

一种双功能血管生成抑制剂及其用途

技术领域

[01] 本发明涉及一种双功能血管生成抑制剂及其用途,具体涉及一种具有 VEGF 抑制活性和 FGF 抑制活性的融合蛋白及其在抑制 VEGF 和 FGF 双因子或者高糖诱导的细胞增殖、细胞迁移和/或管腔成形中的用途,如抑制视网膜血管生成血管新生相关眼部疾病,糖尿病视网膜病变,年龄相关黄斑变性等。

背景技术

[02] 眼底新生血管是多种眼部疾病的严重并发症,新生血管可以在角膜、虹膜睫状体、脉络膜、视网膜、黄斑及视盘等几乎眼内所有组织中出现,它能够引起这些部位的组织出血、渗出及增生等一系列病理改变,因而造成眼球结构和功能的破坏,严重损害视功能。这一系列的眼底病变包括糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)、早产儿视网膜病(retinopathy of prematurity, ROP)、年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)等,严重影响视力,甚至致盲。

[03] 研究表明,VEGF 是目前所知对血管新生最特异、最有效的生长因子。1990 年代以来,以 VEGF 为靶标,通过阻断 VEGF 信号通路抑制眼底血管新生的药物成为开发的热点。兰尼单抗(Ranibizumab,商品名 Lucentis)可特异性地结合 VEGF-A,已获美国 FDA 批准用于治疗湿性老年黄斑变性和糖尿病性黄斑水肿。VEGF Trap-Eye(阿柏西普或 Eylea)是美国 Regeneron 制药公司开发的抗 VEGF 重组蛋白,临床研究结果显示对 DME(糖尿病性黄斑水肿)的疗效令人满意,已递交治疗 DME 补充申请。KH902(康柏西普,Conbercept)是成都康弘公司开发的针对老年黄斑变性(AMD)的 VEGFR-Fc 重组蛋白,2013 年 12 月批准上市用于治疗 AMD。以 VEGF 为靶标的雷珠单抗等成功用于 DR 的临床研究和临床应用中表明 VEGF 是 DR 的主要有效靶标之一。

[04] 尽管针对 VEGF 靶标的药物在临床上取得了很大的进展,由于血管新生受多种因子的调节,血管新生的调控是一个十分复杂的动态平衡过程。现有的药物在临床治疗中也存在很大的局限性,因此如何进一步提高抗血管新生的临床治疗效果是研究者需要解决的问题,也是研究开发下一代抗血管新生药物的重点。

[05] 成纤维细胞生长因子(FGF)是一种结合肝素的生长因子家族,其在多种生物学功能上具有重要作用,例如细胞增殖、分化、迁移、血管新生和肿瘤发生。其通过结合并活化细胞表面 FGF 受体(FGFR)发挥其多种生物学功能。成纤维细胞生长因子受体(fibroblast growth factor receptor, FGFR)是与成纤维细胞生长因子(FGF)家族成员相结合的受体,其一部分参与疾病过程。

[06] 申请人在专利 CN201110131029.X 公开了一种靶向 VEGF 和 FGF 的双特异性融合蛋白(专利 CN 201110131029.X 的 28[#]融合蛋白,以下简称 VF28),研究表明 VF28 融合蛋白具有良好的生物学活性,能够有效的靶向 VEGF 和 FGF 靶点,在治疗或预防肿瘤和/或眼科血管新生性疾病方面有显著的疗效。但是,在研究过程中发现,制备的 VF28 随着保存时间的延长存在活性不稳定的问题,在开展的 3 批次 VF28 原液长期试验中(-80°C±10°C长期试验条件),放置 0 时、1 个月、3 个月、6 个月,进行结合活性(ELISA 法)分析,数据显示,在 1 个月、3 个月、6 个月各监测时间点分别有 1 批次、2 批次、3 批次 VF28 原液结合活性检测结果不符合评价标准要求(FGF 端的结合活性不符合导致);在开展的 3 批 VF28 成品加速试验条件稳定性试验中,25°C±2°C加速试验条件下放置 1 个月,进行细胞活性分析。结果显示:三个批次中有一个批次的 VF28 成品细胞活性检测结果超出评价标准要求,不符合评价标准要求。

发明内容

[07] 针对上述问题,本发明提供了一种改构的、靶向 VEGF 和 FGF 的双功能血管生成抑制剂 RC28-05,其不仅具有良好的生物学活性,能够有效的抑制视网膜血管生成,在诸如糖尿病视网膜病变,年龄相关黄斑变性等眼部疾病中有显著的疗效,并且制备的产品保存稳定,不易降解,对储藏温度、环境等要求较低。

[08] 具体的,本发明提供了一种双功能血管生成抑制剂,其具有 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列。

[09] 进一步的,所述的双功能血管生成抑制剂,具有 VEGF 抑制活性和 FGF 抑制活性。

[10] 进一步的,所述的双功能血管生成抑制剂,能够抑制 VEGF 和 FGF 双因子或者高糖诱导的细胞增殖、细胞迁移和/或管腔成形。

[11] 本发明提供了上述双功能血管生成抑制剂在制备用于抑制视网膜血

管生成的药物中的用途。

[12] 进一步的,提供了上述双功能血管生成抑制剂在制备用于治疗血管新生相关眼部疾病的药物中的用途。

[13] 优选的,所述血管新生相关眼部疾病选自:年龄相关性黄斑变性例如干性 AMD 和湿性 AMD,糖尿病视网膜病变例如非增殖型 DR、增殖型 DR 和 DME,糖尿病性黄斑水肿,早产儿视网膜病和视网膜血管阻塞。

[14] 进一步的,提供了上述双功能血管生成抑制剂在糖尿病对象中改善视网膜损伤之药物中的用途。

[15] 优选的,所述的视网膜损伤为短期视网膜损伤。

[16] 进一步的,所述短期视网膜损伤选自减少视网膜血管网中凋亡细胞的数量、降低血-视网膜屏障的渗漏、抑制视网膜胶质细胞反应性增生、以及改善神经视网膜和视网膜血管的超微结构。

