

一种具有抑制新生血管生长及抑制炎症反应活性的蛋白质及其制备方法

技术领域

本发明属于生物医药领域，特别是一种具有抑制新生血管生长及抑制炎症反应活性的蛋白质及其制备方法。

背景技术

临床上很多眼科疾病都与眼部组织发炎及病理性血管新生相关，包括但不限于湿性老年性黄斑病变、糖尿病视网膜病变、葡萄膜炎及结膜结缔组织增生（翼状赘肉）等。眼组织受到外部刺激或损伤后，会产生炎症反应，增加生长因子的释放修复受损组织。血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor, VEGF）是人体其中一种重要的生长因子，主要促进血管内皮细胞增生及形成新生血管。新血管生成是胚胎发育和伤口愈合过程中血管生长的主要机制。正常血管生成过程不仅包括内皮细胞迁移和增殖，还有血管成熟，血管重塑以及细胞外基质的降解等步骤。在正常条件下，由于血管生成因子如 VEGF 和色素上皮衍生因子（PEDF）的表达水平和功能的平衡，内皮细胞静止而且没有增殖。病理性的新血管生成明显不同于正常的血管，过量分泌的 VEGF 会诱导内皮细胞过度生长，快速形成不受控制的病理性新生血管。这些新生血管结构脆弱，容易出现出血和渗漏。此外，VEGF 还会导致微血管壁内皮细胞形成间隙，增加血管的渗透性。如脉络膜出现病理性的新生血管增生，有机会侵犯视网膜，渗出的血液可能导致视网膜黄斑病变，病情严重的患者甚至会失去视力。如新生血管出现在结膜，则可能诱导病理性结膜组织增生。眼部炎症可能由外部刺激、感染或意外损伤引起，不同部位的炎症会引起不同的病变，包括角膜炎和葡萄膜炎等。有研究发现，长期的炎症刺激会增加 VEGF 的表达，加快病理性的血管新生。现今临床治疗新生血管相关的眼科疾病主要以针对清除 VEGF 的单克隆抗体为主。因此，同时具有抗炎生物活性的抑制新生血管药物能提供更好的疗效。因鉴于此，特提出此发明。

发明内容

现有针对新生血管的药物治疗以封闭血管渗漏及抑制新生血管生长为主，临床治疗药物主要有针对 VEGF 的单克隆抗体，虽然单克隆抗体药物具有一定疗效，但也具有干扰免疫系统，诱导系统性炎症反应的风险。而且，单克隆抗体药物的分子量大，结构复杂，不容易存储，更重要的是对生产技术及生产环境的要求很高，造成单克隆抗体药物的价格相对较高。

对此，本发明提供了一种蛋白质，编号为 ZK002，具有抑制新生血管生成及抗炎生物活性，同时制备工艺简单，成本较低，利于工业化生产。

首先,本发明提供了一种具有抑制新生血管生长及抑制炎症反应活性的蛋白质,其编号为 ZK002,所述蛋白质采用非还原性 SDS-PAGE (非还原性聚丙烯酰胺凝胶电泳)测定的分子量为 25000-35000 道尔顿,所述蛋白质的分子由 α 链和 β 链组成, α 链的蛋白序列如 SEQ ID No. 1 所示, β 链的蛋白序列如 SEQ ID No. 2 所示;所述蛋白质具有抑制新生血管生长及抑制炎症反应活性。

该蛋白质采用还原性 SDS-PAGE (还原性聚丙烯酰胺凝胶电泳)法测定的 α 链分子量为 12000-22000 道尔顿, β 链的分子量为 9000-19000 道尔顿。晶体结构观察发现蛋白分子内存在 6 对链内二硫键 (α 链和 β 链各有 3 对)和 1 对链间二硫键。

进一步的,本发明还公开了该蛋白质在抑制新生血管生成和抑制炎症反应方面的应用,以及在药物组合物中的应用。进一步的,药物组合物中还包括药学可接受的载体或药学可接受的赋形剂和/或稳定剂。

更进一步的,本发明公开了一种上述蛋白质 ZK002 的制备方法,依次按以下步骤进行:

(1) 将尖吻蝮蛇毒用 Tris-HCl 缓冲液溶解,离心收集上清液;

