



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102286101 B

(45) 授权公告日 2013.05.08

(21) 申请号 201110225852.7

(22) 申请日 2011.08.08

(73) 专利权人 常州亚当生物技术有限公司

地址 213022 江苏省常州市新北区科技创新  
楼北区 A 座 369

(72) 发明人 霍世元 叶亚东 滕凌 朱文华  
潘鹞 路易斯易格那罗

(51) Int. Cl.

C07K 16/22(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 27/02(2006.01)

(56) 对比文件

CN 101525628 A, 2009.09.09, 全文.

CN 101534865 A, 2009.09.16, 全文.

CN 102026599 A, 2011.04.20, 全文.

审查员 高宇

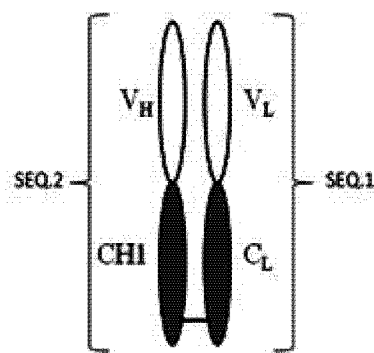
权利要求书1页 说明书13页  
序列表6页 附图3页

(54) 发明名称

抗 VEGF 单克隆抗体 Fab 片段 Vasculizumab  
及其应用

(57) 摘要

本专利涉及抗血管内皮生长因子(VEGF)单克隆抗体抗原结合片段(Fab)药物,其特征在于该抗体由抗 VEGF 单克隆抗体片段 Vasculizumab 保持对抗原 VEGF 的高特异性和高亲和力,而分子量较全抗体小,更容易到达靶部位;且鼠源比例低,不易引起人体免疫反应;半衰期长,可以减少病人用药次数。



1. 抗 VEGF 单克隆抗体 Fab 片段 Vasculizumab, 其特征在于所述的 Fab 片段由 SEQ NO. 1 和 SEQ NO. 2 由二硫键连接而构成。

2. 根据权利要求 1 所述的抗 VEGF 单克隆抗体 Fab 片段 Vasculizumab 在制备治疗新生血管性眼病药物中的应用。

3. 根据权利要求 2 所述的抗 VEGF 单克隆抗体 Fab 片段 Vasculizumab 在制备治疗新生血管性眼病药物中的应用, 其特征在于所述新生血管性眼病包括虹膜新生血管性眼病、脉络膜新生血管性眼病、视网膜新生血管性眼病或角膜新生血管性眼病。

4. 根据权利要求 3 所述的抗 VEGF 单克隆抗体 Fab 片段 Vasculizumab 在制备治疗新生血管性眼病药物中的应用, 其特征在于角膜新生血管性眼病为角膜接触镜所致角膜新生血管性疾病, 以及碱及其他化学物质烧伤、角膜手术、细菌感染、衣原体感染、病毒感染或原虫感染引起的角膜新生血管性眼病。

5. 根据权利要求 4 所述的抗 VEGF 单克隆抗体 Fab 片段 Vasculizumab 在制备治疗新生血管性眼病药物中的应用, 其特征在于所述的病毒为单纯疱疹病毒、带状疱疹病毒、牛痘苗、腺病毒。

6. 根据权利要求 4 所述的抗 VEGF 单克隆抗体 Fab 片段 Vasculizumab 在制备治疗新生血管性眼病药物中的应用, 其特征在于所述原虫为利什曼原虫、阿米巴原虫、疟原虫、弓形虫。

7. 根据权利要求 3 所述的抗 VEGF 单克隆抗体 Fab 片段在制备 Vasculizumab 治疗新生血管性眼病药物中的应用, 其特征在于所述虹膜新生血管性眼病, 包括新生血管性青光眼、糖尿病视网膜病变或视网膜中央静脉栓塞引起的虹膜新生血管性眼病。

8. 根据权利要求 3 所述的抗 VEGF 单克隆抗体 Fab 片段 Vasculizumab 在制备治疗新生血管性眼病药物中的应用, 其特征在于所述脉络膜新生血管性眼病, 包括年龄相关性黄斑变性、中心性渗出性视网膜脉络炎、眼组织胞浆菌病综合征或葡萄性脉络膜病变脉络膜新生血管性眼病。

9. 根据权利要求 3 所述的抗 VEGF 单克隆抗体 Fab 片段 Vasculizumab 在制备治疗新生血管性眼病药物中的应用, 其特征在于所述视网膜新生血管性眼病, 包括糖尿病、肿瘤、视网膜脱落、视网膜中央静脉阻塞、视网膜静脉周围炎、全身性红斑狼疮、Eales 病或 Coat 病相关的视网膜新生血管性眼病。

## 抗 VEGF 单克隆抗体 Fab 片段 Vasculizumab 及其应用

### 技术领域

[0001] 本专利涉及治疗性单克隆抗体药物,特别涉及抗肿瘤血管新生的抗人血管内皮生长因子单克隆抗体抗原结合片段药物。

### 背景技术

[0002] 早在一个多世纪以前,就有文献报道过肿瘤生长伴随着新生血管生成(Ferrara 2002)。但直到 1939 年,才由 Ide 及其同事首次提出,可能存在着某种肿瘤来源的血管生长刺激因子为肿瘤的生长提供血管供应(Ide *et al.* 1939)。数年后,由于观察到血管密度的增高会先于肿瘤的快速生长,Algire 等人认为“肿瘤的快速扩散取决于丰富的血管供给”(Algire *et al.* 1945)。在上个世纪六十年代,Greenblatt、Shubik (Greenblatt *et al.* 1968)和 Ehrmann、Knoth (Ehrmann *et al.* 1968)两个研究小组的实验相继提供初步证据,证实肿瘤的血管生成是由肿瘤细胞产生的某些可扩散因子介导。

[0003] 1971 年,美国科学家福克曼(Judah Folkman)在《新英格兰医学杂志》中提出,抗血管生成可能是一种有效的抗癌手段(Folkman 1971)。从七十年代早期开始,以这个前瞻性的假说为基础,福克曼及其研究小组致力于从人体和动物的肿瘤中分离某种‘肿瘤血管生成因子’(Folkman *et al.* 1971)。1978 年,Gullino 也提出了抑制血管生成能避免癌症的观点(Gullino 1978)。随后,多种血管源因子(如,表皮生长因子 EGF,转化生长因子 TGF- $\alpha$ 、TGF-beta,肿瘤生长因子 TNF- $\alpha$  和血管生长素等)先后被发现(Folkman *et al.* 1987)。

[0004] 血管内皮生长因子(VEGF)

[0005] 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF, 也可写作 VEGF-A) 是一个血管生成的关键调节因子,对于 VEGF 基因家族在血管生成调节中所扮演的角色,人们已经深入研究了十多年之久(Ferrara 2002)。VEGF 家族目前主要包括原型成员 (VEGF-A)、胎盘生长因子(placenta growth factor, PlGF) (Maglione *et al.* 1991)、VEGF-B (Olofsson *et al.* 1996)、VEGF-C (Joukov *et al.* 1996)、VEGF-D (Orlandini *et al.* 1996)。其中 VEGF-A 是诱导肿瘤血管生成作用最强、特异性最高的血管生长因子。VEGF 有 3 个高亲合性的酪氨酸激酶受体 (RTKs),分别为 VEGFR-1 (Flt-1) (Shibuya *et al.* 1990; de Vries *et al.* 1992)、VEGFR-2 (KDR, Flk-1) (Yoshiji *et al.* 1996; Ellis *et al.* 1998; Tomisawa *et al.* 1999) 和 VEGFR3 (Flt-4) (Joukov *et al.* 1996)。KDR 是血管形成的主要调控分子,具有明显的化学趋化和促分裂作用,与血管岛、血管形成和造血有关。

