

抗 VEGF 抗体及其用途

技术领域

本申请涉及生物医药领域，具体的涉及一种抗 VEGF 抗体及其在制备药物中的用途

背景技术

恶性肿瘤是目前全球范围内严重威胁人类健康的疾病，是疾病导致人类死亡的主要类型。随着国内人口老龄化的日渐加剧，肿瘤发生率不断提高，有效的治疗药物亟待开发，其中抗血管生成药物的开发为近年来研究热点。肿瘤的生长、转移需要丰富的血管为其提供足够的氧气和营养物质，肿瘤组织可分泌多种促血管生成物质。

在肿瘤的生长过程中表皮生长因子 VEGF 能特异性刺激内皮细胞的增殖，在多种类型的肿瘤血管生成中起关键作用。VEGF 与表皮生长因子受体 VEGFR 结合后能够通过下游信号通路介导胞内相关蛋白基因转录表达，促进血管内皮细胞增殖。目前已开发出诸如贝伐单抗（Bevacizumab）等多款靶向人 VEGF 人源化单克隆抗体，但在治疗过程中仍存在响应率低，易产生耐药性等现象。因此，亟需结构稳定、疗效好且适合大规模工业化生产的抗肿瘤 VEGF 抗体。

发明内容

本申请提供了一种分离的抗原结合蛋白，其具有下述性质中的一种或多种：（1）能够以 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 或更低的 KD 值结合 VEGF 蛋白；和（2）能够阻断 VEGF 蛋白与 VEGFR 蛋白之间结合。

在某些实施方式中，所述 VEGF 蛋白包括 VEGF165。

在某些实施方式中，所述 VEGFR 蛋白包括 VEGFR2。

在某些实施方式中，所述分离的抗原结合蛋白包括抗体或其抗原结合片段。

在某些实施方式中，所述抗原结合片段包括 Fab, Fab', F(ab)2、Fv 片段、F(ab')2、scFv、di-scFv、VHH 和/或 dAb。

在某些实施方式中，所述抗原结合片段为 VHH。

在某些实施方式中，所述抗体选自下组：单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体和全人源抗体。

在某些实施方式中，所述分离的抗原结合蛋白能够与参比抗体竞争结合所述 VEGF 蛋白，其中所述参比抗体包含重链可变区 VH，所述参比抗体的 VH 包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，

且所述参比抗体的 HCDR1 包含如 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列, 所述参比抗体的 HCDR2 包含如 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列, 和, 所述参比抗体的 HCDR3 包含如 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 所述参比抗体的 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 所述参比抗体的 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 12-14 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 所述参比抗体的 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 17-19 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 所述分离的抗原结合蛋白包含 VH 中的至少一个 CDR, 所述 VH 包含如 SEQ ID NO: 29 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 所述分离的抗原结合蛋白包含 VH 中的至少一个 CDR, 所述 VH 包含如 SEQ ID NO: 1-6 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 所述分离的抗原结合蛋白包含 HCDR3, 且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 17-19 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 所述分离的抗原结合蛋白包含 HCDR2, 且所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 12-14 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 所述分离的抗原结合蛋白包含 HCDR1, 且所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 所述分离的抗原结合蛋白包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 其中所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列, 所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列, 且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 所述分离的抗原结合蛋白包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 其中所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列, 所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 12-14 中任一项所示的氨基酸序列, 且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 17-19 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 所述分离的抗原结合蛋白包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 且所述 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 选自以下任一组氨基酸序列:

- (1) HCDR1: SEQ ID NO: 9, HCDR2: SEQ ID NO: 12 和 HCDR3: SEQ ID NO: 17;
- (2) HCDR1: SEQ ID NO: 9, HCDR2: SEQ ID NO: 13 和 HCDR3: SEQ ID NO: 17;

(3) HCDR1: SEQ ID NO: 9, HCDR2: SEQ ID NO: 14 和 HCDR3: SEQ ID NO: 17;

(4) HCDR1: SEQ ID NO: 9, HCDR2: SEQ ID NO: 13 和 HCDR3: SEQ ID NO: 18;

和

(5) HCDR1: SEQ ID NO: 9, HCDR2: SEQ ID NO: 13 和 HCDR3: SEQ ID NO: 19。

在某些实施方式中, 所述分离的抗原结合蛋白包含重链可变区 VH, 其中所述 VH 包括框架区 H-FR1, 所述 H-FR1 的 C 末端与所述 HCDR1 的 N 末端直接或间接相连, 且所述 H-FR1 包含 SEQ ID NO: 25 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 所述 H-FR1 包含 SEQ ID NO: 7-8 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 所述 VH 包括框架区 H-FR2, 所述 H-FR2 位于所述 HCDR1 与所述 HCDR2 之间, 且所述 H-FR2 包含 SEQ ID NO: 26 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 所述 H-FR2 包含 SEQ ID NO: 10-11 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 所述 VH 包括框架区 H-FR3, 所述 H-FR3 位于所述 HCDR2 与所述 HCDR3 之间, 且所述 H-FR3 包含 SEQ ID NO: 27 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 所述 H-FR3 包含 SEQ ID NO: 15-16 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 所述 H-FR4 的 N 末端与所述 HCDR3 的 C 末端相连, 且所述 H-FR4 包含 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 所述 H-FR4 包含 SEQ ID NO: 20-22 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 所述分离的抗原结合蛋白包含 H-FR1、H-FR2、H-FR3 和 H-FR4, 其中所述 H-FR1 包含 SEQ ID NO: 25 所示的氨基酸序列, 所述 H-FR2 包含 SEQ ID NO: 26 所示的氨基酸序列, 所述 H-FR3 包含 SEQ ID NO: 27 所示的氨基酸序列且所述 H-FR4 包含 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 所述分离的抗原结合蛋白包含 H-FR1、H-FR2、H-FR3 和 H-FR4, 其中所述 H-FR1 包含 SEQ ID NO: 7 或 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列, 所述 H-FR2 包含 SEQ ID NO: 10 或 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列, 所述 H-FR3 包含 SEQ ID NO: 15 或 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列, 且所述 H-FR4 包含 20-22 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 所述分离的抗原结合蛋白包含 H-FR1、H-FR2、H-FR3 和 H-FR4, 且所述 H-FR1、H-FR2、H-FR3 和 H-FR4 选自以下任一组氨基酸序列:

(1) F-FR1: SEQ ID NO: 7, H-FR2: SEQ ID NO: 10, H-FR3: SEQ ID NO: 15 和 H-FR4: SEQ ID NO: 20;

(2) H-FR1: SEQ ID NO: 8, H-FR2: SEQ ID NO: 11, H-FR3: SEQ ID NO: 16 和 H-

FR4: SEQ ID NO: 21; 和

(3) H-FR1: SEQ ID NO: 8, H-FR2: SEQ ID NO: 11, H-FR3: SEQ ID NO: 16 和 H-FR4: SEQ ID NO: 22。

在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白包含重链可变区 VH,且所述 VH 包含 SEQ ID NO: 29 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中,所述 VH 包含 SEQ ID NO: 1-6 中任一项所示的氨基酸序列。

另一方面,本申请提供了分离的一种或多种核酸分子,其编码所述分离的抗原结合蛋白。

另一方面,本申请提供了载体,其包含所述的核酸分子。

另一方面,本申请提供了细胞,其包含所述的核酸分子或所述的载体。

另一方面,本申请提供了制备所述的分离的抗原结合蛋白的方法,所述方法包括在使得所述的分离的抗原结合蛋白表达的条件下,培养所述的细胞。

另一方面,本申请提供了药物组合物,其包含所述的分离的抗原结合蛋白、所述的核酸分子、所述的载体和/或所述的细胞,以及任选地药学上可接受的载体。

另一方面,本申请提供了多肽,其包含所述的分离的抗原结合蛋白。

另一方面,本申请提供了免疫缀合物,其包含所述的分离的抗原结合蛋白或所述的多肽。

另一方面,本申请提供了所述的分离的抗原结合蛋白、所述的核酸分子、所述的载体、所述的细胞、所述的药物组合物、所述的多肽和/或免疫缀合物在制备药物中的用途,所述药物用于预防、缓解和/或治疗肿瘤。

在某些实施方式中,所述肿瘤包括 VEGF 过表达的肿瘤。

在某些实施方式中,所述肿瘤包括实体瘤和/或非实体瘤。

在某些实施方式中,所述肿瘤包括肺癌、结直肠癌、乳腺癌、肾癌、胃癌、肝癌、母细胞瘤、宫颈癌和/或卵巢癌。

另一方面,本申请提供了预防、缓解或治疗肿瘤的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用所述的分离的抗原结合蛋白、所述的核酸分子、所述的载体、所述的细胞、所述的药物组合物、所述多肽和/或所述免疫缀合物。

在某些实施方式中,所述肿瘤包括 VEGF 过表达的肿瘤。

在某些实施方式中,所述肿瘤包括实体瘤和/或非实体瘤。

在某些实施方式中,所述肿瘤包括肺癌、结直肠癌、乳腺癌、肾癌、胃癌、肝癌、母细胞瘤、宫颈癌和/或卵巢癌。

另一方面,本申请提供了所述的分离的抗原结合蛋白、所述的核酸分子、所述的载体、

所述的细胞、所述的药物组合物、多肽和/或免疫缀合物，其用于预防、缓解或治疗肿瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤包括 VEGF 过表达的肿瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤包括实体瘤和/或非实体瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤包括肺癌、结直肠癌、乳腺癌、肾癌、胃癌、肝癌、母细胞瘤、宫颈癌和/或卵巢癌。

另一方面，本申请提供了抑制 VEGF 蛋白与 VEGFR 蛋白结合的方法，其包括施用所述的分离的抗原结合蛋白、所述的核酸分子、所述的载体、所述的细胞、所述的药物组合物、所述多肽和/或所述免疫缀合物。

本领域技术人员能够从下文的详细描述中容易地洞察到本申请的其它方面和优势。下文的详细描述中仅显示和描述了本申请的示例性实施方式。如本领域技术人员将认识到的，本申请的内容使得本领域技术人员能够对所公开的具体实施方式进行修改而不脱离本申请所涉及发明的精神和范围。相应地，本申请的附图和说明书中的描述仅仅是示例性的，而非为限制性的。

