



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118108862 A

(43) 申请公布日 2024. 05. 31

(21) 申请号 202410524546.0

A61P 27/02 (2006.01)

(22) 申请日 2024.04.29

A61P 9/10 (2006.01)

(71) 申请人 上海鼎新基因科技有限公司

A61P 29/00 (2006.01)

地址 200131 上海市浦东新区巴圣路160号
7幢5单元2001室

A61P 37/02 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(72) 发明人 谭青乔 高凯瑜 陈秋宇 周睿

(74) 专利代理机构 北京瑞盛铭杰知识产权代理
事务所(普通合伙) 11617

专利代理师 栗华楠

(51) Int. Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/864 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

权利要求书2页 说明书18页

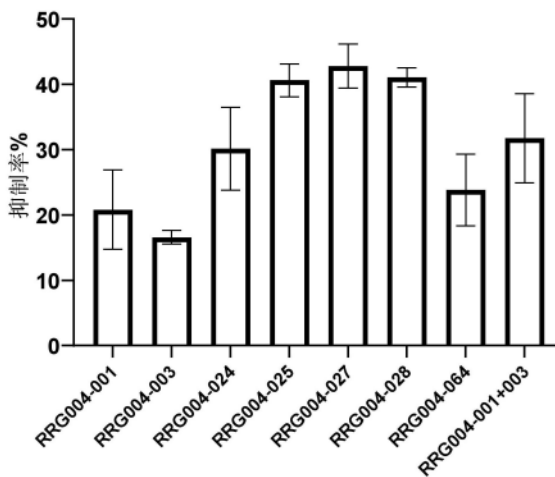
序列表(电子公布) 附图4页

(54) 发明名称

抗血管新生的融合蛋白及其应用

(57) 摘要

本发明属于生物医药领域,涉及抗多个VEGF家族蛋白的融合蛋白及其应用。所述融合蛋白N端为VEGF受体2的胞外结构域2和胞外结构域3,即VEGFR2D2D3。本发明通过不同结构域的组合、载体元件优化和密码子优化,通过AAV递送编码抗VEGF家族的多功能融合蛋白的表达盒实现上述多功能融合蛋白在靶组织中的高表达、高活性。可应用于对VEGF-A,和/或VEGF-C的抑制,特别在制备治疗血管内皮生长因子(VEGF)相关疾病的制剂或配方或药物组合物中的应用,对治疗新生血管性相关眼部疾病具有显著的治疗效果。



1. 一种融合蛋白,其特征在于,所述融合蛋白N端为VEGF受体2的胞外结构域2和胞外结构域3,即VEGFR2D2D3;

所述融合蛋白为VEGFR2D2D3-Fc,氨基酸序列如序列表SEQ ID NO.1所示;

所述融合蛋白为VEGFR2D2D3-(GGGGS)₄G-Fc,氨基酸序列如序列表SEQ ID NO.2所示;

所述融合蛋白为VEGFR2D2D3-(GGGGS)₄G-VEGFR1D2-Fc,氨基酸序列如序列表SEQ ID NO.3所示。

2. 如权利要求1所述的融合蛋白,其特征在于,所述融合蛋白的Fc片段为经过工程化改造的人IgG Fc片段mFc,突变位点为H90E,氨基酸序列如序列表SEQ ID NO.7所示;

所述融合蛋白为VEGFR2D2D3-(GGGGS)₄G-VEGFR1D2-mFc,氨基酸序列如序列表SEQ ID NO.8所示。

3. 权利要求1或2所述融合蛋白的编码基因。

4. 如权利要求3所述的编码基因,其特征在于,融合蛋白VEGFR2D2D3-Fc,核苷酸序列如序列表SEQ ID NO.4所示;

融合蛋白VEGFR2D2D3-(GGGGS)₄G-Fc,核苷酸序列如序列表SEQ ID NO.5所示;

融合蛋白VEGFR2D2D3-(GGGGS)₄G-VEGFR1D2-Fc,核苷酸序列如序列表SEQ ID NO.6所示;

融合蛋白VEGFR2D2D3-(GGGGS)₄G-VEGFR1D2-mFc,核苷酸序列如序列表SEQ ID NO.9所示。

5. 包含权利要求3所述编码基因的表达盒,其特征在于,所述表达盒从5' -3' 端包含如下式I所述结构:

E1-E2-E3-E4 (式I)

其中:E1为启动子;E2为信号肽;E3为编码融合蛋白的核苷酸序列;E4为Poly A序列。

6. 如权利要求5所述的表达盒,其特征在于,所述启动子元件具有眼部细胞组织特异性,包括但不限于NA65p、hGRK1、GNAT2、PR1.7、SNCG、IRBP启动子;

所述启动子具有在真核细胞或哺乳动物细胞广泛表达的特性,包括但不限于CMV、CBA、EF1a、SV40、PGK1、Ubc、CAG或miniCAG;

所述信号肽来自Human OSM、Gaussia luc、Human IL-2或者Albumin (HSA);

所述Poly A序列选自bGH polyA、SV40 polyA、HSV-TK polyA或hGH polyA。

7. 如权利要求5所述的表达盒,其特征在于,所述表达盒还包括其他表达调控元件,所述表达调控元件包括但不限于以下功能的调控元件:(1)增强子,增强子可以来自SV40病毒,CMV病毒或腺病毒;(2)用于稳定RNA和增强表达的调控元件,包括human actin beta (ActB) 5` UTR、human hemoglobin beta (HBB) 5` UTR、artificial HBB 5` UTR、artificial ActB 5` UTR、HBB 3` UTR、AES-mtRNR13` UTR;(3)内含子,包含human β -globin intron、chicken beta actin intron、rabbit β -globin intron、truncated SV40 late 16S intron、MVM intron-1;(4)kozak序列,kozak序列为GNCNCN;(5)WPRE序列或HPRE序列。

8. 如权利要求5所述的表达盒,其特征在于,所述表达盒如SEQ ID NO.10所示。

9. 一种包含权利要求3所述编码基因或权利要求5所述表达盒的AAV病毒,其特征在于,将所述编码基因或表达盒克隆至腺相关病毒AAV骨架中两个末端重复序列ITR之间,构建目

的基因质粒GOI,应用于AAV包装载体系统,包装成为AAV病毒。

10. 权利要求1或2所述融合蛋白,或权利要求3所述编码基因,或权利要求5所述表达盒,或权利要求9所述AAV病毒的应用。

11. 如权利要求10所述的应用,其特征在于,是在抑制VEGF-A,和/或VEGF-C中的应用;或是在制备抑制VEGF-A,和/或VEGF-C的药物中的应用。

12. 如权利要求10所述的应用,其特征在于,是在制备治疗血管内皮生长因子相关疾病的制剂或配方或药物组合物中的应用;

所述疾病包括但不限于眼部疾病、炎性疾病、自身免疫性疾病或肿瘤;

所述眼部疾病包括但不限于年龄相关性黄斑变性、糖尿病视网膜病变、糖尿病黄斑水肿。

抗血管新生的融合蛋白及其应用

[0001] 技术领域:

本发明属于生物医药领域,涉及抗血管新生的融合蛋白及其应用。

[0002] 背景技术:

血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)能诱导已有血管的再生(血管再生)或新血管的生长(血管新生),是胚胎发育和血管修复的关键因子。VEGF 家族包括 VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E 以及胎盘生长因子 1、2(PlGF-1、PlGF-2)。VEGF-A 是迄今最有效且研究最多的血管生长诱导因子。VEGF的家族成员由多个外显子编码,选择性剪接后可以产生不同的亚型,从而影响可溶性和受体结合情况。例如,VEGF-A有7个亚型,而VEGF-B 有2个亚型。VEGF的家族成员通过与VEGF受体(VEGFR)结合,激活信号转导。VEGFR为酪氨酸激酶受体,具有由7个免疫球蛋白样(immunoglobulin, IG)结构域所组成的细胞外区域。VEGFR-1(Flt-1)结合VEGF-A、VEGF-B,以及PlGF,并可作为VEGF的诱饵受体或VEGFR-2的调节剂。VEGFR-2(KDR/Flk-1)结合VEGF-A、VEGF-C和VEGF-D,且为VEGF诱导的血管生成通路的主要媒介。VEGFR-3(Flt-4)结合VEGF-C与VEGF-D,但不结合VEGF-A,是淋巴管生成的主要媒介。

[0003] 新生血管的形成是许多疾病发生的关键因素,包括眼部相关疾病如年龄相关性黄斑变性(AMD)、视网膜静脉阻塞(RVO)和糖尿病视网膜病变(DR)等,目前的主要疗法为抗VEGF-A药物(阿柏西普,雷珠单抗等),这些药物在临床治疗对于部分人群的疗效仍然不佳。且有报道,在抗VEGF-A的药物给药后,存在VEGF-C上升的情况。近几年,Opthea公司抗VEGF-C的OPT-302药物在nAMD的二期临床实验中展现出了良好的疗效和安全性。证明抑制VEGF-C能够有效地治疗nAMD,同时也说明VEGF家族中多个蛋白都参与了脉络膜新生血管CNV的形成,抑制VEGF家族中的多个蛋白有助于进一步提升nAMD的治疗效果。

[0004] 目前,对于前述的多种血管新生性眼底疾病(AMD, RVO, DR)的治疗来说,已批准的蛋白药物均需要通过反复的玻璃体腔注射进行治疗,既给患者造成了不便也加重了医疗机构的负担,通过基因治疗递送抗VEGF基因已进入临床后期开发,但是目前的技术仍以递送编码抗VEGF-A的拮抗剂为主,无法解决对抗VEGF-A抵抗的患者面临的临床需求。面对这个问题,通过基因治疗递送编码抗多个VEGF家族蛋白的拮抗剂成为一种突破性的治疗方案。通过基因治疗的方式在靶组织中充分、高效地表达能够抗多个VEGF家族的拮抗剂,且表达的拮抗剂能够高活性地结合并抑制VEGF家族蛋白是其中的关键技术难点,而本发明构建了抗多个VEGF家族蛋白的融合蛋白,并进一步通过融合蛋白与表达元件的筛选和优化实现了多个VEGF家族蛋白的抑制,且在动物模型中显示出了良好的疗效。

[0005] 发明内容:

目前治疗新生血管性相关眼部疾病的药物主要为抗VEGF-A,或抗VEGF-A/PlGF/VEGF-B等药物(Aflibercept, R1D2-R2D3-Fc),但近年来发现VEGF-C/D在新生血管性相关眼部疾病中同样很重要,因此,本发明提供抗多种VEGF家族蛋白的融合蛋白,主要研究了融合蛋白对于VEGF-A和VEGF-C的结合活性和抑制活性。

