



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110003328 A

(43)申请公布日 2019.07.12

(21)申请号 201810011151.5

G01N 33/53(2006.01)

(22)申请日 2018.01.05

G01N 33/68(2006.01)

(71)申请人 百奥泰生物制药股份有限公司

地址 510530 广东省广州市广州高新技术产业开发区科学城开源大道11号A6栋第五层

(72)发明人 吴晓云 徐臣超 王志刚 李胜峰

(74)专利代理机构 北京市万慧达律师事务所 11111

代理人 谢敏楠

(51)Int.Cl.

C07K 16/22(2006.01)

C12N 15/13(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 27/02(2006.01)

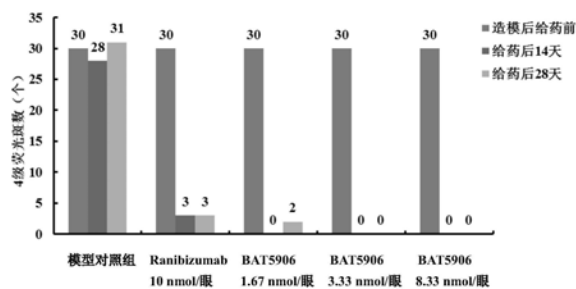
权利要求书1页 说明书14页
序列表3页 附图5页

(54)发明名称

一种长效低毒的重组抗VEGF人源化单克隆抗体及其生产方法

(57)摘要

本发明涉及一种可特异性结合VEGF的全长人源化单克隆抗体。所述的抗体可抑制VEGF与VEGFR-1和VEGFR-2的结合,从而抑制VEGF的信号传导。所述的抗体对VEGF具有很强的亲和力且半衰期较长,玻璃体注射后安全性较高。本发明的抗体可以有效治疗与VEGF过表达相关的疾病,尤其是VEGF过表达导致的血管生成异常相关的疾病。



1. 一种人源化全长抗VEGF的IgG1抗体,包含:
 - (a) 两条免疫球蛋白轻链;
 - 以及 (b) 两条免疫球蛋白重链;所述的重链含有SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列,所述的轻链含有SEQ ID NO:2所述的氨基酸序列;
 - 优选地,所述的抗体是人IgG1;
 - 优选地,所述的抗体与VEGF结合;更优选地,所述的抗体与VEGF-A结合;还更优选地,所述的抗体与VEGF-A165结合;
 - 优选地,所述抗体与人VEGF结合的KD值不超过10nM;更优选地,所述的抗体与人VEGF结合的KD值不超过1nM;还更优选地,所述的抗体与人VEGF结合的KD值不超过500pM。
2. 一种核酸,所述的核酸编码权利要求1所述的抗体。
3. 一种载体,所述的载体含有权利要求2所述的核酸。
4. 一种宿主细胞,所述的宿主细胞含有权利要求3所述的载体。
5. 一种产生如权利要求1或2所述的抗体的方法,包括培养权利要求4所述的宿主细胞,从而核酸被表达出来;
 - 优选地,所述的方法还包括从宿主或宿主培养物中回收抗体。
6. 一种亲和纯化试剂,所述的试剂含有权利要求1所述的抗体。
7. 如权利要求1所述的抗体在制备用于VEGF蛋白的诊断分析的试剂中的用途。
8. 一种用于VEGF蛋白诊断的试剂盒,所述的试剂盒含有权利要求1所述的抗体。
9. 一种药物制剂,所述的药物制剂含有权利要求1所述的抗体;
 - 优选地,所述的药物制剂还含有药学上可接受的载体。
10. 如权利要求1所述的抗体在制备哺乳动物中VEGF过表达相关的疾病的药物中用途;
 - 优选地,所述的VEGF过表达相关的疾病为VEGF过表达相关的眼底病变;更优选地,所述的VEGF过表达相关的疾病选自年龄相关性黄斑变性、病理性近视继发脉络膜新生血管、糖尿病性黄斑水肿、糖尿病性视网膜病变、视网膜分枝静脉阻塞或视网膜中央静脉阻塞;
 - 优选地,所述的哺乳动物为人。

一种长效低毒的重组抗VEGF人源化单克隆抗体及其生产方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域;更具体地,本发明涉及一种用于减少人血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF/VEGF-A)的抗体,还涉及所述抗体的制备方法及其应用。

背景技术

[0002] 血管生成是由血管内皮细胞从先前存在的血管网络增殖并重组成新生血管。血管生成对人体正常增殖过程是必不可少的,包括伤口愈合和器官发育及分化。同时血管生成也涉及多种病理疾病的形成,如年龄相关性黄斑变性、肿瘤、类风湿性关节炎和牛皮癣。鉴于重要的生理病理重要性,有人认为血管生成过程由促血管生成分子和抗血管生成分子之间的平衡来进行调节,并在病症中出现异常调节。血管生成是级联过程,包括下述过程:释放蛋白酶后局部位置的细胞外基质的降解;毛细内皮细胞的增殖;毛细小管向血管生成刺激物的迁移。

