ESBA1008),a Novel Inhibitor of Vascular Endothelial Growth Factor A for the Treatment of Retinal Disorders).眼科研究与视觉科学(IOVS).56, 1501(2015).

[0852] 30.F.G.Holz等人,针对新生血管性年龄相关黄斑变性的单链抗体片 段VEGF抑制剂RTH258:一项随机分组对照研究(Single-Chain Antibody Fragment VEGF Inhibitor RTH258 for Neovascular Age-Related Macular Degeneration:ARandomized Controlled Study).眼科学(Ophthalmology). 123,1080-1089(2016).

[0853] 31.RTH258相对于阿柏西普的功效和安全性(Efficacy and Safety of RTH258 Versus Aflibercept).www(dot)clinicaltrials(dot)gov/ct2/show/ NCT02307682

(2014)

[0854] 32.RTH258相对于阿柏西普的功效和安全性-研究2(Efficacy and Safety of RTH258 Versus Aflibercept-Study 2).www(dot) clinicaltrials(dot)gov/ct2/show/NCT02434328(2015)

[0855] 33.G.Gasparini,R.Longo,M.Toi,N.Ferrara,血管生成抑制剂:肿瘤学 的新治疗策略(Angiogenic inhibitors:a new therapeutic strategy in oncology). 自然:临床实践肿瘤学(Nature Clinical Practice Oncology).2,562-577 (2005).

[0856] 34.J.J.Wallin等人,阿特珠单抗与贝伐单抗组合增强转移性肾细胞癌 中的抗原特异性T细胞迁移(Atezolizumab in combination with bevacizumab enhances antigen-specific T-cell migration in metastatic renal cell carcinoma). 自然通信(Nature Communications).7,1-8(2016).

[0857] 35.M.Reck等人,论文非小细胞肺癌中阿特珠单抗外加贝伐单抗和化 学疗法(IMpower150):一项随机分组开放标签3期临床试验中EGFR突变 或基线肝转移患者的关键亚组分析(Articles Atezolizumab plus bevacizumab and chemotherapy in non-small-cell lung cancer(IMpower150):key subgroup analyses of patients with EGFR mutations or baseline liver metastases in a randomised,open-label phase 3 trial).柳叶刀:呼吸科(Lancet Respiratory Medicine).19,1-15(2019).

[0858] 36.S.S.Sidhu,B.K.Feld,G.A.Weiss,经工程改造以便改进噬菌体展 示的M13噬菌体外壳蛋白(M13 Bacteriophage Coat Proteins Engineered for Improved Phage Display).蛋白质工程改造方案(Protein Eng.Protoc.), 205-220(2006).

[0859] 37.T.A.Kunkel,无需表型选择的快速且高效位点特异性诱变(Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection).美国国 家科学院院刊82,488-492(1985).

[0860] 材料和方法

[0861] 蛋白质合成试剂

[0862] Fmoc-D-氨基酸购自成都郑源生化科技有限公司(Chengdu Zhengyuan Company,Ltd.)和成都诚诺新技术有限公司(Chengdu Chengnuo New-Tech Company,Ltd.)。Fmoc-D-Ile-OH购自Chemimpex International,Inc.。Fmoc-D- 炔丙基甘氨酸(Fmoc-D-Pra-OH)购自海宇生物科技(Haiyu Biochem.)。MBHA树脂购自西安蓝晓科技新材料股份有限公司(Sunresin New Materials Co.Ltd.,Xian)。Rink酰胺连接子购自成都泰和伟业生物科技有限公司 (Chengdu Tachem Company,Ltd.)。氯-(2-Cl)-三苯甲基树脂购自天津南开和成科技有限公司(Tianjin Nankai Hecheng Science and Technology Company, Ltd.)。Fmoc-NH2(PEG)n-COOH和其它PEG连接子购自博美生物技术有限 公司(Biomatrik Inc.)。2-叠氮乙酸购自爱玛特科技有限公司(Amatek Scientific Company Ltd.)。抗坏血酸钠购自梯希爱(上海)化成工业发展有限 公司(TCI(Shanghai)Ltd.)。硫酸铜五水合物(CuSO4·5H2O)购自安耐吉 化学(Energy Chemical.)。

[0863] D-VEGF-A合成与重折叠

[0864] D-VEGF-A多肽链(COOH酸,残基8-109(33))使用固相肽合成(SPPS) 和天然化学连接化学合成,且使用根据我们先前工作(21)改编的方法折 叠形成蛋白共价同二聚体。对应

于1:Gly1至D-Tyr18、2:D-Cys19至 D-Arg49、3:D-

[0865] Cys50至D-Asp102的个别肽片段使用用于分步SPPS的标准Fmoc化 学方案合成。片段1和2在NH_2NH-(2-Cl)三苯甲基树脂上合成且片段3由 预负载王氏树脂(Wang Resin)合成。简单来说,首先将预负载Fmoc-氨基 酰基-王氏树脂用DMF(10mL/g)溶胀1小时,然后用20%哌啶/DMF处 理(30分钟)以去除Fmoc基团,且再用DMF洗涤(5次)。通过将3当 量的以下各者的预活化溶液添加到树脂中来偶联Fmoc-D-氨基酸残基:受 保护氨基酸(0.4M于DMF中)、二异丙基碳二亚胺(DIC)和羟基苯并三 唑(HOBt)。1至2小时后,茚三酮测试显示反应完成,并且用DMF洗涤 树脂(3次)。为了去除Fmoc基团,将哌啶(20%于DMF中)添加到树脂,保持30分钟。去除最终Fmoc基团之后,用DMF(3次)和MeOH(2次) 冲洗树脂,真空干燥,随后溶解于85%TFA、5%苯硫基甲烷、5%EDT、2.5%苯酚和2.5%水中以进行裂解。2小时后,用TFA洗涤树脂,且通过鼓 泡氮气浓缩洗脱的肽。用冷乙醚使粗肽沉淀,通过离心粒化,并且用冷乙 醚洗涤2次,之后真空干燥。将肽残余物溶解于水中,通过制备型逆相HPLC 纯化并且通过HPLC和MS进行分析。

[0866] 如下进行D-肽-酰肼片段与D-Cys-肽片段之间的连接:将D-肽-酰肼溶 解于缓冲液A(含6M GnHCl的0.2M磷酸钠,pH 3.0)中,在冰盐浴中 冷却到-15℃,并且通过磁性搅拌器轻轻搅拌。添加$NaNO_2$(7当量),并且 搅拌溶液20分钟以将D-肽-酰肼氧化成肽-叠氮化物。将溶解于缓冲液B(含 6M GnHCl的0.2M磷酸钠,pH 7.0)中的4-巯基苯基乙酸(MPAA)溶液 (50当量)快速添加到含有新形成的D-肽-叠氮化物的溶液(相等体积)中 以消除过量的$NaNO_2$且将肽-叠氮化物转化为肽-MPAA硫酯。随后将D-Cys- 肽于缓冲液B中的溶液(相等体积)添加到含有新形成的肽-MPAA硫酯的 溶液中。且用NaOH将反应混合物调节到pH 7,以引发过夜天然化学连接。通过分析型RP-HPLC监测反应进展直至完成,随后通过TCEP处理,之后 进行HPLC纯化。

[0867] 连接的肽产物的纯化在CXTHLC6000/Hanbon NU3000制备系统上在 Phenomenex C18/YMC C4硅胶上进行,柱尺寸为21.2×250mm/20.0×250 mm。将粗肽负载到制备柱上,且用浓度逐渐提高的溶剂B(含0.1%TFA 的80%乙睛)于溶剂A(含0.1%TFA的水)中的浅梯度以5毫升/分钟的 流动速率洗脱。通过分析型LC-MS鉴别含有经纯化目标肽的洗脱份,合并并且冻干。

[0868] 将最终线性D-VEGF-A肽在含有谷胱甘肽还原型(2mM)/谷胱甘肽 氧化型(0.4mM)氧化还原对的Gu·HCl(0.15M)水溶液中在pH 8.4下折 叠,且搅拌5天以达到完成(21)。折叠的D-VEGF-A通过RP-HPLC来纯 化。

[0869] 噬菌体展示库和淘选

[0870] 通过先前描述的方法(34),将未经处理的GA和Z结构域支架库构建 成与N末端基因8主要外壳蛋白的融合体。所需库位置(图46A-46C)的 随机化使用孔克尔诱变进行(35),其中三核苷酸寡核苷酸允许并入除半胱 氨酸外的所有天然氨基酸。所得库含有>10^{10}个唯一成员。对于亲和力成熟 库,分别使用靶向NNC或软随机化寡核苷酸对RFX-11055或RFX-978336 亲本序列进行孔克尔诱变。作为亲和力成熟目标的位置突出显示于图S1 中。

[0871] 根据先前建立的方案(34)执行所有噬菌体选择。简单来所,使用用 经抗生蛋白链菌素涂布的磁珠(普洛麦格(Promega))捕获的经生物素标 记的D-VEGF进行肽库的选择。最初,用逐渐减少量的D-VEGF(2.0mM、1.0mM和0.5mM)完成三轮选择。然后将噬菌体池转移到

N末端基因3 次要外壳蛋白展示载体上，且用逐渐减少量的D-VEGF(200nM、100nM 和50nM)和增加的洗涤次数进行额外三轮淘选。随后将个别噬菌体克隆 株送去进行测序分析。

[0872] D-蛋白结合子的合成

[0873] 亲和力成熟的D-蛋白RFX-979110和RFX-98018的多肽链(图 46A-46C)通过Fmoc化学分步SPPS在Rink酰胺MBHA树脂上手动制备。氨基酸的侧链保护如下:D-Arg(Pbf)、D-Asp(OtBu)、D-Glu(OtBu)、 D-Asn(Trt)、D-Gln(Trt)、D-Ser(tBu)、D-Thr(tBu)、D-Tyr(tBu)、D-His(Trt)、 D-Lys(Boc)、D-Trp(Boc)。在D-多肽的链组装完成且去除最末Fmoc基团 之后，通过用含有2.5％三异丙基硅烷和2.5％H_2O的TFA在室温下处理2.5 小时，使所得D-肽的侧链脱保护且同时从树脂支持物裂解。通过过滤从树 脂回收粗D-多肽产物，沉淀，且用冷却二乙醚湿磨，然后真空干燥。D-多 肽链在溶解于适当缓冲液中后自发地折叠，得到功能性D-蛋白结合子分子。

[0874] D-蛋白异二聚体的合成

[0875] 步骤1:叠氮基-PEG3-D-979110树脂的制备。

[0876] 将Fmoc-氨基酰基-Rink酰胺MBHA树脂在DMF(10-15mL/g树脂) 中溶胀1小时。将悬浮液过滤，交换到含20％哌啶的DMF中，且在连续氮 气灌注下在室温下保持0.5小时。然后用DMF洗涤树脂5次。将Fmoc-D- 氨基酸-OH、DIC、HOBt和DMF添加到树脂。将悬浮液在室温下保持1 小时，同时其中鼓泡通过氮气流。使用茚三酮测试监测偶联反应直至完成。 对应于亲和力成熟的D-蛋白RFX-979110的其余D-氨基酸依序与肽基树脂 偶联。叠氮基-PEG3-COOH与Lys19的伯胺偶联。受保护的RFX-979110 多肽链的氨基酸序列组装完成后，通过用含20％哌啶的DMF处理去除最末 Fmoc基团。肽基树脂用DMF(5次)、MeOH(2次)、DCM(2次)和MeOH (2次)洗涤，然后真空干燥过夜。

[0877] 步骤2:叠氮基-PEG3-D-979110-树脂的裂解和脱保护。

[0878] 将裂解溶液(TFA/硫代苯甲醚/EDT/苯酚/H_2O＝87.5/5/2.5/2.5/2.5v/v，10mL/g肽树脂)添加到干燥的叠氮基-PEG3-D-979110-树脂中。将悬浮液 摇动3小时且过滤，并收集滤液。将冷乙醚添加到滤液中以沉淀出肽，通 过离心进行回收。白色沉淀物用乙醚洗涤两次，然后真空干燥过夜，得到 呈白色固体状的粗叠氮基-PEG3-D-979110。

[0879] 步骤3:氧化和纯化。使用I_2氧化粗叠氮基-PEG3-D-979110。

[0880] 简单来说，将肽(23.5mg)溶解于11mL 30％ACN中，且与330μL CH_3COOH混合。逐滴添加I_2/MeOH溶液直至混合物为浅黄色，然后逐滴 添加抗坏血酸钠水溶液以淬灭过量I_2。经氧化的叠氮基-PEG3-D-979110的 纯化在CXTH LC6000/Hanbon NU3000制备系统上在Phenomenex C18硅胶 上进行，柱尺寸为21.2×250mm。将粗肽负载到制备柱上，且用浓度逐渐 提高的溶剂B(含0.1％TFA的80％乙睛)于溶剂A(含0.1％TFA的水) 中的浅梯度以5mL/min的流动速率洗脱。含有纯目标肽的洗脱份通过分析 型LC-MS鉴别，且合并并冻干，得到纯化的叠氮基-PEG3-D-979110，以用 于与(炔基-PEG2)-D-980181的后续点击反应。

[0881] 步骤4:炔基-PEG2-D-980181树脂的制备。

[0882] 将Fmoc-氨基酰基-Rink酰胺MBHA树脂在DMF(10-15mL/g树脂) 中溶胀1小时。将悬浮液过滤，交换到含20％哌啶的DMF中，且在连续氮 气灌注下在室温下保持0.5小时。然后用DMF洗涤树脂5次。将Fmoc-D- 氨基酸-OH、DIC、HOBt和DMF添加到树脂。将悬浮液在室温下保持1 小时，同时其中鼓泡通过氮气流。使用茚三酮测试监测偶联反应直至完成。 对应于

亲和力成熟的D-蛋白980181多肽链的其余D-氨基酸按顺序依序添 加。炔基-PEG2-COOH与Lys7的伯胺偶联。受保护的RFX-979181多肽链 的氨基酸序列组装完成后,通过用含20%哌啶的DMF处理去除最末Fmoc 基团。

[0883] 肽基树脂用DMF(5次)、MeOH(2次)、DCM(2次)和MeOH(2 次)洗涤,然后真空干燥过夜。

[0884] 步骤5:炔基-PEG2-D-980181的裂解和脱保护。

[0885] 将裂解溶液(TFA/TIS/H_2O 95/2.5/2.5v/v,10mL/g肽树脂)添加到炔 基-PEG2-D-980181同二聚体树脂中。将混合物摇动3小时,且收集滤液。将冷乙醚添加到滤液以沉淀出肽,通过离心进行回收。白色沉淀物用乙醚 洗涤两次,且真空干燥过夜,得到呈白色固体状的粗炔基-PEG2-D-980181 同二聚体。

[0886] 步骤6:纯化。

[0887] 粗炔基-PEG2-D-980181同二聚体的纯化在CXTH LC6000/Hanbon NU3000制备系统上在YMC C4硅胶上进行,柱尺寸为21.2×250mm。将粗 肽负载到制备柱上,且用浓度逐渐提高的溶剂B(含0.1%TFA的80%乙睛) 于溶剂A(含0.1%TFA的水)中的浅梯度以10毫升/分钟的流动速率洗脱。含有纯目标肽的洗脱份通过分析型LCMS鉴别,合并且冻干,得到纯化的 炔基-PEG2-D-980181同二聚体,其用于与叠氮基-PEGn-D-979110的点击反 应。

[0888] 步骤7:点击反应和纯化。

[0889] 将叠氮基-PEG3-D-979110及炔基-PEG2-D-980181溶解于乙醇:H_2O (v/v,1:1)中,然后将0.2M $CuSO_4$添加到反应混合物中,接着添加0.2M 抗坏血酸钠,且将反应混合物在30℃下搅拌2小时。反应混合物不经进一 步处理即负载到RP-HPLC上,且如上文所描述通过梯度洗脱来纯化。通过 LCMS鉴别含有所需产物的洗脱份,合并且冻干。质量观测值(LC-MS):13174.0Da;质量计算值(平均同位素组成):13176.8Da。

[0890] D-蛋白的LC-MS分析

[0891] 在具有Waters C4/Phenomenex C18硅胶柱(4.6×150mm,3.5μm/4.6×150 mm,5.0μm粒度)的HP 1090系统上以1.0mL/min的流动速率(50℃柱温 度)进行分析型RP-HPLC。使用水/0.1%TFA(溶剂A)相对于含80%乙腈 的水/0.1%TFA(溶剂B)的1.0%B/min梯度从柱洗脱肽。使用Agilent 6120 LC/MSD离子阱通过在线电喷雾MS检测获得肽质量。

[0892] 表面等离子体共振亲和力测量

[0893] 在Biacore S200(GE)上进行表面等离子体共振(SPR)结合测量。将 经生物素标记的VEGF-A(8-109)固定在生物素CAPture芯片(GE)上, 且将D-蛋白的连续稀释液在运行缓冲液(10mM Hepes,pH 7.4,150mM NaCl,0.05%P20)中以30μL/min流过芯片。RFX-11055、-978336、-979110 和-980181的缔合反应为60秒,且RFX-980869的缔合反应为120秒。在 运行缓冲液中进行解离反应120秒(RFX-11055、-978336、-979110、-980181) 或360秒(RFX-980869)。在25℃下进行所有测量。SPR数据代表多个独 立滴定。使用Biacore软件,使用全局单位点结合模型进行动力学拟合。

[0894] 用于晶体学的VEGF-A的表达和纯化

[0895] 将VEGF-A(8-109)多肽链的基因序列克隆到表达载体pET21b中, 在N末端处添加His_6标签和TEV裂解位点序列。将重组质粒转型到大肠杆 菌(E.coli)BL21-Gold中,在补充有氨苄西林(100μg/ml)的LB培养基 中生长,且在16℃下由0.3mM异丙基-b-D-硫代半乳糖

苷(IPTG)诱导加 His标签的蛋白的表达过夜。通过离心收集细胞,随后存储在-80℃下。

[0896] 将来自30L培养物的集结细胞再悬浮于1L缓冲液A(20mM Tris, pH 8.0,400mM NaCl)中,且然后通过高压均质化(3个循环)。将来自上 清液的加His标签的蛋白捕获在Ni-NTA树脂柱(30ml)上。用20CV含 20mM咪唑的缓冲液A、5CV缓冲液C(20mM Tris,pH 8.0,1M NaCl) 和10CV含50mM咪唑的缓冲液A洗涤柱。用缓冲液A(5CV)中高浓 度的咪唑(0.25M)洗脱加His_6标签-TEV位点-VEGF-A蛋白。洗脱蛋白质 用TEV蛋白酶以1:20比率(TEV:蛋白质)消化,且在4℃下用5L缓冲液(20 mM Tris,pH 8.0,50mM NaCl)渗析过夜。将裂解样品负载到第2Ni-NTA 柱上,以去除游离的His标签。洗脱的VEGF-A蛋白通过Resource Q柱(6 ml)上的离子交换色谱进一步纯化。使用以缓冲液A平衡的HiLoad 16/60 Superdex 75pg柱进行最终SEC精制步骤。单分散VEGF-A峰洗脱份通过 280nm下吸光度鉴别,且在缓冲液A中合并并浓缩到10-15mg/mL。如通 过SDS-PAGE分析评定,最终纯化的VEGF-A(8-109)蛋白的纯度为95%, 且通过直接注射MS确认分子量。

[0897] VEGF-A/D-蛋白复合物的晶体学

[0898] VEGF-A/RFX-11055复合物。通过在18℃下悬滴蒸汽扩散使 VEGF-A/RFX-11055的晶体生长。滴液由0.8μL VEGF-A/D-蛋白复合物 (2.72mg/ml VEGF-A和0.5mM RFX-11055)与0.8μl含0.2M氯化钙、0.1 M Tris pH 8.5、18%w/v PEG 4000的结晶溶液1:1混合构成。将晶体浸没 于含结晶溶液外加20%(v/v)甘油的低温保护剂溶液中,且在液氮中快速 冷冻。衍射数据在上海光源(Shanghai Synchrotron Radiation Facility)束线 BL19U1下收集,达到2.31埃分辨率,且使用XDS在空间群$P2_12_12_1$中处 理。使用Phaser用VEGF结构(PDB ID:3QTK)作为搜索模型,通过分 子置换解析结构。在Refmac5与Coot之间反复地对初始模型进行结构优化 和模型构建。在不对称单元中有{VEGF-A外加RFX-11055}复合物的两个拷贝。详细的数据处理和结构优化统计数据在图53中列出。

[0899] VEGF-A/RFX-978336复合物。

[0900] 通过在18℃下悬滴蒸汽扩散使VEGF-A/RFX-978336的晶体生长。滴 液由0.8μL VEGF-A/D-蛋白复合物(5.44mg/ml VEGF-A和0.46mM RFX-978336)与0.8μl含0.15M氯化镁、0.1M Bis-Tris pH 5.5、25%w/v PEG 3350的结晶溶液1:1混合构成。将晶体浸没于含结晶溶液外加10%(v/v) 甘油的低温保护剂溶液中,且在液氮中快速冷冻。衍射数据在ALS束线8.3.1 下收集,达到2.9埃分辨率,且使用XDS在空间群$P2_12_12_1$中索引化。使用 Phaser用VEGF结构(PDB ID:3QTK)作为搜索模型,通过分子置换解析 结构。在Refmac5与Coot之间反复地对初始模型进行结构优化和模型构建。 在不对称单元中有{VEGF_A外加RFX-978336}复合物的四个拷贝。详细的 数据处理和结构优化统计数据在图53中列出。使用Pymol(Schrodinger) 渲染所有结构图像。

[0901] VEGF-A121/VEGFR1-Fc结合ELISA

[0902] 经生物素标记的人类VEGF-A121(同功异型物121)购自Acro Biosystems(目录号VE1-H82E7)。VEGFR-1-Fc购自R&D Systems(目录 号3516-FL-050)。

[0903] 贝伐单抗由基因泰克公司(Genentech Inc.)制造(批号3067997)。在 所有情况下,将1μg/mL VEGFR1-Fc在4℃下涂布于MaxiSorp板上过夜。 第二天,将经涂布的孔在室温下用Super Block(Rockland)伴随摇动阻断 2小时。对于非平衡ELISA,将D-蛋白和贝伐单抗的滴定液与1.0nM经生 物素标记的VEGF-A121一起培育30分钟,随后添加到阻断的

VEGFR1-Fc 涂布的孔中。

[0904] 拮抗剂/VEGF-A121混合物在VEGFR1-Fc孔上伴随摇动在室温下培育 1小时,用洗涤缓冲液(PBS,0.05%Tween 20)洗涤3次,且用抗生蛋白 链菌素-HRP(赛默飞世尔)检测到结合的经生物素标记的VEGF-A121。对 于平衡结合ELISA,将D-蛋白、贝伐单抗和可溶性VEGFR1-Fc的滴定液 与0.15nM经生物素标记的VEGF-A121在4℃下培育过夜,随后添加至阻断的VEGFR1-Fc涂布的孔中。将拮抗剂/VEGF-A121混合物伴随摇动在室 温下在VEGFR1-Fc孔上培育5小时,且如上显色。标绘的数据是三次重复 测量的平均值±标准差。IC_{50}值使用Prism(GraphPad)由3参数拟合得出，并且报告的误差由拟合得出。

[0905] VEGF细胞信号传导分析

[0906] 使用VEGF生物分析(普洛麦格)进行VEGF细胞信号传导的测量。简单来说,HEK293细胞经工程改造以表达与荧光素酶反应元件 (KDR/NFAT-RE HEK293)偶联的VEGFR-2。经由VEGFR-2的VEGF信号 传导介导荧光素酶表达,其可使用生物发光来定量。将接种细胞在0.15nM VEGF-A165外加D-蛋白或贝伐单抗滴定液存在下培育,且在37℃、5%CO_2下培育6小时。培育后,根据制造商的方案将Bio-Glo添加到孔中,且在珀 金埃尔默(PerkinElmer)2300Enspire多模式板读取器上测量相对发光单位 (RLU)。标绘的数据是三次重复测量的平均值±标准差。IC_{50}值使用Prism (GraphPad)由3参数拟合得到,并且报告的误差由拟合得到。

[0907] 兔湿性AMD模型

[0908] 荷兰黑带兔(Dutch Belted rabbit)(1.5-2.5kg)购自Western Oregon Rabbit Company。阿柏西普购自再生元制药(Regeneron Pharmaceuticals)。在第0天,将兔随机分入治疗组(每组N＝5),且进行基线眼科检查,随 后单次玻璃体内注射(25微升/眼)RFX-980869(0.25mg或1.0mg)或采 视明(1.0mg)。在第2天和第23天,用1μg VEGF-A_{165}在两只眼中攻击 兔。在第5天和第26天,对两只眼进行荧光素血管造影,且拍摄图像以评 定血管渗漏。在第5天和第26天进行基于FA图像的血管渗漏评分(图44B)。

[0909] C57BL6小鼠中的MC38同系肿瘤模型

[0910] 针对人类PD-1转基因的雌性C57BL6小鼠(12-13周)购自北京百奥 赛图基因生物技术有限公司(Beijing Biocytogen Co.)。纳武单抗购自百时 美施贵宝(Bristol Myers Squibb),批号AAY1999。将MC38肿瘤细胞(1×106 个)皮下植入右前侧腹,且允许肿瘤建立,直至平均体积为82mm3。在治 疗起始开始时第0天,将小鼠随机分入治疗组(每组N＝6)。每天i.p.注射 2mg/kg或6mg/kg的RFX-980869持续2周(14次剂量),且每两周一次 i.p.注射1mg/kg或3mg/kg的纳武单抗,持续6次剂量。所有数据绘制为 平均值±SEM。

[0911] BALB/c小鼠中的皮下免疫接种

[0912] 佐剂购自TiterMax。贝伐单抗购自基因泰克/罗氏(Roche)。在第0天， 将雌性BALB/c小鼠(6-8周)随机分入免疫接种组(每组n＝5)。在第0、21、35天通过皮下注射25μg抗原进行免疫接种。抗原在第0天在注射用 佐剂(TiterMax)中乳化,且在第21天和第35天在PBS中施用。在第0、21、35天在免疫接种之前进行血清预采血。在第42天进行最大滴度反应的 最终采血。

[0913] 尽管已出于理解清楚性的目的借助于说明和实例相当详细地描述特定 实施例,但根据本发明的教示容易显而易见的是可在不背离所附权利要求 书的精神或范围的情况

下对其作出某些改变和修改。

[0914] 因此,先前内容仅说明本发明的原理。可设计各种布置,尽管其未明 确地描述或显示于本文中,但体现本发明的原理且包括在其精神和范围内。此外,本文中叙述的所有实例和条件性语言主要旨在帮助读者理解本发明 的原理和由诸位发明人为本领域技术发展所贡献的概念,并且应解释为但 不限于这种具体叙述的实例和条件。此外,本文中叙述本发明的原理、方 面和实施例以及其具体实例的所有陈述旨在涵盖其结构等同物和其功能等 同物。另外,这种等同物旨在包括目前已知的等同物以及将来开发的等同 物,即所开发的执行相同功能的任何要素,而不考虑结构。因此,本发明 的范围不旨在受限于本文中所示和描述的示例性实施例。相反,本发明的 范围和精神由所附权利要求书体现。

[0915] 本申请还涉及以下项目。

[0916] 1.一种特异性结合VEGF的多价D-肽化合物,其包含:

[0917] D-肽Z结构域,其能够特异性结合VEGF的第一结合位点;和

[0918] D-肽GA结构域,其能够特异性结合VEGF的第二结合位点。

[0919] 2.根据项目1所述的D-肽化合物,其中:

[0920] 所述第一结合位点包含VEGF的氨基酸侧链E90、F62、D67、I69、E70、 K110、P111、H112和Q113;