[0006] 本发明提供的技术方案之一,是一种具有抗VEGF-A和VEGF-C活性的融合蛋白,所

述融合蛋白的N端为VEGF受体2的胞外结构域2和胞外结构域3,即VEGFR2D2D3;

进一步地,所述融合蛋白为VEGFR2D2D3-Fc,氨基酸序列如序列表SEQ ID NO.1所示;

进一步地,所述融合蛋白为VEGFR2D2D3-(GGGS)₄G-Fc,氨基酸序列如序列表SEQ ID NO.2所示;

进一步地,所述融合蛋白为VEGFR2D2D3-(GGGS)₄G-VEGFR1D2-Fc,氨基酸序列如序列表SEQ ID NO.3所示。

[0007] 进一步地,技术方案一所述融合蛋白的Fc片段为经过工程化改造的人IgG Fc片段(mFc),突变位点为H90E,氨基酸序列如序列表SEQ ID NO.7所示。

[0008] 进一步地,带有经过改造的人IgG Fc的分子为VEGFR2D2D3-(GGGS)₄G-VEGFR1D2-mFc,氨基酸序列如序列表SEQ ID NO.8所示。

[0009] 本发明提供的技术方案之二,是技术方案一所述融合蛋白的编码基因;

进一步地,所述融合蛋白VEGFR2D2D3-Fc,核苷酸序列如序列表SEQ ID NO.4所示;

进一步地,所述融合蛋白VEGFR2D2D3-(GGGS)₄G-Fc,核苷酸序列如序列表SEQ ID NO.5所示;

进一步地,所述融合蛋白VEGFR2D2D3-(GGGS)₄G-VEGFR1D2-Fc,核苷酸序列如序列表SEQ ID NO.6所示。

[0010] 进一步地,所述融合蛋白VEGFR2D2D3-(GGGS)₄G-VEGFR1D2-mFc,核苷酸序列如序列表SEQ ID NO.9所示。

[0011] 进一步地,对上述编码基因的核苷酸序列进行了密码子优化,所述核苷酸序列在不改变编码产物氨基酸序列基础上,进行了密码子的随机替代和筛选,使得本发明的核苷酸序列在靶细胞内相对于原始密码子具有增加的表达量,可以提高编码产物在靶细胞中的表达水平。

[0012] 本发明提供的技术方案之三,是包含技术方案二所述融合蛋白编码基因的表达盒,所述表达盒从5'-3'端包含如下式I所述结构:

E1-E2-E3-E4 (式I)

其中:

E1为启动子;

E2为信号肽;

E3为编码技术方案一所述融合蛋白的核苷酸序列;

E4为Poly A序列。

[0013] 进一步地,式I所述结构还包括两端的ITR序列,具体为:ITR-E1-E2-E3-E4-ITR;所述ITR序列(反向末端重复序列)来自于AAV1,AAV2,AAV3,AAV4,AAV5,AAV6,AAV7,AAV8或AAV9;优选地来自AAV2;

优选地,所述启动子是可以启动目的基因转录的DNA序列,该序列可以被RNA聚合酶所识别,并开始转录合成RNA。所述启动子包括但不限于天然、优化或组合启动子;

更进一步地,所述启动子元件具有眼部细胞组织特异性,包括但不限于NA65p、hGRK1、GNAT2、PR1.7、SNCG、IRBP等启动子;

更进一步地,所述启动子具有在真核细胞或哺乳动物细胞广泛表达的特性,优选

地包含但不限于CMV、CBA、EF1a、SV40、PGK1、Ubc、CAG或miniCAG；

优选地，所述信号肽来自Human OSM、Gaussia luc、Human IL-2或者Albumin (HSA)；

优选地，所述Poly A序列选自bGH polyA、SV40 polyA、HSV-TK polyA或hGH polyA；

进一步地，上述表达盒还包括其他表达调控元件，所述表达调控元件包括但不限于以下功能的调控元件：(1)增强子，增强子可以来自SV40病毒，CMV病毒或腺病毒等；(2)用于稳定RNA和增强表达的调控元件，包括human actin beta (ActB) 5` UTR、human hemoglobin beta (HBB) 5` UTR、artificial HBB 5` UTR、artificial ActB 5` UTR、HBB 3` UTR、AES-mtRNR13` UTR等；(3)内含子，包含human β -globin intron、chicken beta actin intron、rabbit β -globin intron、truncated SV40 late 16S intron、MVM intron-1等；(4)调控元件还可以是部分的kozak序列，kozak序列为GNCNCN，例如GCCACC等；(5)调控元件可以是土拨鼠肝炎病毒转录后元件WPRE序列或人乙型肝炎病毒转录后元件HPRE序列。

[0014] 优选地，所述表达盒从5' 到3' 包含：5' ITR、增强子、启动子、内含子、UTR序列、kozak序列、信号肽、目标蛋白编码序列、RNA输出信号、多腺苷酸化信号序列和3' ITR；

更优选地，所述表达盒从5' 到3' 包含：5' 端的AAV2 ITR序列、CMV增强子、CMV启动子、ActB 5' UTR-HBB 2nd intron内含子、kozak序列、Gaussia luc信号肽、目标蛋白编码序列、WPRE、bGH多腺苷酸化信号序列和3' 端的AAV2 ITR序列；

优选地，包含CMV增强子-CMV启动子-ActB 5' UTR-HBB 2nd intron-kozak-Gaussia luc信号肽-RRG004-027-WPRE-bGH polyA的表达盒如序列表SEQ ID NO.10所示；

优选地，将所述融合蛋白表达盒，连接至瞬时转染载体；通过转染试剂将载体导入宿主细胞，表达所述融合蛋白。

[0015] 进一步地，所述瞬时转染载体包括但不限于PTT5、pCDNA3.1 (-)、pCDNA3.1 (+)、pPICZ α A、pGAPZ α A、PYES2.0、pAAV-MCS等；优选地，瞬时转染载体为pCDNA3.1 (+)、pAAV-MCS。

[0016] 进一步地，所用的转染试剂包括Lipo2000、Lipo3000、PEI、293fectin[™]、Cellfectin、磷酸钙等；优选地，转染试剂为PEI。

[0017] 进一步地，所用的宿主细胞包括原核细胞或真核细胞；优选地，宿主细胞选自大肠杆菌、酵母细胞或哺乳动物细胞；更优选地，宿主细胞为Expi293细胞、ARPE-19细胞。

[0018] 本发明的技术方案之四，是一种包含技术方案二所述编码基因或技术方案三所述表达盒的AAV病毒，将所述编码基因或表达盒克隆至腺相关病毒AAV骨架中两个末端重复序列ITR之间，构建目的基因质粒GOI，应用于AAV包装载体系统，所述包装载体系统包括：目的基因质粒GOI，携带AAV rep、cap基因的载体以及辅助载体，上述载体通过三质粒瞬时转染生产细胞包装成为AAV病毒。

[0019] 本发明的技术方案之五，是提供技术方案一所述多功能融合蛋白，技术方案二所述编码基因，或技术方案三所述表达盒，或技术方案四所述AAV病毒的应用；进一步地，是在抑制VEGF-A，和/或VEGF-C中的应用；

进一步地，是在制备抑制VEGF-A，和/或VEGF-C的药物中的应用；

进一步地，是在制备治疗血管内皮生长因子(VEGF)相关疾病的制剂或配方或药物

组合物中的应用,相关疾病包括但不限于眼部疾病、炎性疾病、自身免疫性疾病或肿瘤等,特别是在制备治疗年龄相关性黄斑变性、糖尿病视网膜病变、糖尿病黄斑水肿以及肿瘤相关药物中的应用;

进一步地,所述制剂或配方或药物可以是任何剂型,包括但不限于注射剂型和软膏剂型;

进一步地,所述制剂或配方或药物中,包含上述融合蛋白、表达盒或AAV病毒为唯一活性成分。

[0020] 进一步地,给药方式为AAV病毒视网膜下腔注射方式;

更进一步地,终身单次给药,给药总剂量为 1×10^6 - 1×10^{13} 个病毒基因组/眼;

进一步地,给药方式为蛋白的玻璃体腔注射,注射剂量为 $1\mu\text{g}$ - 10mg /眼。

[0021] 有益效果:

本发明通过优化组合和分子改造,提供了一种具有高表达、高活性和性质稳定的抗VEGF家族(VEGF-A和VEGF-C)的多功能融合蛋白。进一步通过载体元件的优化和组合,通过重组腺相关病毒AAV递送实现上述多功能融合蛋白在靶组织中的高表达、高活性。

[0022] VEGFR2D2D3-Fc、VEGFR2D2D3-(GGGS)₄G-Fc和VEGFR2D2D3-(GGGS)₄G-VEGFR1D2-Fc这三个融合蛋白氨基酸结构组成中采用了VEGFR2D2D3,文献报道VEGF-A与VEGFR2的亲合力是VEGFR1的1/10,但在本发明中发现,与现有技术VEGFR1D2-R2D3相比,VEGFR2D2D3具有相同的表达量和抗VEGF-A活性;同时在抗VEGF-C方面,与现有技术VEGFR3D1D2D3相比,VEGFR2D2D3的表达量和活性均显著提升。另外,本发明还发现VEGFR2D2D3需要放到蛋白的N端,否则会严重影响蛋白的表达量。

[0023] 本发明通过Fc的工程化改造(H90E),改善了目标蛋白的眼部药代动力学行为,减少了经眼部入血的蛋白暴露量,大幅增加了目标蛋白在眼部的蓄积并延长了半衰期。

[0024] 本发明通过载体元件优化和密码子优化,通过AAV递送编码抗VEGF家族的多功能融合蛋白的表达盒,在体内高效表达目标蛋白,在小鼠激光诱导脉络膜新生血管模型中体现出更优的抑制效果,对治疗新生血管性相关眼部疾病具有更优的治疗效果。

[0025] 附图说明:

图1载体图谱:pCDNA3.1中表达RRG004-027的载体图谱。

[0026] 图2载体图谱:pAAV-MCS载体表达RRG004-027的载体图谱。

[0027] 图3载体图谱:C12载体图谱。

[0028] 图4 融合蛋白表达水平。

[0029] 图中横坐标中的1,3,24...分别表示RRG004-001,003,024...,以此类推。

[0030] 图5 融合蛋白对于VEGFA的抑制活性。

[0031] 图6 融合蛋白对于VEGFC的抑制活性。

[0032] 图7 融合蛋白对于VEGFA和VEGFC刺激下的HUVEC细胞生长抑制。

[0033] 具体实施方式:

为了使本申请的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合具体实施例,对本申请进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅用以解释本专利,并不用于限定本发明。