[17] 优选的,所述的视网膜损伤为长期视网膜损伤。

[18] 进一步的,所述长期视网膜损伤选自改善视网膜屏障渗漏以及抑制毛细血管基底膜的增厚。

[19] 进一步的,提供了上述双功能血管生成抑制剂在制备用于在视网膜病对象中改善视网膜无血管灌注区或者降低视网膜新生血管细胞核数之药物中的用途,优选的,视网膜病对象为早产儿。

[20] 进一步的,提供了上述双功能血管生成抑制剂在制备用于在对象中降低视网膜血管内皮细胞增殖、移行和/或管腔形成之药物中的用途。

[21] 本发明还提供了一种包含编码双功能血管生成抑制剂的核苷酸序列的分离的多核苷酸,其中所述双功能血管生成抑制剂的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示,其核苷酸序列如 SEQ ID NO:3 所示的。

[22] 本发明还提供了一种包含上述多核苷酸的核酸构建体,所述多核苷酸可操作地连接于一个或几个调控序列,所述调控序列指导所述多肽在表达宿主中的产生。

[23] 本发明还提供了一种包含上述多核苷酸的载体,优选的,所述载体为表达载体,所述的多核苷酸可操作地连接于一个或多个调控序列,所述调控序列指导所述多肽在表达宿主中的产生。

[24] 本发明还提供了一种包含上述多核苷酸或核酸构建体或表达载体的

宿主细胞,所述多核苷酸可操作地连接于一个或多个调控序列,所述调控序列指导多肽的产生。优选的,所述细胞为哺乳动物细胞或人源细胞。更优选的,所述细胞为 CHO 细胞。

5 [25] 本发明还提供了一种制备所述的双功能血管生成抑制剂的方法,该方法包括在允许表达该双功能血管生成抑制剂的条件下培养前述任一项所述的宿主细胞,并且回收该抑制剂。

[26] 本发明还提供了一种包含前述任一项所述的多肽和/或载体的药物组合物。

[27] 本发明还提供了一种包含上述组合物的试剂盒。

10 附图说明

[28] 图 1 VF28 和 RC28-05 对 VEGF165 刺激 HUVECs 细胞增殖抑制结果。

[29] 图 2 VF28 和 RC28-05 对 bFGF 刺激 HUVECs 细胞增殖抑制结果。

具体实施方式

[30] 定义:

15 [31] 除非另有定义,本文使用的所有科技术语具有本领域普通技术人员所理解的通常含义。关于本领域的定义及术语,专业人员具体可参考 Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel)。氨基酸残基的缩写是本领域中所用的指代 20 个常用 L-氨基酸之一的标准 3 字母和/或 1 字母代码。

20 [32] 尽管本发明的广义范围所示的数字范围和参数近似值,但是具体实施例中所示的数值尽可能准确的进行记载。然而,任何数值本来就必然含有一定的误差,其是由它们各自的测量中存在的标准偏差所致。另外,本文公开的所有范围应理解为涵盖其中包含的任何和所有子范围。例如记载的“1 至 10”的范围应认为包含最小值 1 和最大值 10 之间(包含端点)的任何和所有子范围;也就是说,所有以最小值 1 或更大起始的子范围,例如 1 至 6.1,以及以最大值 10 或更小终止的子范围,例如 5.5 至 10。另外,任何称为“并入本文”的参考文献应理解为以其整体并入。

[33] 本文使用的术语“可溶性”蛋白是指在生物学相关的温度、pH 水平和渗透压下可溶于水溶液的蛋白。在某些特定技术方案中,本发明的融合蛋白是可溶性融合蛋白。

30 [34] 如本文所用,术语“分离的”是指以下物质和/或实体,(1)与起初产生时(在天然环境中和/或在试验设置中)和其相关联的至少一些组分相

分离和/或(2)通过人工生产、制备和/或制造。分离的物质和/或实体可与至少约 10%、约 20%、约 30%、约 40%、约 50%、约 60%、约 70%、约 80%、约 90%、约 95%、约 98%、约 99%、基本 100%或 100%的其初始相关联的其他组分相分离。在某些特定技术方案中，本发明的融合蛋白是分离的融合蛋白。

[35] 本文使用的术语“VEGF”是指血管内皮生长因子。本文使用的术语“VEGFR”是指血管内皮生长因子受体，其可以是 VEGFR1、VEGFR2 和/或 VEGFR3。优选地，本发明中的 VEGFR 是 VEGFR1 和/或 VEGFR2，优选人的 VEGFR。

[36] 本文使用的术语“FGF”是指成纤维细胞生长因子。本文使用的术语“FGFR”是指成纤维细胞生长因子受体，其可以是 FGFR1、FGFR2、FGFR3 和/或 FGFR4。优选地，本发明中的 FGFR 是 FGFR1，更优选人 FGFR1。

[37] 本文所使用的术语“对象”包括哺乳动物人类等哺乳动物如家养动物（如狗、猫等），家畜（如牛、羊、猪、马等）或实验动物（如猴子、大鼠、小鼠、兔子、豚鼠等）。

[38] 本发明的融合蛋白还可包含翻译后修饰。这样的修饰包括但不限于乙酰化、羧基化、糖基化、磷酸化、脂化和酰基化。结果，经修饰的蛋白可包含非氨基酸组分，例如聚乙二醇、脂质、多糖或单糖以及磷酸。这样的非氨基酸组分对蛋白功能的作用可如本文所述的那样进行测试。当蛋白在细胞中产生时，翻译后加工对于正确折叠和/或融合蛋白功能可能也是重要的。不同的细胞（例如 CHO、HeLa、MDCK、293、WI38、NIH-3T3 或 HEK293）拥有针对这些翻译后活性的特定细胞机器和特有机制，并且可以选择不同的细胞以确保蛋白的正确修饰和加工。

