



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118085081 A

(43) 申请公布日 2024. 05. 28

(21) 申请号 202410471608.6

(22) 申请日 2024.04.19

(71) 申请人 云南大学

地址 650000 云南省昆明市翠湖北路2号

(72) 发明人 陈大华 章文信 周一珉

(74) 专利代理机构 云南派特律师事务所 53110

专利代理人 王昆汉

(51) Int. Cl.

C07K 16/22 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

权利要求书1页 说明书6页
序列表(电子公布) 附图3页

(54) 发明名称

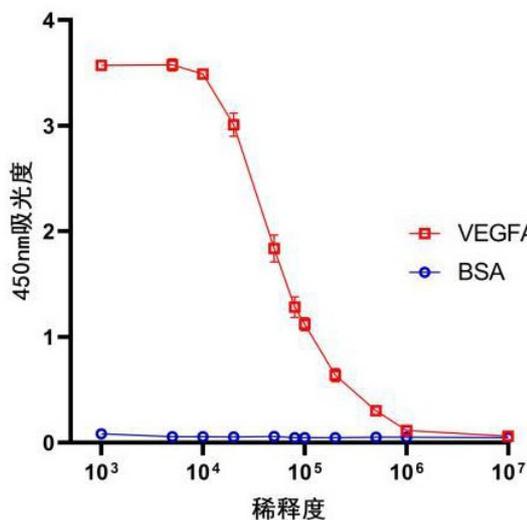
一种特异性结合VEGF的纳米抗体及用途

(57) 摘要

本发明公开了一种特异性结合VEGF的纳米抗体及用途,所述纳米抗体与人或小鼠VEGF特异性结合以封闭所述VEGF的活性,所述纳米抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示或与SEQ ID NO.1相比具有一个或多个氨基酸的置换、缺失或添加的序列,所述纳米抗体的互补决定区包括CDR1、CDR2、CDR3,其中,CDR1的氨基酸序列为SEQ ID NO.2,CDR2的氨基酸序列为SEQ ID NO.3,CDR3的氨基酸序列为SEQ ID NO.4;本发明的纳米抗体相对分子质量小约(12-15 KDa)、与人或小鼠VEGF特异性结合以封闭所述VEGF的活性,有效地抑制因VEGF增多导致的血管异常增生,经小鼠疾病模型验证,本发明的纳米抗体可以有效抑制激光诱导的脉络膜新生血管的形成,在临床治疗湿性年龄相关黄斑病性疾病中有极大的应用潜力。

CN 118085081 A

1719号羊驼血清效价



1. 一种特异性结合VEGF的纳米抗体,其特征在于,所述纳米抗体与人或小鼠VEGF特异性结合以封闭所述VEGF的活性,所述纳米抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO .1所示或与SEQ ID NO .1相比具有一个或多个氨基酸的置换、缺失或添加的序列。

2. 根据权利要求1所述的一种特异性结合VEGF的纳米抗体,其特征在于,所述纳米抗体的互补决定区包括CDR1、CDR2、CDR3,其中,CDR1的氨基酸序列为SEQ ID NO .2,CDR2的氨基酸序列为SEQ ID NO .3,CDR3的氨基酸序列为SEQ ID NO .4。

3. 根据权利要求2所述的一种特异性结合VEGF的纳米抗体,其特征在于,所述纳米抗体的骨架区包括FR1、FR2、FR3、FR4,其中,FR1的氨基酸序列如SEQ ID NO .5所示,FR2的氨基酸序列如SEQ ID NO .6所示,FR3的氨基酸序列如SEQ ID NO .7所示,FR4的氨基酸序列如SEQ ID NO .8所示。

4. 根据权利要求1所述的一种特异性结合VEGF的纳米抗体,其特征在于,n个所述纳米抗体直接连接或通过连接序列介导连接形成融合蛋白仍然具有结合VEGF的能力,其中, $n \geq 2$ 。

5. 一种药物组合物,其特征在于,包括权利要求1~4任一项所述的纳米抗体以及可药用赋形剂、载体或稀释剂。

6. 如权利要求1~4任一项所述的纳米抗体在制备治疗阻断VEGF信号相关疾病的药物中的用途。

7. 根据权利要求6所述的用途,其特征在于,所述治疗阻断VEGF信号相关疾病为老年性黄斑变性疾病。

一种特异性结合VEGF的纳米抗体及用途

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体涉及一种特异性结合VEGF的纳米抗体及用途。

背景技术

[0002] 血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)是调控血管生成的主要因子,具有促进血管通透性增加、细胞外基质变性、血管内皮细胞迁移、增殖和血管形成等作用。血管内皮生长因子家族有多种亚型,包括VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E和胎盘生长因子(PGF),其中,VEGF-A含量丰富、功能研究较为深入,VEGF若未作特殊说明通常VEGF指VEGF-A。在血管新生过程中,VEGF与其受体(Vascular Endothelial Growth Factor Receptors, VEGFR)相结合激活胞内酪氨酸激酶,启动下游细胞信号促进新生血管生成,血管新生是促进恶性肿瘤发展以及诱发眼科疾病的重要病因,因此,阻断血管生成是治疗肿瘤和相关眼科疾病的关键,VEGF通路也成为相关药物研发的重要靶点。

