一种抗 VEGFA 融合构建体及其制备方法和应用

技术领域

本发明涉及生物医药技术领域，具体涉及一种抗 VEGFA 融合构建体及其制备方法和应用。

背景技术

血管内皮生长因子 A（Vascular endothelial growth factor A，VEGFA）是 VEGF 家族的重要成员，是一种主要的血管生成因子，可促进血管内皮细胞分化、增殖、迁移和侵袭，并调节血管的形成和发育。VEGFA 促进血管新生主要通过结合并激活受体 VEGFR2（VEGF Receptor 2）及其下游通路来实现。VEGFA 与 VEGFR2 胞外域的结合导致受体二聚化、蛋白激酶激活、酪氨酸磷酸化和下游信号通路的激活，刺激内皮细胞的增殖，并增加血管通透性。VEGF 信号通路的激活发生在多种疾病中，从癌症、自身免疫到视网膜病变等。抑制 VEGF 信号通路可以治疗与异常血管增生相关的疾病，如湿性老年黄斑变性（wet age-related macular degeneration，wAMD）。目前已有多个抗 VEGF 蛋白药物上市，用于治疗肿瘤和眼部新生血管相关疾病。

首个抗 VEGFA 的蛋白药物为单克隆抗体贝伐单抗（bevacizumab/Avastin），此外抗 VEGFA 的蛋白药物还有雷珠单抗（ranibizumab/Lucentis）、阿柏西普和 Brolucizumab（Beovu）等等。其中，游离的阿柏西普在人房水中的半衰期约为 11 天，长于雷珠单抗（7 天）和贝伐单抗（9 天），阿柏西普给药间隔为每 2 个月一次。目前，将阿柏西普给药剂量从 2 mg 提高到 8 mg，在临床试验中证明能进一步延长给药间隔至每 3 或 4 个月一次。Brolucizumab（Beovu）可制备成 120 mg/mL 的蛋白溶液，单次玻璃体腔注射的蛋白量可达 6 mg，是目前单次注射的最大剂量。在 brolucizumab 的给药方案中，患者前三个月每个月接受一次注射，随后每 3 个月注射一次，视力改善效果不差于对照组阿柏西普（每 2 个月注射一次）。这些抗 VEGF 蛋白药物的给药途径玻璃体腔注射，给药体积不超过 100μL。Brolucizumab 的最长给药间隔为 3 个月，其余药物的给药间隔是 1~2 个月注射一次。频繁的眼内注射会增加注射带来的眼压升高、眼内炎症、视网膜脱落等风险，因此临床上迫切需要长效抗 VEGFA 治疗药物，减少患者的注射次数。

现有技术中减少给药频率的方法包括增加蛋白药物的浓度，使得单次注射药物的剂量增加；其他手段还包括增强抗 VEGFA 抗体的生物学活性，降低最小起效浓度；或者增强药物的半衰期来实现。目前长效抗 VEGFA 治疗药物的开发在临床中取得了一定成果，但也存在一些问题，比如高浓度蛋白制剂往往会有粘度增加，容易形成蛋白聚集体或者稳定性较差的技术问题，增加了玻璃体注射的风险；另外还存在生物学效应不足或者半衰期增强不显著等问题，因此抗 VEGFA 药物的设计和开发还有待进一步的研究和改进。

重链抗体是起源于驼类动物（骆驼、单峰骆驼和美洲驼等）血清中仅含重链、不含轻链的 IgG2 和 IgG3 抗体。重链抗体的重链可变区（variable domain of heavy chain，VHH）具有独立的抗原结合活性，是目前天然抗体中分子量最小的功能片段，被称为纳米抗体或者单域抗体。纳米抗体的分子量约为 13 kDa，热稳定性高且水溶性好，具有较大潜力可以开发为较高浓度的蛋白制剂。白蛋白（albumin）是血浆中含量最丰富的蛋白（浓度约为 40 mg/mL），它对于维持血浆渗透压至关重要，同时白蛋白是内源配体（如脂肪酸、金属离子、激素等）和外源配体（如药物）的重要运输载体。

白蛋白分子量为 66.5 kDa，并在弱酸性条件下能结合细胞表面的受体 FcRn（neonatal Fc receptor），而在中性条件下结合力较弱，因此，白蛋白结合 FcRn 后，内吞进入内体（endosome），随着内体环境酸化，白蛋白与 FcRn 结合力增强，并被 FcRn 重新带回细胞表面，或实现跨细胞转运。因此，白蛋白能借助于 FcRn 的循环利用机制，实现较长半衰期。人血白蛋白在血浆中的半衰期约为 3 周，因此，与白蛋白结合的小分子化合物，或是与白蛋白融合表达的蛋白（如上市药物 Tanzeum®和 Idelvion®），具有显著改善的药代动力学性质，获得更长的半衰期，能潜在延长给药间隔，为患者提供更好的用药方案。

抗白蛋白抗体或其抗原结合片段可以以高亲和力结合不同种属白蛋白，同时，所述抗白蛋白抗体可以与生物活性效应分子，比如抗 VEGFA 抗体或者抗原结合片段连接，形成融合构建体融合构建体可通过与白蛋白的结合来改善的药代动力学性质，获得更长的半衰期。然而融合构建体的结构的设计，各个结构域之间的连接方式，与白蛋白结合后是否会影响生物活性效应分子的活性仍需大量创造性的工作。本申请希

望利用纳米抗体技术用于抗白蛋白抗体或者抗原结合片段的开发、以及抗 VEGFA 融合构建体的开发和设计中，提供更优的抗 VEGFA 融合构建体。

发明内容

为克服现有技术的缺陷，本申请以结合 VEGFA 的纳米抗体为基本活性单元，并进行纳米抗体的一价和二价化设计，制备出稳定性好、且具有很强生物活性的抗 VEGFA 融合蛋白，此外通过连接子与其他抗原的抗体或抗原结合片段相连接，如抗白蛋白抗体，制备出抗 VEGFA 抗体或抗原结合片段与抗白蛋白抗体或抗原结合片段的融合构建体。该融合构建体具有很强的 VEGFA 结合亲和力及抑制 VEGFA 刺激的 HUVEC 增殖的生物学活性，另外融合构建体中的各个结构域之间的功能不相互影响。具体的，

本发明的第一方面，提供了一种抗 VEGFA 融合构建体，所述的融合构建体包含抗白蛋白抗体或其抗原结合片段和抗 VEGFA 抗体或其抗原结合片段，所述的抗 VEGFA 抗体或其抗原结合片段与所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段连接。

优选的，所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段包含重链可变区的 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3。

CDR-H1 的氨基酸序列包含 SEQ ID NO：1，或与 SEQ ID NO：1 所示氨基酸序列具有至少 80%同一性的氨基酸序列；

CDR-H2 的氨基酸序列包含 SEQ ID NO：41（GISVX$_1$X$_2$SFLDYADAVKG）或与 SEQ ID NO：41 所示氨基酸序列具有至少 80%同一性的氨基酸序列；

CDR-H3 的氨基酸序列包含 SEQ ID NO：3 或与 SEQ ID NO：3 所示氨基酸序列具有至少 80%同一性的氨基酸序列。

其中，所述的 SEQ ID NO：41（GISVX$_1$X$_2$SFLDYADAVKG）中的 X 可以为任意天然氨基酸残基，例如丙氨酸（A）、精氨酸（R）、天冬酰胺（N）、天冬氨酸（D）、半胱氨酸（C）、谷氨酰胺（Q）、谷氨酸（E）、甘氨酸（G）、组氨酸（H）、异亮氨酸（I）、亮氨酸（L）、赖氨酸（K）、甲硫氨酸（M）、苯丙氨酸（F）、苏氨酸（T）、脯氨酸（P）、丝氨酸（S）、色氨酸（W）、酪氨酸（Y）、缬氨酸（V）。

在本发明的一个具体实施方式中，SEQ ID NO：41（GISVX$_1$X$_2$SFLDYADAVKG）中的 X$_1$X$_2$ 代表 DS、DA、EG 或 DG。

在本发明的一个具体实施方式中，所述的 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3 的氨基酸序列包含下列任一组（具体见表 42）：

A）SEQ ID NO：1、2、3；

B）SEQ ID NO：1、10、3；

C）SEQ ID NO：1、11、3；

D）SEQ ID NO：1、12、3。

表 42 抗白蛋白候选抗体 CDR 序列

候选抗体编号	SEQ ID NO	CDR-H1	SEQ ID NO	CDR-H2	SEQ ID NO	CDR-H3
3005	1	NYYMS	2	GISVDGSFLDYADAVKG	3	ASGPQGLRLGAP
3005Hz6 (DA)	1	NYYMS	10	GISVDASFLDYADAVKG	3	ASGPQGLRLGAP
3005Hz6 (DS)	1	NYYMS	11	GISVDSSFLDYADAVKG	3	ASGPQGLRLGAP
3005Hz6 (EG)	1	NYYMS	12	GISVEGSFLDYADAVKG	3	ASGPQGLRLGAP

优选的，所述的 CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3 的氨基酸序列以从 N 端到 C 端的顺序排列。

所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段包含重链可变区。本申请中抗体 CDR 区氨基酸的划分采用 Kabat 编号系统。

优选的，所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段包括人源化序列，所述的人源化序列的改造位点位于非 CDR 区，进一步优选的，所述的人源化序列的改造位点位于可变区的框架区和/或恒定区。

优选的，所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段的结构包括纳米抗体、嵌合抗体、Fab 片段、Fab'片段、Fd 片段、Fv 片段、dAb 片段、F(ab')2 片段、单链抗体（single chain antibody fragment，scFv）

或线性抗体。

所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段可以为单域抗体或纳米抗体。

在本发明的一个具体实施方式中，所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段为纳米抗体，与全长IgG 抗体、Fab、scFv 相比，在相同质量下，纳米抗体具有更高的摩尔浓度，可结合更多的抗原分子。

所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段可以结合哺乳动物白蛋白。

优选的，所述的哺乳动物包括人或非人哺乳动物，所述的非人哺乳动物可以为野生动物、动物园动物、经济动物、宠物、实验动物等等。优选的，所述的非人哺乳动物包括但不限于猪、牛、羊、马、驴、狐、貉、貂、骆驼、狗、猫、兔、鼠（例如大鼠、小鼠、豚鼠、仓鼠、沙鼠、龙猫、松鼠）或猴等等。

优选的，所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段的氨基酸序列包含 SEQ ID NO：4、6-9、13-15 中的任一氨基酸序列，或与 SEQ ID NO：4、6-9、13-15 中的任一氨基酸序列具有至少 80%同一性。

在本发明的一个具体实施方式中，所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段的氨基酸序列如 SEQ ID NO：4、6-9、13-15 中的任一氨基酸序列所示。

所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段可以采用现有技术任何常规方法进行构建。例如人工合成或者真核表达或原核表达。

优选的，所述的抗 VEGFA 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区的 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3；

其中，CDR-H1 的氨基酸序列包含 SEQ ID NO：16，或与 SEQ ID NO：16 所示氨基酸序列具有至少 80%同一性的氨基酸序列；

CDR-H2 的氨基酸序列包含 SEQ ID NO：17 或与 SEQ ID NO：17 所示氨基酸序列具有至少 80%同一性的氨基酸序列；

CDR-H3 的氨基酸序列包含 SEQ ID NO：18 或与 SEQ ID NO：18 所示氨基酸序列具有至少 80%同一性的氨基酸序列。

所述的抗 VEGFA 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区。

所述的抗 VEGFA 抗体或其抗原结合片段的结构包括纳米抗体、嵌合抗体、Fab 片段、Fab'片段、Fd 片段、Fv 片段、dAb 片段、F(ab')2 片段、单链抗体（single chain antibody fragment，scFv）或线性抗体。

所述的抗 VEGFA 抗体或其抗原结合片段可以为单域抗体或纳米抗体。

所述的抗 VEGFA 抗体或其抗原结合片段可以为人源化抗体或全人源抗体。

优选的，所述的抗 VEGFA 抗体或其抗原结合片段包括人源化序列，所述的人源化序列的改造位点位于非 CDR 区，进一步优选的，所述的人源化序列的改造位点位于可变区的框架区和/或恒定区。

在本发明的一个具体实施方式中，所述的抗 VEGFA 抗体或其抗原结合片段为纳米抗体，与全长IgG 抗体、Fab、scFv 相比，在相同质量下，纳米抗体具有更高的摩尔浓度，可结合更多的抗原分子。

优选的，所述的抗 VEGFA 抗体或其抗原结合片段可以结合人或猴 VEGFA 蛋白。

优选的，所述的抗 VEGFA 抗体或其抗原结合片段的氨基酸序列包含 SEQ ID NO：19-28 中的任一氨基酸序列，或与 SEQ ID NO：19-28 中的任一氨基酸序列具有至少 80%同一性。

优选的，所述的融合构建体包含一个或者多个抗 VEGFA 抗体或其抗原结合片段。

优选的，所述的融合构建体包含一个或者多个抗白蛋白抗体或其抗原结合片段。

优选的，抗 VEGFA 抗体或其抗原结合片段与抗 VEGFA 抗体或其抗原结合片段之间直接连接或者间接连接。

优选的，所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段与抗 VEGFA 抗体或其抗原结合片段之间直接连接或间接连接。

优选的，所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段与抗白蛋白抗体或其抗原结合片段之间直接连接或间接连接。

优选的，所述的间接连接为通过接头、功能结构域和/或用于偶联的连接子连接。

其中，所述的接头选自连接肽、寡肽、寡肽聚合物、多肽、多肽聚合物、PEG、核酸、多糖、脂肪链、生物素、链霉亲和素或亲和素。

所述的功能结构域为 Fc 片段、血清白蛋白、细胞因子、转铁蛋白或支架蛋白中的一种或多种的组合。

所述的用于偶联的连接子包括功能团连接子，优选的，所述的功能团连接子包括巯基、氨基、羟基和/或羧基反应活性基团，可以使抗白蛋白抗体或其抗原结合片段与抗 VEGFA 抗体或其抗原结合片段之间共价偶联。

优选的，所述的抗 VEGFA 抗体或其抗原结合片段的 N 端和/或 C 端通过连接肽与其他抗 VEGFA 抗体或其抗原结合片段的 C 端和/或 N 端相连。

在本发明的一个具体实施方式中，从 N 端到 C 端依次包括第一个抗 VEGFA 抗体或其抗原结合片段、连接肽、第二个抗 VEGFA 抗体或其抗原结合片段。

优选的，所述的抗 VEGFA 抗体或其抗原结合片段直接或者间接连接在所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段的 N 端、C 端和/或内部残基上。

在本发明的一个具体实施方式中，所述的融合构建体包含两个抗 VEGFA 抗体或其抗原结合片段，所述的两个抗 VEGFA 抗体或其抗原结合片段直接或者间接连接在所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段的 N 端、C 端和/或内部残基上。

例如，所述的融合构建体中从 N 端到 C 端，抗白蛋白抗体或其抗原结合片段和抗 VEGFA 抗体或其抗原结合片段的连接顺序如下：

1） 抗白蛋白抗体或其抗原结合片段、连接肽、抗 VEGFA 抗体或其抗原结合片段；

2） 抗 VEGFA 抗体或其抗原结合片段、连接肽、抗白蛋白抗体或其抗原结合片段；

3） 抗白蛋白抗体或其抗原结合片段、连接肽、第一个抗 VEGFA 抗体或其抗原结合片段、连接肽、第二个抗 VEGFA 抗体或其抗原结合片段；或者，

4） 第一个抗 VEGFA 抗体或其抗原结合片段、连接肽、抗白蛋白抗体或其抗原结合片段、连接肽、第二个抗 VEGFA 抗体或其抗原结合片段，等等；

其中，所述的连接可以不包括连接肽。

优选的，两个或两个以上抗 VEGFA 抗体或其抗原结合片段为完全相同序列的抗 VEGFA 抗体或其抗原结合片段、部分相同序列的抗 VEGFA 抗体或其抗原结合片段或完全不同序列的抗 VEGFA 抗体或其抗原结合片段。

在一个具体实施方式中，所述的融合构建体包含 SEQ ID NO：29-35 中的任一氨基酸序列，或与 SEQ ID NO：29-35 中的任一氨基酸序列具有至少 80%同一性。

优选的，所述的融合构建体包括 Fc 片段。

进一步优选的，所述的 Fc 片段包含 SEQ ID NO：38，或与 SEQ ID NO：38 所示氨基酸序列具有至少 80%同一性。

优选的，所述的融合构建体还包含分泌肽。所述的分泌肽连接在融合构建体的 N 端。进一步优选的，所述的分泌肽的氨基酸序列可以为 SEQ ID NO：36。

优选的，所述的融合构建体中还包含标签。

优选的，所述的标签连接在任一抗体或其抗原结合片段，或者融合构建体的 C 端。

优选的，所述的融合构建体可以抑制或竞争其他抗 VEGFA 抗体（优选为与本发明中的抗 VEGFA 抗体结合相同或重叠表位的抗体）与 VEGFA 的结合。

优选的，所述的融合构建体还可以抑制或竞争其他抗白蛋白抗体（优选为与本发明中的抗白蛋白抗体结合相同或重叠表位的抗体）与白蛋白的结合。

本发明的第二方面，提供了一种核酸，其编码本申请所述的抗体或抗原结合片段，或上述的融合构建体。例如，所述核酸包含 DNA 和/或 mRNA。例如，所述核酸为治疗性核酸。

在一些实施方案中，所述核酸为 DNA，其编码本申请所述的抗体或抗原结合片段，或上述的融合构建体。

优选的，编码抗白蛋白抗体或其抗原结合片段中 CDR-H1 的核苷酸序列包含 SEQ ID NO：42 或 51 中的任一核苷酸序列或其简并序列，或与 SEQ ID NO：42 或 51 中的任一核苷酸序列具有至少 80%同一性。

优选的，编码抗白蛋白抗体或其抗原结合片段中 CDR-H2 的核苷酸序列包含 SEQ ID NO：43、52-54 中的任一核苷酸序列或其简并序列，或与 SEQ ID NO：43、52-54 中的任一核苷酸序列具有至少 80%同一性。

优选的，编码抗白蛋白抗体或其抗原结合片段中 CDR-H3 的核苷酸序列包含 SEQ ID NO：44 或 55 中的任一核苷酸序列或其简并序列，或与 SEQ ID NO：44 或 55 中的任一核苷酸序列具有至少 80%同一性。