[39] 本文所述的蛋白可通过任何本领域已知的方法产生。例如化学合成或从核酸表达来产生。可根据本领域已知的完善的标准液体或优选固相肽合成方法容易地制备用于本发明的肽（参见，例如 J. M. Stewart 和 J. D. Young, Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd edition, Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois (1984), in M. Bodanzsky 和 A. Bodanzsky, The Practice of Peptide Synthesis, Springer Verlag, New York (1984)）。可以使用本领域已知技术产生所述融合蛋白以在位于预期包含在所述蛋白中的多肽序列内的半胱氨酸残基之间形成一个或多个分子内交联（参见例如美国专利 No. 5478925）。另外，本文所述融合蛋白可以通过在所述融合蛋白的 C 端或 N 端添加半胱氨酸或生物素进行常规修饰。

[40] 本文使用的术语“治疗有效量”或“有效量”是指足以显示其对于所施用对象益处的剂量。施用的实际量，以及施用的速率和时间过程会取决于所治疗者的自身情况和严重程度。治疗的处方（例如对剂量的决定等）最终是全科医生及其它医生的责任并依赖其做决定，通常考虑所治疗的疾病、患者个体的情况、递送部位、施用方法以及对于医生来说已知的其它因素。

[41] 本文使用的术语“VF28”表示特定的 VEGFR-FGFR 融合蛋白，其包含 VEGFR1 的第二 Ig 样结构域、VEGFR2 的第三 Ig 样结构域、源自 FGFR Ig 样结构域中间功能性序列区的部分、FGFR 第二 Ig 样结构域、FGFR 第三 Ig 样结构域和 Fc 片段。VF28 是中国专利 201110131029.X 中 28[#]融合蛋白的缩写，其构建过程和其他信息可参见中国专利 201110131029.X 的公开文本中。具体地，VF28 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示。

[42] 本文使用的术语“原液”为经纯化后分装于中间贮存容器中的融合蛋白液，本发明中的原液是将细胞培养液经亲和层析、去病毒处理、粗滤层析、精纯后得到的；本文使用的术语“成品”为将原液经除菌过滤后分装于无菌终容器中并经封包后的融合蛋白液，本发明中的成品是将原液添加一定配比的辅料（磷酸二氢钠、氯化钠、蔗糖、聚山梨酯 80）后，除菌过滤获得。

[43] 本文使用的术语“FGF-Trap”是指 FGFR-Fc 融合蛋白，其可用作 FGF 的 Trap，从而拮抗 FGF。具体地，本发明实施例中所用的 FGF-Trap 是 26[#] FGFR 融合蛋白，其构建过程和其他信息可参见 CN102219860A。

[44] 本文使用的术语“VEGF-Trap”是指 VEGFR-Fc 融合蛋白，其可用作 VEGF 的 Trap，从而拮抗 VEGF。具体地，本发明实施例中所用的 VEGF-Trap 是美国 Regeneron 制药公司开发的抗 VEGF 重组蛋白（ETLEA，艾力亚），其可从市场上购得。

[45] 实施例是对本发明进行进一步的阐述和解释，而不应被看作是对本发明的限制。

[46] 实施例 1：宿主细胞的选择

[47] 二氢叶酸还原酶（DHFR）基因缺陷的中国仓鼠卵巢细胞（Chinese Hamster Ovary Cell, CHO/dhfr-）购自美国 ATCC，目录号 CRL-9096，批号（Lot number）3691620。CHO/dhfr-细胞在添加次黄嘌呤和胸苷（HT）及 10%胎牛血清（FBS）的 IMDM 完全培养基培养，细胞呈多边形，贴壁生长，传

代3次后,置细胞于液氮冻存。为获得适应无血清悬浮培养的 CHO/dhfr-细胞,取冻存的细胞一支,在37°C水浴中解冻,将细胞悬浮于含10%FBS和HT的Ex-Cell 302 CHO培养基(Sigma),在细胞培养瓶中让细胞贴壁生长,待细胞生长良好后,将细胞悬浮于30mL含5%胎牛血清的Ex-Cell 302 CHO培养基,摇瓶培养。待细胞长至 $1-2 \times 10^6$ / mL,转入含2.5%胎牛血清的Ex-Cell 302 CHO细胞培养基,摇瓶培养。如此逐级分别在含1.5%和0.5%胎牛血清的Ex-Cell 302培养基中摇瓶培养适应。最后,将细胞悬浮于无血清的Ex Cell 302 CHO培养基,摇瓶培养。细胞生长良好后,离心收集细胞,将细胞悬浮于含10% DMSO的Ex-Cell 302 CHO培养基中,液氮冻存,该为经无血清培养驯化的CHO细胞原始细胞库。经无血清培养驯化的CHO细胞在悬浮培养条件下呈圆形或近圆形。

[48] 实施例2: 目的基因

[49] RC28-05 融合蛋白为双功能血管生成抑制活性的融合蛋白,其由VEGFR和FGFR的部分氨基酸序列,与人免疫球蛋白Fc片段融合而成,其氨基酸序列如下所示(如SEQ ID NO:1所示):

```

GRPFVEMYSE IPEIIHMTG RELVIPCRVT SPNITVTLKK FPLDTLIPDG KRIIWDSRKG      60
FIISNATYKE IGLLTCEATV NGHLYKTNLY THRQTNTIID VVLSPSHGIE LSVGEKLVNL      120
CTARTELVNG IDFNWEYPSS KHQHKLVNR DLKTQSGSEM KKFLSTLTID GVTRSDQGLY      180
TCAASSGLMT KKNSTFVRVH EKPVPYWTS PEKMEKKLHA VPAAKTVKFK CPSSGTPNPT      240
LRWLKNGKEF KPDHRIGGYK VRYATWSIIM DSVVPSDKGN YTCIVENEYG SINHTYQLDV      300
VERSPHRPIL QAGLPANKTV ALGSNVEFMC KVYSDPQPHI QWLKHIEVNG SKIGPDNLPLY      360
VQILKTAGVN TTDKEMEVLH LRNVSFEDAG EYTCLAGNSI GLSHHSAWLT VLEADKTHTC      420
PPCPAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN      480
AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP      540
QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPP VLDSGDSFFL      600
YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K                          641