[0003] 目前,针对阻断VEGF的药效学分子机理研究已较为明确,也有多种单克隆抗体药物应用于靶向VEGF通路的阻断治疗,其中代表性的药物包括贝伐珠单抗、雷珠单抗,以老年性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD,导致老年人视力丧失的常见眼病)的临床治疗为例,由于应用的抗VEGF单抗药物半衰期短,需每4~8周重复进行眼内注射单抗药物以维持疗效,频繁注射带来高昂的用药成本 and 不便显著降低了患者的依从性和治疗效果。而且传统的单克隆抗体是经典的大分子药物(分子量约150 KDa),在结合抗原的特异性、亲合力以及组织渗透能力(药物有效吸收)方面仍有不足。因此抗体的小型化改造仍然存在需求。

发明内容

[0004] 本发明的目的是解决现有技术的不足,提供一种重链单域VHH抗体,具有相对分子质量小约(12-15 KDa)、抗原结合特异性高的一种特异性结合VEGF的纳米抗体的制备方法及其用途。

[0005] 本发明采取的技术方案如下:

一种特异性结合VEGF的纳米抗体,所述纳米抗体与人或小鼠VEGF特异性结合以封闭所述VEGF的活性,所述纳米抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO .1所示或与SEQ ID NO .1相比具有一个或多个氨基酸的置换、缺失或添加的序列。

[0006] 进一步地,所述纳米抗体的互补决定区包括CDR1、CDR2、CDR3,其中,CDR1的氨基酸序列为SEQ ID NO .2,CDR2的氨基酸序列为SEQ ID NO .3,CDR3的氨基酸序列为SEQ ID NO .4。

[0007] 进一步地,所述纳米抗体的骨架区包括FR1、FR2、FR3、FR4,其中,FR1的氨基酸序列如SEQ ID NO .5所示,FR2的氨基酸序列如SEQ ID NO .6所示,FR3的氨基酸序列如SEQ ID NO .7所示,FR4的氨基酸序列如SEQ ID NO .8所示。

[0008] 进一步地,n个所述纳米抗体直接连接或通过连接序列介导连接形成融合蛋白仍

然具有结合VEGF的能力,其中, $n \geq 2$ 。

[0009] 本发明提供了一种药物组合物,包括所述的纳米抗体以及可药用赋形剂、载体或稀释剂。

[0010] 本发明提供了一种所述的纳米抗体在制备治疗阻断VEGF信号相关疾病的药物中的用途。

[0011] 进一步地,所述治疗阻断VEGF信号相关疾病为老年性黄斑变性疾病。

[0012] 本发明的有益效果:

本发明的纳米抗体相对分子质量小约(12-15 KDa)、与人或小鼠VEGF特异性结合以封闭所述VEGF的活性有效地抑制因VEGF增多导致的血管异常增生。经小鼠疾病模型验证,本发明的纳米抗体可以有效抑制激光诱导的脉络膜新生血管的形成,在临床治疗湿性年龄相关黄斑病性疾病中有极大的应用潜力。

附图说明

[0013] 图1为实施例1中血管内皮生长因子A抗原蛋白4次免疫羊驼后进行的血清抗体效价检测图;

图2为实施例2中ELISA法检测候选纳米抗体分子与血管内皮生长因子A抗原蛋白的结合图;

图3为实施例3中免疫共沉淀法检测候选纳米抗体分子与血管内皮生长因子A抗原蛋白的结合图;

图4为实施例4中候选纳米抗体与血管内皮生长因子A抗原蛋白的亲合力图;

图5为实施例5中纳米抗体VE12与融合蛋白2VE12抑制激光诱导小鼠脉络膜新生血管的效果统计图。

具体实施方式

[0014] 本发明术语“抗体”以最广泛的含义使用,包括各种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体、双特异性抗体和抗体片段,只要它们表现出特定的抗原结合活性。抗体的结合特异性及亲合力均主要由CDR序列决定,根据成熟、公知的现有各项技术可轻易地将非CDR区域的氨基酸序列改变而获得具有相类似的生物活性的变体。本领域公知,抗原结合功能区是指可以与目标分子如抗原发生特异性相互作用的区域,其作用具有高度选择性,识别一种目标分子的序列通常不能识别其他分子序列。

[0015] 本发明术语“结合”是指分子(例如抗体)的单个结合位点与其结合配偶体(例如抗原)之间的非共价相互作用。除非另有说明,本发明所述“结合力”是指结合对成员(例如抗体和抗原)之间1:1相互作用的内在结合亲和力。分子X对其配偶体Y的亲合力通常可以由解离常数(KD)表示,亲合力可以通过本领域已知的常用方法来测量。

[0016] 为使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将对本发明作进一步地详细描述。

[0017] 实施例1 纳米抗体VE12的制备

步骤1:人VEGF α 抗原的表达、纯化。在NCBI数据库中查询人VEGF α 蛋白及编码mRNA序列信息,构建pcDNA3.1-VEGF α -6 \times His质粒并转染HEK293F细胞,转染72小时后收取细胞