优选的，编码抗 VEGFA 抗体或其抗原结合片段中 CDR-H1 的核苷酸序列包含 SEQ ID NO：59 中的任一核苷酸序列或其简并序列，或与 SEQ ID NO：59 中的任一核苷酸序列具有至少 80%同一性。

优选的，编码抗 VEGFA 抗体或其抗原结合片段中 CDR-H2 的核苷酸序列包含 SEQ ID NO：60 中的任一核苷酸序列或其简并序列，或与 SEQ ID NO：60 中的任一核苷酸序列具有至少 80%同一性。

优选的，编码抗 VEGFA 抗体或其抗原结合片段中 CDR-H3 的核苷酸序列包含 SEQ ID NO：61

中的任一核苷酸序列或其简并序列，或与 SEQ ID NO：61 中的任一核苷酸序列具有至少 80%同一性。

更优选的，所述编码抗 VEGFA 抗体或其抗原结合片段的核苷酸序列包含 SEQ ID NO：62-71 中的任一核苷酸序列或其简并序列，或与 SEQ ID NO：62-71 中的任一核苷酸序列具有至少 80%同一性，并具有编码抗 VEGFA 抗体或其抗原结合片段的功能的核苷酸序列。

更优选的，所述编码抗白蛋白抗体或其抗原结合片段的核苷酸序列包含 SEQ ID NO：45、47-50、56-58 中的任一核苷酸序列或其简并序列，或与 SEQ ID NO：45、47-50、56-58 中的任一核苷酸序列具有至少 80%同一性，并具有编码抗白蛋白抗体或其抗原结合片段的功能的核苷酸序列。

更优选的，所述编码上述融合构建体的核苷酸序列包含 SEQ ID NO：72-78 中的任一核苷酸序列或其简并序列，或与 SEQ ID NO：72-78 中的任一核苷酸序列具有至少 80%同一性，并具有编码上述融合构建体功能的核苷酸序列。

在一些实施方案中，所述核酸为 mRNA。可使用一种或多种修饰技术用于产生更稳定的 mRNA。已知的 mRNA 修饰技术大致可分为三类：用人工合成的非天然核糖核酸代替天然核糖核酸合成 mRNA；添加 5'caps、3'poly (A)"尾"和 UTR（未翻译区）序列；采用特殊的新型配方技术，有效保护 mRNA。其中，优选的 mRNA 修饰技术可以通过人工合成非天然核糖核酸取代天然核糖核酸合成 mRNA。真核 mRNA 上的化学修饰大致可以分为三类：甲基化、伪尿苷(Ψ)和次黄嘌呤。例如，所述化学修饰可选自：假尿苷、N1 -甲基假尿苷、N1 -乙基假尿苷、2-硫代尿苷、4'-硫代尿苷、5-甲基胞嘧啶、2-硫代-1-甲基-1-脱氮-假尿苷、2-硫代-1-甲基-假尿苷、2-硫代-5-氮杂-尿苷、2-硫代-二氢假尿苷、2-硫代-二氢尿苷、2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-假尿苷、4-硫代-1-甲基-假尿苷、4-硫代-假尿苷、5-氮杂-尿苷、二氢假尿苷、5-甲基尿苷、5-甲氧基尿苷和 2'-O-甲基尿苷。

本发明的第三方面，提供了一种载体，所述的载体包含上述的核酸。

所述的载体能够在体内或体外或离体条件下表达。优选的，所述的载体为原核表达载体、病毒表达载体或真核表达载体等重组载体。

例如，可以使用病毒表达载体。所述病毒表达载体可包含病毒衍生的 DNA 或 RNA 序列，用于包装成病毒(例如逆转录病毒、复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒、复制缺陷型腺病毒、和腺相关病毒 AAV)。所述病毒和病毒表达载体可用于体外、离体和/或体内递送。例如，所述重组载体可包含在递送载体中。在某些实施方案中，所述递送载体包含本申请所述的抗体或抗原结合片段、本申请所述的核酸、和/或本申请所述的重组载体，以及任选地包含脂质体和/或脂质纳米颗粒 (LNP)。例如，可以通过物理递送方法将递送载体引入细胞。物理方法的例子包括显微注射、电穿孔和流体动力学递送。例如，LNPs 可以将本申请所述的核酸包裹在阳离子脂质颗粒(例如脂质体)中，并且可以相对容易地递送至细胞。

本发明的第四方面，提供了一种宿主细胞，所述的宿主细胞包含上述的核酸或上述的载体。

所述的宿主细胞可以为真核细胞或原核细胞。

真核细胞包括动植物细胞、真菌等，例如 T 细胞、酵母细胞、HEK293 细胞或 CHO 细胞等等。

原核细胞例如大肠杆菌等。

本发明的第五方面，提供了一种包含上述核酸或上述载体的宿主细胞的制备方法，所述的制备方法包括将上述核酸或载体导入宿主细胞。

本发明的第六方面，提供了一种上述的融合构建体的制备方法，所述的制备方法包括培养上述的宿主细胞，表达所述的融合构建体。

本发明的第七方面，提供了一种治疗和/或诊断疾病的产品，所述的治疗和/或诊断疾病的产品包含下列任一种：

A）上述的融合构建体；

B）上述的核酸；

C）上述的载体；或，

D）上述的宿主细胞。

优选的，所述的抗 VEGFA 抗体或其抗原结合片段具有治疗和/或诊断疾病的活性。

优选的，所述的产品可以是诊断试剂盒或药物或诊断芯片等。

所述的疾病为与 VEGFA 信号通路相关的疾病。进一步优选可以为肿瘤、血管异常增生、眼科涉及血管新生的疾病（例如眼底血管病）等等。

优选的，所述的融合构建体阻断 VEGFA 介导的血管内皮细胞增殖或抑制血管新生。

本发明的第八方面，提供了一种 VEGFA 的检测方法，所述的检测方法包括将待检样品与上述的融合构建体接触，然后检测 VEGFA 与上述的融合构建体形成的复合物含量。

所述的检测方法为检测 VEGFA 的存在或含量。其中，所述的存在表示有无，所述的含量可以为表达

量或蛋白浓度等。

优选的，所述的 VEGFA 来自哺乳动物，更为优选的，所述的哺乳动物来自人、鼠或者猴。

本发明的第九方面，提供了一种阻断 VEGFA 介导的血管内皮细胞增殖或抑制血管新生的方法，所述的方法包括将血管内皮细胞与上述的融合构建体、上述的核酸、上述的载体、上述的宿主细胞或上述的治疗和/或诊断疾病的产品接触。

优选的，所述的方法包括用血管内皮细胞的无血清培养基稀释上述的融合构建体、上述的核酸、上述的载体、上述的宿主细胞或上述的治疗和/或诊断疾病的产品，然后与抗原（例如 VEGFA165）孵育。

优选的，孵育后包含弃去培养板中血管内皮细胞完全培养基的步骤。

优选的，将抗原以及上述的融合构建体、上述的核酸、上述的载体、上述的宿主细胞或上述的治疗和/或诊断疾病的产品与血管内皮细胞混合，加入到血管内皮细胞培养板中，在培养板上培养。

优选的，培养后进行检测。

优选的，所述的孵育时间为 0.5-5h，例如 0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5h。

优选的，所述的孵育温度为室温-45℃，优选 30-40℃，例如 25、30、35、36、37、38、39、40、45℃等。

优选的，所述的培养温度为室温-45℃，优选 30-40℃，例如 25、30、35、36、37、38、39、40、45℃等。优选的，所述的培养在 5% CO_2 的培养箱中进行。

优选的，所述的培养时间为 24-120h，优选 48-96h，例如 24、36、48、68、72、96、120h 等。

优选的，所述的检测为检测活的血管内皮细胞细胞数。

本发明的第十方面，提供了一种治疗和/或预防疾病的方法，所述的方法包括向个体施加上述的融合构建体、上述的核酸、上述的载体、上述的宿主细胞、上述的治疗和/或诊断疾病的产品。

所述的疾病包括与 VEGFA 信号通路相关的疾病。进一步优选可以为肿瘤、血管异常增生、眼科涉及血管新生的疾病（例如眼底血管病）等等。

优选的，所述的靶细胞选自表达 VEGFA 的细胞，例如心肌细胞、近端肾小管细胞、肝细胞、血管内皮细胞、颗粒细胞、特化的上皮细胞、间充质细胞、巨噬细胞、血小板、树突状细胞、活化的 T 细胞、视网膜色素上皮细胞、视网膜中的 Muller 细胞、星形胶质细胞、成骨细胞、支气管与肺泡上皮细胞、周细胞、血管平滑肌细胞、肌成纤维细胞、角质形成细胞、肾系膜细胞或肿瘤细胞等等。

本发明的第十一方面，上述的融合构建体、上述的核酸、上述的载体或上述的宿主细胞在制备治疗和/或预防疾病的产品中的应用，所述的抗 VEGFA 抗体或其抗原结合片段具有治疗和/或诊断疾病的活性。

所述的疾病包括与 VEGFA 信号通路相关的疾病。进一步优选可以为肿瘤、血管异常增生、眼科涉及血管新生的疾病（例如眼底血管病）等等。

优选的，所述的产品包括阻断 VEGFA 介导的血管内皮细胞增殖或抑制血管新生的产品。

本申请所述的产品可以为试剂盒或药物或芯片或抗体药物偶联物等。

本文使用的“融合构建体”定义了本发明的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段与另外的化合物的融合。所述的融合构建体可以包含一个或多个抗白蛋白抗体或其抗原结合片段，所述的多个抗白蛋白抗体或其抗原结合片段可以相同或不同。所述的融合构建体可以包含一个或多个另外的化合物，所述的多个另外的化合物也可以相同或不同。所述的化合物可以是蛋白质化合物或非蛋白质化合物。在化合物是蛋白质化合物或者融合构建体仅包含多个抗白蛋白抗体或其抗原结合片段的情况下，融合构建体也可以称为融合蛋白。在化合物是以偶联形式与抗白蛋白抗体或其抗原结合片段融合情况下，融合构建体也可以称为偶联物。

本发明所述的“药物”可以用于治疗人或非人动物，例如非人哺乳动物。所述的药物可以包含现有技术常见的药学上可接受的载体、辅料或盐。所述的药物可以采用任何合适的给药途径，例如胃肠道给药（例如口服）或非胃肠道给药（例如，静脉内、肌内、皮下、皮内、器官内、鼻内、眼内、滴注、脑内、鞘内、透皮、直肠内等）途径。所述的药物可以为任何合适的剂型，例如经胃肠道给药剂型或非经胃肠道给药剂型，优选包括但不限于片剂、丸剂、粉剂、颗粒剂、胶囊剂、锭剂、糖浆剂、液体、乳剂、微乳剂、混悬剂、注射剂、喷雾剂、气雾剂、粉雾剂、洗剂、软膏剂、硬膏剂、糊剂、贴剂、滴眼剂、滴鼻剂、舌下片剂、栓剂、气雾剂、泡腾片、滴丸剂、凝胶剂等等。所述的药物的各种剂型可以按照药学领域的常规生产方法制备。

所述的药物可以含有重量比为 0.01-99.5%（具体如，0.01%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、99.5%）的所述的融合构建体、所述的核酸、所述的载体、所述的宿主细胞等等。所述的药物可以制备为蛋白浓度为 1-300mg/mL（例如 1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、

230、240、250、260、270、280、290、300mg/mL）的试剂。

所述的药物的单次给药剂量可以为 0.1-1000mg，例如 0.1、0.2、0.5、0.75、1、1.25、1.5、1.75、2、2.25、2.5、3、5、10、20、50、80、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000mg。

本发明所述的“药学上可接受的”是指既不显著刺激生物体也不抑制所施用的产品的活性物质的生物学活性及特性。

本发明所述的“...方法”可以为疾病的诊断和治疗目的，也可以为非疾病的诊断和治疗目的。

本发明所述的“抗原结合片段”是保留抗体的特定结合活性的抗体的一部分，即抗体的任何部分能够与抗体的靶分子上的表位特异结合。它包括例如 Fab，Fab'，F（ab'）2、Fv、Fd 和这些片段的变体。例如，抗体的重链和/或轻链，抗体的重链可变区和/或轻链可变区，或来自抗体的重链或轻链的单个或 2 个以上 CDR。其中，

纳米抗体或单域抗体是指抗体重链的可变区（variable domain of heavy chain，VHH），具有独立的抗原结合活性。

嵌合抗体是指其中重链和/或轻链的一部分源自特定来源或物种,而重链及/或轻链的其余部分源自不同来源或物种的抗体。

单链抗体，是由抗体重链可变区和轻链可变区通过连接肽（linker）连接而成的抗体。

Fab，即由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的单价片段。

Fab'，是在 CH1 结构域的 C 端具有一个或多个半胱氨酸残基的 Fab 片段。

F(ab')2，即包含由铰链区的二硫键连接的两个 Fab 片段的二价片段。

Fd，由 VH 和 CH1 结构域组成的 Fd 片段。

Fv，由抗体单臂的 VL 和 VH 结构域组成的 Fv 片段。

dAb 片段，是由 VH 结构域组成的抗体片段。

本发明所述的“线性抗体”包括一对或多对串联的抗体片段，所述抗体片段可以是 Fd 区段（VH-CH1）、单链抗体（scFv）、抗体片段（Fab）、或单域抗体（VHH），这些片段通过连接肽串联在一起，以形成连续的抗体结构。

其中，VH 代表重链可变区，VL 代表轻链可变区，CL 代表轻链恒定区，CH 代表重链恒定区。

本发明所述的“Fc”区含有包含抗体的 CH2 和 CH3 结构域的两个重链片段。两个重链片段由铰链区的两个或多个二硫键形成二聚体并通过 CH3 结构域的疏水作用保持在一起。

本发明所述的“包含”或“包括”为开放式写法，当用于描述蛋白质或核酸的序列时，所述蛋白质或核酸可以是由所述序列组成，或者在所述蛋白质或核酸的一端或两端可以具有额外的氨基酸或核苷酸，但仍然具有与原序列相同或相似的活性。

本发明所述的“同源性”或“同一性”，是指在使用蛋白序列或核苷酸序列的方面，本领域技术人员可以根据实际工作需要对序列进行调整，使使用序列与现有技术获得的序列相比，具有（包括但不限于）1%，2%，3%，4%，5%，6%，7%，8%，9%，10%，11%，12%，13%，14%，15%，16%，17%，18%，19%，20%，21%，22%，23%，24%，25%，26%，27%，28%，29%，30%，31%，32%，33%，34%，35%，36%，37%，38%，39%，40%，41%，42%，43%，44%，45%，46%，47%，48%，49%，50%，51%，52%，53%，54%，55%，56%，57%，58%，59%，60%，70%，80%，81%，82%，83%，84%，85%，86%，87%，88%，89%，90%，91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%，99%，99.1%，99.2%，99.3%，99.4%，99.5%，99.6%，99.7%，99.8%，99.9%的同源性/同一性。

本发明所述的“人源化抗体” 指抗体的框架区和/或恒定区部分（例如 CH 区）或抗体的全部或部分由人类抗体基因所编码。在本发明的一个具体实施方式中，抗体的 CDR 区未经过人源化改造。

本发明所述的“个体”可以为人或非人哺乳动物，所述的非人哺乳动物可以为野生动物、动物园动物、经济动物、宠物、实验动物等等。优选的，所述的非人哺乳动物包括但不限于猪、牛、羊、马、驴、狐、貉、貂、骆驼、狗、猫、兔、鼠（例如大鼠、小鼠、豚鼠、仓鼠、沙鼠、龙猫、松鼠）或猴等等。

本发明所述的“治疗”表示在疾病已开始发展后减缓、中断、阻止、控制、停止、减轻、或逆转一种体征、症状、失调、病症、或疾病的进展或严重性，但不一定涉及所有疾病相关体征、症状、病症、或失调的完全消除。

本发明所述的“预防”表示为了阻止或延迟疾病或病症或症状在机体内的发生而实施的方式。

本发明所述的“诊断”是指以查明患者过去、诊断时或将来是否患有疾病或病症，或者是查明疾病的进展或将来可能的进展。

本发明所述的“肿瘤”可以是任何不良的细胞增殖(或本身表现为不良细胞增殖的任何疾病)、赘生

物，或不良细胞增殖、赘生物或肿瘤的倾向性或风险增加。其可以是良性或恶性的，也可以是原发性或继发性(转移性)。赘生物可以是细胞的任何异常生长或增殖，并且可以位于任何组织中。组织的实例包括肾上腺、肾上腺髓质、肛门、阑尾、膀胱、血液、骨、骨髓、脑、乳腺、盲肠、中枢神经系统(包括或排除大脑)、小脑、子宫颈、结肠、十二指肠、子宫内膜、上皮细胞(例如肾上皮细胞)、胆囊、食道、神经胶质细胞、心脏、回肠、空肠、肾、泪腺、喉、肝、肺、淋巴、淋巴结、淋巴母细胞、上颌骨、纵隔、肠系膜、子宫肌层、鼻咽、网膜、口腔、卵巢、胰腺、腮腺、周围神经系统、腹膜、胸膜、前列腺、唾液腺、乙状结肠、皮肤、小肠、软组织、脾、胃、睾丸、胸腺、甲状腺、舌、扁桃体、气管、子宫、外阴、白细胞。进一步优选的，所述的肿瘤选自前列腺癌、乳腺癌、肝癌、胶质瘤（例如神经胶质瘤）、肠癌、宫颈癌、非小细胞肺癌、肺癌、胰腺癌、胃癌、膀胱癌、皮肤癌、横纹肌癌、舌鳞癌、鼻咽癌、卵巢癌、胎盘绒毛癌、淋巴瘤（例如非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、皮肤 T 细胞淋巴瘤）、白血病、直肠腺癌、成神经管细胞瘤、脑膜瘤、神经纤维瘤（例如神经纤维肉瘤）、室管膜瘤、神经鞘瘤、星形细胞瘤、黑色素瘤、间皮瘤、骨髓瘤、慢性粒细胞白血病、急性髓性白血病、骨髓增生异常综合征、慢性淋巴细胞白血病、表皮样癌、结肠癌、胸腺癌、血液癌、头颈癌或口咽癌。