[0006] 肿瘤的生长有两个明显不同的阶段,即从无血管的缓慢生长阶段转变为有血管的快速增殖阶段,血管生成使肿瘤能够获得足够的营养物质,是促成上述转变的关键环节。如果没有血管生成,原发性肿瘤的生长不会超过  $1\sim 2\text{ mm}^3$ 。肿瘤侵袭转移是肿瘤治疗失败的主要原因,而在肿瘤发生侵袭转移的多步骤过程中,血管生成均发挥着重要作用。

[0007] 原位杂交研究已经发现 VEGF mRNA 在多种人类肿瘤中都有表达,包括肺癌 (Volm *et al.* 1997)、乳腺癌 (Yoshiji *et al.* 1996)、胃肠癌 (Ellis *et al.* 1998)、肾癌

(Tomisawa *et al.* 1999) 和卵巢癌(Sowter *et al.* 1997)。多家实验室使用多种抗 VEGF 的手段均已实现了肿瘤生长的抑制, 这些方法包括: 针对 VEGF 或其受体 (VEGFRs) 的抗体、可溶性受体, VEGFRs 酪氨酸激酶的小分子抑制剂以及利用 VEGF 的突变二聚体封闭其受体结合位点等。

[0008] 1993 年, 费拉拉制备了 VEGF 的鼠源性抗体, 在体外实验中, 鼠源性抗体可以显著抑制数种人类癌细胞系的生长。从此, VEGF 抗体的临床应用价值开始显露。为了降低鼠源性抗体的免疫原性, 费拉拉将鼠源抗体的骨架换做了人源抗体 IgG1 的部分, 由此诞生了基因泰克公司“重磅炸弹级”药物——贝伐单抗(Avastin)。它是一种抗 VEGF 的人源化抗体 (IgG1), 93% 的人源结构域和 7% 的鼠源结合区域组成, 是全世界第一个被批准用于抑制血管生长的单克隆抗体药物, 2004 年 2 月美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准该药用于治疗转移性结肠癌 (mCRC)、小细胞分子肺癌 (GBM) 和转移性肾癌。阿瓦斯汀区别于已有抗癌药物, 以 VEGF 为药物靶点, 加之抗体的特异性结合能力, 使其临床疗效显著。在人体试验中, 即使对于晚期的癌症患者, 注射阿瓦斯汀也可延长寿命数月。2007 年 ASCO 会议 Souglakos 报道 Avastin 联合靶向 EGFR 的单克隆抗体 Cetuximab (西妥昔单抗) 可以安全有效地治疗化疗失败的晚期转移性结直肠癌。基因泰克公司正在用 Avastin 对超过 40 种癌症进行适应症研究, 希望可以生产出更多的单抗延伸产品。同时, 他们也在研究将全抗体分子 IgG 切割之后, 先将蛋白用原核细胞表达, 然后再将其通过基因工程的手段连接为 IgG。

[0009] 除了癌症外, VEGF 也是治疗包括老年性黄斑变性 (AMD), 糖尿病引起的眼底病在内的多种眼科疾病关键。为了治疗这些疾病, 在 Avastin 的基础上, 基因泰克公司又将其全抗体分子结构进行简化, 保留能够中和 VEGF 的抗体片段, 同时将给药途径由静脉注射改为玻璃体直接注射, 由此成就另一药物——Avastin 的孪生姊妹兰尼单抗 (Lucentis)。2006 年, 兰尼单抗被美国药监局批准用于治疗老年黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD), 很快就成为治疗老年性黄斑变性, 糖尿病引起的眼底病的首选药, 占领北美市场 80% 以上的份额。

## 发明内容

[0010] 发明目的

[0011] 本发明提供 Vasculizumab, 其运用基因工程等技术手段, 将识别 VEGF 的抗体片段在大肠杆菌中表达, 其抑制眼科血管新生的效果与全抗分子相比无明显的差异, 而该 Fab 片段分子量低, 容易到达靶部位; 另外该 Fab 片段可以在大肠杆菌中大规模表达生产, 效率高且成本相对较低。

[0012] 技术方案

[0013] 抗 VEGF 单克隆抗体 Fab 片段命名为 Vasculizumab, 其特征在于该抗体由 SEQ NO. 1 和 SEQ NO. 2 由二硫键连接而构成。

[0014] 抗 VEGF 单克隆抗体 Fab 片段 Vasculizumab 在制备治疗新生血管性眼病药物中的应用。

[0015] 所述新生血管性眼病包括虹膜新生血管性眼病、脉络膜新生血管性眼病、视网膜新生血管性眼病或角膜新生血管性眼病。

[0016] 角膜新生血管性眼病为角膜接触镜所致角膜新生血管性疾病,以及碱及其他化学物质烧伤、角膜手术、细菌感染、衣原体感染、病毒感染或原虫感染引起的角膜新生血管性眼病。

[0017] 所述的病毒为单纯疱疹病毒、带状疱疹病毒、牛痘苗、腺病毒。

[0018] 所述原虫为利什曼原虫、阿米巴原虫、疟原虫、弓形虫。

[0019] 所述虹膜新生血管性眼病,包括新生血管性青光眼、糖尿病视网膜病变或视网膜中央静脉栓塞引起的虹膜新生血管性眼病。

[0020] 所述脉络膜新生血管性眼病,包括年龄相关性黄斑变性、中心性渗出性视网膜脉络炎、眼组织胞浆菌病综合征或葡萄行性脉络膜病变脉络膜新生血管性眼病。

[0021] 所述指视网膜新生血管性眼病,包括糖尿病、肿瘤、视网膜脱落、视网膜中央静脉阻塞、视网膜静脉周围炎、全身性红斑狼疮、Eales 病或 Coat 病相关的视网膜新生血管性眼病。

[0022] 具体来说氨基酸序列 SEQ NO. 1 为 Anti-VEGF Fab 轻链( $V_L-C_L$ );氨基酸序列 SEQ NO. 2 为 Anti-VEGF Fab 重链( $V_H-CH1$ )。

[0023] 本发明实际上是抗 VEGF-A 单克隆抗体的一个 Fab 片段。

[0024] 有益效果

[0025] 1、目前上市的抗体药物中人源化抗体只占 20%,鼠源性抗体导致排异大,毒副作用强。本专利涉及的单抗 Fab 片段是使用人源化噬菌体抗体库筛选针对 VEGF-A 的 ScFv 抗体,筛选定型后进一步构建形成的重组 Fab 片段,降低使用后人体的免疫反应。

[0026] 2、本专利涉及的 Fab 片段与全抗体分子相比,分子量小,因此在到达肿瘤靶部位的过程中穿透力大;同时该 Fab 片段保留了全抗体对 VEGF 的高特异性和高亲和力,并且其半衰期较同类药物长,可以减少药物的使用次数。

## 附图说明

[0027] 图 1. Vasculizumab 结构示意图;

[0028] 图 2. Vasculizumab 表达载体;

[0029] 图 3. 纯化后的 Vasculizumab SDS-PAGE 电泳图。Vasculizumab 为 IgG1 抗原结合区重链和轻链二聚体,在 46 kDa 处有单一电泳条带。

[0030] 图 4. ELISA 测定抗体与抗原 VEGF165 特异性结合能力及抗体活性。与作为阳性对照的 Avastin 比较,在浓度分别为 10, 1 和 0.1  $\mu\text{g/ml}$  时, Vasculizumab 的活性与同等浓度的 Avastin 没有明显区别;在低浓度条件下(0.01  $\mu\text{g/ml}$ ), Vasculizumab 的活性高于 Avastin。本图中数据为 5 次实验数据的平均值。