[0003] 新生血管生成的过程是多因素和高度复杂的,但是VEGF被认为是在生理和病理血管生成中最为关键的因子。VEGF对胚胎的脉管生成和血管生成是必不可少的。除了是血管生成和脉管生成中的血管生成因子,VEGF还是多向性的生长因子,在内皮细胞存活、血管渗透性和血管舒张、单核细胞趋化性和钙流入中表现出多种生物效应,例如有报道称VEGF对视网膜色素内皮细胞和神经膜细胞有促进细胞分裂效应。血管生成是由血管内皮细胞增殖、重组形成新的血管,有证据表明血管供给的发育对正常和病理性增殖是必不可少的。大量数据显示VEGF在涉及病理性血管生成的疾病发展中起到关键作用,VEGF mRNA在大部分人类肿瘤中被过表达,VEGF在房水中的浓度与在患有糖尿病或其它缺血性视网膜疾病的患者中发现的血管活性增生高度相关,尤其是在年龄相关性黄斑变性(AMD)患者中脉络丛新血管形成膜中更甚。

[0004] VEGF是一种糖基化分泌性多肽生长因子,是一种同源二聚体糖蛋白,分子量在46~48kDa间,它直接作用于血管内皮细胞,能够诱导血管内皮细胞增生和血管新生。VEGF家族成员有6型,包括VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E和胎盘生长因子,其中VEGF-A在眼睛中最重要的。VEGF-A基因定位于6号染色体的p12~p21,由8个外显子和7个内含子构成。由于mRNA不同的剪切方式,产生出VEGF-A₁₂₁、VEGF-A₁₄₅、VEGF-A₁₄₈、VEGF-A₁₆₅、VEGF-A₁₈₃、VEGF-A₁₈₉和VEGF-A₂₀₆等7种蛋白形式。其中有5种蛋白形式可以增加血管通透性、促进血管内皮细胞增殖、诱导新生血管生成。血管内皮生长因子受体(VEGFR)有VEGFR1(F1t-1)、VEGFR2(KDR)和VEGFR3(F1t-4)三种,VEGF通过与其受体结合,从而发挥其生物学效应。无论是在实验模型还是在湿性AMD的病理性血管生成中,都发现存在高水平的VEGF表达。同时也有相当数量的文献报道,通过中和VEGF,血管新生和血管渗漏可以得到抑制。

[0005] 认识到VEGF在病理状况中的血管生成发挥重要作用后,人们采取很多措施来阻断VEGF活性。包括用抑制性抗VEGF受体的抗体、可溶性受体构建体、反义策略和低分子量VEGF受体酪氨酸激酶抑制物来干扰VEGF通路等。据相关文献报道,抗VEGF的中和性抗体已经显

示出抑制多种人类肿瘤细胞系在裸鼠中的生长,也抑制了缺血性视网膜病症模型中的眼内血管生成。所以抗VEGF单克隆抗体或VEGF作用抑制物是治疗实体瘤和多种眼内新生血管病症的有效候选物。

[0006] 黄斑变性是一种主要在老年人中发现的医学病症,其中已知为视网膜黄斑区域的眼睛的内衬中心变薄、萎缩,并且在一些情形中出血。这可能导致中央视觉的丧失,这使得患者不能看到更详细的内容。根据美国眼科学会的报道,黄斑变性是老年人的中央视觉丧失(失明)的主要原因。尽管一些影响年轻人的黄斑营养不良(macular dystrophies)有时也称为黄斑变性,但是该术语通常是指年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration,AMD)。

[0007] 年龄相关性黄斑变性从位于视网膜色素上皮与其下的脉络膜之间的黄斑(提供详细的中央视觉的视网膜中央区域,称为小窝)中的特征性的黄色沉积(称为玻璃疣)开始。具有玻璃疣的人们会继续发展晚期AMD。当玻璃疣变大并且变多,并且与在斑下的色素细胞层中的紊乱相关时,危险相当高。

[0008] 导致深入的视觉丧失的晚期AMD具有两种形式:干性和湿性。中央萎缩,即干性形式的晚期AMD,由在视网膜下的视网膜色素上皮层的萎缩导致,其通过丧失在眼睛中央部分的光感受器(杆状和锥体)而引起视觉丧失。

[0009] 年龄相关黄斑病变是视网膜色素上皮细胞和神经视网膜退化造成的一种不可逆性视力下降或丧失的疾病。多发生于50岁以上的患者,双眼先后或同时发病,且进行性损害视力,是一种严重威胁老年人视功能的眼底病变。随着人口老龄化,在西方国家已成为第一位的致盲性眼病,在亚洲其发病率亦呈逐渐增多的趋势。

[0010] 现代生物技术的发展使我们可通过重组DNA技术生产抗VEGF单克隆抗体,这种技术已经被大量应用于多种单克隆抗体的生产。可选择用来自噬齿类动物抗体的残基替换人抗体中CDR区或框架区的一些位点,以组合成人源化单克隆抗体,从而降低抗原性。目前已经成功生产出多种人源化抗VEGF单克隆抗体,在体内和体外显示了明显的hVEGF亲和力和抑制活性。例如治疗实体瘤的临床试验中使用一种特异性的人源化抗VEGF抗体Bevacizumab,还有其他人源化抗VEGF抗体雷珠单抗(Ranibizumab)和阿柏西普(Aflibercept)以高亲和力治疗脉络丛新血管生成相关的年龄相关性黄斑变性。