(2) 将步骤 (1) 得到上清液通过已充分平衡的阴离子交换层析柱进行吸附,吸附完成后用 A 液洗脱未被吸附的杂蛋白, A 液洗脱完成后用 B 液进行梯度洗脱,用分部收集器收集 B 液洗脱产物,并同时使用紫外检测器在 280nm 处检测追踪各组峰;本步骤中所述 A 液为 pH7.0-9.0 的 0.01-0.1mol/L Tris-HCl 溶液, B 液为 pH6.0-9.0 的 0.01-0.05mol/L Tris-HCl 和 0.05-0.6mol/L NaCl 的混合溶液;

(3) 将步骤 (2) 中收集的蛋白洗脱产物用截留分子量 3000-10000Da 的膜包进行超滤浓缩,将浓缩后的产物用已充分平衡好的阳离子交换层析柱进行吸附,吸附完成后用 C 液洗脱未被吸附的杂蛋白, C 液洗脱完成后用 D 液进行梯度洗脱,用分部收集器收集 D 液洗脱产物,并同时使用紫外检测器在 280nm 处检测追踪各组峰;本步骤中 C 液为 pH6.0-9.0 的 0.01-0.1mol/L Tris-HCl 溶液, D 液为 pH7.0-9.0 的 0.01-0.06mol/L Tris-HCl 和 0.05-0.6mol/L NaCl 的混合溶液;

(4) 将步骤 (3) 中收集的蛋白洗脱产物用截留分子量 3000-10000Da 的膜包进行超滤浓缩,将浓缩后的产物用亲和层析柱吸附,吸附完成后用平衡缓冲液平衡,再用 Gly 缓冲液洗脱,收集 Gly 洗脱峰对应的洗脱产物,用 NaOH 将该洗脱产物的 pH 调节至 6.0-9.0 本步骤中平衡缓冲液为 pH6.0-9.0 的 0.01-0.1mol/L Tris-HCl 和 0.05-0.5mol/L NaCl 的混合溶液, Gly 缓冲液为 0.1-0.5mol/L Gly, PH 2.0-4.0;

(5) 将步骤 (4) 中收集的经 pH 调整的 Gly 洗脱峰的洗脱产物用截留分子量 3000-10000Da 的滤膜进行超滤浓缩,将浓缩后的产物用凝胶层析柱吸附,吸附完成后用 E 液洗脱,收集洗脱峰对应的洗脱产物即为纯化后的蛋白质产品;本步骤中 E 液为 pH6.0-9.0 的 0.01-0.1mol/L Tris-HCl 和

0.05-0.5mol/L NaCl 的混合溶液。

优选的，步骤（1）中所用的 Tris-HCl 缓冲液的 pH 为 7.0-9.0，浓度为 0.01-0.1mol/L。

优选的，步骤（1）中溶解温度为 4℃，溶解时间为 6-12h。

优选的，步骤（1）中离心工艺为 4000r/min 离心两次，每次 10min。

优选的，步骤（2）中上清液吸附工艺的流速为 50mL/min。

优选的，步骤（2）A 液洗脱流速为 48mL/min，洗脱时间为 600min；B 液洗脱流速为 43mL/min。

优选的，步骤（3）中吸附工艺的流速为 5mL/min。

优选的，步骤（3）中 C 液洗脱流速为 5.5mL/min，洗脱时间为 300min；D 液洗脱流速为 5.5mL/min。

优选的，步骤（4）中平衡缓冲液洗脱的流速为 0.5mL/min。

优选的，步骤（5）中吸附工艺的流速为 2.0mL/min。

优选的，步骤（5）中 E 液洗脱流速为 0.3mL/min。

相比于现有技术，本发明的优点在于：

本发明公开的天然蛋白 ZK002 的能同时抑制新生血管生长及抑制炎症反应，可通过双重作用机制，对老年性黄斑病变、糖尿病视网膜病变及翼状赘肉等眼科相关疾病具备一定的预防和缓解效果。此外，ZK002 的提取纯化工艺相对简单，并且重复性强，成本低，利于工业化生产。