[0921] 所述第二结合位点包含VEGF的氨基酸侧链F43、M44、Y47、Y51、 N88、D89、L92、I72、K74、M107、I109、Q115和I117;且

[0922] 所述第一结合位点和所述第二结合位点各自与VEGF目标蛋白上的 VEGFR2结合位点至少部分重叠。

[0923] 3.根据请求项1或2所述的D-肽化合物,其中所述D-肽Z结构域包 含VEGF特异性决定基序(SDM),所述VEGF特异性决定基序在选自9、 10、13、14、17、24、27、28、32和35的位置处包含5个或更多个变异氨 基酸残基(例如,6个或更多个,例如6、7、8、9或10个)。

[0924] 4.根据项目2所述的D-肽化合物,其中所述D-肽Z结构域是根据项 目30至41中任一项所述。

[0925] 5.根据项目1至3中任一项所述的D-肽化合物,其中所述D-肽GA 结构域包含VEGF特异性决定基序(SDM),所述VEGF特异性决定基序 在选自25、27、30、31、34、36、37、39、40和42-48的位置处包含5 个或更多个(例如,5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16个) 变异氨基酸残基。

[0926] 6.根据项目4所述的D-肽化合物,其中所述D-肽GA结构域是根据 项目42至60中任一项所述。

[0927] 7.根据项目1至3中任一项所述的D-肽化合物,其进一步包含共价连 接所述D-肽Z结构域和所述D-肽GA结构域的连接组分。

[0928] 8.根据项目7所述的D-肽化合物,其中所述连接组分为将所述D-肽Z 结构域的末端氨基酸残基连接到所述D-肽GA结构域的末端氨基酸残基的 连接子(例如,N末端到N末端连接子或C末端到C末端连接子)。

[0929] 9.根据项目8所述的D-肽化合物,其中所述连接组分为N末端到N 末端连接子。

[0930] 10.根据项目9所述的D-肽化合物,其中所述N末端到N末端连接子 为连接所述D-肽Z结构域和所述D-肽GA结构域的N末端氨基酸残基的 $(PEG)_n$双官能连接子,其中n为2-20

(例如,n为5、6、7、8、9、10、11 或12)。

[0931] 11.根据项目7所述的D-肽化合物,其中所述连接组分为:

[0932] 连接所述D-肽Z结构域的氨基酸侧链和所述D-肽GA结构域的末端氨 基酸残基的连接子,在所述D-肽Z结构域和所述D-肽GA结构域同时与目 标蛋白结合时,所述氨基酸侧链与所述末端氨基酸残基彼此接近;或

[0933] 连接所述D-肽Z结构域的末端氨基酸残基和所述D-肽GA结构域的氨 基酸侧链的连接子,在所述D-肽Z结构域和所述D-肽GA结构域同时与目 标蛋白结合时,所述末端氨基酸残基与所述氨基酸侧链彼此接近。

[0934] 12.根据项目11所述的D肽化合物,其中所述连接组分为连接所述 D-肽Z结构域的氨基酸侧链和所述D-肽GA结构域的氨基酸侧链的连接子, 在所述D-肽Z结构域和所述D-肽GA结构域同时与VEGF结合时,所述氨 基酸侧链彼此接近。

[0935] 13.根据项目12所述的D-肽化合物,其中所述连接子连接所述D-肽Z 结构域的位置7处的氨基酸残基的侧链和所述D-肽GA结构域的位置19 处的氨基酸残基的侧链。

[0936] 14.根据项目13所述的D-肽化合物,其中所述D-肽GA结构域和所 述D-肽Z结构域经由所述D-肽Z结构域的k^{7}残基与所述D-肽GA结构域 的k^{19}残基之间的连接子连接。

[0937] 15.根据项目6至14中任一项所述的D-肽化合物,其中所述连接组分 将所述D-肽Z结构域的N末端连接到所述D-肽GA结构域的近端残基(例 如,k^{19}、k^{20}或k^{50}残基)的侧链。

[0938] 16.根据项目1至15中任一项所述的D-肽化合物,其中所述D-肽GA 结构域包含在所述结构域的位置7和38处的近端氨基酸残基之间的螺旋间 连接子。

[0939] 17.根据项目16所述的D-肽化合物,其中所述螺旋间连接子具有长度 为3至7个原子的主链,如在所述近端氨基酸残基的α-碳之间所测量。

[0940] 18.根据项目16或17所述的D-肽化合物,其中所述螺旋间连接子包 含一个或多个选自以下的基团:$C_{(1-6)}$烷基、被取代的$C_{(1-6)}$烷基、$-(CHR)_n-CONH-(CHR)_m-$和$-(CHR)_n-S-S-(CHR)_m-$,其中各R独立地为H、$C_{(1-6)}$烷基或被取代的$C_{(1-6)}$烷基,且n+m=0-5(例如,n+m=2、3、4或5)。

[0941] 19.根据项目7至18中任一项所述的D-肽化合物,其中所述连接组分 被配置成连接所述D-肽GA结构域和所述D-肽Z结构域,由此所述结构域 能够同时结合到VEGF-A。

[0942] 20.根据项目7至19中任一项所述的D-肽化合物,其中所述连接组分 包含一个或多个选自以下的基团:氨基酸残基、多肽、$(PEG)_n$连接子(例 如,n为2-50、3-50、4-50、6-50或6-20)、经修饰的PEG部分、$C_{(1-6)}$烷基 连接子、被取代的$C_{(1-6)}$烷基连接子、$-CO(CH_2)_mCO-$、$-NR(CH_2)_pNR-$、$-CO(CH_2)_mNR-$、$-CO(CH_2)_mO-$、$-CO(CH_2)_mS-$和连接的化学选择性官能团(例如,-CONH-、-OCONH-、点击化学缀合物,例如1,2,3-三唑、马来酰亚胺- 硫醇缀合硫代琥珀酰亚胺、卤乙酰基-硫醇缀合硫醚等),其中m为1至6, p为2-6,且各R独立地为H、$C_{(1-6)}$烷基或被取代的$C_{(1-6)}$烷基。

[0943] 21.根据项目1至20中任一项所述的D-肽化合物,其中所述化合物为 二价的。

[0944] 22.根据项目1至20中任一项所述的D-肽化合物,其中所述化合物为 三价的。

[0945] 23.根据项目1至20中任一项所述的D-肽化合物,其中所述化合物为 四价的。

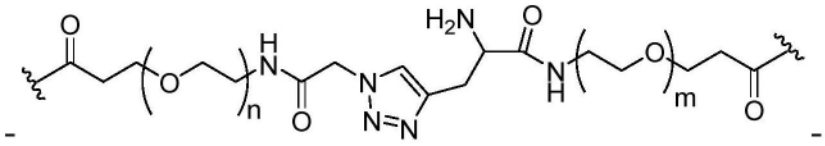
[0946] 24.根据项目1至23中任一项所述的D-肽化合物,其中所述化合物进 一步包含与所述第一D-肽Z结构域同源的第二D-肽Z结构域。

[0947] 25.根据项目1至24中任一项所述的D-肽化合物,其中所述化合物进 一步包含与所述第一D-肽GA结构域同源的第二D-肽GA结构域。

[0948] 26.根据项目23至25中任一项所述的D-肽化合物,其中所述化合物 包含四个D-肽结构域,所述四个D-肽结构域被配置为两种二价D-肽化合 物的二聚体,所述两种二价D-肽化合物各自包含D-肽Z结构域和D-肽GA 结构域。

[0949] 27.根据项目26所述的D-肽化合物,其中各二价D-肽化合物的D-肽 Z结构域和D-肽GA结构域经由D-肽Z结构域的k^{7}残基与D-肽GA结构 域的k^{19}残基之间的连接子连接。

[0950] 28.根据项目17所述的D-肽化合物,其中所述连接子为:

[0951] 

[0952] 其中n和m独立地为1-6(例如,1、2或3)。

[0953] 29.根据项目28所述的D-肽化合物,其中所述两种二价D-肽化合物 经由所述二价D-肽化合物的D-肽Z结构域的C末端氨基酸残基之间的连 接子共价连接。

[0954] 30.根据项目29所述的D-肽化合物,其中所述C末端到C末端连接 子包含:

[0955] *-丙氨酸-赖氨酸(-*)

[0956] 其中各-*为与D-肽结构域的键。

[0957] 31.一种特异性结合VEGF的D-肽化合物,其包含:

[0958] D-肽Z结构域,其包含:

[0959] a)由以下氨基酸残基界定的VEGF特异性决定基序(SDM):

[0960] $w^{9}d^{10}$--$w^{13}x^{14}$--r^{17}------x^{24}--$k^{27}x^{28}$---x^{32}--y^{35}(SEQ ID NO:160)

[0961] 其中:

[0962] x^{14}选自l、r和t;

[0963] x^{24}选自h、i、l、r和v;

[0964] x^{28}选自G、r和v;

[0965] x^{32}选自a、r、h、s和t;且

[0966] x^{35}选自k或y;

[0967] b)与(a)中所界定的SDM残基具有80%或更高(例如,90%或更高) 同一性的VEGF SDM;或

[0968] c)相对于(a)中所界定的SDM残基具有1至3个氨基酸残基取代的 VEGF SDM,其中所述1至3个氨基酸残基取代选自:

[0969] i)根据表6的类似氨基酸残基取代;

[0970] ii)根据表6的保守氨基酸残基取代;

[0971] iii)根据表6的高度保守氨基酸残基取代;和

[0972] iv)根据图33A中所界定的基序的氨基酸残基取代。

[0973] 32.根据项目31所述的D-肽化合物,其中(a)中所界定的SDM残基 为:

[0974] $w^{9}d^{10}$--$w^{13}r^{14}$--r^{17}------l^{24}--$k^{27}r^{28}$---s^{32}--y^{35}(SEQ ID NO:161)

[0975] 或

[0976] $w^{9}d^{10}$--$w^{13}r^{14}$--r^{17}------v^{24}--$k^{27}r^{28}$---r^{32}--y^{35}(SEQ ID NO:162)。

[0977] 33.根据项目32所述的D-肽化合物,其中所述VEGF SDM由以下残 基界定:

[0978] $w^{9}d^{10}$--$w^{13}r^{14}$--r^{17}------l^{24}--$k^{27}r^{28}$---s^{32}--y^{35}(SEQ ID NO:161)

[0979] 或

[0980] $w^{9}d^{10}$--$w^{13}r^{14}$--r^{17}------v^{24}--$k^{27}r^{28}$---r^{32}--y^{35}(SEQ ID NO:162)。

[0981] 34.根据项目31至33中任一项所述的D-肽化合物,其中所述SDM残 基包含在包含以下的肽框架序列中:

[0982] a)由以下氨基酸残基界定的肽框架残基:

[0983] --n^{11}a--e^{15}i-h^{18}lpnln-e^{25}q--a^{29}fi-s^{33}l-;

[0984] b)与(a)中所界定的残基具有80%或更高(例如,90%或更高)同 一性的肽框架残基;或

[0985] c)相对于(a)中所界定的残基具有1至3个氨基酸残基取代的肽框 架残基,其中所述1至3个氨基酸残基取代选自:

[0986] i)根据表6的类似氨基酸残基取代;

[0987] ii)根据表6的保守氨基酸残基取代;和

[0988] iii)根据表6的高度保守氨基酸残基取代。

[0989] 35.根据项目31至34中任一项所述的D-肽化合物,其包含与以下氨 基酸序列具有80%或更高(例如,85%或更高、90%或更高、或95%或更高) 同一性的含SDM序列:

[0990] $w^{9}d^{10}$naw^{13}x^{14}eir^{17}hlpnlnx^{24}eqk^{27}x^{28}afix^{32}sly^{35}(SEQ ID NO:133)

[0991] 其中:

[0992] x^{14}选自l、r和t;

[0993] x^{24}选自h、i、l、r和v;

[0994] x^{28}选自G、r和v;

[0995] x^{32}选自a、r、h、s和t;且

[0996] x^{35}选自k或y。

[0997] 36.根据项目31至35中任一项所述的D-肽化合物,其中所述D-肽Z 结构域为以下结构式的三螺旋束:

[0998] [螺旋1$^{(\#8\text{-}18)}$]-[连接子1$^{(\#19\text{-}24)}$]-[螺旋2$^{(\#25\text{-}36)}$]-[连接子2$^{(\#37\text{-}40)}$]-[螺旋3$^{(\#41\text{-}54)}$]

[0999] 其中:

[1000] #表示所述D-肽GA结构域中所包含的氨基酸残基的参考位置;且

[1001] 螺旋3$^{(\#41\text{-}54)}$包含选自以下的肽框架序列:

[1002] a)s^{41}anllaeakklnda^{54}(SEQ ID NO:134);

[1003] b)与(a)中所阐述的序列具有70%或更高(例如,75%或更高、 80%或更高、85%或更高、或90%或更高)同一性的序列;或

[1004] c)相对于(a)中所阐述的序列具有1至5个氨基酸残基取代的序 列,其中所述1至5个氨基酸残基取代选自:

[1005] i)根据表6的类似氨基酸残基取代;

[1006] ii)根据表6的保守氨基酸残基取代;和

[1007] iii)根据表6的高度保守氨基酸残基取代。

[1008] 37.根据项目31至36中任一项所述的D-肽化合物,其中所述D-肽Z 结构域进一步

包含选自以下的C末端肽框架序列：

[1009] a)d^{36}dpsqsanllaeakklndaqapk^{58}(SEQ ID NO:135)；和

[1010] b)相对于(a)中所阐述的序列具有70％或更高(例如,75％或更高、80％或更高、85％或更高、或90％或更高)同一性的序列。

[1011] 38.根据项目31至37中任一项所述的D-肽化合物,其中所述D-肽Z 结构域进一步包含选自以下的N末端肽框架序列：

[1012] a)v^{1}dnkfnke^{8}(SEQ ID NO:136)；和

[1013] b)相对于(a)中所阐述的序列具有60％或更高(例如,75％或更高、85％或更高)同一性的序列。

[1014] 39.根据项目31至38中任一项所述的D-肽化合物,其包含：

[1015] (a)选自化合物978333至978337(SEQ ID NO:114-118)、980181(SEQ ID NO:119)、980174至980180(SEQ ID NO:120-126)和981188至981190 (SEQ ID NO:127-129)中的一者的序列；

[1016] (b)与(a)中所界定的序列具有80％或更高序列同一性的序列；或

[1017] (c)相对于(a)中所界定的序列具有1至10个氨基酸取代的序列，其中所述1至10个氨基酸取代为：

[1018] i)根据表6的类似氨基酸取代；

[1019] ii)根据表6的保守氨基酸取代；或

[1020] iii)根据表6的高度保守氨基酸取代。

[1021] 40.根据项目39所述的D-肽化合物,其包含化合物978333至978337 和980181(SEQ ID NO:114-119)中的一者的氨基酸序列。

[1022] 41.根据项目31至40中任一项所述的D-肽化合物,其中所述化合物 为二聚的。

[1023] 42.根据项目31至40中任一项所述的D-肽化合物,其中所述化合物 进一步包含与所述第一D-肽Z结构域同源的第二D-肽Z结构域。

[1024] 43.一种特异性结合VEGF的D-肽化合物,其包含：

[1025] D-肽GA结构域,其包含：

[1026] a)由以下氨基酸残基界定的VEGF特异性决定基序(SDM)：

[1027] e^{25}phvisf--h^{34}-$p^{36}x^{37}$-s^{39}h--G^{43}---a^{47}(SEQ ID NO:149)

[1028] 其中x^{37}选自s、n和y；

[1029] b)与(a)中所界定的SDM残基具有80％或更高(例如,90％或更高) 同一性的VEGF SDM；或

[1030] c)相对于(a)中所界定的SDM残基具有1至3个氨基酸残基取代的 VEGF SDM,其中所述1至3个氨基酸残基取代选自：

[1031] i)根据表6的类似氨基酸残基取代；

[1032] ii)根据表6的保守氨基酸残基取代；

[1033] iii)根据表6的高度保守氨基酸残基取代；和

[1034] iv)根据图26中所界定的基序的氨基酸残基取代。

[1035] 44.根据项目43所述的D-肽化合物,其中(a)中所界定的VEGF SDM 进一步由以下残基界定：

[1036] c^{7}----------e^{25}phvisf--h^{34}-$p^{36}x^{37}c^{38}$sh--G^{43}---a^{47}(SEQ ID NO:150)

[1037] 其中x^{37}选自s和n。

[1038] 45.根据项目43或44所述的D-肽化合物,其进一步包含以下区段(I) -(II):

[1039] $x^{1}x^{2}x^{3}$qw$x^{6}x^{7}$ (I)

[1040] $x^{37}x^{38}$ (II)

[1041] 其中:

[1042] x^{1}至x^{3}独立地选自任何D-氨基酸残基;

[1043] x^{6}选自i和v;

[1044] x^{37}选自s和n;且

[1045] x^{7}和x^{38}为经由结构域内连接子连接的氨基酸残基,所述结构域内 连接子具有长度为3至7个原子的主链,如在氨基酸残基x^{7}和x^{38}的α- 碳之间所测量。

[1046] 46.根据项目45所述的D-肽化合物,其中x^{1}至x^{3}独立地选自f、h、i、 p、r、y、n、s和v。

[1047] 47.根据项目45或46所述的D-肽化合物,其中x^{6}为v。

[1048] 48.根据项目44至47中任一项所述的D-肽化合物,其中x^{37}为n。

[1049] 49.根据项目44至48中任一项所述的D-肽化合物,其中所述x^{7}氨基 酸残基和所述x^{38}氨基酸残基经由二硫化物结构域内连接进行连接,且选 自:

[1050] 半胱氨酸^{7}-半胱氨酸^{38}二硫化物;

[1051] 高半胱氨酸^{7}-半胱氨酸^{38}二硫化物;

[1052] 半胱氨酸^{7}-高半胱氨酸^{38}二硫化物;和

[1053] 高半胱氨酸^{7}-高半胱氨酸^{38}二硫化物。

[1054] 50.根据项目49所述的D-肽化合物,其中x^{7}和x^{38}各自为半胱氨酸, 且所述结构域内连接子包含c^{7}氨基酸残基与c^{38}氨基酸残基之间的二硫化物 连接。

[1055] 51.根据项目45至50中任一项所述的D-肽化合物,其中所述结构域 内连接子包含所述x^{7}氨基酸残基的侧链与所述x^{38}氨基酸残基的侧链之间 的酰胺键连接。

[1056] 52.根据项目51所述的D-肽化合物,其中所述酰胺键连接是在以下x^{7}和x^{38}D-氨基酸残基对中的一者之间:

[1057] 天冬氨酸7和Dap38;

[1058] 天冬氨酸7和Dab38;

[1059] 天冬氨酸7和鸟氨酸-38;

[1060] 谷氨酸7和Dap38;

[1061] 谷氨酸7和Dap38;和

[1062] 谷氨酸7和鸟氨酸38;

[1063] 其中Dap为α,β-二氨基丙酸,且Dab为α,γ-二氨基丁酸。

[1064] 53.根据项目45至52中任一项所述的D-肽化合物,其对VEGF的结 合亲和力(K_D)比缺乏所述结构域内连接子的对照化合物强3倍或更高(即, K_D低3倍)。

[1065] 54.根据项目43至53中任一项所述的D-肽化合物,其中所述D-肽 GA结构域包含以下结构式的三螺旋束:

[1066] [螺旋1$^{(\#6-21)}$]-[连接子1$^{(\#22-26)}$]-[螺旋2$^{(\#27-35)}$]-[连接子2$^{(\#36-37)}$]-[螺旋3$^{(\#38-51)}$]

[1067] 其中:

[1068] #表示所述D-肽GA结构域中所包含的氨基酸残基的参考位置;且

[1069] 螺旋1$^{(\#6-21)}$包含选自以下的肽框架序列:

[1070] a)x^6x^7knakedaiaelkka^{21}(SEQ ID NO:138)

[1071] 其中:

[1072] x^6选自l、v和i;且

[1073] x^7选自l和c;和

[1074] b)相对于(a)中所界定的序列具有70%或更高(例如,75%或更 高、80%或更高、85%或更高、90%或更高、或95%或更高)同一性的 序列。

[1075] 55.根据项目54所述的D-肽化合物,其中所述D-肽GA结构域包含 选自以下的N末端肽框架序列:

[1076] a)$x^1x^2x^3$qwx$^6x^7$knakedaiaelkkaGit^{24}(SEQ ID NO:139)

[1077] 其中:

[1078] x^1选自t、y、f、i、p和r;

[1079] x^2选自i、h、n、p和s;

[1080] x^3选自d、i和v;

[1081] x^6选自l、v和i;且

[1082] x^7选自l和c;和

[1083] b)相对于(a)中所界定的序列具有70%或更高(例如,75%或更高、 80%或更高、85%或更高、90%或更高、或95%或更高)同一性的序列。

[1084] 56.根据项目43至55中任一项所述的D-肽化合物,其中所述D-肽 GA结构域进一步包含选自以下的C末端肽框架序列:

[1085] a)ilkaha(SEQ ID NO:140);和

[1086] b)相对于(a)中所界定的序列具有50%或更高(例如,65%或更高、 或80%或更高)同一性的序列。

[1087] 57.根据项目56所述的D-肽化合物,其中所述D-肽GA结构域包含 以下序列:

[1088] $x^1x^2x^3$qwx$^6x^7$knakedaiaelkkagitephvisfinhapx$^{37}x^{38}$shvnGlknailkaha^{53}(SEQ ID NO:141)

[1089] 其中:

[1090] x^1选自t、y、f、i、p和r;

[1091] x^2选自i、h、n、p和s;

[1092] x^3选自d、i和v;

[1093] x^6选自l、v和i;

[1094] x^7选自l和c;

[1095] x^{37}选自t、y、n和s;

[1096] x^{38}选自v和c;

[1097] x^{39}选自e和s;

[1098] x^{40}选自h和e;

[1099] x^{43}选自g和a;且

[1100] x^{47}选自a和e。

[1101] 58.根据项目43至57中任一项所述的D-肽化合物,其包含:

[1102] (a)选自化合物11055、979102和979107-979110(SEQ ID NO:108-113) 中的一者的序列;

[1103] b)与(a)中所界定的序列具有80%或更高(例如,90%或更高)同 一性的序列;或

[1104] c)相对于(a)中所界定的序列具有1至10个氨基酸残基取代的序列, 其中所述1至10个氨基酸残基取代选自:

[1105] i)根据表6的类似氨基酸残基取代;

[1106] ii)根据表6的保守氨基酸残基取代;和

[1107] iii)根据表6的高度保守氨基酸残基取代。

[1108] 59.根据项目58所述的D-肽化合物,其包含化合物11055、979102和 979107-979110(SEQ ID NO:108-113)中的一者。

[1109] 60.根据项目43至59中任一项所述的D-肽化合物,其进一步包含与 所述第一D-肽GA结构域同源的第二D-肽GA结构域。

[1110] 61.根据项目43至59中任一项所述的D-肽化合物,其中所述化合物 为二聚的。

[1111] 62.一种药物组合物,其包含:

[1112] 根据条项1至61中任一项所述的D-肽化合物或其药学上可接受的盐; 和

[1113] 药学上可接受的赋形剂。

[1114] 63.根据项目62所述的药物组合物,其中所述组合物被配制成用于治 疗眼部疾病或病况。

[1115] 64.一种治疗或预防受试者的与血管生成相关的疾病或病况的方法,所 述方法包含向有需要的受试者施用有效量的根据条项1至60中任一项所述 的特异性结合VEGF的D-肽化合物或其药学上可接受的盐。

[1116] 65.根据项目64所述的方法,其中所述与血管生成相关的疾病或病况 为癌症(例如,乳癌、皮肤癌、结肠直肠癌、胰脏癌、前列腺癌、肺癌或 卵巢癌)、发炎性疾病、动脉粥样硬化、类风湿性关节炎、黄斑变性、视网 膜病变和皮肤疾病(例如,红斑痤疮)。

[1117] 66.根据项目64所述的方法,其中所述与血管生成相关的疾病或病况 为糖尿病性黄斑水肿(DME)。

[1118] 67.根据项目64所述的方法,其中所述与血管生成相关的疾病或病况 为湿性年龄相关黄斑变性(AMD)。

[1119] 68.根据项目64至67中任一项所述的方法,其进一步包含向所述受试 者施用有效量的第二活性剂。

[1120] 69.根据项目68所述的方法,其中所述第二活性剂为D-肽化合物。

[1121] 70.根据项目68所述的方法,其中所述第二活性剂选自小分子、化学 治疗剂、抗体、抗体片段、适体和L-蛋白。

[1122] 71.根据项目68至70中任一项所述的方法,其中所述第二活性剂特异 性结合选自以下的目标蛋白:血小板衍生生长因子(PDGF)、VEGF-B、 VEGF-C、VEGF-D、EGF、EGFR、Her2、Her3、PD-1、PD-L1、CTLA4、 OX-40、DR3、LAG3、Ang2、IL-1、IL-6、FcRn、CD3、BCMA和IL-17。

[1123] 72.根据项目71所述的方法,其中所述第二活性剂选自:派勒兰尼 (pegpleranib)(福维斯塔(Fovista))、兰尼单抗(ranibizumab)(乐舒晴 (Lucentis))、曲妥珠单抗

(trastuzumab)(贺癌平(Herceptin))、贝伐单抗 (bevacizumab)(癌思停(Avastin))、阿柏西普(aflibercept)(采视明 (Eylea))、纳武单抗(nivolumab)(保疾伏(Opdivo))、阿特珠单抗 (atezolizumab)、德瓦鲁单抗(durvalumab)、吉非替尼(gefitinib)、埃罗替 尼(erlotinib)和派姆单抗(pembrolizumab)(吉舒达(Keytruda))。

[1124] 73.根据项目68所述的方法,其中所述第二活性剂为D-肽化合物,所 述D-肽化合物为PD-1的拮抗剂。

[1125] 74.一种用于对与血管生成相关的疾病或病况进行活体内诊断或成像 的方法,其包含:

[1126] 向受试者施用根据项目1至60中任一项所述的特异性结合VEGF的 D-肽化合物;和

[1127] 对所述受试者的至少一部分进行成像。

[1128] 75.根据项目74所述的方法,其中所述成像包含PET成像,且所述施 用包含向所述受试者的血管系统施用所述化合物。

[1129] 76.根据项目74所述的方法,其进一步包含检测细胞受体对所述化合 物的摄取。

[1130] 77.根据项目74所述的方法,其进一步包含向所述受试者施用贝伐单 抗,其中所述与血管生成相关的疾病或病况为癌症。

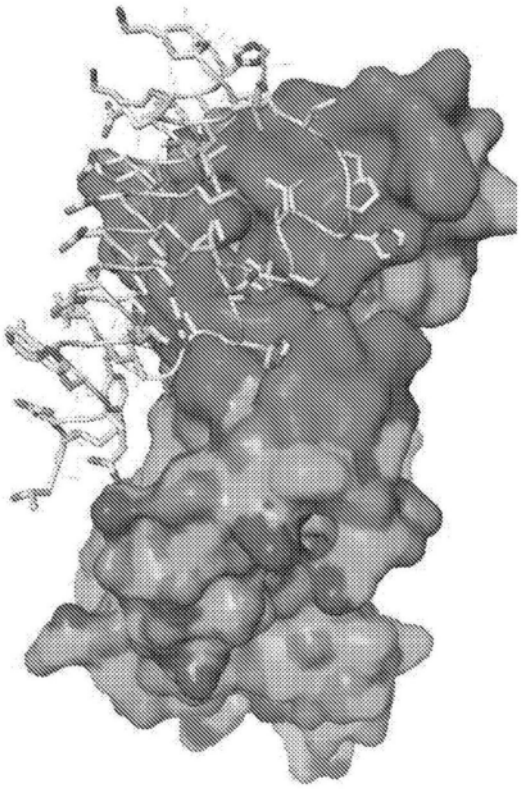


图1

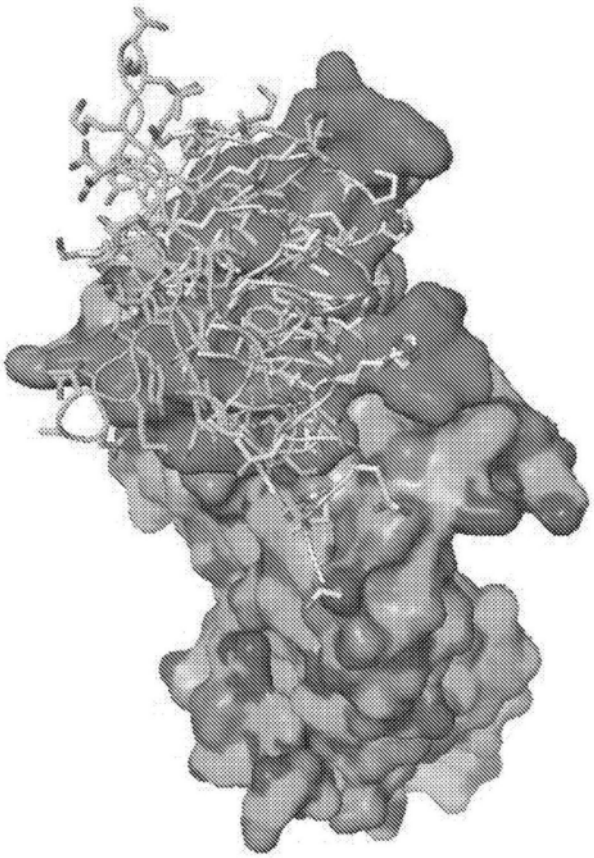


图2

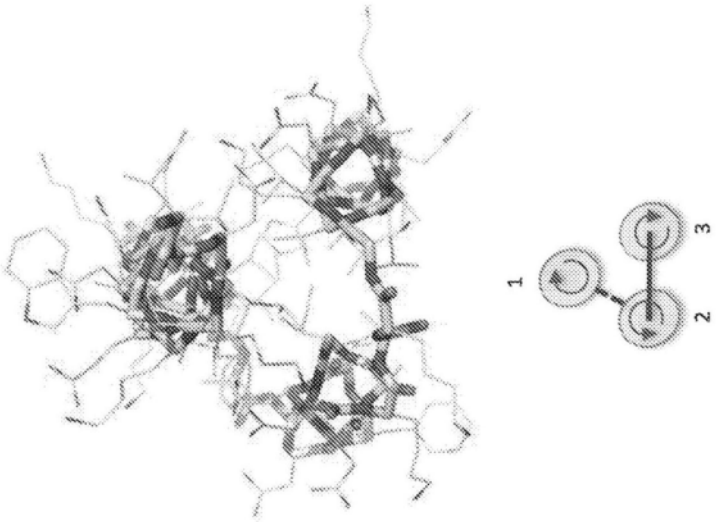


图3A

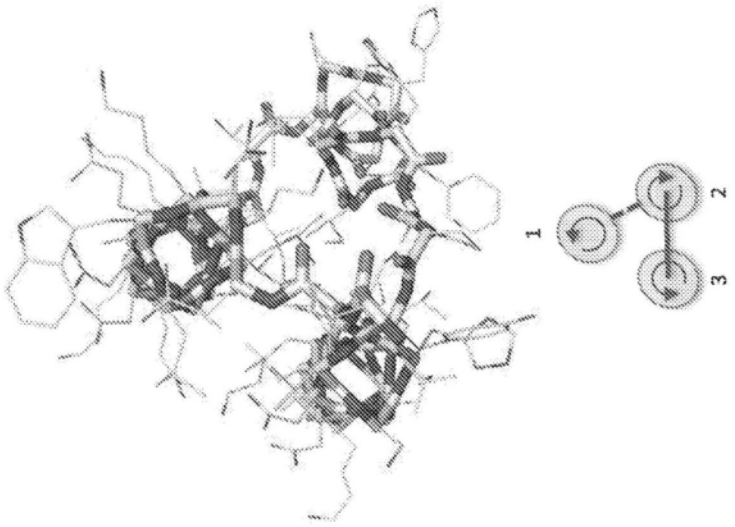

1
2
3

图3B

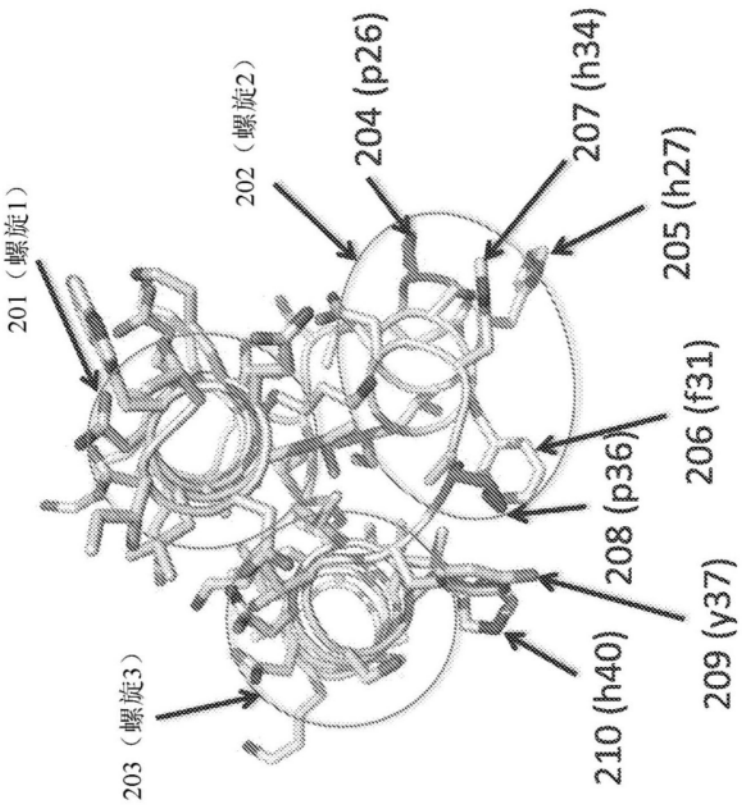

201（螺旋1）
202（螺旋2）
203（螺旋3）
204 (p26)
205 (h27)
206 (f31)
207 (h34)
208 (p36)
209 (y37)
210 (h40)

图4

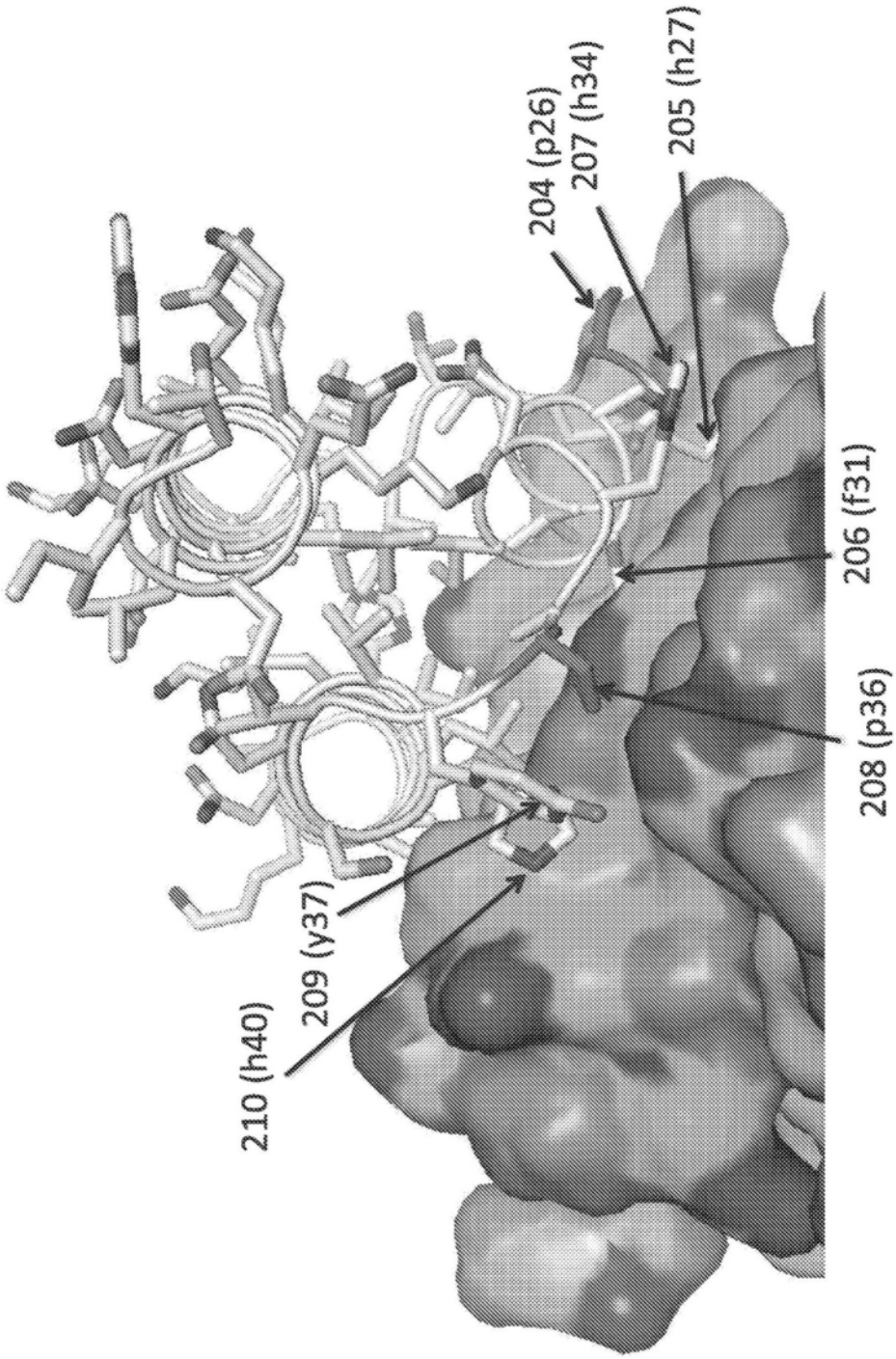


图5

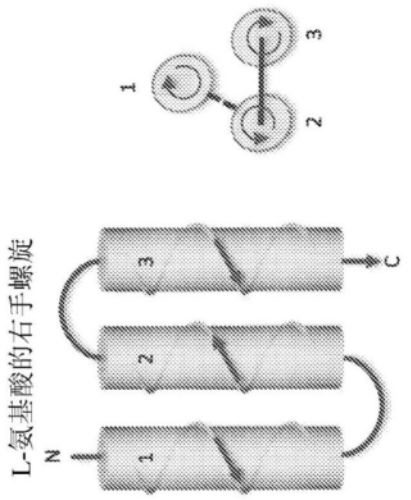


图6A

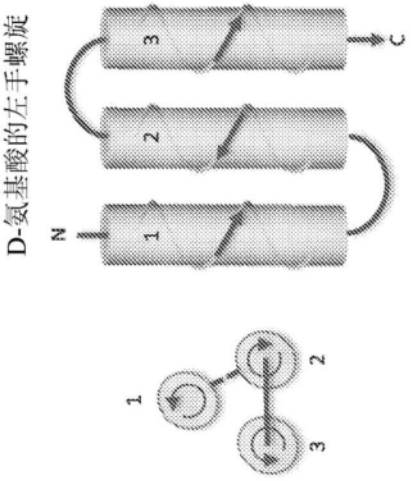


图6B

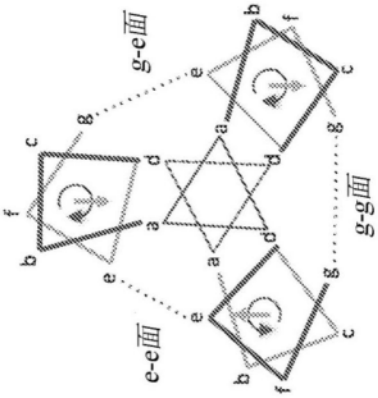


图6C

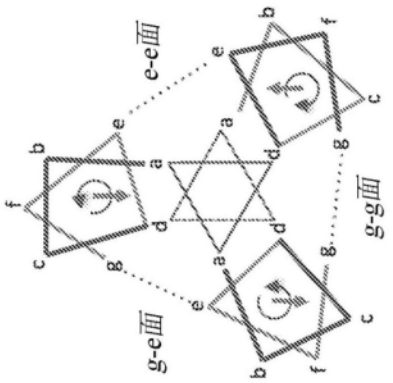


图6D



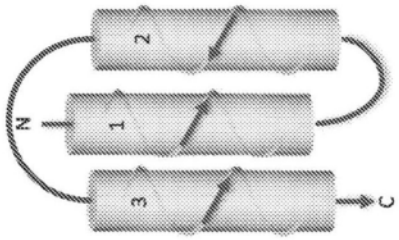


图7A

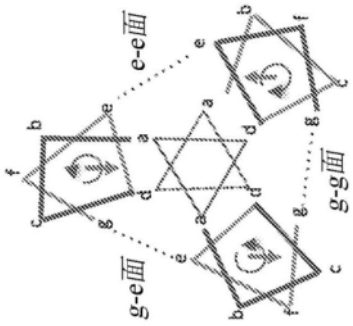


图7B

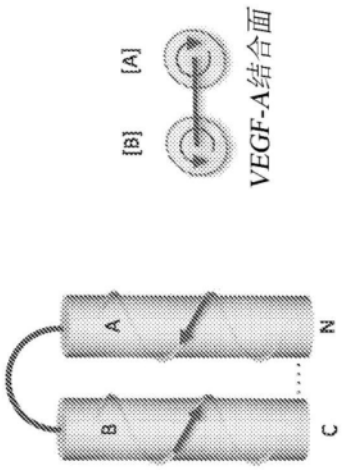


图8A

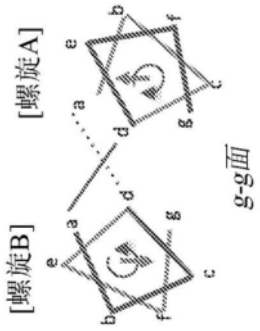


图8B

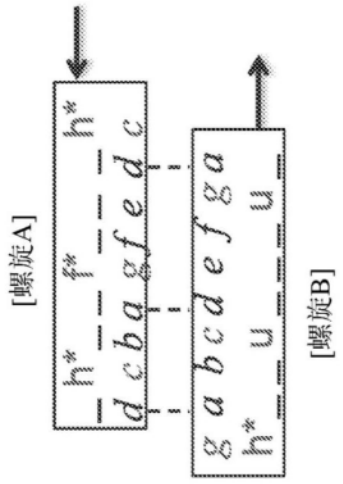


图8C

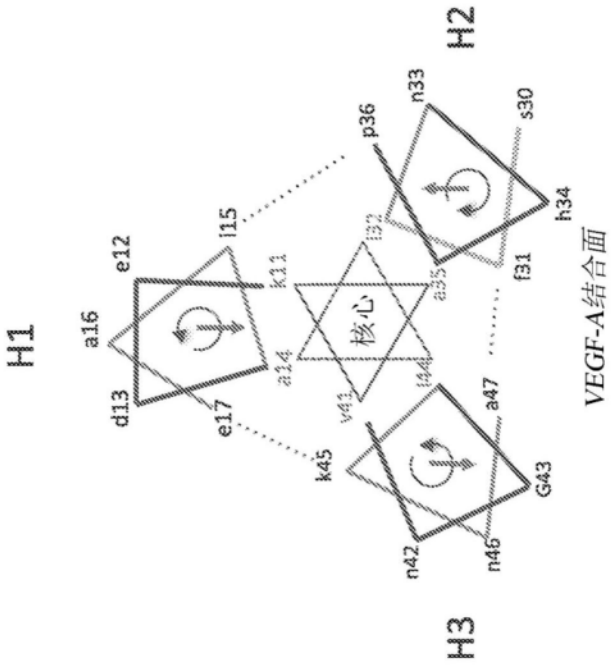

H1
H2
H3
核心
VEGF-A结合面
a16
e12
l15
d13
e17
k11
a14
k45
p36
n33
s30
h34
t32
a35
f31
v41
i44
a47
G43
n42
n46

图9A

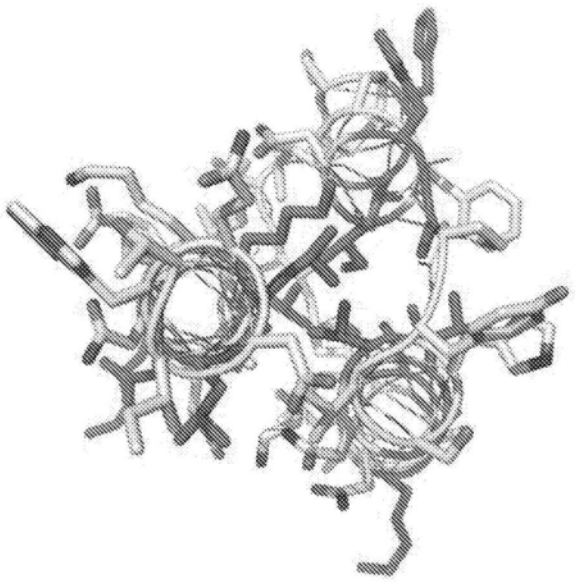


图9B

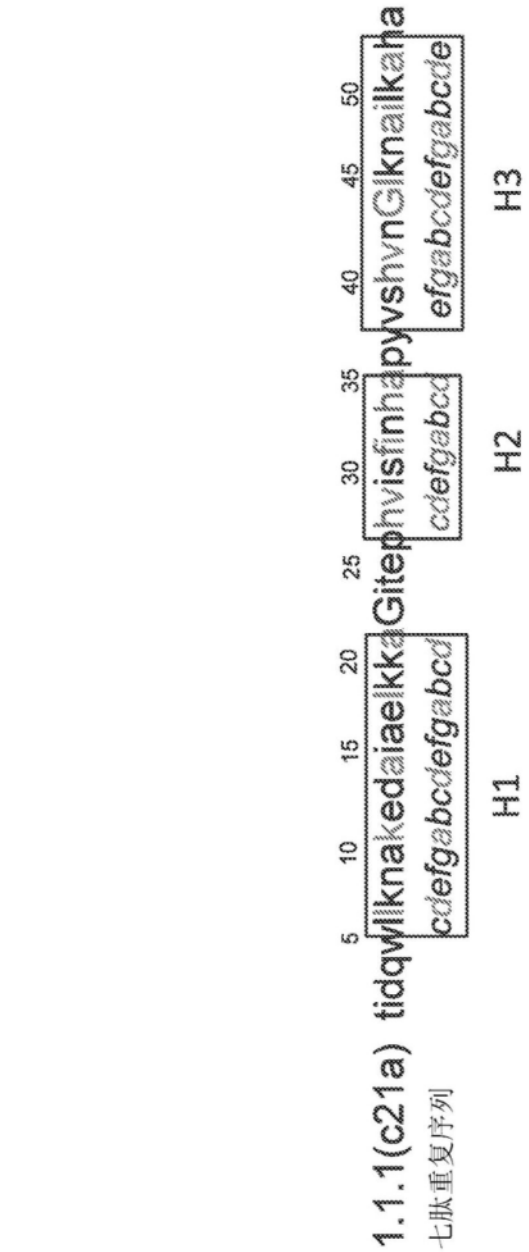

1.1.1(c21a)
七肽重复序列
tidqwlknakedaiaeikka
cdefgabcdefgabcd
Gitephvisfinhapyvshvnglknailkaha
cdefgabcd
efgabcdefgabcde
H1
H2
H3
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50

图9C

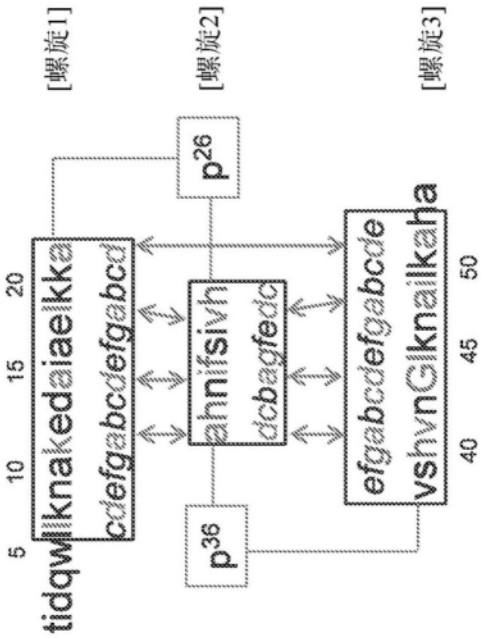

[螺旋1]
[螺旋2]
[螺旋3]
p26
p36
tidqwlknakedaiaeikka
cdefgabcdefgabcd
ahnifsivh
dcbagfedc
efgabcdefgabcde
vshvnGlknailkaha
5
10
15
20
40
45
50

图10A

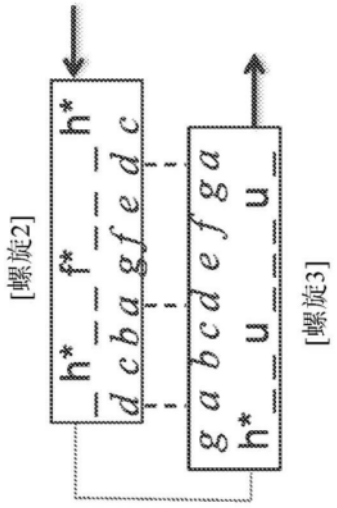

[螺旋2]
[螺旋3]
h* f* h*
d c b a g f e d c
g a b c d e f g a
h* u u

图10B

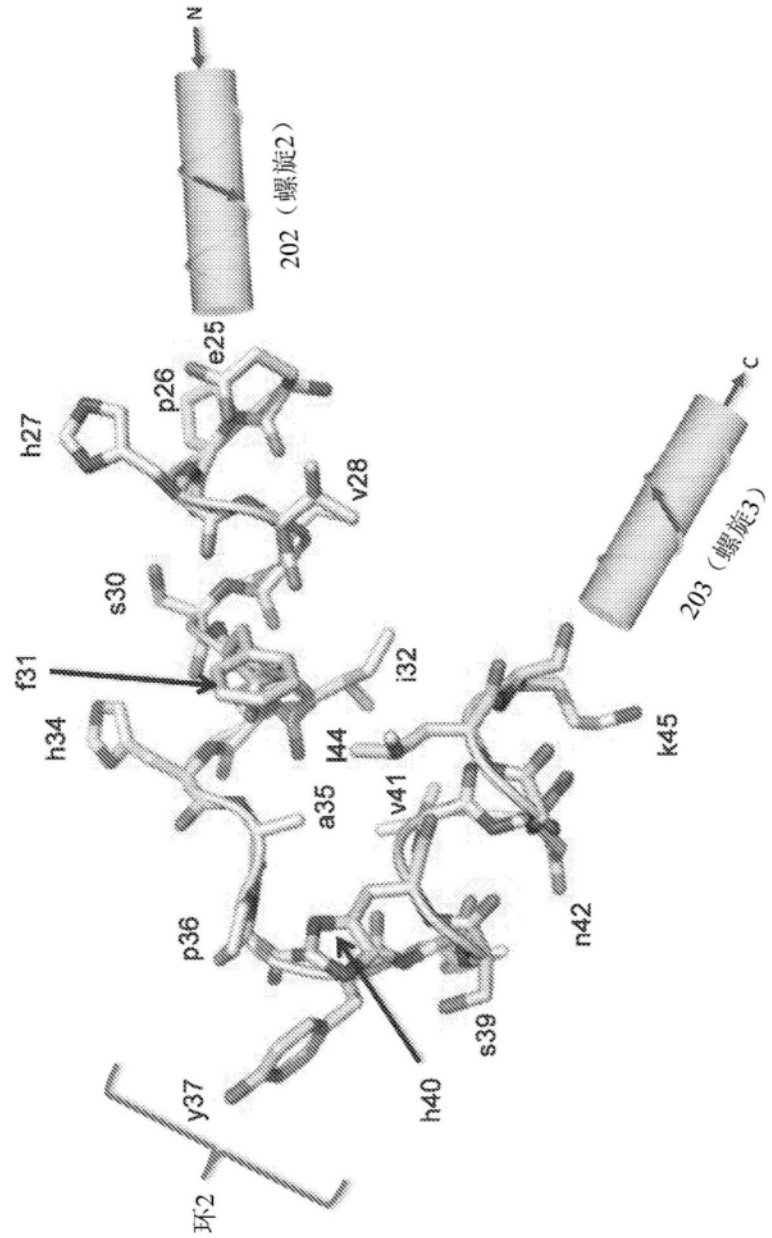

N
202（螺旋2）
e25
p26
h27
v28
s30
f31
i32
h34
l44
k45
a35
v41
n42
p36
s39
y37
h40
环2
c
203（螺旋3）