[0011] 在使用治疗性抗体于人体上前,需在非人哺乳动物中进行临床前研究,以评价所用单克隆抗体的有效性和毒性。理想情况是,进行了这些临床前研究的抗体能够识别并以高效性与宿主动物(小鼠、兔子和非人类灵长类动物)的靶标抗原进行反应。

[0012] 贝伐珠单抗(Bevacizumab,Avastin)是由基因泰克公司(Genentech)研发的另一个人源化IgG1抗VEGF单克隆抗体,是采用重组DNA技术在哺乳动物细胞表达系统中国仓鼠卵巢细胞(CHO)中进行生产,然后采用包括病毒灭活和去除步骤在内的工艺进行纯化的人用抗肿瘤单克隆抗体。

[0013] 雷珠单抗(Ranibizumab,Lucentis)是由美国基因泰克公司(Genentech)研发的一种通过重组DNA技术在大肠杆菌中进行生产的人源化单克隆抗体Fab片段,靶向VEGF-A,它能高亲和力结合VEGF-A各种亚型,如VEGF-A₁₂₁,VEGF-A₁₆₅,VEGF-A₁₁₀。雷珠单抗与VEGF-A结合从而阻止了VEGF-A与其位于内皮细胞表面的受体(VEGFR-1,VEGFR-2)结合,阻止血管内皮增生,减少血管渗漏,抑制视网膜新血管(CNV)的生成。

[0014] 雷珠单抗和贝伐珠单抗都是来源于相同的鼠源母本抗体A4.6.1。A4.6.1是由人VEGF-A₁₆₅蛋白免疫小鼠产生的杂交瘤细胞系生产的小鼠抗VEGF的单克隆抗体。为了降低鼠源抗体治疗人体疾病时产生的免疫原性，A4.6.1抗体基因通过重组DNA技术进行了人源化改造。人源化的Fab片段保留了鼠源性CDR序列，再与人源Fc片段组合得到全长抗体，即贝伐珠单抗。贝伐珠单抗具有与其亲本抗体相同的抗原亲和力，但是免疫原性更低，体内半衰期更长。

[0015] 雷珠单抗是在贝伐珠单抗Fab区的基础上通过氨基酸定点突变筛选得到的高亲和力抗体。雷珠单抗和贝伐珠单抗Fab区一共有6个氨基酸不同，这6个氨基酸的突变使得雷珠单抗对VEGF-A的亲和力相比贝伐珠单抗提高了5~20倍，体外实验证实雷珠单抗抑制HUVEC增殖的强度，是贝伐珠单抗的5.2倍。雷珠单抗是Fab片段，分子量小，可在1h内完全渗透视网膜全层，玻璃体内药物的半衰期为3.2天，而贝伐珠单抗不能穿透猴视网膜的内界膜。此外，由于雷珠单抗是较小的抗原结合片段，不含Fc区，不会触发补体介导的免疫反应，全身半衰期短，因而全身不良反应小。

[0016] 对于眼部疾病，通常使用通过玻璃体内应用的较小的抗体片段，如Fab或(Fab)₂，原因在于其具有低血清半衰期，并且系统性毒性的危险较低。然而，这种较小的抗体片段会导致较短的玻璃体内半衰期(由于较快地扩散到血清中)，并且必须更频繁地给药，给患者造成治疗中精神和身体上的负担。故具有较长半衰期的含Fc结构域的抗体也被应用于眼部疾病的治疗中，例如拜耳公司生产的Aflibercept就是一种Fc融合蛋白。

发明内容

[0017] 本发明的目的在于提供一种亲和力强的抗-VEGF抗体。

[0018] 本发明的目的还在于提供一种体内半衰期长的抗-VEGF抗体。

[0019] 本发明的目的还在于提供一种免疫原性更低的抗-VEGF抗体。

[0020] 本发明抗体是专门设计的用于眼底病变治疗的人源化全长抗VEGF的IgG1抗体。本发明抗体具有与雷珠单抗相近的抗原亲和力，但是本发明抗体无CDC和ADCC效应，玻璃体内注射安全性更高，玻璃体内注射后在玻璃体中半衰期更长，预期治疗效果更佳。

[0021] 一方面，本发明提供了一种全长人源化抗VEGF抗体，所述的抗体具有(a)两条免疫球蛋白轻链；以及(b)两条免疫球蛋白重链，所述重链从N末端到C末端都包括可变区和恒定区；所述抗体特异性地识别VEGF的抗原结合位点。

[0022] 更进一步地，所述重链的含有SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列，所述的轻链含有SEQID NO:2所述的氨基酸序列。

[0023] 在一些实施方案中，本发明的抗体为单克隆抗体，进一步地，所述的抗体是人IgG1。

[0024] 在一些实施方案中，本发明所提供的抗体，其能以与贝伐珠单抗相近的KD值结合人VEGF并能够抑制VEGF与VEGF受体结合。更具体地，能够在30℃以10nM或更低的KD值结合人VEGF并能够抑制VEGF与VEGF受体结合。根据另一个实施方案，KD值是1nM或更低。根据另一个实施方案，本发明抗体以不超过大约500pM的KD值结合VEGF。