且和现有的抗新生血管药物康柏西普相比，动物实验结果显示，ZK002 抑制角膜新生血管生长的效果比康柏西普强。

附图说明

图 1 为本发明实施例一步骤（2）B 液洗脱过程吸光度图；

图 2 为本发明实施例一步骤（3）D 液洗脱过程吸光度图；

图 3 为本发明实施例一步骤（4）Gly 缓冲液洗脱过程吸光度图；

图 4 为本发明实施例一步骤（5）E 液洗脱过程吸光度图；

图 5 为本发明实施例二中 ZK002 对 NO 生成量影响结果图；

图 6 为本发明实施例二中 ZK002 对 iNOS 表达影响结果图；

图 7 为本发明实施例二中 ZK002 对促炎因子及肿瘤坏死因子 α 的 mRNA 表达影响结果图；

图 8 为本发明实施例三中 ZK002 对 LPS 诱导的促炎因子 IL-6 及 IL-8 的 mRNA 表达影响结果图；

图 9 为本发明实施例四中 ZK002 对 LPS 诱导的促炎因子 IL-1 β 、IL-6 及 TNF α 的 mRNA 表达影响结果图；

图 10 为本发明实施例四中 ZK002 对 LPS 诱导的 NF- κ B 从细胞质转入细胞核结果对比图；

图 11 为本发明实施例五中 ZK002 对角叉菜胶诱导的大鼠脚掌肿胀的缓解效果结果对比图；

图 12 为本发明实施例五中 ZK002 对胶原诱导的小鼠关节炎症的缓解效果结果对比图；

图 13 为本发明实施例六中 ZK002 对 FBS 诱导的 HUVEC 细胞形成小管的抑制效果结果对比图；

图 14 为本发明实施例七中视网膜经染色后新生血管生成结果对比图；

图 15 为本发明实施例七中视网膜厚度结果对比图；

图 16 为本发明实施例七中 ZK002 对炎性反应相关的细胞因子和趋化因子抑制效果结果图；

图 17 为本发明实施例八中视网膜经染色后新生血管生成结果对比图；

图 18 为本发明实施例八中视网膜厚度结果对比图；

图 19 为本发明实施例八中 ZK002 对炎性反应相关的细胞因子和趋化因子抑制效果结果图；

图 20 为本发明实施例九中视网膜经染色后新生血管生成结果对比图；

图 21 为本发明实施例九中视网膜厚度结果对比图；

图 22 为本发明实施例九中 ZK002 对炎性反应相关的细胞因子和趋化因子抑制效果结果图；

图 23 为本发明实施例十中烧灼大鼠角膜新生血管生成情况对比图；

图 24 为本发明实施例十中烧灼大鼠角膜新生血管生成情况结果图。

具体实施方式

为更清楚的对本发明技术方案予以阐述，下面将结合具体实施方式对本发明的技术方案进行进一步阐述

实施例一 蛋白质 ZK002 的制备

本实施例提供了一种具体的蛋白质 ZK002 的制备方法。

该方法依次按以下步骤进行：

(1) 称取尖吻蝮蛇蛇毒 40g，用 320mL 的 0.02M pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液在 4℃ 的冷藏环境下将蛇毒溶解，溶解时间为 6-12h，溶解完成后以 4000r/min 连续离心两次，每次离心时间均为 10min，离心完成后收集上清液。

(2) 将步骤 (1) 中获得的上清液以流速 50mL/min 上样于已充分平衡的阴离子交换层析 DEAE 柱中进行吸附，本步骤中使用的 DEAE 柱的型号为 BXK200×500，柱体积为 8L，吸附过程中上样体积不超过 200mL。吸附完成后以 A 液 (0.02M Tris-HCl pH 8.0) 洗脱不能被层析介质吸附的杂蛋白，洗脱时间 600min，洗脱流速 48ml/min；然后再以 B 液 (0.02M Tris-HCl+0.3M NaCl pH 6.0) 进行梯度洗脱，洗脱流速 43mL/min。在 B 液洗脱的过程中，用纯化系统 AKTA Pilot 自带的紫外检测器在 280nm

