



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101838329 A

(43) 申请公布日 2010.09.22

(21) 申请号 200910056955.8

(22) 申请日 2009.03.18

(71) 申请人 嘉和生物药业有限公司

地址 201203 上海市张江高科技园区哈雷路
1043 号 602 室

(72) 发明人 周新华 赵建阳 孙九如

(51) Int. Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 19/04 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图 3 页

(54) 发明名称

抗血管新生融合蛋白

(57) 摘要

本发明涉及了一种抗血管新生融合蛋白及其用途。本发明利用分子生物学、细胞生物学和免疫学技术,构建了几种人 VEGFR 受体片断与 IgFc 片断的融合蛋白,可用于治疗或预防血管新生或者 VEGF 相关疾病。该融合蛋白具有优良的 VEGF 及 PLGF 结合能力,且稳定性好、半衰期长,并可多价结合 VEGF 分子。

1. 一种抗血管新生融合蛋白,其特征在于,包括(a)编码 VEGF 受体成分的氨基酸序列,该序列连接于(b)编码一种多聚成分的氨基酸序列上,形成(a)-

(b) 结构。其中,所述 VEGF 受体成分是这样融合多肽中唯一的 VEGF 受体成分;所述多聚成分通常为免疫球蛋白 Fc 片段。

2. 如权利要求 1 所述的融合蛋白,其特征在于(a)编码 VEGF 受体成分的多肽具有 SEQ ID NO:6 所述的氨基酸序列。

3. 如权利要求 1 所述的融合蛋白,其特征在于(a)编码 VEGF 受体成分的多肽具有 SEQ ID NO:7 所述的氨基酸序列。

4. 如权利要求 1 所述的融合蛋白,其特征在于(a)编码 VEGF 受体成分的多肽具有 SEQ ID NO:8 所述的氨基酸序列。

5. 如权利要求 1 所述的融合蛋白,其特征在于(b)编码一种多聚成分的氨基酸序列可为来源于人 IgG, IgM, IgA 或亚型 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 的 Fc 段。

6. 如权利要求 5 所述的融合蛋白,其特征在于(b)编码一种多聚成分的氨基酸优选为来源于人 IgG1 的 Fc 段。

7. 一种核酸分子,其特征在于,所述的核酸分子编码权利要求 1-6 任一所述的融合蛋白。

8. 一种产生权利要求 1 所述的融合蛋白的方法,其特征在于,所述的方法包括:在适合表达所述融合蛋白的条件下,培养权利要求 10 所述的宿主细胞,表达和分离出所述的融合蛋白。

9. 权利要求 1-6 任一所述的融合蛋白的用途,其特征在于,用于制备治疗或预防血管新生或者 VEGF 相关疾病的组合物。

10. 一种用于制备治疗或预防血管新生或者 VEGF 相关疾病的组合物,其特征在于,所述的组合物含有:

- (i) 有效量的权利要求 1-6 所述的融合蛋白;和 / 或
- (ii) 其它 VEGF 拮抗剂;和 / 或
- (iii) 药学上可接受的载体。

抗血管新生融合蛋白

技术领域

[0001] 本发明涉及基因工程技术领域,具体地说地涉及抑制血管新生的重组 DNA 序列、该 DNA 序列表达的融合蛋白及其在病理性血管新生疾病治疗药物中的应用。

背景技术

[0002] 在正常情况下,成人体内的血管绝大多数处于静止状态,血管新生只见于少数病理或生理状态。生理状态仅发生于创伤修复,组织再生和妇女的生理周期。病理情况发生于肿瘤,类风湿性关节炎,糖尿病性视网膜病和干癣,年龄相关的黄斑变性 (AMD)。肿瘤血管新生是肿瘤生长和转移的“命脉”。(Hanahan and Folkman, Cell, 1996, 86 :353-364)。近年来,抗血管新生治疗成为肿瘤等疾病治疗的热点和最有前途的领域。

[0003] 血管生成由多个血管生成促进因子和抑制因子组成的复杂系统调节,成人的血管生成严格受此促进和抑制平衡调节。VEGF 对血管内皮细胞基膜的水解、迁移和血管构建的调节作用强,特异性高,是目前发现的主要特异促血管生成因子。(Folkman J, et al. Science 1987 ;235 :442 ;Giampietro G, et al. Cancer Metastasis Rev 1994 ;Ferrara. Endocrine Reviews 2004, 25 (4) :581-611) 因此,针对 VEGF 信号通路的抗血管新生治疗成为抗肿瘤和类风湿性关节炎等疾病的重要治疗靶点。