本发明所述的“眼底血管病”指的是发生在视网膜动脉或静脉的疾病的总称，或与脉络膜血管新生相关疾病的总称。包括但不限于年龄相关性黄斑变性（AMD）、糖尿病性黄斑水肿（DME）、糖尿病性视网膜病变、视网膜中央静脉阻塞、病理性近视、新生血管性青光眼等等。

概括来说，本发明的有益技术效果包括：

1）本申请技术获得的抗 VEGFA 融合构建体，具有很强的 VEGFA 结合亲和力（经 SPR 测试，K_D=2.4-5.4 pM），远高于现有的 VEGFA 抗体类药物，能与 VEGFR2 竞争结合 VEGFA。

2）融合构建体能抑制 VEGFA 刺激的 HUVEC 增殖，其 IC50 值与受体类药物阿柏西普相近。在 VEGFA 刺激的报告基因细胞中，融合构建体能抑制荧光素酶的表达和荧光素发光。在 HUVEC 细胞中，融合构建体能抑制 VEGFA 激活的 VEGFR2 磷酸化。

3）融合构建体中的各个结构域之间功能不相互影响，本发明的融合构建体将抗白蛋白抗体与抗 VEGFA 抗体连接，依然具有较强的人白蛋白结合亲和力（经 SPR 测试，K_D=35-69 nM）及 VEGFA 结合亲和力（经 SPR 测试，K_D=2.4-5.4 pM）。

4）在体内，融合构建体有潜力能抑制 VEGFA 刺激的血管增生，并通过与白蛋白结合，被白蛋白携带进入特定的有白蛋白富集的组织微环境中，潜在提高融合构建体被递送到特定组织的选择性。而且，由于融合构建体结合白蛋白后分子量增加，还能参与白蛋白与 FcRn 的结合和循环利用机制来延长半衰期，因此，抗 VEGFA 抗体与抗白蛋白抗体的融合构建体在体内有潜力实现长效作用。

附图说明

以下，结合附图来详细说明本发明的实施例，其中：

图 1：带 His 标签的抗体 Alb Nb 和抗体 3005 经 Ni 柱纯化后的考染胶图，（A）为抗体 Alb Nb 的考染胶图，（B）为抗体 3005 的考染胶图，抗体 Alb Nb 瞬转后细胞培养基上清标记为 Input，不能结合 Ni 柱的流穿液标注为 FT，与 Ni 柱结合并被洗脱的抗体 Alb Nb 标注为 E，Marker 标注为 M。

图 2：抗体 3005-Fc 和 Alb Nb-Fc 结合不同物种白蛋白的 ELISA 测试，（A）为 HSA 结合测试，（B）为 MSA 结合测试，（C）为大鼠白蛋白结合测试。

图 3：带 His 标签的 3005 人源化抗体经 Ni 柱纯化后的考染胶图。

图 4：抗体 3005 及其人源化抗体结合 MSA 的 ELISA 结合活性测试。

图 5：抗体 3005 及其人源化抗体 3005Hz6 和对照抗体 Alb Nb 结合 HSA 和大鼠白蛋白的 ELISA 结合活性测试，（A）为 HSA 结合测试，（B）为大鼠白蛋白结合测试。

图 6：人源化抗体 3005Hz6 与 HSA 和 MSA 的结合和解离曲线（SPR 方法），（A）为抗体 3005Hz6 与 HSA 的结合和解离曲线，（B）为抗体 3005Hz6 与 MSA 的结合和解离曲线。

图 7：人源化抗体 3005Hz6 突变体蛋白 3005Hz6 (EG)、3005Hz6 (DS)和 3005Hz6 (DA)纯化后的 SDS-PAGE 考染胶图，（A）为 3005Hz6 (EG)、3005Hz6 (DS)的 SDS-PAGE 考染胶图，瞬转表达 3005Hz6 (EG)、3005Hz6 (DS)的细胞培养基上清标注为 Input，不能结合 Ni 柱的流穿液标注为 FT，洗脱的纯化产物标注为 E，（B）为 3005Hz6 (DA)的 SDS-PAGE 考染胶图。

图 8：人源化抗体 3005Hz6 及其突变体蛋白 3005Hz6 (DA)、3005Hz6 (DS)和 3005Hz6 (EG)结合 HSA 的 ELISA 活性检测。

图 9：融合构建体 V1SA-3005Hz6、3005Hz6-V1SA 以及 V1DP-3005Hz6 经 Ni 柱纯化后的 SDS-PAGE 胶图，（A）为 V1SA-3005Hz6、3005Hz6-V1SA 的 SDS-PAGE 考染胶图，（B）为 V1DP-3005Hz6 的 SDS-PAGE 考染胶图，其中各个蛋白的瞬转后细胞培养基上清标注为 Input，不能结合 Ni 柱的流穿液标注为 FT，以及洗脱的纯化产物标注为 E。

图 10：人源化抗体 3005Hz6 与单价抗 VEGFA 纳米抗体的融合构建体、人源化抗体 3005Hz6 结合 HSA 的 ELISA 活性检测。

图 11：融合构建体和单价纳米抗体 V1-SA1 的 VEGFR2 竞争 ELISA 活性测试。

图 12：人源化抗体 3005Hz6 与二价抗 VEGFA 纳米抗体的融合构建体纯化后的 SDS-PAGE 图，（A）为 V1SA-3005Hz6-V1SA 和 3005Hz6-2V1SA 考染胶图，其中流穿液标注为 FT，V1SA-3005Hz6-V1SA 的洗脱产物标注为 A1、A2 组分， 3005Hz6-2V1SA 的洗脱产物标注为 A5、A6 组分，（B）为无标签的 3005Hz6-2V1SA 蛋白产物考染胶图，（C）为 V1DP-3005Hz6-V1DP 考染胶图，（D）为 3005Hz6-2V1DP 考染胶图。

图 13：融合构建体 V1SA-3005Hz6-V1SA、3005Hz6-2V1SA 和 3005Hz6-2V1DP 结合 HSA 的 ELISA 测试。

图 14：用 SPR 方法测试蛋白与 HSA 的亲和力，其中图（A）为融合构建体 V1SA-3005Hz6-V1SA 与 HSA 的结合和解离曲线，图（B）为融合构建体 3005Hz6-2V1SA 与 HSA 的结合和解离曲线，图（C）为抗体 3005Hz6 与 HSA 的结合和解离曲线。

图 15：用 SPR 方法测试蛋白与 VEGFA 的亲和力，其中图（A）为 V1SA-3005Hz6-V1SA 与 VEGFA 的结合和解离曲线，图（B）为 3005Hz6-2V1SA 与 VEGFA 的结合和解离曲线，图（C）为阳性对照 aflibercept 与 VEGFA 的结合和解离曲线。

图 16：融合构建体抑制 VEGFA 诱导的 HUVEC 增殖实验，其中图（A）为 V1SA-3005Hz6-V1SA、V1SA-3005Hz6-V1SA 与 HSA 的预混物（V1SA-3005Hz6-V1SA＋HSA）的测试结果，图（B）为 3005Hz6-2V1SA、3005Hz6-2V1SA 与 HSA 的预混物（3005Hz6-2V1SA＋HSA）的测试结果。

图 17：融合构建体抑制 VEGFA 诱导的报告基因细胞实验，其中图（A）为 V1SA-3005Hz6-V1SA 和 V1SA-3005Hz6-V1SA＋HSA 的测试结果，图（B）为 3005Hz6-2V1SA 和 3005Hz6-2V1SA＋HSA 的测试结果。

具体实施方式

下面将结合本发明实施例中的附图，对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例仅是本发明的部分实施例，而不是全部。基于本发明中的实施例，本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都属于本发明保护的范围。

实施例 1 羊驼免疫和抗体库构建

1、羊驼免疫和效价检测

将人血清白蛋白 HSA（购自：Sigma-Aldrich，货号：A3782）乳化后免疫羊驼。每次免疫 1mg 人血清白蛋白，每 2 周免疫一次，共免疫羊驼三次，从第二次免疫开始，免疫一周后取血清检测效价。

血清效价检测方法为：

1) HSA 抗原用 CBS 缓冲液稀释到 1 μg/mL，取 100 μL/孔加入到酶标板中，4 ℃过夜；

2) PBST（含 0.1%Tween20 的 PBS，pH=7.4）洗板 3 次。每孔加入 200 μL 的脱脂奶粉，室温放置 1 h，PBST 洗板 3 次；

3) 加样：将免疫后的血清以及阴性血清分别稀释 1000 倍、3000 倍、9000 倍、27000 倍、81000 倍、243000 倍，分别取 100 μL 加入到封闭好的孔中，室温放置 1h，PBST 洗板 3 次；

4) 二抗：每孔加入 100 μL 带有 HRP 标记的 Goat Anti-Alpaca IgG，室温放置 1h，PBST 洗板 3 次；

5) TMB 显色：在酶标板中加入 TMB 显色液 100 μL/孔，显色 15 min；加入终止液 50 μL/孔，将酶标板放进酶标仪，读取 450 nm 处的光吸收值（OD450）。

第二次和第三次羊驼免疫后的血清效价检测见表 1，可见血清稀释 243000 倍后，结合人血清白蛋白的

信号值在 0.59 以上，均达到文库构建标准，将第三次免疫后的羊驼外周血进行噬菌体文库构建。

表 1 第二次和第三次白蛋白羊驼免疫后的血清效价检测

抗原包被	人血清白蛋白 HSA（1 μg/mL）			
	OD450			
血清稀释倍数	第二次免疫后血清	阴性血清	第三次免疫后血清	阴性血清
1000	2.1439	0.0734	2.3233	0.0945
3000	1.9308	0.0553	2.3931	0.054
9000	1.5265	0.0541	2.1041	0.0526
27000	1.3957	0.0442	1.8906	0.0502
81000	1.029	0.0404	1.4248	0.0407
243000	0.592	0.035	0.8564	0.035
空白孔	0.0418	0.0538	0.0073	0.0538

2、噬菌体文库构建

抽取羊驼外周血，使用 Trizol 从分离好的羊驼 PBMC 中提取 total RNA，并进行 cDNA 的反转录，采用纳米抗体特异性引物扩增可变区 VH 片段（长度约 700bp），扩增两次。用 SfiI 酶对上述所得片段以及 pcomb3X 载体进行酶切，酶切后按适当比例混合用 T4 连接酶连接。连接后，用于电转化 XL1-Blue 感受态细胞。根据感受态细胞的稀释液在含抗性平板上的菌落生长情况，计算羊驼的转化库容量为 6.24×10^{8}。

实施例 2 抗体库筛选获得交叉结合人、小鼠、食蟹猴白蛋白的抗体

1、噬菌体文库筛选

筛选流程为：

1) 包被抗原人血清白蛋白 HSA 以及小鼠白蛋白 MSA（购自：Sigma-Aldrich，货号：A3559），同时设置阴性对照（用 3%脱脂奶粉包被酶标板），在室温下孵育 1 小时。丢弃封闭缓冲液并用 PBST 清洗。

2) 加入约 5×10^{12} pfu 文库于抗原板，在 37 ℃下与抗原温育 2 小时，用 0.1% PBST 洗板。

3) 用低 pH 的甘氨酸-HCl 进行洗脱，然后用 Tris-HCl 中和直至 pH 为 7.4。

4) 将洗脱液与大肠杆菌 XL1-Blue 混合，在 37 ℃下孵育并摇动。

5) 加入噬菌体后，在 30 ℃下培养过夜，收集上清液。

6) 重复 1）-5）可得到第二轮文库。

7) 对于包被 MSA 条件下获得的第二轮扩增文库，进行抗原结合 ELISA 测试。ELISA 实验中采用 CBS buffer 分别包被 HSA 和 MSA，ELISA 检测结果如表 2。可知，该富集条件下也获得了较强的能结合 HSA 和 MSA 的噬菌体。

表 2 包被 MSA 条件下富集获得的第二轮噬菌体文库结合 HSA 和 MSA 的检测结果

文库富集方式	扩增文库稀释倍数	OD450（包被 5μg/mL HSA）	OD450（包被 5μg/mL MSA）	OD450（包被 3%奶粉）
MSA 包被富集	10	1.9721	1.7435	0.0826

总结：包被 MSA 富集得到的第二轮噬菌体文库的抗原结合 ELISA 显示与 HSA 及 MSA 结合均为阳性，表明富集到了结合 HSA 及 MSA 的噬菌体，可开展噬菌体单克隆水平的结合筛选。

2、噬菌体单克隆筛选和测序

实验流程为：

1) 从包被 MSA 富集到的第二轮噬菌体文库选择了 96 个单克隆菌落用于噬菌体表达，分别包被 HSA、MSA、猴白蛋白用于 ELISA 结合活性检测。

2) 包被抗原 HSA、MSA、猴白蛋白，包被时蛋白浓度为 0.5 μg/mL，4℃ 包被过夜。

3) 封闭：3%奶粉，200 μL/孔，室温 1 小时。

4) 加入 10 倍稀释后的噬菌体表达上清，100 μL/孔，室温 1 小时。

5) 添加检测抗体 Anti-M13 Antibody（HRP 标记）（浓度为 0.2μg/mL），100 μL/孔，室温 1 小时。

6) 加入 TMB 显色液 200μL/孔，显色 20 分钟，加入终止液 50μL/孔。酶标仪检测 OD450。

从包被 MSA 富集到的第二轮噬菌体文库的 96 个噬菌体克隆中，选择克隆编号为 3005，ELISA 检测结果见表 3。

表 3 噬菌体单克隆 3005 结合 HSA、MSA 和猴白蛋白活性检测

噬菌体克隆编号	OD450			
	包被 MSA 0.5μg/mL	包被 HSA 0.5μg/mL	包被猴白蛋白 0.5μg/mL	包被 3%奶粉对照
3005	2.9804	4.3634	2.7835	0.0556

7）经 DNA 测序和密码子翻译后，获得候选纳米抗体的氨基酸序列。其中，优选的抗白蛋白纳米抗体 3005 的 CDR 区（CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3）氨基酸序列见表 4，CDR 区核酸序列见表 5，抗体重链可变区（VH）氨基酸序列见表 6，核酸序列见表 7。

表 4 抗白蛋白纳米抗体 3005 的 CDR 区氨基酸序列

抗体编号	SEQ ID NO	CDR-H1	SEQ ID NO	CDR-H2	SEQ ID NO	CDR-H3
3005	1	NYYMS	2	GISVDGSFLDYADAVKG	3	ASGPQGLRLGAP

表 5 编码抗白蛋白纳米抗体 3005 的 CDR 区的核酸序列

抗体编号	SEQ ID NO	CDR-H1	SEQ ID NO	CDR-H2	SEQ ID NO	CDR-H3
3005	42	AACTATTACATGAGT	43	GGTATTAGTGTTGATGGTAGTTTCCTTGACTATGCAGACGCCGTGAAGGGC	44	GCCTCTGGGCCCCAGGGACTACGCCTTGGGGCCCCC

表 6 抗白蛋白纳米抗体 3005 氨基酸序列

SEQ ID NO	抗体编号	抗体氨基酸序列
4	3005	QVQLVESGGGLAQPGGSLRLSCAASGFTFS**NYYMS**WARQAPGKGLEWVS**GISVDGSFLDADAVKG**RFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTALYYCAR**ASGPQGLRLGAP**RGQGTQVTVSS

表 7 抗白蛋白纳米抗体 3005 的核酸序列

SEQ ID NO	抗体编号	抗体的核酸序列
45	3005	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGCGCAGCCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAACTATTACATGAGTTGGGCTCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGACTCGAGTGGGTGTCCGGTATTAGTGTTGATGGTAGTTTCCTTGACTATGCAGACGCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCACTGTATTACTGTGCAAGAGCCTCTGGGCCCCAGGGACTACGCCTTGGGGCCCCCCGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

实施例 3 抗白蛋白候选抗体结合不同物种白蛋白的活性检测

1、抗白蛋白候选抗体的表达

将候选抗体，在哺乳动物细胞中表达，蛋白纯化后进行抗原结合活性测试，验证候选抗体在蛋白水平

结合白蛋白的活性。

通过基因合成，构建了带 His 标签抗体 3005 和阳性对照抗体 Alb Nb 的表达质粒，其中阳性对照 Alb Nb 抗体是抗人血清白蛋白的纳米抗体，抗体氨基酸序列来自专利 US 2007/0269422 A1 中的 SEQ ID NO: 62。

在上述抗体的 N 端增加 tPA 分泌信号肽：MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPS（SEQ ID NO：36），抗体 C 端添加连接子 GGGGS（SEQ ID NO：37）和 6xHis，基因序列通过酶切位点 NheI 和 XbaI 连入表达载体 pCDNA3.1（+）。质粒测序正确后，经无内毒素大量提取，开展悬浮 293F 细胞的瞬时表达并采用 Ni 柱进行亲和纯化。

带 His 标签的抗体 Alb Nb 和抗体 3005 经 Ni 柱纯化后，其 SDS-PAGE 染色结果见图 1（A）和图 1（B），其分子量符合预期（~15kDa）。在图 1（A）中，抗体 Alb Nb 瞬转后细胞培养基上清标记为 Input，不能结合 Ni 柱的流穿液标记为 FT，与 Ni 柱结合并被洗脱的抗体 Alb Nb 标记为 E。

同时，构建抗体 3005 和阳性对照抗体 Alb Nb 与 Fc 的融合蛋白，通过引物设计在抗体编码序列的 N 端增加 tPA 分泌信号肽：MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPS（SEQ ID NO：36）。通过同源重组法，在抗体序列的 C 端添加人 IgG1 Fc 的氨基酸序列：

IgG1 Fc 的氨基酸序列：
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK（SEQ ID NO：38）

将抗白蛋白纳米抗体-Fc 构建体基因片段插入到哺乳动物细胞表达载体 pCDNA3.1（+）中。抗白蛋白纳米抗体-Fc 融合蛋白的氨基酸序列见表 8，核酸序列见表 9。

表 8 抗白蛋白纳米抗体-Fc 融合蛋白的氨基酸序列

SEQ ID NO	抗体名称	抗体氨基酸序列
5	3005-Fc	QVQLVESGGGLAQPGGSLRLSCAASGFTFS**NYYMS**WARQAPGKGLEWVS **GISVDGSFLDYADAVKG**RFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTALYYCAR**A SGPQGLRLGAP**RGQGTQVTVSSPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