上清液,利用AKTA对上清液进行亲和纯化,洗脱液经浓缩后使用分子筛做进一步纯化,得到人VEGF α 蛋白作为抗原分子;

步骤2:抗原免疫羊驼。将步骤1中抗原分子与等体积弗氏佐剂混合,震荡混匀后在羊驼颈部多点皮下注射,免疫羊驼操作重复五次进行,每14天免疫1次,免疫四次后检测抗体效价,结果如图1所示,抗原注射后形成了良好的免疫效果;

步骤3:羊驼外周血淋巴细胞RNA提取与反转录。采用肝素钠真空采血管,收集完成步骤2中羊驼腿部静脉血液,分离淋巴细胞后提取总RNA,随后进行反转录合成cDNA用于核糖体展示文库构建;

步骤4:构建核糖体展示文库。以步骤3中cDNA为模板,根据羊驼重链抗体结构,设计引物(引物序列:AlpVh-L2:CTGARCTKGGTGGTCCTGGCTGC;Hinge-R:tggRcatttgggacacttggga)用于扩增抗体片段,其扩增片段大小约为500-600bp,再通过重叠延伸PCR法(SOE-PCR)在抗体片段两端加入核糖体展示的必要元件,其中,噬菌体P3蛋白片段用于已翻译蛋白的核糖体表面展示;PolyP和PolyA结构用于引发核糖体停滞,末端无中止密码子;

步骤5:核糖体展示筛选。抗原蛋白在96孔板中完成包被后备用,将步骤4中核糖体展示文库进行体外翻译反应,反应产物与包被的抗原蛋白共孵育,洗去非特异结合后洗脱孵育混合物,回收混合物中的RNA,使用上述Hinge-R引物进行反转录,所得cDNA即为下一轮核糖体展示文库的抗体片段模板;再通过SOE-PCR在抗体片段两端加入核糖体展示的必要元件,构建新一轮核糖体展示文库,如此重复进行三次筛选,完成筛选的cDNA文库进行下一步(步骤6)序列确认;

步骤6:细菌ELISA检测。在96孔板中分别包被牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA)(阴性对照)和抗原蛋白备用;取步骤5中的筛选所得的cDNA,设计引物(引物序列:RDLT28A-F:agcaaatgggtcgcggatccGtggtcctggctgctcttctac;HA-28A-R:gtggtggtggtggtggtgctcgagTTAAGCGTAATCTGGTACGTCGTATGGTA),在其末端引入HA标签并连入原核表达质粒pET-28a,重组产物转化大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞,挑取单克隆扩大培养后加入IPTG诱导目的蛋白表达,完成诱导的大肠杆菌裂解,产物与BSA或抗原蛋白分别共孵育,洗去非特异结合,用抗HA标签抗体做ELISA检测,结果如表1所示,在取抗原蛋白和相应BSA的比值最高的50条抗体序列,去除其中的重复序列和抗体结构不完整序列,剩余序列按比值高低排序取前5条为候选纳米抗体序列(带框且加粗字体表示的序列),分别为候选A、候选B、候选C、候选D、候选E,进行进一步实验;