图11

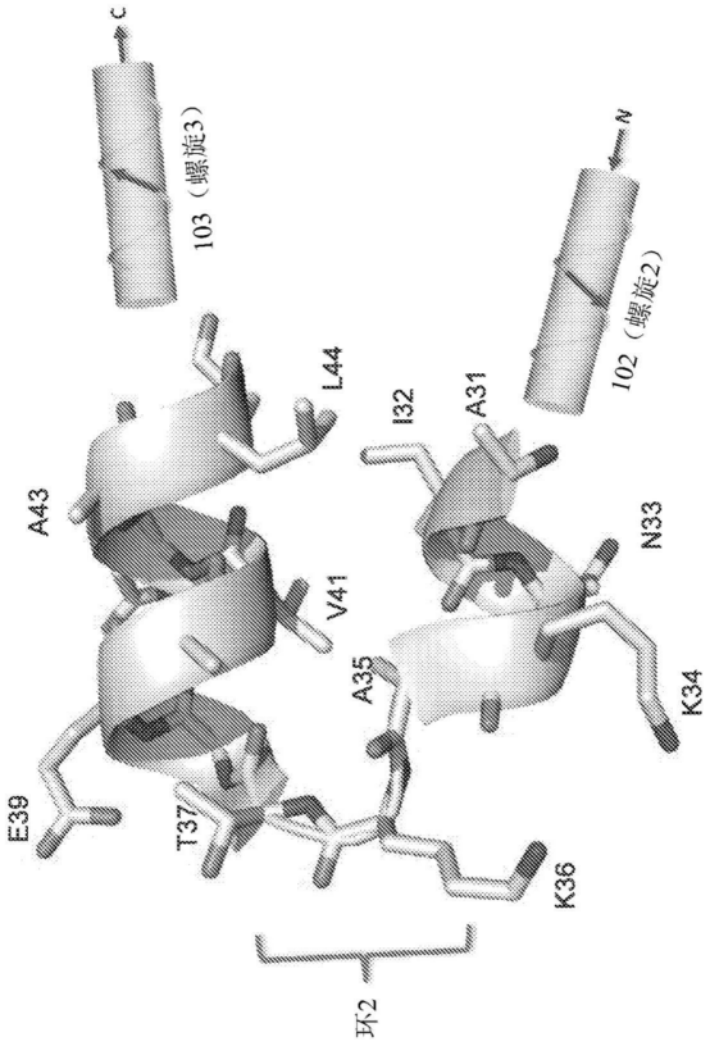


图12

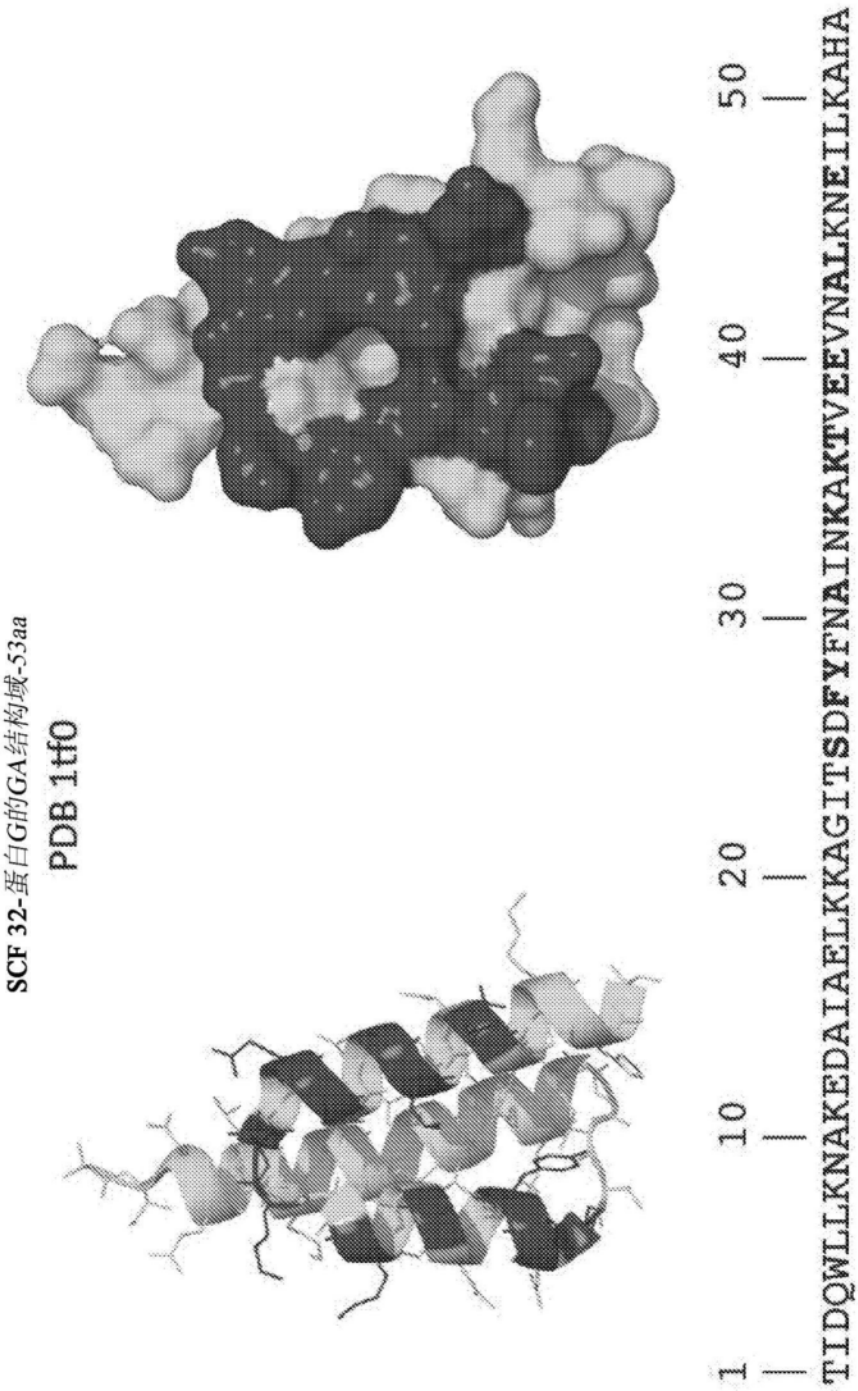

SCF 32-蛋白G的GA结构域-53aa
PDB 1tf0
1
10
20
30
40
50
TIDQWLLKNAKEDAIAELKKAGITSDFYFNAINKAKTVEEVNALKNEILKAHA

图13

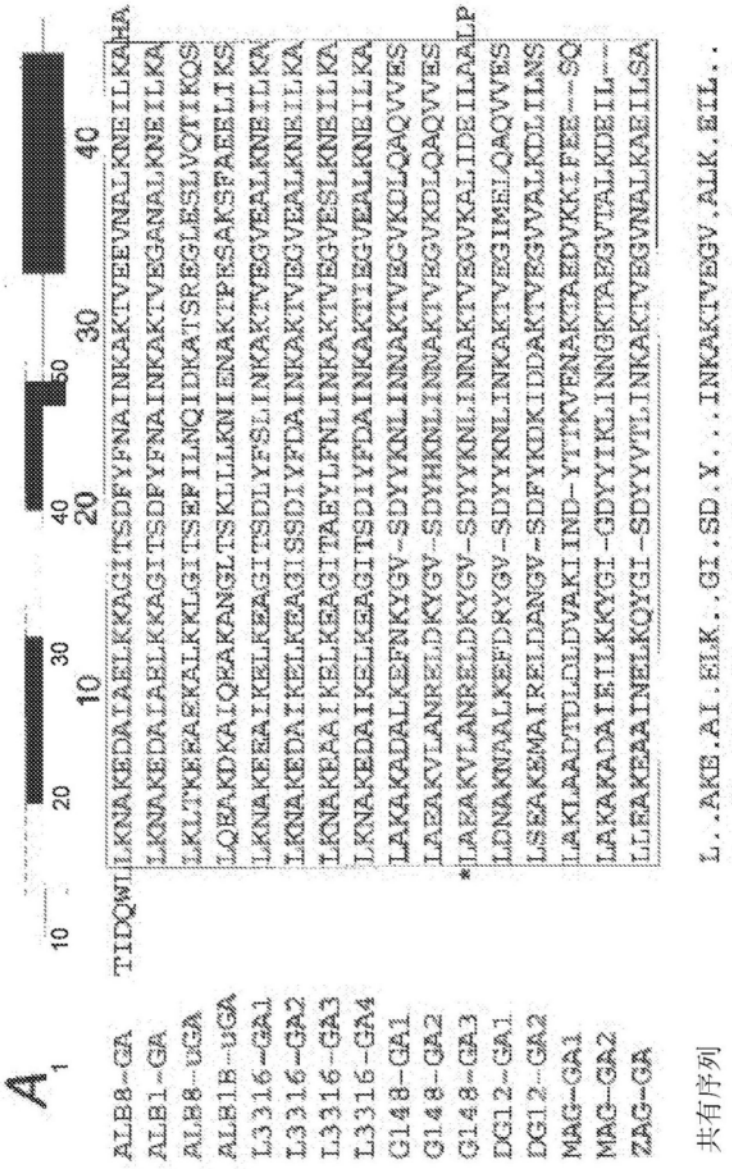

A
1
10
20
30
40
50
ALB8-GA TIDQWL
ALB1-GA
ALB8-uGA
ALB1B-uGA
L3316-GA1
L3316-GA2
L3316-GA3
L3316-GA4
G148-GA1
G148-GA2
G148-GA3
DG12-GA1
DG12-GA2
MAG-GA1
MAG-GA2
ZAG-GA
共有序列

图14

SCF32 tidqwllknakedaiaelkkaGitsdfyfnainkaktveevnalkneilkaha
1 tidqwllknakedaiaelkkaGitsdhvfnfinyapyvsdvnalkneilkaha
1.1 tidqwllknakedaiaelkkaGitedhvfnfinhapyvshvnGlknailkaha
1.1.1 tidqwllknakedaiaelkkcGitephvisfinhapyvshvnGlknailkaha
1.1.1(c21a) tidqwllknakedaiaelkkaGitephvisfinhapyvshvnGlknailkaha

图15

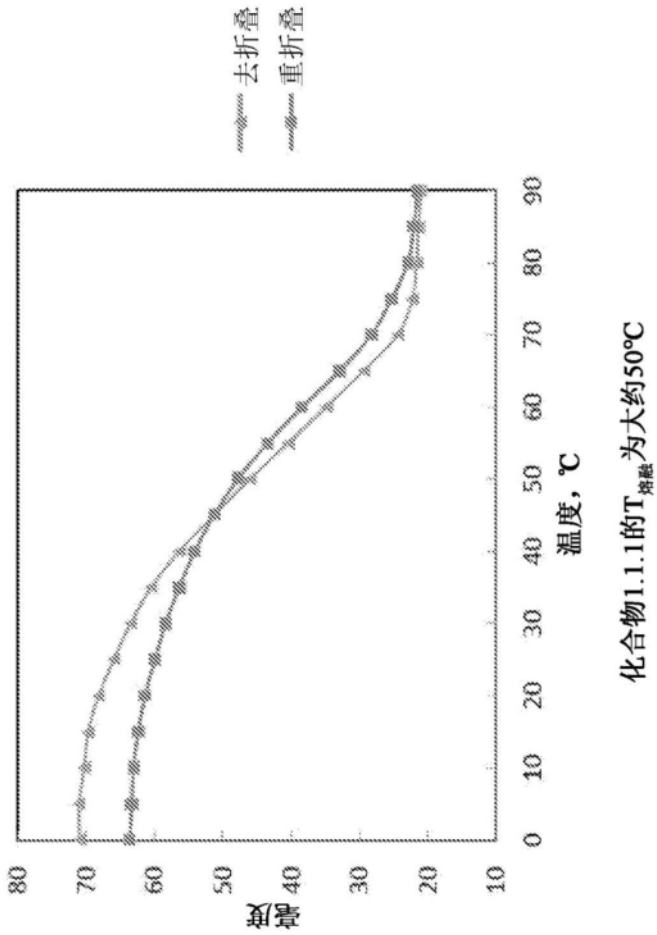

去折叠
重折叠
80
70
60
50
40
30
20
10
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
温度，℃
化合物1.1.1的$T_{熔融}$为大约50℃

图16

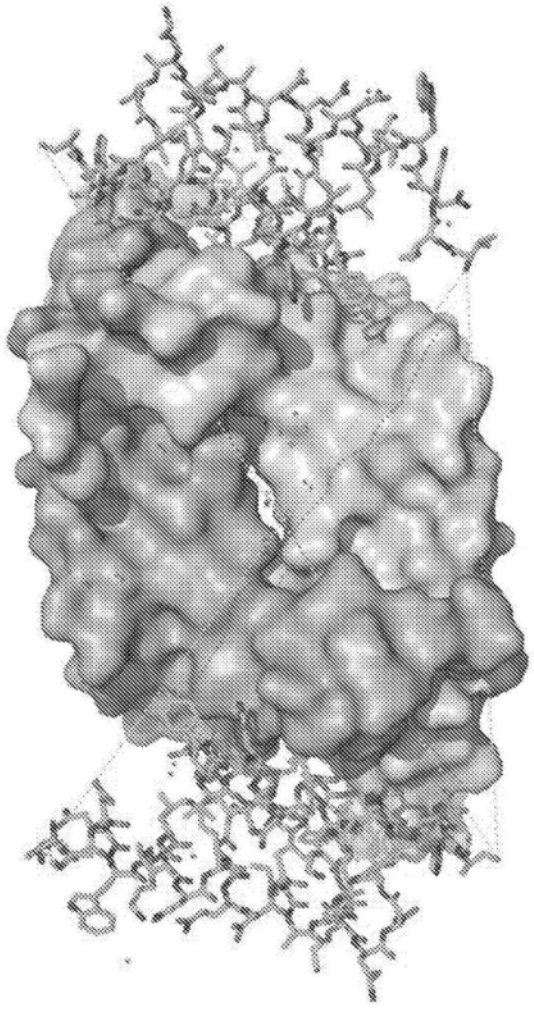


图17

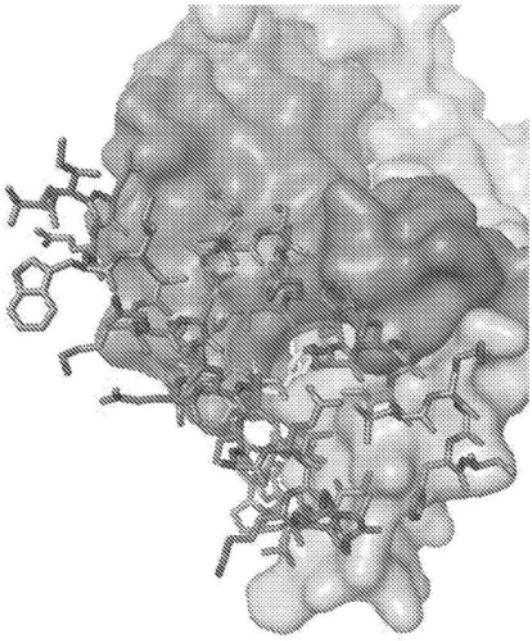


图18A

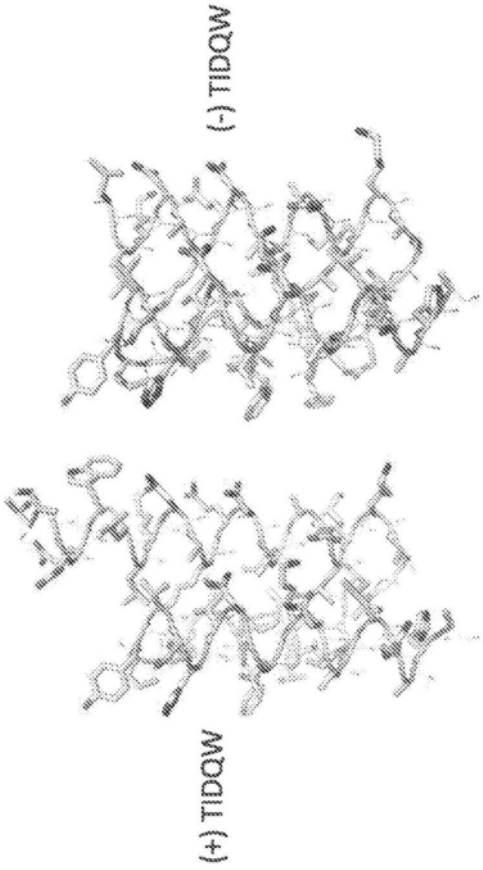


图18B

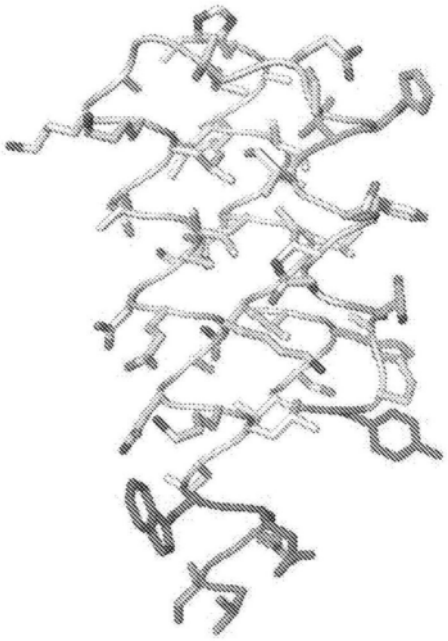


图19A

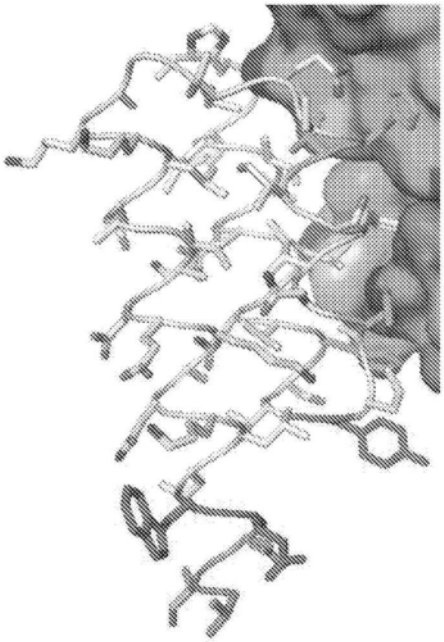


图19B

化合物1.1.1(C21A) tidqwlknakedaiaelkkagitephvisfinhapyvshvngiknailkaha

T1、I2和D3被去除
Q4用AVC突变（编码T/N/S）
Trp5用NNK突变
Tyr37用NNK突变
His27用（70:10:10:10）软随机化
His34用（70:10:10:10）软随机化
His40用（70:10:10:10）软随机化
Ile15用DTK突变（编码F/I/L/M/V）
Ile29用DTK突变