```

[50] RC28-05 的核苷酸序列如下所示(1923bp)(如SEQ ID NO:3所示):

```

ggtagaccat tcgtagagat gtacagtga atccccgaaa ttatacacat gactgaagga      60
agggagctcg tcattccctg ccgggttacg tcacctaaca tcactgttac tttaaaaaag      120
tttccacttg acactttgat ccctgatgga aaacgcataa tctgggacag tagaaagggc      180
ttcatcatat caaatgcaac gtacaaagaa atagggtctc tgacctgtga agcaacagtc      240

```

	aatgggcatt tgtataagac aaactatctc acacatcgac aaaccaatac aatcatagat	300
	gtggttctga gtccgtctca tggaattgaa ctatctgttg gagaaaagct tgtctttaat	360
	tgtacagcaa gaactgaact aaatgtggg attgacttca actgggaata cccttcttcg	420
	aagcatcagc ataagaaact tgtaaaccga gacctaaaaa cccagtctgg gaggatgatg	480
5	aagaaatttt tgagcacctt aactatagat ggtgtaaccc ggagtgacca aggattgtac	540
	acctgtgcag catccagtgg gctgatgacc aagaagaaca gcacatttgt cagggtccat	600
	gaaaaacccg tagctccata ttggacatcc ccagaaaaga tggaaaagaa attgcatgca	660
	gtgccggctg ccaagacagt gaagttcaaa tgcccttcca gtgggacccc aaaccccaca	720
	ctgcgctggt tgaaaaatgg caaagaattc aaacctgacc acagaattgg aggctacaag	780
10	gtccgttatg ccacctggag catcataatg gactctgttg tgccctctga caagggaac	840
	tacacctgca ttgtggagaa tgagtacggc agcatcaacc acacatacca gctggatgtc	900
	gtggagcggg cccctcaccg gccatcctg caagcagggt tgcccgccaa caaacagtg	960
	gccctgggta gcaacgtgga gttcatgtgt aagggtgaca gtgacccgca gccgcacatc	1020
	cagtggctaa agcacatcga ggtgaatggg agcaagattg gccagacaa cctgccttat	1080
15	gtccagatct tgaagactgc tggagttaat accaccgaca aagagatgga ggtgcttcac	1140
	ttaagaaatg tctcctttga ggacgcaggg gagtatacgt gcttggcggg taactctatc	1200
	ggactctccc atcactctgc atggttgacc gttctggaag ccgacaaaac tcacacatgc	1260
	ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa	1320
	cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc cctgaggtea catgcgtggt ggtggacgtg	1380
20	agccacgaag accctgaggt caagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat	1440
	gccaaagaaa agccgcggga ggagcagtac aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc	1500
	accgtcctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa	1560
	gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca	1620
	cagggtgtaca ccctgcccc atcccgggat gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc	1680
25	tgcttggtca aaggcttcta tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag	1740
	ccggagaaca actacaagac cagcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc	1800
	tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc	1860
	gtgatgcatg aggtcttgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt	1920
	aaa	1923

[51] 在 RC28-05 目的基因序列两端引入双酶切位点后插入常规表达载体，采用通用方法转染 CHO 细胞，筛选出 RC28-05 表达细胞株，进行 RC28-05 融合蛋白的表达。

[52] 实施例 3：融合蛋白的亲合力实验

5 [53] 用 ForteBio Octet (PALL 公司) 对 VF28、RC28-05 的亲合力进行检测，将检测板 A-E 行第 1 列各孔加入 PBS (pH 7.4) 作为平衡液，探针浸泡活化 10 min；用 PBS 分别稀释 RC28-05 和 VF28 至浓度为 50 nM，加入 96 孔测定板 A-E 行第 2 列，设定程序为 Loading, 300 s；检测板 A-E 行第 3 列各孔加入 PBS 作为平衡液，设定程序为 Baseline, 180 s；以 PBS 为稀释液，
10 将 rhVEGF (R&D) 和 rhFGF (R&D) 分别稀释至浓度为 500 nM 和 400 nM，然后 1:2 向下系列稀释 3 个梯度(共四个梯度)至浓度为 62.5 nM 和 50 nM，将系列稀释样品分别加入 96 孔板 A-D 行的第 4 列，同时将稀释液加入 E 行的第 4 列，作为阴性对照，设定程序为 Association, 600 s；A-E 行第 5 列各孔加入 PBS 作为解离液，设定程序为 Dissociation, 1800 s；A-E 行第
15 6 和 7 列分别加入 10 mM 甘氨酸 (pH1.5) 和 PBS 作为重生液和中和液，程序分别设定为 Regeneration 和 Neutralization, 各 15 s，反复 5 次。共计检测 3 个循环。使用 Data analysis7.0 软件对数据进行分析。以对应的未结合 rhVEGF/rhFGF 的传感器为对照扣减背景，计算平衡常数(KD) 值。结果如表 1 所示，结果显示 RC28-05 和 VF28 与 rhVEGF、rhFGF 均具有良好的
20 的亲合力。

表1 RC28-05与VF28的亲合力比较结果统计

样品	因子	平衡常数 KD (M)	结合常数 kon(1/Ms)	解离常数 kdis(1/s)	N
RC28-05	rhVEGF165	2.70E-10 ± 1.28E-10	2.30E+05 ± 0.64E+05	5.65E-05 ± 0.75E-05	3
VF28	rhVEGF165	2.51E-10 ± 5.65E-11	2.76E+05 ± 7.94E+04	6.68E-05 ± 1.31E-05	3
RC28-05	rhFGF2	3.28E-09 ± 1.60E-09	2.66E+04 ± 1.01E+04	7.96E-05 ± 2.42E-05	3
VF28	rhFGF2	5.24E-09 ± 2.07E-09	1.90E+04 ± 1.74E+03	9.78E-05 ± 3.26E-05	3