附图说明

本申请所涉及的发明的具体特征如所附权利要求书所显示。通过参考下文中详细描述 of 示例性实施方式和附图能够更好地理解本申请所涉及发明的特点和优势。对附图简要说明如下：

图 1 显示的是酵母展示文库构建方法示意图。

图 2 显示的是本申请所述抗原结合蛋白 Ab1910VE8、Ab1910VE9 和 Ab1910VE6 阻断人 VEGF165 和人 VEGFR2 的结合。

图 3 显示的是本申请所述抗原结合蛋白 Ab1910VE18、Ab1910VE21 和 Ab1910VE24 阻断人 VEGF165 和人 VEGFR2 的结合。

具体实施方式

以下由特定的具体实施例说明本申请发明的实施方式，本领域技术人员可由本说明书所公开的内容容易地了解本申请发明的其他优点及效果。

术语定义

在本申请中，术语“VEGF”通常是指血管内皮细胞生长因子，包括其天然存在的等位基因形式和加工形式。所述 VEGF 可包括 VEGF-A，VEGF-B，VEGF-C，VEGF-D，VEGF-E，

VEGF-F 和/或 PlGF。在本申请中,所述 VEGF 可以为 VEGF-A,也可称为 VEGF165。VEGF-A 可结合受体酪氨酸激酶,即 VEGFR-1(Flt-1)、VEGFR-2(Flk-1/KDR)、VEGFR3 和 Neuropilin-1(NRP-1)。VEGF165 与 VEGFR2 结合后通过下游 PLC- γ -PKC-Raf-MEK-MAPK 信号通路介导胞内相关蛋白基因转录表达,促进血管内皮细胞增殖(Takahashi T 等人, *Oncogene*, 18(13):2221-2230. (1999))。术语“VEGF”还可以指来自非人物种诸如小鼠,大鼠或灵长类动物的 VEGF。在本申请中,来自特定物种的 VEGF 可以表示如下,hVEGF 表示人 VEGF,mVEGF 表示鼠 VEGF。通常,VEGF 可以指人 VEGF。术语“VEGF”还用于指完整 VEGF 的截短形式或片段,还包括 VEGF 的功能性变体、同工型、物种同源物、衍生物、类似物,以及具有至少一个与 VEGF 共同表位的类似物。VEGF 序列是本领域已知的。例如,示例性的全长人 VEGFA 蛋白序列可在 NCBI 登录号 NP_001020537、NP_001020538、NP_001020539、NP_001020540 或 NP_001020541 下找到。

在本申请中,术语“VEGFR”通常是指血管内皮细胞生长因子受体,包括其天然存在的等位基因形式和加工形式。VEGFR 可包括 VEGFR1、CEGFR2 和 VEGFR3,以及其他选择性剪接变体。VEGFR 可以是膜结合的或可溶的。术语“VEGFR”还可以指来自非人物种诸如小鼠,大鼠或灵长类动物的 VEGFR。在本申请中,来自特定物种的 VEGFR 可以表示如下,hVEGFR 表示人 VEGFR,mVEGFR 表示鼠 VEGFR。通常,VEGFR 可以指人 VEGFR。术语“VEGFR”还用于指完整 VEGFR 的截短形式或片段,还包括 VEGFR 的功能性变体、同工型、物种同源物、衍生物、类似物,以及具有至少一个与 VEGFR 共同表位的类似物。VEGFR 序列是本领域已知的。例如,示例性的全长人 VEGFR2 蛋白序列可在 NCBI 登录号 NP_002244 下找到。

在本申请中,术语“同源物”通常是指与野生型氨基酸序列和野生型核苷酸序列具有一定同源性的氨基酸序列或核苷酸序列。术语“同源性”可以等同于序列“同一性”。同源序列可以包括可以与主题序列是至少 80%、85%、90%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或 99.9%相同的氨基酸序列。通常,同源物将包含与主题氨基酸序列相同的活性位点等。同源性可以根据相似性(即具有相似化学性质/功能的氨基酸残基)来考虑,也可以在序列同一性方面表达同源性。在本申请中,提及的氨基酸序列或核苷酸序列的 SEQ ID NO 中的任一项具有百分比同一性的序列是指在所提及的 SEQ ID NO 的整个长度上具有所述百分比同一性的序列。

在本申请中,术语“抗原结合蛋白”通常是指包含结合抗原部分的蛋白质,以及任选地允许结合抗原的部分采用促进抗原结合蛋白与抗原结合的构象的支架或骨架部分。抗原结合

蛋白可典型地包含抗体轻链可变区 (VL)、抗体重链可变区 (VH) 或上述两者, 及其功能性片段。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗原结合蛋白的实例包括但不限于抗体、抗原结合片段、免疫缀合物、多特异性抗体 (例如双特异性抗体)、抗体片段、抗体衍生物、抗体类似物或融合蛋白等, 只要它们显示出所需的抗原结合活性即可。

在本申请中, 术语“抗体”通常是指对指定蛋白质或肽或其片段有反应性的免疫球蛋白。抗体可以是来自任何类的抗体, 包括但不限于 IgG、IgA、IgM、IgD 和 IgE, 及来自任何亚类 (例如 IgG1、IgG2、IgG3、和 IgG4) 的抗体。抗体可具有选自例如 IgG1、IgG2、IgG3、或 IgG4 的重链恒定区。抗体还可具有选自例如 kappa (κ) 或 lambda (λ) 的轻链。本申请的抗体可衍生自任何物种。

在本申请中, 术语“抗原结合片段”通常是指抗体分子的某部分, 该部分包含氨基酸残基, 该氨基酸残基与抗原相互作用并赋予抗体对于抗原的特异性和亲和力。抗原结合片段的实例可包括但不限于 Fab, Fab', F(ab)₂, Fv 片段, F(ab')₂, scFv, di-scFv 和/或 dAb。在本申请中, 术语“Fab”通常是指含有重链可变结构域和轻链可变结构域的片段, 并且还含有轻链的恒定结构域和重链的第一恒定结构域 (CH1); 术语“Fab'”通常是指在重链 CH1 结构域的羧基端添加少量残基 (包括一个或多个来自抗体铰链区的半胱氨酸) 而不同于 Fab 的片段; 术语“F(ab')₂”通常是指 Fab' 的二聚体, 包含通过铰链区上的二硫桥连接的两个 Fab 片段的抗体片段。术语“Fv”通常是指含有完整抗原识别与结合位点的最小抗体片段。在某些情形中, 该片段可以由一个重链可变区和一个轻链可变区以紧密非共价结合的二聚体组成; 术语“dsFv”通常是指二硫键稳定的 Fv 片段, 其单个轻链可变区与单个重链可变区之间的键是二硫键。术语“dAb 片段”通常是指由 VH 结构域组成的抗体片段。在本申请中, 术语“scFv”通常是指抗体的一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域通过柔性肽连接子共价连接配对形成的单价分子; 此类 scFv 分子可具有一般结构: NH₂-VL-连接子-VH-COOH 或 NH₂-VH-连接子-VL-COOH。在本申请中, 术语“VHH”通常是指包含重链抗体的可变抗原结合结构域的抗体 (参见 Vanlandschoot P. 等人, 2011, Antiviral Research 92, 389-407)。VHH 也可称为纳米抗体 (Nanobody) (Nb)。

在本申请中, 术语“可变区”或“可变结构域”通常是指参与抗体与抗原的结合的抗体重链或轻链的结构域。在本申请中, 术语“可变”通常是指, 抗体的可变结构域的序列的某些部分变化强烈, 形成各种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。变异性并非均匀地分布在抗体的整个可变区中。它集中在轻链可变区和重链可变区中的三个区段, 被称为互补决定区 (CDR) 或高变区 (HVR), 分别为 LCDR1、LCDR2、LCDR3、HCDR1、HCDR2 和

HCDR3。可变域中更高度保守的部分被称为框架区（FR）。天然重链和轻链的可变结构域各自包含四个 FR 区（H-FR1，H-FR2，H-FR3，H-FR4，L-FR1，L-FR2，L-FR3，L-FR4），大部分采用 β -折叠构型，通过三个 CDR 结构环区连接。每条链中的 CDR 通过 FR 区紧密靠近在一起，并与来自另一条链的 CDR 一起形成抗体的抗原结合位点。

在本领域中，可以通过多种方法来编码抗体的可变区或划分抗体的 CDR，例如基于序列可变性的 Kabat 编号方案和定义规则（参见，Kabat 等人，免疫学的蛋白质序列，第五版，美国国立卫生研究院，贝塞斯达，马里兰州（1991）），基于结构环区域位置的 Chothia 编号方案和定义规则（参见，A1-Lazikani 等人，JMol Biol 273:927-48,1997），efranc 等人的基于种系 V 基因的氨基酸序列比对的 IMGT 编号方案和定义规则，还有 Honneger's 编号方案（AHO's），Martin 编号方案，Gelfand 编号方案等，可参见 Mathieu Dondelinger 等人，Understanding the Significance and Implications of Antibody Numbering and Antigen-Binding Surface/Residue Definition, Front. Immunol., 16 October 2018.