处检测，并以系统所带分部收集器收集。B 液洗脱过程中的吸光度图如图 1 所示，收集目的峰洗脱产物，用于后续步骤。

(3) 将步骤(2)中收集的洗脱产物用截留分子量为 5000Da 的滤膜进行超滤，浓缩至体积为 100-200mL，将浓缩后的产物以流速 5mL/min 上样于已充分平衡好的阳离子交换层析柱中进行吸附，本步骤中使用的层析柱型号为 XK50×60，柱体积为 1L。吸附完成后，先以 C 液(0.02M Tris-HCl，pH 6.0)洗脱不能被层析介质吸附的杂蛋白，洗脱时间 300min，洗脱流速 5.5mL/min；然后再以 D 液(0.02M Tris-HCl+0.5M NaCl，pH 8.0)进行梯度洗脱，洗脱流速 5.5mL/min。在 D 液洗脱过程中，用纯化系统 AKTA prime plus 自带紫外检测器在 280nm 处检测，并以系统所带分部收集器收集。D 液洗脱过程中的吸光度图如图 2 所示，收集目的峰洗脱产物，用于后续步骤。

(4) 将步骤(2)中收集的 2 峰的洗脱产物用截留分子量为 5000Da 的滤膜进行超滤，浓缩至体积 30mL 以下，将浓缩后的产物上样于负向亲和层析柱中进行吸附，本步骤中使用的负向亲和层析柱的型号为 XK16×40，柱体积为 60ml。吸附完成后，先以平衡缓冲液洗脱(0.02M Tris-HCl+0.15M NaCl，pH 7.6)不能被层析介质吸附的杂蛋白，洗脱流速 0.5ml/min，再以 Gly 缓冲液洗脱，Gly 洗脱过程中的吸光度图如图 3 所示，收集目的峰洗脱产物，收集后立即用 1M 的 NaOH 将 pH 调至 7.0。

(5) 将步骤(4)收集的活性峰洗脱产物用截留分子量为 5000Da 的滤膜进行超滤，浓缩至层析柱柱体积的 5%以下，将浓缩后的产物以流速 2.0mL/min 上样于凝胶层析柱进行吸附，本步骤中适中的凝胶层析柱型号为 XK26×100cm，柱体积为 0.5L。吸附完成后，用 E 液(0.02M Tris-HCl+0.15M NaCl，pH 7.6)洗脱，洗脱流速为 0.3mL/min。洗脱过程中的吸光度图如图 4 所示，收集目的峰洗脱产物，即为纯化后的目标蛋白。

实施例二 利用人源视网膜色素上皮层细胞模型评价 ZK002 的抑制炎症反应的作用

选择人源视网膜色素上皮层细胞(APRE19)作为体外模型，通过在 APRE19 细胞的培养环境中加入浓度为 1μg/mL 的脂多糖(Lipopolysaccharides, LPS)诱导 APRE19 细胞产生炎症反应，具体表现为诱导性一氧化氮合成酶(iNOS)表达和一氧化氮(NO)生成增加，及一些促炎因子包括 iNOS，白细胞介素-1β(IL-1β)、IL-6、IL-12、IL-18 及肿瘤坏死因子α(TNF α)的 mRNA 表达显著上升。而通过加入不同浓度的蛋白质 ZK002(1.25 - 30 μM)与 LPS 共同培养后，其结果如图 5-7 和表 1-2 所示。

ZK002 (μM)	NO 生成 (%)	iNOS 表达 (%)
1.25	86.80	93.10
2.5	65.60	51.80
5	53.40	28.20

10	33.10	21.50
20	18.90	10.60
30	10.88	1.70
LPS (1 μ g /mL)	100	100

表 1 蛋白质 ZK002 对抑制 LPS 诱导的 APRE19 细胞 iNOS 的表达和 NO 的生成效果表

ZK002(μ M)	iNOS mRNA 表达 (%)	IL-1 β mRNA 表达 (%)	IL-6 mRNA 表达 (%)	IL-12 mRNA 表达 (%)	IL-18 mRNA 表达 (%)	TNF α mRNA 表达 (%)
5	71.4	80.2	64.3	89.9	74.0	92.4
10	45.0	66.2	36.6	73.3	77.2	87.8
20	36.6	45.3	22.7	73.1	51.2	86.0
30	45.2	32.3	14.2	69.8	45.0	80.0
LPS (1 μ g /mL)	100	100	100	100	100	100