[54] 实施例 4：融合蛋白的细胞活性实验

25 [55] 取 10 代内 HUVECs 细胞，调整密度为 5×10^4 个/mL，接种至 96 孔板，100 μ L/孔(即 5000 个细胞/孔)。细胞贴壁后，加入条件培养液或 VEGF165 或 bFGF 因子 (40 ng/mL) 或 VEGF165 + 不同浓度的 RC28-05 或 VF28 药物 (终浓度为 0、0.0125、0.0625、0.125、0.25、0.5、1、5、25 nM) 或 bFGF+

不同浓度的 RC28-05 或 VF28 药物（终浓度为 0、0.0156、0.0625、0.25、0.5、1、2、8、32 nM），100 μL/孔，培养终体积 200 μL/孔，每样品 3 复孔；37℃，5% CO2 培养箱继续培养。在加药 72 小时后，甩干 96 孔板中培养液，每孔加入含 10% CCK-8 的内皮细胞基础培养液，100 μL/孔。37℃孵育 4 小时，酶标仪检测 OD450。以细胞增殖抑制率%=(OD 因子-OD(因子+药物))/OD 因子×100 计算每一浓度下相应药物对 VEGF165/bFGF 促 HUVECs 增殖抑制率，利用 Prism 软件计算药物的 IC50 值，测试最大药物浓度的抑制率采用实测值，比较 RC28-05 与 VF28 对 VEGF165/bFGF 刺激下 HUVECs 细胞增殖的抑制作用差异。VF28 和 RC28-05 对 VEGF165/bFGF 刺激 HUVECs 细胞增殖的抑制结果见图 1 和图 2，最大抑制率和 IC50 值统计见表 2。结果表明 RC28-05 与 VF28 对 VEGF165/bFGF 刺激下 HUVECs 细胞增殖的均有显著的抑制作用。

表2 RC28-05与VF28对VEGF₁₆₅/bFGF刺激下HUVECs细胞增殖的抑制作用

药物	刺激因子	IC ₅₀ (nM)	最大抑制率(%)
VF28	VEGF ₁₆₅	0.48	82.34±1.83
	bFGF	3.20	70.16±2.79
RC28-05	VEGF ₁₆₅	0.43	80.19±0.27
	bFGF	1.50	70.40±1.05

- [56] 实施例 5：RC28-05 原液及成品的制备
- [57] RC28-05 原液及成品的制备与 VF28 的制备方法相同，具体为：
- 1) 将细胞培养液离心后，收集上清液进行蛋白 A 亲和层析；
 - 2) 将收集的全部洗脱液进行有机溶剂/去污剂处理（S/D）后，将处理后的洗脱液中加入 1%聚山梨酯 80（W/V）和 0.3%磷酸三丁酯（W/V），20-25℃放置 6h，灭活脂包膜类病毒；
 - 3) 经上述处理后，再经 Sepharose 阳离子交换层析去除聚合体和降解物等相关杂质；
 - 4) 将收集的全部洗脱液再进行阴离子交换层析去除少量聚体、CHO 宿主细胞蛋白、宿主 DNA 和细胞内毒素等；
 - 5) 收集上述层析后的穿透液，再进行纳米膜过滤去除非脂包膜类病毒；
 - 6) 将纳米膜过滤后的蛋白液超滤浓缩至一定浓度后（10-15mg/mL），

使用 10-12 倍于浓缩蛋白体积的缓冲液（0.02mol/L 磷酸二氢钠、0.015mol/L 氯化钠、0.2mol/L 蔗糖、PH 6.8）进行置换透析，再将蛋白液浓缩（40-45mg/mL），添加 0.02%（W/V）的聚山梨酯 80 搅拌溶解后，使用 0.45+0.2 μ m 膜过滤后所得蛋白液即为 RC28-05 原液，蛋白浓度 40-45mg/mL。

[58] 7) 成品制备：1000 支规格为 40mg/mL（0.2ml/支）的成品的制备方法如下，测定上述蛋白原液中 RC28-05 蛋白的浓度，定义为 C mg/mL，考虑到 10%的灌装损耗，总计需要配制 220ml 蛋白液。则需要的总蛋白量为 220ml*40 mg/mL*0.2ml=8.8g 蛋白。则需要使用蛋白原液体积为 V=8.8/C*1000（mL），取 V mL 蛋白原液，向其中加入缓冲液（0.02mol/L 磷酸二氢钠、0.015mol/L 氯化钠、0.2mol/L 蔗糖、0.02%（W/V）聚山梨酯 80）至 220mL，混合均匀，用孔径不大于 0.22 μ m 的滤膜过滤除菌，分装、轧铝盖、装盒后，即为 RC28-05 成品。

[59] 实施例 6：RC28-05（原液/成品）稳定性试验

[60] 1.RC28-05 原液稳定性试验

[61] （1）不同放置时间（-80℃±10℃）的纯度分析

[62] ① SEC-HPLC 法

[63] 3 批 RC28-05 原液（批号为：RC28-05-YY20160329、RC28-05-YY20160330、RC28-05-YY20160331）于-80℃±10℃长期试验条件下放置 0 时、6 个月、9 个月、12 个月，进行纯度（SEC-HPLC 法）分析，各监测时间点检验样品 SEC 纯度检测结果主峰均≥95.0%，详见表 14。

表 14 RC28-05 原液（-80℃±10℃）SEC 纯度检验结果（单位：%）

批号 \ 周期	SEC 纯度%			
	T0	6m	9m	12m
RC28-05-YY20160329	98.4	98.2	98.5	100.0
RC28-05-YY20160330	98.0	97.9	98.1	99.8
RC28-05-YY20160331	97.7	97.5	97.8	99.2

备注：该 SEC 纯度评价标准为主峰≥95.0%；

“m”代表“月”。

[64] ② SDS-PAGE 法

[65] 3 批 RC28-05 原液（批号为：RC28-05-YY20160329、RC28-05-YY20160330、RC28-05-YY20160331）于-80℃±10℃长期试验条件下放置 0 时、6 个月、9 个月、12 个月，进行纯度（SDS-PAGE 法）分析，结果见表 15 所示，数据显示随着放置时间的延长，RC28-05 原液的 SDS-PAGE 还原纯度检测结果均高于 90%。