[0004] VEGF 受体有 3 种, f1t-1 (fms-like tyrosine kinase, VEGFR-1), Flk-1/KDR (fetal liver kinase 1-murine homologue/Kinase insert Domain containing Receptor-human homologue, VEGFR-2) 和 f1t-4 (VEGFR-3)。VEGFR-1, 2, 主要分布于血管内皮细胞表面, VEGFR-3 主要分布于淋巴内皮。他们由含 7 个免疫球蛋白样结构的细胞外区、膜区及酪氨酸激酶区组成。该酪氨酸激酶的活性通过受体和配体结合而激活,由受体磷酸化而引起细胞内许多酶和其他反应。其中 Flk-1 (KDR) 在内皮细胞的增殖和血管生成起决定作用。

[0005] 通过抗 VEGF 抗体和可溶性 VEGF 受体片断可以阻断 VEGF 与血管内皮细胞上 VEGF 受体 (f1t-1, KDR 等) 之间的相互作用,从而阻止由 VEGF 介导的信息传导,抑制由 VEGF 高表达而引起的病理性新生血管的生长。这类 VEGF 抑制剂包括 Avastin (bevacizumab), Lucentis, VEGF-Trap 等,用于治疗血管新生相关的疾病。2004 年美国 FDA 批准的针对血管新生的抗癌药物 Avastin 就是特异性结合 VEGF 的单克隆抗体,其机理就是通过结合 VEGF 达到阻断 VEGF 与其受体结合的目的 (Ferrara et al, Nature Reviews Drug Discovery. 2004, 3 :391-400)。但是 Avastin 有两个主要缺点 :1. 亲和力较低 2.3×10^{-9} , 抗体用量大。2. 没有 PLGF 结合能力。

[0006] 因此,理想化的 VEGF 阻断剂是 VEGF 受体的细胞外片段,其具有天然的针对 VEGF 的高特异性和亲和力 (Kuo et al, Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001, 98 :4605-4610), 比 Avastin 的亲和力高 20-100 倍 (Ferrara N et al, Nature medicine. 2003, 9 :669-676)。近年来的研究表明,抗 PLGF 可以抑制肿瘤的血管新生和转移,可以显著增强抗 VEGF 的抗血管新生治疗效果,并且可以抑制一些抗 VEGF 治疗无效的肿瘤生长 (Fischer C. et al, cell, 131 :463-475)。因此利用 f1t-1 与 PLGF 也具有高亲和力

(Christinger, HW. Et al, J. Biol. Chem. 2004, 279(11) :10382-8) 的特点,用含有 flt-1 受体片段的融合蛋白可以结合 VEGF 和 PLGF 具有更加优良的抗血管新生治疗效果。

[0007] 美国专利 6100071, 5952199 等描述了几种用 Flt 1 部分片段和 KDR 的部分片段融合的蛋白,但由于其不稳定,副作用大,没有进一步开发。虽然 Flt1 胞外区第 2-3 免疫球蛋白结构域具有大部分的 Flt1 对 VEGF 和 PLGF 的结合活性,但是它的第三免疫球蛋白样结构域的成串碱性氨基酸导致在体内的有效活性很低。因此本发明采用 Flt1 和 KDR 的其它部分免疫球蛋白样结构域与 Flt1 第 2 免疫球蛋白结构域组合以保持融合蛋白的对 VEGF 和 PLGF 的结合活性。此外,一些正在进行临床试验的药物 - 如 Regeneron 公司 VEGF trap- 与 VEGF 分子结合比例是 1 : 1。本发明不仅保留了人 VEGF 受体 Flt1 (VEGFR I) 和 KDR (VEGFR II) 与 VEGF 的结合性能,及 Flt1 与 PLGF 的结合活性,而且由于两个与 VEGF 结合的免疫球蛋白结构域距离较远,提供了双价结合能力。

发明内容

[0008] 本发明的目的在于提供一种用于抑制血管新生的融合蛋白,该融合蛋白包括 (a) 编码 VEGF 受体成分的氨基酸序列,该序列连接于 (b) 编码一种多聚成分的氨基酸序列上,形成 (a)-(b) 结构。其中,所述 VEGF 受体成分是这样融合多肽的唯一的 VEGF 受体成分;所述多聚成分通常为免疫球蛋白 Fc 片段。

[0009] 本发明的另一目的在于提供所述的融合蛋白的用途及组合物。

[0010] 在本发明的第一方面,提供一种融合蛋白,即 VEGF 结合物 SR1-3,它们包括 (a) 编码 VEGF 受体成分的氨基酸序列,该序列连接于 (b) 编码一种多聚成分的氨基酸序列上,形成 (a)-(b) 结构。其中,所述 VEGF 受体成分是这样融合多肽的唯一的 VEGF 受体成分,与多聚成分 Fc 多肽链结合,然后两个 Fc 作为二聚体来提高体内的作用半衰期和生物活性。