表 9 编码抗白蛋白纳米抗体-Fc 融合蛋白的核酸序列

SEQ ID NO	抗体名称	抗体核酸序列
46	3005-Fc	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGCGCAGCCTGGGGGG TCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAACTATTA CATGAGTTGGGCTCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGACTCGAGTGGGTGTC CGGTATTAGTGTTGATGGTAGTTTCCTTGACTATGCAGACGCCGTGAAGG GCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTGTATCTGCA AATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCACTGTATTACTGTGCAAG AGCCTCTGGGCCCCAGGGACTACGCCTTGGGGCCCCCCGGGGCCAGGG GACCCAGGTCACCGTCTCCTCACCTCCTTGTCCTGCCCCCGAGCTGCTG GGCGGACCTTCTGTGTTCCTGTTCCCTCCCAAGCCCAAGGACACCCTGA TGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCC ACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGATGGCGTGGAGG

		TGCACAATGCCAAGACAAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAATTCCACCT ACAGAGTGGTGAGCGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAATG GCAAGGAGTACAAGTGTAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCA TCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAGCCCCAGG TGTACACCCTGCCTCCTTCCAGGGACGAGCTGACAAAGAACCAGGTGA GCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGA GTGGGAGTCCAATGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACAACACCCCC TGTGCTGGATAGCGACGGCTCCTTCTTCCTGTACTCCAAGCTGACAGTG GACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCTCCGTGATG CACGAGGCCCTGCACAATCACTACACACAGAAGAGCCTGAGCCTGAGC CCCGGCAAG

Fc 融合蛋白的表达质粒测序正确后，进行无内毒素大量提取，开展悬浮 293F 细胞的瞬时表达和 Protein A 亲和纯化获得目标蛋白。

2、抗白蛋白候选抗体结合白蛋白的活性检测

采用生物膜干涉技术（Bio-Layer Interferometry，BLI）方法测试单价纳米抗体结合不同种属白蛋白的亲和力。采用 8 根 NTA sensor 结合同一个 his tag 的单价纳米抗体（浓度为 1 μg/mL），抗原分别为人血清白蛋白 HSA（Baxter AG）、小鼠白蛋白 MSA（购自：Equitech-bio，货号：MSA62-1000）和大鼠白蛋白 Rat albumin（购自：abcam，货号：ab198656）。BLI 实验中抗原的浓度梯度设置为 200、100、50、25、12.5、6.25、3.125nM，抗原和抗体结合 180 秒，解离 360 秒。

表 10 展示了经“1：1”模型拟合后，带 his 标签的单价纳米抗体 3005 结合不同物种白蛋白的结合速率（ka），解离速率（kd）和平衡解离常数（K_D）。

表 10 纳米抗体 3005 结合不同物种白蛋白的结合速率（ka），解离速率（kd）和平衡解离常数（K_D）

抗体名称	抗原	K_D (M)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	Full R^2
3005	人血清白蛋白 HSA	4.05E-09	1.87E+05	7.57E-04	0.9983
	小鼠白蛋白 MSA	5.78E-09	2.71E+05	1.57E-03	0.9858
	大鼠白蛋白 Rat albumin	5.32E-09	1.55E+05	8.26E-04	0.9982

数据表明，3005 能以高亲和力结合 HSA 和 MSA，还能结合大鼠白蛋白。

采用 ELISA 方法再次检测 3005 结合不同种属白蛋白的活性，实验方法是：

用 ELISA 包被缓冲液稀释抗原，人血清白蛋白 HSA（Baxter AG）的终浓度为 1 μg/mL，小鼠白蛋白 MSA（购自：Equitech-bio，货号：MSA62-1000）的终浓度为 2 μg/mL，大鼠白蛋白（购自：abcam，货号：ab198656）的终浓度为 2μg/mL。将抗原稀释液加入酶标板中，100μL/孔，4 ℃包被过夜。经 5%脱脂奶粉封闭后，用 PBST（含 0.1% Tween20 的 PBS，pH=7.4）加入候选抗体 3005-Fc，以及阳性对照抗体 Alb Nb-Fc 的梯度稀释液（0.0001，0.001，0.01，0.1，1，10，100nM），37℃孵育 1 小时，洗板后加入 HRP 标记的山羊抗人 IgG Fc 抗体（购自：Abbkine，货号：A21050），室温孵育 45 分钟。洗板后，每孔加入 100μL TMB（购自：天根生化，货号：PA107-01），37 ℃显色 15 分钟后，加入终止液 50μL。用酶标仪测定在 450nm 处的吸光度（OD450）。

抗体 3005-Fc、Alb Nb-Fc 结合不同物种白蛋白的 ELISA 测试结果如图 2 所示，结合 ELISA 实验的 EC50 汇总见表 11。

表 11 抗体 3005-Fc 和阳性对照 Alb Nb-Fc 结合不同物种白蛋白的 ELISA 实验 EC50 汇总

蛋白	结合 HSA EC50 (nM)	结合 MSA EC50 (nM)	结合大鼠白蛋白 EC50 (nM)
3005-Fc	0.24	0.23	0.40
Alb Nb-Fc	0.19	0.27	弱结合

结果显示抗体 3005-Fc 能高效结合 HSA 和 MSA，结合活性与阳性对照 Alb Nb-Fc 类似。阳性对照抗体 Alb Nb-Fc 结合大鼠白蛋白活性很弱，但是抗体 3005-Fc 有较好的大鼠血清白蛋白结合活性。

实施例 4 抗白蛋白候选抗体的人源化改造

1、候选抗体人源化改造和表达纯化

通过抗体的 CDR 区移植，进行人源化改造。以候选纳米抗体 3005（SEQ ID NO：4）作为起始抗体，进行抗体的人源化改造。先通过抗体数据库 IGBLAST 和 IMGT，比对候选抗体 3005 序列与人源抗体序列的同源性，再将同源性高的人抗体框架区序列与候选抗体 3005 的 3 个 CDR 区序列（SEQ ID NO：1，SEQ ID NO：2 和 SEQ ID NO：3）进行组合，构建人源化抗体。

在抗体的 N 端增加分泌信号肽，抗体 C 端添加连接子 GGGGS（SEQ ID NO：37）和 6xHis，通过基因合成获得编码 DNA 序列，再通过酶切位点 NheI 和 XbaI 连入表达载体 pCDNA3.1（+）。质粒测序正确并经无内毒素大量提取，在悬浮 293F 细胞中进行瞬时表达并采用 Ni 柱进行亲和纯化。

纳米抗体 3005 的人源化改造抗体的氨基酸序列见表 12，核酸序列见表 13。

表 12　3005 人源化改造纳米抗体的氨基酸序列

SEQ ID NO	抗体名称	抗体氨基酸序列
6	3005Hz3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWVRQAPGKGLEW VSGISVDGSFLDYADAVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYC ARASGPQGLRLGAPRGQGTLVTVSS
7	3005Hz4	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPGKGLEWV SGISVDGSFLDYADAVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RASGPQGLRLGAPRGQGTQVTVSS
8	3005Hz5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPGKGLEWV SGISVDGSFLDYADAVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRPEDTAVYYCA RASGPQGLRLGAPRGQGTLVTVSS
9	3005Hz6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWARQAPGKGLEW VSGISVDGSFLDYADAVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRPEDTAVYYC ARASGPQGLRLGAPRGQGTLVTVSS

表 13　编码 3005 人源化改造纳米抗体的核酸序列

SEQ ID NO	抗体名称	抗体核酸序列
47	3005Hz3	GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGGAG GATCTCTGCGGCTGAGCTGTGCTGCTTCTGGCTTTACCTTCAGCAACT ACTATATGAGCTGGGTCAGACAGGCCCCTGGCAAAGGCCTGGAATGG GTGTCCGGCATCAGCGTGGACGGCAGCTTCCTGGACTACGCCGATGC CGTGAAGGGCAGATTCACAATCAGCAGAGATAATGCCAAGAACACC CTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGCCCCGAGGACACCGCCGTGTA CTACTGCGCCAGAGCCTCTGGACCTCAGGGCCTCCGGCTGGGCGCCC CAAGAGGCCAGGGCACACTGGTGACCGTGTCCAGC
48	3005Hz4	CAAGTGCAGCTGGTTGAGAGCGGCGGAGGCCTGGTGAAACCTGGAG GATCTCTGAGACTGTCTTGTGCTGCTTCTGGCTTTACATTCAGCAACT ACTATATGAGCTGGATCAGACAGGCCCCAGGCAAGGGCCTGGAATGG GTCAGCGGCATCAGCGTGGACGGCAGCTTCCTGGACTACGCCGATGC CGTGAAGGGCAGATTCACAATCAGCAGAGATAATGCCAAGAACTCCC TGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTA

		CTACTGCGCCAGAGCCAGCGGACCTCAGGGCCTCCGGCTGGGCGCC CCCAGAGGCCAGGGCACCCAGGTGACCGTGTCCAGC
49	3005Hz5	GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGAGGACTGGTCCAGCCCGGC GGAAGCCTGCGGCTCTCTTGTGCTGCTTCTGGCTTTACCTTCAGCAA CTACTATATGAGCTGGATCAGACAGGCCCCTGGCAAAGGCCTGGAAT GGGTGTCCGGCATCAGCGTGGACGGCAGCTTCCTGGACTACGCCGAT GCCGTGAAGGGCAGATTCACAATCAGCAGAGACAATGCCAAGAACA GCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGCCTGAGGACACCGCCGT GTACTACTGCGCCAGAGCCAGCGGACCTCAAGGCCTGAGACTGGGC GCCCCAAGAGGCCAGGGCACCCTGGTGACAGTGTCCAGC
50	3005Hz6	GAAGTGCAGCTGGTCGAGAGCGGCGGAGGACTGGTGCAACCTGGCG GCAGCCTCAGACTGAGCTGTGCTGCTTCTGGCTTCACCTTCAGCAAC TACTATATGAGCTGGGCCAGACAGGCCCCAGGCAAAGGCCTGGAATG GGTTTCCGGCATCAGCGTGGACGGCTCTTTTCTGGACTACGCCGATG CCGTGAAGGGCAGATTCACAATCTCTCGGGATAATGCCAAGAACAGC CTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGACCTGAGGACACCGCCGTGTA CTACTGCGCCCGGGCCAGCGGCCCCCAGGGCCTGCGGCTGGGAGCC CCTAGAGGCCAGGGTACACTGGTGACCGTGTCCAGC

带 His 标签的人源化蛋白经 Ni 柱纯化后，经 SDS-PAGE 电泳分离，分子量符合预期（~13kDa），考染结果见图 3。

2、人源化抗体的结合活性检测

本实施例采用 ELISA 方法检测原始候选抗体 3005 与人源化改造后的抗体结合小鼠白蛋白 MSA 的活性。

实验中，包被小鼠白蛋白 MSA（包被的蛋白浓度为 5 μg/mL）于酶标板中，100 μL/孔，4 ℃包被过夜。经 5%脱脂奶粉封闭后，用 PBST（含 0.1% Tween20 的 PBS，pH=7.4）配置待测的带 His 标签蛋白的稀释液（0.0001，0.001，0.01，0.1，1，10，100nM），待测蛋白为原始抗体 3005 以及四个经人源化改造的抗体。蛋白稀释液加入酶标板中后，37 ℃孵育 1 小时，洗板后加入 HRP 标记的小鼠抗 His 标签单克隆抗体（购自：Proteintech，货号：HRP-66005），室温孵育 45 分钟。洗板后，每孔加入 100μL TMB（购自：天根生化，货号：PA107-01），37 ℃显色 15 分钟后，加入终止液 50 μL。用酶标仪测定在 450nm 处的吸光度（OD450）。

抗体 3005 及其人源化抗体结合 MSA 的 ELISA 测试结果如图 4 所示。结合 ELISA 实验的 EC50 汇总见表 14。

表 14 抗体 3005 及其人源化抗体结合 MSA 的 ELISA 实验 EC50 和最大结合值汇总

抗体	结合 MSA EC50（nM）	最大结合值 OD450
3005	2.3	1.38
3005Hz3	22.0	0.89
3005Hz4	49.8	0.79
3005Hz5	31.6	0.80
3005Hz6	2.9	1.34

结果显示人源化抗体 3005Hz6 结合 MSA 的活性与原始抗体 3005 近似。其他人源化抗体结合 MSA 的活性差于 3005Hz6。

采用 ELISA 方法检测原始候选抗体 3005 与人源化后的 3005Hz6 结合 HSA 和大鼠白蛋白（Rat albumin）的活性。

实验中，包被 HSA 或大鼠白蛋白（包被的蛋白浓度为 2 μg/mL）于酶标板中，100 μL/孔，4 ℃包被过夜。经 5%脱脂奶粉封闭后，用 PBST（含 0.1% Tween20 的 PBS，pH=7.4）配置待测的带 His 标签蛋白的稀释液（0.0001，0.001，0.01，0.1，0.3，1，10，100 nM），待测蛋白为阳性对照抗体 Alb Nb，以及原始抗

体 3005、人源化抗体 3005Hz6。蛋白稀释液加入酶标板中后，37 ℃孵育 1 小时，洗板后加入 HRP 标记的小鼠抗 His 标签单克隆抗体（购自：Proteintech，货号：HRP-66005），室温孵育 45 分钟。洗板后，每孔加入 100 μL TMB（购自：天根生化，货号：PA107-01），37 ℃显色 15 分钟后，加入终止液 50 μL。用酶标仪测定在 450nm 处的吸光度（OD450）。

ELISA 结果见图 5（A）和图 5（B）。图 5 的结合 ELISA 曲线拟合的 EC50 值见表 15。

表 15 抗体 3005 及其人源化抗体 3005Hz6 结合 HSA 和大鼠白蛋白的 EC50 汇总

抗体名称	结合 HSA 的 EC50 (nM)	结合大鼠白蛋白的 EC50 (nM)
3005	0.31	2.74
3005Hz6	0.26	1.64
Alb Nb	0.66	弱结合

从图 5 和表 15 中可知，人源化抗体 3005Hz6 结合 HSA 和大鼠白蛋白的活性与原始抗体 3005 相当，均强于阳性对照抗体 Alb Nb。

采用表面等离子共振（Surface Plasmon Resonance, SPR）方法检测人源化抗体 3005Hz6 结合 HSA 和 MSA 的结合速率（ka）、解离速率（kd）和平衡解离常数（K_D）。实验中采用 Biacore 8K 仪器（Cytiva），利用 Series S Sensor Chip NTA 分别捕获 His 标签的人源化抗体 3005Hz6，分析物为梯度浓度的 HSA 或 MSA，用流动相缓冲液（成分为：10 mM HEPES，150 mM NaCl，0.05% v/v Tween-20，pH=7.4）稀释分析物。结合时间为 150 秒，解离时间为 900 秒。抗体 3005Hz6 与 HSA 的结合和解离曲线如图 6（A）所示，抗体 3005Hz6 与 MSA 的结合和解离曲线如图 6（B）所示。采用“Two state reaction”模型拟合 3005Hz6 结合 HSA 和 MSA 结合速率（ka）、解离速率（kd）和平衡解离常数（K_D），结果见表 16。

表 16 人源化抗体 3005Hz6 与 HSA 和 MSA 的结合速率（ka）、解离速率（kd）和平衡解离常数（K_D）

配体	分析物	ka1 (1/Ms)	kd1 (1/s)	ka2 (1/s)	kd2 (1/s)	K_D (M)
3005Hz6	HSA	9.04E+04	1.56E-03	3.67E-04	8.08E-04	1.19E-08
3005Hz6	MSA	7.57E+04	1.51E-02	5.01E-03	3.02E-04	1.14E-08

从表 16 可知，人源化抗体 3005Hz6 结合 HSA 和 MSA 的亲和力近似，采用 SPR 方法测定的 K_D 约为 11 nM。

结合实施例 3 的表 10 中，采用 BLI 方法测定原始抗体 3005 与 HSA 和 MSA 的 K_D 值约为 5 nM，数值与表 16 中的 K_D 相差为 3 倍以内，因此认为人源化抗体 3005Hz6 结合 HSA 和 MSA 的亲和力与原始抗体 3005 近似。

实施例 5 人源化抗体 3005Hz6 的风险位点改造及其活性测试

1、人源化抗体 3005Hz6 的风险位点突变及其表达纯化

通过对于 3005Hz6 抗体序列分析，其 CDR-H2 区（SEQ ID NO：2）含有易使天冬氨酸 D 异构化的氨基酸基序 DG，因此对 3005Hz6 的 CDR-H2 区的 DG 氨基酸基序进行改造，分别突变为 DA、DS 或 EG，以降低蛋白发生结构和活性变化的风险。改造后的抗体名称及其 CDR 区氨基酸序列见表 17，核酸序列见表 18，抗体重链可变区（VH）氨基酸序列见表 19，核酸序列见表 20。

表 17 人源化抗体 3005Hz6 突变体的 CDR 区氨基酸序列

抗体名称	SEQ ID NO	CDR-H1	SEQ ID NO	CDR-H2	SEQ ID NO	CDR-H3
3005Hz6 (DA)	1	NYYMS	10	GISV**DA**SFLDYADAVKG	3	ASGPQGLRLGAP
3005Hz6 (DS)	1	NYYMS	11	GISV**DS**SFLDYADAVKG	3	ASGPQGLRLGAP

3005Hz6 (EG)	1	NYYMS	12	GISV**EG**SFLDYADAVKG	3	ASGPQGLRLGAP

表 18 编码人源化抗体 3005Hz6 突变体 CDR 区的核酸序列

抗体名称	SEQ ID NO	CDR-H1	SEQ ID NO	CDR-H2	SEQ ID NO	CDR-H3
3005Hz6 (DA)	51	AACTACTATATGAGC	52	GGCATCAGCGTGGACGCTAGCTTTCTGGACTACGCCGATGCCGTGAAGGGC	55	GCTTCCGGTCCTCAGGGCCTGCGGCTGGGAGCTCCC
3005Hz6 (DS)	51	AACTACTATATGAGC	53	GGCATCAGCGTGGACTCTAGCTTTCTGGACTACGCCGATGCCGTGAAGGGC	55	GCTTCCGGTCCTCAGGGCCTGCGGCTGGGAGCTCCC
3005Hz6 (EG)	51	AACTACTATATGAGC	54	GGCATCAGCGTGGAGGGCAGCTTTCTGGACTACGCCGATGCCGTGAAGGGC	55	GCTTCCGGTCCTCAGGGCCTGCGGCTGGGAGCTCCC