[0031] 图 5. Biacore T100 测试 Vasculizumab 的亲合力。测试表明, Vasculizumab (图 5A) 与 Bevacizumab (图 5B) 对抗原 VEGF 的亲合力相似。抗体的浓度由上至下分别为 32, 16, 8, 4, 2, 0 nM, 每个浓度分别测试 3 次。

[0032] 图 6. HUVECs 和 HBVP 共培养,测试抗 Vasculizumab 对血管内皮细胞生长,及内皮细胞-周细胞结合的抑制作用。三种浓度的 Vasculizumab (25, 5, 1 nM) 对内皮细胞出芽(sprout)生长的抑制作用均略高于作为阳性对照的 Bevacizumab。(p<0.01)

[0033] 图 7. Vasculizumab 在大肠杆菌中表达与生产流程图。构建好的表达载体转入大

肠杆菌后,涂平板筛选阳性克隆。筛选得到的菌株逐级放大培养,最后在发酵罐中进行大规模生产。

### 具体实施方式

[0034] 实施例 1

[0035] 噬菌体表面展示技术筛选人源抗 VEGF-A 单克隆抗体 Fab 片段,参照 Dimitrova et al. 2009, Urushibata et al. 2010, Liu et al. 2011, Wang et al. 2011

[0036] 将新鲜制备的约  $1 \times 10^{11}$  噬菌体抗体用固相抗原筛选。将噬菌体抗体加入 hVEGF-A 包被的免疫板中,  $37^{\circ}\text{C}$  孵育 1 小时。用洗涤试剂 PBST 1X 洗涤 10 次, 去除未结合或亲和力较弱的噬菌体抗体。胰酶 (Trypsin/EDTA, Lonza) 消化结合在抗原上的噬菌体, 感染 XL-1 blue 大肠杆菌 (Stratagene)。选取 Phage ELISA 值最高的克隆, PCR 扩增 ( $97^{\circ}\text{C}$  变性 10s ;  $60^{\circ}\text{C}$  退火 5s ;  $70^{\circ}\text{C}$  延伸 30s ; 35 个循环) 其包含的 Fab 重链和轻链基因, 得到人源化抗 VEGF-A 单克隆抗体 Fab 片段基因。

[0037] 噬菌体抗体库为公司自己构建, 具体方法为 :

[0038] 1) 提取抗 VEGF-A 强阳性的老年黄斑变性患者外周血淋巴细胞 ( $1 \times 10^7$ ) 的总 RNA, 提取使用 QIAamp RNA Mini Kit (Qiagen)。逆转录为 cDNA, PCR 扩增 Fab 轻链 (L) 和重链 (Fd), 扩增引物 : Fd 链 3' 端 5' —GCATGTACTAGTTTTGTCACAAGA TTTGGG—3' ; 扩增  $V_H$  段 5' 端的引物为 ,  $V_H1a$ : 5' —CAGGTGCAGCTCGAG CAGTCTGGG—3' ,  $V_H1f$ : 5' —CAGGTGCAGCTGCTCGAGTCTGGG—3' ,  $V_H2f$ : 5' —CAGGTGCAGCTACTCGAGTCGGG—3' ,  $V_H3a$ : 5' —GAGGTGCAGCTC GAGGAGTCTGGG—3' ,  $V_H3f$ : 5' —GAGGTGCAGCTGCTCGAGTCTGGG—3' ,  $V_H4f$ : 5' —CAGGTGCAGCTGCTCGAGTCGGG—3' ,  $V_H6f$ : 5' —CAGGTGCAGTACTCGAGTGGGG—3' ,  $V_H6a$ : 5' —CAGGTACAGCTCGAGCAGTCA GG—3' ; 扩增  $\kappa$  链 3' 端的引物  $C_{\kappa}1d$  为 : 5' —GCGCCGTCTAGAATTAACACT CTCCCCTGTTGAAGCTCTTTGTGACGGGCGA ACTCAG—3' ; 扩增  $\kappa$  链 5' 端的引物为 :  $V_{\kappa}1a$ : 5' —GACATCGAGCTCACCCAGTCTCCA—3' ,  $V_{\kappa}2a$ : 5' —GATATTGAGCTCACTCAGTCTCCA—3' ,  $V_{\kappa}3a$ : 5' —GAAATTGAGCTCAGCAGTCTCCA—3' ,  $V_{\kappa}1s$ : 5' —GACATCGAGCTCACCCAGTCTCC—3' 。扩增  $\lambda$  链 3' 端引物  $C_L2$  为 : 5' —CGCCGTCTAGAATTA TGAACATTCTGTAGGC—3' 。扩增  $\lambda$  链 5' 端引物为 :  $V_L1$ : 5' —AATTTTGAGCTCACTCAGCCCCAC—3' ,  $V_L2$ : 5' —TCTGCCGAGCTCCAGCCTGCCTCCGTG—3' ,  $V_L3$ : 5' —TCTGTG GAGCTCCAGCCGCCCTCACTG—3' ,  $V_L4$ : 5' —TCTGAAGAGCTCCAGGACCCTGTTGTGTCTGTG—3' ,  $V_L5$ : 5' —CAGTCTGAGCTCACGCAGCCCCC—3' ,  $V_L6$ : 5' —CAGACTGAGCTCACTCAGGAGCCC—3' 。PCR 扩增条件为 :  $94^{\circ}\text{C}$  变性 45s ;  $52^{\circ}\text{C}$  退火 45s ;  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 1min。

[0039] 2) 将 PCR 扩增的轻链基因 (1ug) 和 pComb3 质粒 (10ug) 用 Sac I 和 Xba I 于  $37^{\circ}\text{C}$  双酶切 4 小时。酶切产物纯化后, 于室温下将轻链基因插入载体, 纯化后转化 XL-1 blue 大肠杆菌 (Stratagene)。涂平板选取阳性菌株培养扩增, 提取质粒获得轻链基因文库。用 Xho I 和 Spe I 对重链基因 PCR 扩增产物和构建好的轻链基因文库质粒双酶切, 纯化后连接并转化 XL-1 blue 大肠杆菌。涂平板选取阳性克隆, 加入到 100 ml SB 培养液内 (含 Amp 20 mg /l 及 Tet 10 mg /l) 摇动 1 h, 补加 Amp 至 50 mg /l, 继续摇菌 2 h。加入辅助噬菌体 VCSM13 1 ml, 继续摇菌 1 h, 加入卡那霉素至终浓度为 70 mg /l, 继续培养过夜。次

日，离心收集细菌培养上清，加入 PEG 8000 和 NaCl，至终浓度分别为 4% 和 3%，搅拌溶解置冰浴 30 min 后，于 4°C 以 9000 rpm 离心 20 min。弃上清，沉淀悬浮于 2 ml PBS(pH 7.2) 内，即得噬菌体抗体库。

[0040] 3) 抗体库的滴度测定 用 SB 培养液将所制备的噬菌体抗体库作  $1 \times 10^9$ 、 $10^{10}$ 、 $10^{11}$ 、 $10^{12}$  稀释，分别加入 100  $\mu$ l XL-1 blue 菌株 (A600=1)。在室温下感染 20 min，涂 LB 平板 (含 Amp 100 mg/l)，于 37°C 培养过夜，计数集落并计算出抗体库的滴度： $3 \times 10^{11}$ 。

[0041] 实施例 2

[0042] 本实施例参照文献：《Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition》作者 Joe Sambrook, Chapter 1, 8, 15