在本申请中，术语“单克隆抗体”通常是指从一群基本上同质的抗体获得的抗体，即构成群体的各个抗体相同，除了可能以极小量存在的可能的天然存在突变和/或翻译后修饰（例如异构化、酰胺化）外。单克隆抗体是高度特异性的，针对单一抗原性位点。

在本申请中，术语“嵌合抗体”通常是指其中可变区源自一个物种，而恒定区源自另一个物种的抗体。通常，可变区源自实验动物诸如啮齿动物的抗体（“亲本抗体”），且恒定区源自人类抗体，使得所得嵌合抗体与亲本（例如小鼠来源）抗体相比，在人类个体中引发不良免疫反应的可能性降低。

在本申请中，术语“人源化抗体”通常是指非人抗体（例如小鼠抗体）的 CDR 区以外的部分或全部有的氨基酸被源自人免疫球蛋白的相应的氨基酸置换的抗体。在 CDR 区中，氨基酸的添加、缺失、插入、置换或修饰也可以是允许的，只要它们仍保留抗体结合特定抗原的能力。人源化抗体可任选地包含人类免疫球蛋白恒定区的至少一部分。“人源化抗体”保留类似于原始抗体的抗原特异性。非人（例如鼠）抗体的“人源化”形式可以最低限度地包含衍生自非人免疫球蛋白的序列的嵌合抗体。在某些情形中，可以将人免疫球蛋白（受体抗体）中的 CDR 区残基用具有期望性质、亲和力和/或能力的非人物种（供体抗体）（诸如小鼠，大鼠，家兔或非人灵长类动物）的 CDR 区残基替换。在某些情形中，可以将人免疫球蛋白的 FR 区残基用相应的非人残基替换。此外，人源化抗体可包含在受体抗体中或在供体抗体中没有的氨基酸修饰。

在本申请中，术语“全人源抗体”通常是指将人类编码抗体的基因转移至基因工程改造

的抗体基因缺失动物中，使动物表达的抗体。抗体所有部分（包括抗体的可变区和恒定区）均由人类来源的基因所编码。本领域获得全人源抗体的方法可以有噬菌体展示技术、转基因小鼠技术、核糖体展示技术和 RNA-多肽技术等。

在本申请中，术语“结合”、“特异性结合”或“对…特异性的”通常是指可测量且可再现的相互作用，诸如抗原和抗体之间的结合，其可以确定在存在分子（包括生物学分子）的异质群体的情况中靶物的存在。例如，抗体通过其抗原结合域与表位结合，并且该结合需要抗原结合域和表位之间的一些互补性。例如，特异性结合靶物（其可以是表位）的抗体是相比于其结合其它靶物更大的亲和力、亲合力、更容易和/或以更大的持续时间结合此靶物的抗体。当抗体相比于其将结合随机的、不相关的表位而言更容易通过其抗原结合域与表位结合时，抗体被称为“特异性结合”该抗原。

在本申请中，术语“KD”、“ K_D ”可互换地使用，通常是指平衡解离常数，“KD”是解离速率常数（ k_{dis} ，也称为“解离率（off-rate）（ k_{off} ）”或“ k_d ”）与结合速率常数（ k_{on} ，也称为“结合率（ k_{on} ）”或“ k_a ”）的比值。可使用结合速率常数（ k_{on} ）、解离速率常数（ k_{dis} ）和平衡解离常数（KD）表示抗原结合蛋白（例如抗体）对抗原的结合亲和力。确定结合和解离速率常数的方法为本领域熟知，包括但不限于生物膜干涉技术（BLI）、放射免疫法（RIA）、平衡透析法、表面等离子共振（SPR）、荧光共振能量迁移（FRET）、免疫共沉淀（Co-IP）以及蛋白质芯片技术。如果在不同的条件（例如盐浓度、pH）下测量，则所测得的某种特定蛋白-蛋白相互作用的亲和力可不同。

在本申请中，术语“灵长类动物”通常是指猴和猿物种，并包括猴物种，诸如来自猕猴属（例如，食蟹猴（*Macaca fascicularis*）和或恒河猴（*Macaca mulatta*））和狒狒（豚尾狒狒（*Papio ursinus*））的猴，以及狨猴（来自狨（*Callithrix*）属的物种），松鼠猴（来自松鼠猴（*Saimiri*）属的物种）和绢毛猴（来自怪柳猴（*Saguinus*）属的物种），以及猿物种，诸如黑猩猩（*Pan troglodytes*），并且还包含智人（*Homo sapiens*）。

在本申请中，术语“多肽”或“蛋白质”可互换地使用，通常是指氨基酸残基的聚合物。该术语也适用于其中一个或多个氨基酸残基是相应的天然存在的氨基酸的类似物或模拟物的氨基酸聚合物、以及天然存在的氨基酸聚合物。该术语也可包括修饰的氨基酸聚合物，例如，通过添加糖残基以形成糖蛋白或被磷酸化修饰。多肽和蛋白质可由天然存在的和非重组的细胞或由遗传工程改造的或重组的细胞产生，并且可包含具有天然蛋白质的氨基酸序列的分子、或具有天然序列的一个或多个氨基酸的缺失、添加和/或取代的分子。术语“多

肽”和“蛋白质”特别包括本申请所述的抗原结合蛋白的一个或多个氨基酸的缺失、添加和/或取代的序列。

在本申请中，术语“分离的”通常是指大体上不含其天然存在的环境中通常伴随或与之相互作用的组分的生物材料（例如病毒、核酸或蛋白质）。所述分离的生物材料任选地包含在其天然环境（例如，核酸或蛋白质）中所述生物材料未发现具有的另外的材料。在本申请中，当涉及蛋白质时，“分离”通常是指所述的分子从发现该分子天然存在的整个生物体中分离和分开，或基本不存在其它相同类型的生物大分子。当涉及核酸分子时，它与天然与其结合的序列完全或部分分离，或该核酸具有与其结合的异源序列，或该核算从染色体分离。

在本申请中，术语“免疫缀合物”通常是指抗原结合蛋白与其它活性剂连接形成的物质，其他活性剂可以是小分子活性剂，例如化疗剂、毒素、免疫治疗剂、成像探针或光谱探针。

在本申请中，术语“核酸”分子通常是指从其天然环境中分离的或人工合成的任何长度的分离形式的核苷酸、脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸或其类似物。

在本申请中，术语“载体”通常是指能够在合适的宿主中自我复制的核酸分子，其将插入的核酸分子转移到宿主细胞中和/或宿主细胞之间。所述载体可包括主要用于将 DNA 或 RNA 插入细胞中的载体、主要用于复制 DNA 或 RNA 的载体，以及主要用于 DNA 或 RNA 的转录和/或翻译的表达的载体。所述载体还包括具有多种上述功能的载体。所述载体可以是当引入合适的宿主细胞时能够转录并翻译成多肽的多核苷酸。通常，通过培养包含所述载体的合适的宿主细胞，所述载体可以产生期望的表达产物。

在本申请中，术语“细胞”通常是指可以包含或已经含有包括本申请所述的核酸分子的质粒或载体，或者能够表达本申请所述的抗原结合蛋白的个体细胞、细胞系或细胞培养物。所述细胞可以包括单个宿主细胞的子代。由于天然的、意外的或故意的突变，子代细胞与原始亲本细胞在形态上或在基因组上可能不一定完全相同，但能够表达本申请所述的抗体或其抗原结合片段即可。所述细胞可以通过使用本申请所述的载体体外转染细胞而得到。所述细胞可以是原核细胞（例如大肠杆菌），也可以是真核细胞（例如酵母细胞，例如 COS 细胞，中国仓鼠卵巢（CHO）细胞，HeLa 细胞，HEK293 细胞，COS-1 细胞，NS0 细胞或骨髓瘤细胞）。在某些情形中，所述细胞可以是哺乳动物细胞。例如，所述哺乳动物细胞可以是 CHO-K1 细胞。

在本申请中，术语“药物组合物”通常是指这样的制剂，其以允许活性成分的生物学活性有效的形式存在，并且不包含对将施用所述组合物的对象具有不可接受的毒性的另外的成分。

在本申请中，术语“治疗”通常是指期望改变所治疗个体的天然病程，且可为实现防治或在临床病变过程中进行的临床介入。合乎需要的治疗效果包括但不限于防止疾病发生或复发性、减轻症状、减弱疾病的任何直接或间接病理学后果、防止转移、降低疾病进展速率、改善或缓解疾病状态以及缓和或改善预后。在一些情形中，抗原结合蛋白（例如，抗 VEGF 抗体）可用来延迟疾病发展或减缓疾病进展。

在本申请中，术语“施用”通常是指向受试者（例如，患者）给予一定剂量的化合物（例如，抗癌治疗剂）或药物组合物（例如，包含抗癌治疗剂的药物组合物）的方法。施用可通过任何合适的方式进行，包括肠胃外、肺内和鼻内，以及（如果局部治疗需要）损伤内施用。胃肠外输注包括例如肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。

在本申请中，术语“肿瘤”通常是指所有赘生性细胞生长和增殖（无论恶性还是良性）以及所有癌前和癌性细胞和组织。在本申请中，所述肿瘤可以为细胞和组织的 VEGF 或 VEGFR 高表达的肿瘤。肿瘤可包括实体瘤和/或非实体瘤（例如，血液瘤、淋巴瘤）。

在本申请中，术语“在……之间”通常是指某种氨基酸片段的 C 端与第一氨基酸片段的 N 端直接或间接连接，并且其 N 端与第二氨基酸片段的 C 端直接或间接连接。在轻链中，例如，所述 L-FR2 的 N 末端与所述 LCDR1 的 C 末端直接或间接相连，且所述 L-FR2 的 C 末端与所述 LCDR2 的 N 末端直接或间接相连。又例如，所述 L-FR3 的 N 末端与所述 LCDR2 的 C 末端直接或间接相连，且所述 L-FR3 的 C 末端与所述 LCDR3 的 N 末端直接或间接相连。在重链中，例如，所述 H-FR2 的 N 末端与所述 HCDR1 的 C 末端直接或间接相连，且所述 H-FR2 的 C 末端与所述 HCDR2 的 N 末端直接或间接相连。又例如，所述 H-FR3 的 N 末端与所述 HCDR2 的 C 末端直接或间接相连，且所述 H-FR3 的 C 末端与所述 HCDR3 的 N 末端直接或间接相连。在本申请中，“第一氨基酸片段”和“第二氨基酸片段”可以为相同或不同的任意一段氨基酸片段。

在本申请中，术语“包括”通常是指包含、总括、含有或包涵的含义。在某些情况下，也表示“为”、“由……组成”的含义。

在本申请中，术语“约”通常是指在指定数值以上或以下 0.5%-10% 的范围内变动，例如在指定数值以上或以下 0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、或 10% 的范围内变动。