表1 细菌ELISA法初步筛选候选纳米抗体序列

1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
a	0.32	1.98	0.29	0.26	0.29	0.22	2.32	2.45	0.25	0.26	1.90	2.65
b	1.27	0.27	2.70	0.29	0.24	0.25	0.24	2.55	0.28	0.29	1.14	2.60
c	1.95	0.97	1.27	3.82	2.17	2.98	3.25	1.85	1.58	3.22	0.23	1.46
d	3.96	0.30	1.16	3.05	3.24	0.27	0.25	0.27	6.64(E)	1.78	3.14	1.58
e	0.27	2.70	0.27	0.33	2.03	0.25	3.57	5.57	2.91	0.56	2.86	2.40
f	0.41	0.30	0.56	2.97	2.03	3.72	3.40	1.43	4.08	0.23	2.53	6.88(D, VE12)
g	2.45	2.62	0.30	2.59	0.28	2.90	2.24	3.60	0.23	2.89	2.57	2.57
h	1.95	4.26	0.32	0.32	3.00	1.66	0.33	3.88	0.30	1.64	4.99	2.50
2												
a	0.28	2.05	0.27	2.52	2.80	0.27	0.73	1.79	0.29	0.94	0.31	0.32
b	0.27	0.26	2.42	1.45	2.70	0.28	1.91	2.68	0.29	0.30	0.31	0.30
c	0.28	0.40	0.27	2.74	2.45	4.88	0.56	0.31	3.04	0.28	2.68	2.76
d	2.10	1.62	0.34	3.04	3.38	3.25	0.36	8.40(C)	0.34	2.81	2.66	2.56
e	1.16	1.59	0.27	0.42	3.47	0.31	3.55	0.30	0.37	3.04	2.89	0.93
f	1.66	1.36	2.62	0.29	0.30	1.97	0.33	0.30	0.96	0.28	1.92	0.28
g	1.07	0.28	1.09	5.75	0.31	2.68	0.46	0.26	0.31	2.17	2.93	0.27
h	0.84	0.43	2.47	2.73	0.32	1.30	2.97	0.27	0.27	1.99	2.71	0.28
3												
a	1.93	1.11	0.25	1.19	9.02(B)	0.76	2.75	0.37	3.43	3.46	0.34	9.12(A)
b	2.67	0.38	2.52	0.33	0.47	0.81	3.62	0.37	1.89	4.84	3.94	1.87
c	1.60	5.12	0.30	1.39	2.24	4.26	4.10	2.24	4.89	0.29	0.28	3.84
d	2.75	0.29	0.84	0.33	3.83	5.03	4.15	3.86	3.76	0.28	3.67	0.27
e	2.77	2.65	2.95	3.20	3.75	2.88	0.29	0.29	3.96	3.67	3.38	0.28
f	0.84	0.28	11.40	2.06	9.34	0.51	0.44	0.31	0.30	0.96	5.97	0.27
g	0.26	1.00	0.32	6.51	1.40	0.40	2.97	2.36	0.26	2.71	0.26	2.38
h	0.67	0.29	4.33	3.24	3.19	3.08	1.80	0.33	1.26	2.28	0.27	0.27
4												
a	1.59	0.35	2.99	2.91	1.56	0.50	0.28	0.34	0.30	0.50	0.32	3.10
b	0.36	0.27	2.65	0.28	2.42	2.62	2.85	0.33	3.82	1.36	0.83	2.96
c	2.04	2.58	3.14	0.29	0.28	3.29	3.44	3.43	0.33	3.20	4.56	0.36
d	1.63	1.07	1.55	1.74	0.33	3.66	2.31	0.39	1.87	3.57	3.26	3.18
e	0.34	2.68	5.03(F)	0.39	3.23	3.36	2.97	3.54	1.58	0.27	0.27	3.76
f	0.74	0.37	0.32	0.30	0.35	1.45	6.20	0.72	2.09	2.72	0.35	0.65
g	2.67	2.21	2.03	0.29	0.33	0.29	3.18	0.33	3.19	3.88	1.66	4.10
h	0.41	0.33	0.31	0.36	0.33	3.34	0.48	0.33	0.34	1.38	5.81	3.54

[0018] 步骤7: 抗体-抗原亲和性检测。构建步骤6中候选抗体序列的原核表达质粒, 表达纯化候选纳米抗体, 采用表面等离子体共振 (Surface plasmon resonance, SPR) 技术检测抗原-抗体亲和力;

以步骤7中纳米抗体为基础的优化: 将两段VE12抗体序列用linker串联(linker序列: GGGGS), 形成的融合蛋白名称为2VE12, 相较于原始纳米抗体, 融合蛋白2VE12结合抗原的能力显著提升。

[0019] 实施例2 纳米抗体VE12、融合蛋白2VE12与VEGF抗原的结合

取实施例1中第三次核糖体展示筛选所得的cDNA, 根据保守的前导序列和铰链区设计引物(引物序列: RDLT28A-F: agcaaatgggtcgcggatccGtggtcctggctgctcttctac; HA-28A-R: gtggtggtggtggtggtggtgctcagTTAAGCGTAATCTGGTACGTCGTATGGGTA), 在其C末端引入HA标签并连入原核表达质粒pET-28a, 重组产物转化大肠杆菌BL21 (DE3) 感受态细胞, 次日挑取单克隆至2mL 96孔无菌深孔板, 每孔含有300 μ L LB培养基(卡那霉素抗性), 在37 $^{\circ}$ C摇床, 220rpm, 震荡培养4小时以上, 4 $^{\circ}$ C保存; 用ELISA包被液将抗原蛋白稀释至2 μ g/mL, 在96孔板中包被100 μ L /孔, 4 $^{\circ}$ C, 50rpm摇床摇过夜, 同时相同条件包被等量的BSA蛋白作为对照。准备新的深孔板, 每孔含有300 μ L LB培养基(卡那霉素抗性), 将保存的单克隆每孔取菌液50 μ L接种至新深孔板中, 37 $^{\circ}$ C摇床中, 220 rpm, 震荡培养1小时后加入50 μ L含1.6mM IPTG的LB培养基(卡那霉素抗性), 使菌液中IPTG终浓度为0.2mM, 16 $^{\circ}$ C 200rpm过夜诱导表达。取出诱导表达菌液, 4 $^{\circ}$ C, 4000 \times g离心15分钟, 弃培养基上清。每孔加入300 μ L蛋白酶抑制剂Cocktail和溶菌酶的大肠杆菌裂解缓冲液, 重悬菌体后置于冰上裂解30分钟。弃去包被抗原蛋白过夜的96孔板中的包被液, 每孔加入200 μ L PBS洗3次, 每次5分钟, 加入3% PBSTA封闭液, 200 μ L/孔, 室温密封1小时。弃去封闭液, 每孔加入200 μ L PBST洗涤3次, 每次5分钟。每孔加入100 μ L 3%PBSTA封闭液, 再取大肠杆菌裂解液上清, 每孔100 μ L加入对应的孔中, 包被BSA的孔操作相同, 4 $^{\circ}$ C, 50rpm摇床孵育结合4小时。弃去孔内剩余液体, 每孔加入200 μ L PBST洗涤3次, 每次10分钟。将anti-HA鼠抗用3% PBSTA按1:3000稀释, 100 μ L/孔加入96孔酶标板, 室温孵育2小时, 弃去孔内剩余液体, 每孔加入200 μ L PBST洗涤6次, 每次10分钟。将