[0011] 在一优选例中,所述融合蛋白 SR1 具有 SEQ ID NO :6 所述的氨基酸序列。

[0012] 在另一优选例中,所述的融合蛋白 SR2 具有 SEQ ID NO :7 所述的氨基酸序列。

[0013] 在另一优选例中,所述的融合蛋白 SR3 具有 SEQ ID NO :8 所示的氨基酸序列。

[0014] 在本发明的第二方面,提供一种核酸分子,所述的核酸分子编码 SEQ IDNO :6-8 所述的融合蛋白 SR1-3。

[0015] 在一优选例中,所述核酸分子编码具有 SEQ ID NO :6 所述的氨基酸序列的融合蛋白 SR1。

[0016] 在另一优选例中,所述核酸分子编码具有 SEQ ID NO :7 所述的氨基酸序列的融合蛋白 SR2。

[0017] 在另一优选例中,所述核酸分子编码具有 SEQ ID NO :8 所述的氨基酸序列的融合蛋白 SR3。

[0018] 在本发明的第三方面,提供一种载体,它含有所述的核酸分子。

[0019] 在一优选例中,所述的载体是 pcDNA3.1 表达载体。

[0020] 在本发明的第四方面,提供一种基因工程化的细胞,

[0021] 所述的细胞含有所述的载体;

[0022] 或所述的细胞基因组中整合有所述的核酸分子。

[0023] 在本发明的第五方面,提供一种产生所述的融合蛋白的方法,所述的方法包括:在

适合表达所述融合蛋白的条件下,培养所述的宿主细胞,表达和分离出所述的融合蛋白。

[0024] 在本发明的第六方面,提供所述的融合蛋白的用途,用于制备治疗或预防血管新生或者 VEGF 相关疾病的组合物。

[0025] 在一优选例中,所述的组合物用于治疗或预防血管新生或者 VEGF 相关疾病。

[0026] 在另一优选例中,所述的 VEGF 相关疾病包括:各种实体肿瘤,AMD,关节炎,等等。

[0027] 在本发明的第七方面,提供一种特异性结合 VEGF 的组合物,所述的组合物含有:

[0028] (i) 有效量的所述的融合蛋白;

[0029] (ii) 其它 VEGF 拮抗剂;

[0030] (iii) 药学上可接受的载体。

[0031] 本发明的其它方面由于本文的公开内容,对本领域的技术人员而言是显而易见的。

附图说明

[0032] 图 1. Flt1 胞外区氨基酸序列

[0033] 图 2 :KDR 胞外区氨基酸序列

[0034] 图 3 :融合蛋白 SR1-3 结构示意图

具体实施方式

[0035] 本发明人经过研究,意外地发现将 VEGF 受体的部分氨基酸序列与多聚成分如人免疫球蛋白的 Fc 片段相融合,获得的融合蛋白具有极其优异的结合 VEGF 的效果,且稳定性好、半衰期长,可多价结合 VEGF 分子。

[0036] 如本文所用,除非另外说明,Flt1, flt-1, VEGFR-1 可互换使用,都指第一种 VEGF 受体。

[0037] 如本文所用,除非另外说明,Flk-1, KDR 或 VEGFR-2 可互换使用,都指第二种 VEGF 受体。

[0038] 如本文所用,所述的“含有”,“具有”或“包括”包括了“包含”、“主要由……构成”、“基本上由……构成”、和“由……构成”;“主要由……构成”、“基本上由……构成”和“由……构成”属于“含有”、“具有”或“包括”的下位概念。

[0039] 如本文所用,除非另外说明,所述的融合蛋白是一种分离的蛋白,与其它蛋白、多肽或分子无联系,是重组宿主细胞培养的纯化产物或作为一种纯化的提取物。

[0040] 本发明的目的在于提供三种用于抑制血管新生的 VEGF 结合物 SR1-3。它们包括 (a) 编码 VEGF 受体成分的氨基酸序列,该序列连接于 (b) 编码一种多聚成分的氨基酸序列上,形成 (a)-(b) 结构。其中,所述 VEGF 受体成分是这样融合多肽的唯一的 VEGF 受体成分,该受体成分和 Fc 链结合,利用两个 Fc 单链形成二聚体来提高体内的作用半衰期。

[0041] SR1-3 中的 VEGF 受体成分 (a) 分别具有以下三种结构:

[0042] SR1 :由 Flt 1 的胞外结构域的第 2 免疫球蛋白样区域,和 KDR 的胞外结构域的第 2 和第 3 免疫球蛋白样区域,融合而成 :Flt1D2-KDRD2-KDRD3 ;

[0043] SR2 :由 Flt 1 的胞外结构域的第 2 免疫球蛋白样区域,和 KDR 的胞外结构域的第 4 免疫球蛋白样区域融合而成 :Flt1D2-KDRD4 ;