图19C

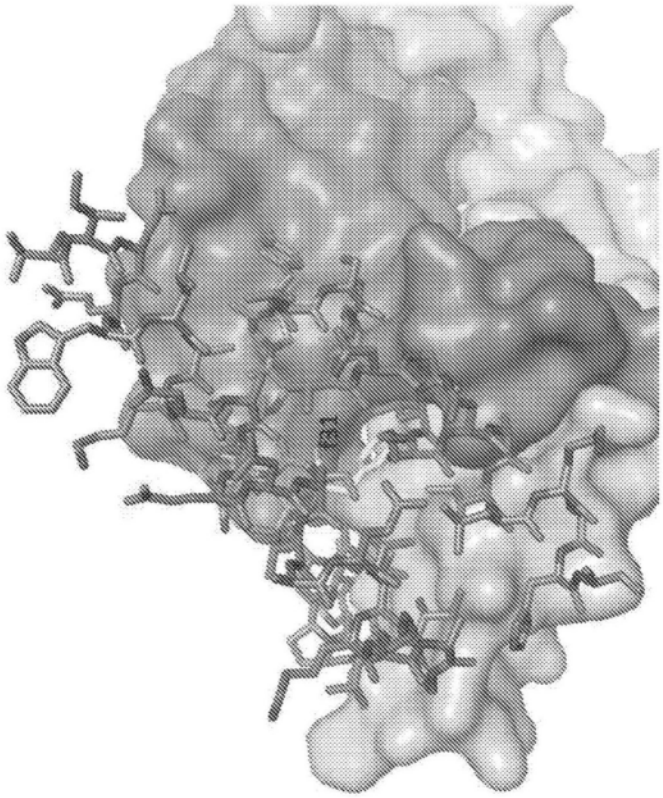


图20

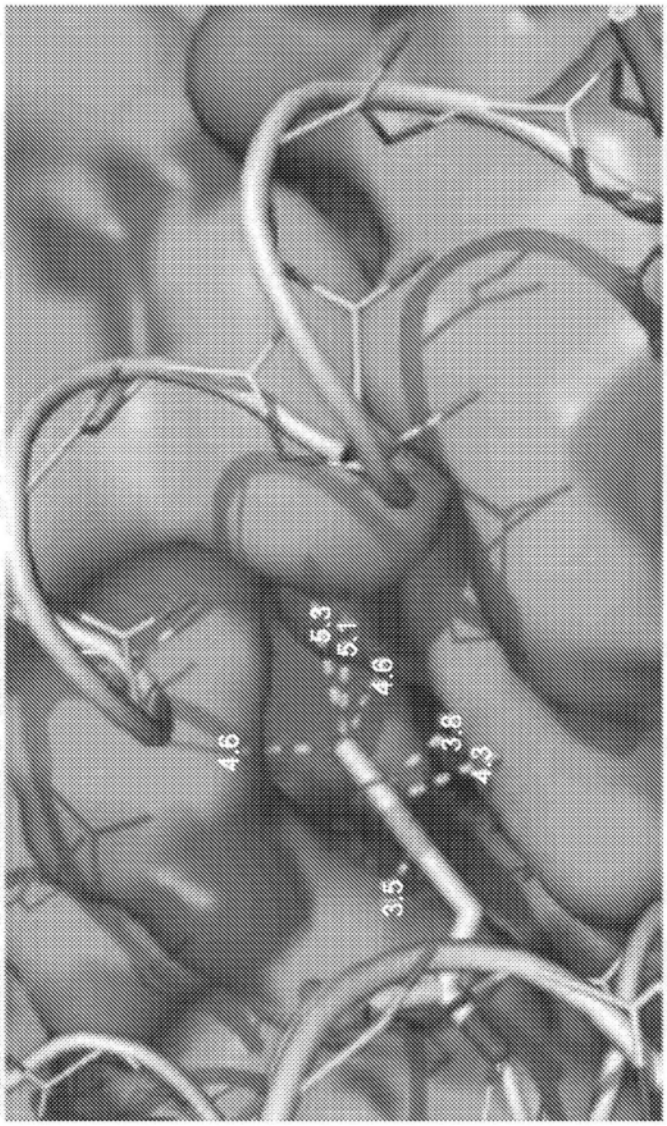


图21

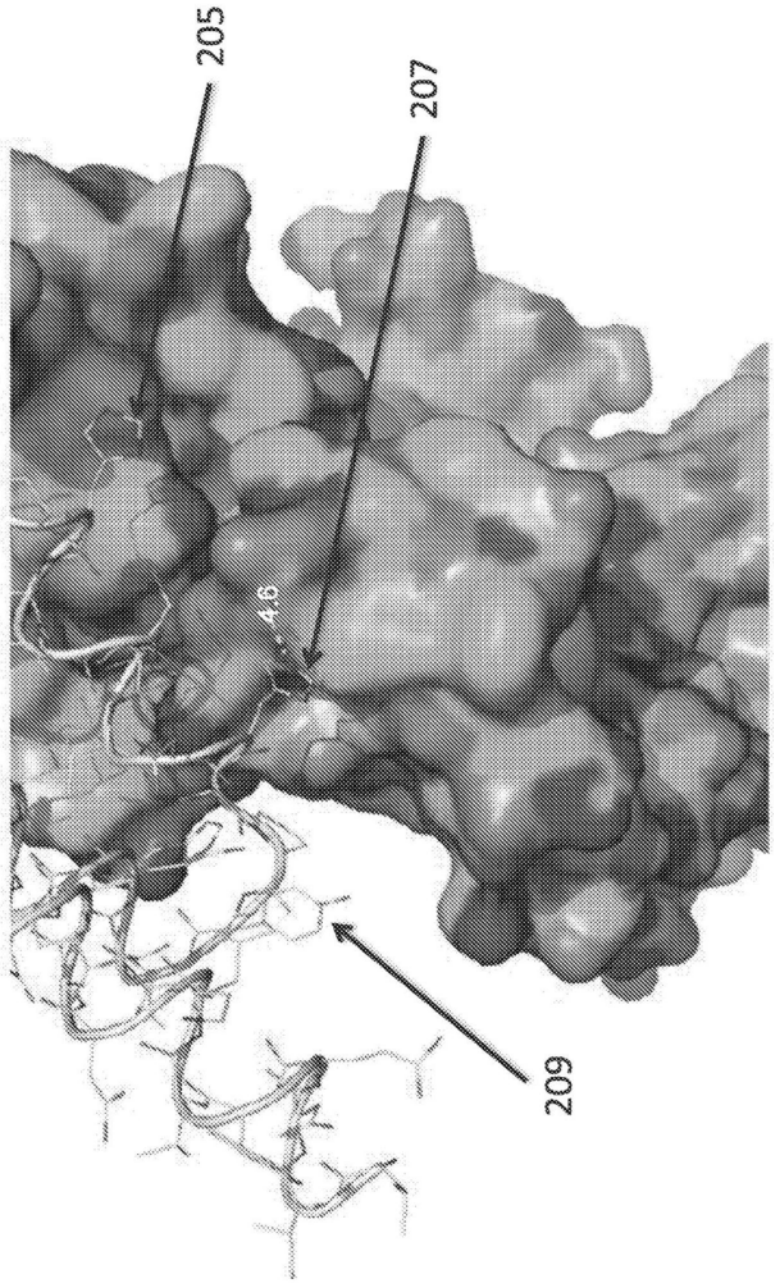


图22

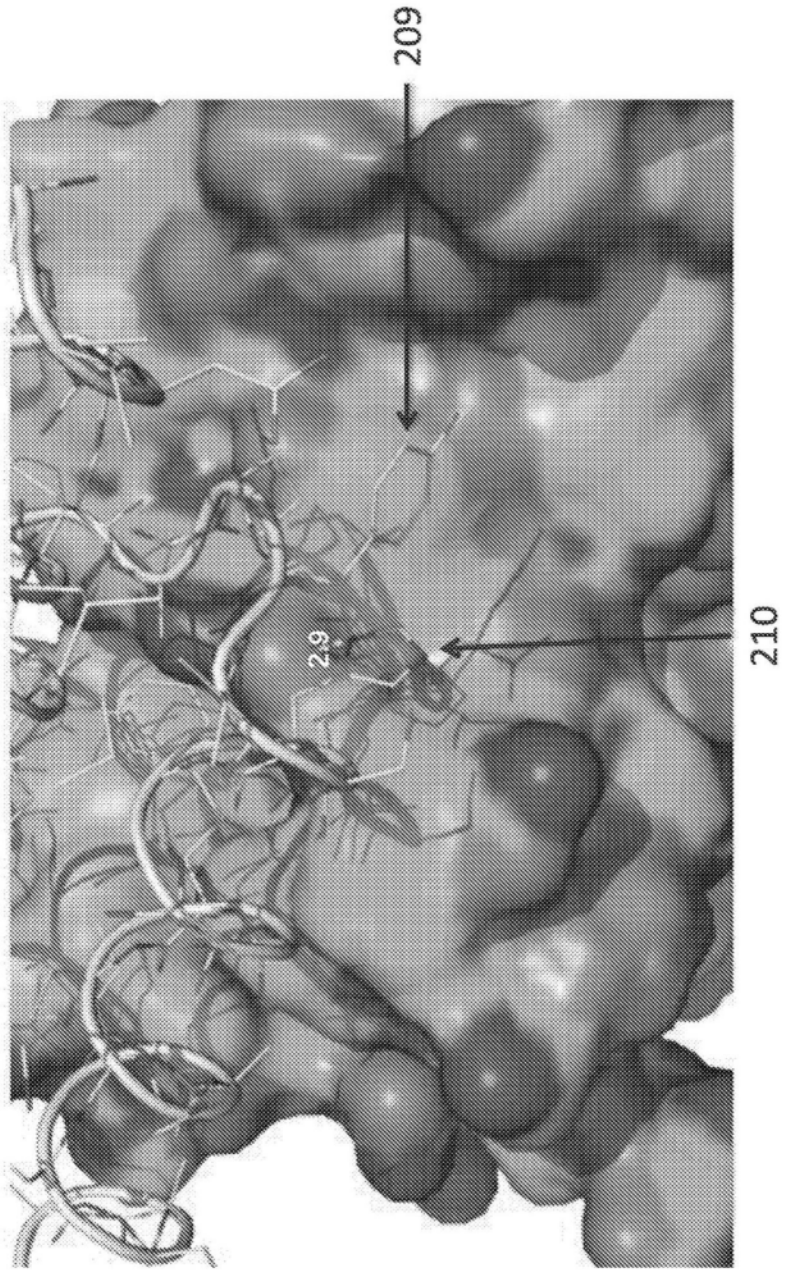


图23

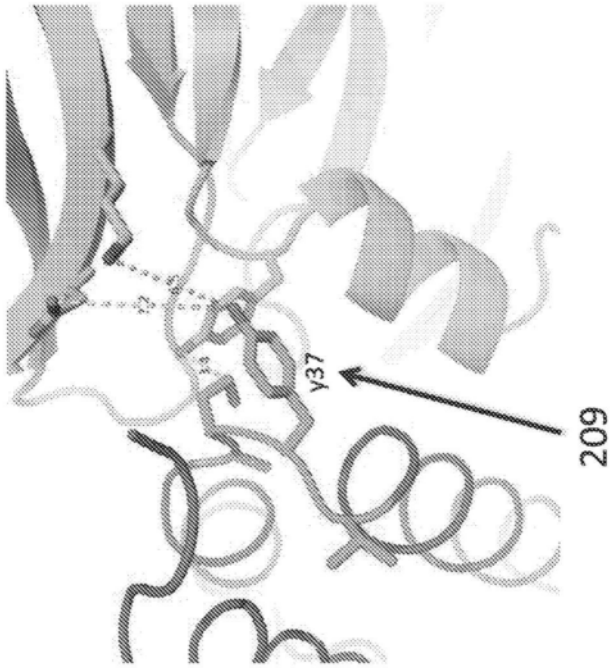


图24

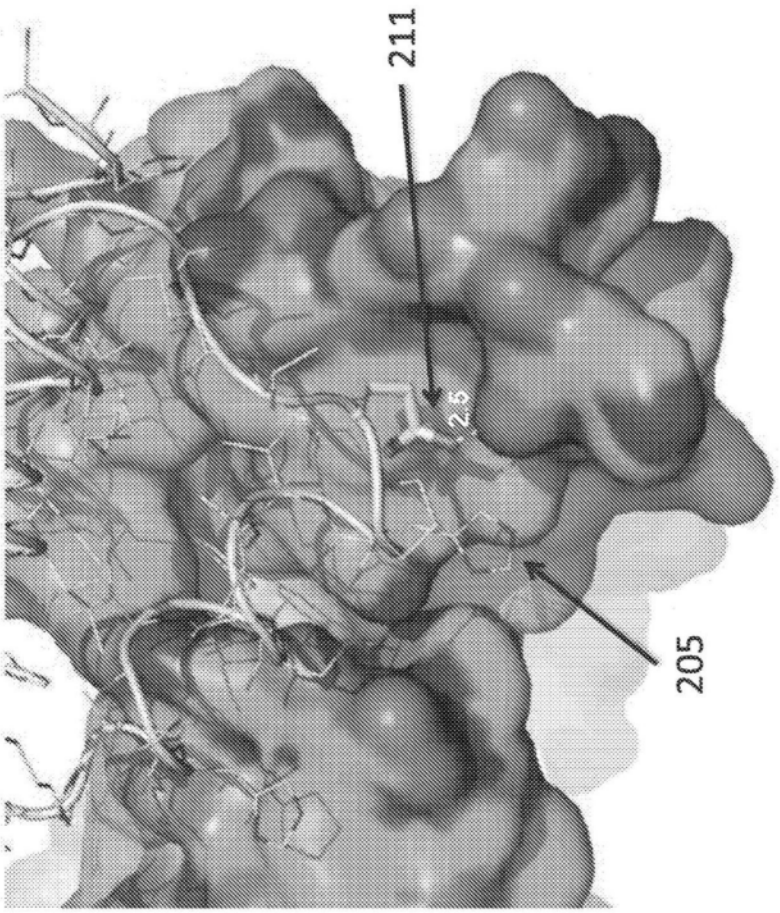


图25

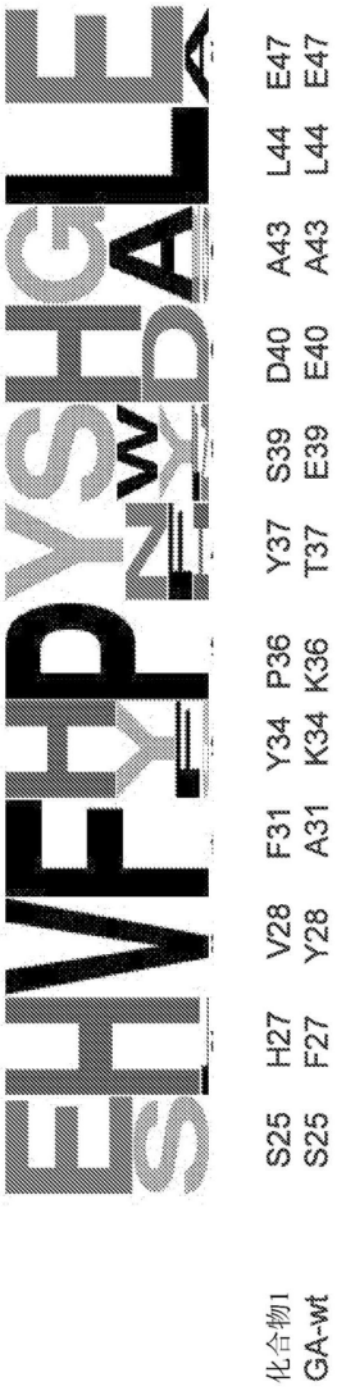

化合物1 S25 H27 V28 F31 Y34 P36 Y37 S39 D40 A43 L44 E47
GA-wt S25 F27 Y28 A31 K34 K36 T37 E39 E40 A43 L44 E47

图26

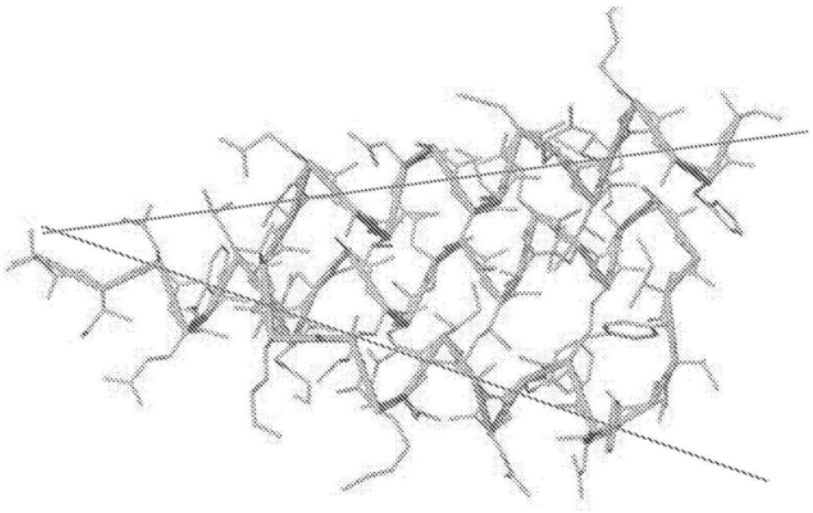


图27A

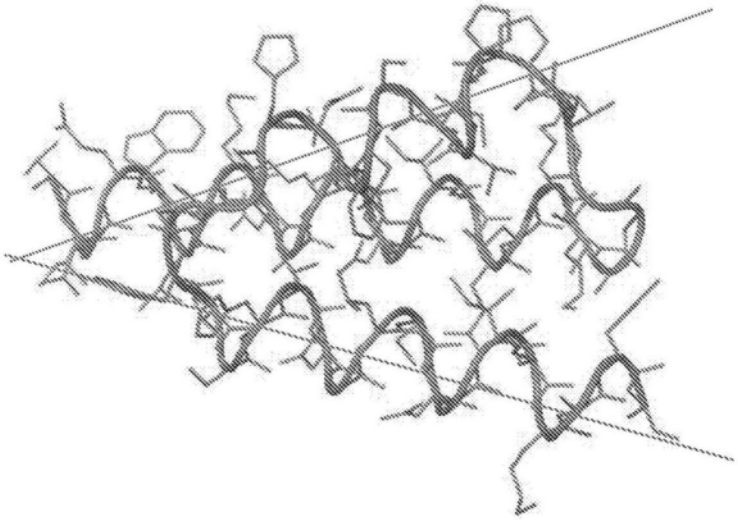


图27B



图28A

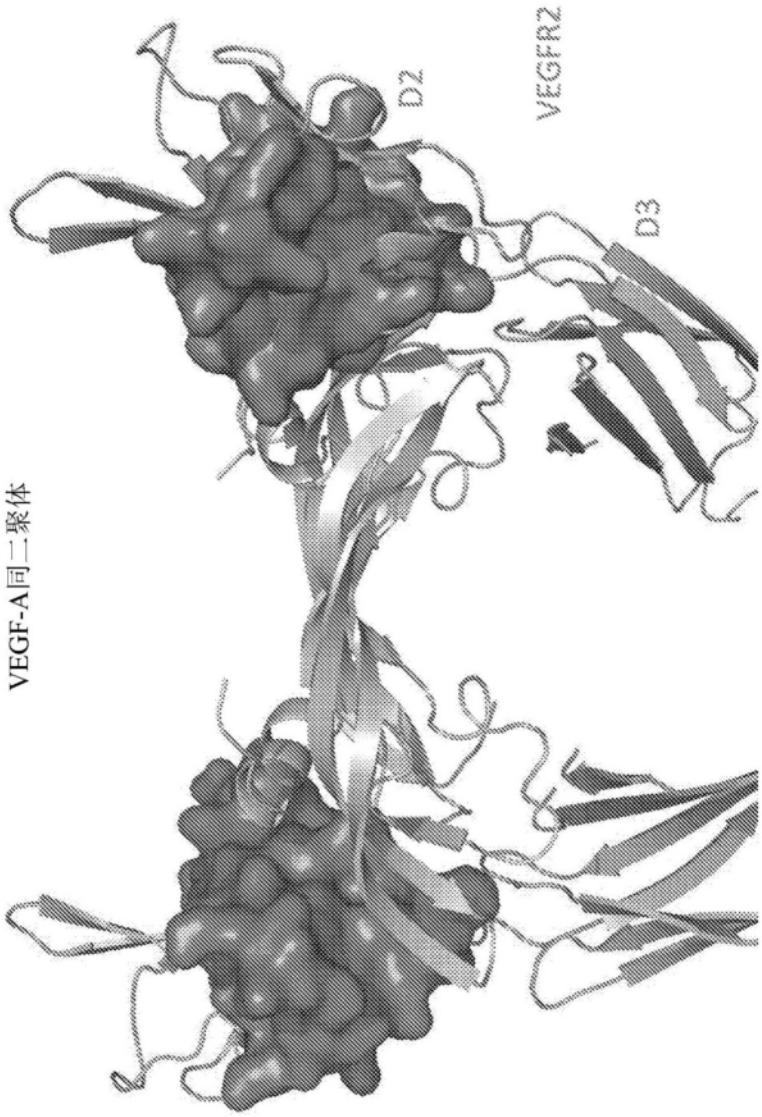


图28B

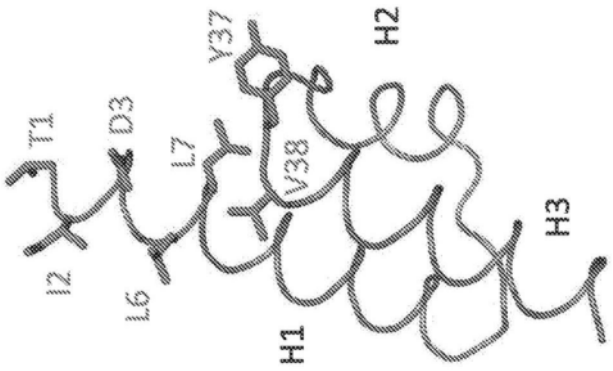


图29A

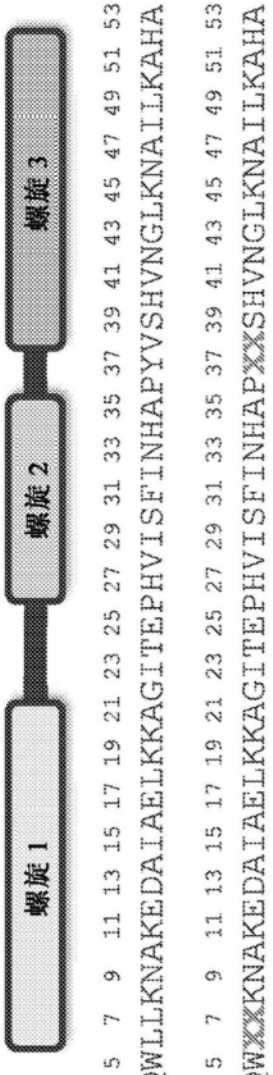

螺旋 1
螺旋 2
螺旋 3
1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25 27 29 31 33 35 37 39 41 43 45 47 49 51 53
TIDQWLLKNAKEDAIAELKKAGITEPHVISFTNHAPYVSHVNGLKNAILKAHA
11055
库
1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25 27 29 31 33 35 37 39 41 43 45 47 49 51 53
XXXQWXXKNAKEDAIAELKKAGITEPHVISFTNHAPXXSHVNGLKNAILKAHA
X == NNC 密码子

图29B

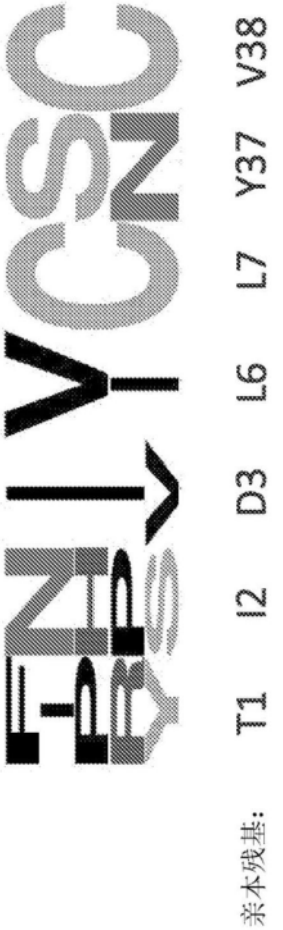


图30A

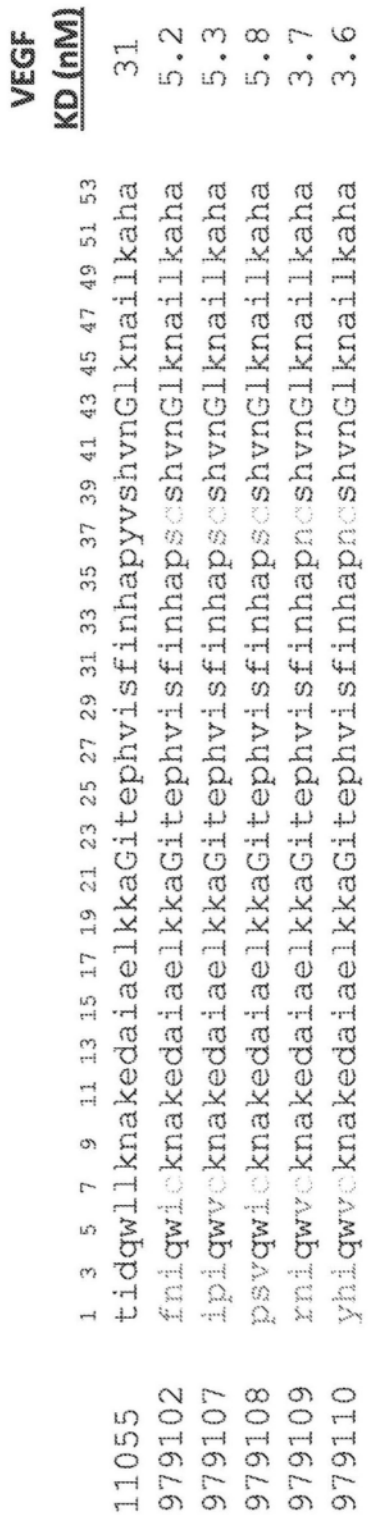

VEGF
KD (nM)
1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25 27 29 31 33 35 37 39 41 43 45 47 49 51 53
11055 tidqwllknakedaiaelkkaGitephvisfinhapyvshvnGlknailkaha 31
979102 fniqwicknakedaiaelkkaGitephvisfinhapscshvnGlknailkaha 5.2
979107 ipiqwvcknakedaiaelkkaGitephvisfinhapscshvnGlknailkaha 5.3
979108 psvqwicknakedaiaelkkaGitephvisfinhapscshvnGlknailkaha 5.8
979109 rniqwvcknakedaiaelkkaGitephvisfinhapncshvnGlknailkaha 3.7
979110 yhiqwvcknakedaiaelkkaGitephvisfinhapncshvnGlknailkaha 3.6

图30B

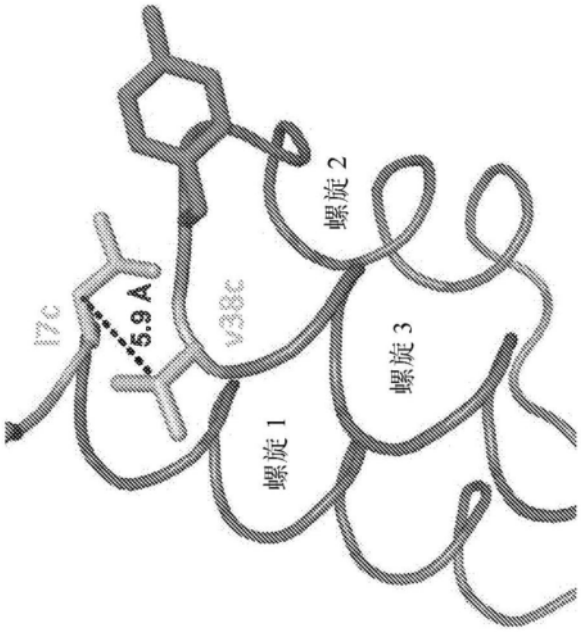

I7c
5.9 Å
V38c
螺旋 1
螺旋 2
螺旋 3

图30C

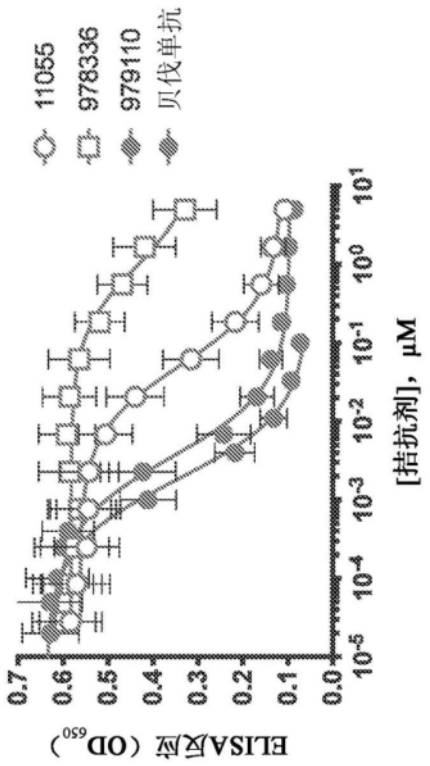

11055
978336
979110
贝伐单抗
ELISA反应（OD650）
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
10-5
10-4
10-3
10-2
10-1
100
101
[拮抗剂]，μM

图31A

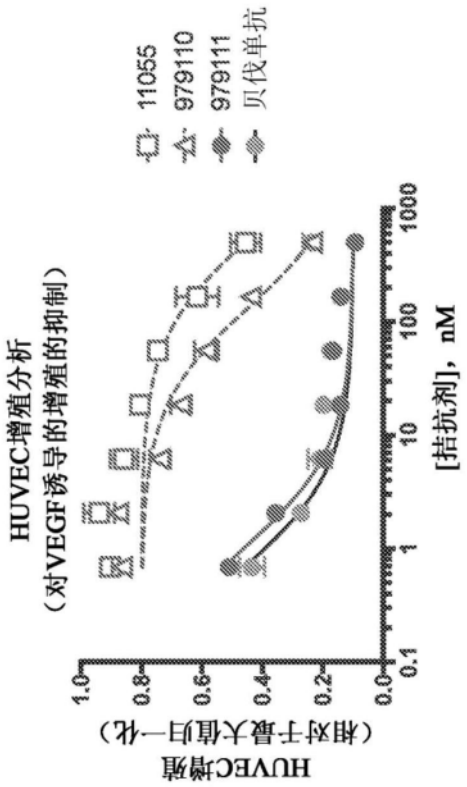

HUVEC增殖
（相对于最大值归一化）
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0.1
1
10
100
1000
[拮抗剂]，nM
HUVEC增殖分析
（对VEGF诱导的增殖的抑制）
11055
979110
979111
贝伐单抗

图31B

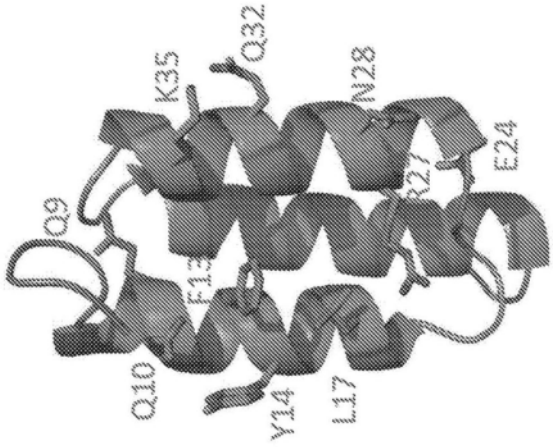

Q32
K35
N28
E24
R27
Q9
E13
Q10
Y14
L17

图32A

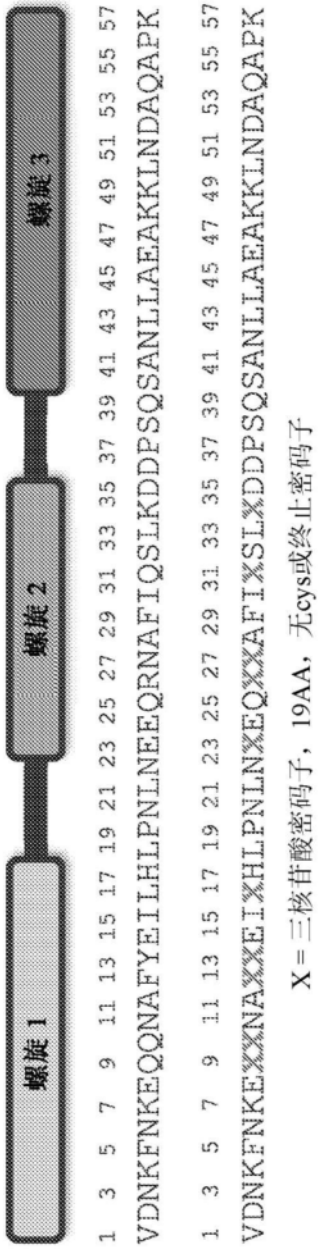

螺旋 1
螺旋 2
螺旋 3
1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25 27 29 31 33 35 37 39 41 43 45 47 49 51 53 55 57
亲本
Z结构域
VDNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNAFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK
1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25 27 29 31 33 35 37 39 41 43 45 47 49 51 53 55 57
库
VDNKFNKEXXNAXXEIXHLPNLNXEQXXAFIXSLXDDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK
X＝三核苷酸密码子，19AA，无cys或终止密码子

图32B

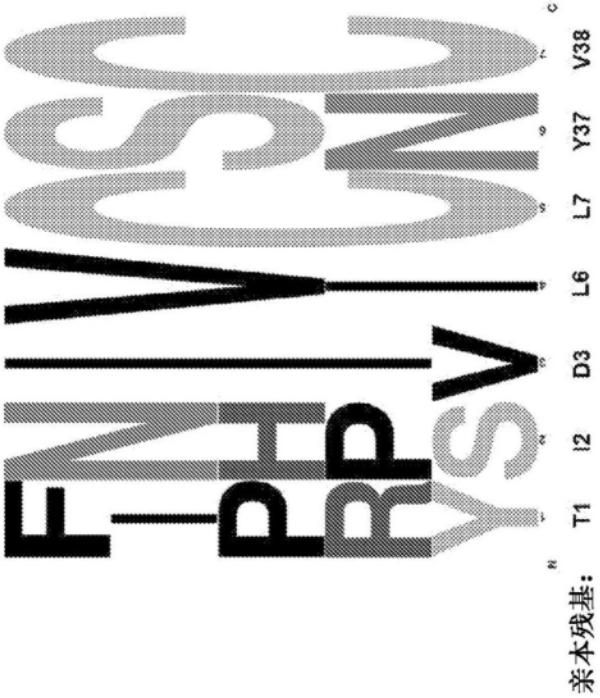


图33A

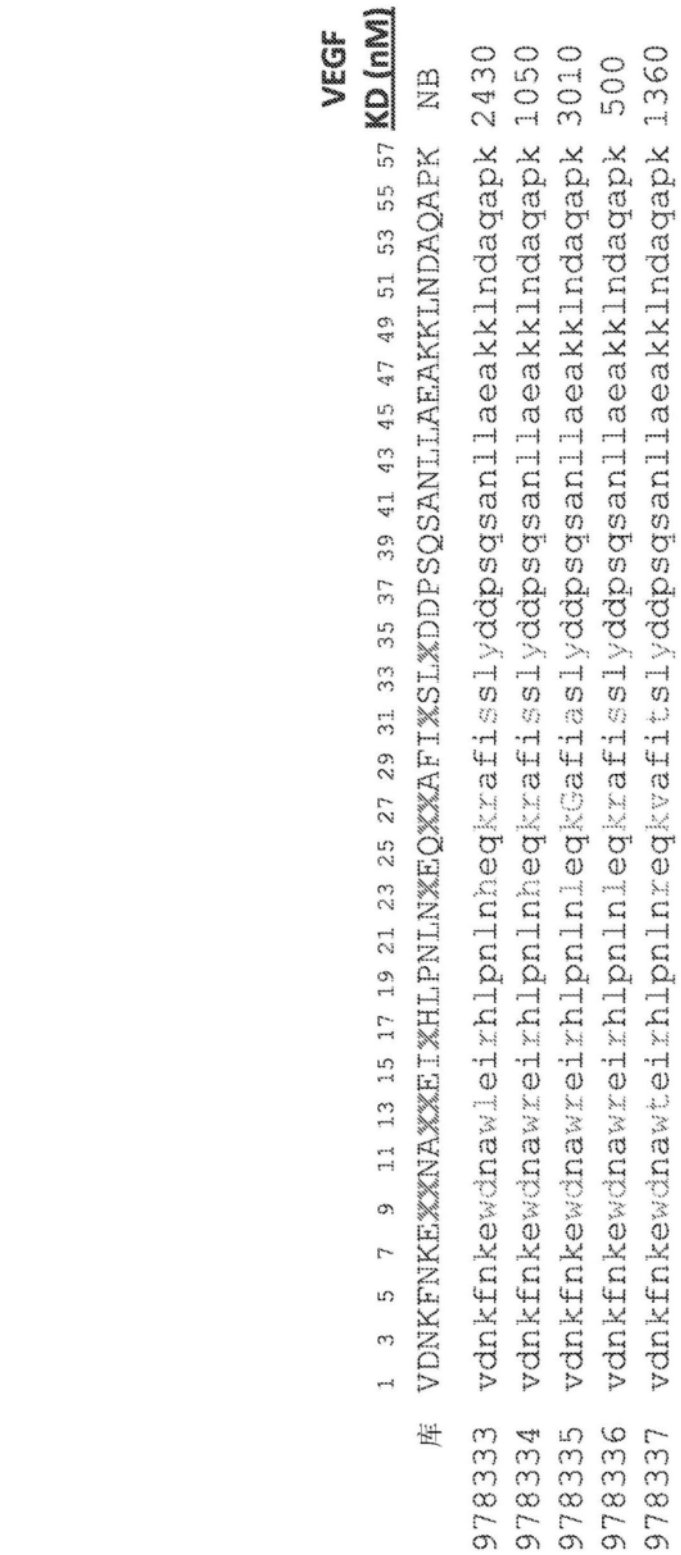

VEGF
KD (nM)
1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25 27 29 31 33 35 37 39 41 43 45 47 49 51 53 55 57
库 VDNKFNKE%%NA%%EI%HLPNLN%EQ%%AFI%SL%DDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK NB
9783333 vdnkfnkewdnawleirhlpnlnheqkrafisslyddpsqsanllaeakklndaqapk 2430
9783334 vdnkfnkewdnawreirhlpnlnheqkrafisslyddpsqsanllaeakklndaqapk 1050
9783335 vdnkfnkewdnawreirhlpnlnleqkCafiaslyddpsqsanllaeakklndaqapk 3010
9783336 vdnkfnkewdnawreirhlpnlnleqkrafisslyddpsqsanllaeakklndaqapk 500
9783337 vdnkfnkewdnawteirhlpnlnreqkvafitslyddpsqsanllaeakklndaqapk 1360