[0025] 根据一个实施方案，本发明抗体具有1.0或更高(10M⁻¹S⁻¹)的结合速率(on rate)(k_{on})结合人和/或小鼠VEGF。根据另一个实施方案，该结合速率是4.0或更高(10M⁻¹S⁻¹)。

[0026] 根据另一个实施方案,本发明抗体以理想的亲和力结合人VEGF,进一步结合VEGF-A,更进一步地,与VEGF-A165结合,但不结合人VEGF-B、人VEGF-C和人VEGF-D组成的任一或所有的VEGF相关的同系物。

[0027] 与VEGF的结合受抑制的VEGF受体可以是VEGF受体1(F1t-1),VEGF受体2(F1t-1)或者两者。

[0028] 根据一个实施方案,本发明单克隆抗体接触20s螺旋(helix)的VEGF。根据另一个实施方案,本发明单克隆抗体接触80s环(loop)的VEGF。根据另一个实施方案,本发明单克隆抗体接触20s螺旋(helix)的和80s环(loop)的人VEGF。

[0029] 本发明的另一方面提供了编码本发明所述的抗体的重链和/或轻链的核酸。

[0030] 本发明还提供包含本发明所述的核酸的表达载体,所述表达载体能够在原核或真核宿主细胞中表达所述核酸。

[0031] 本发明还提供包含所述载体的宿主细胞,所述宿主细胞用于生产本发明所述抗体。

[0032] 所述的宿主细胞为真核的或者所述的宿主细胞为原核的。

[0033] 本发明还包括用于生产抗体的方法,其特征在于在原核或真核宿主细胞中表达本发明所述的核酸,并且从所述宿主细胞或宿主细胞培养物中回收所述抗体。

[0034] 其中一个实施方案包括下述步骤:

[0035] a) 用包含编码所述抗体的核酸分子的载体转化宿主细胞;

[0036] b) 在允许合成所述抗体分子的条件培养所述宿主细胞;和

[0037] c) 从所述培养物回收所述抗体分子。

[0038] 本发明还包括通过所述用于生产全长抗体的方法获得的抗体。

[0039] 本发明还提供一种亲和纯化试剂。所述的亲和纯化试剂含有上述的抗体,上述的抗体可以用于制备可用于VEGF蛋白的诊断性分析的试剂中的用途。所述的抗体可用检测分子进行标记。如放射性同位素、荧光标志、或酶等进行标记。

[0040] 本发明还提供了一种用于VEGF蛋白诊断的试剂盒,所述的试剂盒含有上述的抗体或多肽。

[0041] 本发明还提供了一种含有所述抗体的药物制剂。所述药物制剂还可包含药学上可接受的载体。

[0042] 本发明也提供了包含所述抗体或多肽用于制备治疗哺乳动物中VEGF过表达相关的疾病的药物的用途。

[0043] 本发明所述的治疗哺乳动物,其包含给以有效量的所述抗体到所述哺乳动物。抗体的给药量将是治疗所述疾病的有效量。在增加剂量的研究中,可将多种剂量的抗体给药所述哺乳动物。另一个实施方案中,治疗有效量的所述抗体给药人类患者,以治疗疾病。

[0044] 所述的哺乳动物可以是人,也可以是非人的哺乳动物,例如适合产生临床前数据的灵长类动物或啮齿类动物(例如小鼠、大鼠或兔子)。优选地,所述的哺乳动物为人。

[0045] 所述哺乳动物可以是健康的,也可以是患有要用所述抗体治疗的疾病。

[0046] 在发明中,所述的VEGF过表达相关的疾病或者是所述的疾病为VEGF过表达导致的血管生成异常相关的疾病;更进一步为VEGF过表达导致的眼底病变。

[0047] 作为优选的实施方式,本发明所述的抗体用于治疗湿性(新生血管性)年龄相关性

黄斑变性 (wet-AMD)、病理性近视 (PM) 继发脉络膜新生血管 (CNV)、糖尿病性黄斑水肿 (DME)、糖尿病性视网膜病变 (DR)、视网膜分枝静脉阻塞 (BRVO)、视网膜中央静脉阻塞 (CRVO) 等眼底病变。

[0048] 这些抗体可用于采用激光导致脉络膜新生血管的恒河猴模型中,这些抗体可用于通过观察或监测在用本发明抗VEGF抗体治疗黄斑变性的面积变化情况,来鉴定抗VEGF抗体在治疗年龄相关性黄斑变性的方法。本发明所述抗体也可用于研究并评价本发明抗VEGF抗体及其他治疗剂的联合疗法。本发明所述抗体可通过将所述抗体或多肽给药患有类似疾病的动物并确定是否所述疾病的一种或多种症状会减轻,用于研究VEGF在其他疾病中的作用。