表 19 人源化纳米抗体 3005Hz6 突变体的氨基酸序列

SEQ ID NO	抗体名称	3005Hz6 突变体的氨基酸序列
13	3005Hz6 (DA)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWARQAPGKGLEWVSGISVDASFLDYADAVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRPEDTAVYYCARASGPQGLRLGAPRGQGTLVTVSS
14	3005Hz6 (DS)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWARQAPGKGLEWVSGISVDSSFLDYADAVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRPEDTAVYYCARASGPQGLRLGAPRGQGTLVTVSS
15	3005Hz6 (EG)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWARQAPGKGLEWVSGISVEGSFLDYADAVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRPEDTAVYYCARASGPQGLRLGAPRGQGTLVTVSS

表 20 编码人源化纳米抗体 3005Hz6 突变体的核酸序列

SEQ ID NO	抗体名称	3005Hz6 突变体的核酸序列
56	3005Hz6 (DA)	GAAGTGCAGCTGGTCGAGAGCGGTGGAGGACTGGTGCAACCTGGCGGAAGCCTCAGACTGAGCTGTGCTGCCTCTGGCTTCACCTTCAGCAACTACTATATGAGCTGGGCCAGACAGGCCCCAGGCAAAGGCCTGGAATGGGTTTCCGGCATCAGCGTGGACGCTAGCTTTCTGGACTACGCCGATGCCGTGAAGGGCAGATTCACAATCTCTCGGGATAATGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGACCTGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCAAGGGCTTCCGGTCCTCAGGGCCTGCGGCTGGGAGCTCCCAGAGGTCAGGGTACACTGGTGACCGTGTCCAGC
57	3005Hz6 (DS)	GAAGTGCAGCTGGTCGAGAGCGGTGGAGGACTGGTGCAACCTGGCGGAAGCCTCAGACTGAGCTGTGCTGCCTCTGGCTTCACCTTCAGCAACTACTATATGAGCTGGGCCAGACAGGCCCCAGGCAAAGGCCTGGAATGGGTTTCCGGCATCAGCGTGGACTCTAGCTTTCTGGACTACGCCGATGCCGTG

		AAGGGCAGATTCACAATCTCTCGGGATAATGCCAAGAACAGCCTGTAC CTGCAGATGAACAGCCTGAGACCTGAGGACACCGCCGTGTACTACTGC GCAAGGGCTTCCGGTCCTCAGGGCCTGCGGCTGGGAGCTCCCAGAGG TCAGGGTACACTGGTGACCGTGTCCAGC
58	3005Hz6 (EG)	GAAGTGCAGCTGGTCGAGAGCGGTGGAGGACTGGTGCAACCTGGCGG AAGCCTCAGACTGAGCTGTGCTGCCTCTGGCTTCACCTTCAGCAACTA CTATATGAGCTGGGCCAGACAGGCCCCAGGCAAAGGCCTGGAATGGGT TTCCGGCATCAGCGTGGAGGGCAGCTTTCTGGACTACGCCGATGCCGT GAAGGGCAGATTCACAATCTCTCGGGATAATGCCAAGAACAGCCTGTA CCTGCAGATGAACAGCCTGAGACCTGAGGACACCGCCGTGTACTACTG CGCAAGGGCTTCCGGTCCTCAGGGCCTGCGGCTGGGAGCTCCCAGAG GTCAGGGTACACTGGTGACCGTGTCCAGC

在抗体 3005Hz6 突变体的 N 端添加分泌信号肽，抗体 C 端添加连接子 GGGGS（SEQ ID NO：37）和 6xHis，通过基因合成获得编码 DNA 序列（见表 20），再通过酶切位点 NheI 和 XhoI 连入表达载体 pCDNA3.1（+）。质粒测序正确并经无内毒素大量提取，利用悬浮 293F 细胞进行瞬时表达，收获细胞培养上清进行 Ni 柱亲和纯化，纯化产物的 SDS-PAGE 结果见图 7（A），其中，瞬转表达 3005Hz6 (EG)、3005Hz6 (DS)的细胞培养基上清标注为 Input，不能结合 Ni 柱的流穿液标注为 FT，洗脱的纯化产物标注为 E。瞬转表达 3005Hz6 (DA)蛋白的细胞上清经 Ni 柱纯化后，再经阳离子交换纯化，纯化后蛋白的 SDS-PAGE 结果见图 7（B）。三个突变体蛋白的分子量为 13kDa。

2、人源化抗体 3005Hz6 突变体的活性测试

对人源化抗体 3005Hz6 突变体蛋白 3005Hz6 (DA)、3005Hz6 (DS)和 3005Hz6 (EG)开展 HSA 结合活性的 ELISA 检测。ELISA 实验中，包被 2 μg/mL HSA，加入浓度梯度的 3005Hz6 或其突变体，通过 HRP 标记的小鼠抗 His 标签单克隆抗体（购自：Proteintech，货号：HRP-66005），检测结合 HSA 的抗体水平。ELISA 实验结果见图 8，ELISA 实验的 EC50 见表 21。

表 21 人源化抗体 3005Hz6 突变体蛋白 3005Hz6 (DA)、3005Hz6 (DS)和 3005Hz6 (EG)结合 HSA 的 EC50 汇总

抗体名称	结合 HSA 的 EC50 (nM)
3005Hz6	0.35
3005Hz6 (DA)	0.44
3005Hz6 (DS)	0.28
3005Hz6 (EG)	0.40

从表 21 可知，人源化抗体 3005Hz6 及其突变体蛋白具有近似的 HSA 结合活性。

实施例 6 单价抗 VEGFA 纳米抗体与人源化抗白蛋白抗体的融合构建体

1、单价抗 VEGFA 纳米抗体与人源化抗白蛋白抗体 3005Hz6 的融合构建体设计

以抗 VEGFA 纳米抗体为效应分子，构建抗 VEGFA 抗体与抗白蛋白抗体 3005Hz6 的融合构建体。

本实施例中抗 VEGFA 纳米抗体的筛选技术方案可参考申请号为 PCT/CN2023/118600 的专利，简要概括为：

本实施例采用的抗 VEGFA 纳米抗体序列筛选自人 VEGFA 免疫羊驼库，其噬菌体文库的构建和筛选流程如下：将人 VEGFA165（无标签，购自：义翘神州，货号：HPLC-10008-HNAH，以下简称 VEGFA）乳化后免疫羊驼并构建噬菌体展示文库，经 4 轮富集筛选后，挑取 1 板 96 孔的单克隆，检测噬菌体与 VEGFA 的结合活性。有 VEGFA 结合活性的噬菌体，经质粒测序和密码子翻译后，获得候选纳米抗体的氨基酸序列，其中优选的抗 VEGFA 纳米抗体 V1 的 CDR 区氨基酸序列见表 22，核酸序列见表 23。纳米抗体 V1 及其 9 种人源化抗体的氨基酸序列见表 24，核酸序列见表 25。

表 22 抗 VEGFA 纳米抗体 V1 的 CDR 区氨基酸序列

抗 VEGFA 纳米抗体名称	SEQ ID NO	CDR-H1	SEQ ID NO	CDR-H2	SEQ ID NO	CDR-H3
V1	16	SYTMG	17	AISKGGYKYDSVSLEA	18	TRAYGSSRLRLADTYEY

表 23 编码抗 VEGFA 纳米抗体 V1 的 CDR 区的核酸序列

抗 VEGFA 纳米抗体名称	SEQ ID NO	CDR-H1	SEQ ID NO	CDR-H2	SEQ ID NO	CDR-H3
V1	59	TCATATACC ATGGGT	60	GCAATCTCCAAAGGA GGCTATAAGTATGATT CCGTTTCCCTCGAGG CC	61	ACGAGAGCATACGGC TCGTCTAGGCTGAGG CTCGCCGACACCTAT GAGTAT

表 24 抗 VEGFA 纳米抗体 V1 及其人源化抗体的氨基酸序列

SEQ ID NO	人源化抗 VEGFA 纳米抗体名称	抗 VEGFA 纳米抗体氨基酸序列
19	V1	QLQLVESGGGSVQPGGSLRLSCEVSGRTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVVAIS KGGYKYDSVSLEARFTISKDNTKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAATRAYGS SRLRLADTYEYWGQGTQVTVSS
20	V1-SA1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGRTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVVAIS KGGYKYDSVSLEARFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAATRAYGS SRLRLADTYEYWGQGTLVTVSS
21	V1-DP	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGRTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVVAIS KGGYKYDSVSLEARFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAATRAYGSS RLRLADTYEYWGQGTLVTVSS
22	V1-com-78	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVVAIS KGGYKYDSVSLEARFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAATRAYGS SRLRLADTYEYWGQGTLVTVSS
23	V1-com-87	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVVAIS KGGYKYDSVSLEARFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAATRAYGSS RLRLADTYEYWGQGTLVTVSS
24	V1-2m	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVVAIS KGGYKYDSVSLEARFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAATRAYGSS RLRLADTYEYWGQGTLVTVSS
25	V1-3m	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVVAIS KGGYKYDSVSLEARFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAATRAYGS SRLRLADTYEYWGQGTLVTVSS
26	V1-com-74-78-97	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVVAIS KGGYKYDSVSLEARFTISRDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCASTRAYGS SRLRLADTYEYWGQGTLVTVSS
27	V1-4m	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVVAIS KGGYKYDSVSLEARFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCASTRAYGS SRLRLADTYEYWGQGTLVTVSS

28	V1-SA3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVVAIS KGGYKYDSVSLEARFTISRDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAATRAYGS SRLRLADTYEYWGQGTLVTVSS

表 25 编码抗 VEGFA 纳米抗体 V1 及其人源化抗体的核酸序列

SEQ ID NO	人源化抗 VEGFA 纳米抗体名称	抗 VEGFA 纳米抗体的核酸序列
62	V1	CAGTTGCAGCTCGTGGAGTCGGGTGGAGGCTCGGTGCAACCTGGGGGGT CTCTGAGACTCTCCTGTGAGGTCTCTGGAAGAACCTTCTCCTCATATACCA TGGGTTGGTTCCGCCAGGCCCCAGGGAAGGAGCGTGAGTTCGTGGTGGC AATCTCCAAAGGAGGCTATAAGTATGATTCCGTTTCCCTCGAGGCCCGATT CACCATCTCCAAAGACAACACCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACA GCCTGAAACCTGAGGACACAGCCGTTTATTACTGTGCAGCAACGAGAGCA TACGGCTCGTCTAGGCTGAGGCTCGCCGACACCTATGAGTATTGGGGCCAG GGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
63	V1-SA1	GAAGTGCAACTGGTCGAAAGCGGCGGAGGCCTGGTGCAGCCCGGAGGAA GCCTGAGACTGTCCTGCGCCGTCAGCGGCAGAACATTCAGCAGCTATACA ATGGGCTGGTTTAGACAAGCCCCTGGCAAGGAGAGAGAGTTCGTGGTCGC CATTTCTAAGGGCGGCTACAAGTACGACAGCGTGTCCCTGGAGGCTAGATT CACAATTAGCAGAGACAACGCCAAAAACACAGTGTATCTGCAGATGAATA GCCTCAGACCTGAGGACACAGCCGTGTATTACTGCGCCGCCACAAGGGCC TACGGAAGCAGCAGACTCAGACTGGCCGACACATACGAGTACTGGGGAC AAGGCACCCTCGTCACCGTGAGCAGT
64	V1-DP	GAAGTGCAGCTGGTCGAGAGCGGCGGAGGCCTGGTGCAGCCCGGCGGAT CTCTGCGGCTGTCTTGTGCCGTGTCTGGCAGAACCTTCAGCAGCTACACC ATGGGCTGGTTTAGACAGGCCCCTGGCAAGGAAAGAGAGTTCGTGGTGGC CATCAGCAAGGGCGGATATAAGTACGACAGCGTGTCCCTGGAGGCCAGAT TCACCATCAGCCGGGACAATAGCAAAAACACCGTGTACCTGCAGATGAAC AGCCTGCGGCCTGAAGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCGCTACAAGAGC CTACGGCAGCAGCAGACTGCGCCTGGCCGACACATACGAGTACTGGGGCC AGGGCACACTGGTGACCGTGTCCTCC
65	V1-com-78	GAAGTGCAGCTGGTCGAGAGCGGCGGAGGCCTGGTGCAGCCCGGCGGAT CTCTGCGGCTGTCTTGTGCCGCCTCTGGCAGAACCTTCAGCAGCTACACC ATGGGCTGGTTTAGACAGGCCCCTGGCAAGGAAAGAGAGTTCGTGGTGGC CATCAGCAAGGGCGGATATAAGTACGACAGCGTGTCCCTGGAGGCCAGAT TCACCATCAGCCGGGACAATTCCAAAAACACCGTGTACCTGCAGATGAAC AGCCTGCGGGCTGAAGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCGCTACAAGAGC CTACGGCAGCAGCAGACTGCGCCTGGCCGACACATACGAGTACTGGGGCC AGGGCACACTGGTGACCGTGTCCTCC
66	V1-com-87	GAAGTGCAGCTGGTCGAGAGCGGCGGAGGCCTGGTGCAGCCCGGCGGAT CTCTGCGGCTGTCTTGTGCCGCCTCTGGCAGAACCTTCAGCAGCTACACC ATGGGCTGGTTTAGACAGGCCCCTGGCAAGGAAAGAGAGTTCGTGGTGGC CATCAGCAAGGGCGGATATAAGTACGACAGCGTGTCCCTGGAGGCCAGAT TCACCATCAGCCGGGACAATAGCAAAAACACCCTGTACCTGCAGATGAAC AGCCTGCGGCCTGAAGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCGCTACAAGAGC

		CTACGGCAGCAGCAGACTGCGCCTGGCCGACACATACGAGTACTGGGGCC AGGGCACACTGGTGACCGTGTCCTCC
67	V1-2m	GAAGTGCAGCTGGTCGAGAGCGGCGGAGGCCTGGTGCAGCCCGGCGGAT CTCTGCGGCTGTCTTGTGCCGCCTCTGGCAGAACCTTCAGCAGCTACACC ATGGGCTGGTTTAGACAGGCCCCTGGCAAGGAAAGAGAGTTCGTGGTGGC CATCAGCAAGGGCGGATATAAGTACGACAGCGTGTCCCTGGAGGCCAGAT TCACCATCAGCCGGGACAATTCCAAAAACACCGTGTACCTGCAGATGAAC AGCCTGCGGCCTGAAGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCGCTACAAGAGC CTACGGCAGCAGCAGACTGCGCCTGGCCGACACATACGAGTACTGGGGCC AGGGCACACTGGTGACCGTGTCCTCC
68	V1-3m	GAAGTGCAGCTGGTCGAGAGCGGCGGAGGCCTGGTGCAGCCCGGCGGAT CTCTGCGGCTGTCTTGTGCCGCCTCTGGCAGAACCTTCAGCAGCTACACC ATGGGCTGGTTTAGACAGGCCCCTGGCAAGGAAAGAGAGTTCGTGGTGGC CATCAGCAAGGGCGGATATAAGTACGACAGCGTGTCCCTGGAGGCCAGAT TCACCATCAGCCGGGACAATGCCAAAAACACCGTGTACCTGCAGATGAAC AGCCTGCGGCCTGAAGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCGCTACAAGAGC CTACGGCAGCAGCAGACTGCGCCTGGCCGACACATACGAGTACTGGGGCC AGGGCACACTGGTGACCGTGTCCTCC
69	V1-com-74-78-97	GAAGTGCAGCTGGTCGAGAGCGGCGGAGGCCTGGTGCAGCCCGGCGGAT CTCTGCGGCTGTCTTGTGCCGCCTCTGGCAGAACCTTCAGCAGCTACACC ATGGGCTGGTTTAGACAGGCCCCTGGCAAGGAAAGAGAGTTCGTGGTGGC CATCAGCAAGGGCGGATATAAGTACGACAGCGTGTCCCTGGAGGCCAGAT TCACCATCAGCCGGGACAATGCCAAAAACACCGTGTACCTGCAGATGAAC AGCCTGCGGGCTGAAGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCTCTACAAGAGC CTACGGCAGCAGCAGACTGCGCCTGGCCGACACATACGAGTACTGGGGCC AGGGCACACTGGTGACCGTGTCCTCC
70	V1-4m	GAAGTGCAGCTGGTCGAGAGCGGCGGAGGCCTGGTGCAGCCCGGCGGAT CTCTGCGGCTGTCTTGTGCCGCCTCTGGCAGAACCTTCAGCAGCTACACC ATGGGCTGGTTTAGACAGGCCCCTGGCAAGGAAAGAGAGTTCGTGGTGGC CATCAGCAAGGGCGGATATAAGTACGACAGCGTGTCCCTGGAGGCCAGAT TCACCATCAGCCGGGACAATGCCAAAAACACCGTGTACCTGCAGATGAAC AGCCTGCGGCCTGAAGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCTCTACAAGAGC CTACGGCAGCAGCAGACTGCGCCTGGCCGACACATACGAGTACTGGGGCC AGGGCACACTGGTGACCGTGTCCTCC
71	V1-SA3	GAAGTGCAGCTGGTCGAGAGCGGCGGAGGCCTGGTGCAGCCCGGCGGAT CTCTGCGGCTGTCTTGTGCCGCCTCTGGCAGAACCTTCAGCAGCTACACC ATGGGCTGGTTTAGACAGGCCCCTGGCAAGGAAAGAGAGTTCGTGGTGGC CATCAGCAAGGGCGGATATAAGTACGACAGCGTGTCCCTGGAGGCCAGAT TCACCATCAGCCGGGACAATGCCAAAAACACCGTGTACCTGCAGATGAAC AGCCTGCGGGCTGAAGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCGCTACAAGAGC CTACGGCAGCAGCAGACTGCGCCTGGCCGACACATACGAGTACTGGGGCC AGGGCACACTGGTGACCGTGTCCTCC

热稳定性高的抗体更有利于抗体的生产和长期储存，因此比较了不同抗 VEGFA 纳米抗体的热稳定性 *Tm* 值（熔解温度，melting temperature）。针对抗 VEGFA 纳米抗体 V1 及其 9 种人源化抗体，采用 UNCLE 仪器（unchainedlabs）测定 *Tm* 值，结果见表 26。