[0044] SR3 :由 F1t 1 的胞外结构域的第 2 免疫球蛋白样区域,和 F1t 1 胞外结构域的第 4 免疫球蛋白样区域融合而成 :F1t1D2-F1t1D4 ;

[0045] 其中 F1t1D2 代表 F1t1 胞外结构域的第 2 免疫球蛋白样区域氨基酸序列, F1t1D4 代表 F1t1 胞外结构域的第 4 免疫球蛋白样区域氨基酸序列, KDRD2 代表 KDR 胞外结构域的第 2 免疫球蛋白样区域氨基酸序列, KDRD3 代表 KDR 胞外结构域的第 3 免疫球蛋白样区域氨基酸序列, KDRD4 代表 KDR 胞外结构域的第 4 免疫球蛋白样区域氨基酸序列。

[0046] F1t1 和 KDR 的各免疫球蛋白样区域的氨基酸序列可以从公用数据库获得,由于 F1t1 和 KDR 中各个免疫球蛋白样区域的氨基酸序列之间并没绝然的分界,因此各免疫球蛋白样区域的氨基酸序列的长度可以有一定的变化。所以,本发明所涉及的融合蛋白质的氨基酸序列也可以有一定的变化。它们都属于本发明保护的范畴。

[0047] (b) 编码多聚成分的氨基酸序列,通常为但不限于人免疫球蛋白 Fc 序列,它们都属于本发明保护的范畴。其中的免疫球蛋白 Fc 片段选自人免疫球蛋白 Fc 如 :IgG, IgM, IgA 或亚型 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4。其中的免疫球蛋白 Fc 片段是 Fc 全长或是部分 Fc 序列,选自 CH2 片断, CH3 片断, 绞链区域片断。

[0048] 研究表明, f1t1 的 N 端第 2 个免疫球蛋白样区域 f1t1D2 和 KDR 的 N 端第 3 个免疫球蛋白样区域 KDRD3 分别是 f1t1 和 KDR 与 VEGF 结合的区。f1t1 的 N 端第 3 个免疫球蛋白样区域 f1t1D3, 和 KDR 的 N 端第 2 个免疫球蛋白样区域 KDRD2 分别对维持 f1t1 和 KDR 与 VEGF 结合的亲和力具有非常重要的作用。

[0049] 在一个实施例中,本发明提供了一种结构利用由 F1t1 的胞外结构域的第 2 免疫球蛋白样区域,和 KDR 的胞外结构域的第 2 和第 3 免疫球蛋白样区域融合,从而保证了融合蛋白具有 F1t1 与 VEGF 和 PLGF 的结合亲和力,并具有足够的空间距离进行双价结合。

[0050] 在另一个实施例中,本发明提供了一种结构利用由 F1t1 的胞外结构域的第 4 免疫球蛋白样区域,融合于 F1t1 的胞外结构域的第 2 免疫球蛋白样区域从而保证了融合蛋白具有 F1t1 与 VEGF 和 PLGF 的结合亲和力。

[0051] 在另一个实施例中,本发明提供了一种结构利用 KDR 的胞外结构域的第 4 免疫球蛋白样区域,融合于 F1t1 的胞外结构域的第 2 免疫球蛋白样区域从而保证了融合蛋白具有 F1t1 与 VEGF 和 PLGF 的结合亲和力。

[0052] 融合蛋白质的构建技术基于分子克隆方法,具体实验方法可参考《分子克隆》第二版和第三版等实验手册。编码上述融合蛋白的 DNA 的获得可以通过常规技术,如通过全基因合成或分别从 F1t1, KDR 的片断拼接形成。所用载体可以是分子生物学所常用的质粒载体。各融合蛋白的氨基末端前加上蛋白分泌信号序列以保证蛋白质从细胞中分泌出来。载体序列中包括用于驱动基因表达的启动子,蛋白质翻译起始和终止信号,以及多聚腺苷酸 ((PolyA) 序列。载体中有抗菌素抗性基因以利于质粒在细菌中所繁殖。另外,载体中还包真核细胞选择性基因用于稳定转染细胞株的筛选。

[0053] 在完成上列各种融合蛋白的质粒构建以后,即可用质粒 DNA 转染细胞,表达相应的蛋白质。能够用于表达这些融合蛋白的表达系统有多种,它们包括(但不限于)哺乳动物细胞,细菌,酵母,昆虫细胞,等等。从哺乳动物细胞所表达的蛋白质具有糖基修饰。由于本发明的融合蛋白质的氨基酸序列中包括可糖基化的氨基酸,因此,哺乳动物细胞是表达这些蛋白质的最佳细胞。可用于蛋白质大规模表达的哺乳动物细胞有多种,例如 293 细胞,