[0049] 在一些方面,本发明还提供了抗体衍生物,可以将本发明的抗体进一步修饰以含有本领域公知的其他非蛋白质部分,如水溶性的聚合物。

[0050] 在一些方面,本发明还提供了免疫偶联物(抗体-药物偶联物或ADC),其包含本发明所述抗体与一种或多种细胞毒性试剂偶联的抗体,该抗体毒性试剂例如化疗剂、药物、生产抑制剂、毒素或者放射性同位素。

[0051] 本发明所述的抗体由于其Fc部分的存在,对患有视网膜黄斑变性疾病的患者更有益处。与不具有恒定重链区的较小的抗体片段相比,其在玻璃体内环境中具有高度的稳定性和从玻璃体中的缓慢扩散特性,即半衰期延长,药物作用时间得到延长,其中实际的疾病位于此处并在此处治疗。因此,与非IgG样抗体,例如,Fab和(Fab)₂片段相比,治疗周期可以延长,病患生理和心理状况可得到改善。

[0052] 本发明所述抗体为全长人源化抗体。全长人源化抗体与鼠源抗体、嵌合抗体相比,在安全性和疗效上都有多个潜在优势。与其他的抗体种类相比,全长人源化抗体通常表现出较低的清除率。较低的清除率可以允许较低的剂量和给药频率。

[0053] 根据一个优选的实施方案,本发明抗体是通过重组方法来合成而不是直接从杂交瘤产生的或从来自杂交瘤的抗体序列衍生。一个优选的实施方案中,所述抗体以不超过大约2nM,不超过大约1nM,不超过大约500pM的KD值来结合hVEGF-A₁₆₅。本发明所述的全长抗体表现出抑制眼底疾病尤其是脉络膜血管新生的良好药效。

附图说明

[0054] 图1为BAT5906不同结构与Ranibizumab新生血管抑制效果比较试验,显示了所述单克隆抗体BAT5906完整分子抑制血管新生效果最佳,优于上市药物Ranibizumab。图2显示了所述单克隆抗体BAT5906的SDS-PAGE电泳(非还原)结果,M:250kDa预染蛋白Marker,泳道1:BAT5906非还原样品。

[0055] 图3显示了所述单克隆抗体BAT5906的SDS-PAGE电泳(还原)结果。M:250kDa预染蛋白Marker,泳道1:BAT5906还原样品,由图2和图3的结果显示所述单克隆抗体分子大小在还原与非还原条件下均与设计大小一致。

[0056] 图4为给药后各组猴眼底激光斑荧光素渗漏面积改善率(%),显示了所述单克隆抗体BAT5906在恒河猴药效试验中发挥作用,有效地抑制了荧光素渗漏的面积,上市药物Ranibizumab作为对照,与模型对照组比较,均数的差异有统计学意义($P \leq 0.05$)。图5为给药前后各组猴眼球4级荧光斑数(个),显示了所述单克隆抗体BAT5906在恒河猴药效试验中

发挥作用,有效抑制了4级荧光斑数量,上市药物Ranibizumab作为阳性对照。

[0057] 图6为给药后各组猴视网膜病损最高处视网膜厚度改善率(%),显示了所述单克隆抗体BAT5906在猴药效试验中发挥作用,有效抑制了眼底视网膜的增厚,上市药物Ranibizumab作为阳性对照,与模型对照组比较,均数的差异有统计学意义($P \leq 0.05$)。

[0058] 图7为恒河猴急性毒性试验中猴眼球荧光造影图,给药前及眼玻璃体内注射后14天各检测一次。眼底荧光造影检查可见造影后早期(约1分钟以内)及晚期(约5分钟以后)视网膜血管灌注均匀,动、静脉充盈时间正常,未见视网膜静脉扩张、渗漏,亦未见视网膜无灌注区、遮蔽荧光以及新生血管形成等表现,说明本发明抗体玻璃体内注射安全性较高。

[0059] 图8为BAT5906与对照眼科药物稀释后37℃条件下细胞生物学活性变化,显示了所述单克隆抗体BAT5906在模拟人玻璃体注射浓度条件下仍保持稳定细胞生物学活性,可在眼底病变部位发挥抑制VEGF的功能。

[0060] 图9为BAT5906与对照眼科药物稀释后37℃条件下SEC主峰变化,显示了所述单克隆抗体BAT5906在模拟人玻璃体注射浓度条件下仍保持稳定结构,可在眼底病变部位发挥抑制VEGF的功能。

具体实施方式

[0061] 以下通过具体的实施例进一步说明本发明的技术方案,具体实施例不代表对本发明保护范围的限制。其他人根据本发明理念所做出的一些非本质的修改和调整仍属于本发明的保护范围。

[0062] I. 定义

[0063] 如果没有特别指明,本文所涉及的描述和要求依照以下所述来定义。

[0064] 需要说明的是,除非特别指明,本文所述单数形式包含复数含义。如,当谈及一种“复合物”时,同时包含复合物的复数形式。

[0065] 本文所涉的“大约”应为本领域普通技术人员所理解并且能够简单扩展其应用。如果有术语的应用对于本领域的普通技术人员是不清楚的,则需给出应用的上下文。“大约”指特定值的+10%至-10%、+5%至-5%或+1%至-1%。