表 2 蛋白质 ZK002 对抑制 LPS 诱导的 APRE19 细胞促炎因子 mRNA 表达效果表

由图 5-7 和表 1-2 所示的结果可以看出,蛋白质 ZK002 可以浓度依赖性的抑制 LPS 诱导的 APRE19 细胞对 iNOS 的表达和 NO 的生成、以及抑制各促炎因子的 mRNA 的表达。即蛋白质 ZK002 有一定的抑制炎症反应的作用。

实施例三 利用人脐静脉内皮细胞模型评价 ZK002 的抑制炎症反应的作用

选择人脐静脉内皮细胞(HUVEC)作为体外模型,通过在 HUVEC 细胞的培养环境中加入浓度为 1 μ g/mL 的 LPS 诱导 HUVEC 细胞产生炎症反应,具体表现为 LPC 可诱导促炎因子 IL-6 及 IL-8 的 mRNA 表达显著上升。

将蛋白质 ZK002 (5 μ M) 与 HUVEC 细胞预培养 24 小时后,再加入 LPS (1 μ g/mL) 共同培养,结果如图 8 所示。

由图 8 的结果可以看出,蛋白质 ZK002 对 LPS 诱导的促炎因子 IL-6 及 IL-8 的 mRNA 表达有一定的抑制作用。即蛋白质 ZK002 有一定的抑制炎症反应的作用。

实施例四 利用小鼠巨噬细胞模型评价 ZK002 的抑制炎症反应的作用

选择小鼠巨噬细胞(RAW264.7)作为体外模型,通过在 RAW264.7 细胞的培养环境中加入浓度为 1 μ g/mL 的 LPS 诱导 RAW264.7 细胞产生炎症反应,具体表现为 LPC 可诱导促炎因子 IL-1 β 、IL-6 及 TNF α 的 mRNA 表达显著上升。

将蛋白质 ZK002 (5 μ M) 与 RAW264.7 细胞预培养 24 小时后,再加入 LPS (1 μ g/mL) 共同培养,结果如图 9 所示。

由图 9 的结果可以看出,蛋白质 ZK002 对 LPS 诱导的促炎因子 IL-1 β 、IL-6 及 TNF α 的 mRNA 表达有一定的抑制作用。

另一方面, LPS 还可以诱导增加 NF- κ B 从细胞质转入细胞核, 再经蛋白质 ZK002 处理后, LPS 对 NF- κ B 从细胞质转入细胞核的诱导增加作用被抑制, 结果如图 10 所示。

由上, 蛋白质 ZK002 可以抑制细胞的炎性反应, 具有一定的抗炎作用。

实施例五 利用整体动物模型评价 ZK002 的抑制炎症反应的作用

选择 SPF 大鼠及 SPF 小鼠作为整体动物模型。向大鼠后脚掌皮下注射 100 μ L 浓度为 1% 的角叉菜胶模拟急性炎症, 注射后大鼠脚掌大小会在注射后 4 小时涨大 50%。在致炎前 1 小时对大鼠腹腔注射给药蛋白质 ZK002 (2.5mg/kg), 并在致炎前后的不同时间点测量大鼠后足体积, 结果如图 11 所示。

由图 11 的结果可以看出, ZK002 (2.5mg/kg) 可以减轻角叉菜胶诱导的脚掌肿胀, 且效果与吲哚美辛 (Indomethac, 10mg/kg) 相似。

利用胶原注射诱导小鼠产生关节炎, 以模拟长期炎症。对小鼠进行腹腔注射给药蛋白质 ZK002 (1mg/kg, 3mg/kg), 结果如图 12 所示。

由图 12 的结果可以看出, ZK002 可以显著的缓解胶原注射的诱导的关节炎, 且 ZK002 (3mg/kg) 的药效与塞来昔布 (Celebrex, 30mg/kg) 相似。

上述结果显示, 蛋白质 ZK002 对急性和长期炎症均有一定的减轻效果。

实施例六 利用人脐静脉内皮细胞模型评价 ZK002 的抑制新生血管生成作用

选择 HUVEC 作为体外模型, HUVEC 细胞可接种于 Matrigel 基质胶上。通过加入 2% 胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS), 培养 8-12 小时后可形成管状结构。