图33B

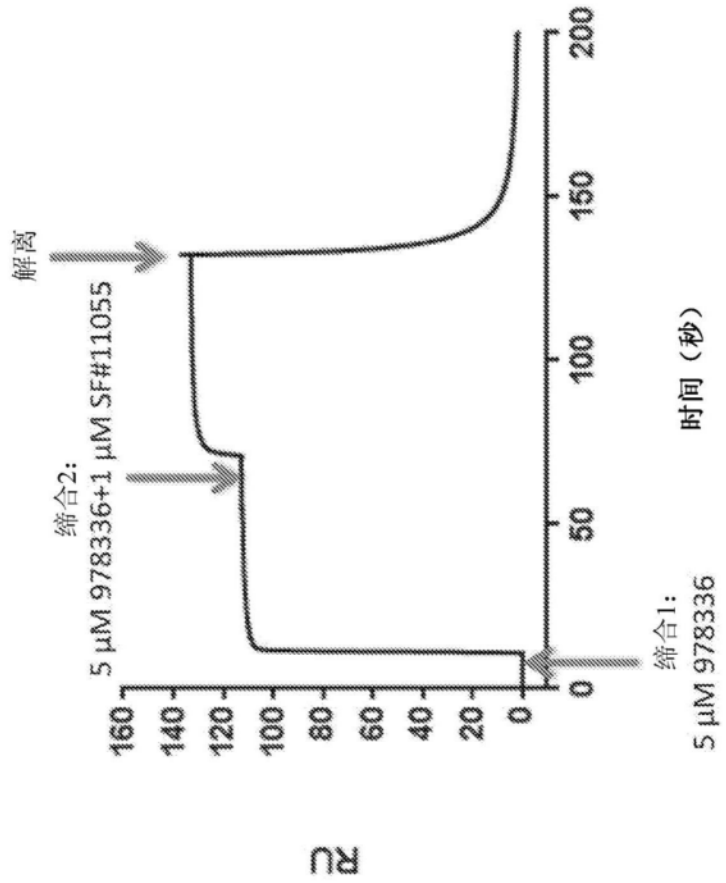

RU
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0
50
100
150
200
时间（秒）
缔合1:
5 μM 978336
缔合2:
5 μM 978336+1 μM SF#11055
解离

图34



图35A

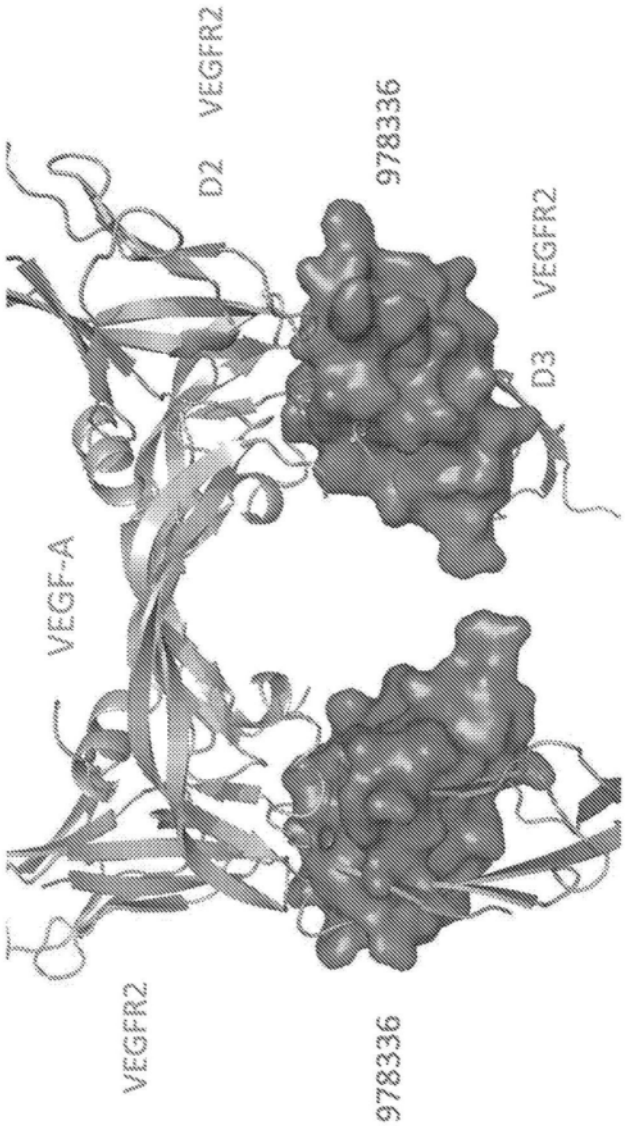


图35B

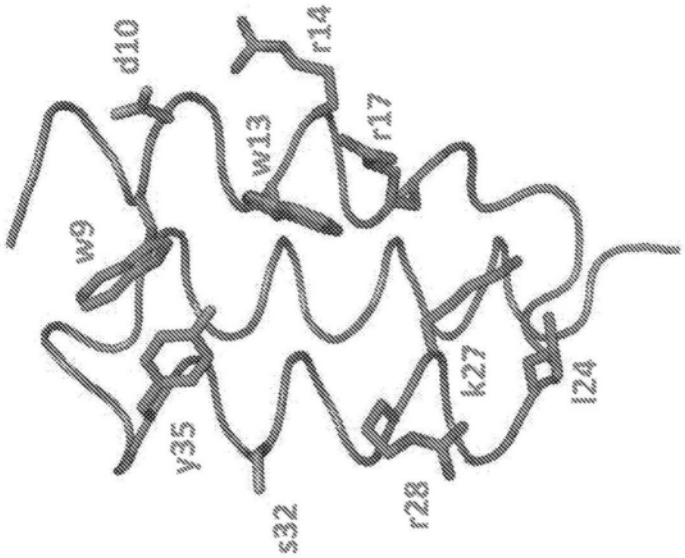


图35C

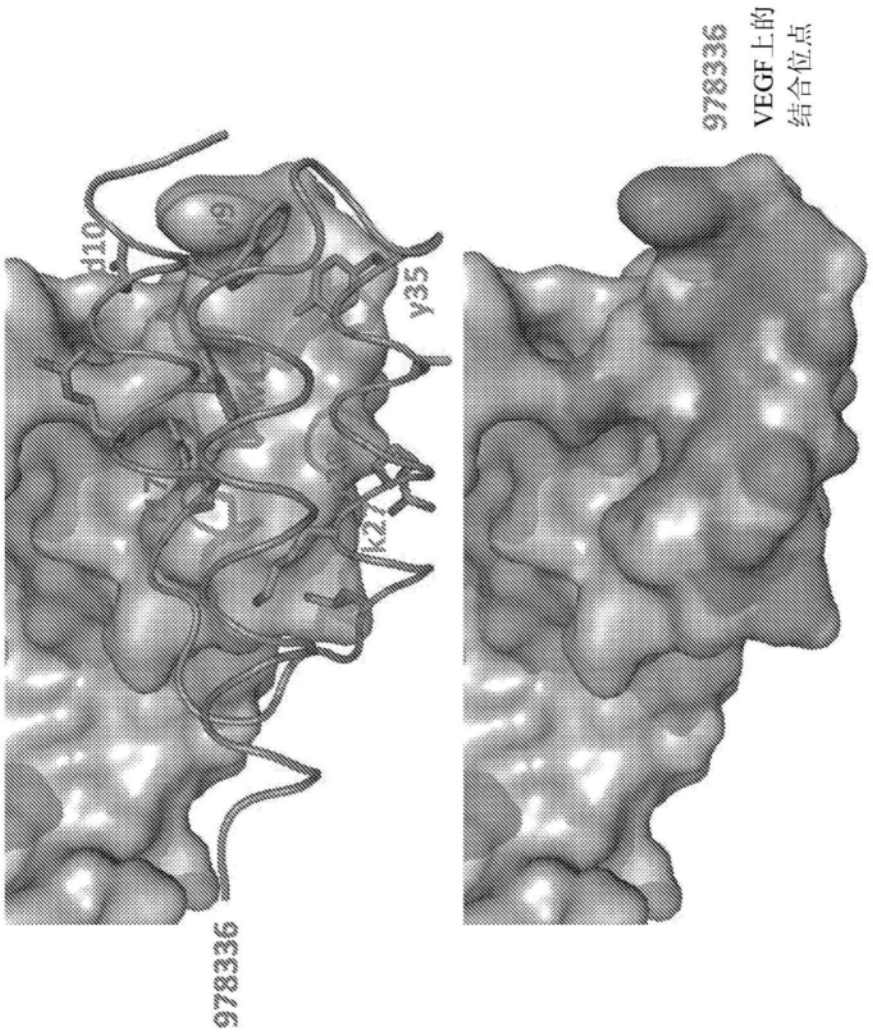


图35D

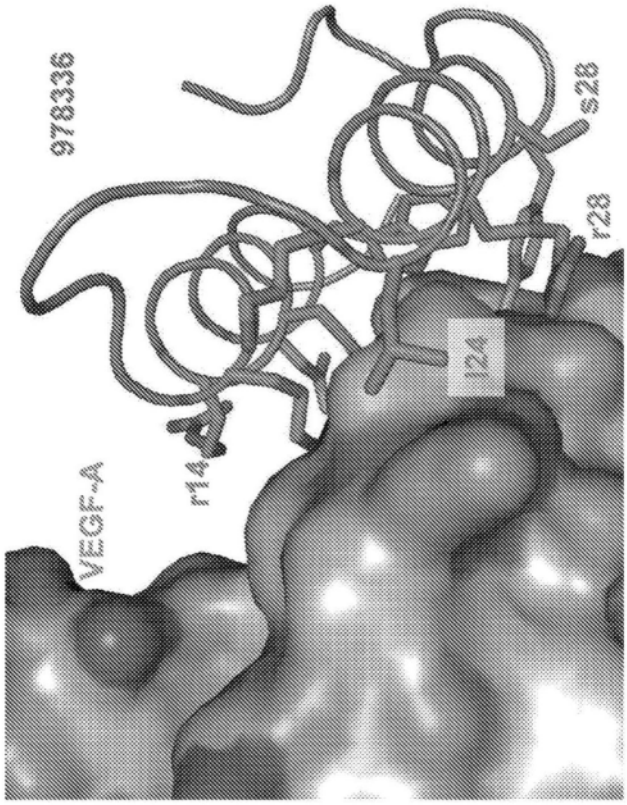


图35E

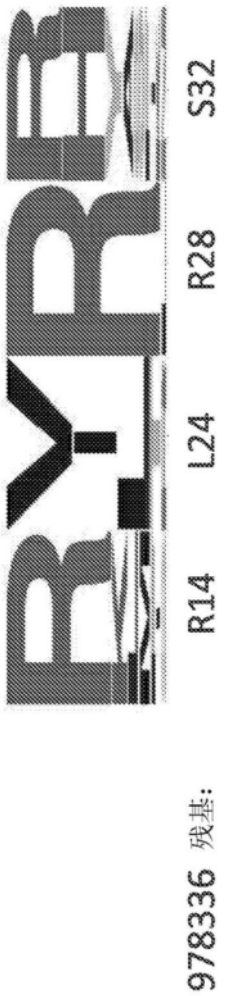


图35F


VEGF
KD (nM)
1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25 27 29 31 33 35 37 39 41 43 45 47 49 51 53 55 57
978336 vdnkfnkewdnawreirhlpnlnleqkrafisslyddpsqsanllaeakklndaqapk 500
库
980181 VDNKFNKEWDNAWXEIRHLPNLNXEQKXAFIXSLYDDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK NB
980181 vdnkfnkewdnawreirhlpnlnveqkrafirslyddpsqsanllaeakklndaqapk 66

图35G

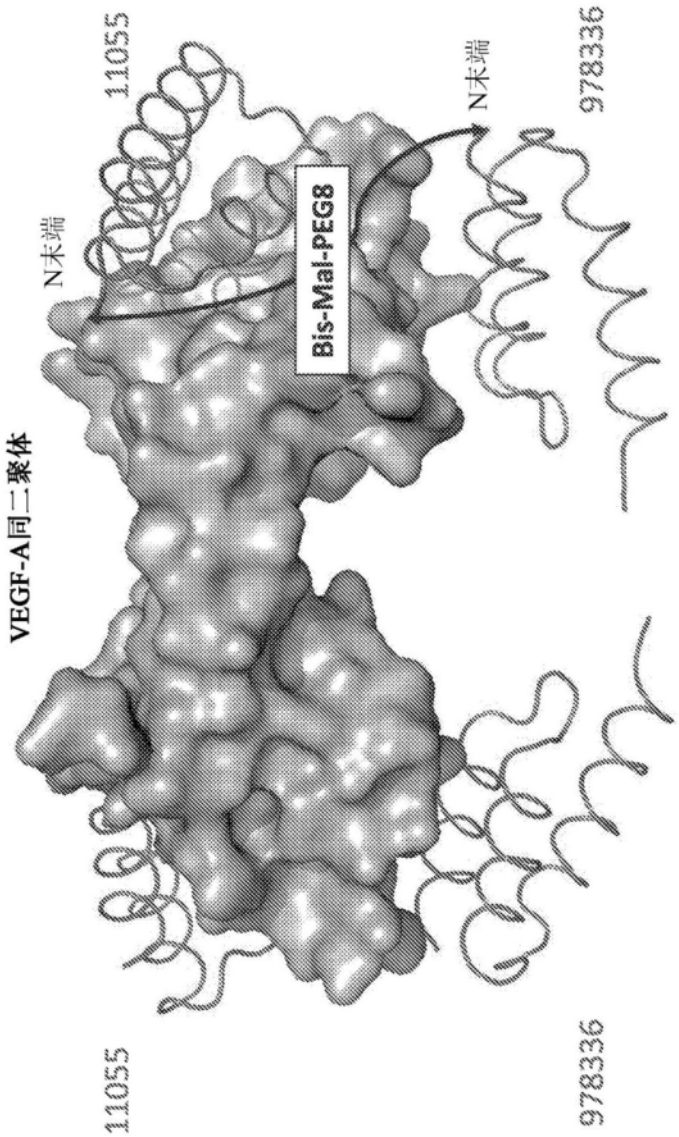


图36A

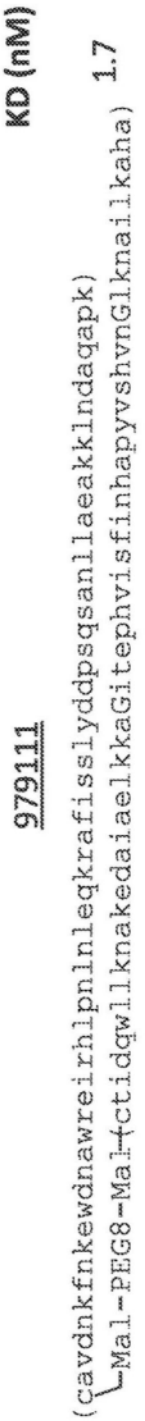

VEGF
KD (nM)
979111
(cavdnkfnkewdnawreirhlpnlnleqkrafisslyddpsqsanllaeakklndaqapk)
Mal-PEG8-Mal-{ctidqwllknakedaiaelkkaGitephvisfinhapyvshvnGlknailkaha)
1.7

图36B

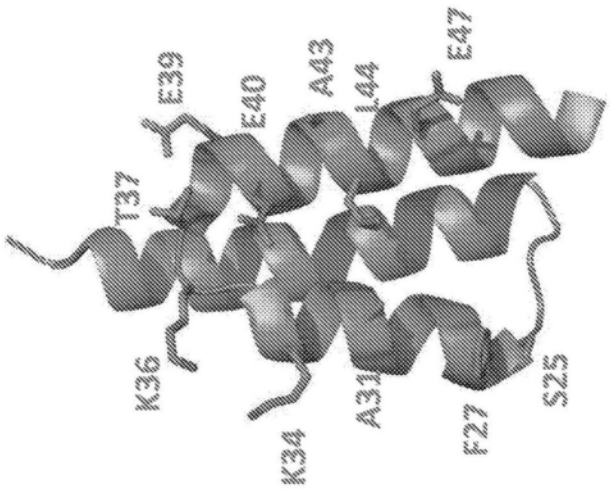


图37A

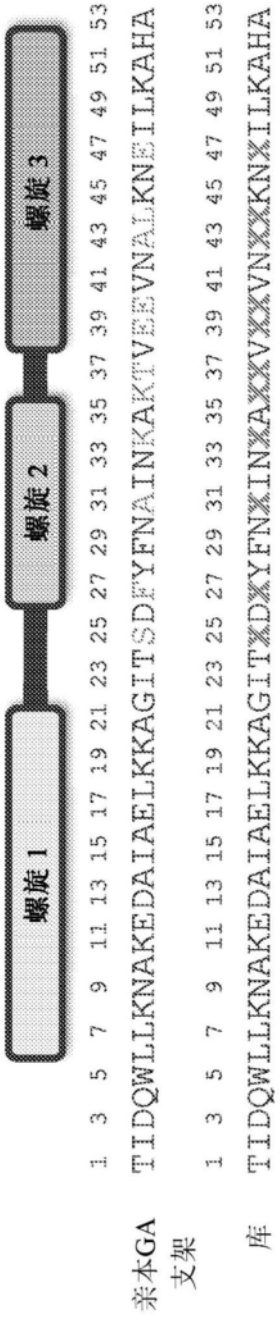

螺旋 1
螺旋 2
螺旋 3
1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25 27 29 31 33 35 37 39 41 43 45 47 49 51 53
亲本GA支架 TIDQWLLKNAKEDAIAELKKAGITSDEYFNAINKAKTVEEVNALKNEILKAHA
1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25 27 29 31 33 35 37 39 41 43 45 47 49 51 53
库 TIDQWLLKNAKEDAIAELKKAGIT%DXYFN%INX%AXXVXXVN%%KN%ILKAHA
X = 三核苷酸密码子，19AA，无cys或终止密码子

图37B

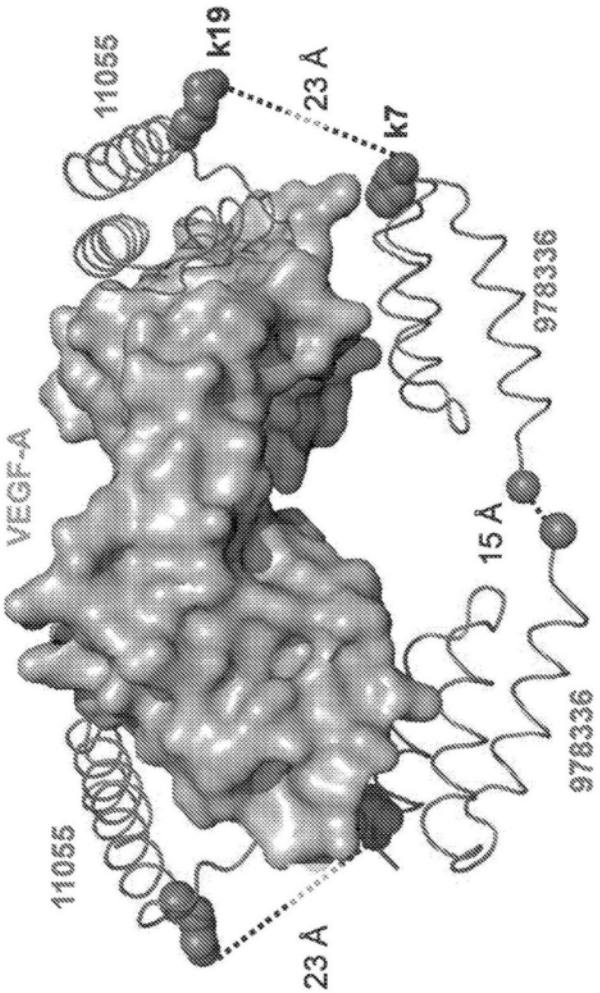


图38A

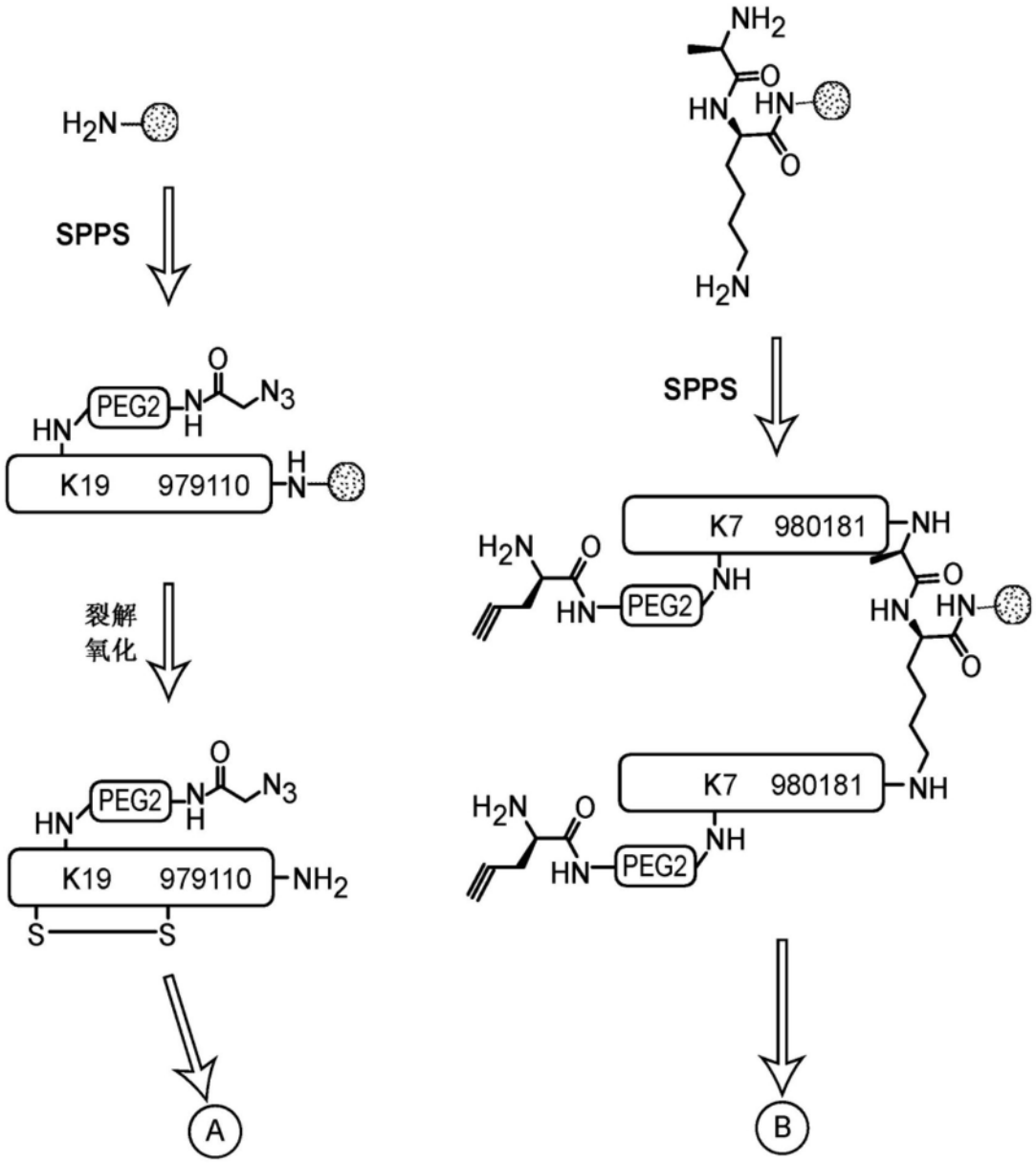

SPPS
PEG2
K19 979110
裂解
氧化
K19 979110
A
SPPS
K7 980181
PEG2
K7 980181
PEG2
B

图38B

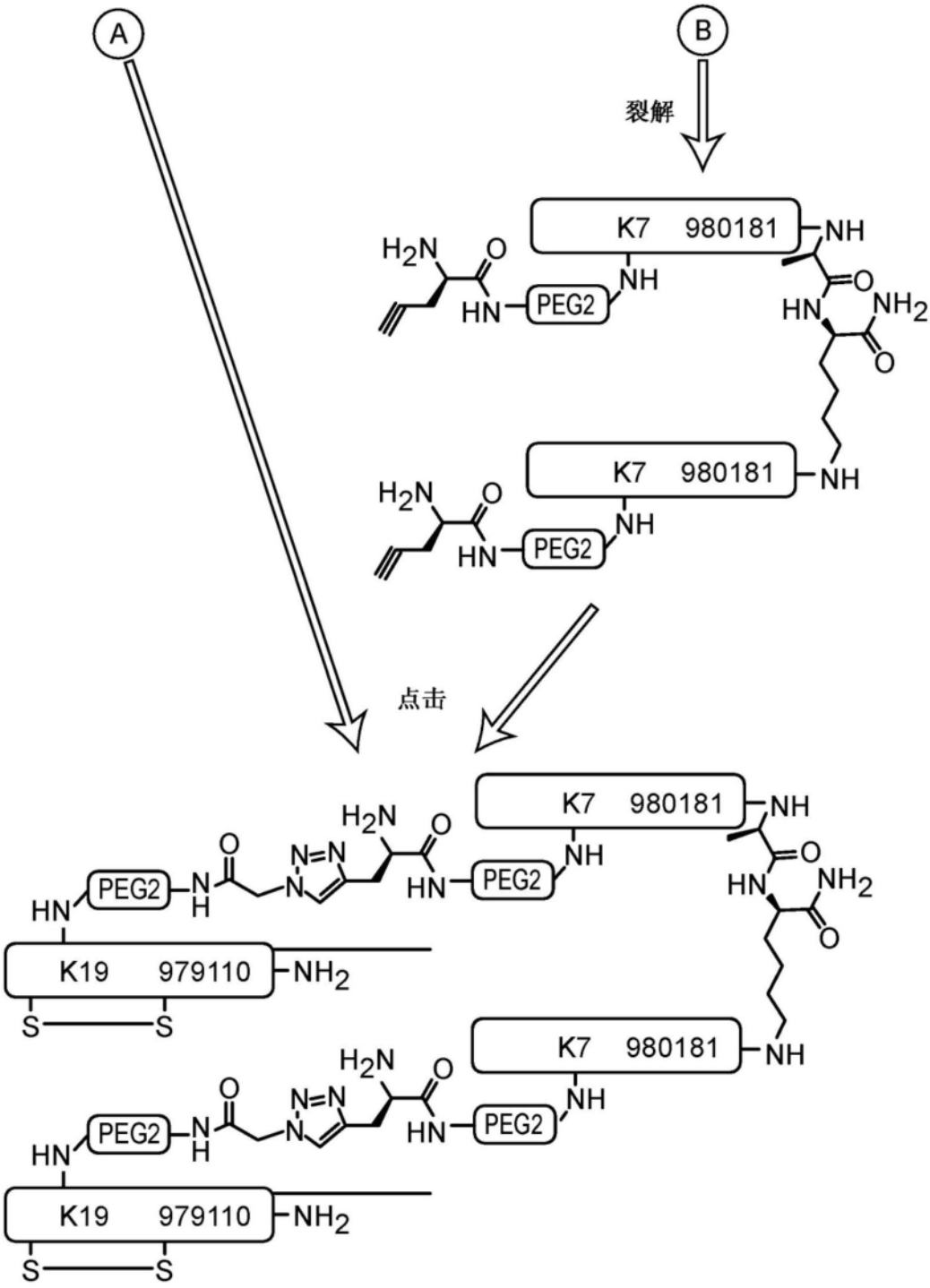


图38B(续)

980870 {[yhiqwvcknakedaiaelk(叠氮基乙酰基-NH-PEG2-CO)kaGitephvisfinhapncshvnGlknailkaha-NH_2
(c到c二硫桥键)]-k19至k7结构域间连接-[vdnkfnk(*D*-Pra-NH-PEG2-CO-)
ewdnawreirhlpnlnveqkrafirslyddpsqsanllaeakklndaqapk]}$_2$-ak(-)NH_2