HRP标记的鼠二抗用3% PBSTA按1:5000稀释;100 μ L/孔加入96孔酶标板,室温孵育30分钟,弃去孔内剩余液体,每孔加入300 μ L PBST洗涤6次,每次5分钟。弃去孔内剩余液体,每孔加入100 μ L TMB单组分显色液,室温暗处孵育5-10分钟,每孔加入100 μ L 1mol/L HCl终止液终止反应,用酶标仪读取OD450值,如图2所示,纳米抗体VE12和融合蛋白2VE12均能与抗原VEGF结合。

[0020] 实施例3 纳米抗体与VEGF抗原的结合

使用免疫共沉淀法检测纳米抗体VE12及候选A、候选B、候选C、候选D、候选E共6种纳米抗体分别与人VEGF、小鼠VEGF的结合。

[0021] 构建原核表达质粒,带HA标签,在大肠杆菌中原核表达,同时在HEK293T中分别表达Flag-hVEGF和Myc-mVegf,将转染后的细胞裂解液分别结合Flag beads和Myc beads,将含有抗原的Flag或Myc beads与含有抗体的细菌裂解液在室温孵育1小时,用500mM NaCl IP buffer洗去非特异结合后,进行Western Blot检测;如图3所示,6种纳米抗体均与VEGF抗原结合,但结合程度差异较大;其中VE12和候选E分子与人VEGF抗原结合最强,但候选E不与小鼠VEGF结合,无法进行后续动物模型测试,VE12是本发明中最佳的纳米抗体。

[0022] 实施例4 基于表面等离子体共振技术检测纳米抗体VE12,融合蛋白2VE12与VEGF抗原的亲合力

使用Biacore X 100 测定纳米抗体VE12及融合蛋白2VE12与VEGF的动力学常数及亲和力参数。将VEGF作为配体经氨基偶联固定在Series Chip CM5芯片表面,以HEB-EP+1mg/mL DSS(硫酸葡聚糖钠作为流动相);纳米抗体为分析物,流经芯片表面获得仪器的响应值(respond unit, RU);分析物注入后,仪器响应值上升,抗体结合至平衡状态,由此获得结合速率常数Kon;分析物注入完毕后,流动相流经芯片表面,抗体解离至平衡状态,由此获得解离速率常数Koff;Koff/Kon获得抗体和抗原的解离尝试KD;在多循环模式中检测不同浓度抗体与芯片表面抗原的结合,以0.5%SDS为再生缓冲液,每轮检测完成后,再生缓冲液流经芯片表面再生后进行下一轮分析。如图4所示,在HEB-EP+1mg/ml DSS溶液中,抗体VE12与VEGF α -165的亲和力常数为0.31 μ M,抗体2VE12与VEGF α -165的亲和力常数为70.3 nM,亲合力检测表明候选纳米抗体分子与抗原蛋白分子间存在较强的亲和性。

[0023] 实施例5 注射纳米抗体VE12和融合蛋白2VE12以抑制激光诱导小鼠脉络膜新生血管

步骤1:由于脉络膜新生血管(CNV)是AMD的重要特征之一,首先构建激光诱导CNV小鼠模型:

a. 选择6至8周健康C57小鼠,腹腔注射0.3mL麻醉剂(即用型1.25%阿佛丁溶液),等待3-5分钟小鼠麻醉;

b. 在麻醉小鼠右眼滴一滴复方托吡卡胺滴眼液进行扩瞳处理,约1-3分钟后,滴一滴盐酸奥布卡因滴眼液;

c. 设置激光光凝仪参数:

pulse power: 150-200mw,duration: 50ms,interval: 300ms

e. 将小鼠放置在显微镜前合适位置,调整显微镜焦距至清晰看见小鼠眼睛,持眼底激光镜轻贴于小鼠眼部,微调看见眼底,打激光3次,以光凝处产生气泡作为击穿Bruch膜的标志;

f. 给小鼠双眼涂抹妥布霉素地塞米松眼膏以防感染；

步骤2:OCT(A)检测

a. 提前预热海德堡眼科诊断仪OCT仪器；

b. 小鼠麻醉、扩瞳操作如上；

c. 将小鼠放置在仪器前合适位置；

d. 打开海德堡软件,新建文件后启动OCT模式；

e. 调整焦距,微调至看清眼底血管后,获取OCT图像；

f. 切换至OCTA模式,设置视野框,调整焦距,微调至看清眼底血管后,获取OCTA图像；

g. 双击图像,选择OCTA,调整厚度至激光斑处新生血管最清晰且其他杂质较少时,保存图像、数据；

步骤3:准备注射用药物

构建pLVX- VE12 (or 2VE12) - 6×His质粒转染HEK293F细胞,转染后60-72小时后收取细胞上清,在AKTA上使用HisTrap excel 5ml亲和柱纯化,将洗脱液超滤浓缩,而后使用经PBS平衡的分子筛Superdex™ 75 Increase 10/300 GL做进一步纯化,收集单一组分,抗体产物使用NanoDrop OneC进行定量(选择蛋白质A205模式),使用PBS稀释抗体至终浓度5mg/mL或10mg/mL。