表 15 RC28-05 原液（-80℃±10℃）SDS-PAGE 纯度检验结果（单位：%）

周期 批号	SDS-PAGE 还原纯度%			
	T0	6m	9m	12m
RC28-05-YY20160329	98.1	98.3	97.7	97.6
RC28-05-YY20160330	98.1	98.1	97.8	97.5
RC28-05-YY20160331	98.8	98.2	97.1	97.8

备注：该 SDS-PAGE 纯度的评价标准为非还原纯度≥90%；

“m”代表“月”。

[66] （2）不同放置时间（-80℃±10℃）原液的细胞活性实验

[67] 3 批 RC28-05 原液（批号为：RC28-05-YY20160329、RC28-05-YY20160330、RC28-05-YY20160331）于-80℃±10℃长期试验条件下放置 12 个月，进行细胞活性分析；结果显示，RC28-05 原液于-80℃±10℃条件下放置 12 个月，经细胞活性分析，试验周期内各个检测时间点细胞相对活性均符合质量要求。详见表 16。

表 16 RC28-05 原液（-80℃±10℃）相对细胞活性检验结果（单位：%）

周期 批号	相对细胞活性%			
	T0	6m	9m	12m
RC28-05-YY20160329	85.1	92.8	81.8	103.3
RC28-05-YY20160330	93.0	88.1	77.7	95.7
RC28-05-YY20160331	86.7	100.5	92.7	106.0

备注：该相对细胞活性的评价标准为相对细胞活性应为 70%~130%；

“m”代表“月”。

[68] （3）不同放置时间（-80℃±10℃）原液的结合活性实验

[69] 3 批 RC28-05 原液（批号为：RC28-05-YY20160329、RC28-05-YY20160330、RC28-05-YY20160331）于-80℃±10℃长期试验条件下放置 12 个月，进行结合活性（ELISA 法）分析；结果显示，RC28-05 原液于-80℃±10℃条件下放置 12 个月，经相对结合活性检验分析，试验周期内各个检测时间点细胞相对活性均符合质量要求。详见表 17。

表 17 RC28-05 原液（-80℃±10℃）相对结合活性检验结果（单位：%）

批号	周期	相对结合活性			
		T0		6m	9m
		VEGF	FGF		
RC28-05-YY20160329		87.6	97.4	101.4	114.6
RC28-05-YY20160330		120.2	109.6	99.6	105.0
RC28-05-YY20160331		103.0	94.5	101.5	103.6

备注：相对结合活性的评价标准相对结合活性应为 70%~130%；

0 点为双体系分析，其余时间点为单体系分析；

“m”代表“月”。

[70] 2.RC28-05 成品稳定性试验

[71] （1）不同放置时间的纯度分析

[72] ① SEC-HPLC 法

[73] 3 批 RC28-05 成品(批号为:RC28-05-20160401-1、RC28-05-20160401-2、RC28-05-20160401-3) 分别于 5℃±3℃长期试验条件下放置 12 个月，25℃±2℃加速试验条件下放置 1 个月，进行纯度（SEC-HPLC 法）分析，实验结果显示，5℃±3℃长期试验条件下放置 12 个月，经纯度（SEC-HPLC 法）分析,实验周期内各检测时间点检验样品的 SEC 纯度检测结果均大约 95%；25℃±2℃加速试验条件下放置 1 个月时，各监测时间点检验样品 SEC 纯度检测结果主峰均≥95.0%，详见表 18 和表 19。

表 18 RC28-05 成品 (5°C±3°C) SEC 纯度检验结果 (单位: %)

批号 \ 周期	SEC 纯度				
	T0	3m	6m	9m	12m
RC28-05-20160401-1	98.4	98.4	97.4	96.9	97.9
RC28-05-20160401-2	98.1	98.1	97.0	96.6	97.1
RC28-05-20160401-3	97.7	97.7	96.7	96.4	96.9

备注: 该 SEC 纯度评价标准为主峰≥95.0%;

“m”代表“月”。

表 19 RC28-05 成品 (25°C±2°C) SEC 纯度检验结果 (单位: %)

批号 \ 周期	SEC 纯度			
	0d	10d	20d	30d
RC28-05-20160401-1	98.4	96.6	96.1	96.6
RC28-05-20160401-2	98.1	96.3	95.8	96.1
RC28-05-20160401-3	97.7	96.2	95.6	95.9

备注: 该 SEC 纯度评价标准为主峰≥95.0%;

“m”代表“月”。

[74] ② SDS-PAGE 法

[75] 3 批 RC28-05 成品(批号为:RC28-05-20160401-1、RC28-05-20160401-2、RC28-05-20160401-3) 分别于 5°C±3°C 长期试验条件下放置 12 个月, 25°C ±2°C 放置 1 个月, 进行纯度 (SDS-PAGE 法) 分析, 结果显示, RC28-05 成品在 5°C±3°C 放置 12 个月, 经纯度 (SDS-PAGE) 分析, 试验周期内各个测时间点检验样品的 SDC-PAGE 还原纯度检测结果均大于 90.0%; RC28-05 成品在 25°C±2°C 放置 6 个月, 经纯度 (SDS-PAGE) 分析, 试验周期内各个测时间点检验样品的 SDC-PAGE 还原纯度有下降趋势, 但是检测结果均大于 90.0%。详见表 20、表 21。

表 20 RC28-05 成品 (5°C±3°C) SDS-PAGE 纯度检验结果 (单位: %)

批号	周期	SDS-PAGE 还原				
		0h	3m	6m	9m	12m
RC28-05-20160401-1		98.9	97.7	97.0	96.9	95.7
RC28-05-20160401-2		97.9	97.6	96.7	97.7	95.9
RC28-05-20160401-3		98.0	97.6	97.0	96.9	96.3

备注：该 SDS-PAGE 纯度的评价标准为非还原纯度≥90%；

“m”代表“月”。

表 21 RC28-05 成品（25℃±2℃）SDS-PAGE 还原纯度检验结果（单位：%）

批号	周期	SDS-PAGE 还原			
		0h	10d	20d	30d
RC28-05-20160401-1		98.9	96.3	97.5	97.8
RC28-05-20160401-2		97.9	96.1	97.4	97.6
RC28-05-20160401-3		98.0	96.0	96.8	98.1