980871 {[yhiqwvcknakedaiaelk(叠氮基乙酰基-NH-PEG3-CO)kaGitephvisfinhapncshvnGlknailkaha-NH_2
(c到c二硫桥键)]-k19至k7结构域间-[vdnkfnk(*D*-Pra-NH-PEG2-CO-)
ewdnawreirhlpnlnveqkrafirslyddpsqsanllaeakklndaqapk]}$_2$-ak(-)NH_2

图38C

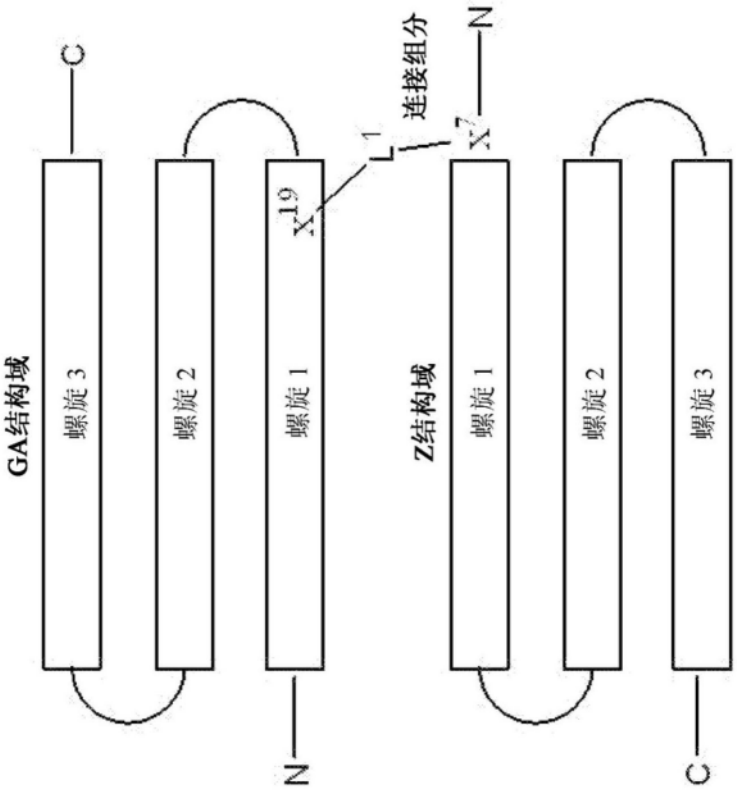


图38D

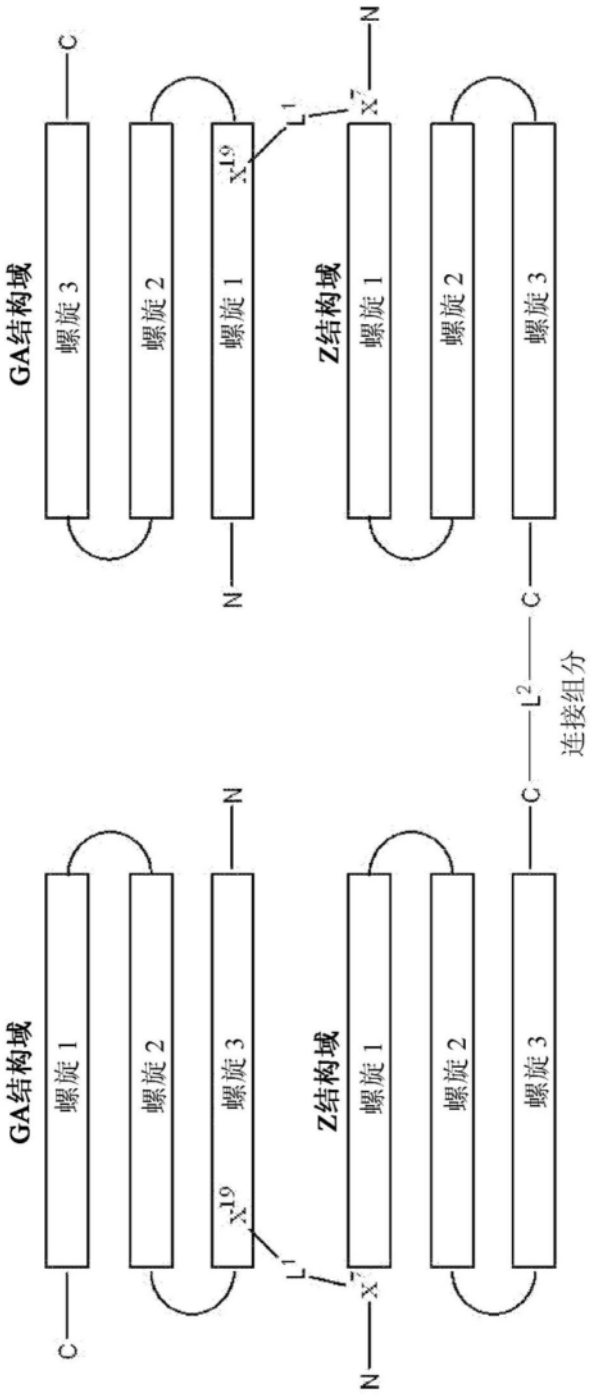

GA结构域
螺旋 3
螺旋 2
螺旋 1
C
N
X^{19}
L^1
X^7
Z结构域
螺旋 1
螺旋 2
螺旋 3
N
C
L^2
连接组分
GA结构域
螺旋 1
螺旋 2
螺旋 3
C
N
X^{19}
L^1
X^7
Z结构域
螺旋 1
螺旋 2
螺旋 3
C
N

图38E

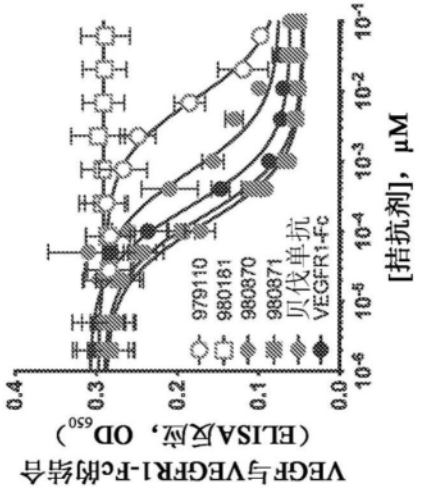


图39A

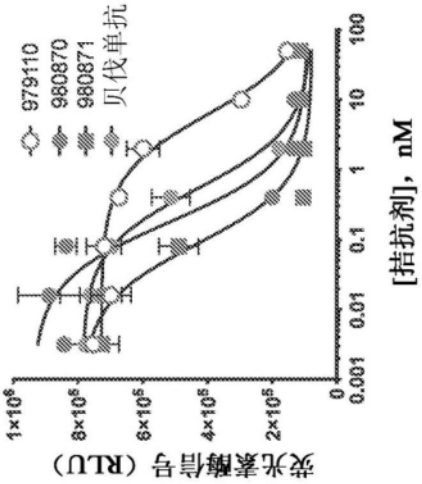


图39B

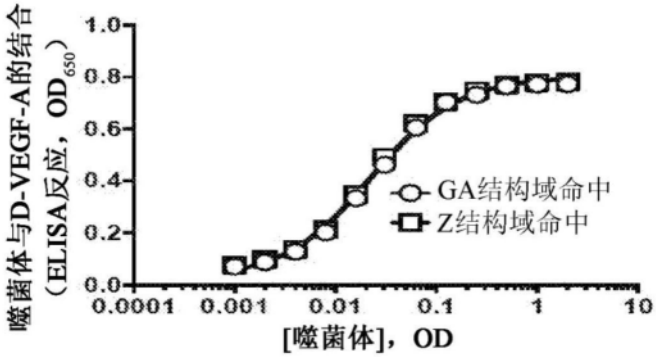


图40A

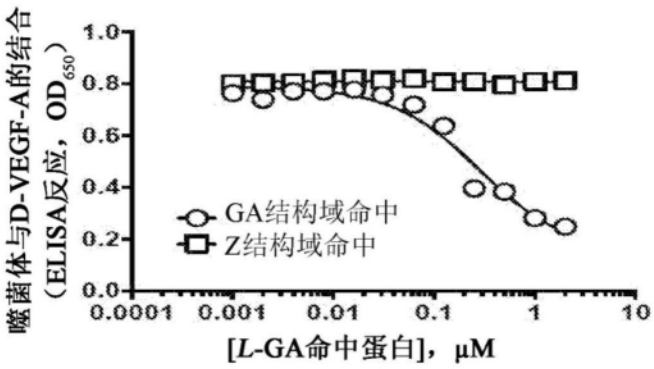


图40B

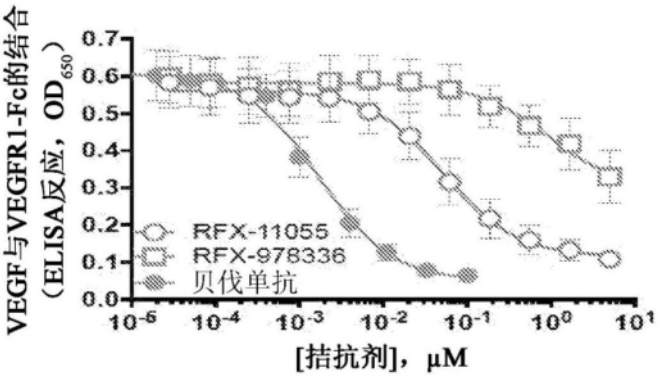


图40C

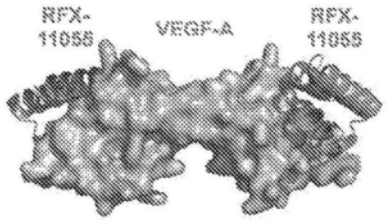


图41A

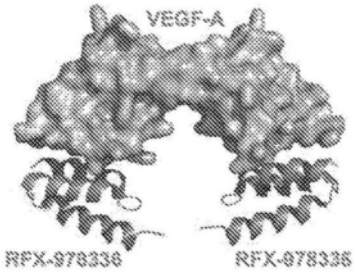


图41B

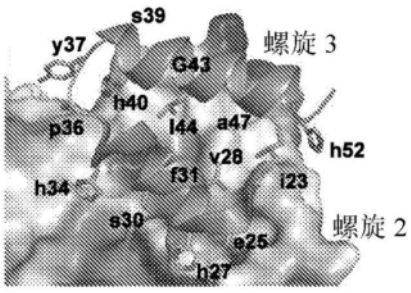


图41C

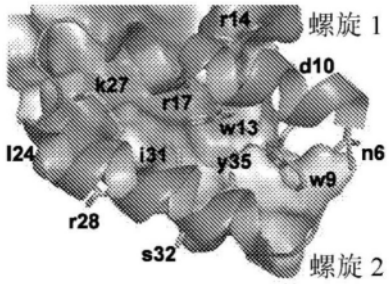


图41D

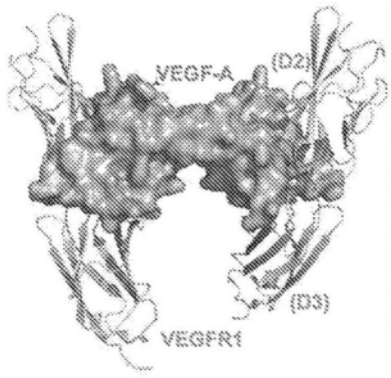


图41E

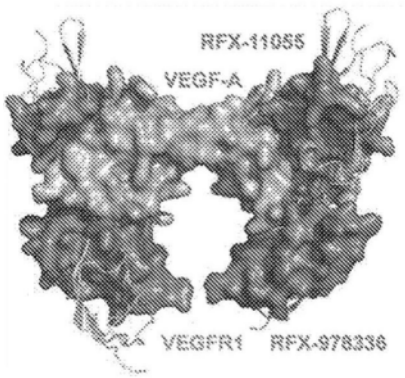


图41F

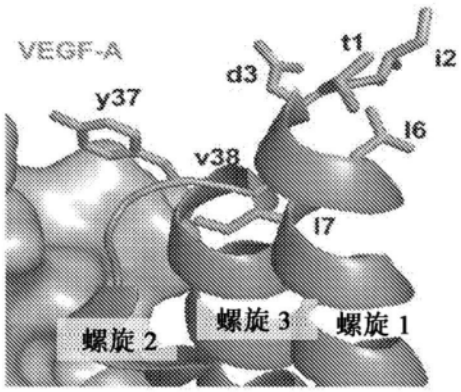


图42A

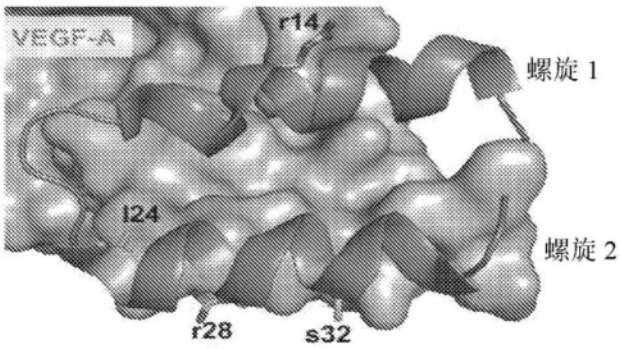


图42B

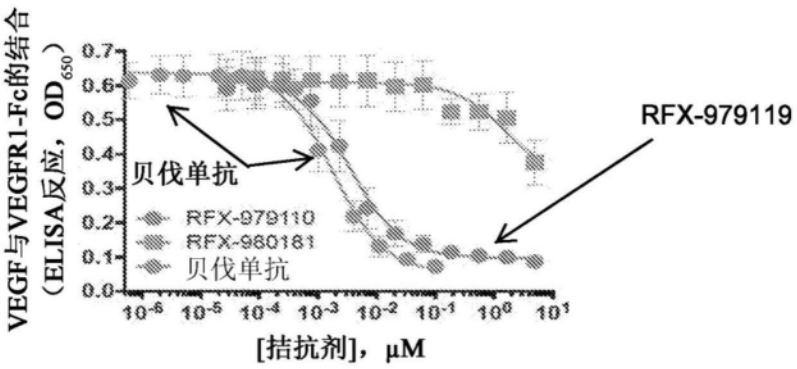


图42C

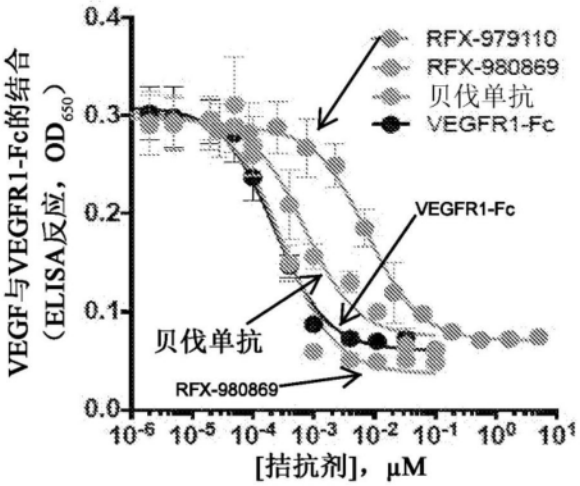


图43A

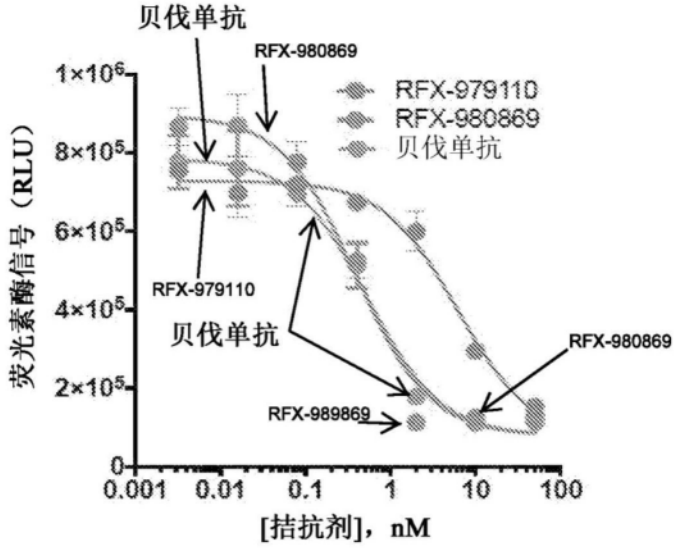


图43B

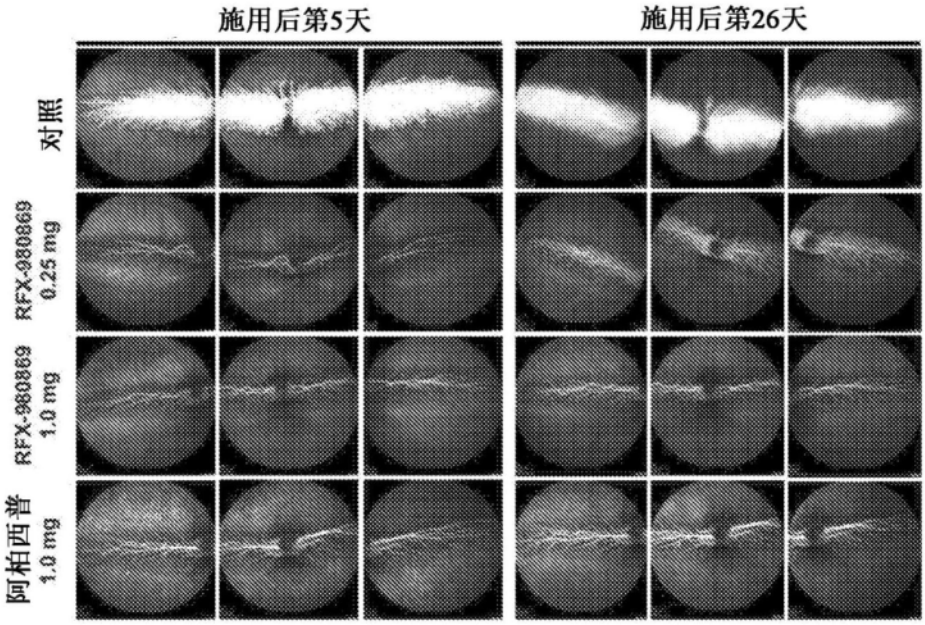

施用后第5天
施用后第26天
对照
RFX-980869 0.25 mg
RFX-980869 1.0 mg
阿柏西普 1.0 mg

图44A

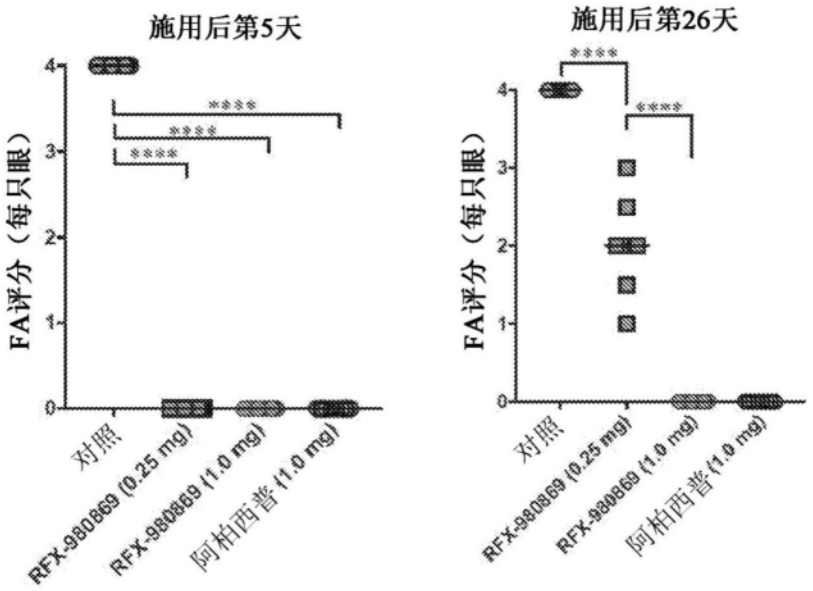

施用后第5天
施用后第26天
FA评分（每只眼）
****
对照
RFX-980869 (0.25 mg)
RFX-980869 (1.0 mg)
阿柏西普 (1.0 mg)

图44B

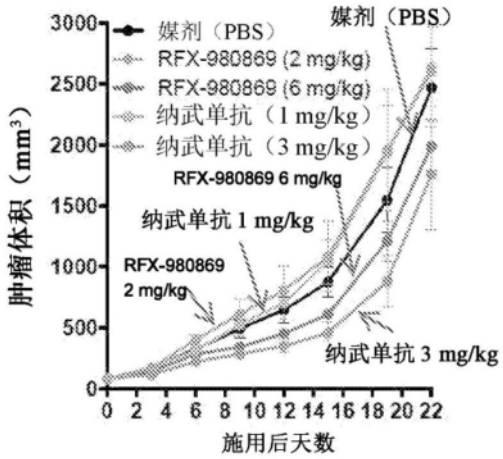

媒剂（PBS）
RFX-980869 (2 mg/kg)
RFX-980869 (6 mg/kg)
纳武单抗（1 mg/kg）
纳武单抗（3 mg/kg）
肿瘤体积（mm³）
施用后天数
媒剂（PBS）
RFX-980869 6 mg/kg
纳武单抗 1 mg/kg
RFX-980869
2 mg/kg
纳武单抗 3 mg/kg

图45A

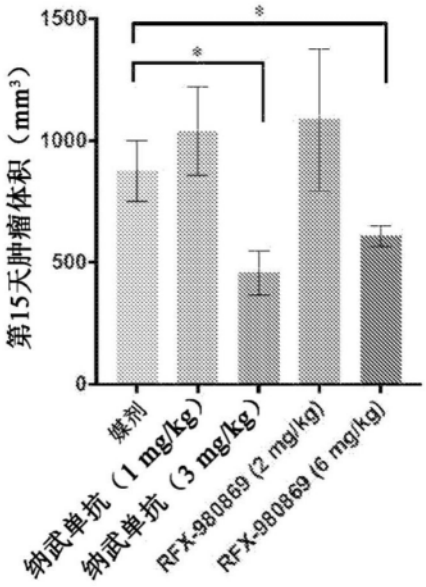

第15天肿瘤体积（mm³）
媒剂
纳武单抗（1 mg/kg）
纳武单抗（3 mg/kg）
RFX-980869 (2 mg/kg)
RFX-980869 (6 mg/kg)

图45B

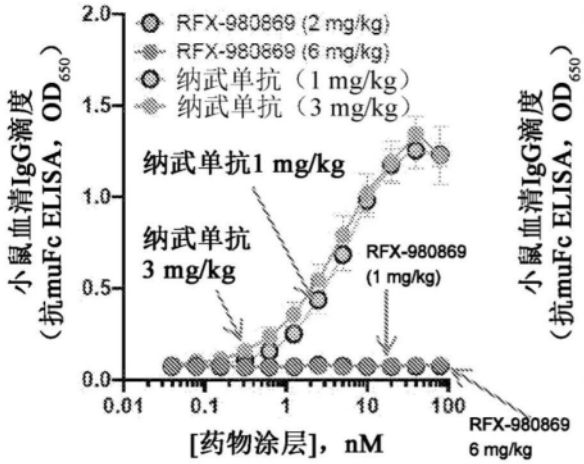


图45C

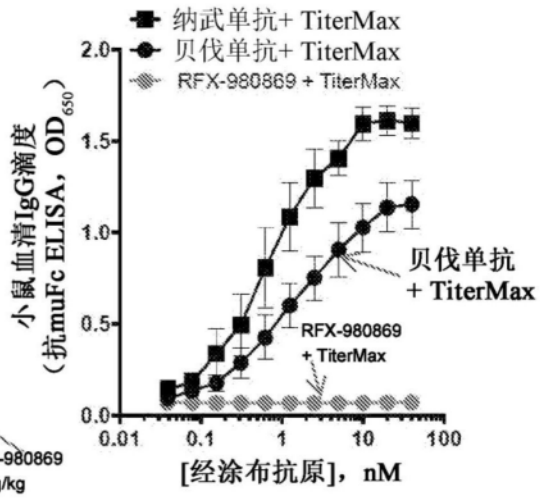


图45D



图46A

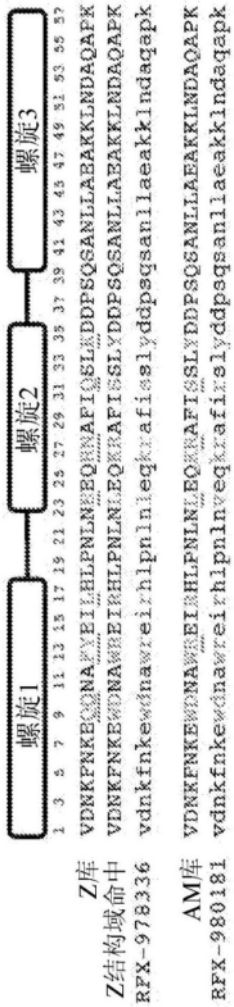

螺旋1
螺旋2
螺旋3
1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25 27 29 31 33 35 37 39 41 43 45 47 49 51 53 55 57
Z库
Z结构域命中
RFX-978336
VDNKFNKEWDNAWREIKHLPNLNEEQRNAFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK
VDNKFNKEWDNAWREIKHLPNLNLEQKNAFISSLYDDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK
vdnkfnkewdnawreirhlpnlneeqknafisslydd psqsanllaeakklndaqapk
AM库
RFX-980181
VDNKFNKEWDNAWREIKHLPNLNLEQKNAFTSSLYDDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK
vdnkfnkewdnawreirhlpnlneqknafirslydd psqsanllaeakklndaqapk

图46B


RFX-980869 [yhiqwvcknakedaiael-k(叠氮基乙酰基-PEG3)-kaGitephvisfinhapncs
hvnGlknailkaha-NH2]-三唑-[vdnkfn-k(D-Pra-PEG2)-
ewdnawreirhlpnlnveqkrafirslyddpsqeanllaeakklndaqapk-NH2]