发明详述

抗原结合蛋白

一方面，本申请提供一种分离的抗原结合蛋白，所述的分离的抗原结合蛋白能够以 $1 \times 10^{-}$

^8M 或更低的 KD 值结合源自灵长类动物 (例如, 人) 的 VEGF (例如, VEGF165)。所述 VEGF 抗原结合蛋白对 VEGF 的结合亲和力可通过本领域已知的任何方法测定。在某些情形中, 结合亲和力可通过表面等离子共振法 (SPR)、酶联免疫法 (ELISA)、结合抗原沉淀法、平衡透析法、生物膜干涉 (BLI) 测定。在某些情形中, VEGF 抗原结合蛋白对 VEGF 的结合亲和力和 KD 值可通过生物膜干涉 (BLI) 测定。例如, 可使用 ForteBio Octet 分子相互作用分析仪, 来进行抗原抗体之间的结合动力学分析。

本申请中, 所述分离的抗原结合蛋白能够以 $1 \times 10^{-7}\text{M}$ 或更低的 KD 值结合 VEGF (例如, VEGF165)。例如, 所述 KD 的值可以以约 $5 \times 10^{-8}\text{M}$ 或以下、约 $4 \times 10^{-8}\text{M}$ 或以下、约 $3 \times 10^{-8}\text{M}$ 或以下、约 $2 \times 10^{-8}\text{M}$ 或以下、约 $1 \times 10^{-8}\text{M}$ 或以下、约 $9 \times 10^{-9}\text{M}$ 或以下、约 $8 \times 10^{-9}\text{M}$ 或以下、约 $7 \times 10^{-9}\text{M}$ 或以下、约 $6 \times 10^{-9}\text{M}$ 或以下、约 $5 \times 10^{-9}\text{M}$ 或以下、约 $4 \times 10^{-9}\text{M}$ 或以下、约 $3 \times 10^{-9}\text{M}$ 或以下、约 $2 \times 10^{-9}\text{M}$ 或以下、约 $1 \times 10^{-9}\text{M}$ 或以下、约 $9 \times 10^{-10}\text{M}$ 或以下、约 $8 \times 10^{-10}\text{M}$ 或以下、约 $7 \times 10^{-10}\text{M}$ 或以下的值结合源自人的 VEGF, 例如, 使用 ForteBio Octet 分子相互作用分析仪所检测的。

本申请所述的抗原结合蛋白能够阻断 VEGF (例如, VEGF165) 与 VEGFR (例如 VEGFR2) 的结合。在某些情形中, 所述的抗原结合蛋白阻断 VEGF 与 VEGFR 的结合可通过流式细胞技术 FACS、酶联免疫法 ELISA 测定。

例如, 首先将人 VEGFR (例如 VEGFR2) 与递减量的未标记的所述抗原结合蛋白孵育, 随后用被标记的 VEGF 蛋白孵育。然后, 检测 OD450, 以证实所述抗原结合蛋白阻断 VEGF (例如, VEGF165) 与 VEGFR (例如 VEGFR2) 结合。例如, 阻断活性的 IC₅₀ 在约 $0.001\mu\text{g/mL}$ 至约 $10\mu\text{g/mL}$ 之间, 约 $0.001\mu\text{g/mL}$ 至约 $5\mu\text{g/mL}$ 之间, 约 $0.01\mu\text{g/mL}$ 至约 $1\mu\text{g/mL}$ 之间, 约 $0.02\mu\text{g/mL}$ 至约 $0.5\mu\text{g/mL}$ 之间, 约 $0.2\mu\text{g/mL}$ 至约 $15\mu\text{g/mL}$ 之间, 约 $0.2\mu\text{g/mL}$ 至约 $12\mu\text{g/mL}$ 之间, 约 $0.2\mu\text{g/mL}$ 至约 $10\mu\text{g/mL}$ 之间, 约 $0.3\mu\text{g/mL}$ 至约 $8\mu\text{g/mL}$ 之间, 约 $0.3\mu\text{g/mL}$ 至约 $6\mu\text{g/mL}$ 之间, 约 $0.5\mu\text{g/mL}$ 至约 $5\mu\text{g/mL}$ 之间, 约 $0.1\mu\text{g/mL}$ 至约 $2\mu\text{g/mL}$ 之间, 或约 $0.5\mu\text{g/mL}$ 至约 $1.5\mu\text{g/mL}$ 之间。

在本申请中, 所述分离的抗原结合蛋白能够与参比抗体竞争结合 VEGF 蛋白, 其中所述参比抗体可包含重链可变区 VH, 所述参比抗体的 VH 可包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 且所述参比抗体的 HCDR1 可包含如 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列, 所述参比抗体的 HCDR2 可包含如 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列, 和, 所述参比抗体的 HCDR3 可包含如 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列。

在本申请中, 所述分离的抗原结合蛋白能够与参比抗体竞争结合 VEGF 蛋白, 所述参比

抗体可包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，且所述参比抗体的 HCDR1 可包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列，所述参比抗体的 HCDR2 可包含 SEQ ID NO: 12-14 中任一项所示的氨基酸序列，所述参比抗体的 HCDR3 可包含 SEQ ID NO: 17-19 中任一项所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白能够与参比抗体竞争结合 VEGF 蛋白，所述参比抗体可包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，且所述参比抗体的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 可以包含选自以下任一组氨基酸序列：

- (1) HCDR1: SEQ ID NO: 9, HCDR2: SEQ ID NO: 12 和 HCDR3: SEQ ID NO: 17;
- (2) HCDR1: SEQ ID NO: 9, HCDR2: SEQ ID NO: 13 和 HCDR3: SEQ ID NO: 17;
- (3) HCDR1: SEQ ID NO: 9, HCDR2: SEQ ID NO: 14 和 HCDR3: SEQ ID NO: 17;
- (4) HCDR1: SEQ ID NO: 9, HCDR2: SEQ ID NO: 13 和 HCDR3: SEQ ID NO: 18;

和

- (5) HCDR1: SEQ ID NO: 9, HCDR2: SEQ ID NO: 13 和 HCDR3: SEQ ID NO: 19。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白可包含至少一个来自 VH 的 CDR，其中所述 VH 可包含 SEQ ID NO: 29 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白可包含至少一个来自 VH 的 CDR，其中所述 VH 可包含 SEQ ID NO: 1-6 中任一项所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白可以是 VHH。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白可包含 HCDR3，所述 HCDR3 可包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 29 所示的 VH 的 CDR3。在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白可包含 HCDR3，所述 HCDR3 可包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1-6 中任一项所示的 VH 的 CDR3。

例如，所述分离的抗原结合蛋白可包含 HCDR3，所述 HCDR3 可包含如 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列：RLRIX₅X₆X₇X₈X₉X₁₀ERLDY (SEQ ID NO: 24)，其中，X₅ 为 P 或 T，X₆ 为 D 或 H，X₇ 为 E，Q 或 W，X₈ 为 R，W 或 Y，X₉ 为 R 或 S，且 X₁₀ 为 R 或 T。例如，该序列可以是根据 Chothia 定义规则确定的序列。

在某些情形中，与 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列相比，所述 HCDR3 可至少包含在选自下组位置处的氨基酸取代：在 X₅、X₆、X₇、X₈、X₉ 和/或 X₁₀ 处的氨基酸取代。

例如，所述 HCDR3 可包含如 SEQ ID NO: 17-19 中任一项所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白可包含 HCDR2，所述 HCDR2 可包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 29 所示的 VH 的 CDR2。在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白可包含 HCDR2，所述 HCDR2 可包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1-6 中任一项所示的 VH 的 CDR2。

例如，所述分离的抗原结合蛋白可包含 HCDR2，所述 HCDR2 可包含如 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列：AVX₃AX₅X₆WX₈YVEDSVX₁₅G（SEQ ID NO: 23），其中，X₃ 为 F 或 L，X₅ 为 E 或 P，X₆ 为 D 或 G，X₈ 为 R 或 S，且 X₁₅ 为 K 或 R。例如，该序列可以是根据 Chothia 定义规则确定的序列。

在某些情形中，与 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列相比，所述 HCDR2 可至少包含在选自下组位置处的氨基酸取代：在 X₃、X₅、X₆、X₈ 和/或 X₁₅ 处的氨基酸取代。

例如，所述 HCDR2 可包含如 SEQ ID NO: 12-14 中任一项所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白可包含 HCDR1，所述 HCDR1 可包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 29 所示的 VH 的 CDR1。在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白可包含 HCDR1，所述 HCDR1 可包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1-6 中任一项所示的 VH 的 CDR1。

例如，所述分离的抗原结合蛋白可包含 HCDR1，所述 HCDR1 可包含如 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白可包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述 HCDR1 可包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 29 所示的 VH 的 CDR1，所述 HCDR2 可包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 29 所示的 VH 的 CDR2，所述 HCDR3 可包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 29 所示的 VH 的 CDR3。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白可包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述 HCDR1 可包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1-6 中任一项所示的 VH 的 CDR1，所述 HCDR2 可包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1-6 中任一项所示的 VH 的 CDR2，所述 HCDR3 可包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1-6 中任一项所示的 VH 的 CDR3。

在本申请中，本申请所述分离的抗原结合蛋白可包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述 HCDR1 可包含如 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 可包含如 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 可包含如 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列。

在本申请中，本申请所述分离的抗原结合蛋白可包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述 HCDR1 可包含如 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 可包含如 SEQ ID NO: 12-14 中任一项所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 可包含如 SEQ ID NO: 17-19 中任一项所示的氨基酸序列。

例如，本申请所述分离的抗原结合蛋白可包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述 HCDR1 可包含如 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 可包含如 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 可包含如 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列。

例如,本申请所述分离的抗原结合蛋白可包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3,所述 HCDR1 可包含如 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列,所述 HCDR2 可包含如 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列,且所述 HCDR3 可包含如 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列。

例如,本申请所述分离的抗原结合蛋白可包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3,所述 HCDR1 可包含如 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列,所述 HCDR2 可包含如 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列,且所述 HCDR3 可包含如 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列。