表 26 抗 VEGFA 纳米抗体 V1 及其 9 种人源化抗体的热稳定性 *Tm* 值

抗 VEGFA 纳米抗体名称	*Tm*（℃）
V1-DP	72.4
V1-SA1	71.0
V1	67.0
V1-SA3	66.7
V1-3m	66.4
V1-2m	65.8
V1-com-78	64.5
V1-com-87	63.5
V1-com-74-78-97	60.6
V1-4m	59.4

从表 26 可见 V1-DP 和 V1-SA1 的 *Tm* 值较高，说明这两个抗体的热稳定性很可能优于其他人源化抗体。

选用熔解温度 *Tm* 值较高的人源化抗 VEGFA 纳米抗体：V1-SA1（SEQ ID NO：20）和 V1-DP（SEQ ID NO：21）与人源化抗白蛋白抗体 3005Hz6 进行融合构建体的设计，根据不同的串联顺序，以 GGS 作为连接子的融合构建体共设计了 3 种，氨基酸序列如表 27 所示，核酸序列见表 28。

表 27 人源化抗体 3005Hz6 与单价抗 VEGFA 纳米抗体的融合构建体氨基酸序列

SEQ ID NO	融合构建体名称	融合构建体氨基酸序列
29	V1SA-3005Hz6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGRTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVVAIS KGGYKYDSVSLEARFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAATRAYG SSRLRLADTYEYWGQGTLVTVSSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSNYYMSWARQAPGKGLEWVSGISVDGSFLDYADAVKGRFTISRDNA KNSLYLQMNSLRPEDTAVYYCARASGPQGLRLGAPRGQGTLVTVSS
30	3005Hz6-V1SA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWARQAPGKGLEWVSG ISVDGSFLDYADAVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRPEDTAVYYCARASGP QGLRLGAPRGQGTLVTVSSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGRTFS SYTMGWFRQAPGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLEARFTISRDNAKNTVYLQ MNSLRPEDTAVYYCAATRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTLVTVSS
31	V1DP-3005Hz6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGRTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVVAIS KGGYKYDSVSLEARFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAATRAYGS SRLRLADTYEYWGQGTLVTVSSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FTFSNYYMSWARQAPGKGLEWVSGISVDGSFLDYADAVKGRFTISRDNAK NSLYLQMNSLRPEDTAVYYCARASGPQGLRLGAPRGQGTLVTVSS

表 28 编码人源化抗体 3005Hz6 与单价抗 VEGFA 纳米抗体的融合构建体的核酸序列

SEQ ID NO	融合构建体名称	融合构建体的核酸序列
72	V1SA-3005Hz6	GAGGTGCAACTGGTGGAGTCCGGAGGTGGCCTGGTCCAGCCTGGCGGC AGCCTGAGACTCTCCTGCGCCGTGAGCGGCAGAACCTTCAGCAGCTAC ACCATGGGCTGGTTCAGACAAGCTCCAGGCAAAGAAAGGGAGTTCGTG GTGGCTATTAGCAAAGGCGGCTATAAGTACGATAGCGTGAGCCTGGAAG

		CTCGGTTCACCATTAGCAGAGATAACGCCAAGAACACCGTGTACCTGCA AATGAATAGCCTGAGACCTGAGGATACCGCCGTGTACTACTGTGCCGCC ACAAGAGCCTATGGCAGCTCCAGGCTCAGACTGGCTGATACCTACGAAT ATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACAGTCAGCAGCGGCGGATCCGAAG TGCAGCTGGTCGAGAGCGGCGGAGGACTGGTGCAACCTGGCGGCAGC CTCAGACTGAGCTGTGCTGCTTCTGGCTTCACCTTCAGCAACTACTATAT GAGCTGGGCCAGACAGGCCCCAGGCAAAGGCCTGGAATGGGTTTCCGG CATCAGCGTGGACGGCTCTTTTCTGGACTACGCCGATGCCGTGAAGGGC AGATTCACAATCTCTCGGGATAATGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGA TGAACAGCCTGAGACCTGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGGG CCAGCGGCCCCCAGGGCCTGCGGCTGGGAGCCCCTAGAGGCCAGGGTA CACTGGTGACCGTGTCCAGC
73	3005Hz6-V1SA	GAAGTGCAGCTGGTCGAGAGCGGCGGAGGACTGGTGCAACCTGGCGG CAGCCTCAGACTGAGCTGTGCTGCTTCTGGCTTCACCTTCAGCAACTAC TATATGAGCTGGGCCAGACAGGCCCCAGGCAAAGGCCTGGAATGGGTT TCCGGCATCAGCGTGGACGGCTCTTTTCTGGACTACGCCGATGCCGTGA AGGGCAGATTCACAATCTCTCGGGATAATGCCAAGAACAGCCTGTACCT GCAGATGAACAGCCTGAGACCTGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGC CCGGGCCAGCGGCCCCCAGGGCCTGCGGCTGGGAGCCCCTAGAGGCCA GGGTACACTGGTGACCGTGTCCAGCGGCGGATCCGAGGTGCAACTGGT GGAGTCCGGAGGTGGCCTGGTCCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTCTC CTGCGCCGTGAGCGGCAGAACCTTCAGCAGCTACACCATGGGCTGGTT CAGACAAGCTCCAGGCAAAGAAAGGGAGTTCGTGGTGGCTATTAGCAA AGGCGGCTATAAGTACGATAGCGTGAGCCTGGAAGCTCGGTTCACCATT AGCAGAGATAACGCCAAGAACACCGTGTACCTGCAAATGAATAGCCTG AGACCTGAGGATACCGCCGTGTACTACTGTGCCGCCACAAGAGCCTATG GCAGCTCCAGGCTCAGACTGGCTGATACCTACGAATATTGGGGCCAAGG CACCCTGGTGACAGTCAGCAGC
74	V1DP-3005Hz6	GAAGTTCAGTTGGTCGAATCAGGAGGAGGATTGGTTCAACCTGGTGGT TCTCTCAGATTGTCTTGCGCTGTGAGTGGCAGGACATTCAGCAGCTACA CTATGGGATGGTTTCGCCAGGCTCCAGGCAAGGAGAGAGAGTTTGTAGT CGCCATTTCTAAGGGGGGATACAAGTACGACTCTGTGAGCCTGGAGGCT AGGTTCACAATCAGCAGGGATAACTCTAAGAATACCGTCTACCTGCAGA TGAATAGCCTCAGACCTGAGGACACTGCCGTCTACTACTGCGCTGCCAC TCGGGCTTACGGTTCCAGCAGGCTTAGGCTGGCCGATACATATGAATACT GGGGCCAGGGCACCCTTGTTACAGTGAGCAGTGGCGGATCCGAAGTGC AGCTGGTCGAGAGCGGCGGAGGACTGGTGCAACCTGGCGGCAGCCTC AGACTGAGCTGTGCTGCTTCTGGCTTCACCTTCAGCAACTACTATATGA GCTGGGCCAGACAGGCCCCAGGCAAAGGCCTGGAATGGGTTTCCGGCA TCAGCGTGGACGGCTCTTTTCTGGACTACGCCGATGCCGTGAAGGGCA GATTCACAATCTCTCGGGATAATGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGAT GAACAGCCTGAGACCTGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGGGC CAGCGGCCCCCAGGGCCTGCGGCTGGGAGCCCCTAGAGGCCAGGGTAC ACTGGTGACCGTGTCCAGC

在融合构建体 N 端添加分泌信号肽，抗体 C 端添加连接子 GGGGS（SEQ ID NO：37）和 6xHis，通

过基因合成获得编码 DNA 序列（见表 28），再通过酶切位点 NheI 和 XhoI 连入表达载体 pCDNA3.1（+）。质粒测序正确并经无内毒素大量提取，利用悬浮 293F 细胞进行瞬时表达，收获细胞培养上清进行 Ni 柱亲和纯化。纯化产物的 SDS-PAGE 结果见图 9，其中各个蛋白的瞬转后细胞培养基上清标注为 Input，不能结合 Ni 柱的流穿液标注为 FT，以及洗脱的纯化产物标注为 E，目标蛋白分子量约为 28 kDa。

2、人源化抗体 3005Hz6 与单价抗 VEGFA 纳米抗体的融合构建体活性检测

本实施例检测构成融合构建体的两个纳米抗体元件是否维持原本的活性。

检测融合构建体中抗白蛋白纳米抗体 3005Hz6 结合 HSA 的活性。检测方法同实施例 4 中的“2、人源化抗体的活性检测”。ELISA 结果如图 10 所示，EC50 值见表 29。

表29 融合构建体或3005Hz6结合HSA的EC50汇总

融合构建体名称	结合HSA的EC50 (nM)
V1SA-3005Hz6	0.32
3005Hz6-V1SA	0.33
V1DP-3005Hz6	0.39
3005Hz6	0.25

从表 29 中可知，融合构建体结合 HSA 的活性与单独的 3005Hz6 近似，表明 3005Hz6 融合其他抗体片段并不影响 3005Hz6 与 HSA 的结合活性。而且，抗 VEGFA 抗体可以融合在抗白蛋白抗体的 N 或者 C 端，不同位置并不影响融合蛋白结合白蛋白的活性。

采用 VEGFR2 竞争 ELISA 方法，检测融合构建体中抗 VEGFA 纳米抗体的活性。并对比融合构建体与单独的 VEGFA 抗体的活性。

具体地，酶标板包被羊抗人 IgG Fc 蛋白（购自：Solarbio，货号：SPA105），包被浓度为 5μg/mL，4°C 过夜。用 PBST 洗板和奶粉封闭后，加入 VEGFR2 胞外区-人 IgG1 Fc 融合蛋白（VEGFR2-Fc，内部制备）。VEGFR2-Fc 的氨基酸序列为：

ASVGLPSVSLDLPRLSIQKDILTIKANTTLQITCRGQRDLDWLWPNNQSGSEQRVEVTECSDGLFCKT
LTIPKVIGNDTGAYKCFYRETDLASVIYVYVQDYRSPFIASVSDQHGVVYITENKNKTVVIPCLGSISNLN
VSLCARYPEKRFVPDGNRISWDSKKGFTIPSYMISYAGMVFCEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVL
SPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVT
RSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKPFVAFGSGMESLVEATVGERVRIPAKYLGYPPPEIKWYKN
GIPLESNHTIKAGHVLTIMEVSERDTGNYTVILTNPISKEKQSHVVSLVVYVPPQIGEKSLISPVDSYQYGT
TQTLTCTVYAIPPPHHIHWYWQLEEECANEPSQAVSVTNPYPCEEWRSVEDFQGGNKIEVNKNQFALIEG
KNKTVSTLVIQAANVSALYKCEAVNKVGRGERVISFHVTRGPEITLQPDMQPTEQESVSLWCTADRSTFE
NLTWYKLGPQPLPIHVGELPTPVCKNLDTLWKLNATMFSNSTNDILIMELKNASLQDQGDYVCLAQDRK
TKKRHCVVRQLTVLERVAPTITGNLENQTTSIGESIEVSCTASGNPPPQIMWFKDNETLVEDSGIVLKDGN
RNLTIRRVRKEDEGLYTCQACSVLGCAKVEAFFIIEGAQEKTNLEPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK（SEQ ID NO：39）

将浓度梯度的融合构建体，与恒定终浓度（0.4 nM）的带生物素修饰的 VEGFA165-Avi-His 孵育 1 小时。VEGFA165-Avi-His 为内部制备，是在人 VEGFA165 的 C 端添加连接子和 Avi 标签和 6xHis 标签，VEGFA165-Avi-His 表达质粒与 BirA 酶表达质粒共转染 293F 细胞，蛋白在表达过程中，经 BirA 酶催化，在 Avi 标签上进行生物素修饰。VEGFA165-Avi-His 的氨基酸序列为：

APMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGL
ECVPTEESNITMQIMRIKPHQGQHIGEMSFLQHNKCECRPKKDRARQENPCGPCSERRKHLFVQDPQTCK
CSCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRRGSGSGLNDIFEAQKIEWHEGGGGSHHHHHH（SEQ ID NO：

40）。

将融合构建体与 VEGFA165-Avi-His 的混合物加入到已捕获 VEGFR2-Fc 的酶标板中，37 °C 孵育 1 小时。用 HRP 标记的链霉亲和素抗体 Streptavidin-HRP（购自：生工生物，货号：D111054-0001）检测 VEGFA165-Avi-His 的生物素信号，室温孵育 45 分钟，洗板后，在酶标板中加入 TMB 显色液 100 μL/孔，显色 15 min；加入终止液 50 μL/孔，将酶标板放进酶标仪，读取 450 nm 处的光吸收值（OD450）。

融合构建体和单价纳米抗体 V1-SA1 的竞争 VEGFR2 的活性如图 11，VEGFR2 竞争实验的 IC50 汇总见表 30。

表30 融合构建体和单价纳米抗体V1-SA1竞争VEGFR2的IC50汇总

融合构建体名称	VEGFR2竞争ELISA IC50 (nM)	融合构建体的IC50与V1-SA1的IC50比值
V1SA-3005Hz6	0.84	1.08
3005Hz6-V1SA	0.75	0.96
V1DP-3005Hz6	0.63	0.81
V1-SA1	0.78	1.00
3005Hz6	N/A	N/A

从表 30 可知，3005Hz6 与 V1-SA1 或 V1-DP 串联而成的三个融合构建体的 VEGFR2 竞争活性，均与单价纳米抗体 V1-SA1 的活性近似（IC50 比值为 0.81-1.08），表明抗 VEGFA 抗体与 3005Hz6 融合后，不影响抗 VEGFA 的活性，而且，抗 VEGFA 抗体可以融合在抗白蛋白抗体的 N 或者 C 端，均不影响融合构建体中抗 VEGFA 抗体的活性。

综合表 29 和表 30 的数据说明，单价抗 VEGFA 纳米抗体（V1-SA1 或 V1-DP）和抗白蛋白纳米抗体（3005Hz6）的融合构建体，具有很强的竞争 VEGFR2，以及结合 HSA 的活性。说明在融合构建体中，结合不同抗原的抗体元件能独立发挥功能，抗体元件之间的相互干扰较小。因此，可以将结合其他抗原的抗体与抗白蛋白的人源化抗体 3005Hz6 融合表达，以构建多功能的融合构建体。

实施例 7 二价抗 VEGFA 纳米抗体与人源化抗白蛋白抗体的融合构建体

1、二价抗 VEGFA 纳米抗体与抗白蛋白纳米抗体融合构建体的设计

由于VEGFA在体内是同源二聚体，为提高纳米抗体结合VEGFA的效率，并提升纳米抗体阻断VEGFA/VEGFR互作的效率，抗VEGFA纳米抗体采用二价态形式，即串联两个序列相同的纳米抗体。为了增大二价抗VEGFA纳米抗体在体内的分子量，并通过结合白蛋白延长二价抗体的半衰期，将二价抗VEGFA纳米抗体与人源化抗白蛋白抗体3005Hz6融合表达。人源化抗体3005Hz6与二价抗VEGFA纳米抗体V1-SA1或V1-DP融合构建体的氨基酸序列见表31，核酸序列见表32。

表31 二价抗VEGFA纳米抗体与人源化抗白蛋白抗体3005Hz6的融合构建体氨基酸序列

SEQ ID NO	融合构建体名称	融合构建体氨基酸序列
32	V1SA-3005Hz6-V1SA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGRTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLEARFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAATRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTLVTVSSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWARQAPGKGLEWVSGISVDGSFLDYADAVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRPEDTAVYYCARASGPQGLRLGAPRGQGTLVTVSSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGRTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLEARFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAATRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTLVTVSS

33	3005Hz6-2V1SA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWARQAPGKGLEWVS GISVDGSFLDYADAVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRPEDTAVYYCARA SGPQGLRLGAPRGQGTLVTVSSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVS GRTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLEARFTISRDNAK NTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAATRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTLVTVS SGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGRTFSSYTMGWFRQAPGKERE FVVAISKGGYKYDSVSLEARFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCA ATRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTLVTVSS
34	V1DP-3005Hz6-V1DP	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGRTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVVA ISKGGYKYDSVSLEARFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAATRA YGSSRLRLADTYEYWGQGTLVTVSSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSNYYMSWARQAPGKGLEWVSGISVDGSFLDYADAVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRPEDTAVYYCARASGPQGLRLGAPRGQGTLVTVSS GGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGRTFSSYTMGWFRQAPGKEREF VVAISKGGYKYDSVSLEARFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAA TRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTLVTVSS
35	3005Hz6-2V1DP	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWARQAPGKGLEWVS GISVDGSFLDYADAVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRPEDTAVYYCARA SGPQGLRLGAPRGQGTLVTVSSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVS GRTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLEARFTISRDNSKN TVYLQMNSLRPEDTAVYYCAATRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTLVTVSS GGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGRTFSSYTMGWFRQAPGKEREF VVAISKGGYKYDSVSLEARFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAA TRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTLVTVSS

表32 编码二价抗VEGFA纳米抗体与人源化抗白蛋白抗体3005Hz6的融合构建体的核酸序列

SEQ ID NO	融合构建体名称	融合构建体的核酸序列
75	V1SA-3005Hz6-V1SA	GAAGTGCAACTGGTCGAAAGCGGCGGAGGCCTGGTGCAGCCCGGAGG AAGCCTGAGACTGTCCTGCGCCGTCAGCGGCAGAACATTCAGCAGCTA TACAATGGGCTGGTTTAGACAAGCCCCTGGCAAGGAGAGAGAGTTCGT GGTCGCCATTTCTAAGGGCGGCTACAAGTACGACAGCGTGTCCCTGGA GGCTAGATTCACAATTAGCAGAGACAACGCCAAAAACACAGTGTATCT GCAGATGAATAGCCTCAGACCTGAGGACACAGCCGTGTATTACTGCGC CGCCACAAGGGCCTACGGAAGCAGCAGACTCAGACTGGCCGACACATA CGAGTACTGGGGACAAGGCACCCTCGTCACCGTGAGCAGTGGCGGATC CGAAGTGCAGCTGGTCGAGAGCGGTGGAGGACTGGTGCAACCTGGCGG AAGCCTCAGACTGAGCTGTGCTGCCTCTGGCTTCACCTTCAGCAACTAC TATATGAGCTGGGCCAGACAGGCCCCAGGCAAAGGCCTGGAATGGGTT TCCGGCATCAGCGTGGACGGCAGCTTTCTGGACTACGCCGATGCCGTGA AGGGCAGATTCACAATCTCTCGGGATAATGCCAAGAACAGCCTGTACC TGCAGATGAACAGCCTGAGACCTGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCG CAAGGGCTTCCGGTCCTCAGGGCCTGCGGCTGGGAGCTCCCAGAGGTC AGGGTACACTGGTGACCGTGTCCAGCGGCGGAAGCGAGGTGCAACTGG TGGAGTCCGGAGGTGGCCTGGTCCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTCT CCTGCGCCGTGAGCGGCAGAACCTTCAGCAGCTACACCATGGGCTGGT