[0034] 除非本文另有定义,否则本文使用的科学及技术术语具有本领域普通技术人员通

常理解的含义。

[0035] 在本发明的一些实施例中,本发明所述的具有抗VEGF-A与VEGF-C活性的融合蛋白使用了R2D2D3作为同时能够抗VEGF-A与VEGF-C的模块,如RRG004-024/025/027等。目前已有证据表明VEGFR2可以结合VEGF-A与VEGF-C,但是普遍认为VEGFR2结合VEGFA的能力要弱于VEGFR1的结合能力,而本发明发现R2D2D3作为VEGF-A的模块结合VEGF-A的活性不弱于甚至强于R1D2-R2D3的活性,同时发现R2D2D3对于VEGF-C的结合活性也很强;另外,本发明还发现R2D2D3需要放到蛋白的N端,否则会严重影响蛋白的表达量。并且从临床前结果来看,RRG004-027即VEGFR2D2D3-(GGGGS)₄G-VEGFR1D2-mFc的药效好于anti-VEGFA(RRG004-001)或anti-VEGFC(RRG004-063)单用。

[0036] 在一些实施例中,本发明所述的具有抗VEGF-A与VEGF-C活性的融合蛋白使用了经工程化改造的人IgG Fc段,如H90E,通过FcRn的结合位点突变能够进一步改善药物的代谢性质,增加药物在眼部的蓄积,并且减少药物经眼部入血引起的系统暴露。

[0037] 本发明还提供了一种多核苷酸表达盒,所述表达盒从5'-3'端包含如下式I所述结构:

E1-E2-E3-E4 (I)

其中:

E1为启动子(包括天然、优化或组合启动子);E2为信号肽;E3为编码抗多个VEGF家族蛋白的融合蛋白的核苷酸序列;E4为Poly A序列。

[0038] 在一些实施方案里,式I所述结构为:ITR-E1-E2-E3-E4-ITR;ITR序列(反向末端重复序列)来自于AAV1,AAV2,AAV3,AAV4,AAV5,AAV6,AAV7,AAV8或AAV9;优选地来自AAV2;

在一些实施方案里,所述表达盒核酸序列具有启动子,所述启动子用于启动与其连接的可编码核酸序列的表达,启动子可以是组成型的或是诱导型的,启动子可以是在眼部组织细胞中特异性表达的启动子,也可以是普遍存在的启动子。优选地,所述启动子是可以启动目的基因转录的DNA序列,该序列可以被RNA聚合酶所识别,并开始转录合成RNA。所述启动子包括但不限于天然、优化或组合启动子;

更进一步地,所述启动子元件具有眼部细胞组织特异性,包括NA65p、hGRK1、GNAT2、PR1.7、SNCG、IRBP等启动子;

更进一步地,所述启动子具有在真核细胞或哺乳动物细胞广泛表达的特性,优选地包含CMV、CBA、EF1a、SV40、PGK1、Ubc、CAG或miniCAG等启动子;

信号肽是引导新合成的蛋白质向分泌通路转移的短肽链(长度5-30个氨基酸),常指新合成多肽链中用于指导蛋白质的跨膜转移(定位)的N-末端的氨基酸序列(有时不一定在N端)。在起始密码子后,有一段编码疏水性氨基酸序列的RNA区域,该氨基酸序列就被称为信号肽序列,它负责把蛋白质引导到细胞含不同膜结构的亚细胞器内。包括三个区:一个带正电的N末端,称为碱性氨基末端;一个中间疏水序列,以中性氨基酸为主,能够形成一段 α 螺旋结构,它是信号肽的主要功能区;一个较长的带负电荷的C末端,含小分子氨基酸,是信号序列切割位点,也称加工区。当信号肽序列合成后,被信号识别颗粒(SRP)所识别,蛋白质合成暂停或减缓,信号识别颗粒将核糖体携带至内质网上,蛋白质合成重新开始。在信号肽的引导下,新合成的蛋白质进入内质网腔。而信号肽序列则在信号肽酶的作用下被切除。如终止转运序列存在于新生肽链的C端,也可以不被信号肽酶切除。

[0039] 在本发明的一些实施例中,选取常用的真核生物表达信号肽,优选地,所述信号肽为Human OSM、Gaussia luc、Human IL-2或者Albumin (HSA);

多腺苷酸化(Poly A)信号保护mRNA,免受核酸外切酶攻击,并且对转录终结、将mRNA从细胞核输出及进行翻译都十分重要。Poly A信号包含多个连续的腺苷一磷酸,通常含有AAUAAA重复序列。本发明所述Poly A序列位于编码抗多个VEGF家族蛋白融合蛋白的核苷酸序列的下游。优选地,所述Poly A序列选自bGH polyA、SV40 polyA、HSV-TK polyA或hGH polyA;

在本发明的一些实施例中,上述表达盒还包括表达调控元件,所述表达调控元件包括但不限于以下功能的调控元件:(1)增强子,增强子可以来自SV40病毒,CMV病毒或腺病毒等;(2)用于表达miRNA和siRNA序列的调控元件,包括human actin beta (ActB) 5` UTR、human hemoglobin beta (HBB) 5` UTR、artificial HBB 5` UTR、artificial ActB 5` UTR、HBB 3` UTR、AES-mtRNR13` UTR等;(3)内含子,包含human β -globin intron、chicken beta actin intron、rabbit β -globin intron、truncated SV40 late 16S intron、MVM intron-1等;(4)调控元件还可以是部分的kozak序列,Kozak序列是位于真核生物mRNA 5`端帽子结构后面的一段核酸序列,它可以与翻译起始因子结合而介导含有5`帽子结构的mRNA翻译起始,对应于原核生物的SD序列,其为存在于真核生物mRNA的一段序列,在翻译的起始中有重要作用。kozak序列为G/N-C/N-C/N-ANNAUGG,例如GCCACCAUGG;(5)调控元件可以是土拨鼠肝炎病毒转录后元件WPRE序列或人乙型肝炎病毒转录后元件HPRE序列。

[0040] 在本发明的一些实施例中,对上述表达盒的组成进行了优化,优选地,所述表达盒从5`到3`包含:5`端的AAV2 ITR序列、CMV增强子、CMV启动子、ActB 5` UTR-HBB 2nd intron内含子、kozak序列、Gaussia luc信号肽、目标蛋白编码序列、WPRE、bGH多腺苷酸化信号序列和3`端的AAV2 ITR序列。经过优化后,RRG004-027的蛋白表达量达到1771.4ng/ml,远远高于其他表达元件组合获得的表达量,属于预料不到的技术效果。

[0041] 在本发明的一些实施例中,将所述融合蛋白表达盒,连接至瞬时转染载体;通过转染试剂将载体导入宿主细胞,表达所述融合蛋白。进一步地,所述瞬时转染载体包括但不限于PTT5、pCDNA3.1(-)、pCDNA3.1(+)、pPICZ α A、pGAPZ α A、PYES2.0、pAAV-MCS等,优选地瞬时转染载体为pCDNA3.1(+)、pAAV-MCS;进一步地,所用的转染试剂包括Lipo2000、Lipo3000、PEI、293fectin[™]、Cellfectin、磷酸钙等;优选地转染试剂为PEI;进一步地,所用的宿主细胞包括原核细胞或真核细胞;优选地宿主细胞选自大肠杆菌、酵母细胞或哺乳动物细胞,更优选地宿主细胞为Expi293细胞、ARPE-19细胞。

[0042] 在本发明的一些实施例中,所述融合蛋白由Expi293细胞瞬时表达,并通过重组protein G亲和层析法从转染的细胞培养上清液中纯化。经过再一步的分子筛纯化过程获得了纯度大于90%的产物,且所有融合蛋白都被正确地形成及表达。

[0043] 在本发明的一些实施例中,融合蛋白与VEGF的结合能力通过ELISA试验得以验证,融合蛋白表现出与VEGF-A及VEGF-C的强结合能力。

[0044] 在本发明的一些实施例中,提供用于测试融合蛋白抑制VEGF-A或VEGF-C诱导的VEGFR2信号通路转录激活能力的测定方法;于另一实施例中,提供用于测试融合蛋白抑制VEGF-A和VEGF-C共同刺激人类脐静脉内皮细胞(HUVEC)增殖的能力的测定方法。通过这些

方法证明本发明的融合蛋白具有抑制VEGF-A和VEGF-C的生物学活性,并且抑制效果优于单体分子。于某一实施例中,提供了融合蛋白用于治疗激光诱导小鼠脉络膜新生血管(CNV)小鼠模型(湿性AMD模型)中的应用,本发明提供的融合蛋白具有比现有技术更优的疗效。

[0045] 在本发明的一些实施方式中,还提供包含本发明所述抗多个VEGF家族的重组蛋白的编码基因或表达盒的AAV病毒,以及通过AAV递送融合蛋白的编码基因用于治疗血管内皮生长因子(VEGF)相关疾病。AAV病毒可采用本领域已公开的标准方法制备,可参见《AAV Production Everywhere: A Simple, Fast, and Reliable Protocol for In-house AAV Vector Production Based on Chloroform Extraction》。

[0046] 复制缺陷重组AAV可通过三质粒共转细胞系而制备:所含的目标核酸序列的侧翼为两个AAV反向末端重复序列(ITR)区域的质粒,辅助包装质粒,和携带AAV衣壳化基因(rep和cap基因)的质粒,上述载体通过三质粒瞬时转染生产细胞包装成为AAV病毒。然后通过标准技术纯化所产生的AAV重组病毒。优选地,所述重组腺相关病毒为单链AAV。

[0047] 在本发明的一些实施例中,上述抗多个VEGF家族的重组蛋白优选在AAV病毒载体上进行表达,例如自身互补的AAV(scAAV),单链AAV(ssAAV),pAAV-CMV、pAAV-MCS等;优选地,所述AAV病毒载体为pAAV-MCS。

[0048] 在本发明的一些实施例中,将抗多个VEGF家族的重组蛋白的编码基因片段包装到病毒颗粒(例如,包括但不限于AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV14、AAV15、AAV16、AAV7m8、AAV PHP.eB等的AAV血清型病毒颗粒)中。因此,本公开包括含有本文所述的任何载体的重组病毒颗粒。优选地,所述重组腺相关病毒血清型是AAV2,AAV8。更优选地,所述重组腺相关病毒血清型是AAV8。

[0049] 本发明进行上述病毒组装采用的宿主细胞,用于AAV载体转导细胞表达抗多个VEGF家族的重组蛋白。优选地,所述宿主细胞为哺乳动物细胞(优选为人体来源的细胞,更优选为人视神经细胞或感光细胞),提高抗多个VEGF家族的重组蛋白的表达量,体现本发明的AAV载体分子的特异性表达。所述宿主细胞包括但不限于HeLa-S3,HEK-293,HEK-293T,HEK-293FT,Expi293F,A549和Sf9等细胞;在本发明的一些实施方案中,优选的宿主细胞为HEK 293、HEK-293T细胞或Expi293F细胞。