例如,本申请所述分离的抗原结合蛋白可包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3,所述 HCDR1 可包含如 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列,所述 HCDR2 可包含如 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列,且所述 HCDR3 可包含如 SEQ ID NO: 18 所示的氨基酸序列。

例如,本申请所述分离的抗原结合蛋白可包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3,所述 HCDR1 可包含如 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列,所述 HCDR2 可包含如 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列,且所述 HCDR3 可包含如 SEQ ID NO: 19 所示的氨基酸序列。

在本申请中,所述分离的抗原结合蛋白包可含 H-FR1,所述 H-FR1 可包含如 SEQ ID NO: 25 所示的氨基酸序列: $X_1VQLVESGGGLVQX_{14}GGSX_{18}RLSCAASGSTSD$ (SEQ ID NO: 25), 其中, X_1 为 A 或 E, X_{14} 为 A 或 P, 且 X_{18} 为 A 或 L。例如,该序列可以是根据 Chothia 定义规则确定的序列。

在某些情形中,与 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列相比,所述 H-FR1 可至少包含在选自下组位置处的氨基酸取代: 在 X_1 、 X_{14} 和/或 X_{18} 处的氨基酸取代。

例如,所述 H-FR1 可包含如 SEQ ID NO: 7 或 8 所示的氨基酸序列。

在本申请中,所述分离的抗原结合蛋白包可含 H-FR2,所述 H-FR2 可包含如 SEQ ID NO: 26 所示的氨基酸序列: $WYRQAPGKERXQQLVX_{14}$ (SEQ ID NO: 26), 其中, X_{11} 为 D 或 E, 且 X_{14} 为 A 或 S。例如,该序列可以是根据 Chothia 定义规则确定的序列。

在某些情形中,与 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列相比,所述 H-FR2 可至少包含在选自下组位置处的氨基酸取代: 在 X_{11} 和/或 X_{14} 处的氨基酸取代。

例如,所述 H-FR2 可包含如 SEQ ID NO: 10 或 11 所示的氨基酸序列。

在本申请中,所述分离的抗原结合蛋白包可含 H-FR3,所述 H-FR3 可包含如 SEQ ID NO: 27 所示的氨基酸序列:

$RFTISRDNX_9KNTVX_{14}LQMNX_{19}LX_{21}X_{22}EDTAX_{27}YYCNV$ (SEQ ID NO: 27), 其中, X_9 为 S 或 T, X_{14} 为 D 或 Y, X_{19} 为 N 或 S, X_{21} 为 K 或 R, X_{22} 为 A 或 P, 且 X_{27} 为 I 或 V。例如,该序列可以是根据 Chothia 定义规则确定的序列。

在某些情形中，与 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列相比，所述 H-FR3 可至少包含在选自下组位置处的氨基酸取代：在 X₉、X₁₄、X₁₉、X₂₁、X₂₂ 和/或 X₂₇ 处的氨基酸取代。

例如，所述 H-FR3 可包含如 SEQ ID NO: 15 或 16 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白包可含 H-FR4，所述 H-FR4 可包含如 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列：WG₃X₃GT₆X₆VT₁V₂SS（SEQ ID NO: 28），其中，X₃ 为 K 或 Q，且 X₆ 为 L、Q 或 T。例如，该序列可以是根据 Chothia 定义规则确定的序列。

在某些情形中，与 SEQ ID NO: 20 所示的氨基酸序列相比，所述 H-FR4 可至少包含在选自下组位置处的氨基酸取代：在 X₃ 和/或 X₆ 处的氨基酸取代。

例如，所述 H-FR4 可包含如 SEQ ID NO: 20-22 中任一项所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白可包含重链可变区 VH，所述 VH 可包含 SEQ ID NO: 29 所示的氨基酸序列：

X₁VQLVESGGGLVQX₁₄GG₁₈SX₁₈RLSCAASGSTSDIVSMAWYRQAPGKERX₄₆LVX₄₉AVX₅₂AX₅₄X₅₅WX₅₇YVEDSVX₆₄GRFTISRDNX₇₄KNTVX₇₉LQMNX₈₄LX₈₆X₈₇EDTAX₉₂YYCNVRLR IX₁₀₂X₁₀₃X₁₀₄X₁₀₅X₁₀₆X₁₀₇ERLDYWG₁₁₅X₁₁₅GT₁₁₈X₁₁₈VT₁V₂SS（SEQ ID NO: 29），其中，X₁ 为 A 或 E，X₁₄ 为 A 或 P，X₁₈ 为 A 或 L，X₄₆ 为 D 或 E，X₄₉ 为 A 或 S，X₅₂ 为 F 或 L，X₅₄ 为 E 或 P，X₅₅ 为 D 或 G，X₅₇ 为 R 或 S，X₆₄ 为 K 或 R，X₇₄ 为 S 或 T，X₇₉ 为 D 或 Y，X₈₄ 为 N 或 S，X₈₆ 为 K 或 R，X₈₇ 为 A 或 P，X₉₂ 为 I 或 V，X₁₀₂ 为 P 或 T，X₁₀₃ 为 D 或 H，X₁₀₄ 为 E，Q 或 W，X₁₀₅ 为 R，W 或 Y，X₁₀₆ 为 R 或 S，X₁₀₇ 为 R 或 T，X₁₁₅ 为 K 或 Q，且 X₁₁₈ 为 L、Q 或 T。例如，该序列可以是根据 Chothia 定义规则确定的序列。

在某些情形中，与 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列相比，所述 VH 可至少包含在选自下组位置处的氨基酸取代：在 X₁、X₁₄、X₁₈、X₄₆、X₄₉、X₅₂、X₅₄、X₅₅、X₅₇、X₆₄、X₇₄、X₇₉、X₈₄、X₈₆、X₈₇、X₉₂、X₁₀₂、X₁₀₃、X₁₀₄、X₁₀₅、X₁₀₆、X₁₀₇、X₁₁₅ 和/或 X₁₁₈ 处的氨基酸取代。

例如，所述 VH 可包含 SEQ ID NO: 1-6 中任一项所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白可以是 VHH。例如，所述 VHH 可包含 SEQ ID NO: 1-6 中任一项所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述抗原结合蛋白每个重链或轻链氨基酸序列的一部分与来自特定物种的抗体中相应氨基酸序列同源，或者属于特定的类别。例如，轻链和重链的可变区及恒定部分均来自一个动物物种（如人）的抗体的可变区及恒定区。在本申请中，所述同源物可以为，与所述蛋白质和/或所述多肽（例如，特异性结合 VEGF 蛋白的抗体或其片段）的氨基酸序列具有至少约 85%（例如，具有至少约 85%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约

95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99%或更高的) 序列同源性的蛋白质或多肽。

在本申请中, 所述同源性通常是指两个或多个序列之间的相似性、类似或关联。为了确定序列同源性百分数而进行的比对, 可以按本领域已知的多种方式实现, 例如, 使用可公开获得的计算机软件如 BLAST、BLAST-2、ALIGN 或 Megalign (DNASTAR) 软件。本领域技术人员可以确定用于比对序列的适宜参数, 包括为实现正在比较的全长序列范围内或目标序列区域内最大比对所需要的任何算法。所述同源性也可以通过以下的方法测定: FASTA 和 BLAST。对 FASTA 算法的描述可以参见 W. R. Pearson 和 D. J. Lipman 的“用于生物学序列比较的改进的工具”, 美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci.), 85: 2444-2448, 1988; 和 D. J. Lipman 和 W. R. Pearson 的“快速灵敏的蛋白质相似性搜索”, Science, 227: 1435-1441, 1989。对 BLAST 算法的描述可参见 S. Altschul、W. Gish、W. Miller、E. W. Myers 和 D. Lipman 的“一种基本的局部对比 (alignment) 搜索工具”, 分子生物学杂志, 215: 403-410, 1990。

核酸、载体、宿主细胞和制备方法

在另一个方面, 本申请还提供了分离的一种或多种核酸分子, 所述一种或多种核酸分子可编码本申请所述的抗原结合蛋白。例如, 所述一种或多种核酸分子中的每一个核酸分子可以编码完整的所述抗原结合蛋白, 也可以编码其中的一部分 (例如, HCDR1-3、LCDR1-3、VL、VH、轻链或重链中的一种或多种)。

本申请所述的核酸分子可以为分离的。例如, 其可以通过以下方法产生或合成的: (i) 在体外扩增的, 例如通过聚合酶链式反应 (PCR) 扩增产生的, (ii) 通过克隆重组产生的, (iii) 纯化的, 例如通过酶切和凝胶电泳分级分离, 或者 (iv) 合成的, 例如通过化学合成。在某些实施方式中, 所述分离的核酸是通过重组 DNA 技术制备的核酸分子。

在本申请中, 可以通过本领域已知的多种方法来制备编码所述抗体、其抗原结合片段的核酸, 这些方法包括但不限于, 采用限制性片段操作或采用合成性寡核苷酸的重叠延伸 PCR。

在另一个方面, 本申请提供了一种或多种载体, 其包含本申请所述的一种或多种核酸分子。每种载体中可包含一种或多种所述核酸分子。此外, 所述载体中还可包含其他基因, 例如允许在适当的宿主细胞中和在适当的条件下选择该载体的标记基因。此外, 所述载体还可包含允许编码区在适当宿主中正确表达的表达控制元件。例如, 所述载体为表达载体。

在另一个方面, 本申请提供了宿主细胞, 所述宿主细胞可包含本申请所述的一种或多种核酸分子和/或本申请所述的一种或多种载体。在某些实施方式中, 每种或每个宿主细胞可包含一个或一种本申请所述的核酸分子或载体。在某些实施方式中, 每种或每个宿主细胞可包

含多个（例如，2个或以上）或多种（例如，2种或以上）本申请所述的核酸分子或载体

在另一个方面，本申请提供了制备所述的抗体或其抗原结合片段的方法。所述方法可包括，在使得所述的抗体或其抗原结合片段表达的条件下，培养所述本申请所述的宿主细胞。例如，可通过使用适当的培养基、适当的温度和培养时间等，这些方法是本领域普通技术人员所了解的。