将蛋白质 ZK002 (3 μ M) 和 2% FBS 与 HUVEC 细胞共同培养 8 小时后, 结果如图 13 所示。

由图 13 可以看出, 通过加入 ZK002, 可以显著的抑制 FBS 诱导的 HUVEC 细胞形成管状结构的总长度、节点数目、覆盖面积以及成环数。即蛋白质 ZK002 对新生血管生成有一定的抑制作用。

实施例七 利用整体动物模型评价 ZK002 的抑制新生血管生成作用及抗炎和对糖尿病视网膜病变的作用

取 8 周大的雄性 C57BL/6 小鼠作为整体动物模型, 对小鼠单次腹腔注射链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) (150mg/kg) 对小鼠胰岛 β 细胞功能造成损伤, 并使小鼠血糖升高。当小鼠血糖高于 18mmol/L, 即为 I 型糖尿病。随机把小鼠分成两组 (每组 10 只), 分别接受玻璃体注射生理盐水或 ZK002 (5 μ g), 每周两次给药, 持续两周。14 天后摘除眼球, 固定视网膜并使用 FITC 偶联抗体进行免疫荧光染色或苏木素-伊红染色, 使用荧光显微镜观察新生血管生成及视网膜厚度变化情况, 结果如图 14 和 15 所示。

进一步的, 收集采集的视网膜样品, 匀浆后使用 ELISA 测量与炎症反应相关的细胞因子和趋化因子的变化, 结果如图 16 所示。

由图 14 和 15 可以看出, 蛋白质 ZK002 可以显著的抑制视网膜新生血管的生成, 同时降低视网膜变薄的程度。

由图 16 可以看出, 蛋白质 ZK002 可以抑制糖尿病小鼠的视网膜促炎因子的表达。

由上可见, 蛋白质 ZK002 有一定的抑制新生血管生成作用及抑制炎症反应的作用, 同时对于糖尿病引起的视网膜病变也有一定的潜在预防和缓解作用。

实施例八 利用整体动物模型评价 ZK002 的抑制新生血管生成作用及抗炎和对糖尿病视网膜病变的作用

取 16 周大的 $Lepr^{db/db}$ 转基因 2 型糖尿病成年小鼠作为整体动物模型。随机把小鼠分成两组(每组 10 只), 分别接受玻璃体注射生理盐水或 ZK002 (5 μ g), 每周两次给药, 持续两周。14 天后摘除眼球, 固定视网膜并使用 FITC 偶联抗体进行免疫荧光染色或苏木素-伊红染色, 使用荧光显微镜观察血管生成及视网膜厚度变化情况, 结果如图 17 和 18 所示。

进一步的, 收集采集的视网膜样品, 匀浆后使用 ELISA 测量与炎症反应相关的细胞因子和趋化因子的变化, 结果如图 19 所示。

由图 17 和 18 可以看出, 蛋白质 ZK002 可以显著的抑制视网膜新生血管的生成, 同时降低视网膜变薄的程度。

由图 19 可以看出, 蛋白质 ZK002 可以抑制糖尿病小鼠的视网膜促炎因子的表达。

由上可见, 蛋白质 ZK002 有一定的抑制新生血管生成作用及抑制炎症反应的作用, 同时对于糖尿病引起的视网膜病变也具有潜在的预防和缓解作用。

实施例九 利用整体动物模型评价 ZK002 的抑制新生血管生成作用及抗炎和对糖尿病视网膜病变的作用

取 16 周大的 $Ins2Akita$ 转基因 1 型糖尿病成年小鼠作为整体动物模型。随机把小鼠分成两组(每组 10 只), 分别接受玻璃体注射生理盐水或 ZK002 (5 μ g), 每周两次给药, 持续两周。14 天后摘除眼球, 固定视网膜并使用 FITC 偶联抗体进行免疫荧光染色或苏木素-伊红染色, 使用荧光显微镜观察新生血管生成及视网膜厚度变化情况, 结果如图 20 和 21 所示。