[0043] 1. 抗 VEGF 单克隆抗体 Fab 的核苷酸序列设计和合成：

[0044] 该 Fab 片段重链包含抗 VEGF IgG1 重链可变区 ( $V_H$ ) 和恒定区 CH1 段；轻链包括 IgG1 轻链可变区 ( $V_L$ ) 和轻链恒定区 ( $C_L$ )。重链 CH1 段中与轻链中的半胱氨酸 (Cys) 残基共价形成二硫键，使重链和轻链形成二聚体结构。重链 DNA 序列 5' 端加入 *Bam*H I 酶切位点，前导序列 (AGGAGGT) 和 KOZAK 序列 (GCCACCATGG) 以提高转录后翻译的效率。在其 3' 端加入 *Xho* I 酶切位点；轻链 DNA 序列 5' 端加入 *Nde* I 酶切位点，前导序列和 KOZAK 序列，在其 3' 端加入 *Bam*H I 酶切位点。分别设计引物扩增筛选得到的 Fab 重链和轻链基因，使重链和轻链包含上述的序列和酶切位点。

[0045] 2. 抗 VEGF 单克隆抗体 Fab 表达载体的构建：

[0046] 将该 Fab 重链基因用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切，用 T4 连接酶将重链基因插入经 *Bam*H I 和 *Xho* I 处理的原核共表达载体 pET 21 (Novagen) 中；将轻链基因用 *Nde* I 和 *Bam*H I 双酶切，通过 T4 连接酶将其插入经 *Nde* I 和 *Bam*H I 处理的已插入重链基因的 pET 21 表达载体中。重链和轻链基因前均有载体自带的 T7 启动子。

[0047] 用构建好的 pET 21 共表达载体转化 BL21 感受态大肠杆菌菌株 (New England Biolabs)

[0048] 。涂平板 (含 100ug/ml 氨苄青霉素) 37°C 过夜培养。挑取平板上单克隆菌落，进行酶切鉴定和测序分析。

[0049] 3. 抗 VEGF 单克隆抗体 Fab 片断的表达和分离纯化：

[0050] 经鉴定的阳性 BL21 菌株接入含 100ug/ml 的 LB 培养基 (3ml) 中于 37°C 过夜培养。之后菌液转入 2 升含 100ug/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基中，于 37°C 250 rpm 振荡培养至 OD600=0.6，后加入 0.1 mM IPTG，18°C 诱导表达 20 小时。菌液 3000 rpm 常温离心，保留上清。

[0051] 上清中的 Fab 片断用亲和层析法 (Protein A) 和分子筛层析分离提纯分子量为 46 kDa 左右的完整双特异性抗体分子。提纯后的各个组分通过 SDS-PAGE 法鉴定。

[0052] 具体方法：

[0053] 1). 上样 应用 Protein A-Sepharose CL-4B 亲和层析法纯化单克隆抗体，A KTA explorer100 进行监测。收集放大培养筛选得到的细胞培养基上清液用 0.02M, pH7.4 的磷酸盐缓冲液稀释，以 1ml/min 的流速上样。

[0054] 2). 洗脱 用上样缓冲液进行流洗，10 倍柱床体积，流速为 1 ml/min。然后用 0.02 M, pH 4.0 的柠檬酸缓冲液洗脱抗体。同时用 A KTA explorer100 进行监测，当出现洗脱峰

时,取干净的离心管收集。每收集 3 ml 后,立即用 1 M, pH9.0 的 Tris-HCl 缓冲液调整 pH 值至 7.0。

[0055] 实施例 3

[0056] 抗原抗体结合测试(ELISA 法):本实施例参考 Klettner et al. 2009, Li et al. 2011, Liu et al. 2011

[0057] 1. 包被:用 0.05 M PH9. 轴碳酸盐包被缓冲液将抗原(hVEGF-A) 稀释至蛋白质含量为 5  $\mu$ g / ml。在每个聚苯乙烯板的反应孔中加 0.1 ml, 4 $^{\circ}$ C 过夜。次日, 弃去孔内溶液, 用洗涤缓冲液洗 3 次, 每次 3 分钟。

[0058] 2. 加样:加一定稀释的待检抗体(anti-VEGF Fab, bevacizumab) 0.1 ml 于上述已包被之反应孔中, 置 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。然后洗涤。(同时做空白孔, 阴性对照孔及阳性对照孔)。 3. 加酶标抗体(羊抗人 Fab):于各反应孔中, 加入新鲜稀释的酶标抗体(经滴定后的稀释度)0.1 ml。37 $^{\circ}$ C 孵育 0.5 ~ 1 小时, 洗涤。 4. 加底物液显色:于各反应孔中加入临时配制的 TMB 底物溶液 0.1 ml, 37 $^{\circ}$ C 10 ~ 30 分钟。 5. 终止反应:于各反应孔中加入 2 M 硫酸 0.05 ml。 6. 结果判定:可于白色背景上, 直接用肉眼观察结果:反应孔内颜色越深, 阳性程度越强, 阴性反应为无色或极浅, 依据所呈颜色的深浅, 以“+”、“-”号表示。也可测 OD 值:在 ELISA 检测仪上, 于 450 nm (若以 ABTS 显色, 则 410 nm) 处, 以空白对照孔调零后测各孔 O · D 值, 若大于规定的阴性对照 OD 值的 2.1 倍, 即为阳性。

[0059] 实验结果:

[0060] 测试 Vasculizumab 与 VEGF-A 的结合能力, 并与 bevacizumab 做对比。该 Fab 与抗原 VEGF-A 的结合能力与全抗体 bevacizumab 基本一致。

[0061] 实施例 4

[0062] Vasculizumab 亲和力测试

[0063] 使用表面等离子共振技术(Surface Plasmons Resonance, SPR), 在 Biacore T100 上分别测试 Vasculizumab 和作为阳性对照的 Bevacizumab 对抗原 hVEGF-A 的亲和力。

[0064] 1) 用 HEPES (10 mM HEPES-KOH, pH 7.6, 150 mM NaCl) 缓冲液将 hVEGF-A 稀释为 1mg/ml, 并以 2  $\mu$ l/min 的流速通过芯片表面, 持续 1 小时, 使 hVEGF-A 固定在芯片上。

[0065] 2) 使用 0.1 M 的 NaOH 洗涤芯片, 除去未结合的 hVEGF-A。

[0066] 3) 用 0.1 mg/ml 的 BSA 以 20  $\mu$ l/min 的流速通过芯片表面 5 分钟, 避免抗体的非特异性结合。

[0067] 4) 将纯化后的 Vasculizumab 或 Bevacizumab 用 HEPES 缓冲液做梯度稀释(0, 2, 4, 8, 16, 32 nM), 各浓度的抗体分别以 20  $\mu$ l/min 的流速通过芯片表面, 重复 2 次, 每次实验之间用 0.1 M 的 HCl 和 0.1 M 的 NaOH 重生芯片。

[0068] 5) 用 BIACore evaluation 软件分析抗原抗体的结合和解离曲线。

[0069] 参考文献:

[0070] Dimitrova D, Choudhry V, Broder CC. Antibody fragment expression and purification. *Methods Mol Biol.* 2009;525:491-8, xiii.

[0071] Klettner A, Roeder J. Treating age-related macular degeneration - interaction of VEGF-antagonists with their target. *Mini Rev Med Chem.* 2009 Aug;9(9):1127-35.



[0072] Li C, Zhang F, Lin H, Wang ZC, Liu XJ, Feng ZQ, Zhu J, Guan XH. Generation and characterization of the human neutralizing antibody fragment Fab091 against rabies virus. *Acta Pharmacol Sin.* 2011 Mar;32(3):329-37.

[0073] Liu X, Lin H, Tang Q, Li C, Yang S, Wang Z, Wang C, He Q, Cao B, Feng Z, Guan X, Zhu J. Characterization of a human antibody fragment Fab and its calcium phosphate nanoparticles that inhibit rabies virus infection with vaccine. *PLoS One.* 2011 May 9;6(5):e19848.

[0074] Urushibata Y, Itoh K, Ohshima M, Seto Y. Generation of Fab fragment-like molecular recognition proteins against staphylococcal enterotoxin B by phage display technology. *Clin Vaccine Immunol.* 2010 Nov;17(11):1708-17.