备注：该 SDS-PAGE 纯度的评价标准为非还原纯度≥90%；

“d”代表“天”。

[76] （2）不同放置时间成品的细胞活性实验

[77] 3 批 RC28-05 成品(批号为:RC28-05-20160401-1、RC28-05-20160401-2、RC28-05-20160401-3) 分别于 5℃±3℃长期试验条件下放置 12 个月，25℃±2℃放置 1 个月，进行细胞活性分析。结果显示：5℃±3℃条件下放置 12 个月，经细胞活性分析，试验周期内各监测时间点检验样品相对细胞活性结果均符合评价标准要求；25℃±2℃条件下放置 1 个月，经细胞活性分析，试验周期内各监测时间点相对细胞活性检测结果均符合质量要求。详见表 22、表 23。

10

表 22 RC28-05 成品（5℃±3℃）相对细胞活性检验结果（单位：%）

周期	相对细胞活性
----	--------

批号 \ 周期	0h	3m	6m	9m	12m
RC28-05-20160401-1	120.8	125.1	111.8	85.4	100.2
RC28-05-20160401-2	104.3	125.1	96.1	85.0	103.4
RC28-05-20160401-3	105.2	111.7	100.5	93.7	100.3

备注：该细胞活性的评价标准为相对细胞活性应为 70%~130% 。

“m”代表“月”。

表 23 RC28-05 成品（25℃±2℃）相对细胞活性检验结果（单位：%）

批号 \ 周期	相对细胞活性			
	0h	10d	20d	30d
RC28-05-20160401-1	120.8	103.4	88.7	110.0
RC28-05-20160401-2	104.3	93.4	90.6	108.4
RC28-05-20160401-3	105.2	94.4	88.0	104.1

备注：该细胞活性的评价标准为相对细胞活性应为 70%~130% 。

“d”代表“天”。

[78] （3）不同放置时间成品的结合活性实验

[79] 3 批 RC28-05 成品(批号为:RC28-05-20160401-1、RC28-05-20160401-2、RC28-05-20160401-3) 分别于 5℃±3℃长期试验条件下放置 12 个月，25℃±2℃放置 1 个月，进行结合活性分析。结果显示：5℃±3℃条件下放置 12 个月，经结合活性分析，试验周期内各监测时间点检验样品相对结合活性结果均符合评价标准要求；25℃±2℃条件下放置 1 个月，经结合活性分析，试验周期内各监测时间点相对结合活性（VEGF 端和 FGF 端）检测结果均符合质量要求。详见表 24、表 25。

表 24 RC28-05 成品（5℃±3℃）相对结合活性检验结果（单位：%）

批号 \ 周期	相对结合活性				
	0h (VEGF;FGF)	3m	6m	9m	12m
RC28-05-20160401-1	72.8;90.5	111.6	107.6	104.9	119.3
RC28-05-20160401-2	76.9;76.5	116.1	102.4	112.0	109.8
RC28-05-20160401-3	85.5;86.1	107.1	98.5	110.2	111.1

备注：该结合活性的评价标准为相对结合活性应为 70%~130%。

0h 为双体系分析，其余时间点变为单体系分析。

“m”代表“月”。

表 25 RC28-05 成品 (25℃±2℃) 相对结合活性检验结果 (单位：%)

批号 \ 周期	相对结合活性			
	0h (VEGF;FGF)	10d	20d	30d
RC28-05-20160401-1	72.8;90.5	112.4	104.5	95.7
RC28-05-20160401-2	76.9;76.5	109.4	120.5	101.2
RC28-05-20160401-3	85.5;86.1	107.8	118.6	113.1

备注：该结合活性的评价标准为相对结合活性应为 70%~130%。

0h 为双体系分析，其余时间点变为单体系分析。

“d”代表“天”。

[80] 3.实验结论

[81] 通过对 3 批 RC28-05 原液（批号为：RC28-05-YY20160329、RC28-05-YY20160330、RC28-05-YY20160331）于-80℃±10℃长期试验条件下储存进行考察，其考察结果为：

① SEC 纯度：3 批 RC28-05 原液在-80℃±10℃条件下放置 12 个月，其 SEC 纯度均≥90%。

② SDS-PAGE 还原纯度：3 批 RC28-05 原液在-80℃±10℃条件下放置 12 个月，其还原纯度均≥90%。

③ 细胞活性：3 批 RC28-05 原液于-80℃±10℃条件下放置 12 个月，

经细胞活性分析, 试验周期内各个检测时间点细胞相对活性均符合质量要求。

④ 结合活性: 3 批 RC28-05 原液于 $-80^{\circ}\text{C}\pm 10^{\circ}\text{C}$ 条件下放置 12 个月, 经细胞活性分析, 试验周期内各个检测时间点细胞相对活性均符合质量要求。

[82] 对 3 批 RC28-05 成品 (批号为: RC28-05-20160401-1、RC28-05-20160401-2、RC28-05-20160401-3) 分别于 $5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$ 、 $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 条件下储存进行考察, 其考察结果为:

① SEC 纯度:

3 批 RC28-05 成品在 $5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$ 条件下放置 12 个月, 其 SEC 纯度均 $\geq 90\%$;

3 批 RC28-05 成品在 $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 条件下放置 1 个月, 其 SEC 纯度均 $\geq 90\%$ 。

② SDS-PAGE 还原纯度:

3 批 RC28-05 成品在 $5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$ 条件下放置 12 个月, 其 SDS-PAGE 还原纯度均 $\geq 90\%$;

3 批 RC28-05 成品在 $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 条件下放置 1 个月, 其 SDS-PAGE 还原纯度均 $\geq 90\%$ 。

③ 细胞活性:

3 批 RC28-05 成品在 $5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$ 条件下放置 12 个月, 各监测时间点检验样品细胞活性检测结果均符合评价标准要求;