		TCAGACAAGCTCCAGGCAAAGAAAGGGAGTTCGTGGTGGCTATTAGCA AAGGCGGCTATAAGTACGATAGCGTGAGCCTGGAAGCTCGGTTCACCA TTAGCAGAGATAACGCCAAGAACACCGTGTACCTGCAAATGAATAGCC TGAGACCTGAGGATACCGCCGTGTACTACTGTGCCGCTACAAGAGCCT ATGGCAGCTCCAGGCTCAGACTGGCTGATACCTACGAATATTGGGGCC AAGGCACCCTGGTGACAGTCTCTAGC
76	3005Hz6-2V1SA	GAAGTGCAGCTGGTCGAGAGCGGTGGAGGACTGGTGCAACCTGGCGGA AGCCTCAGACTGAGCTGTGCTGCCTCTGGCTTCACCTTCAGCAACTACT ATATGAGCTGGGCCAGACAGGCCCCAGGCAAAGGCCTGGAATGGGTTT CCGGCATCAGCGTGGACGGCAGCTTTCTGGACTACGCCGATGCCGTGA AGGGCAGATTCACAATCTCTCGGGATAATGCCAAGAACAGCCTGTACC TGCAGATGAACAGCCTGAGACCTGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCG CAAGGGCTTCCGGTCCTCAGGGCCTGCGGCTGGGAGCTCCCAGAGGTC AGGGTACACTGGTGACCGTGTCCAGCGGCGGATCCGAAGTGCAACTGG TCGAAAGCGGCGGAGGCCTGGTGCAGCCCGGAGGAAGCCTGAGACTGT CCTGCGCCGTCAGCGGCAGAACATTCAGCAGCTATACAATGGGCTGGT TTAGACAAGCCCCTGGCAAGGAGAGAGAGTTCGTGGTCGCCATTTCTA AGGGCGGCTACAAGTACGACAGCGTGTCCCTGGAGGCTAGATTCACAA TTAGCAGAGACAACGCCAAAAACACAGTGTATCTGCAGATGAATAGCC TCAGACCTGAGGACACAGCCGTGTATTACTGCGCCGCCACAAGGGCCT ACGGAAGCAGCAGACTCAGACTGGCCGACACATACGAGTACTGGGGAC AAGGCACCCTCGTCACCGTGAGCAGTGGCGGAAGCGAGGTGCAACTGG TGGAGTCCGGAGGTGGCCTGGTCCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTCT CCTGCGCCGTGAGCGGCAGAACCTTCAGCAGCTACACCATGGGCTGGT TCAGACAAGCTCCAGGCAAAGAAAGGGAGTTCGTGGTGGCTATTAGCA AAGGCGGCTATAAGTACGATAGCGTGAGCCTGGAAGCTCGGTTCACCA TTAGCAGAGATAACGCCAAGAACACCGTGTACCTGCAAATGAATAGCC TGAGACCTGAGGATACCGCCGTGTACTACTGTGCCGCTACAAGAGCCT ATGGCAGCTCCAGGCTCAGACTGGCTGATACCTACGAATATTGGGGCC AAGGCACCCTGGTGACAGTCTCTAGC
77	V1DP-3005Hz6-V1DP	GAGGTCCAGCTGGTGGAGTCTGGTGGAGGTCTGGTGCAGCCTGGTGGC TCTCTGAGACTGAGCTGTGCTGTGAGTGGCAGAACCTTCTCCAGCTACA CCATGGGTTGGTTCAGGCAGGCTCCAGGTAAAGAGAGAGAGTTCGTGG TGGCCATCAGCAAGGGCGGTTACAAGTACGATAGCGTTTCTCTGGAAG CCAGATTCACCATTTCTCGCGACAACAGTAAGAACACTGTGTACCTGCA AATGAACAGTCTGAGGCCAGAAGATACTGCCGTGTACTACTGTGCAGC TACTCGGGCCTATGGCTCTAGCAGACTGAGACTGGCCGATACCTATGAG TACTGGGGCCAGGGTACACTCGTCACAGTGTCTTCTGGCGGTTCTGAAG TCCAGTTGGTCGAGAGCGGAGGTGGTCTCGTGCAACCAGGCGGTAGCT TGAGACTGTCTTGTGCTGCAAGCGGTTTCACCTTTAGCAACTACTACAT GTCTTGGGCAAGGCAAGCTCCAGGCAAGGGCTTGGAGTGGGTCAGCGG TATCTCCGTGGATGGAAGCTTTCTGGACTACGCTGATGCCGTGAAGGGC CGGTTCACCATCTCTCGCGATAACGCAAAGAATTCTCTCTACCTGCAGA TGAACAGCTTGCGACCTGAAGACACAGCTGTCTATTATTGCGCTCGGGC TTCTGGACCTCAGGGCTTGAGACTCGGAGCACCTAGAGGTCAGGGTAC

		TCTGGTGACAGTGAGCAGTGGCGGTAGCGAGGTGCAGTTGGTGGAAAG CGGCGGTGGCCTGGTGCAACCTGGTGGAAGCCTGAGGCTGTCATGCGC CGTGTCAGGCCGGACATTTAGCTCTTACACAATGGGCTGGTTCCGACAG GCACCAGGCAAAGAACGGGAATTCGTCGTGGCTATCTCTAAGGGCGGC TATAAGTATGATTCCGTCTCACTGGAAGCAAGGTTTACCATTAGCAGAG ACAACAGCAAGAACACAGTCTACCTCCAGATGAATAGCCTGCGGCCTG AAGATACAGCCGTCTACTACTGCGCCGCTACACGGGCATACGGCTCCA GCAGACTCAGGCTCGCAGACACCTACGAATACTGGGGTCAGGGAACCT TGGTCACAGTCAGCTCA
78	3005Hz6-2V1DP	GAAGTCCAGTTGGTGGAGTCCGGTGGAGGTCTGGTGCAACCTGGCGGA TCACTGCGGTTGTCTTGCGCTGCCAGCGGATTTACCTTCAGCAACTACT ATATGTCTTGGGCTAGGCAAGCACCAGGCAAAGGCCTGGAGTGGGTCT CTGGCATCTCTGTCGACGGTAGCTTTCTGGATTACGCCGACGCTGTCAA GGGTCGCTTCACCATCAGCAGGGACAACGCTAAGAACTCTCTGTATCTG CAAATGAACAGTCTCAGACCAGAAGATACAGCCGTCTACTATTGTGCC AGAGCCAGTGGACCACAGGGTTTGCGCTTGGGTGCACCAAGAGGCCAG GGAACACTCGTTACCGTCTCCAGCGGCGGAAGCGAAGTCCAACTGGTG GAATCTGGAGGTGGCCTGGTCCAGCCAGGTGGCTCTCTGAGACTGAGC TGCGCAGTGTCCGGAAGAACCTTCTCCAGCTATACCATGGGCTGGTTTA GACAAGCACCTGGTAAGGAGAGGGAGTTCGTGGTCGCTATCTCCAAGG GCGGATACAAGTACGACAGCGTCTCTCTGGAAGCTAGGTTTACCATTAG CCGGGACAACTCCAAGAATACCGTCTATCTGCAGATGAACAGCCTTAG GCCTGAAGACACAGCCGTGTATTACTGCGCTGCTACAAGGGCCTACGG CAGCTCTAGGCTGAGACTGGCAGACACCTATGAGTACTGGGGTCAGGG TACTCTGGTCACCGTGAGCTCAGGCGGATCTGAAGTCCAGCTGGTCGAA TCCGGTGGTGGACTGGTTCAGCCTGGTGGTAGCCTGCGCCTTTCTTGTG CTGTGAGCGGCCGGACCTTCTCTAGCTACACCATGGGTTGGTTCAGACA GGCACCTGGCAAAGAGAGAGAATTCGTCGTGGCCATCTCTAAGGGTGG CTACAAATACGACTCCGTGAGCCTTGAAGCACGCTTTACCATCTCCAGA GATAACAGCAAGAACACCGTCTACCTTCAGATGAACTCTCTGAGGCCA GAAGACACTGCCGTGTACTACTGTGCAGCTACCAGAGCATACGGTAGC AGCAGGCTTAGACTGGCCGATACCTACGAGTATTGGGGACAGGGTACA CTGGTGACAGTGAGCTCT

在融合构建体N端添加分泌信号肽：MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPS（SEQ ID NO：36），抗体C端添加连接子GGGGS（SEQ ID NO：37）和6xHis，通过基因合成获得编码DNA序列（见表32），再通过酶切位点NheI和XhoI连入表达载体pCDNA3.1（+）。质粒测序正确并经无内毒素大量提取，利用悬浮293F细胞进行瞬时表达，收获细胞培养上清并进行Ni柱亲和纯化。对于融合构建体3005Hz6-2V1SA（SEQ ID NO：33），同时构建无标签的蛋白，在蛋白N端添加分泌信号肽后，连入表达载体中，在293F细胞中进行瞬转表达。

对经Ni柱纯化后的V1SA-3005Hz6-V1SA（SEQ ID NO：32）和3005Hz6-2V1SA（SEQ ID NO：33）进行阳离子交换纯化，纯化产物各个组分进行SDS-PAGE，结果见图12（A），其中流穿液标注为FT，V1SA-3005Hz6-V1SA的洗脱产物标注A1、A2组分， 3005Hz6-2V1SA 的洗脱产物标注为A5、A6组分。对没有任何标签的3005Hz6-2V1SA开展阳离子交换，纯化产物考染图见图12（B），对V1DP-3005Hz6-V1DP和3005Hz6-2V1DP开展Ni柱纯化，纯化产物考染图见图12（C）。融合构建体的分子量约为41 kDa。

2、融合构建体的 ELISA 测试以及结合和解离速率测定（SPR）

用ELISA方法，检测融合构建体V1SA-3005Hz6-V1SA（SEQ ID NO：32）、3005Hz6-2V1SA（SEQ ID NO：33）和3005Hz6-2V1DP（SEQ ID NO：35）中结合HSA的活性。实验中，将人血清白蛋白HSA（Baxter AG）稀释至2 μg/mL，加入到酶标板中，100μL/孔，4℃包被过夜。经5%脱脂奶粉封闭和PBST（含0.1% Tween20的PBS，pH=7.4）洗涤后。将含His标签的融合构建体梯度稀释液加入酶标板中，100μL/孔，37℃孵育1小时，用PBST洗板后加入HRP标记的小鼠抗His标签单克隆抗体（购自：Proteintech，货号：HRP-66005），室温孵育45分钟。洗板后，每孔加入100μL TMB（购自：天根生化，货号：PA107-01），37℃显色15分钟后，加入终止液50μL。用酶标仪（购自：Thermo Scientific, 型号：Multiskan SkyHigh，货号：A51119700C）测定在450nm处的吸光度（OD450）。

ELISA结果如图13所示，EC50值见表33。

表33 融合构建体V1SA-3005Hz6-V1SA、3005Hz6-2V1SA和3005Hz6-2V1DP结合HSA的EC50汇总

融合构建体名称	结合 HSA 的 EC50 (nM)
V1SA-3005Hz6-V1SA	0.35
3005Hz6-2V1SA	0.26
3005Hz6-2V1DP	0.30

从表33可知，融合构建体V1SA-3005Hz6-V1SA、3005Hz6-2V1SA和3005Hz6-2V1DP均有较强的HSA结合活性，说明融合构建体中的抗体3005Hz6能发挥完整的生物活性。

采用表面等离子共振（SPR）方法测定融合构建体V1SA-3005Hz6-V1SA和3005Hz6-2V1SA与HSA的亲和力。

实验中运用Biacore 8K仪器（Cytiva），利用Series S Sensor Chip NTA分别捕获带His标签的抗白蛋白抗体3005Hz6或融合构建体V1SA-3005Hz6-V1SA、3005Hz6-2V1SA。分析物为梯度浓度的HSA，用流动相缓冲液（成分为：10 mM HEPES、150 mM NaCl，0.05% v/v Tween-20，pH=7.4）稀释分析物。配体和分析物的结合时间为150秒，解离时间为900秒。配体和分析物的结合和解离曲线如图14所示。

采用“1:1 binding”模型拟合获得3005Hz6、V1SA-3005Hz6-V1SA和3005Hz6-2V1SA与HSA的结合速率（ka）、解离速率（kd）和平衡解离常数（K_D），结果见表34。

表34 抗白蛋白抗体3005Hz6和融合构建体V1SA-3005Hz6-V1SA、3005Hz6-2V1SA与HSA的结合速率（ka）、解离速率（kd）和平衡解离常数（K_D）

配体	分析物	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K_D (M)
3005Hz6	HSA	1.09E+05	1.38E-03	1.27E-08
V1SA-3005Hz6-V1SA	HSA	2.48E+04	1.72E-03	6.94E-08
3005Hz6-2V1SA	HSA	4.11E+04	1.47E-03	3.58E-08

从表34可知，融合构建体3005Hz6-2V1SA与HSA有较高亲和力，K_D近似于抗体3005Hz6与HSA的K_D（K_D为12.7-35.8 nM）。

3、融合构建体与 VEGFA 的结合和解离速率测定（SPR）

采用SPR方法测定融合构建体V1SA-3005Hz6-V1SA（His标签）、3005Hz6-2V1SA（无标签）和阳性对照aflibercept与VEGFA的亲和力。SPR实验利用Biacore 8K（Cytiva）开展，用Series S Sensor Chip CAP捕获带有生物素修饰的VEGFA165-Avi-His（SEQ ID NO：40），捕获水平约为40 RU，用流动相缓冲液HBS-EP（0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% v/v Tween 20）稀释各个蛋白，设置2倍蛋白浓度梯度。动力学分析时，配体与分析物的结合时间为150秒，解离时间为900秒，流速是30μL/min。

V1SA-3005Hz6-V1SA、3005Hz6-2V1SA和阳性对照aflibercept与VEGFA的结合和解离曲线分别如图15（A）、图15（B）和图15（C）所示。结合解离曲线采用“1:1 binding”模型拟合，获得结合速率（ka）、解离速率（kd）和平衡解离常数（K_D），结果见表35。

表35 融合构建体V1SA-3005Hz6-V1SA、3005Hz6-2V1SA和阳性对照aflibercept与VEGFA的结合速率（ka）、解离速率（kd）和平衡解离常数（K_D）

分析物	配体	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K_D (M)
V1SA-3005Hz6-V1SA	VEGFA165-Avi-His	7.35E+06	1.79E-05	2.43E-12
3005Hz6-2V1SA	VEGFA165-Avi-His	7.86E+06	4.24E-05	5.39E-12
Aflibercept	VEGFA165-Avi-His	1.19E+06	1.31E-04	1.10E-10

从表35可知，在捕获生物素修饰的VEGFA165-Avi-His的SPR实验条件下，融合构建体V1SA-3005Hz6-V1SA和3005Hz6-2V1SA与VEGFA具有极高的结合亲和力（KD = 2.4-5.4 pM），相同实验条件下，阳性对照药物aflibercept与VEGFA的亲和力比V1SA-3005Hz6-V1SA和3005Hz6-2V1SA低一个数量级，KD约为110 pM。

实施例 8 融合构建体抑制 VEGFA 刺激的 HUVEC 增殖活性研究

本实施例采用原代人脐静脉内皮细胞（Human umbilical vein endothelial cells，HUVEC）测试融合构建体能否在细胞水平阻断VEGFA刺激的HUVEC增殖。

由于融合构建体在人体内会结合HSA，因此本实验中，对比了融合构建体在预孵育或不预孵育HSA时，抑制HUVEC增殖的活性差异。

实验中，用含 0.5% FBS 的内皮细胞培养基 ECM（购自：中乔新舟，货号：ZQ-1304），配制浓度为 210 ng/mL 的人 VEGFA165（购自：金斯瑞，货号：Z03073）溶液，配置加或者不加相同摩尔浓度 HSA 的融合构建体 3005Hz6-2V1SA 梯度稀释液（分别标记为：3005Hz6-2V1SA + HSA 和 3005Hz6-2V1SA）、加或者不加相同摩尔浓度 HSA 的融合构建体 V1SA-3005Hz6-V1SA 梯度稀释液（分别标记为：V1SA-3005Hz6-V1SA + HSA 和 V1SA-3005Hz6-V1SA），阳性对照为相同摩尔浓度梯度的上市药物 aflibercept（Bayer）。在 96 孔板中将 50 μL 浓度梯度的待测蛋白（3005Hz6-2V1SA + HSA、3005Hz6-2V1SA、V1SA-3005Hz6-V1SA + HSA、V1SA-3005Hz6-V1SA 以及 aflibercept）与 50 μL VEGFA165 溶液混合。设置不加 VEGFA165 的对照（预计增殖最慢）及只加 VEGFA165（预计增殖最快）的对照。待测蛋白和 VEGFA165 的混合液在 37 °C、5% CO2 培养箱中放置 1.5-2 小时。将原代细胞 HUVEC（购自：国家干细胞转化资源库，货号：DFSC-EC-01）消化并离心后，用含 0.5% FBS 的 ECM 重悬细胞，按照 50 μL 细胞混悬液/孔，将细胞加入到预混有待测蛋白和 VEGFA165 的 96 孔板中，每孔加入 1.2×10^4 个细胞，此时 VEGFA165 的最终浓度为 70 ng/mL。在 37 °C、5%CO_2 培养箱中培养 68-72h。培养结束后，每孔加入 16μL CCK-8 染色液（购自：Solarbio，货号：CA-1210），在 37 °C 培养箱中孵育 2.5-4 小时。通过酶标仪读取吸光度值（波长为 450nm），检测 HUVEC 细胞增殖活性。IC50 值采用 GraphPad Prism 8 软件通过四参数非线性回归分析计算得出。