[0024] 步骤4:玻腔注药

a. 小鼠麻醉、扩瞳操作如上；

c. 将小鼠放在显微镜下合适位置,左手固定小鼠头部,使小鼠眼睛突出,用棉签蘸取碘伏擦拭小鼠眼周,在显微镜下观察到角巩膜缘；

d. 取0.3mm注射器,酒精消毒后在角巩膜下方1mm避开血管,垂直进针面进针打孔,手持微量注射器从该孔进针,注射3μL药物,显微镜下观察眼压；实验组注射纳米抗体或融合蛋白,对照组注射雷珠单抗(Ranibizumab)。

[0025] e. 给小鼠双眼涂抹妥布霉素地塞米松眼膏防止感染,将小鼠放在加热垫上,醒后放入鼠框；

步骤5:第二次OCT(A)检测,操作同上；

如图5所示,纳米抗体VE12和双重纳米抗体融合蛋白2VE12能够有效抑制激光诱导的小鼠脉络膜新生血管生成。在同等注射剂量下,抑制效果与雷珠单抗等同或优于雷珠单抗。其中,注射雷珠单抗的分组新生血管信号平均下降约16.2%,注射VE12纳米抗体的分组信号下降15.1%(效果与雷珠单抗近似),而注射2VE12纳米抗体的分组信号下降约23.7%,效果显著优于雷珠单抗。

[0026] 以上所述的实施例仅是对本发明的优选方式进行描述,并非对本发明的范围进行限定,在不脱离本发明设计精神的前提下,本领域普通技术人员对本发明的技术方案做出的各种变形和改进,均应落入本发明权利要求书确定的保护范围内。