CHO 细胞, SP20 细胞, NSO 细胞, COS 细胞, BHK 细胞, PerC6 细胞, 等等。许多其他细胞也可用于这些蛋白质的表达和生产, 因此都包括在本发明所能使用的细胞之列。

[0054] 编码多肽的质粒可经转染进入细胞。转染方法包括(但不限于): 电穿孔, 脂质体(liposome)介导等等。融合蛋白质表达后, 可用酶联免疫吸附试验(ELISA)或其他方法测定细胞培养液中融合蛋白质的浓度。由于这些融合蛋白质具有免疫球蛋白 Fc 片断, 因此可用蛋白 A 亲和层析法提取所表达的融合蛋白质。

[0055] 由于本发明的各种融合蛋白质的基本作用是阻断 VEGF 信号通路, 因此这些融合蛋白质可能应用于与血管新生或者 VEGF 相关的疾病。这些疾病可能包括(但不限于)各种实体肿瘤, AMD, 关节炎, 等等。融合蛋白可以作为提取的重组蛋白质注射到病人体内。也可以将融合蛋白 DNA 序列插入到适当的载体中, 用基因治疗或细胞治疗的方法在病人体内表达。所以, 本发明所涉及的融合蛋白质的使用方法有多种形式, 不仅包括蛋白质本身, 也包括编码融合蛋白氨基酸序列的对应 DNA 序列。

[0056] 本发明还包括含有本发明融合蛋白的药物组合物, 组合物中可以含有药物可接受的载体。组合物可以以任何形式的药物制剂形式存在, 优选的是注射剂, 最优选的是冷冻干燥注射剂。该药物制剂形式药物组合物, 可以按照制剂学常规技术制备, 包括将药物活性成分, 本发明的融合蛋白与药物载体混合, 按照制剂学常规技术制成所需要的剂型。

[0057] 本发明的融合蛋白, 特别优选的融合蛋白是 SR1, 与现有技术相比, 优点明显, 具有多价, 副作用小的特点。

[0058] 实施例 1: 融合蛋白质及其质粒的构建。

[0059] 构建本发明的 SR1-3 融合蛋白的氨基酸序列来自 Flt1(NP_002010) 和 KDR(NP_002244) cDNA 编码区相应的胞外区免疫球蛋白域氨基酸序列, 融合于人免疫球蛋白 IgG1Fc(P01857, 104-330) 氨基酸序列, 信号肽来自 Flt1 的信号肽序列(NP_002010 :1-26)。

[0060] SR1-3 的结构见图 3。SR1, 2, 3 氨基酸序列分别见序列 6, 7, 8。

[0061] DNA 序列分别通过基因合成和拼接的方式获得, 在两端分别加上 Xba1/HindIII 酶切位点, 克隆入 pcDNA3. 1。

[0062] 实施例 2: 融合蛋白质在细胞中的表达和纯化。

[0063] 本发明的组成部分之一是在在完成各质粒的构建以后, 提取获得高纯度质粒 DNA, 在瞬时转染细胞中表达所构建的融合蛋白质。在蛋白质被纯化后, 递药给特定的动物模型来证实生物学活性。然后将质粒转染至稳定的 CHO 细胞用于生产。

[0064] 瞬时转染表达:

[0065] 首先用生长良好的 CHO 细胞, 在转染的前一天以 $8 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的密度用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基接种至 6 孔板或需要的平皿, 第二天先将培养液换为 opti-mem, 然后以 $0.4 \mu\text{gDNA}/\text{cm}^2$ 的量将质粒 DNA 与 lipofectamine2000 的复合物加入细胞培养液中。继续培养三天, 然后收集上清液。用 ELISA 法定量测定上清液中表达的融合蛋白, 用 protein A 柱纯化表达的少量融合蛋白。

[0066] 稳定转染表达:

[0067] 转染同上。但是, 在转染第二天, 将细胞用胰酶消化, 用 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基以 $5 \times 10^4/\text{ml}$ 的密度分至 96 孔板, 每孔 100 μl , 第三天加入 G418。5 天后换一次液, 大约 14 天后, 挑取新霉素抗性单克隆, 进行细胞的扩大培养。最后, 细胞在发酵罐中培养生产融

合多肽。

[0068] 实施例 3 :融合蛋白质体外活性测定

[0069] 融合蛋白与 VEGF 和 PLGF 的结合能力分析

[0070] 本发明利用高特异性和高灵敏度的 VEGF 和 PLGF ELISA 定量检测试剂盒来确定各融合蛋白与 VEGF 和 PLGF 的亲合力。实验中,将不同浓度(0 到 1000pM)的融合蛋白和 40pM 的人 VEGF 或 PLGF 在室温下相混合,37 度 2 小时,或 4 度过夜后用 VEGF 或 PLGF ELISA 定量检测试剂盒检测游离的 VEGF 或 PLGF 浓度。计算各融合蛋白的结合亲和力。