[0075] Wang X, Zhong P, Luo PP, Wang KC. Antibody engineering using phage display with a coiled-coil heterodimeric Fv antibody fragment. *PLoS One.* 2011 Apr 28;6(4):e19023.

[0076] 实施例 5

[0077] Vasculizumab 对人视网膜血管内皮细胞(HRCEC)的增殖抑制作用

[0078] 采用 MTT 法检测 Vasculizumab 抑制人视网膜血管内皮细胞增殖的活性。HRCEC 细胞在 37℃、5%CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养至密度 90% 以上时用胰蛋白酶消化收集,用培养液重悬细胞并在显微镜下计数,将细胞浓度调整为  $3.0 \times 10^4$  个/mL,将细胞悬液接种到 96 孔板中,每孔 100 μL,并于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养过夜。将 Vasculizumab、Avastin 用培养液稀释到各个预定浓度。待细胞完全贴壁后,将各个稀释液分别加入 96 孔板中,每孔 100 μL。以加入 Vasculizumab 作为给药组,Avastin 作为阳性对照组,以不加任何药物的培养液作为空白对照组,在 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱孵育 48 小时。向 96 孔板中每孔加入 20 μL 5 mg/mL 的 MTT,继续培养 4 小时。吸去培养基,每孔加入 100 μL DMSO 溶解。用酶标仪在 570nm 下检测,参比波长为 630nm 处测定吸光值,并计算生长抑制率(proliferation inhibition, PI),公式如下:PI (%) = 1 - 给药组 / 阴性组;表 1. Vasculizumab 对人视网膜血管内皮细胞(HRCEC)增殖抑制作用

[0079]

组别	剂量( $\mu\text{g/mL}$ )	A570nm-A630nm	抑制率(%)
Vasculizumab	1	0.8336 $\pm$ 0.09780	38.32%
	2	0.9118 $\pm$ 0.07647	32.53%
	4	1.0386 $\pm$ 0.10279	23.15%
	8	0.8806 $\pm$ 0.06308	34.84%
	16	0.6704 $\pm$ 0.07318	50.39%
	32	0.4264 $\pm$ 0.03153	68.45%
	64	0.1626 $\pm$ 0.03163	87.97%
Avastin	5	0.4950 $\pm$ 0.09328	63.37%
空白对照	—	1.3514 $\pm$ 0.11916	0.00%

[0080] Vasculizumab 对人视网膜血管内皮细胞 HRCEC 的体外抑制实验结果：见表 1，与对照相比，Vasculizumab 能够显著抑制人视网膜血管内皮细胞(HRCEC)的增殖作用，并且呈现剂量依赖关系。

[0081] 实施例 6

[0082] 鸡胚尿囊绒膜(CAM)分析 Vasculizumab 的体内抑制血管生成活性

[0083] 本研究采用 CAM 试验探讨 Vasculizumab 体内抑制血管生成的活性。研究表明在鸡胚发育的第 8 天到第 11 天，胶原蛋白的生物合成速率达到最大，此时正是血管生成的最旺盛阶段，而机体免疫系统尚未完全建立，因此选择发育到第 8 天的鸡胚开始给药。考虑到载药纸片上的 Vasculizumab 会在鸡胚尿囊膜上有一定的弥散范围限制，因此试验中只计数距离纸片边缘 5mm 半径的范围内新生血管数量。采用如下操作步骤：

[0084] (1) 将第 6 天的白来杭鸡胚在 60%–70% 湿度的 37℃ 培养箱培养两天。

[0085] (2) 在鸡胚气室上方钻 1.0cm $\times$ 1.0cm 的窗口，用镊子将内膜撕去，暴露出尿囊膜。以直径为 5mm 的擦镜纸片为加样载体，放入鸡胚气室尿囊绒膜上。滤纸片加 PBS 为空白组，给药组分别加不同剂量的 Vasculizumab，阳性对照为 Avastin。

[0086] (3) 将鸡胚气室用无菌透明胶带封上，于 37℃ 培养 72 小时后，打开鸡胚气室，加入固定液(甲醛：丙酮 = 1 : 1)固定 15min。取出粘附有擦镜纸片的尿囊膜，观察其新生血管分布状况，对新生血管进行计数并拍照。每组剂量设 5 个重复，试验结果进行统计分析。

[0087] 鸡胚尿囊绒膜(CAM)分析 Vasculizumab 的体内抑制血管生成活性结果：阴性对照采用 PBS 处理，阳性对照 Avastin 的剂量为 10  $\mu\text{g}$ ，Vasculizumab 设置三个剂量处理鸡胚，分别是 5.0  $\mu\text{g}$ 、10  $\mu\text{g}$ 、20  $\mu\text{g}$ ，结果，Vasculizumab 显现出了一定的抑制鸡胚尿囊绒膜的活性，CAM 上的新生血管密度和数量显著下降，Vasculizumab 在 5.0  $\mu\text{g}$ 、10  $\mu\text{g}$ 、20  $\mu\text{g}$  三个剂量下，抑制活性呈一定的剂量依赖性。

[0088] 实施例 7

[0089] Vasculizumab 对小鼠角膜新生血管的作用

[0090] (1) BALB/c 小鼠碱烧伤诱导角膜新生血管模型的制备：

[0091] 健康 BALB/c 小鼠 20 只，雄性，体重 20–25g，裂隙灯显微镜下检查双眼眼前段及附

属器,排除眼部病变。碱烧伤模型制备前 1d 予 0.3% 氧氟沙星眼药水点眼,每日 2 次。小鼠经腹腔注射 1.8%Avertin 麻醉后,用镊子夹住直径为 2mm 的单层滤纸片,浸于 1mol/L 氢氧化钠溶液中,使其达饱和状态,去除多余液体,将滤纸片置于 BALB/c 小鼠角膜中央 40S,弃掉滤纸,立即用 15ml 的 PBS 充分冲洗烧伤区及结膜囊 1min。棉签拭去过多水分,于手术显微镜下以角膜刮铲平行于角膜缘的方式旋转刮除角膜上皮,注意勿伤及上皮基质层及角膜缘,术毕结膜囊内涂红霉素眼膏预防感染。

#### [0092] (2) 实验动物分组及标本获取

[0093] 20 只小鼠按随机分组,标记为 Vasculizumab 实验组和对照组,每组 5 只,自碱烧伤后分别给予 50  $\mu$ g Vasculizumab 和生理盐水玻璃体腔注射,每日 1 次,持续 1 周,碱烧伤后 1d、7d、14d 于裂隙灯显微镜下观察各组角膜的炎症反应及新生血管情况。碱烧伤后第 14d 于带眼前段照相的裂隙灯显微镜下拍照记录各组角膜新生血管形成情况,随即以颈椎脱臼法处死所有小鼠并摘除眼球,生理盐水冲洗血迹,4% 多聚甲醛固定 1.5h,含 30% 蔗糖的 PBS 中脱水过夜,0CT 冰冻切片包埋剂包埋,-80℃ 冰箱中保存,8  $\mu$ m 冰冻切片,免疫组织化学法检测 CD31 的表达。

#### [0094] (3) 角膜组织微血管密度定量测定

[0095] 微血管密度 (Microvessel density, MVD) 是评价血管形成的指标。我们采用抗 CD31 抗体免疫组织化学法标记血管内皮细胞,计数单位面积中的微血管数目,由此来衡量新生血管生成的程度。统计微血管的标准:显微镜下观察角膜组织中与邻近组织分界清楚,并被染成棕黄色或褐色的内皮细胞或细胞团均计入新生血管。在 10 $\times$ 20 镜下计数整张切片新生血管数目,角膜组织片照相后以图像处理软件 Image J 计算出整个角膜组织片面积,求出该例整张切片的新生血管密度。