进一步的, 收集采集的视网膜样品, 匀浆后使用 ELISA 测量与炎症反应相关的细胞因子和趋化因子的变化, 结果如图 22 所示。

由图 20 和 21 可以看出, 蛋白质 ZK002 可以显著的抑制视网膜新生血管的生成, 同时降低视网膜变薄的程度。

由图 22 可以看出, 蛋白质 ZK002 可以抑制糖尿病小鼠的视网膜促炎因子的表达。

由上可见, 蛋白质 ZK002 有一定的抑制新生血管生成作用及抑制炎症反应的作用, 同时对于糖尿病引起的视网膜病变也具有潜在的保护治疗作用。

实施例十 利用整体动物模型评价 ZK002 抑制角膜新生血管生成的作用

取 8-12 周大的 SD 大鼠作为整体动物模型, 随机把大鼠分成三组 (每组 10 只), 先使用浸润 1mol/L 氢氧化钠的滤纸片, 烧灼大鼠右眼角膜。取对侧眼作为空白对照。建模当天开始给药, 各组大鼠分别接受康柏西普 (1.5 mg/ml) 或 ZK002 (1.5 mg/ml) 滴眼液, 每天三次给药, 持续两周。分别在第 7、第 10 及 14 天后观察血管生成情况, 结果如图 23 和 24 所示。

由图 23 和 24 可以看出, ZK002 能显著性地抑制角膜新生血管的生成, 且抑制效果相比作为阳性对照组的康柏西普而言效果更加显著。

本发明提供了蛋白质 ZK002 及具体可行的制备方法。蛋白质 ZK002 具备一定的抑制新生血管生成作用及抑制炎症反应的作用, 同时对于糖尿病引起的视网膜病变也有潜在的预防和缓解作用, 同时可通过双重作用机制, 提高对老年性黄斑病变、糖尿病视网膜病变及翼状赘肉等眼科相关疾病的疗效。相比现有的同类药物而言 (如针对 VEGF 的单克隆抗体), 蛋白质 ZK002 的效果更好, 且提取纯化工艺相对简单, 重复性强, 成本低, 更利于工业化的生产。

以上所述, 仅为本发明较佳的具体实施方式; 但本发明的保护范围并不局限于此。任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内, 根据本发明的技术方案及其改进构思加以等同替换或改变, 都应涵盖在本发明的保护范围内。

权利要求书

1、一种具有抑制新生血管生长及抑制炎症反应活性的蛋白质，其特征在于，所述蛋白质采用非还原性 SDS-PAGE（非还原性聚丙烯酰胺凝胶电泳）测定的分子量为 25000-35000 道尔顿，所述蛋白质的分子由 α 链和 β 链组成， α 链的蛋白序列如 SEQ ID No. 1 所示， β 链的蛋白序列如 SEQ ID No. 2 所示；所述蛋白质具有抑制新生血管生长及抑制炎症反应活性。

2、根据权利要求 1 所述的具有抑制新生血管生长及抑制炎症反应活性的蛋白质，其特征在于，采用还原性 SDS-PAGE（还原性聚丙烯酰胺凝胶电泳）法测定的 α 链分子量为 12000-22000 道尔顿， β 链的分子量为 9000-19000 道尔顿。

3、权利要求 1-2 任一所述的蛋白质在抑制新生血管生成和抑制炎症反应方面的应用。

4、权利要求 1-2 任一所述的具有抑制新生血管生长及抑制炎症反应活性的蛋白质在药物组合物中的应用。

5、根据权利要求 4 所述的具有抑制新生血管生长及抑制炎症反应活性的蛋白质在药物组合物中的应用，其特征在于，所述药物组合物还包括药学可接受的载体或药学可接受的赋形剂和/或稳定剂。

6、一种权利要求 1-2 任一所述的具有抑制新生血管生长及抑制炎症反应活性的蛋白质的制备方法，其特征在于，依次按以下步骤进行：

（1）将尖吻蝮蛇毒用 Tris-HCl 缓冲液溶解，离心收集上清液；

（2）将步骤（1）得到上清液通过已充分平衡的阴离子交换层析柱进行吸附，吸附完成后用 A 液洗脱未被吸附的杂蛋白，A 液洗脱完成后用 B 液进行梯度洗脱，用分部收集器收集 B 液洗脱产物，并同时使用紫外检测器在 280nm 处检测追踪各组分峰值；本步骤中所述 A 液为 pH7.0-9.0 的 0.01-0.1mol/L Tris-HCl 溶液，B 液为 pH6.0-9.0 的 0.01-0.05mol/L Tris-HCl 和 0.05-0.6mol/L NaCl 的混合溶液；