[0071] BIAcore 分析 SR1 对 VEGF 165 的分子结合比例

[0072] SR1 融合蛋白被首先用胺偶联化学方法固定在 BIAcore 芯片 (BIACORE) 上的抗 Fc 专一性抗体所固定。用空白抗体表面作负对照,以 10 微升 / 分钟的速度用 1 个小时将 VEGF 165 以 1nM, 10nM 和 50nM 注射在融合蛋白的表面。记录实时结合信号,并在每一次注射结束时达到饱和结合。计算 SR1 融合蛋白对 VEGF 165 的分子结合比例。

[0073] 在溶液中,将浓度为 1nM 的 SR1 融合蛋白与各种浓度的 VEGF 165 混合。在培养 1 小时之后,以与胺结合的 VEGF 165 表面结合信号形式测定溶液中游离的融合蛋白的浓度。利用校正曲线将 BIAcore 结合信号转换成它的摩尔浓度。计算 SR1 融合蛋白对 VEGF 165 的分子结合比例。

[0074] 内皮细胞生长分析:

[0075] 选用生长良好的人脐带静脉内皮细胞悬液 (Cambrex Bio Science Walkersville, Inc.), 调整细胞浓度为 2.5×10^4 个 /ml, 接种于 96 孔培养板 (100 μ l / 孔), 生长培养液为 EGM 基本培养基 (Cambrex), 37°C 5% CO₂ 培养至贴壁状态, 用含 0.2% 明胶的 PBS 系列稀释纯化的 VEGF 抑制剂待测样品, 加入抑制剂浓度为 1-5000ng/ml, 2-3 小时后每孔加 VEGF165 至终浓度 3ng/ml, 2-3 天后, 每孔加入 10 微升 CCK-8 溶液。在细胞培养箱内继续孵育 2 小时。以加了相应量细胞培养液、药物和 CCK-8 溶液但没有加入细胞的孔作为空白对照, 在 450nm 测定吸光度, 以 650nm 作为参考波长双波长测定。

[0076] 实施例 4 :融合多肽抑制小鼠肿瘤的生长。

[0077] 将培养的人 A673 成横纹肌细胞瘤细胞 (ATCC ;CRL 1598) 悬浮于生理盐水中。在 6-10 周龄的雌性 BLAB/c 裸鼠背部区域皮下注射 100 微升体积、 1×10^6 个肿瘤细胞。在肿瘤细胞接种开始后 24 小时, 用融合蛋白或同剂量的提纯人免疫球蛋白 Fc 注射动物。注射剂量为每小鼠每次 400 微克, 每周两次。每组由 10 只小鼠构成。每周测定肿瘤大小。在肿瘤细胞接种 4 周后, 动物被安乐死亡, 然后取出肿瘤并称量分析。

[0078] 序列表:

[0079] <110> 欣润 (上海) 生物药业有限公司

[0080] <120> 抗血管新生融合蛋白

[0081] <160>8

[0082] <210>1

[0083] <211>103

[0084] <212>PRT

[0085] <213> 人工序列

[0086] <400>1 (F1t1D2)

- [0087] 1 SDTGRPFVEM YSEIPEIIHM TEGRELVIPC RVTSPNITVT LKKFPLDTLI
[0088] 51 PDGKRIIWDS RKGFIISNAT YKEIGLLTCE ATVNGLHYKT NYLTHRQTNT
[0089] 101 IID
[0090] <210>2
[0091] <211>204
[0092] <212>PRT
[0093] <213> 人工序列
[0094] <400>2 (KDRD2-KDRD3)
[0095] 1 PFIASVSDQH GVVYITENKN KTVVIPCLGS ISNLNVSLCA RYPEKRFVPD
[0096] 51 GNRISWDSKK GFTIPSYMIS YAGMVFACEK INDESYQSIM YIVVVVGYRI
[0097] 101 YDVVLSPSHG IELSVGEKLV LNCTARTELN VGIDFNWEYP SSKHQHKKLV
[0098] 151 NRDLKTQSGS EMKKFLSTLT IDGVTRSDQG LYTCAASSGL MTKKNSTFVR
[0099] 201 VHEK
[0100] <210>3
[0101] <211>93
[0102] <212>PRT
[0103] <213> 人工序列
[0104] <400>3 (KDRD4)
[0105] 1 FVAFSGMES LVEATVGERV RIPAKYLGYP PPEIKWYKNG IPLESNHTIK
[0106] 51 AGHVLTIMEV SERDTGNYTV ILTNPISKEK QSHVVSLVVY VPP
[0107] <210>4
[0108] <211>96
[0109] <212>PRT
[0110] <213> 人工序列
[0111] <400>4 (FI_t1D4)
[0112] 1 FITVKHRKQQ VLETVAGKRS YRLSMKVKAF PSPEVVWLKD GLPATEKSAR
[0113] 51 YLTRGYSLII KDVTEEDAGN YTILLSIKQS NVFKNLTATL IVNVKP
[0114] <210>5
[0115] <211>227
[0116] <212>PRT
[0117] <213> 人工序列
[0118] <400>5 (IgG1Fc)
[0119] 1 DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
[0120] 51 PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
[0121] 101 CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK
[0122] 151 GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG
[0123] 201 NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK
[0124] <210>6
[0125] <211>534