#### [0096] 表 4:Vasculizumab 对小鼠角膜新生血管的作用 MVD 计数

[0097]

分组	MVD
对照组	50.48 $\pm$ 8.456
Vasculizumab	28.57 $\pm$ 5.428

[0098] 结果:CD31 作为微血管标记物,主要表达于血管内皮细胞胞质中,染色阳性细胞为血管内皮细胞染成棕黄色或褐色,无背景染色。Vasculizumab 实验组 CD31 阳性新生血管与对照组相比显著减少。Vasculizumab 实验组切片 MVD 值为 28.57 $\pm$ 5.428,与对照组 50.48 $\pm$ 8.456 比较有显著性差异。实验结果表明 Vasculizumab 能够抑制角膜新生血管的生长,能够作为治疗角膜新生血管性眼病的药物。

#### [0099] 实施例 8

##### [0100] Vasculizumab 对家兔虹膜新生血管的作用

[0101] 采用 577nm 氩离子激光凝阻家兔视网膜主分支静脉,经眼底荧光素血管造影 (FFA) 证实静脉阻塞成功。5-12 天后眼虹膜荧光素血管造影 (IFA) 显示虹膜血管与正常对照组对比荧光素渗漏明显,证实虹膜新生血管化的动物模型 (NVI) 形成。

[0102] 取造模成功的 12 只眼,随机分成 4 组,每组 3 只。分别标记为阴性对照组、Vasculizumab,分别以生理盐水、200  $\mu$ g Vasculizumab 玻璃体腔注射给药,每日 1 次,持续 2 周。第 3 周用光学及电子显微镜观察。

[0103] 结果:光学显微镜下可观察到虹膜前表面是主要由纤维组织组成的纤维血管膜残

迹,仅有极少的开放血管腔。在虹膜基质内可看到血管残存物,为坏死细胞及细胞碎片。而光镜下的对照眼的虹膜表面为有分枝的和潜在管腔的纤维血管膜。

[0104] 治疗组虹膜的超微结构为一系列的退行性改变。虹膜基质中部的大血管的内皮细胞有正常的细胞核、细胞质和细胞连接。虹膜基质中及虹膜前表面有毛细血管残迹,周围有细胞碎片和巨噬细胞浸润。无潜在管腔的毛细血管及退变的壁细胞,表明新生血管消退。

[0105] 通过虹膜新生血管化的动物模型实验,证明了 Vasculizumab 能够抑制新生血管形成并使已形成的血管退化。

[0106] 实施例 9

[0107] Vasculizumab 对兔眼脉络膜血流的影响

[0108] 取体重为 2.5-3.0 公斤的新西兰白兔,随机分为 4 组,分别标记为对照组、Vasculizumab 实验组。每组的白兔用 35mg/kg 甲苯噻嗪混合后肌注麻醉,之后每小时用起始量的一半肌注维持麻醉。升高左眼眼压至 40mmHg,该压力下可使眼血流降至正常值的 1/3。经右颈动脉插管至左心室,用于注射微球(计算眼血流量),股动脉插管用于采血。各组分别进行玻璃体腔注射生理盐水、200  $\mu$ g Vasculizumab,给药后于 0、30、60 和 120 分钟用彩色微球技术测定高眼压兔眼的眼血流量。在每个时间点,注入 0.2mL (约 200 万)微球,微球注入后立即经股动脉采血 60 秒整,并置于肝素化抗凝管,记录采血量。最后一次采血后,用 100mg/kg 的苯巴比妥静注处死动物,摘取眼球,分离视网膜、脉络膜、虹膜和睫状体,记录组织重量。

[0109] 每个时间点组织血流的计算用以下公式:  $Q_m = (C_m \times Q_r) / C_r$ 。其中  $Q_m$  代表组织血流,单位  $\mu$  L/min/mg;  $C_m$  是每毫克组织微球数;  $Q_r$  是血流量,单位  $\mu$  L/min;  $C_r$  是作为参照的血液微球数。

[0110] 表 5. Vasculizumab 对白兔眼脉络膜血流的影响

[0111]

时间(min)	组别	血流量( $\mu$ L/min/mg)
0	对照组	12.5 $\pm$ 1.6
	治疗组	21.4 $\pm$ 4.3
30	对照组	8.9 $\pm$ 1.2
	治疗组	15.4 $\pm$ 2.8
60	对照组	4.5 $\pm$ 0.9
	治疗组	15.6 $\pm$ 2.6
120	对照组	4.3 $\pm$ 0.5
	治疗组	12.5 $\pm$ 1.7

[0112] Vasculizumab 对兔眼脉络膜血流的影响结果:见表 5,与阴性对照组相比,在所有观察时间点(30、60、120 分钟),Vasculizumab 的治疗组脉络膜血流量都显著增加。

[0113] 实施例 10

[0114] Vasculizumab 对大鼠脉络膜新生血管的作用

[0115] 用 846 复合麻醉剂 0.5ml/Kg 腹腔注射充分麻醉 6-8 周雄性 BN 大鼠,激光光凝前 5min 用复方托品酰胺眼液滴眼一次,充分散大双眼瞳孔。固定动物,在 -53.00D 角膜接触镜辅助下,围绕视盘并在距视盘 2PD 位置等距离行氩离子激光光凝,共计 8 个光凝斑,激光波长为 647.1nm,功率为 350mW,光凝斑直径和时间分别为 50  $\mu$  m 及 0.05s。光凝后立刻进行眼

底照相。于光凝后 3、7、14、21、28 分别进行 FFA、组织病理及透射电镜检查。

[0116] 通过眼底照相及 FFA 检查证实,光凝后第 21 天光凝斑荧光素渗漏达到高峰。同时进行病理组织学检查,光凝后 21 天,光镜下显示 CNV 呈现显著的纤维血管增殖,其中可见大量新生血管,管腔内可见红细胞;镜下显示脉络膜黑色素细胞间有毛细血管呈凝聚性改变,内皮细胞凝聚。表明 21 天后大鼠脉络膜新生血管模型形成。

[0117] 将造模成功的 20 只大鼠,随机分成 4 组,每组 5 只大鼠。分别标记为空白对照组、Vasculizumab I 治疗组,分别以生理盐水、Vasculizumab (100  $\mu$ g) 玻璃体腔注射,每日 1 次,持续 1 周。给药后 3 天、7 天、14 天及 28 天均进行 FFA 检查。表 8:各实验组给药后不同时间 CNV 发生率

[0118]

组别	检测时间							
	第 3 天 (总光斑数为 268)		第 7 天 (总光斑数为 194)		第 14 天 (总光斑数为 142)		第 28 天 (总光斑数为 82)	
	渗漏光斑数	CNV 发生率 (%)	渗漏光斑数	CNV 发生率 (%)	渗漏光斑数	CNV 发生率 (%)	渗漏光斑数	CNV 发生率 (%)
对照组	225	84.0	152	78.4	97	68.3	51	62.2
Vasculizumab	158	59.0	106	54.6	69	48.6	34	41.5

[0119] 结果:见表 8,各实验组给药后不同时间 CNV 发生率(发生渗漏的光斑数/总光斑数)。FFA 检测,给药后 3 天,Vasculizumab 治疗组荧光素渗漏与用药前相比无明显变化;给药后 7、14 天,治疗组荧光素渗漏比用药前逐渐减轻;给药后 28 天,荧光素渗漏相比用药后 14 天更少。说明 Vasculizumab 能够治疗大鼠脉络膜新生血管,有可能开发成为治疗脉络膜新生血管性眼病的药物。