[0066] 本文所述术语,“包括”是指组成和方法包括所述物质,而不排除其他物质。当“主要包括”用于定义组成和方法时,应当意为不包括其他任何重要的组分。例如,一个复合物包括所述的重要组分但排除其他的重要组分。例如,一个复合物由所述定义的重要组分组成,则不排除那些对本发明的基本特性及新颖性无重大影响的组分。“由……组成”意为排除超过微量的成分和重要方法步骤。这些术语所定义的实施方式限于本发明的范围中。

[0067] 如本文所用,“抗体(Ab)”或“抗原结合单元(Abu)”是指,其包含一个或多个抗原结合位点的蛋白或分子。该术语包含了全长的抗体和抗体片段,但不限于此。在某一方面,抗体包含重链可变区(VH)和/或抗体轻链可变区(VL),或一对VH/VL,以及可以是全长抗体或抗体片段,如单链Fv、VH结构域和/或VL结构域、Fab、或(Fab)₂。在某一方面,每一个抗原结合位点包括抗体重链可变区(VH)和/或抗体轻链可变结构域(VL),也可以是一对由抗体轻链可变区(VL)和抗体的重链可变区(VH)多肽组成。

[0068] 如本文所用,术语“重组人源抗体”是指包括所有利用重组方法制备、表达、创造或分离的人源抗体,例如,从NS0或CHO宿主细胞中分离出的抗体,或是利用表达人免疫球蛋白

基因的转基因动物(例如小鼠)中获得的抗体,或使用重组表达载体,转染到宿主细胞中表达的抗体。

[0069] 术语“高变区”或“抗体的抗原结合部分”,在本文中使用时,请参阅负责抗原结合的抗体的氨基酸残基。高变区包括从“互补性决定区”或“CDR”氨基酸残基。“框架”或“FR”区域是本文所定义的高变区残基以外的那些可变结构域的区域。因此,抗体的轻链和重链包括从N-到C-末端的结构域FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。这样的框架氨基酸分隔的每个链的CDR。每个链的CDR由这样的框架氨基酸分隔开。特别是,重链CDR3是主要负责抗原结合的区域。CDR和FR区域的确定是根据Kabat等的标准定义(Kabat等, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed., Public Health Service, 15 National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))。

[0070] 用于本文中时,表述“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可互换使用,且全部这些名称都包括子代。因此,词语“转化体”和“转化的细胞”包括原代受试细胞和由其来源的培养物,而不考虑转移的次数。还理解所有的子代的DNA含量可能不精确一致,这归因于有意或无意的突变。包括在最初转化的细胞中筛选的具有相同功能或生物学活性的变异子代。意指不同名称时,通过上下文其将是清楚的。

[0071] 术语“转化”用于本文中时,指将载体/核酸转移到宿主细胞中的过程。如果将无难以克服的细胞壁屏障的细胞用作宿主细胞,则转染例如通过如Graham, F.L., van der Eb, A.J., *Virology* (病毒学) 52 (1973) 546-467所述的磷酸钙沉淀法来进行。然而,还可以使用其他将DNA引入细胞的方法,诸如通过核注射或通过原生质体融合。如果使用原核细胞或包含实质细胞壁结构的细胞,例如,一种转染方法是利用氯化钙的钙处理,如Cohen, S.N., 等, *PNAS* (美国科学院院报) .69 (1972) 2110-2114所述。

[0072] 用于本文中时,“表达”指将核酸转录为mRNA的过程和/或将转录的mRNA(也称为转录物)随后翻译为肽、多肽或蛋白质的过程。转录物和被编码的多肽共同称为基因产物。如果多核苷酸源自基因组DNA,则在真核细胞中的表达可以包括mRNA的剪接。

[0073] “载体”是核酸分子,特别是自我复制的,其将插入的核酸分子转移到宿主细胞之中和/之间。该术语包括主要功能为将DNA或RNA插入细胞(例如,染色体整合)的载体,主要功能是复制DNA或RNA的复制载体,和功能是转录和/或翻译DNA或RNA的表达载体。还包括提供多于一种上述功能的载体。

[0074] “表达载体”是多核苷酸,其在引入到合适的宿主细胞中时能够被转录和翻译为多肽。“表达系统”通常指包括表达载体的适当宿主细胞,所述表达载体可以起作用产生所需的表达产物。

[0075] 提供下述实施例、序列表和附图来辅助对本发明的理解,其真正目的是在附上的权利要求书中列出。应该理解,在不背离本发明的精神的前提下,可以在所述的方法中进行修改。

[0076] 患者疾病“治疗”指的是(1)阻止疾病在有倾向性或还没表现疾病症状的患者中出现;(2)抑制疾病或阻止其发展;或(3)减轻疾病或致其退化。

[0077] “有效量”意指活性化合物或药剂的量,其导致研究人员、兽医、医生或其他临床医生正寻求的组织、系统、动物、个体以及人的生物或药用响应,这包含治疗一种疾病。