- [0126] <212>PRT
- [0127] <213> 人工序列
- [0128] <400>6 (SR1)
- [0129] 1 SDTGRPFVEM YSEIPEIIHM TEGRELVIPC RVTSPNITVT LKKFPLDTLI
- [0130] 51 PDGKRIIWDS RKGFIISNAT YKEIGLLTCE ATVNGHLYKT NYLTHRQTNT
- [0131] 101 IIDPFIASVS DQHG VVYITE NKNKTVVIPC LGSISNLNVS LCARYPEKRF
- [0132] 151 VPDGNRISWD SKKGFTIPSY MISOYAGMVFC EAKINDESYQ SIMYIVVVVG
- [0133] 201 YRIYDVVLSV SHGIELSVGE KLVNCTART ELNVGIDFNW EYPSSKHQHK
- [0134] 251 KLVNRDLKTQ SGSEMKKFLS TLTIDGVTRS DQGLYTCAAS SGLMTKKNST
- [0135] 301 FVRVHEKDKT HTCPCPAPE LGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV
- [0136] 351 VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW
- [0137] 401 LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SRDELTKNQV
- [0138] 451 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLSDSGS FFLYSKLTVD
- [0139] 501 KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKLSLS SPGK
- [0140] <210>7
- [0141] <211>423
- [0142] <212>PRT
- [0143] <213> 人工序列
- [0144] <400>7 (SR2)
- [0145] 1 SDTGRPFVEM YSEIPEIIHM TEGRELVIPC RVTSPNITVT LKKFPLDTLI
- [0146] 51 PDGKRIIWDS RKGFIISNAT YKEIGLLTCE ATVNGHLYKT NYLTHRQTNT
- [0147] 101 IIDFVAFGSG MESLVEATVG ERVRIPAKYL GYPPPEIKWY KNGIPLESNH
- [0148] 151 TIKAGHVLT I MEVSERDTGN YTVILTNPIS KEKQSHVVS VVYVPPDKTH
- [0149] 201 TCPCPAPEL LGGPSVFLFP PPKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK
- [0150] 251 FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS
- [0151] 301 NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS RDELTKNQVS LTCLVKGFYP
- [0152] 351 SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLSDSGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS
- [0153] 401 CSVMHEALHN HYTQKLSLS PGK
- [0154] <210>8
- [0155] <211>426
- [0156] <212>PRT
- [0157] <213> 人工序列
- [0158] <400>8 (SR3)
- [0159] 1 SDTGRPFVEM YSEIPEIIHM TEGRELVIPC RVTSPNITVT LKKFPLDTLI
- [0160] 51 PDGKRIIWDS RKGFIISNAT YKEIGLLTCE ATVNGHLYKT NYLTHRQTNT
- [0161] 101 IIDFITVKHR KQQVLETVAG KRSYRLSMKV KAFPSPEVVW LKDGLPATEK
- [0162] 151 SARYLTRGYS LIIKDVTEED AGNYTILLSI KQSNVFNLT ATLIVNVKPD
- [0163] 201 KTHTCPPCPA PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP
- [0164] 251 EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC

[0165] 301 KVSNKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSRDELTKN QVSLTCLVKG
[0166] 351 FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTTPVLDSG GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN
[0167] 401 VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK

Flt1 SpFlt1D1

MVSYWDTGVL LCALLSCLLL TGSSSGSKLK DPELSLKG
TQHIMQAGQTLH LQCRGEAAHK WSLPEMVSKE SERLSITKSA CGRNGKQFCS
TLTLNTAQAN HTGFYSCKYL AVPTSCKKET ESAIYIFISD TGRPFVEMYS

Flt1D2

EIPEIIHMTE GRELVIPCRV TSPNITVTLK KFPLDTLIPD GKRIIWDSRK
GFIISNATYK EIGLLTCEAT

Flt1D3

VNGHLYKTNY LTHRQNTNII DVQISTPRPV KLLRGHTLVL NCTATTPLNT
RVQMTWSYPD EKNKRASVRR RIDQSNCHAN IFYSVLTIDK MQNKDKGLYT
CRVRSGPSFK SVNTSVHIYD KAFITVKHRK QQVLETVAGK