1719号羊驼血清效价

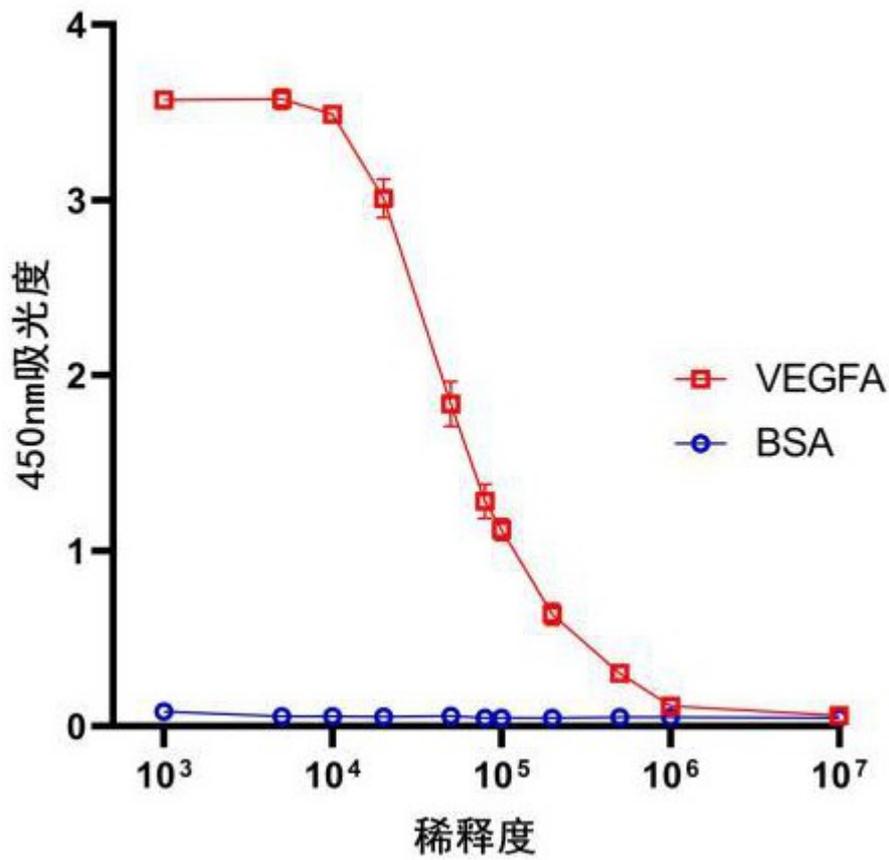


图 1

酶联免疫吸附测定

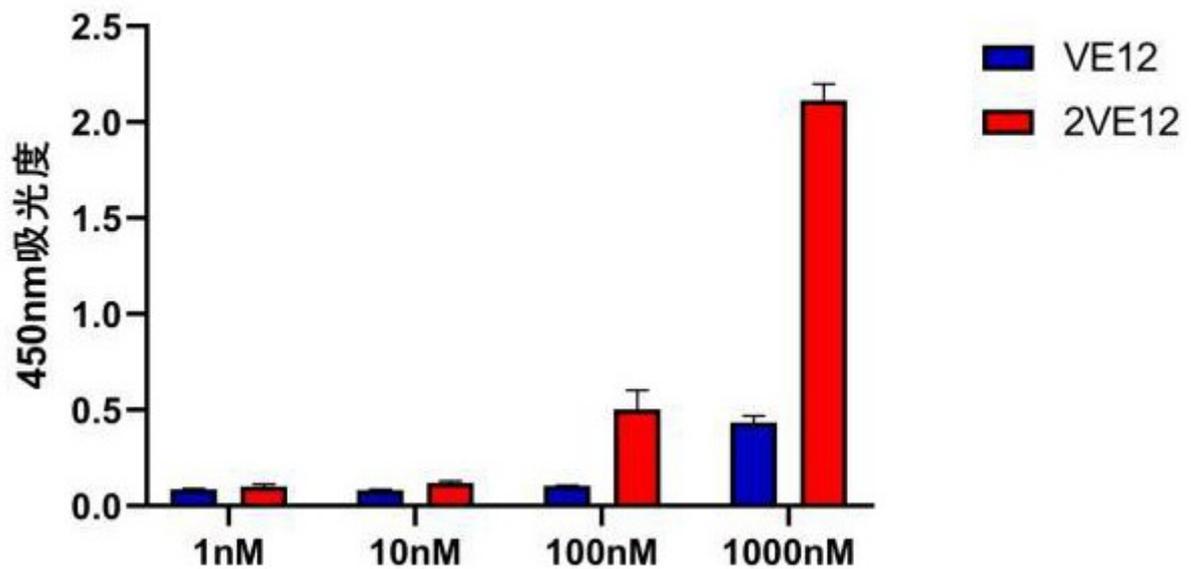
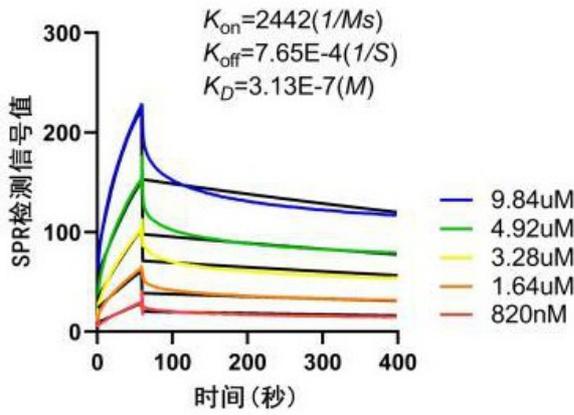