[0050] 在本发明的一些实施例中,本发明公开了以下重组病毒:AAV8-024。该重组病毒是AAV8血清型病毒,携带转基因的载体包含SEQ ID NO:4所述的序列,携带的转基因是VEGF受体2胞外结构域2和结构域3以及人IgG Fc段的编码基因。

[0051] 在本发明的一些实施例中,本发明公开了以下重组病毒:AAV8-027。该重组病毒是AAV8血清型病毒,携带转基因的载体包含SEQ ID NO:9所述的序列,携带的转基因是VEGF受体2胞外结构域2和结构域3、VEGF受体1胞外结构域2以及经过H90E工程化改造的人IgG Fc段的编码基因。

[0052] 本发明中构建的重组病毒适于在体内(in vivo)或体外(ex vivo)使用,优选地适于在血管新生相关眼底疾病患者的玻璃体、视网膜下腔或脉络膜上腔一次给药使用。相关眼部疾病包括年龄相关性黄斑变性、糖尿病性视网膜病变、糖尿病性视网膜水肿、糖尿病性黄斑水肿、视网膜后纤维化、视网膜中央闭塞、视网膜静脉阻塞、缺血性视网膜病变、高血压性视网膜病、眼色素层炎(例如,前、中、后或全葡萄膜炎)、白塞病、Bietti结晶样角膜视网膜营养不良、睑缘炎、开角型青光眼、新生血管性青光眼、角膜新生血管、脉络膜新生血管形

成(CNV)、视网膜下新生血管形成、角膜发炎及角膜移植并发症。其中年龄相关性黄斑变性包含湿性年龄相关性黄斑变性或干性年龄相关性黄斑变性。优选地,小鼠给药的安全有效量范围 1×10^6 - 1×10^{11} 病毒基因组/眼,NHP给药的安全有效量范围 1×10^8 - 1×10^{13} 病毒基因组/眼,人给药的安全有效量范围 1×10^8 - 1×10^{13} 病毒基因组/眼(病毒基因组,genomic copies,简称GC)。

[0053] 在本发明的一些实施方式中,本发明提供了包含本发明的多核苷酸或病毒载体或腺相关病毒的组合物。

[0054] 在本发明的一些实施方式中,本发明提供了包含本发明的多核苷酸或病毒载体或腺相关病毒的组合物的制备方法。

[0055] 在本发明的一些实施方式中,本发明提供了包含本发明的多核苷酸或病毒载体或腺相关病毒的组合物视网膜下腔的给药方式。

[0056] 在本发明的一些实施方式中,本发明提供了小鼠/NHP/人给药后观察的方法,包括荧光素眼底血管造影(FFA)和光学相干断层扫描(OCT)。

[0057] 以下结合具体实施例对本发明作进一步地解释说明。

[0058] 实施例1多功能性融合蛋白结构设计

本实施例中,构建了12种蛋白,其结构分别如下表1所示。其中:

R1D2表示VEGFR1受体domain 2,R2D3表示VEGFR2受体domain 3,R2D2D3表示VEGFR2受体domain 2-3,R3D1D2D3表示VDGFR3受体domain 1-3,(GGGGS)₄G表示GS linker,Fc为IgG1的Fc区域,mFc为经过工程化改造的IgG1 Fc区域(突变位点为H90E)。

[0059] 将以上蛋白结构(表1所示融合蛋白)的天然核苷酸序列作为编码基因(其中,在NCBI数据库中,VEGFR1核苷酸序列来源于NM_002019.4,VEGFR2核苷酸序列来源于NM_002253.4,VEGFR3核苷酸序列来源于NM_182925.5,Fc序列来源于AJ294730.1,(GGGGS)₄G的核苷酸序列为GGTGGCGGAGGCTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGTTCCGCGGAGGTGGGTCCGGA),并在5'端加入GCCGCCACC的kozak序列和*Gaussia luc*的信号肽序列,在前述序列5'端加入BamHI的酶切位点,在3'端加入XhoI的酶切位点,委托南京金斯瑞生物科技有限公司合成基因片段,并且通过BamHI和XhoI的酶切装入pCDNA3.1(+)载体中,该载体中含有的蛋白编码表达盒从5'到3'包含:CMV增强子-CMV启动子-kozak序列-*Gaussia luc*信号肽序列-编码抗多个VEGF家族的融合蛋白基因序列-bGH polyA序列。

[0060] 表1 融合蛋白结构设计

编号	结构	氨基酸序列 (SEQ ID NO.)
RRG004-001	R1D2-R2D3-Fc (aflibercept)	
RRG004-003	R3D1D2D3-Fc	
RRG004-024	R2D2D3-Fc	1
RRG004-025	R2D2D3-(GGGGS) ₄ G-Fc	2
RRG004-026	R2D2D3-R1D2-Fc	
RRG004-027	R2D2D3-(GGGGS) ₄ G-R1D2-mFc	8
RRG004-028	R2D2D3-(GGGGS) ₄ G-R1D2-Fc	3
RRG004-029	R1D2-Fc-(GGGGS) ₄ G-R2D2D3	
RRG004-031	R1D2-R2D2D3-Fc	
RRG004-032	R1D2-(GGGGS) ₄ G-R2D2D3-Fc	
RRG004-036	R1D2-Fc	
RRG004-064	R1D2-mFc	

[0061] 实施例2不同结构组成的多功能性融合蛋白的表达及纯化

将实施例1中制备的含蛋白编码基因的pCDNA3.1 (+) 载体(部分重组载体示例,如图1所示)中,按照转染试剂说明书的方法,采用PEI MAX转染试剂(购自翌圣生物)将质粒载体转入Expi293细胞中。细胞培养5天后收集上清,采用重组protein G亲和层析介质(购自金斯瑞)进行蛋白的初步分离和纯化。取3-5ml重组protein G填料装柱,用0.02M PBS 缓冲液(pH7.4)平衡,然后将细胞培养液上清缓慢上样,使蛋白与层析介质充分结合;使用PBS缓冲液清洗未发生结合的非特异性杂蛋白,最后用0.1M pH3.0甘氨酸缓冲液进行洗脱,洗脱液用pH9.0 Tris缓冲液调节pH值至中性。参考填料使用说明书,采用Superdex 200 prep grade凝胶过滤填料(购自Cytiva)进行精细纯化。纯化蛋白经Millipore Amicon Ultra-15 30kD超滤浓缩管浓缩,用GE PD-10 脱盐柱换液至20mM PBS缓冲液中(20mM sodium phosphate, 150mM NaCl, pH7.4)。经0.22 μ m滤膜过滤获得纯化的表1中的多功能融合蛋白,无菌分装,超低温保存。

[0062] 实施例3 不同结构组成对多功能性融合蛋白表达量的影响

用ELISA方法测定实施例2中质粒瞬转细胞培养上清中的蛋白表达量。用碳酸盐缓冲液稀释Anti-IgG Fc(购自Sigma)至200ng/mL,每孔100 μ L,2-8 $^{\circ}$ C包被过夜。次日,洗板后加入1%BSA封闭。用1%BSA稀释样品至0.5-32ng/mL范围内,每孔加入100 μ L标准曲线、质控样品和稀释后的待测样品,室温孵育1小时。洗板,加入1:4000稀释的HRP偶联羊抗人IgG Fc抗体(购自Sigma),室温孵育1小时。洗板,加入TMB显色,10分钟后终止反应,用酶标仪读取450nm OD值。用软件绘制标准曲线,计算待测样品浓度,根据分子量大小进行归一化处理。

[0063] 结果如图4所示:可见不同结构域的组合,以及相同结构域在蛋白中的不同位置,对于抗多个VEGF家族的融合蛋白表达均有较大影响。

[0064] 相比于RRG004-001,多功能性融合蛋白分子RRG004-024、025、026、027、028等都具有较高的瞬转表达水平。

[0065] 对比RRG004-028、029和032可以发现VEGFR2D2D3需要放在蛋白N端,否则会降低融合蛋白的表达水平。选取了部分蛋白进行蛋白结合实验。

[0066] 实施例4 不同结构组成对多功能性融合蛋白与VEGF-A结合活性的影响

考察多功能性融合蛋白分子与VEGF-A的结合活性,用碳酸盐缓冲液稀释VEGF-A

(购自R&D systems)至200ng/mL,每孔100 μ L,2-8 $^{\circ}$ C包被过夜。次日,洗板后加入1%BSA封闭。用1%BSA稀释样品,样品为实施例2培养获得的细胞上清,各样品从20nM开始稀释,3倍比梯度稀释至0.00034nM,封闭结束后洗板,每孔加入100 μ L稀释后的待测样品,室温孵育1小时。洗板,加入1:4000稀释的HRP偶联羊抗人IgG Fc抗体(购自Sigma),室温孵育1小时。洗板,加入TMB显色,10分钟后终止反应,用酶标仪读取450nm OD值。最后用四参数回归模式进行曲线拟合,计算各样品结合活性 EC_{50} 。

[0067] 与VEGF-A结合的活性经过与RRG004-001对比后结果如表2所示,结果表明:

融合蛋白分子RRG004-024、025、027、028均有较强的结合VEGF-A的能力。

表2细胞上清中融合蛋白与VEGF-A结合活性

编号	结构	VEGF-A binding%	结合活性 EC_{50} (nM)
RRG004-001	R1D2-R2D3-Fc (afibercept)	100	0.102
RRG004-024	R2D2D3-Fc	145.5	0.070
RRG004-025	R2D2D3-(GGGGS) ₄ G-Fc	118.4	0.086
RRG004-027	R2D2D3-(GGGGS) ₄ G-R1D2-mFc	140.4	0.073
RRG004-028	R2D2D3-(GGGGS) ₄ G-R1D2-Fc	128.7	0.079
RRG004-036	R1D2-Fc	119.6	0.085
RRG004-064	R1D2-mFc	115.5	0.088

[0068] 实施例5不同结构组成对多功能性融合蛋白与VEGF-C结合活性的影响

与实施例4中的方法相似,将结合底物替换为VEGF-C蛋白。以RRG004-003蛋白作为对照,结果如表3所示。结果表明:

与RRG004-003相比,含有VEGFR2D2D3结构域的RRG004-024、025、027、028结合VEGF-C的活性显著提高。

表3细胞上清中融合蛋白与VEGF-C结合活性

编号	结构	VEGF-C binding%	结合活性 EC_{50} (nM)
RRG004-003	R3D1D2D3-Fc	100	0.813
RRG004-024	R2D2D3-Fc	178.0	0.457
RRG004-025	R2D2D3-(GGGGS) ₄ G-Fc	204.1	0.398
RRG004-027	R2D2D3-(GGGGS) ₄ G-R1D2-mFc	239.5	0.339
RRG004-028	R2D2D3-(GGGGS) ₄ G-R1D2-Fc	198.3	0.410