[0078] II. 全长抗体

[0079] 在一个实施例中,本发明提供了一种新的全长抗体,该抗体具有高亲和力和具有黄斑变性疾病治疗效果。

[0080] “全长抗体”或“完整抗体”是指包括至少两条轻链和两条重链的抗体或抗体部分,并且每条重链包括至少一个可变区(VH)和三恒定区(例如,CH1、CH2和CH3)。

[0081] 在一些方面,每条轻链、可变区、IgG1的恒定区、scFv的VH和VL区都是人源序列,可以任意的修改。

[0082] 在一些方面中,全长抗体中的每一条重链都包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

[0083] 在一些方面中,全长抗体中的每一条轻链都包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列。

[0084] 重链氨基酸序列(SEQ ID NO:1):

[0085] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFT
FSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEP
KSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
FYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0086] 轻链氨基酸序列(SEQ ID NO:2):

[0087] DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSASQDISNYLNWYQQKPKGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYFREAKV
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0088] III. 治疗方案

[0089] 本发明提供了一种治疗黄斑变性疾病或相关病症的方法,该方法需要使用有效量的如本文所述的全长抗体。在某些方面,这种疾病是湿性(新生血管性)年龄相关性黄斑变性(wet-AMD)、病理性近视(PM)继发脉络膜新生血管(CNV)、糖尿病性黄斑水肿(DME)、糖尿病性视网膜病变(DR)、视网膜分枝静脉阻塞(BRVO)、视网膜中央静脉阻塞(CRVO)等眼底病变。

[0090] 下面实施例进一步阐述本发明的某些方面和帮助熟悉该技术领域的科技人员施行本发明。这些实施例绝不是限制本发明的范围。

[0091] 实施例1重组人源化抗VEGF抗体对新生血管抑制机理研究

[0092] 重组抗VEGF人源化单克隆抗体(抗体BAT5906)的重链和轻链氨基酸序列分别见SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2。

[0093] 对小鼠双眼进行激光光凝,破坏脉络膜结构,形成血管新生模型。对该模型注射人VEGFA抗原后,脉络膜血管新生会在得到增强;然后再分别注射重组人源化抗VEGF单克隆抗体BAT5906、Ranibizumab(Ran)、BAT5906抗体的Fab结构域(BAT5906-Fab)、Fc结构域(BAT5906-Fc)和人IgG1(hIgG1)后,与对照组(PBS相比),脉络膜血管新生均得到抑制,推测存在两种不同的血管新生抑制机制。其中BAT5906-Fc和人IgG1表现出非靶点依赖性的抑制作用,Ranibizumab以及BAT5906-Fab为VEGF靶点依赖性抑制,而BAT5906为完整分子抑制程度最高,同时具有两种抑制作用。试验结果如图1所示。

[0094] BAT5906既可以通过特异性结合VEGF的Fab结构域进而抑制VEGF通路来抑制血管新生,也可以是通过Fc结构域与FcγRI结合来抑制血管新生。人IgG1由于含有Fc结构域,即

使没有特异性结合VEGF的Fab结构域来抑制VEGF通路,也可通过FcγRI通路抑制血管新生,显示出FcγRI通路也是抑制血管新生的一种方式。与只具有特异性结合VEGF的Fab结构域的Ranibizumab相比,Ranibizumab只通过抑制VEGF通路来抑制血管新生;而BAT5906同时具有特异性结合VEGF的Fab结构域和Fc结构域,可抑制VEGF通路和FcγRI通路,血管新生抑制效果更佳。

[0095] 实施例2重组抗VEGF单克隆抗体(抗体BAT5906)的重组质粒及稳定细胞株构建

[0096] 根据氨基酸序列构建重组表达质粒pBAT5906,它含有GS cDNA元件,用于合成谷氨酰胺合成酶基因,作为稳定细胞株的扩增筛选标,从而可以通过在培养基中添加一定量的L-蛋氨酸亚砷(methionine sulphoximine,MSX)进行稳定细胞株筛选。对构建好的重组表达质粒pBAT5906进行限制性内切酶Pvu I/Not I酶切验证,与预期设计结果一致,证明pBAT5906重组表达载体构建成功。

[0097] 用于抗体表达的宿主细胞株为CHO-K1细胞的一种衍生细胞系,悬浮生长于CD-CHO培养基中。BAT5906抗体表达的稳定细胞株构建过程如下:将处于对数生长期的宿主细胞离心,并重悬于新鲜的CD-CHO培养基(细胞密度为 1.43×10^7 个/毫升)。取600μL上述细胞悬液和40μg已线性化的质粒混合均匀,加入电转杯中电击转化,Bio-rad电转化仪的参数设定为:电容:960μFD,电压:300V,电击时间15-20ms。把电击后的细胞立即重悬于500mL 37℃预热的CD-CHO培养基,每孔100μL分装于96孔板,2-3天后补加100μL的筛选培养基。2-3周后测定96孔板细胞培养上清中的抗体浓度,并将表达水平较高的克隆从96孔板转移到24孔板,待细胞生长到一定数量,再次把抗体表达量高的细胞转入到6孔板,最后保留20-30个高表达细胞株转入摇瓶做进一步评价。最终确得到的全长单克隆抗体表达细胞株的产量能够达到3g/L左右。