图 2

HBS-EP+1mg/ml DSS溶液中VE12与VEGFA-165



HBS-EP+1mg/ml DSS溶液中2VE12与VEGFA-165

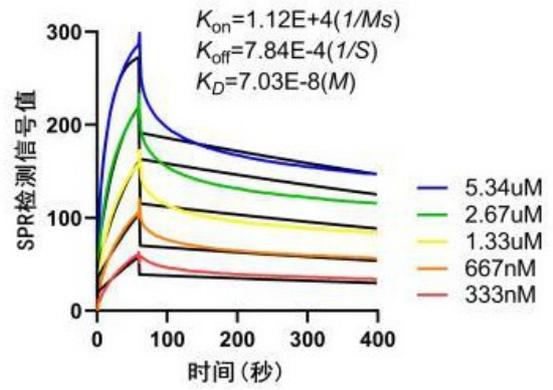


图 3

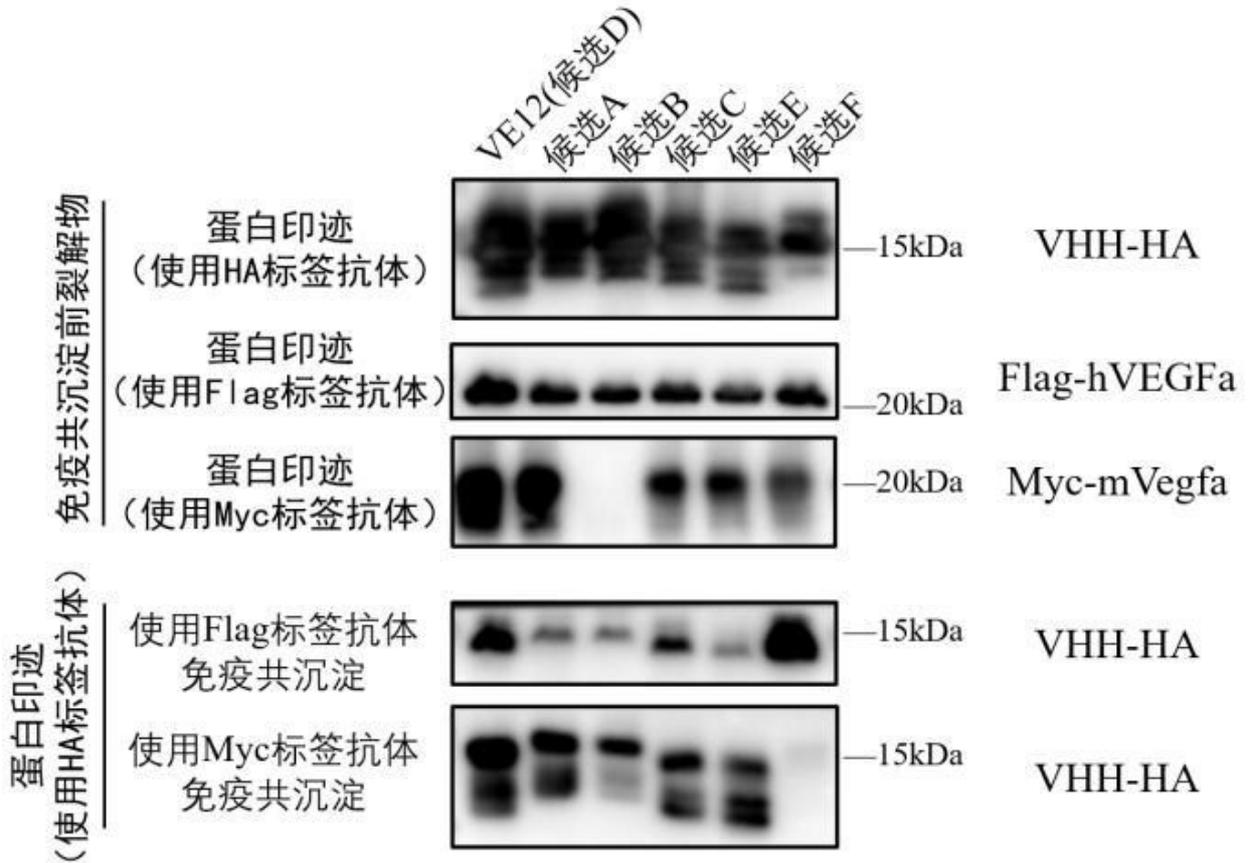


图 4

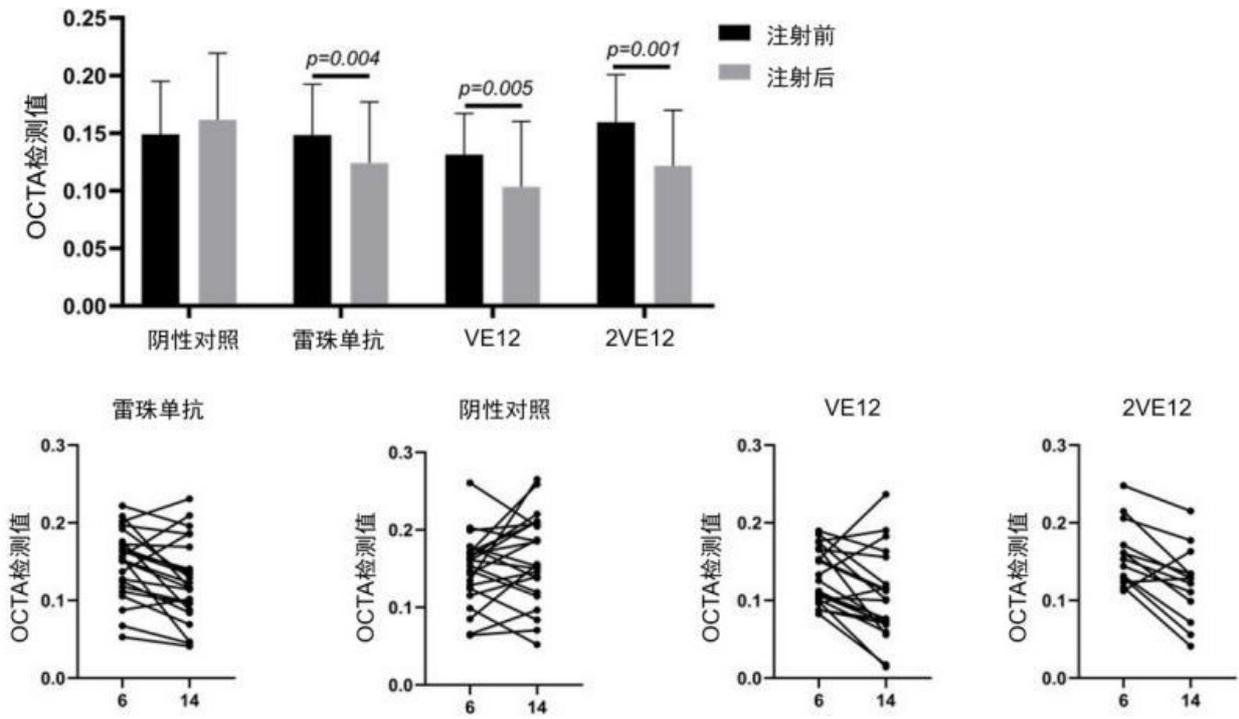


图 5