[0069] 实施例6不同结构组成对纯化后多功能性融合蛋白抑制VEGFR2信号通路的影响

我们验证了纯化后的融合蛋白对于VEGFR2信号通路的抑制实验,使用VEGFR2-luciferase作为检测细胞(南京科佰,C1C42)加入10ng/mL的VEGF-A或100ng/mL的VEGF-C之后再加入梯度稀释的融合蛋白药物,对于荧光信号的抑制如图5、图6及表4所示。

[0070] 结果表明:RRG004-024、025、027、028均能抑制VEGF-A或VEGF-C诱导的VEGFR2信号通路激活。RRG004-027、028对VEGF-A或C的抑制活性均强于现有技术RRG004-001及RRG004-003。

[0071] 表4融合蛋白抑制VEGFR2信号通路活性

编号	抑制VEGF-A IC50 (nM)	抑制VEGF-C IC50 (nM)
RRG004-001	0.082	NA
RRG004-003	NA	1.128
RRG004-024	0.087	0.685
RRG004-025	0.132	0.699
RRG004-027	0.061	0.638
RRG004-028	0.072	0.663
RRG004-064	0.086	NA

[0072] 实施例7 不同结构组成对多功能性融合蛋白抑制VEGF-A/C共刺激HUVEC细胞增殖活性的影响

考察融合蛋白分子抑制VEGF-A/VEGF-C共同刺激HUVEC细胞增殖的生物学活性是否会受到影响。在96孔细胞培养板中每孔接种 6×10^3 个HUVEC细胞(购自Promcell),贴壁过夜。次日,用DMEM+2%FBS培养基稀释液稀释VEGF165-A至200 ng/mL,VEGF-C至100 ng/ml,并加入多功能融合蛋白终浓度为20nM,该步骤得到VEGFA+C-融合蛋白混合液。吸去细胞孔中原培养液,每孔加入100 μ L VEGFA+C-融合蛋白混合液,注意不要使用边缘孔。将处理后的细胞置于37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养箱中培养,96h后取出细胞板,每孔加入10 μ L CCK-8显色液(购自Dojindo);放置于37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养箱中孵育3h,用酶标仪读取450nm OD值。最后以不加入融合蛋白组为对照计算融合蛋白对于HUVEC细胞抑制率。结果如图7所示:

结果表明,多功能融合蛋白RRG004-024、025、027和028对于细胞生长的抑制均高于现有技术RRG004-001及RRG004-003。RRG004-025、027和028对于细胞生长的抑制强于RRG004-001与RRG004-003的联合使用(20nM RRG004-001+ 20nM RRG004-003)抑制效果。

[0073] 实施例8 Fc工程化改造对多功能性融合蛋白眼部药代动力学的影响

考察Fc H90E工程化改造的RRG004-027与对照RRG004-028在兔双眼玻璃体单次注射给药后眼部组织中的PK行为和入血情况。

[0074] 选择2.5kg~3.5kg双眼检查无异常的新西兰兔入组,每组21只新西兰兔。新西兰兔经戊巴比妥钠麻醉后,用聚维酮碘溶液消毒待注射眼,于待注射眼滴1~2滴盐酸奥布卡因滴眼液进行表面麻醉后,双眼均按50 μ L/眼的体积经眼玻璃体分别注射给予1mg/眼融合蛋白。

[0075] 玻璃体注射后,各组兔双眼均加约1~2滴氧氟沙星眼膏以保持角膜湿润及抗感染。给药后1h-672h,设置不同时间点取眼组织,分离视网膜/脉络膜丛、房水和玻璃体,组织匀浆取上清;并且采集静脉血液样本;用ELISA方法检测眼组织和血清中的蛋白浓度。

[0076] 玻璃体、房水和视网膜脉络膜丛3种组织样本,以每组动物浓度均值对时间点绘制药时曲线,采用一房室模型进行PK分析,结果见表5。比较各蛋白的消除半衰期 $t_{1/2}$ 和暴露量药时曲线下面积AUC_{0-t}, RRG004-027半衰期 $t_{1/2}$ 为RRG004-028的1.23-1.40倍,暴露量AUC为RRG004-028的1.15-1.46倍。

[0077] 以血清样本浓度均值对时间点绘制药时曲线,采用非房室模型计算各融合蛋白经眼部入血后的药物暴露量AUC(见表6),RRG004-027的平均AUC较RRG004-028降低58.6%。

[0078] 表5 融合蛋白各眼部组织PK参数(一房室模型)

PK参数		t _{1/2} (h)	AUC _{0-t} (μg/ml*h)
玻璃体	RRG004-027	142.9	196656.8
	RRG004-028	104.1	135154.6
房水	RRG004-027	129.5	13525.8
	RRG004-028	104.9	10934.5
视网膜脉络膜丛	RRG004-027	109.1	4610.5
	RRG004-028	78.2	4023.6

[0079] 表6 融合蛋白血清暴露量AUC(非房室模型)

供试品	RRG004-027	RRG004-028
血清平均AUC _{0-t} (ng/ml*h)	7388.6	17843.7

[0080] 实施例9多功能性融合蛋白抑制激光诱导小鼠CNV模型

采购约2月龄SPF级C57BL/6J雄性小鼠,在实验室饲养3-5天。造模前,使用舒泰(25-50 mg/kg, i.p.)和盐酸赛拉嗪(5 mg/kg, i.p.)注射液麻醉动物,检眼镜检查眼底有无异常,挑选正常动物入组;双眼造模,使用YAG激光光凝仪(VITRA, Quantel Medical)在距离视盘1-1.5PD处围绕视乳头光凝3点(波长532 nm, 250 mw, 50 μm, 100 ms),激光斑位置避开视网膜大血管和注射点。造模后第3天,通过玻璃体腔(IVT)注射2μl PBS(vehicle)或0.15mM RRG004-001、025、027、064。给药后第10天,进行荧光素钠眼底血管造影(FFA)检查,评价脉络膜新生血管(CNV)渗漏面积。

[0081] 结果如表7所示,相对于PBS组,RRG004-025和RRG004-027在该剂量下均能显著抑制CNV渗漏面积,而RRG004-001或RRG004-064观察到了部分抑制,但未见统计学差异。

[0082] 表7 融合蛋白抑制小鼠CNV渗漏面积

组	动物数	眼睛数	平均激光斑渗漏面积 (mm ²)
PBS	6	12	3.93 ± 1.11
RRG004-025	6	12	1.31 ± 0.61*
RRG004-027	6	12	1.20 ± 0.36*
RRG004-001	6	12	1.72 ± 0.54
RRG004-064	6	12	1.79 ± 0.83

[0083] 注:*P<0.05,单因素方差分析,Mean ± SEM。

[0084] 实施例10 具有不同表达调节元件的多核苷酸表达盒对蛋白表达能力的影响

将实施例1中构建的表达RRG004-027的pCDNA3.1(+)重组载体,经BamHI和XhoI酶切,并将pAAV-CMS质粒经BamHI和XhoI酶切,使用T4连接酶连接。并按照常规的分子克隆方法使用氨苄抗性筛选,获得pAAV-RRG004-027(如表8中C01所示,见图2)重组质粒。

[0085] 以下以pAAV-RRG004-027(C01)为基准,按照表8所示对C01上的部分表达元件进行优化,获得C02-C12的重组质粒。具体方法如下:

对于027分子来说,按照表8中提供的表达盒的序列,合成从增强子到027分子Bsu36I酶切位点(Bsu36I酶切位点位于信号肽中)这之间的一段序列,并在5'端加入MluI的酶切位点。对C01及上述合成的片段进行MluI及Bsu36I酶切,使用T4连接酶连接。并按照常规的分子克隆方法使用氨苄抗性筛选,获得C02-C12的部分或全部序列。

[0086] C12, 的WPRES为XhoI 单酶切同源重组改造。C10和C11的SV40 late polyA及HSV TK polyA为XhoI和BstEII酶切改造。

[0087] 表8 不同表达调控元件的多核苷酸表达盒5' -3'

重组质粒编号	增强子	启动子	内含子/5' UTR	kozak	信号肽	目的基因	RNA输出信号	polyA	第二启动子
C01	CMV	CMV	human β -globin intron	kozak	<i>Gaussia luc</i>	RRG004-027	/	bGH	/
C02	CMV	CBA	truncated SV40 late 16S intron	kozak	<i>Gaussia luc</i>	RRG004-027	/	bGH	/
C03	CMV	CBA	Chimeric intron	kozak	<i>Gaussia luc</i>	RRG004-027	/	bGH	/
C04	CMV	CBA	rabbit β -globin	kozak	<i>Gaussia luc</i>	RRG004-027	/	bGH	/
C05	CMV	CBA	MVM intron-1(67-97bp)	kozak	<i>Gaussia luc</i>	RRG004-027	/	bGH	/
C06	/	NA65p	/	kozak	<i>Gaussia luc</i>	RRG004-027	/	bGH	/
C07	/	hGRK1	/	kozak	<i>Gaussia luc</i>	RRG004-027	/	bGH	/
C08	CMV	CMV	human β -globin intron	kozak	Human OSM	RRG004-027	/	bGH	/
C09	CMV	CMV	human β -globin intron	kozak	Human IL-2	RRG004-027	/	bGH	/
C10	CMV	CMV	human β -globin intron	kozak	<i>Gaussia luc</i>	RRG004-027	/	SV40 late	/
C11	CMV	CMV	human β -globin intron	kozak	<i>Gaussia luc</i>	RRG004-027	/	HSV TK	/
C12	CMV	CMV	ActB 5' UTR-HBB 2 nd intron	kozak	<i>Gaussia luc</i>	RRG004-027	WPRES	bGH	/

[0088] 表8中不同表达调节元件的核苷酸序列如下：

CMV增强子:CGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCA TTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTT ACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTA AATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTC ATCGCTATTACCATG

CMV启动子:

GTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTACTCACGGGATTTCCAAGTCTC CACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTTGGCACAAAATCAACGGGACTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGC CCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGA TC

CBA启动子:TCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCC AATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTTGTGACGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGGCCAGGCG GGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGGCTCCGA AAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGGCGGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGGGCGGGCG

NA65p启动子:AGATCTTCGAAATACTCTCAGAGTGCCAAACATATACCAATGGACAAGAAGGTGAG GCAGAGAGCAGACAGGCATTAGTGACAAGCAAAGATATGCAGAATTTCACTCTCAGCAAATCAAAGTCTCAACCT GGTTGGAAGAATATTGGCACTGAATGGTATCAATAAGTTGCTAGAGAGGGTTAGAGGTGCACAATGTGCTTCCATA ACATTTTATACTTCTCCAATCTTAGCACTAATCAAACATGGTTGAATACTTTGTTTACTATAACTCTTACAGAGTTA TAAGATCTGTGAAGACAGGGACAGGGACAATACCCATCTCTGTCTGGTTCATAGGTGGTATGTAATAGATATTTTAA AAAATAAGTGAGTTAATGAATGAGGGTGAGAATGAAGGCACAGAGGTATTAGGGGGAGGTGGGCCCCAGAGAATGGT GCCAAGGTCCAGTGGGGTGACTGGGATCAGCTCAGGCCTGACGCTGGCCACTCCACCTAGCTCCTTTCTTTCTAAT CTGTTCTCATTCTCCTTGGGAAGGATTGAGGTCTCTGAAAACAGCCAAACAACCTGTTATGGGAACAGCAAGCCCAA ATAAAGCCAAGCATCAGGGGATCTGAGAGCTGAAAGCAACTTCTGTTCCCCCTCCCTCAGCTGAAGGGGTGGGGAA GGGCTCCCAAAGCCATAACTCCTTTTAAAGGGATTTAGAAGGCATAAAAAGGCCCTGGCTGAGAATTCCTTCTTCA

TTCTGCAGTTGG

hGRK1启动子:

GGGCCCCAGAAGCCTGGTGGTTGTTTGCCTTCTCAGGGGAAAAGTGAGGCGGCCCTTGGAGGAAGGG
GCCGGGCAGAATGATCTAATCGGATTCCAAGCAGCTCAGGGGATTGTCTTTTTCTAGCACCTTCTTGCCACTCCTAA
GCGTCCTCCGTGACCCCGGCTGGGATTTAGCCTGGTGCTGTGTCAGCCCCGGGCTCCAGGGGCTTCCAGTGGTCC
CCAGGGAACCTCGACAGGGCCAGGGCGTCTCTCTCGTCCAGCAAGGGCAGGGACGGGCCACAGGCAAGGGC

human β -globin intron:

CGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGG
GACCGATCCAGCCTCCGCGGATTGGAATCCCGGCCGGGAACGGTGCATTGGAACGCGGATTCCCCGTGCCAAGAGTG
ACGTAAGTACCGCCTATAGAGTCTATAGGCCACAAAAAATGCTTCTTCTTTAATACTTTTTGTTTATCTTA
TTTCTAATACTTTCCCTAATCTCTTTCTTTCAGGGCAATAATGATACAATGTATCATGCCTCTTTCACCATTCTAA
AGAATAACAGTGATAATTTCTGGGTAAAGCAATAGCAATATTTCTGCATATAAATATTTCTGCATATAAATTGTAA
CTGATGTAAGAGGTTTCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCATTCTGCTTTTTATTTATGGTTGGGATA
AGGCTGGATTATTCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTTTGCTAATCATGTTACCTCTTATCTTCCCTCCACAGCTCC
TGGGCAACGTGCTGGTCTGTGTGCTGGCCATCACTTTGGCAAAGAATTGGGATTGGAACATCGATTGAATTCATCC
TCTAGA

truncated SV40 late 16S intron:

AACTGAAAACCAGAAAGTTAACTGGTAAGTTTAGTCTTTTTGTCTTTTATTTACAGGTCCCGGATCCGG
TGGTGGTGCAAATCAAAGAACTGCTCCTCAGTGGATGTTGCCTTACTTCTAGGCCTGTACGGAAGTGTTACTTCTG
CTCTAAAAGCTGCGGAATTGTACCCGCCCGGGATCC

chimeric intron:

GTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTAATGACGGCTTGTCTTCT
TTTCTGTGGCTGCGTGAAAACCTTGAGGGGCTCCGGGAGGGCCCTTGTGCGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTG
CGTGTGTGTGTGCGTGGGAGCGCCGCTGCGGCTCCGCGCTGCCGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGG
GGCTTTGTGCGCTCCGAGTGTGCGGAGGGGAGCGCGGCCGGGGCGGTGCCCGCGGTGCGGGGGGGGCTGCGAG
GGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGTGTGGGCGCGTCCGTCGGGCTGCAACC
CCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTACGGGGCGTGGCGCGG
GGCTCGCCGTGCCGGCGGGGGGTGGCGGCAGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCCTCGGGCCGGGGAGGGC
TCGGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCCCGAGCGCCGGCGGCTGTGAGGCGCGGCGAGCCGAGCCATTGCCTTTTATG
GTAATCGTGCAGAGGGGCGAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCA
CCCCCTTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCCG
CCGCGCCGCGTCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGACGGGG
CAGGGCGGGGTTCCGGCTTCTGGCGTGTGACCGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTT
TCCTACAG

rabbit β -globin intron:

GTGAGTTTGGGACCCCTTGATTGTTCTTTCTTTTCGCTATTGTAATAATTCATGTTATATGGAGGGGGC
AAAGTTTTAGGGTGTGTTTGTAGAAATGGGAAGATGCCCTGTATACCATGGACCCTCATGATAATTTGTTTCTT
TCACTTTCTACTCTGTTGACAACCATGTCTCCTCTATTTTCTTTTCACTTTTCTGTAACCTTTTTCGTTAAACTTTA
GCTTGCATTTGTAACGAATTTTTAAATTCATTTTGTATTATTGTCAGATTGTAAGTACTTTCTCTAATCACTTTTT

TTTCAAGGCAATCAGGGTATATTATATTGTA CTT CAGCACAGTTTTAGAGAACAATTGTTATAATTA AATGATAAGG
TAGAATATTTCTGCATATAAAATCTGGCTGGCGTGAAAATATTCTTATTGGTAGAAAACA ACTACATCCTGGTCATCA
TCCTGCCTTTCTCTTTATGGTTACAATGATATACTGTTTGAGATGAGGATAAAATACTCTGAGTCCAAACCGGGC
CCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTACAG

MVM intron-1 intron:

AAGAGGTAAGGGTTTAAGGGATGGTTGGTTGGTGGGGTATTAATGTTTAATTACCTGGAGCACCTGCCT
GAAATCACTTTTTTTCAGGTTGG

Gaussia luc 信号肽:

ATGGGCGTGAAGGTGCTGTTCCGCCCTGATCTGTATCGCCGTGGCCGAGGCC

Human OSM 信号肽:

ATGGGGTACTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCCTTGCACTCCTGTTTCCAAGCATGGCG
AGCATG

Human IL-2 信号肽:

ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCATTGCACTAAGTCTTGCATTGTCACAAACAGT

bGH polyA:

CTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTG
CCTACTCCACTGTCTTTTCTAATAAAAATGAGGAAATGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGG
GGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTAT
GG

SV40 late polyA:

AACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAAATAAGCAATAGCATCACAAATTCACAAATAAAGCA
TTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTA

HSV TK polyA:

ATGACGGCAATAAAAAGACAGAATAAAAACCCACGGGTGTTGGGTCGTTTGTTCATAAACGCGGGGTTTCG
GT

Kozak:

GCCGCCACC

ActB 5' UTR:

ACCGCCGAGACCGGTCCGCCCGGAGCACAGAGCCTCGCCTTTGCCGATCCGCCGCCCGTCCACACC
CGCCGCCAG

HBB 2nd intron:

GTGAGTCTATGGGACGCTTGATGTTTTCTTTCCCTTCTTTTCTATGGTTAAGTTCATGTCATAGGAAG
GGGATAAGTAACAGGGTACAGTTTAGAATGGGAAACAGACGAATGATTGCATCAGTGTGGAAGTCTCAGGATCGTTT
TAGTTTCTTTTATTTGCTGTTCAACAATTGTTTTCTTTGTTAATTCTTGCTTTCTTTTTTTTTTCTTCTCCGCA
ATTTTTACTATTATACTTAATGCCTTAACATTGTGTATAACAAAAGGAAATATCTCTGAGATACATTAAGTAACTTA
AAAAAAAACCTTACACAGTCTGCCTAGTACATTACTATTTGGAATATATGTGTGCTATTTGCATATTCATAATCTC
CCTACTTTATTTTCTTTTATTTTAAATTGATACATAATCATTATACATATTTATGGGTAAAGTGAATGTTTTAAT
ATGTGTACACATATTGACCAAATCAGGGTAATTTGCATTTGTAATTTAAAAAATGCTTTCTTCTTTAATATACT
TTTTTGTTTATCTTATTTCTAATACTTTCCCTAATCTTTCTTTTTCAGGGCAATAATGATACAATGTATCATGCCTC

TTTGCACCATTCTAAAGAATAACAGTGATAATTTCTGGGTTAAGGCAATAGCAATATCTCTGCATATAAATATTTCT
GCATATAAATTGTAAGTATGTAAGAGTTTCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCATTCTGCTTTTAT
TTTATGGTTGGGATAAGGCTGGATTATTCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTTTTGCTAATCATGTTTCATACCTCTTATCT
TCCTCCCACAG

HBB 5' UTR:

ACTCTTCTGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAACCC

arti HBB 5' UTR:

TCGTTTACTAGTATCGTATCCGTGTTAACTGTCAGTCTTCTCATTGAAG

arti ActB 5' UTR:

ACCGCATAGACCGCGTAAGCACCGTGAACACTGTGTTTCGCATTATCCGATACGCAGACCGCAAATTC
CACAGTCACGCAACC

CMV 5' UTR:

TCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTGGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCT
CCGCGGATTCGAATCCCGGCCGGGAACGGTGCATTGGAACGCGGATCCCCGTGCCAAGAGTGACGTAAGTACCGCC
TATAGAGTCTATAG

exin21:

CAACCGCGGTTTCGCGGCCGCT

WPRE:

AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACG
CTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTA
TAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTG
CTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCT
ATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCTGCCTTGCCCGTGCCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTC
CGTGGTGTGTCGGGGAAGCTGACGTCCTTTCCATGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGT
CCTTCTGCTACGTCCTTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGCCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTT
CCGCGTCTTCGCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCTCCCCG

HBB 1st INTRON:

GTTGGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACCAATAGAACTGGGCATGTGGAGACAGAGAAGA
CTCTTGGGTTTCTGATAGGCACTGACTCTCTCTGCCTATTGGTCTATTTTCCCACCCTTAG

HBB 3' UTR:

GCTCGCTTTCTTGCTGTCCAATTTCTATTAAGGTTCCCTTGTCCCTAAGTCCAATACTAACTGGG
GGATATTATGAAGGGCCTTGAGCATCTGGATTCTGCCTAATAAAAAACATTTATTTTCATTGCAA

AES-mtRNR1 3' UTR:

CAAGCACGCAGCAATGCAGCTCAAAACGCTTAGCCTAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGTGATTAA
CCTTTAGCAATAAACGAAAGTTTAACTAAGCTATACTAACCCAGGGTTGGTCAATTTTCGTGCCAGCCACACCCTGG
TACTGCATGCACGCAATGCTAGCTGCCCTTTCCCGTCTGGGTACCCCGAGTCTCCCCGACCTCGGGTCCCAGGT
ATGCTCCACCTCCACCTGCCCCACTCACCACCTCTGCTAGTTCAGACACCTCC

将ARPE-19细胞(购自ATCC)按照1E6/孔接种至6孔板中,置于37℃,5% CO₂培养箱中过夜。次日,采用PEI MAX转染试剂(购自翌圣生物)将1μg上述构建的C01-C12的AAV质粒

载体分别转入ARPE-19细胞中。细胞培养4天后收集上清,采用实施例3的方法检测细胞培养上清中的蛋白表达量。如表9所示,结果表明采用C12表达盒中的调节元件组合,可以提高目标蛋白表达水平,并且远高于其他表达元件组合获得的表达量,属于预料不到的技术效果。C12的载体图谱如图3所示。

[0089] 其中,包含CMV增强子-CMV启动子-ActB 5' UTR-HBB 2nd intron-kozak-Gaussia luc信号肽-RRG004-027-WPRE-bGH polyA表达盒如序列SEQ ID NO.10所示。

[0090] 表9 不同核苷酸表达盒的蛋白表达能力

表达盒编号	蛋白表达浓度(ng/ml)
C01	860.2
C02	212.5
C03	101.3
C04	10.8
C05	441.6
C06	8.7
C07	6.4
C08	795.7
C09	643.5
C10	437.1
C11	293.8
C12	1771.4

[0091] 实施例11 携带目标蛋白表达盒的AAV8病毒制备

采用三质粒共转染VPC2.0细胞的方法包装AAV病毒,其中的三质粒分别是辅助包装质粒、AAV8 rep-cap质粒、以及各转基因质粒GOI(含目标蛋白表达盒的AAV载体)。

[0092] 按照实施例10的方法,将含RRG004-001、024、027、064等目标蛋白的表达盒插入pAAV-MCS载体中,构建GOI质粒,表达调节元件采用C12中相应元件,仅替换目标蛋白即可。将构建好的GOI质粒、AAV8 rep-cap质粒和pHelper辅助质粒需经过大量抽提,浓度大于1 μ g/ μ L,A260/280 在1.8-2.0 间用以包装病毒。无血清悬浮培养VPC2.0细胞至细胞密度为1E+6 cells/ml。将抽提的三质粒按摩尔比1:1:1的比例混合,再把质粒DNA按总质量与PEIpro转染试剂按1:2的质量比例进行混匀,室温孵育20分钟后缓慢加到细胞悬液(细胞与三质粒的比例为1mL:1 μ g)中混匀。放37 $^{\circ}$ C,8% CO₂摇床培养3天,收集细胞悬液。

[0093] 将细胞悬液10,000 g 离心10min,所得离心上清转移到一个新离心管中,所得细胞沉淀用少量PBS溶液重悬后反复冻融法裂解细胞;冻融后细胞再10,000 g 离心10min,收集离心所得上清。将两次离心收集的上清混合在一起,用 0.45 μ m 滤器过滤除杂质。加入1/2 体积的 1M NaCl,10% PEG8000 溶液,混合均匀,4度过夜。12,000 rpm 离心 2h,弃上清,病毒沉淀用适量的 PBS 溶液溶解,待完全溶解后用 0.22 μ m 滤器过滤除菌。加入Benzonase 核酸酶消化去除残留的质粒DNA(终浓度为50 U/ml)。合上管盖,颠倒几次以充分混合。在37 $^{\circ}$ C孵育30 分钟;用 0.45 μ m 针头滤器过滤,取滤出液,即为浓缩的AAV病毒。

[0094] 向病毒浓缩液中添加固体 CsCl 直到密度为1.41 g/ml(折射率为1.372);将样品加入到超速离心管中,用预先配好的 1.41 g/ml CsCl 溶液将离心管剩余空间填满;在175,000 g 下离心24 小时,以形成密度梯度。按顺序分步收集不同密度的样品,取样进行

滴度测定。收集富集有AAV 颗粒的组分。

[0095] 重复上述过程一次。将病毒装入100 kDa的透析袋,4度透析脱盐过夜,透析缓冲液成分为含0.001% Pluronic F68的PBS,pH7.2。收获的透析后样品即为纯化的AAV病毒,可用于体内药效验证。

[0096] 本发明使用的AAV病毒均采用上述方法进行制备,包装不同GOI质粒,即可制备携带不同目的基因的AAV,如AAV8-001、AAV8-024、AAV8-027或AAV8-064等。

[0097] 实施例12 携带目标基因的AAV8病毒抑制激光诱导小鼠CNV模型

采购约2月龄SPF级C57BL/6J雄性小鼠,在实验室饲养3-5天。分组前,对动物进行一般眼科检查,筛选合格的动物用于试验,通过视网膜下腔注射,分别给予PBS、AAV8-024、AAV8-027或AAV8-064,给药剂量为1E8vg/眼。注射后每天涂硫酸阿托品眼用凝胶和妥布霉素地塞米松眼膏,每天 3 次,连续 4 天。不同药膏给药间隔 10 min 以上。

[0098] 给药后10天,进行眼底血管荧光造影(FFA),筛选双眼无异常的动物。在给药后2周,使用YAG激光光凝仪(VITRA,Quantel Medical)在距离视盘 1-1.5PD 处围绕视乳头光凝 3点(波长 532nm,250mw,50 μ m,100ms)进行造模。

[0099] 在激光造模后7天和14天,进行FFA检测,量化统计FFA渗漏面积。

[0100] 如表10所示,结果表明,多功能融合蛋白AAV可以显著抑制CNV光斑渗漏, AAV8-024、AAV8-027优于现有技术AAV8-001。

[0101] 表10 携带融合蛋白基因的AAV8抑制小鼠CNV渗漏面积

组别	动物数	眼睛数	CNV渗漏总面积 (mm ²)	
			Day7	Day14
PBS	5	10	9.68 \pm 3.96	7.64 \pm 6.64
AAV8-001	5	10	5.39 \pm 5.76*	2.43 \pm 2.96*
AAV8-024	5	10	3.37 \pm 3.01**	2.42 \pm 2.84*
AAV8-027	5	10	3.04 \pm 3.21**	1.79 \pm 2.83**
AAV8-064	5	10	6.65 \pm 4.68	2.58 \pm 3.07*

[0102] 注:*P<0.05,**P<0.01,(采用单因素方差分析)。

[0103] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但不能因此而理解为对专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本专利构思的前提下,上述各实施方式还可以做出若干变形、组合和改进,这些都属于本专利的保护范围。因此,本专利的保护范围应以权利要求为准。