药物组合物、方法、用途

在另一个方面，本申请提供了一种药物组合物，其可包含本申请所述的抗原结合蛋白，所述多肽，所述的核酸分子，所述的载体，所述的宿主细胞，以及任选地药学上可接受的载体。所述药学上可接受的佐剂在所采用的剂量和浓度下对接受者无毒性，本申请中的药物组合物还可含有多于一种活性化合物，通常为不会不利地影响彼此的具有互补活性的那些活性化合物。此类药物的类型和有效量取决于例如制剂中存在的拮抗剂的量和类型，以及受试者的临床参数。

所述药物组合物可以用于抑制肿瘤生长。例如，本申请的药物组合物可以抑制或延缓疾病的发展或进展，可以减小肿瘤大小（甚至基本消除肿瘤），和/或可以减轻和/或稳定疾病状态。

本申请所述的药物组合物可以包含预防和/或治疗有效量的所述抗体、其抗原结合片段。所述预防和/或治疗有效量是能够预防和/或治疗（至少部分治疗）患有或具有发展风险的受试者中的疾病或病症和/或其任何并发症而所需的剂量。

另一方面，本申请提供了所述抗原结合蛋白和/或所述融合蛋白在制备药物中的用途。所述药物用于治疗癌症，抑制肿瘤生长和/或抑制肿瘤细胞增殖。在某些实施方式中，所述肿瘤包括 VEGF 过表达的肿瘤。在某些实施方式中，所述肿瘤包括 VEGFR 过表达的肿瘤。在某些实施方式中，所述肿瘤包括实体瘤和/或非实体瘤。在某些实施方式中，所述肿瘤包括肺癌、结直肠癌、乳腺癌、肾癌、胃癌、肝癌、母细胞瘤、宫颈癌和/或卵巢癌。

另一方面，本申请提供了抑制 VEGF 蛋白与 VEGFR 蛋白结合的方法，包括施用本申请所述的抗原结合蛋白和/或所述多肽。例如，所述方法可以是离体或体外方法。例如，所述方法可以是非治疗目的的方法。在某些情形中，所述方法可包括使生物样品与本申请所述的抗原结合蛋白和/或 VEGFR 在容许所述抗原结合蛋白和/或 VEGFR 结合 VEGF 的条件下接触，检测在所述抗原结合蛋白与 VEGF 之间是否形成复合物，和检测 VEGF 与 VEGFR 之间是否形成复合物。

另一方面，本申请提供了一种用于检测 VEGF 蛋白的存在和/或含量的方法，其包括施用

所述分离的抗原结合蛋白和/或所述的多肽。例如，所述方法可以是离体或体外方法。例如，所述方法可以是非治疗目的的方法。

本申请还提供了抗原结合蛋白在诊断患有肿瘤或癌症的受试者的方法中的用途，所述方法包括：通过使样品与本申请的抗原结合蛋白接触并检测结合的抗体的存在来确定获自受试者的样品中 VEGF 的存在或表达水平。

另一方面，本申请提供了一种抗体药物偶联物，其可以包含细胞毒性剂，以及本申请所述的抗原结合片段。抗体药物偶联物通常是指采用特定的连接子将抗体和小分子细胞毒药物连接起来，其主要组成成分可以包括抗体、连接子和小分子细胞毒药物。

另一方面，本申请提供了一种试剂盒，其可以包含本申请所述的抗原结合蛋白，嵌合抗原受体，基因修饰的细胞，抗体药物偶联物，和/或本申请所述的药物组合物。其可在单一常用容器中包括本申请所述的抗原结合蛋白，嵌合抗原受体，基因修饰的细胞，和/或抗体药物偶联物，也可任选地与一种或多种治疗剂组合，任选地一起配制于药物组合物中。

另一方面，本申请提供了一种给药装置，它可以用来施用本申请所述的抗原结合蛋白或其药物组合物。

不欲被任何理论所限，下文中的实施例仅仅是为了阐释本申请发明的各个技术方案，而不适用于限制本申请发明的范围。

实施例

实施例 1 抗 VEGF 单域抗体制备与检测

采取三只未免疫目的抗原的羊驼的血样，每只取 150 ml。从血样中分离淋巴细胞提取总 RNA，构建噬菌体展示纳米抗体文库，库容大小为 3×10^9 cfu。取 6 ml 转化的抗体文库菌制备噬菌体用于特异性淘选，菌体总量大于库容 50 倍。

将 50 ml Streptavidin Magnetic Beads (Thermo fisher, 货号: 88817) 预结合 1 ml 噬菌体室温孵育 30 min，去除非特异性结合。取除背景后的纳米抗体文库噬菌体加入 10 ug Biotinylated Human VEGF165 (百普赛斯, 货号: VE5-H82Q0), 150 ul Streptavidin Magnetic Beads, 室温孵育 15 min, PBST (PBS 中含有 0.05% Tween-20) 洗 14 遍，洗去不结合的噬菌体。用 450 ul 100 mM 盐酸洗脱抗原特异性结合的噬菌体，加入 50 ul pH11 的 1M Tris-HCl 中和并感染处于对数生长期的大肠杆菌 SS320，产生并纯化噬菌体用于下一轮的筛选。筛选方法与第一轮相同，仅将抗原用量减为 4 ug。取两轮筛选后富集的噬菌体用酶联免疫 (ELISA) 鉴定富集情况，结果如下表 1 所示，结果表明，经过两轮淘选后噬菌体富集明显。

表 1 第二轮富集后的 Phage Elisa 鉴定

包被抗原	样品孔	对照孔
OD450 nm 吸收值	1.0713	0.1799

实施例 2 单域抗体筛选及体外活性鉴定

以实施例 1 中的单域抗体库两轮淘选后质粒为模板,设计引物进行聚合酶链式反应(PCR)扩增纳米抗体基因 (V_HH); PCR 扩增的 V_HH 基因片段回收后与酵母展示质粒共转入酿酒酵母菌株 EBY100 (购自 ATCC),通过酿酒酵母的同源重组使 VHH 基因插入至酵母展示质粒中,进而实现在酵母细胞壁表面展示单域抗体,构建方案如图 1 所示。

使用流式分选仪对酵母展示文库进行两轮分选,将分选获得的酵母菌涂布营养缺陷型平板培养基,挑 46 个单克隆进行测序,最终获得 5 个独一无二序列的单域重链抗体。鉴定方案如表 2 所示。对相应的酵母单克隆菌落进行流式染色分析,取 1×10⁶ 个细胞按表 2 各方案进行染色,方案 1 与 human VEGF165-Bio 结合细胞群的强弱由 PE 平均荧光信号强度 (MFI) 反映,同理方案 2 和方案 3 可以评估 Mouse VEGF-Bio 以及非特异性的结合水平,方案 4 竞争信号由 APC 平均荧光信号强度 (MFI) 反映,结果如表 3。由表 3 可知,排除与人 VEGF、鼠 VEGF 不结合的克隆,最终获得抗人 VEGF165 单域重链抗体的单克隆 Y20A6, Y20A6 的结合及竞争的能力均理想。

表 2 单克隆酵母菌落流式染色鉴定方案

方案	一抗	二抗	三抗
1	10 nM 人 VEGF-Bio; 鼠抗 V5 (thermo fisher, 货号: R960-25)	Streptavidin-PE ; 山羊抗鼠 - Alexa Fluor 647 (thermo fisher, 货号: A-21235)	无
2	10 nM 鼠 VEGF-Bio; Mouse Anti V5	Streptavidin-PE ; 山羊抗鼠 - Alexa Fluor 647	无
3	10 nM 无关抗原; 鼠抗 V5	Streptavidin-PE ; 山羊抗鼠 - Alexa Fluor 647	无
4	10 nM 人 VEGF-Bio	10 nM 贝伐单抗	Streptavidin-PE; 小鼠抗人 IgG Fc-APC

表 3 酵母展示文库二轮筛选后酵母单克隆菌落流式染色分析结果

克隆编号	人 VEGF 结合信号	鼠 VEGF 结合信号	无关抗原结合信号	竞争信号
Y20A6	1477	1441	21.8	25.4

实施例 3 单域抗体人源化

3.1 单域抗体人源化设计与表达

对单克隆抗体 Y20A6 的序列进行 IMGT/Domain Gap Align，查找与其同源性最高的人源的 germline 为 IGHV3-23*04。抗体序列按 Chothia 规则编号，对 H1，H14，H18 等位点序列不同的位点进行如表 4 突变，蛋白编号 Ab1910VE6 为人源化前的初始抗体。

表 4 单域抗体序列人源化设计

蛋 白 编号	Chothe a	H 1	H 1 4	H 1 8	H 4 4	H 4 5	H 4 6	H 4 9	H 5 7	H 5 9	H 6 0	H 6 4	H 7 4	H 7 9	H8 2B	H 8 3	H 8 4	H 8 9	H 10 5	H 10 8
	IGHV3 -23*04	E	P	L	G	L	E	S	T	Y	A	K	S	Y	S	R	A	V	Q	L
Ab19 10VE 6	Y20A6	A	A	A	E	R	D	A	R	V	E	R	T	D	N	K	P	I	Q	Q
Ab19 10VE 8	H20A 6.2	E	P	L	E	R	E	S	R	V	E	K	S	Y	S	R	A	V	K	T
Ab19 10VE 9	H20A 6.3	E	P	L	E	R	E	S	R	V	E	K	S	Y	S	R	A	V	Q	L

将表 4 中各全长序列与 IgG1 Fc N297A（采购自泰州市百英生物科技有限公司）融合，进行密码子优化，基因合成后装入表达载体 pcDNA3.4（Life Technologies）。表达质粒扩增和质粒抽提后质粒转入 ExpiCHO 细胞（ThermoFisher Scientific, A29133），根据供应商 ExpiCHO 表达系统方法进行抗体瞬转表达，得到纯化的抗体见表 5。