[0120] 实施例 11

[0121] Vasculizumab 在 OIR 小鼠中对视网膜血管的影响

[0122] OIR 模型的建立:在 C57/B16 小鼠出生后第 7 天至第 12 天将小鼠幼畜及其母鼠暴露置于 75% 高氧环境中,可致其中央视网膜中毛细管迅速消失。在第 12 天返回到室内空气中,暴露与高氧中的视网膜血管迅速消失,这会引发广泛的异常新生血管形成,视网膜的中央部分长期在很大程度上保持无血管状态。在血管消失完全之后,于第 13 天向玻璃体内注射 Vasculizumab (给药组, Vasculizumab 剂量为 50  $\mu$ g) 或生理盐水(阴性组),在第 17 天对视网膜血管进行评价。(为标记未闭合的血管,将 50mL 德克萨斯红标记的番茄凝集素注射入左心室并循环 5 分钟。)

[0123] Vasculizumab 在 OIR 小鼠中对视网膜血管的影响结果:对 OIR 小鼠施用 Vasculizumab 后,能够改善病理性新生血管形成。与阴性对照相比,用 Vasculizumab 处理的 OIR 小鼠视网膜中新生血管丛明显减少,所占的面积分别减少了 62.24%。

[0124] 实施例 12

[0125] Vasculizumab 对早产儿视网膜病变大鼠模型新生血管的作用

[0126] 采取波动氧诱导动物模型,将同一天自然分娩的新生鼠(12h内)随机分成3组:给氧模型组和给氧治疗组、正常对照组。给氧模型再分成三个亚组模型组和治疗组均置于有机玻璃制作的半封闭氧舱中,舱内接入医用氧气,测氧仪调整浓度至 $80\% \pm 2\%$ ,24h后往氧气舱内通入氮气,迅速将氧浓度调整至 $10\% \pm 2\%$ ,并维持24h。如此反复,保持氧气舱内的氧气浓度每隔24h在80%和10%之间交替,持续7d后再转入空气中饲养。每天监测氧浓度8次,控制舱内环境温度在 $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ,更换垫料、加食、换水、替换母鼠1次。正常对照组、置于动物房饲养环境中。模型组与对照组比较,若视网膜铺片ADP酶染色示血管改变明显,突破视网膜内界膜长入玻璃体的血管内皮细胞核计数增多,差异有统计学意义,则造模成功。

[0127] 给氧治疗组分成1个亚组,于造模第7天,玻璃体腔注射给药,分别给予Vasculizumab,剂量为 $100 \mu\text{g}$ ;给氧模型组和对照组只给予生理盐水,连续给药1周。

[0128] 第14天时,乙醚麻醉处死后,摘除眼球,于40g/L多聚甲醛溶液中固定24h。梯度酒精脱水、二甲苯透明。浸蜡后连续切片,厚度 $4 \mu\text{m}$ ,尽量避开视盘周围。切片平行于角膜至视盘的矢状位平面。每只眼球随机取10张切片行苏木精伊红染色,计数突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核数目(仅计数与内界膜有紧密联系的血管内皮细胞核),统计平均每只眼球每张切片细胞数。

[0129] 结果:对照组中未发现或仅极少数切片中偶有突破视网膜内界膜长入玻璃体的血管内皮细胞核。模型组可见较多突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核,有些单独出现,有些成簇出现,同时在一些切片上还可见这些血管内皮细胞核邻近深层视网膜血管,证实他们来源于视网膜而非玻璃体或眼部其他组织。治疗组切片中仅可见少数突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核。

[0130] 表9:各组视网膜血管内皮细胞核计数

[0131]

组别	视网膜血管内皮细胞核计数
空白对照	$1.050 \pm 0.327$
Vasculizumab	$6.672 \pm 1.907$
给氧模型	$29.45 \pm 4.543$

[0132] 结果:见表9,Vasculizumab治疗组视网膜血管内皮细胞核计数为 $6.672 \pm 1.907$ ,与给氧组 $29.450 \pm 4.543$ 相比,血管内皮细胞核数都显著减少,证明Vasculizumab一定程度上都能够抑制氧诱导新生鼠视网膜病变模型新生血管的形成。

[0133] 实施例13

[0134] Vasculizumab对糖尿病视网膜病变大鼠模型新生血管的作用

[0135] 将STZ溶于 $0.1\text{mol/L}$ ,pH4.5的柠檬酸缓冲液中配制成2%的溶液。所有实验Wistar大鼠注射前禁食12h,每只大鼠按 $65\text{mg/kg}$ 剂量腹腔注射2%STZ溶液。注射后单笼饲养,48h检测尿糖和血糖。尿糖在+++以上,血糖高于 $16.7\text{mmol/L}$ 为成模标准。通过血糖、尿糖、尿量检测以及视网膜VEGF免疫组化检测,糖尿病视网膜病变模型建模成功。

[0136] 取成模大鼠20只,随机分为2组,标记为对照组、Vasculizumab治疗组。玻璃体腔给药,对照组注射生理盐水( $0.1\text{mL}$ ),Vasculizumab给药 $100 \mu\text{g}$ ( $0.1\text{mL}$ ),每日1次,给药2周,第4周、第8周、第12周天观察。

[0137] 表10:各组大鼠视网膜神经节细胞数目( $\text{mm}^{-2}$ )

[0138]

组别	第 4 周	第 8 周	第 12 周
对照组	208.24±3.15	206.52±3.21	196.07±2.85
Vasculizumab	192.56±2.98	229.14±2.56	254.16±3.82

[0139] 结果：光学显微镜下检测，每只眼球计数 10 张后极部视网膜神经节细胞数目，每只眼球测量 10 张后极部视网膜厚度。实验组大鼠视网膜组织较对照组大鼠视网膜组织各层厚度增加。实验组大鼠视网膜神经节细胞数目与对照组比较如表 10，治疗组视细胞数目和对照组视细胞数目对比增加，差异具有显著意义。

[0140] 实验结果表明：Vasculizumab 在 100  $\mu$ g 剂量下能够对糖尿病视网膜病变产生一定的治疗作用。

## SEQUENCE LISTING

- <110> 常州亚当生物技术有限公司  
 <120> 抗 VEGF 单克隆抗体 Fab 片段 Vasculizumab 及其应用  
 <130>  
 <160> 23  
 <170> PatentIn version 3.3  
 <210> 1  
 <211> 219  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <400> 1