图46C

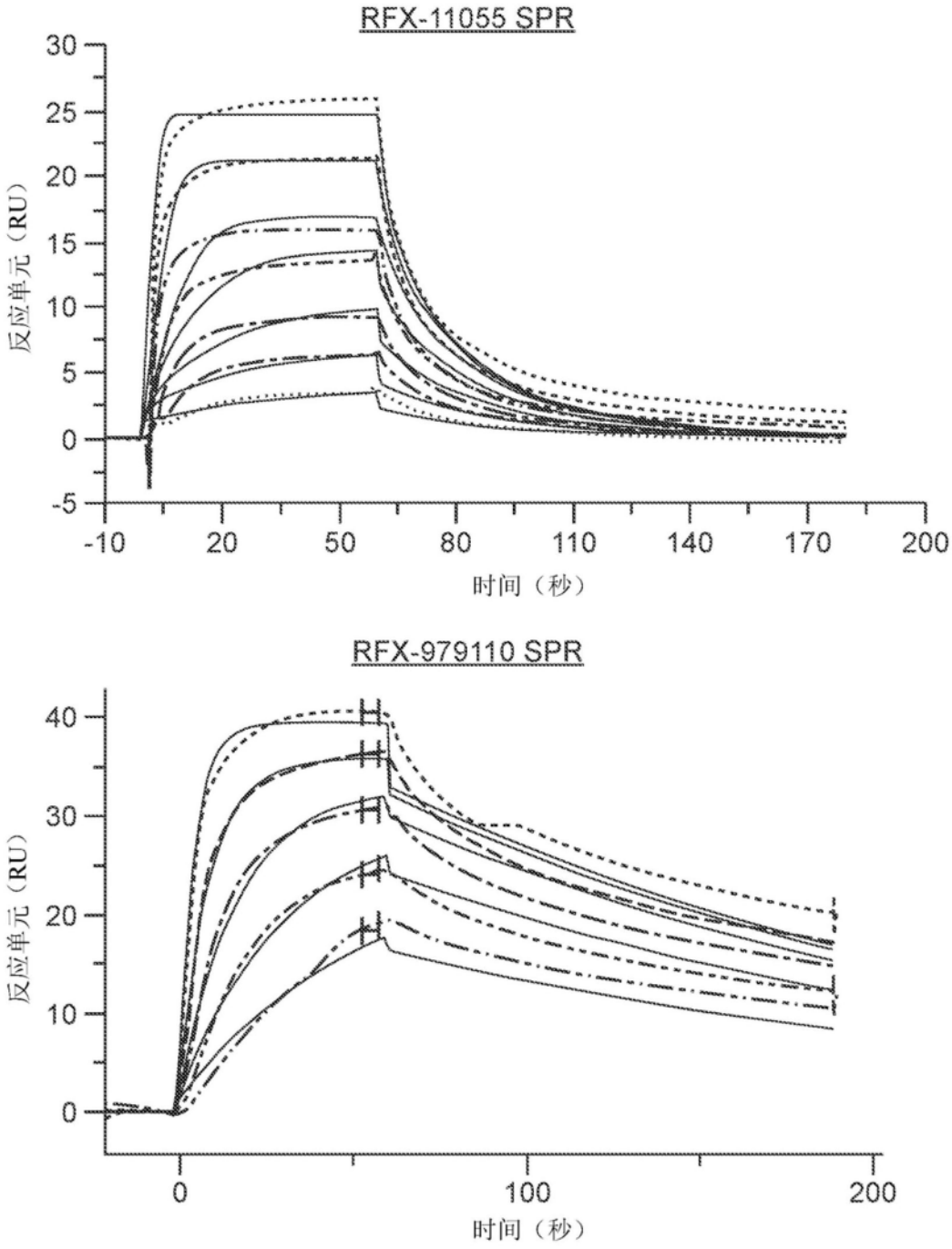

RFX-11055 SPR
反应单元（RU）
30
25
20
15
10
5
0
-5
-10
20
50
80
110
140
170
200
时间（秒）
RFX-979110 SPR
反应单元（RU）
40
30
20
10
0
0
100
200
时间（秒）

图47

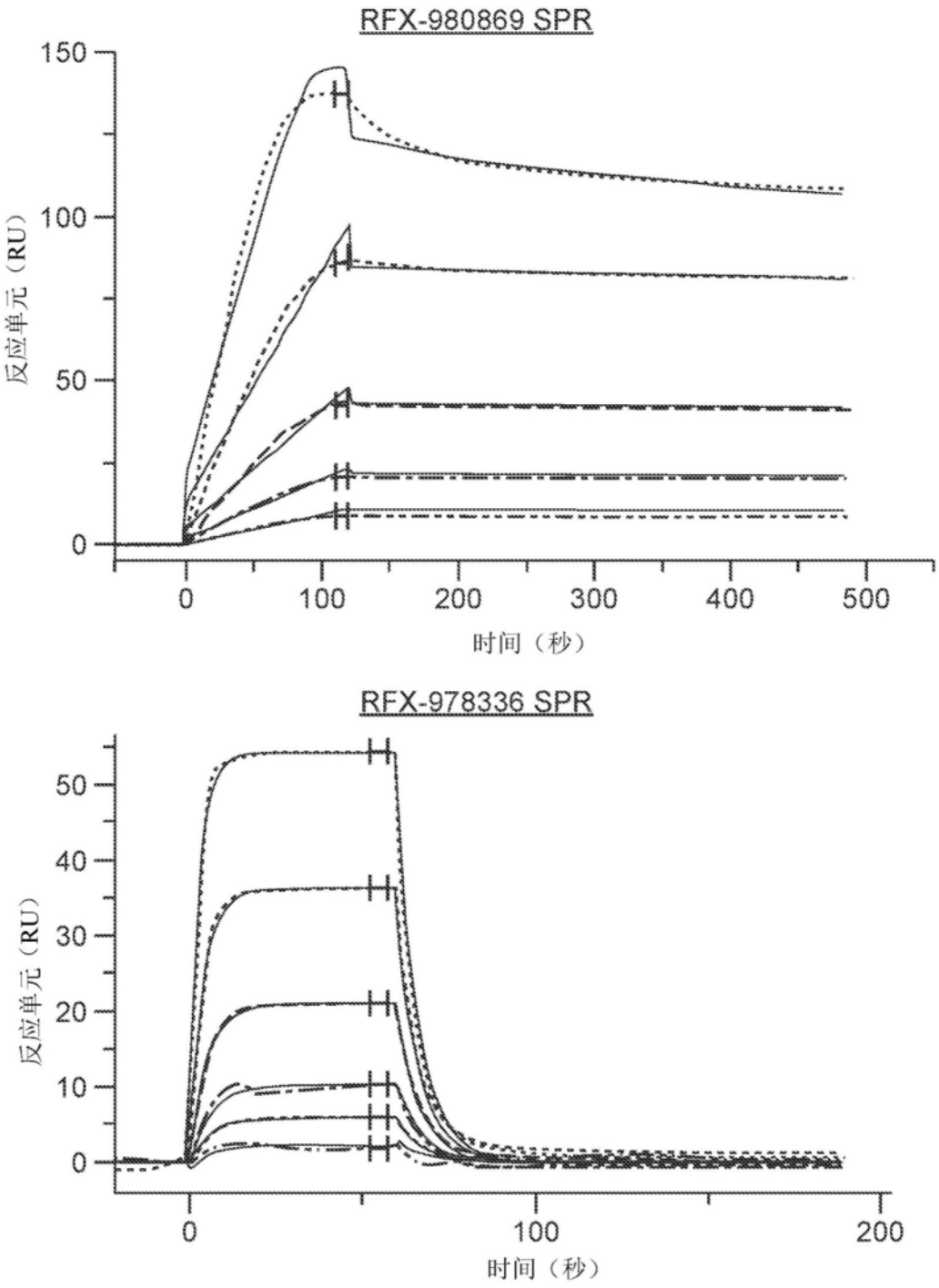

RFX-980869 SPR
反应单元（RU）
150
100
50
0
0
100
200
300
400
500
时间（秒）
RFX-978336 SPR
反应单元（RU）
50
40
30
20
10
0
0
100
200
时间（秒）

图47(续)

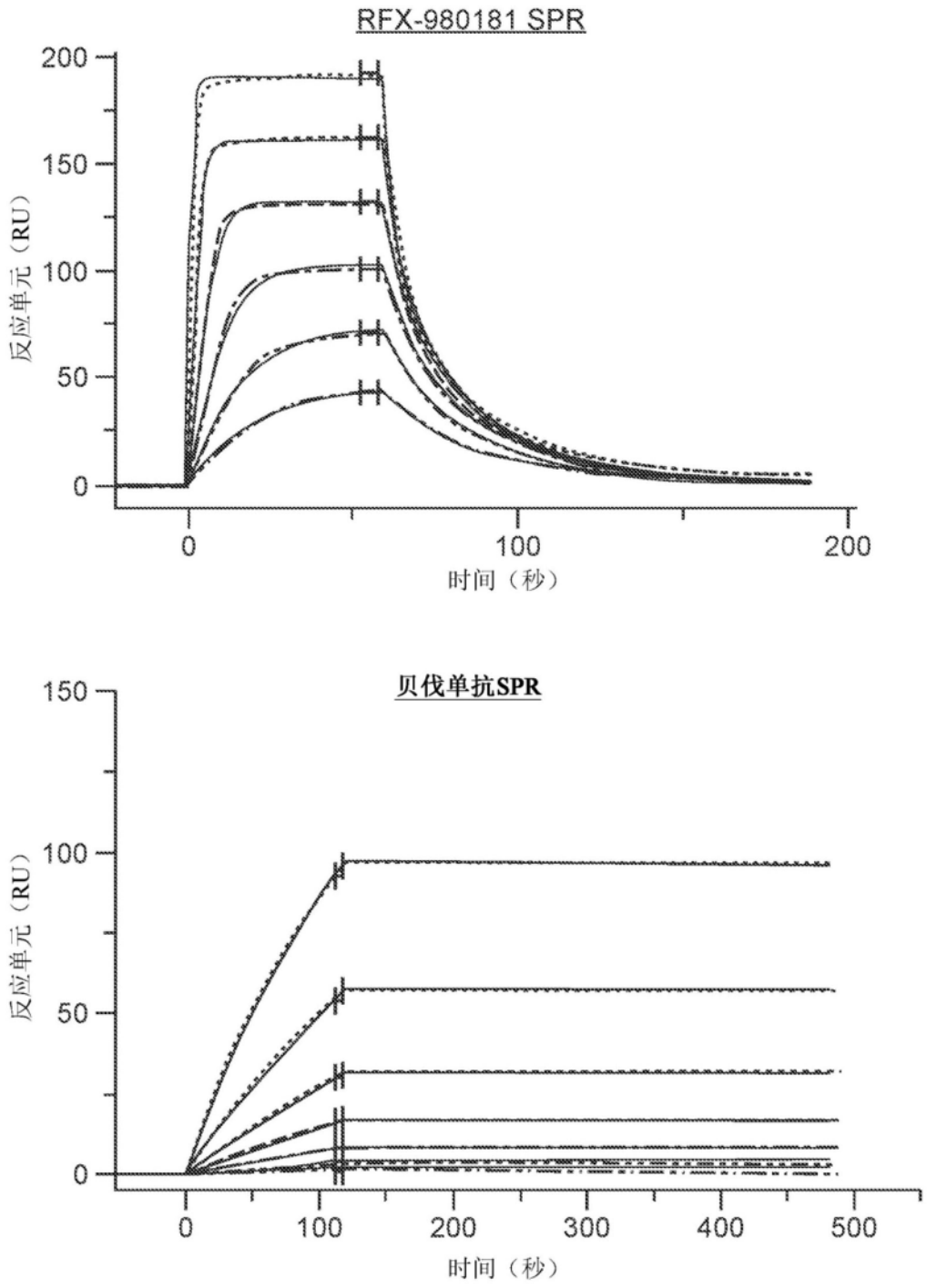

RFX-980181 SPR
反应单元（RU）
200
150
100
50
0
0
100
200
时间（秒）
贝伐单抗SPR
反应单元（RU）
150
100
50
0
0
100
200
300
400
500
时间（秒）

图47(续)

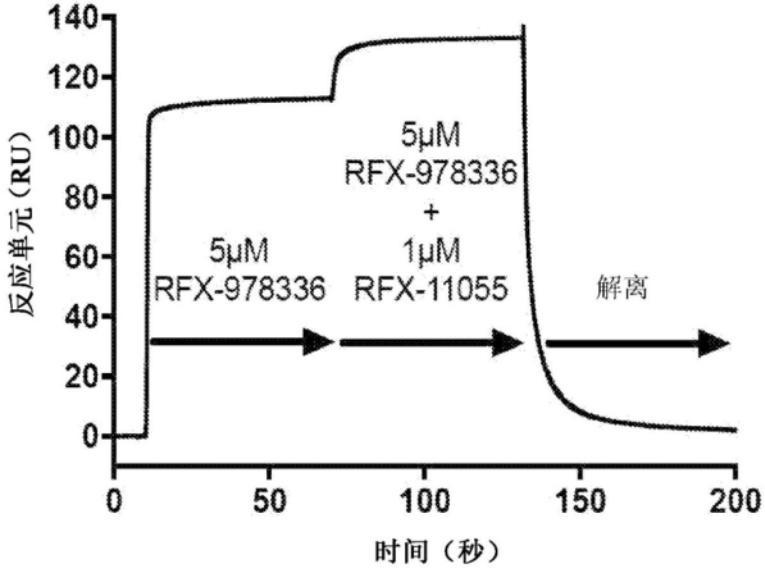

140
120
100
80
60
40
20
0
反应单元（RU）
5μM
RFX-978336
+
1μM
RFX-11055
5μM
RFX-978336
解离
0
50
100
150
200
时间（秒）

图48

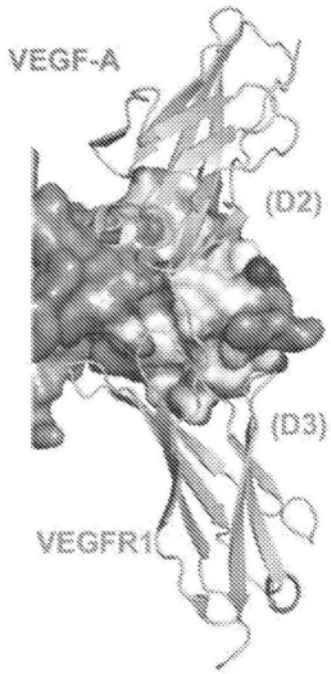

VEGF-A
(D2)
(D3)
VEGFR1

图49A

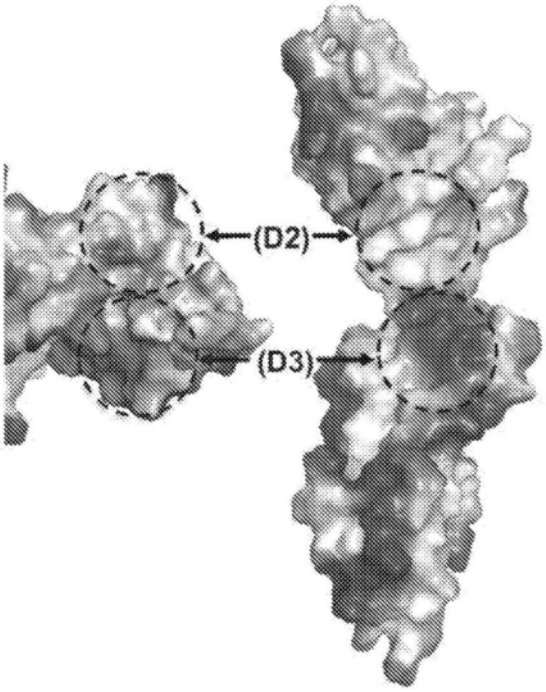


图49B

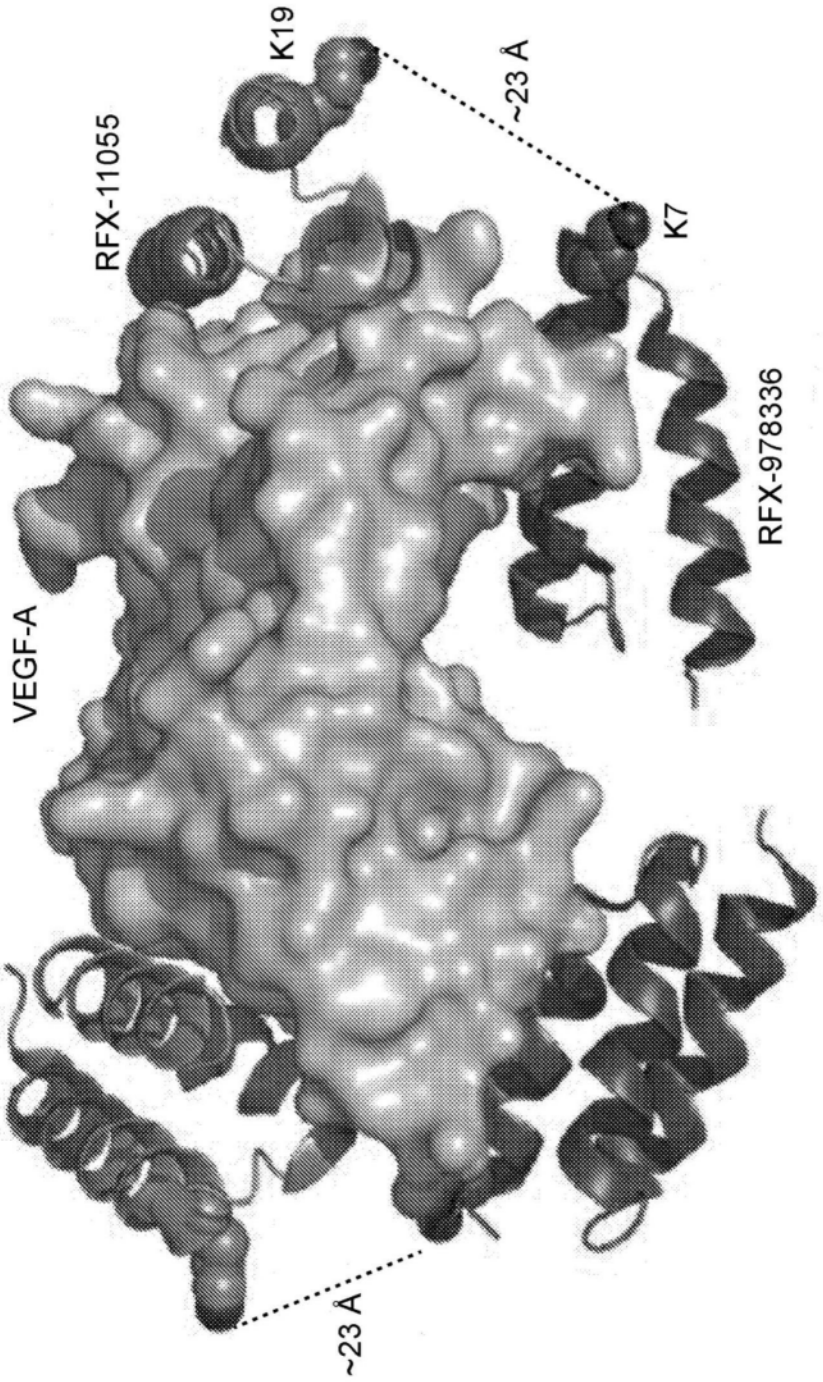


图50A

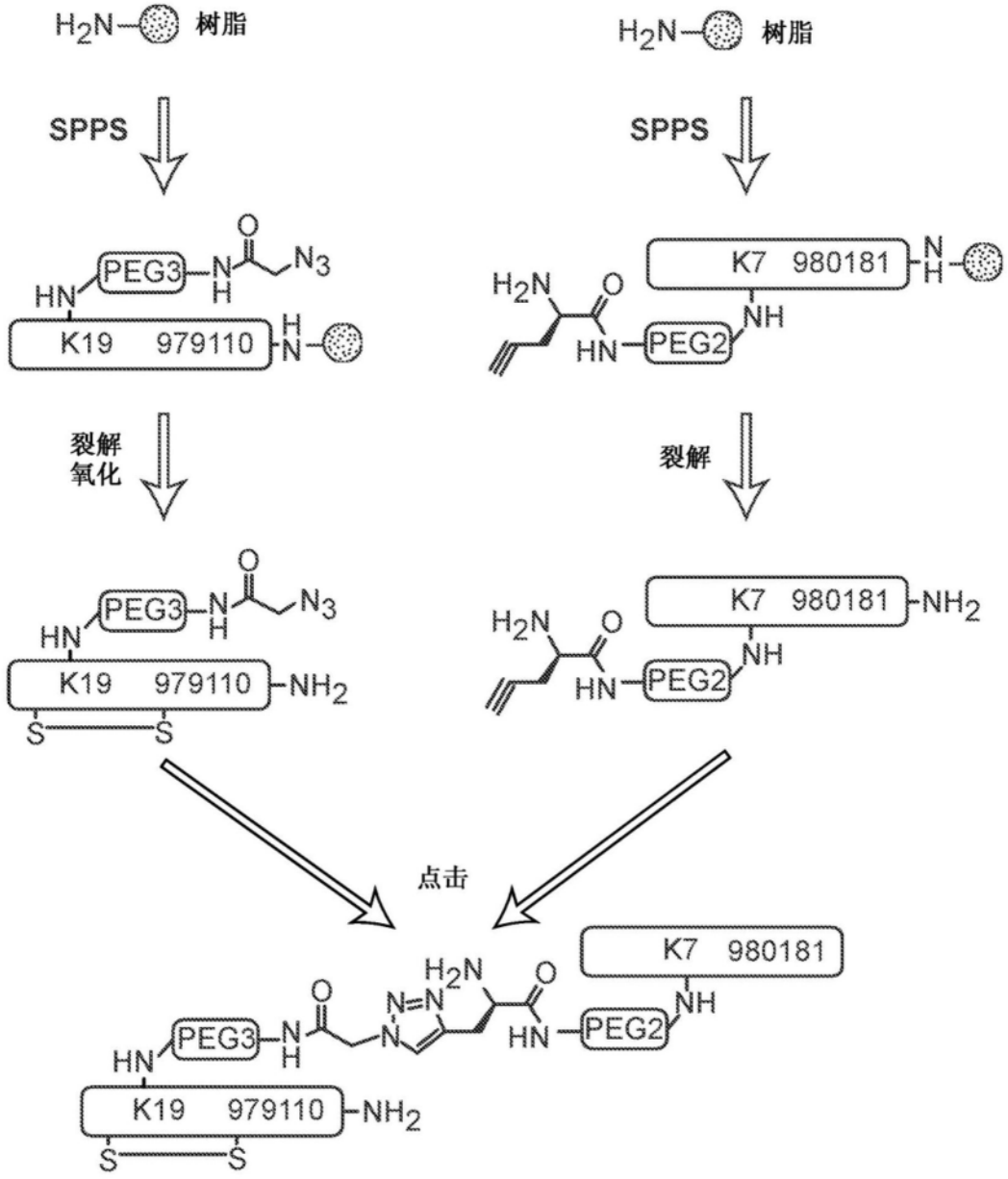

H2N 树脂
SPPS
PEG3
N3
HN
K19 979110
裂解
氧化
NH2
S
S
H2N 树脂
SPPS
K7 980181
H2N
O
NH
HN
PEG2
裂解
NH2
点击
N=N

图50B

D-蛋白	k_a (10^6/$M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (nM)
11055	4.86	2.1×10^{-1}	43.2
978336	0.89	1.8×10^{-1}	168
979110	2.14	5.2×10^{-3}	2.3
980181	11.9	2.1×10^{-1}	17.6
980869	16.8	1.3×10^{-3}	0.07
贝伐单抗	0.18	3.0×10^{-5}	0.16

图51

D-蛋白	VEGF-A121·非平衡阻断ELISA IC_{50}·(nM)
11055	52·±·12
978336	935·±·582
979110	3.5·±·0.6
980181	1658·±·1354
贝伐单抗	1.8·±·0.3

图52

	VEGF-A/RFX-11055	VEGF-A/RFX-978336
数据收集		
束线	SSRF BL19U1	ALS 8.3.1
空间群	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$
波长（Å）	0.97	1.11
晶胞尺寸		
a, *b*, *c* (Å)	61.9, 69.1, 89.4	66.8, 120.4, 120.4
α, β, γ(°)	90, 90, 90	90, 90, 90
摩尔/不对称单元	2	4
摩尔/单位晶胞	8	16
分辨率（Å）	46.09 –2.31 (2.39–2.31)	120.4 – 2.9 (3.08 – 2.90)
$R_{合并}$[a]	0.044 (0.241)	0.059 (1.055)
$I/\sigma I$	25.9 (7.0)	25.7 (2.4)
完整度（%）	99.9 (100.0)	99.9 (99.9)
冗余度	6.4 (6.5)	12.8 (12.7)
优化		
分辨率	54.67 – 2.31 (2.37 – 2.31)	58.45 – 2.90 (2.98 – 2.90)
反射数	16353 (1178)	21152 (1484)
$R_{工作}$（%）/$R_{自由}$（%）	26.8 / 31.9	26.3 / 31.3
原子数		
非溶剂	2430	4936
溶剂	60	0
B因子平均值（Å2）	43.6	126.9
R.M.S偏差		
键长（Å）	0.01	0.006
键角（°）	1.81	1.57

[a] $R_{合并} = \Sigma \mid I - \langle I \rangle \mid / \Sigma I$. [b] $R_{自由}$使用5%的数据计算

图53

D-蛋白	VEGF-A121 平衡阻断ELISA IC_{50} (nM)	*VEGF-A*信号 *传导分析* IC_{50} (nM)
979110	7.6 ± 1.3	6.1 ± 1.2
980869	0.31 ± 0.06	0.39 ± 0.02
贝伐单抗	0.70 ± 0.20	0.53 ± 0.10
VEGFR1-Fc	0.23 ± 0.04	-

图54

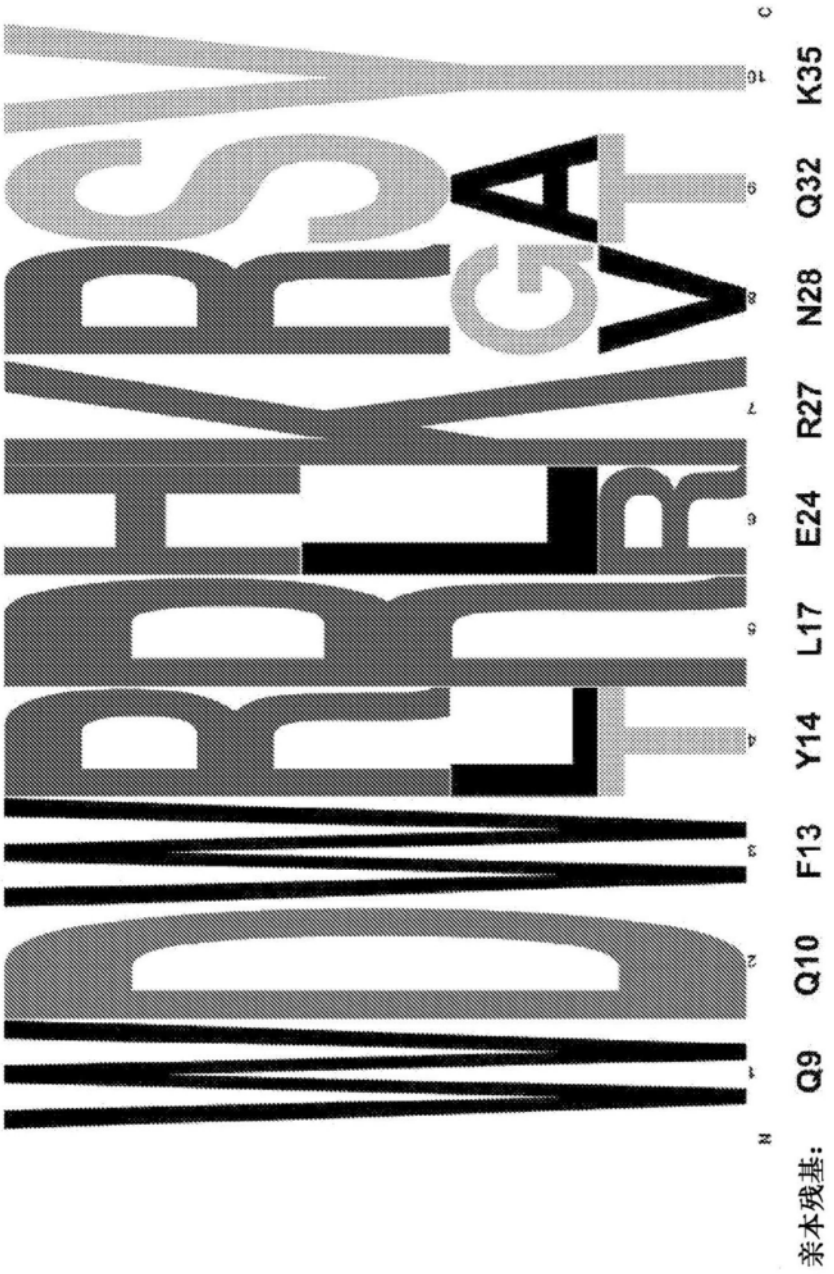


图55