表 5 单域抗体表达、纯化数据

抗体编号	理论等电点	产量（mg）	表达量（mg/L）	浓度（mg/mL）
Ab1910VE6	7	0.89	89	4.6
Ab1910VE8	7.4	0.48	48	4.8
Ab1910VE9	7	0.75	75	3.8

实施例 4 本申请抗原结合蛋白与人 VEGF165 的结合活性测定

（1）采用 Octet RED96e（Fortebio）测定 Ab1910VE6、AB1910VE8 及 Ab1910VE9 与人 VEGF165（Acro, 货号：VE5-H82Q0）的亲和力，抗原及抗体均用 1xPBST（1xPBS：生工，B548117-0500；0.02%吐温 20：sigma-alorich, P1379）稀释，抗原使用浓度为 100 nM，抗体使用浓度为 50 nM。

（2）样品上机检测（Octet Data Acquisition 11.1.0.11）：首先，将样品加入 96 孔板（Greiner bio-one, 655209），体系为 200 μL/well。然后设置软件参数，板温设定为 30℃，收集标准动

力学信号的频率为 5.0 HZ。接着，用 1xPBST 预湿 AHC 传感器（Fortébio, 货号：18-0015）10 分钟，然后上机检测。每个循环包含以下步骤：1) 浸入缓冲液 60 秒；2) 检测抗原是否与传感器有非特异性结合；3) 10 mM pH1.7 的甘氨酸溶液再生；4) 浸入缓冲液 60 秒；5) 抗体固化在传感器上，时间为 20 秒；6) 传感器浸入缓冲液 180 秒；7) 抗原与抗体结合，时间 180 秒；8) 抗原抗体的解离，时间 10 分钟；9) 传感器再生。

(3) 数据分析

采用 Fortebio 的 Data Analysis 11.0 软件，对抗原-抗体以 1:1 的结合方式，测定结合速率（ K_a ）和解离速率（ K_d ），以此计算抗体的平衡解离常数（ K_D ）。结果如表 6。Ab1910VE6、AB1910VE8 和 Ab1910VE9 与人 VEGF 亲和力均较强。说明本申请抗原结合蛋白与 VEGF 的结合亲和力高。

表 6 单域抗体与人 VEGF165 的亲和力

候选抗体	响应值	K_D (M)	k_{on} (1/Ms)	k_{dis} (1/s)
AB1910VE6	0.4416	6.304E-09	1.41E+06	8.88E-03
AB1910VE8	0.4095	1.052E-08	1.75E+06	1.84E-02
AB1910VE9	0.4062	9.913E-09	1.82E+06	1.81E-02
Bevacizumab	0.3414	<1.0E-12	6.75E+05	<1.0E-07

实施例 5 本申请抗原结合蛋白阻断人 VEGF165 与人 VEGFR2 结合的活性测定

采用竞争 ELISA 方法测定单域抗体阻断 VEGF165 和人 VEGFR2 的结合，具体实施步骤如下：将人 VEGFR2（Acro, 货号：KDR-H5227）用 PBS（Gibco, 货号：10010-023）稀释到 1 μ g/mL，加入到 96 孔板中，每孔 100 μ L，贴封板膜，置于 4 度孵育过夜。第二天用洗涤液 PBST(0.05% TWEEN-20: sigma-alorich, P1379) 洗板 3 次，继而用洗涤液配制封闭液 PBST+2%BSA（BSA: VWR,0332-1KG），每孔加入 300 μ L 封闭液，37 $^{\circ}$ C 封闭 1 小时。用封闭液配制 Anti-VEGF 和 Biotin-hVEGF(Acro, 货号：VE5-H82Q0)，Anti-VEGF 的配制起始浓度为 200 μ g/mL，5 倍梯度稀释（7 个浓度点+1 个 0 浓度点），Biotin-hVEGF 的配制浓度为 90 ng/mL。继而取出封闭好的酶标板，用洗涤液洗板 3 次，取 50 μ L 稀释后的 Anti-VEGF 加入到 96 孔板中，再取 50 μ L 的 Biotin-hVEGF 加入到 96 孔板中，37 $^{\circ}$ C 共孵育 1 小时。用洗涤液洗板 3 次，封闭液 1: 5000 稀释二抗 SA-HRP（sigma, S2438），以 100 μ L/孔加至酶标板内，37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。用洗涤液洗板 3 次，每孔加入 100 μ L TMB 显色液（Biopanda, 货号：TMB-S-003），室温避光显色，然后每孔加入 50 μ L 终止液（Solarbio, 货号：C1058）终止反应，在 450nm 波长处测定吸光值。结果显示（图 2），Ab1910VE8、Ab1910VE9 和 Ab1910VE6

的阻断能力均较强。说明本申请抗原结合蛋白具有良好的阻断 VEGF 和 VEGFR 结合的效果。

实施例 6 本申请抗原结合蛋白亲和力成熟及体外鉴定

6.1 单域抗体亲和力成熟文库构建

选择 Ab1910VE9 序列进行亲和力成熟，将 Ab1910VE9 的 CDR 区按 Chothia 定义。对可
变区 CDR1、CDR2、CDR3，设计 NNK 突变引物进行聚合酶链式反应（PCR）扩增各 CDR
突变文库基因片段。根据文献所述方法，将各 CDR 突变文库基因片段与酵母展示质粒分别转
入酿酒酵母菌株 EBY100（购自 ATCC），使各 CDR 突变文库展示于酵母表面。同时将
Ab1910VE9 的亲本序列展示于酵母表面，作为对照使用。

文库经过培养、诱导后，使用 Biotin-Human VEGF165 进行三轮分选，起始浓度 3 nM，
10 倍梯度稀释。收集展示水平高且与抗原结合能力强的细胞群；分选后细胞涂布于 SD-Trp
固体培养基，30℃静置培养 3 天。

6.2 单克隆鉴定

挑取单克隆送测序，对获得的单克隆进行流式染色鉴定，与 1 nM Biotin-Human VEGF165
孵育染色，比较不同克隆的展示平均荧光信号强度与抗原结合平均荧光信号强度的比值，反
映了单个分子与抗原的结合能力。根据结合力数值，选取各 CDR 区不同突变序列共 3 个分子
进行后续体外评估，具体见表 7。

表 7 单克隆鉴定结果与抗体表达编号

抗体编号	克隆编号	1 nM Human VEGF165-Biotin			备注
		展示 MFI	结合 MFI	结合力	
Ab1910VE18	Ab1910VE9	3583	42.1	11.7	亲本序列
Ab1910VE21	YC41D1	3431	337	98.2	亲和力成熟突变序列
Ab1910VE23	YC43H2	2770	358	129.2	
Ab1910VE24	YC43B1	4395	503	114.4	

6.3 亲和力成熟单域抗体表达及 SEC-HPLC 纯度分析

将表 7 中各单域抗体进行表达、纯化。对表达抗体进行 SEC-HPLC 纯度分析，方法如下：

（1）将样品稀释至 1mg/mL，混匀，12000rpm 离心 5min，取上清转至样品瓶，放入 HPLC
样品盘。设置色谱条件如下：

色谱条件	参数
色谱柱	TSK G3000SWxl
检测波长	280nm

柱温	25℃
样品室温度	5℃
流速	0.5ml/min

(2) 色谱柱采用流动相 (200mM 磷酸盐缓冲液, pH6.8) 平衡后, 进样分析, 用色谱软件进行数据分析, 峰面积归一化法计算各个峰的峰面积百分比。

具体结果见表 8。

表 8 亲和力成熟单域抗体表达、纯化数据

抗体编号	理论等电点	产量 (mg)	表达 (mg/L)	浓度 (mg/ml)	单体率 (%)
Ab1910VE18	7.5	3.26	130	2.17	96.4
Ab1910VE21	7.6	3.54	142	2.36	96.9
Ab1910VE23	7.5	2.54	101	1.69	96.2
Ab1910VE24	7.3	2.79	112	1.86	96.5

实施例 7 本申请抗原结合蛋白动力学参数测定

参照实施例 4 的方法, 测定亲和力成熟前后抗体与人 VEGF165 的亲和力。

表 9 亲和力成熟抗体与人 VEGF165 的亲和力

本申请抗体	响应值	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
Ab1910VE18	0.1421	2.227E-09	1.81E+06	4.03E-03
Ab1910VE21	0.1536	4.126E-10	1.24E+06	5.10E-04
Ab1910VE23	0.1164	7.276E-10	1.43E+06	1.04E-03
Ab1910VE24	0.1532	6.257E-10	1.37E+06	8.57E-04
Bevacizumab	0.2211	<1.0E-12	3.50E+05	<1.0E-07

结果如表 9, Ab1910VE18 为亲和力成熟前的分子, 成熟后的抗体分子亲和力提高约 2-5 倍。说明本申请抗原结合蛋白与 VEGF 的结合亲和力高。

实施例 8 本申请抗原结合蛋白阻断人 VEGF165 和人 VEGFR2 的结合功能实验

参照实施例 5 的方法, 测定亲和力成熟 VEGF 抗体阻断人 VEGF165 和人 VEGFR2 的结合功能实验, 其中 Biotin-hVEGF165 的配制浓度为 700 ng/mL。实验结果如图 3, Ab1910VE18, Ab1910VE21, Ab1910VE24 抗体的阻断效果和 Bevacizumab 相当。说明本申请抗原结合蛋白具有良好的阻断 VEGF 和 VEGFR 结合的效果。

前述详细说明是以解释和举例的方式提供的, 并非要限制所附权利要求的范围。目前本申请所列举的实施方式的多种变化对本领域普通技术人员来说是显而易见的, 且保留在所附的权利要求和其等同方式的范围内。