计算待测蛋白在不同浓度下对细胞增殖的抑制率，抑制率的计算公式是：

$$\frac{[\text{OD450（只加VEGFA）} - \text{OD450（含VEGFA与待测蛋白浓度梯度混合物）}]}{[\text{OD450(只加VEGFA)} - \text{OD450(不加VEGFA)}]} * 100\%$$

融合构建体V1SA-3005Hz6-V1SA（预孵育或不预孵育HSA）、3005Hz6-2V1SA（预孵育或不预孵育HSA）抑制VEGFA刺激的HUVEC增殖实验结果分别如图16（A）、图16（B）所示。

融合构建体 V1SA-3005Hz6-V1SA 抑制 HUVEC 增殖的 IC50 和最大抑制率见表 36，融合构建体 3005Hz6-2V1SA 抑制 HUVEC 增殖的 IC50 和最大抑制率见表 37。

表 36 融合构建体 V1SA-3005Hz6-V1SA 在 HUVEC 增殖抑制实验中的 IC50 和最大抑制率

蛋白	HUVEC 增殖抑制	
	IC50 (nM)	最大抑制率 (%)
Aflibercept	2.40	92.6
V1SA-3005Hz6-V1SA	2.67	80.4
V1SA-3005Hz6-V1SA + HSA	2.59	86.3

表37 融合构建体3005Hz6-2V1SA在HUVEC增殖抑制实验中的IC50和最大抑制率

蛋白	HUVEC 增殖抑制	
	IC50 (nM)	最大抑制率 (%)

Aflibercept	4.26	92.2
3005Hz6-2V1SA	2.84	89.0
3005Hz6-2V1SA + HSA	2.59	90.2

表36和表37的结果显示，融合构建体V1SA-3005Hz6-V1SA和3005Hz6-2V1SA，均能在细胞水平高效阻断人VEGFA165所激活的下游信号通路，抑制人VEGFA165刺激的HUVEC增殖，其活性与阳性对照aflibercept（受体类药物）活性近似。而且结果显示，融合构建体V1SA-3005Hz6-V1SA和3005Hz6-2V1SA是否预孵育HSA，对它们的HUVEC增殖抑制活性没有显著影响。

实施例 9 融合构建体抑制 VEGFA 诱导的 VEGFR2 磷酸化活性研究

本实施例采用原代HUVEC细胞，验证融合构建体对VEGFA诱导的VGFR2磷酸化的抑制效果。

实验中，原代HUVEC细胞消化并离心后，用ECM培养基（含5% FBS，1%表皮生长因子，1%青霉素-链霉素）（购自：中乔新舟，货号：ZQ-1304）重悬，以3×10^5个/mL的密度铺96孔板，每孔100μL细胞悬浮液。37 ℃、5% CO2培养箱中过夜培养。

用ECM培养基配置VEGFA165和融合构建体，将工作浓度为50 ng/mL（摩尔浓度为1.3 nM）的无标签人VEGFA165（购自：金斯瑞，货号：Z03073）分别与不同浓度的融合构建体V1SA-3005Hz6-V1SA（预孵育相同摩尔浓度的HSA）、3005Hz6-2V1SA（预孵育相同摩尔浓度的HSA）预混合。同时设置不加VEGFA165和只加VEGFA165的对照，混合液放置37 ℃ 30分钟后加入提前过夜铺板的HUVEC细胞中，处理5分钟。PBS清洗一遍细胞，每孔加入65 μL含PMSF的强RIPA裂解液（购自：Beyotime，货号：P0013B），冰上裂解20分钟。将裂解液转入1.5mL离心管，13000rpm离心15分钟（4 ℃），收集上清液。加入5×Loading buffer，95 ℃加热6分钟，取上清液进行western blot，检测VEGFR2磷酸化情况。蛋白免疫印迹实验中，检测内参GAPDH的抗GAPDH抗体购自Proteintech，货号为60004-1-Ig，检测VGFR2的1175位酪氨酸发生磷酸化（p-VEGFR2）的抗体购自Cell Signaling Technology，货号为2478S。

对免疫印迹实验结果中的磷酸化VEGFR2（p-VEGFR2）条带和GAPDH条带的信号强度进行定量化，并且计算两个条带的信号强度比值（p-VEGFR2/GADPH），获得待测蛋白对VEGFR2磷酸化的抑制率。

待测蛋白对VEGFR2磷酸化抑制率的计算公式为：

$$[1-\frac{[\text{待测蛋白与 VEGFA 共同处理时的 p-VEGFR2/GADPH}]}{[\text{仅 VEGFA 处理时的 p-VEGFR2/GADPH}]}]*100\%$$

融合构建体 V1SA-3005Hz6-V1SA 对 VEGFR2 磷酸化的抑制率见表 38。

表 38 融合构建体 V1SA-3005Hz6-V1SA 对 VEGFR2 磷酸化的抑制率

HUVEC处理方式	融合构建体/VEGFA (摩尔比)	VEGFR2磷酸化抑制率
V1SA-3005Hz6-V1SA与VEGFA共同处理	0.5	22.1%
	1	40.0%
	3	74.7%
	5	90.5%

表 38 显示，V1SA-3005Hz6-V1SA 能够有效抑制人 VEGFA 诱导的 HUVEC 细胞 VEGFR2 磷酸化。V1SA-3005Hz6-V1SA（与 HSA 孵育的条件下）在摩尔浓度为 VEGFA 的 5 倍时，对 VEGFR2 磷酸化抑制率可达到 90%以上。

融合构建体 3005Hz6-2V1SA 对 VEGFR2 磷酸化的抑制率见表 39。

表 39 融合构建体 3005Hz6-2V1SA 对 VEGFR2 磷酸化的抑制率

HUVEC处理方式	融合构建体/VEGFA (摩尔比)	VEGFR2磷酸化抑制率
3005Hz6-2V1SA与VEGFA共同处理	0.5	-5.5%
	1	40.4%
	2	63.0%
	3	90.4%

表 39 显示，3005Hz6-2V1SA 能够有效抑制人 VEGFA 诱导的 HUVEC 细胞 VEGFR2 磷酸化。3005Hz6-

2V1SA（与 HSA 孵育的条件下）在摩尔浓度为 VEGFA 的 3 倍时，对 VEGFR2 磷酸化抑制率可达到 90%以上。

实施例 10 融合构建体在 VEGF 报告基因细胞中的活性研究

本实施例采用 VEGF 报告基因体系评估融合构建体阻断 VEGF 下游信号通路的活性。

HEK-293/VEGF/NFAT 稳转报告基因细胞株（购自中国食品药品检定研究院）由 HEK-293 细胞转染共表达 VEGFR2（KDR）与 NFAT-RE-luc 2p 基因，当 VEGFA 识别并激活 KDR 受体后，启动胞内下游信号通路，激活转录因子 NFAT 启动 Luciferase 报告基因的表达，此时加入荧光素酶底物后可产生化学发光。

将 HEK-293/VEGF/NFAT 报告基因细胞消化并离心后，用含 1% FBS 的 DMEM 重悬细胞，细胞密度为 5×10^4 个/mL，铺在白底 96 孔板（购自：Costar，货号：3917）上，每孔 80μL，在 37 ℃、5% CO_2 培养箱过夜培养。次日用含 1%FBS 的 DMEM 配制 VEGFA165（购自：金斯瑞，货号：Z03073）至 80ng/mL，并与不同浓度的 V1SA-3005Hz6-V1SA（预孵育或不预孵育等摩尔浓度的 HSA）或 3005Hz6-2V1SA（预孵育或不预孵育等摩尔浓度的 HSA）混合，在 37℃孵育 30 分钟。阴性对照为不加 VEGFA165，阳性对照为只加 VEGFA165。将 20 μL 混合液（待测蛋白和 VEGFA165）加入 80 μL 细胞中，在 37℃培养箱培养 6 小时。每孔加入 100μL 荧光素酶报告基因底物（购自：Yeasen，货号：11404ES60），采用多功能酶标仪（购自：Agilent BioTek，型号：Synergy H1）测荧光素的相对光单位（RLU）。

在上述实验条件下，融合构建体V1SA-3005Hz6-V1SA和3005Hz6-2V1SA抑制荧光素底物发光的活性检测结果分别如图17（A）、图17（B）所示，拟合的IC50分别见表40和表41。

表 40 VEGF 报告基因体系中融合构建体 V1SA-3005Hz6-V1SA 在预孵育或不预孵育 HSA 时抑制荧光素发光的 IC50 汇总

蛋白	VEGF 报告基因实验的 IC50 (nM)
V1SA-3005Hz6-V1SA	0.24
V1SA-3005Hz6-V1SA + HSA	0.22

表 41 VEGF 报告基因体系中融合构建体 3005Hz6-2V1SA 在预孵育或不预孵育 HSA 时抑制荧光素发光的 IC50 汇总

蛋白	VEGF 报告基因实验的 IC50 (nM)
3005Hz6-2V1SA	0.24
3005Hz6-2V1SA + HSA	0.25

图 17 和表 40、表 41 的结果显示，融合构建体 V1SA-3005Hz6-V1SA 和 3005Hz6-2V1SA 都能在细胞水平阻断 VEGFA165 刺激的下游信号通路激活，从而减少转录启动子 NFAT 入核激活 Luciferase 报告基因的表达，它们的 IC50 均为 0.24nM 。本实施例中，融合构建体 V1SA-3005Hz6-V1SA 和 3005Hz6-2V1SA 是否预先结合 HSA，对 VEGFA 下游信号的阻断活性基本无影响。

综合上述蛋白水平和细胞水平的活性检测实验，二价抗 VEGFA 纳米抗体（V1-SA1，SEQ ID NO：20）和人源化抗白蛋白纳米抗体（3005Hz6，SEQ ID NO：9）组成的融合构建体 V1SA-3005Hz6-V1SA（SEQ ID NO：32）和 3005Hz6-2V1SA（SEQ ID NO：33），均具有较强的 HSA 结合活性及对 VEGFA 亲和力，融合构建体在细胞水平能高效抑制 VEGFA165 诱导的 HUVEC 增殖及 VEGFR2 磷酸化、抑制 VEGF 报告基因细胞的荧光素发光。这些数据表明，融合构建体 V1SA-3005Hz6-V1SA 和 3005Hz6-2V1SA 具有很强的 VEGFA 中和活性，能高效阻断 VEGFA 下游信号通路，抑制 VEGFA 诱导的细胞增殖，能潜在用于治疗 VEGFA 诱导的异常血管增生相关疾病，如湿性 AMD、糖尿病性黄斑水肿、肿瘤等。

同时，数据还说明融合构建体中结合不同抗原的抗体元件能独立发挥功能，抗体元件之间的相互干扰较小，结合HSA后不影响效应分子发挥生物学功能。因此可以预期融合构建体V1SA-3005Hz6-V1SA和3005Hz6-2V1SA在体内结合白蛋白后，能正常发挥阻断VEGFA信号通路和抑制内皮细胞增殖的活性。

以上详细描述了本发明的优选实施方式，但是，本发明并不限于上述实施方式中的具体细节，在本发明的技术构思范围内，可以对本发明的技术方案进行多种简单变型，这些简单变型均属于本发明的保护范围。

另外需要说明的是，在上述具体实施方式中所描述的各个具体技术特征，在不矛盾的情况下，可以通过任何合适的方式进行组合，为了避免不必要的重复，本发明对各种可能的组合方式不再另行说明。

权 利 要 求 书

1. 一种抗 VEGFA 融合构建体，其特征在于，所述的融合构建体包含抗白蛋白抗体或其抗原结合片段和抗 VEGFA 抗体或其抗原结合片段，所述的抗 VEGFA 抗体或其抗原结合片段与所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段连接。
2. 根据权利要求 1 所述的融合构建体，其特征在于，所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段包含重链可变区的 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3；其中，
   CDR-H1 的氨基酸序列包含 SEQ ID NO：1，或与 SEQ ID NO：1 所示氨基酸序列具有至少 80%同一性的氨基酸序列；
   CDR-H2 的氨基酸序列包含 SEQ ID NO：41 或与 SEQ ID NO：41 所示氨基酸序列具有至少 80%同一性的氨基酸序列；
   CDR-H3 的氨基酸序列包含 SEQ ID NO：3 或与 SEQ ID NO：3 所示氨基酸序列具有至少 80%同一性的氨基酸序列。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的融合构建体，其特征在于，所述的 SEQ ID NO：41（GISVX$_1$X$_2$SFLDYADAVKG）中的 X$_1$X$_2$ 代表 DS、DA、EG 或 DG。
4. 根据权利要求 1-3 任一所述的融合构建体，其特征在于，所述的 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3 的氨基酸序列包含下列任一组：
   A）SEQ ID NO：1、2、3；
   B）SEQ ID NO：1、10、3；
   C）SEQ ID NO：1、11、3；
   D）SEQ ID NO：1、12、3。
5. 根据权利要求 1 所述的融合构建体，其特征在于，所述的抗 VEGFA 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区的 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3；其中，
   CDR-H1 的氨基酸序列包含 SEQ ID NO：16，或与 SEQ ID NO：16 所示氨基酸序列具有至少 80%同一性的氨基酸序列；
   CDR-H2 的氨基酸序列包含 SEQ ID NO：17 或与 SEQ ID NO：17 所示氨基酸序列具有至少 80%同一性的氨基酸序列；
   CDR-H3 的氨基酸序列包含 SEQ ID NO：18 或与 SEQ ID NO：18 所示氨基酸序列具有至少 80%同一性的氨基酸序列。
6. 根据权利要求 1-5 任一所述的融合构建体，其特征在于，所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段或者抗 VEGFA 抗体或其抗原结合片段包括人源化序列，所述的人源化序列的改造位点位于非 CDR 区，优选的，所述的人源化序列的改造位点位于抗体的框架区和/或恒定区。
7. 根据权利要求 1-6 任一所述的融合构建体，其特征在于，所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段或者抗 VEGFA 抗体或其抗原结合片段的结构包括纳米抗体、嵌合抗体、Fab 片段、Fab'片段、Fd 片段、Fv 片段、dAb 片段、F(ab')2 片段、单链抗体或线性抗体。
8. 根据权利要求 1-7 任一所述的融合构建体，其特征在于，所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段的氨基酸序列包含 SEQ ID NO：4、6-9、13-15 中的任一氨基酸序列，或与 SEQ ID NO：4、6-9、13-15 中的任一氨基酸序列具有至少 80%同一性。
9. 根据权利要求 1-7 任一所述的融合构建体，其特征在于，所述的抗 VEGFA 抗体或其抗原结合片段的氨基酸序列包含 SEQ ID NO：19-28 中的任一氨基酸序列，或与 SEQ ID NO：19-28 中的任一氨基酸序列具有至少 80%同一性。
10. 根据权利要求 1-9 任一所述的融合构建体，其特征在于，所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段与抗 VEGFA 抗体或其抗原结合片段之间直接连接或间接连接，优选的，所述的间接连接可以为通过接头、功能结构域和/或用于偶联的连接子连接；
    其中，所述的接头选自连接肽、寡肽、寡肽聚合物、多肽、多肽聚合物、PEG、核酸、多糖、脂肪链、

生物素、链霉亲和素或亲和素；

所述的功能结构域为 Fc 片段、血清白蛋白、细胞因子、转铁蛋白或支架蛋白中的一种或多种的组合；所述的用于偶联的连接子包括功能团连接子，优选的，所述的功能团连接子包括巯基、氨基、羟基和/或羧基反应活性基团，

更优选的，其中，所述融合构建体可以包括一个或多个抗 VEGFA 抗体或其抗原结合片段，所述的抗 VEGFA 抗体或其抗原结合片段直接或者间接连接在所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段的 N 端、C 端和/或内部残基上，

进一步优选的，所述融合构建体包含 SEQ ID NO：29-35 的任一序列，或与 SEQ ID NO：29-35 所示氨基酸序列具有至少 80%同一性。

11. 一种核酸，其特征在于，所述的核酸编码权利要求 1-10 任一所述的融合构建体。
12. 根据权利要求 11 所述的核酸，其特征在于，所述的核酸包含 SEQ ID NO：62-71 中的任一核苷酸序列或其简并序列，或与 SEQ ID NO：62-71 中的任一核苷酸序列具有至少 80%同一性，并具有编码抗 VEGFA 抗体或其抗原结合片段的功能的核苷酸序列。
13. 根据权利要求 11 或 12 所述的核酸，其特征在于，所述的核酸还包含 SEQ ID NO：45、47-50、56-58 中的任一核苷酸序列或其简并序列，或与 SEQ ID NO：45、47-50、56-58 中的任一核苷酸序列具有至少 80%同一性，并具有编码抗白蛋白抗体或其抗原结合片段的功能的核苷酸序列。
14. 根据权利要求 11-13 任一所述的核酸，其特征在于，所述的核酸包含 SEQ ID NO：72-78 中的任一核苷酸序列或其简并序列，或与 SEQ ID NO：72-78 中的任一核苷酸序列具有至少 80%同一性，并具有编码所述融合构建体功能的核苷酸序列。
15. 一种载体，其特征在于，所述的载体包含权利要求 11-14 任一所述的核酸。
16. 一种宿主细胞，其特征在于，所述的宿主细胞包含权利要求 11-14 任一所述的核酸或权利要求 15 所述的载体。
17. 一种权利要求 1-10 任一所述的融合构建体的制备方法，其特征在于，所述的制备方法包括培养权利要求 16 所述的宿主细胞，表达所述的融合构建体。
18. 一种权利要求 1-10 任一所述的融合构建体、权利要求 11-14 任一所述的核酸、权利要求 15 所述的载体或权利要求 16 所述的宿主细胞在制备治疗和/或诊断疾病的产品中的应用。
19. 一种治疗和/或诊断疾病的产品，其特征在于，所述的治疗和/或诊断疾病的产品包含下列任一种：

A）权利要求 1-10 任一所述的融合构建体；

B）权利要求 11-14 任一所述的核酸；

C）权利要求 15 所述的载体；或，

D）权利要求 16 所述的宿主细胞。

20. 一种 VEGFA 的检测方法，其特征在于，所述的检测方法包括将待检样品与权利要求 1-10 任一所述的融合构建体接触，然后检测 VEGFA 与融合构建体形成的复合物含量，优选的，所述的 VEGFA 来自哺乳动物，更为优选的，所述的哺乳动物来自人、鼠或者猴。