Flt1D4

RSYRLSMKVK AFPSPEVWVL KDGLPATEKS ARYLTRGYSL
IIKDVTEEDA GNYTILLSIK QSNVFNLTA

Flt1D5

TLIVNVKPKI YEKAVSSFPD PALYPLGSRQ ILTCTAYGIP QPTIKWFWHP
CNHNHSEARC DFCSNNEESF ILDADSNMGN RIESITQRMA IIEGKNKMAS
TLVVADSRIS GIYICIASNK VGTVGRNISE YITDVPNGFH

Flt1D6

VNLEKMPTEG EDLKLSCVTN KFLYRDVTWI LLRTVNNRTM
HYSISKQKMA ITKEHSITLN LTIMNVSLQD

Flt1D7

SGTYACRARN VYTGEEILQK KEITIRDQEA PYLLRNLSDH TVAISSSTTL
DCHANGVPEP QITWFKNNHK IQQEPGIILG PGSSTLFIER VTEEDEGVYH
CKATNQGKSV ESSAYLTVQG TSDKSNLELI TLT

图 1

KDR spKDR D1

MQSKVLLAVA LWLCVETRAA SVGLPSVSLD LPRLSIQKDI LTIKANTTLQ
ITCRGQRDL D WLWPNNQSGS EQRVEVTECS DGLFCKTLTI PKVIGNDTGA
YKCFYRETDL ASVIYVVYVQD YRSPFIASVS DQHG~~V~~VYITE

KDR D2

NKNKTVVIPC LGSISNLNVS LCARYPEKRF VPDGNRISWD SKKGFTIPSY
MISYAGMVFC EAKINDESYQ

KDR D3

SIMYIVVVVG YRIYDVVLSP SHGIELSVGE KLVLNCTART ELNVGIDFNW
EYPSSKHQHK KLVNRDLKTQ SGSEMKKFLS TLTIDGVTRS DQGLYTCAAS
SGLMTKKNST FVRVHEKPFV AFGSGMESLV EATVGERVRI

KDR D4

PAKYLGYPPP EIKWYKNGIP LESNHTIKAG HVLTIMEVSE RDTGN~~Y~~TVIL
TNPISKEKQS HVVSLVVYVP

KDR D5

PQIGEKSLIS PVDSYQYGTT QTLTCTVYAI PPPHHIHWYW QLEEECANEP
SQAVSVTNPY PCEEWR~~S~~VED FQGGNKIEVN KNQFALIEGK NKT~~V~~STLVIQ
AANVSALYKC EAVNKVGRGE RVISFHVTRG PEITLQPDMQ

KDR D6

PTEQESVSLW CTADRSTFEN LTWYKLG~~P~~QP LPIHVGELPT
PVCKNLDTLW KLNATMFSNS TNDILIMELK

KDR D7

NASLQDQGDY VCLAQDRKTK KRHC~~V~~RQLT VLERVAPTIT
GNLENQTTSI GESIEVSCTA SGNPPPQIMW FKN~~E~~T~~L~~VED SGIVLKDGNR
NLTIRRV~~R~~KE DEGLYTCQAC SVLGC~~A~~KVEA FFIIEGAQEK TN

图 2

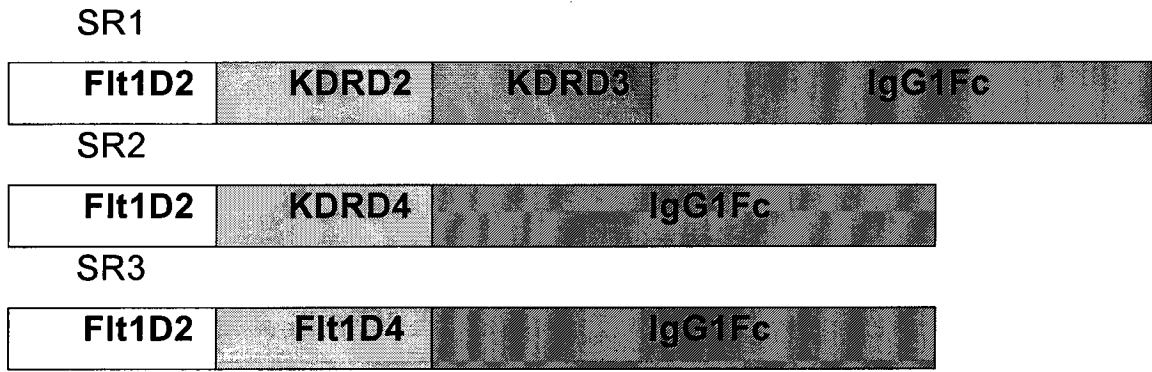


图 3