权 利 要 求 书

1. 分离的抗原结合蛋白，其具有下述性质中的一种或多种：
 - (1) 能够以 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 或更低的 K_D 值结合 VEGF 蛋白；和
 - (2) 能够阻断 VEGF 蛋白与 VEGFR 蛋白之间结合。
2. 根据权利要求 1 所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述 VEGF 蛋白包括 VEGF165。
3. 根据权利要求 1-2 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述 VEGFR 蛋白包括 VEGFR2。
4. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其包括抗体或其抗原结合片段。
5. 根据权利要求 4 所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述抗原结合片段包括 Fab, Fab', F(ab)₂、Fv 片段、F(ab')₂、scFv、di-scFv、VHH 和/或 dAb。
6. 根据权利要求 4 或 5 所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述抗原结合片段为 VHH。
7. 根据权利要求 4-6 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述抗体选自下组：单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体和全人源抗体。
8. 根据权利要求 1-7 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其能够与参比抗体竞争结合所述 VEGF 蛋白，其中所述参比抗体包含重链可变区 VH，所述参比抗体的 VH 包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，且所述参比抗体的 HCDR1 包含如 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列，所述参比抗体的 HCDR2 包含如 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列，和，所述参比抗体的 HCDR3 包含如 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列。
9. 根据权利要求 8 所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述参比抗体的 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列。
10. 根据权利要求 8-9 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述参比抗体的 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 12-14 中任一项所示的氨基酸序列。
11. 根据权利要求 8-10 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述参比抗体的 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 17-19 中任一项所示的氨基酸序列。
12. 根据权利要求 1-11 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其包含 VH 中的至少一个 CDR，所述 VH 包含如 SEQ ID NO: 29 所示的氨基酸序列。
13. 根据权利要求 1-12 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其包含 VH 中的至少一个 CDR，所述 VH 包含如 SEQ ID NO: 1-6 中任一项所示的氨基酸序列。
14. 根据权利要求 1-13 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其包含 HCDR3，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列。
15. 根据权利要求 14 所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 17-19 中任一项所示的氨基酸序列。

16. 根据权利要求 1-15 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其包含 HCDR2，且所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列。
17. 根据权利要求 16 所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 12-14 中任一项所示的氨基酸序列。
18. 根据权利要求 1-17 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其包含 HCDR1，且所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列。
19. 根据权利要求 1-18 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，其中所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列。
20. 根据权利要求 1-19 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，其中所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 12-14 中任一项所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 17-19 中任一项所示的氨基酸序列。
21. 根据权利要求 1-20 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，且所述 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 选自以下任一组氨基酸序列：
 - (1) HCDR1: SEQ ID NO: 9, HCDR2: SEQ ID NO: 12 和 HCDR3: SEQ ID NO: 17;
 - (2) HCDR1: SEQ ID NO: 9, HCDR2: SEQ ID NO: 13 和 HCDR3: SEQ ID NO: 17;
 - (3) HCDR1: SEQ ID NO: 9, HCDR2: SEQ ID NO: 14 和 HCDR3: SEQ ID NO: 17;
 - (4) HCDR1: SEQ ID NO: 9, HCDR2: SEQ ID NO: 13 和 HCDR3: SEQ ID NO: 18;和
 - (5) HCDR1: SEQ ID NO: 9, HCDR2: SEQ ID NO: 13 和 HCDR3: SEQ ID NO: 19。
22. 根据权利要求 1-21 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其包含重链可变区 VH，其中所述 VH 包括框架区 H-FR1，所述 H-FR1 的 C 末端与所述 HCDR1 的 N 末端直接或间接相连，且所述 H-FR1 包含 SEQ ID NO: 25 所示的氨基酸序列。
23. 根据权利要求 22 所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述 H-FR1 包含 SEQ ID NO: 7-8 中任一项所示的氨基酸序列。
24. 根据权利要求 22-23 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述 VH 包括框架区 H-FR2，所述 H-FR2 位于所述 HCDR1 与所述 HCDR2 之间，且所述 H-FR2 包含 SEQ ID NO: 26 所示的氨基酸序列。
25. 根据权利要求 24 所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述 H-FR2 包含 SEQ ID NO: 10-11

中任一项所示的氨基酸序列。

26. 根据权利要求 22-25 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述 VH 包括框架区 H-FR3，所述 H-FR3 位于所述 HCDR2 与所述 HCDR3 之间，且所述 H-FR3 包含 SEQ ID NO: 27 所示的氨基酸序列。
27. 根据权利要求 26 所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述 H-FR3 包含 SEQ ID NO: 15-16 中任一项所示的氨基酸序列。
28. 根据权利要求 22-27 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述 H-FR4 的 N 末端与所述 HCDR3 的 C 末端相连，且所述 H-FR4 包含 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列。
29. 根据权利要求 28 所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述 H-FR4 包含 SEQ ID NO: 20-22 中任一项所示的氨基酸序列。
30. 根据权利要求 1-29 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其包含 H-FR1、H-FR2、H-FR3 和 H-FR4，其中所述 H-FR1 包含 SEQ ID NO: 25 所示的氨基酸序列，所述 H-FR2 包含 SEQ ID NO: 26 所示的氨基酸序列，所述 H-FR3 包含 SEQ ID NO: 27 所示的氨基酸序列且所述 H-FR4 包含 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列。
31. 根据权利要求 1-30 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其包含 H-FR1、H-FR2、H-FR3 和 H-FR4，其中所述 H-FR1 包含 SEQ ID NO: 7 或 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列，所述 H-FR2 包含 SEQ ID NO: 10 或 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列，所述 H-FR3 包含 SEQ ID NO: 15 或 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列，且所述 H-FR4 包含 20-22 中任一项所示的氨基酸序列。
32. 根据权利要求 1-31 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其包含 H-FR1、H-FR2、H-FR3 和 H-FR4，且所述 H-FR1、H-FR2、H-FR3 和 H-FR4 选自以下任一组氨基酸序列：
 - (1) H-FR1: SEQ ID NO: 7, H-FR2: SEQ ID NO: 10, H-FR3: SEQ ID NO: 15 和 H-FR4: SEQ ID NO: 20;
 - (2) H-FR1: SEQ ID NO: 8, H-FR2: SEQ ID NO: 11, H-FR3: SEQ ID NO: 16 和 H-FR4: SEQ ID NO: 21; 和
 - (3) H-FR1: SEQ ID NO: 8, H-FR2: SEQ ID NO: 11, H-FR3: SEQ ID NO: 16 和 H-FR4: SEQ ID NO: 22。
33. 根据权利要求 1-32 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其包含重链可变区 VH，且所述 VH 包含 SEQ ID NO: 29 所示的氨基酸序列。
34. 根据权利要求 33 所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述 VH 包含 SEQ ID NO: 1-6 中任

一项所示的氨基酸序列。

35. 分离的一种或多种核酸分子,其编码权利要求 1-34 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白。
36. 载体,其包含根据权利要求 35 所述的核酸分子。
37. 细胞,其包含根据权利要求 35 所述的核酸分子或根据权利要求 36 所述的载体。
38. 制备权利要求 1-34 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白的方法,所述方法包括在使得权利要求 1-34 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白表达的条件下,培养根据权利要求 37 所述的细胞。
39. 药物组合物,其包含权利要求 1-34 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白、权利要求 35 所述的核酸分子、权利要求 36 所述的载体和/或权利要求 37 所述的细胞,以及任选地药学上可接受的载体。
40. 多肽,其包含权利要求 1-34 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白。
41. 免疫缀合物,其包含权利要求 1-34 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白或权利要求 40 所述的多肽。
42. 权利要求 1-34 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白、权利要求 35 所述的核酸分子、权利要求 36 所述的载体、权利要求 37 所述的细胞、权利要求 39 所述的药物组合物、权利要求 40 所述的多肽和/或权利要求 41 所述的免疫缀合物在制备药物中的用途,所述药物用于预防、缓解和/或治疗肿瘤。
43. 根据权利要求 42 所述的用途,其中所述肿瘤包括 VEGF 过表达的肿瘤。
44. 根据权利要求 42 或 43 所述的用途,其中所述肿瘤包括实体瘤和/或非实体瘤。
45. 根据权利要求 42-44 中任一项所述的用途,其中所述肿瘤包括肺癌、结直肠癌、乳腺癌、肾癌、胃癌、肝癌、母细胞瘤、宫颈癌和/或卵巢癌。
46. 预防、缓解或治疗肿瘤的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用权利要求 1-34 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白、权利要求 35 所述的核酸分子、权利要求 36 所述的载体、权利要求 37 所述的细胞、权利要求 39 所述的药物组合物、权利要求 40 所述的多肽和/或权利要求 41 所述的免疫缀合物。
47. 根据权利要求 46 所述的方法,其中所述肿瘤包括 VEGF 过表达的肿瘤。
48. 根据权利要求 46 或 47 所述的方法,其中所述肿瘤包括实体瘤和/或非实体瘤。
49. 根据权利要求 46-48 中任一项所述的方法,其中所述肿瘤包括肺癌、结直肠癌、乳腺癌、肾癌、胃癌、肝癌、母细胞瘤、宫颈癌和/或卵巢癌。
50. 权利要求 1-34 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白、权利要求 35 所述的核酸分子、权

利要求 36 所述的载体、权利要求 37 所述的细胞、权利要求 39 所述的药物组合物、权利要求 40 所述的多肽和/或权利要求 41 所述的免疫缀合物,其用于预防、缓解或治疗肿瘤。

51. 根据权利要求 50 所述的分离的抗原结合蛋白、核酸分子、载体、细胞、药物组合物、多肽和/或免疫缀合物,其中所述肿瘤包括 VEGF 过表达的肿瘤。
52. 根据权利要求 50 或 51 所述的分离的抗原结合蛋白、核酸分子、载体、细胞、药物组合物、多肽和/或免疫缀合物,其中所述肿瘤包括实体瘤和/或非实体瘤。
53. 根据权利要求 50-52 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白、核酸分子、载体、细胞、药物组合物、多肽和/或免疫缀合物,其中所述肿瘤包括肺癌、结直肠癌、乳腺癌、肾癌、胃癌、肝癌、母细胞瘤、宫颈癌和/或卵巢癌。
54. 抑制 VEGF 蛋白与 VEGFR 蛋白结合的方法,其包括施用权利要求 1-34 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白、权利要求 35 所述的核酸分子、权利要求 36 所述的载体、权利要求 37 所述的细胞、权利要求 39 所述的药物组合物、权利要求 40 所述的多肽和/或权利要求 41 所述的免疫缀合物。