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
           20           25           30
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
           35           40           45
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
           50           55           60
Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
65           70           75           80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
           85           90           95
Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
           100          105          110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Pro
           115          120          125
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
           130          135          140
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145           150          155          160
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
           165          170          175
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
           180          185          190
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
           195          200          205
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
  
```



210	215
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
1	5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr	
	20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile	
	35 40 45
Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
	50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	
65	70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp	
	85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala	
	100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Thr	
	115 120 125
Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys	
	130 135 140
Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu	
145	150 155 160
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser	
	165 170 175
Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala	
	180 185 190
Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe	
	195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 3  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <400> 3

gcatgtacta gttttgtcac aagatttggg	30
<210> 4	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 4	
caggtgcagc tcgagcagtc tggg	24
<210> 5	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 5	
caggtgcagc tgctcgagtc tggg	24
<210> 6	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 6	
caggtgcagc tactcgagtc ggg	23
<210> 7	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 7	
gaggtgcagc tcgaggagtc tggg	24
<210> 8	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 8	
gaggtgcagc tgctcgagtc tggg	24
<210> 9	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 9	
caggtgcagc tgctcgagtc ggg	23
<210> 10	
<211> 23	

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 10	
caggtgcagc tactcgagtg ggg	23
<210> 11	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 11	
caggtacagc tcgagcagtc agg	23
<210> 12	
<211> 58	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 12	
gcgccgtcta gaattaacac tctcccctgt tgaagctctt tgtgacgggc gaactcag	58
<210> 13	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 13	
gacatcgagc tcaccagtc tcca	24
<210> 14	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 14	
gatattgagc tcactcagtc tcca	24
<210> 15	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 15	
gaaattgagc tcacgcagtc tcca	24
<210> 16	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 16	

gacatcgagc tcacccagtc tcc	23
<210> 17	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 17	
cgccgtctag aattatgaac attctgtagg c	31
<210> 18	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 18	
aattttgagc tcactcagcc ccac	24
<210> 19	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 19	
tctgccgagc tccagcctgc ctccgtg	27
<210> 20	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 20	
tctgtggagc tccagccgcc ctcaactg	27
<210> 21	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 21	
tctgaagagc tccaggaccc tgttgtgtct gtg	33
<210> 22	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 22	
cagtctgagc tcacgcagcc cccc	24
<210> 23	
<211> 24	

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 23

cagactgagc tcactcagga gccc

24

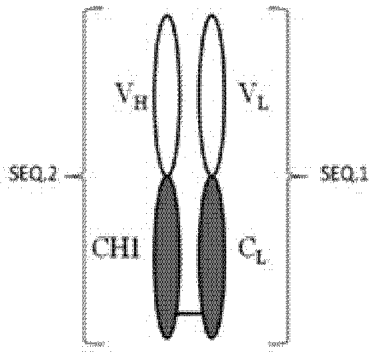


图 1

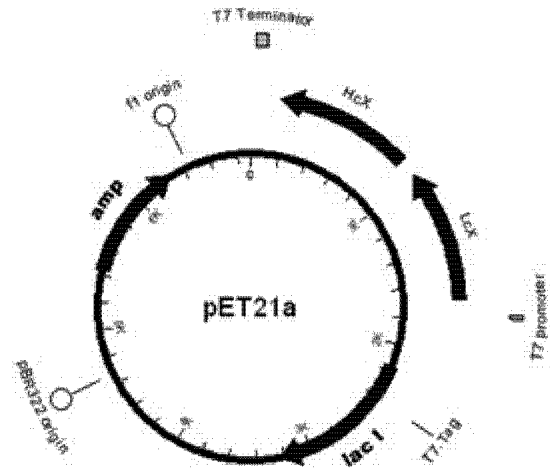


图 2

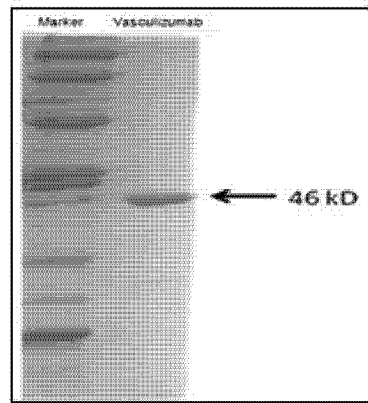


图 3

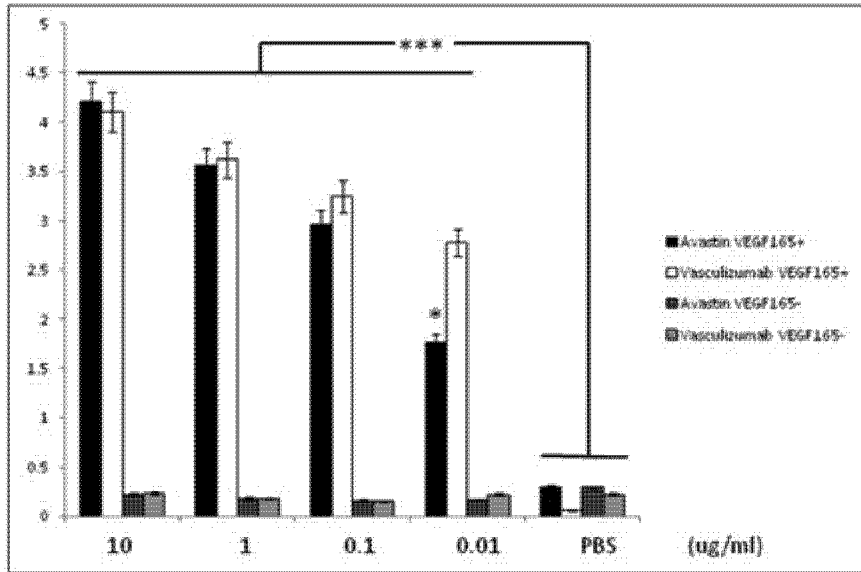
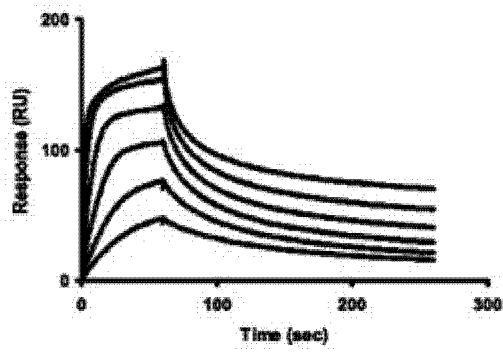
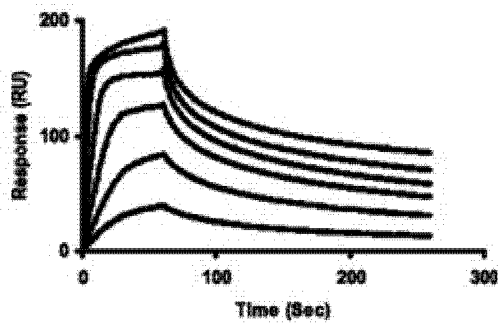


图 4



A



B

图 5

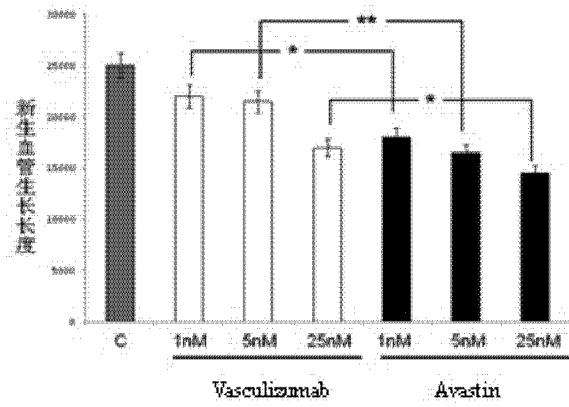


图 6

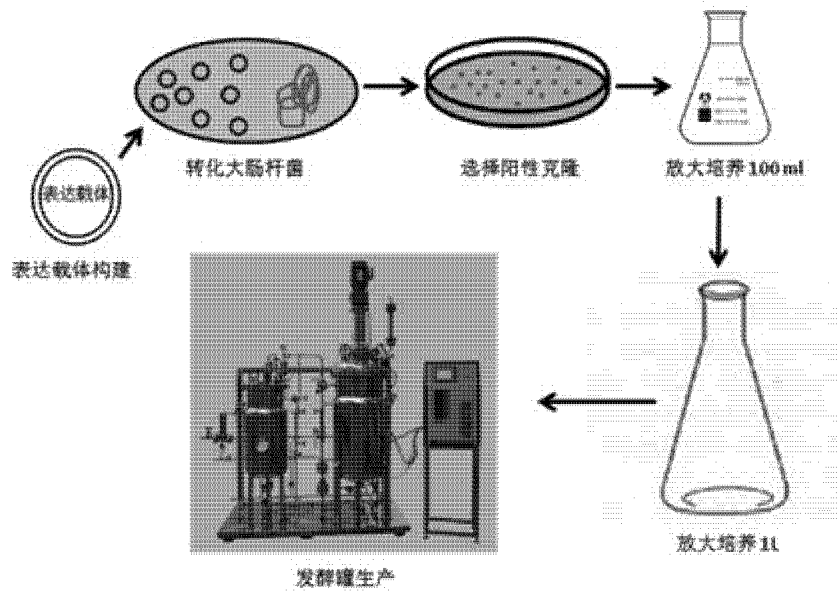


图 7