（3）将步骤（2）中收集的蛋白洗脱产物用截留分子量 3000-10000Da 的膜包进行超滤浓缩，将浓缩后的产物用已充分平衡好的阳离子交换层析柱进行吸附，吸附完成后用 C 液洗脱未被吸附的杂蛋白，C 液洗脱完成后用 D 液进行梯度洗脱，用分部收集器收集 D 液洗脱产物，并同时使用紫外检测器在 280nm 处检测追踪各组分峰值；本步骤中 C 液为 pH6.0-9.0 的 0.01-0.1mol/L Tris-HCl 溶液，D 液为 pH7.0-9.0 的 0.01-0.06mol/L Tris-HCl 和 0.05-0.6mol/L NaCl 的混合溶液；

（4）将步骤（3）中收集目的蛋白洗脱产物用截留分子量 3000-10000Da 的膜包进行超滤浓缩，将浓缩后的产物用亲和层析柱吸附，吸附完成后用平衡缓冲液平衡，再用 Gly 缓冲液洗脱，收集 Gly 洗脱峰对应的洗脱产物，用 NaOH 将该洗脱产物的 pH 调节至 6.0-9.0 本步骤中平衡缓冲液为 pH6.0-9.0 的 0.01-0.1mol/L Tris-HCl 和 0.05-0.5mol/L NaCl 的混合溶液，Gly 缓冲液为 0.1-0.5mol/L

Gly, PH 2.0-4.0;

(5) 将步骤(4)中收集的经 pH 调整的 Gly 洗脱峰的洗脱产物用截留分子量 3000-10000Da 的滤膜进行超滤浓缩, 将浓缩后的产物用凝胶层析柱吸附, 吸附完成后用 E 液洗脱, 收集洗脱峰对应的洗脱产物即为纯化后的蛋白质产品; 本步骤中 E 液为 pH6.0-9.0 的 0.01-0.1mol/L Tris-HCl 和 0.05-0.5mol/L NaCl 的混合溶液。

7、根据权利要求 6 所述具有抑制新生血管生长及抑制炎症反应活性的蛋白质的制备方法, 其特征在于, 步骤(1)中所用的 Tris-HCl 缓冲液的 pH 为 7.0-9.0, 浓度为 0.01-0.1mol/L。

8、根据权利要求 6 所述具有抑制新生血管生长及抑制炎症反应活性的蛋白质的制备方法, 其特征在于, 步骤(1)中溶解温度为 4℃, 溶解时间为 6-12h。

9、根据权利要求 6 所述具有抑制新生血管生长及抑制炎症反应活性的蛋白质的制备方法, 其特征在于, 步骤(1)中离心工艺为 4000r/min 离心两次, 每次 10min。

10、根据权利要求 6 所述具有抑制新生血管生长及抑制炎症反应活性的蛋白质的制备方法, 其特征在于, 步骤(2)中上清液吸附工艺的流速为 50mL/min。

11、根据权利要求 6 所述具有抑制新生血管生长及抑制炎症反应活性的蛋白质的制备方法, 其特征在于, 步骤(2)A 液洗脱流速为 48mL/min, 洗脱时间为 600min; B 液洗脱流速为 43mL/min。

12、根据权利要求 6 所述具有抑制新生血管生长及抑制炎症反应活性的蛋白质的制备方法, 其特征在于, 步骤(3)中吸附工艺的流速为 5mL/min。

13、根据权利要求 6 所述具有抑制新生血管生长及抑制炎症反应活性的蛋白质的制备方法, 其特征在于, 步骤(3)中 C 液洗脱流速为 5.5mL/min, 洗脱时间为 300min; D 液洗脱流速为 5.5 mL/min。

14、根据权利要求 6 所述具有抑制新生血管生长及抑制炎症反应活性的蛋白质的制备方法, 其特征在于, 步骤(4)中平衡缓冲液洗脱的流速为 0.5mL/min。

15、根据权利要求 6 所述具有抑制新生血管生长及抑制炎症反应活性的蛋白质的制备方法, 其特征在于, 步骤(5)中吸附工艺的流速为 2.0mL/min。

16、根据权利要求 6 所述具有抑制新生血管生长及抑制炎症反应活性的蛋白质的制备方法, 其特征在于, 步骤(5)中 E 液洗脱流速为 0.3mL/min。