3 批 RC28-05 成品在 $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 条件下放置 1 个月, 各监测时间点检验样品细胞活性检测结果均符合评价标准要求。

④ 结合活性:

3 批 RC28-05 成品在 $5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$ 条件下放置 12 个月, 各监测时间点检验样品细胞活性检测结果均符合评价标准要求;

3 批 RC28-05 成品在 $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 条件下放置 1 个月, 各监测时间点检验样品细胞活性检测结果均符合评价标准要求。

[83] 由此可以得出以下结论:

① RC28-05 原液于 $-80^{\circ}\text{C}\pm 10^{\circ}\text{C}$ 条件下可稳定存储至少 12 个月, 而

VF28 原液在相同条件下 6 个月时即已经不符合活性要求。

② RC28-05 成品于 $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 条件下储存性质可保护稳定至少 12 个月，VF28 在相同条件下 6 个月内储存性质稳定。

③ RC28-05 成品于 $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 条件下至少 1 个月储存性质稳定，VF28 原液在相同条件下有 1/3 批次不符合活性要求。

综上所述，RC28-05 原液在 $-80^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ 稳定，RC28-05 成品在 $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 条件（至少 12 个月）、 $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 条件（至少 1 个月）条件下储存性质稳定。其相同条件下稳定储存时间大幅长于 VF28。

[84] 本发明已通过各个具体实施例作了举例说明。但是，本领域普通技术人员能够理解，本发明并不限于各个具体实施方式，普通技术人员在本发明的范文内可以作出各种改动或变型，并且在本说明书中各处提及的各个技术特征可以相互组合，而仍不背离本发明的精神和范围。这样的改动和变型均在本发明的范围之内。

权 利 要 求 书

1.一种双功能血管生成抑制剂，其具有 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列。

2.一种分离的包含编码双功能血管生成抑制剂的核苷酸序列的多核苷酸，其中所述双功能血管生成抑制剂的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示。

3.权利要求 2 所述的多核苷酸，其具有 SEQ ID NO:3 所示的核苷酸序列。

4.一种核酸构建体，其包含权利要求 2 或 3 所述的多核苷酸，所述多核苷酸可操作地连接于一个或多个调控序列，所述调控序列指导所述多肽在表达宿主中的产生。

5.一种载体，其包含权利要求 2 或 3 所述的多核苷酸，其中权利要求 2 或 3 所述的多核苷酸可操作地连接一个或多个调控序列。

6.权利要求 5 所述的载体，所述载体为表达载体，所述调控序列指导所述多肽在表达宿主中的产生。

7.一种宿主细胞，其包含权利要求 2 或 3 所述的多核苷酸或权利要求 4 所述的核酸构建体或权利要求 6 所述的表达载体，所述多核苷酸可操作地连接于一个或多个调控序列，所述调控序列指导多肽的产生。

8.权利要求 7 所述的宿主细胞，所述细胞为哺乳动物细胞或人源细胞；所述哺乳动物细胞进一步优选为 CHO 细胞。

9.一种药物组合物，其特征在于所述药物组合物包含如权利要求 1 中所述的多肽或权利要求 2 或 3 中所述的多核苷酸或权利要求 4 中所述的核酸构建体或权利要求 5 或 6 中所述的载体。

10.一种试剂盒，其特征在于所述试剂盒包含权利要求 9 所述的药物组合物。

11. 权利要求 1 所述的双功能血管生成抑制剂或权利要求 2 或 3 所述的多核苷酸或权利要求 4 所述的核酸构建体或权利要求 5 或 6 所述的载体在制备用于抑制 VEGF 和 FGF 双因子或者高糖诱导的细胞增殖、细胞迁移和/或管腔成形中的药物中的用途。

12. 权利要求 1 所述的双功能血管生成抑制剂或权利要求 2 或 3 所述的多核苷酸或权利要求 4 所述的核酸构建体或权利要求 5 或 6 所述的载体在制备用于抑制视网膜血管生成的药物中的用途。

13. 权利要求 1 所述的双功能血管生成抑制剂或权利要求 2 或 3 所述的多核苷酸或权利要求 4 所述的核酸构建体或权利要求 5 或 6 所述的载体在制备用于治疗血管新生相关眼部疾病的药物中的用途。

14. 根据权利要求 13 的用途，其中所述血管新生相关眼部疾病选自：年龄相关性黄斑变性例如干性 AMD 和湿性 AMD，糖尿病视网膜病变例如非增殖型 DR、增殖型 DR 和 DME，糖尿病性黄斑水肿，早产儿视网膜病和视网膜血管阻塞。

15. 权利要求 1 所述的双功能血管生成抑制剂或权利要求 2 或 3 所述的多核苷酸或权利要求 4 所述的核酸构建体或权利要求 5 或 6 所述的载体在制备用于在糖尿病对象中改善视网膜损伤药物中的用途。

16. 根据权利要求 15 所述的用途，其中所述的视网膜损伤为短期视网膜损伤或长期视网膜损伤。

17. 根据权利要求 16 所述的用途，其中所述短期视网膜损伤选自减少视网膜血管网中凋亡细胞的数量、降低血-视网膜屏障的渗漏、抑制视网膜胶质细胞反应性增生、以及改善神经视网膜和视网膜血管的超微结构；所述长期视网膜损伤选自改善视网膜屏障渗漏以及抑制毛细血管基底膜的增厚。

18. 权利要求 1 所述的双功能血管生成抑制剂或权利要求 2 或 3 所述的多核苷酸或权利要求 4 所述的核酸构建体或权利要求 5 或 6 所述的载体在制备用于在视网膜病对象中改善视网膜无血管灌注区或者降低视网膜新生血管细胞核数药物中的用途。

19. 根据权利要求 18 所述的用途，其中所述的视网膜病对象为早产儿。

20. 一种制备如权利要求 1 所述的双功能血管生成抑制剂的方法，该方法包括在允许表达该双功能血管生成抑制剂的条件培养如权利要求 7-8 中任一项所述的宿主细胞，并且回收该抑制剂。