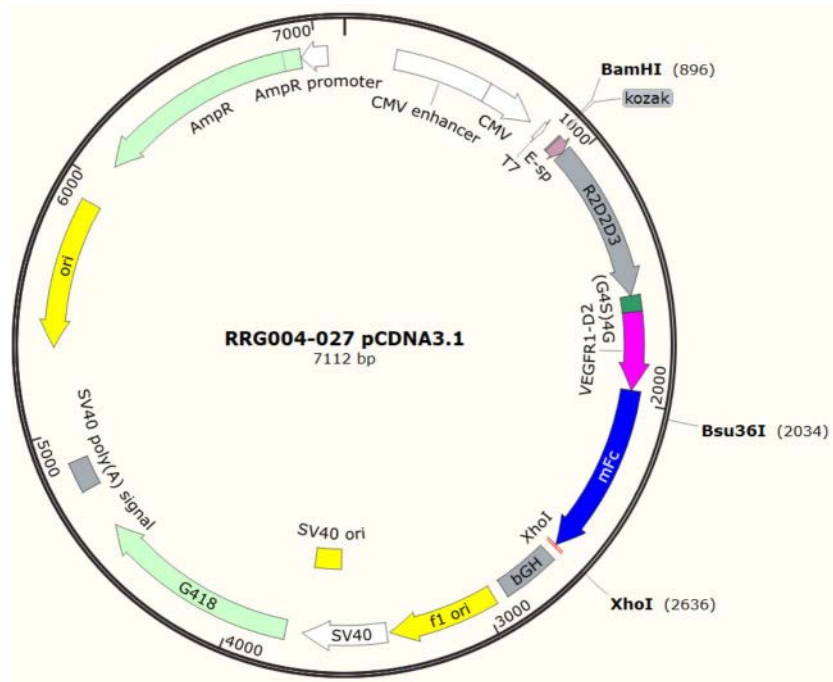


图1

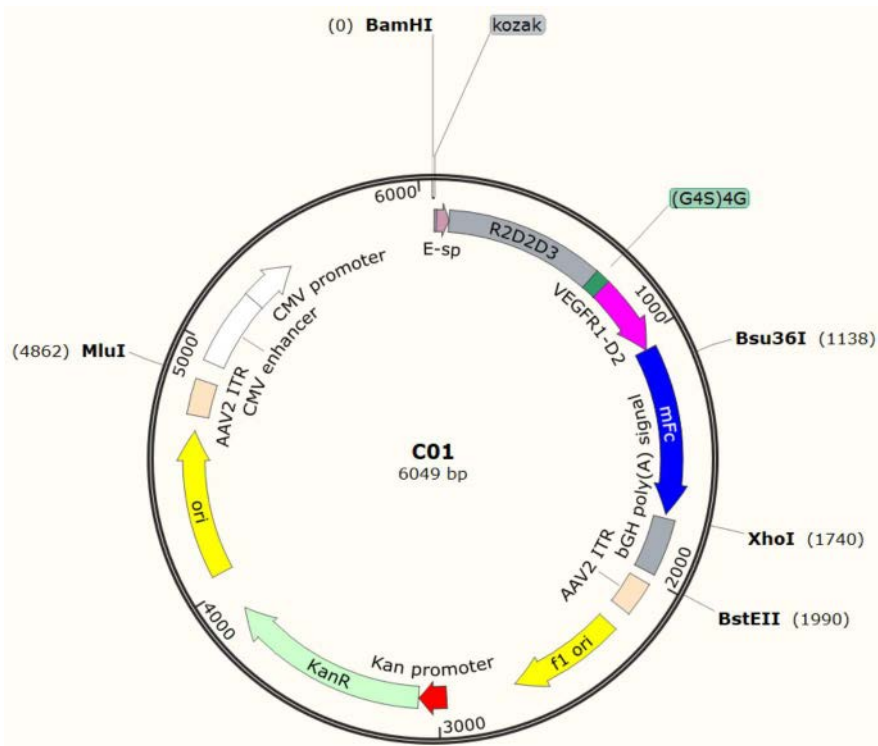


图2

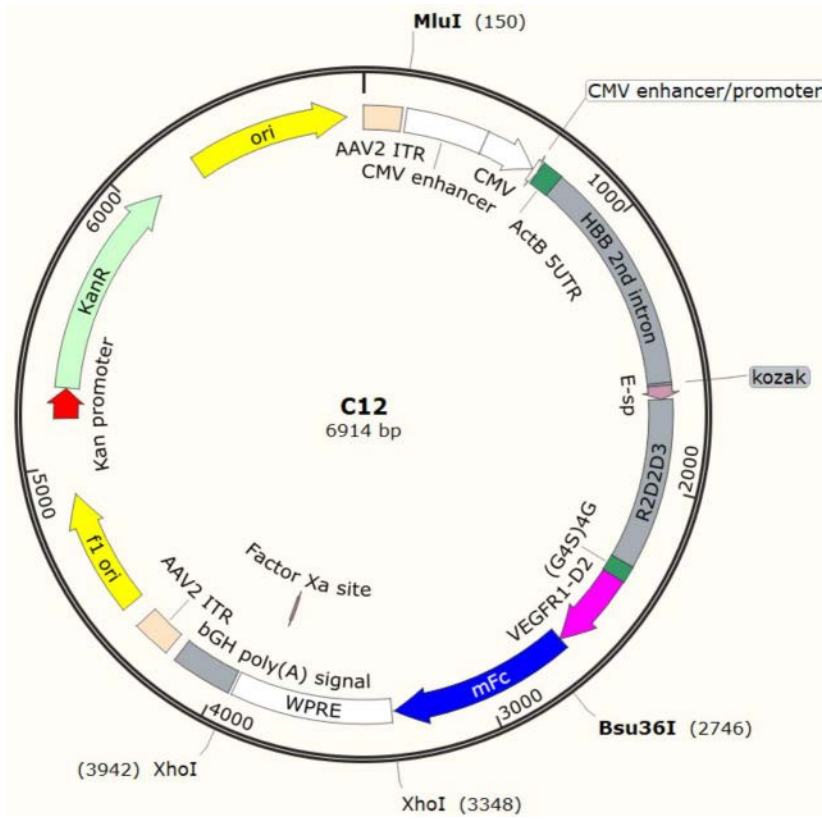


图3

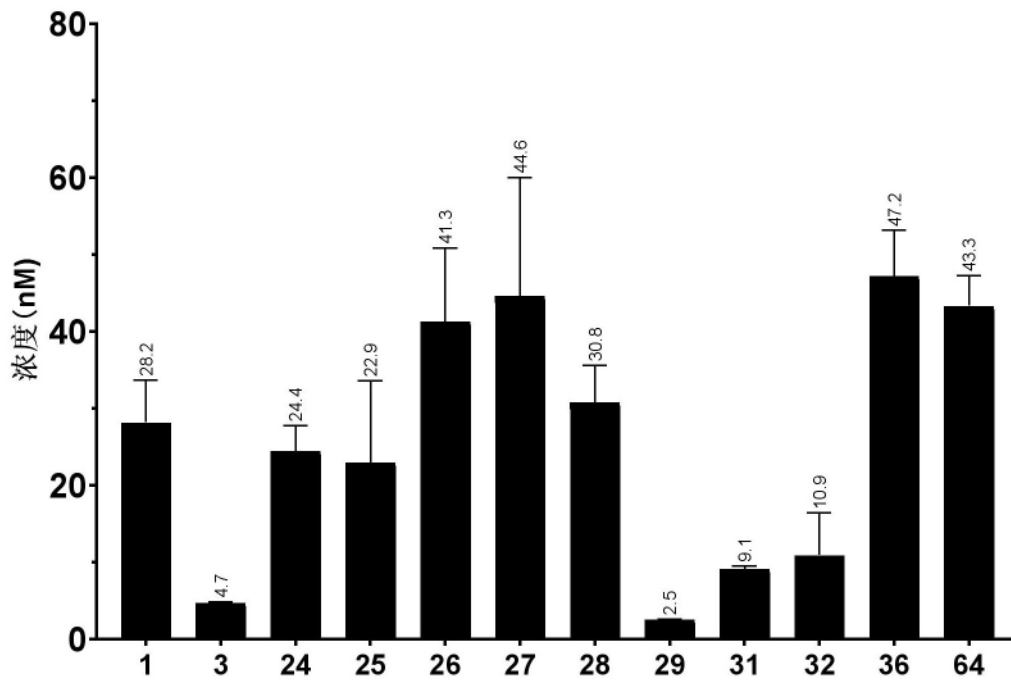


图4

融合蛋白对于VEGF-A的抑制

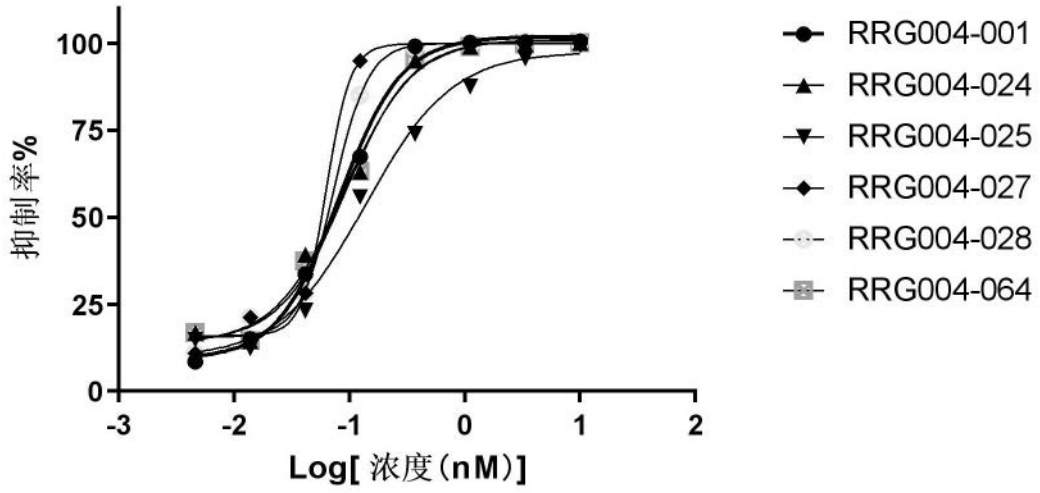


图5

融合蛋白对于VEGF-C的抑制

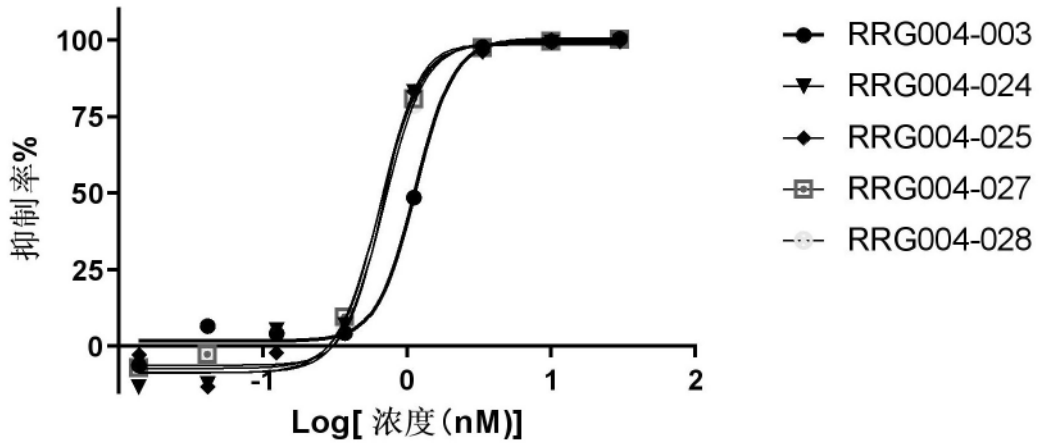


图6

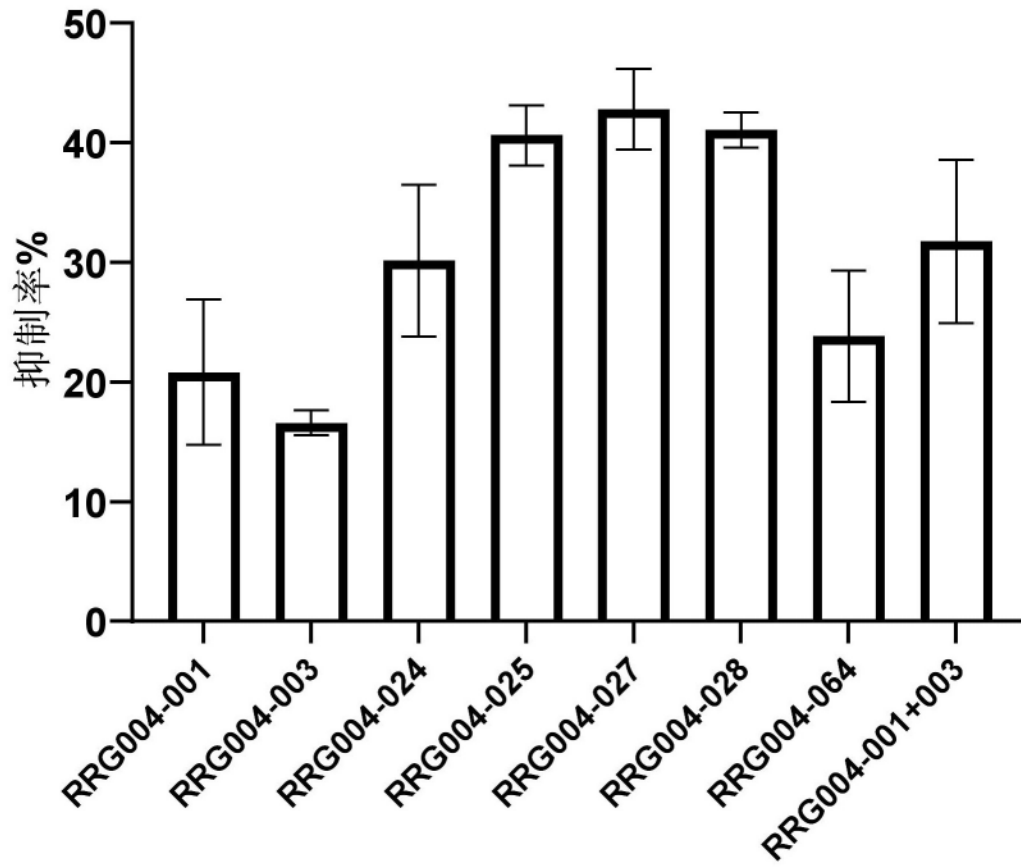


图7