[0098] 实施例3单克隆抗体的表达及纯化

[0099] 单克隆抗体的表达及纯化过程如下:细胞大规模培养2周后,通过低速离心使细胞和培养基分离,将收获的上清进一步高速离心得到澄清的料液。重组抗体通过亲和层析法(Protein A)和离子交换两步法进行纯化,纯化中使用的介质分别是GE公司生产的MabSelect SuRe LX、TOSOH公司的Giga Cap Q-650M和ABI公司的POROS XS。分离纯化后的抗体通过SDS-PAGE法验证其大小正确性(图2和图3),结果显示BAT5906条带在还原和非还原下大小都正确。

[0100] 实施例4抑制恒河猴眼部新生血管有效性实验

[0101] 激光致猴脉络膜新生血管模型是wet-AMD的理想模型,为了有效评价本发明抗体与已上市药品Ranibizumab(Lucentis)的药效,采用激光导致恒河猴脉络膜新生血管,然后进行玻璃体药物注射试验评价药效。造模成功后分组,每组4只恒河猴。双眼单次玻璃体注射给予0.25mg/眼(1.67nmol/眼)、0.5mg/眼(3.33nmol/眼)、1.25mg/眼(8.33nmol/眼)的BAT5906,模型对照组给予玻璃体注射0.9%氯化钠注射液,另设置上市药物对照药组,每只眼球注射0.5mg/眼的Ranibizumab(摩尔剂量为10nmol/眼),上述注射体积均为50μL。给药28天后,对荧光斑渗漏面积改善率、眼底视网膜厚度改善率、房水VEGF含量以及眼底3级和4级荧光斑个数进行测定,结果如表1所示:

[0102] 表1眼玻璃体注射BAT5906对恒河猴药效学评估

[0103]

指标测定时间	模型对照组 $\bar{x} \pm SD$	Lucentis	BAT5906	BAT5906	BAT5906
		0.5 mg/眼组 $\bar{x} \pm SD$	0.25 mg/眼组 $\bar{x} \pm SD$	0.5 mg/眼组 $\bar{x} \pm SD$	1.25 mg/眼组 $\bar{x} \pm SD$
荧光素渗漏面积改善率 (%)					
给药后 28 天	-11.89 ± 68.70	83.69 ± 9.97 *	89.33 ± 9.97 *	85.28 ± 5.15 *	86.46 ± 3.61 *
眼底视网膜增厚改善率 (%)					
给药后 28 天	75.91 ± 25.50	94.73 ± 24.66	106.61 ± 42	115.17 ± 26.33	113.45 ± 20.95
房水 VEGF 含量 (ng/ml)					
给药后 29 天	76.470 ± 21.742	8.074 ± 2.683 *	5.133 ± 3.748 *	1.633 ± 0.909 *▲	0.599 ± 0.129
眼底荧光斑个数 (3 级+4 级)					
给药后 28 天	39	6 *	5 *	2 *	3 *

[0104] 素渗漏面积改善率(改善率均数分别为89.33%,85.28%,86.46%)均明显高于模型对照

[0105] 由上表1和图4可看出,0.25、0.5、1.25mg/眼剂量的BAT5906组对猴眼底激光斑荧光素渗漏面积改善率均略好于0.5mg/眼的Ranibizumab组(83.69%),且低剂量的BAT5906具有更佳的荧光素渗漏面积改善率。

[0106] 本发明单克隆抗体BAT5906的0.25、0.5、1.25mg/眼剂量组猴双眼给药后28天,所有眼球病损最高处视网膜厚度均有所降低,部分眼球色素上皮较规整、连续,部分眼球视网膜厚度已接近或达到甚至低于造模前水平。其病损最高处视网膜厚度改善率及减少量(给药后28天,改善率均数分别为106.61%,115.17%,113.45%)均明显高于模型对照组。由上表1和图6可看出,0.25、0.5、1.25mg/眼剂量的BAT5906组对猴眼底视网膜增厚改善率略好于0.5mg/眼的Ranibizumab组。

[0107] 玻璃体注射3种剂量的本发明抗体BAT5906后29天,恒河猴房水VEGF浓度均低于模型对照组和阳性对照Ranibizumab组,该结果显示本发明抗体对眼组织VEGF有比阳性对照药物Ranibizumab更强的抑制效果。

[0108] 由表1和图5可知,在程度最为严重的3级+4级荧光斑(显著荧光素渗漏,渗漏超过光斑边缘)数量变化比较中,0.5mg/眼的Ranibizumab组在给药后28天3级+4级荧光斑数均为6个,与给药前(39个)相比明显减少,但0.25mg/眼的BAT5906组的3级+4级荧光斑数为5个,0.5、1.25mg/眼的BAT5906组的3级+4级荧光斑数分别为2个和3个,荧光斑数少于阳性对照组Ranibizumab。

[0109] 上述药效学试验结果表明,与Ranibizumab相比,本发明单克隆抗体BAT5906对荧光素渗漏的抑制程度更强,药效略优于Ranibizumab。

[0110] 实施例5CDC效应检测实验与ADCC效应检测实验

[0111] 1.CDC效应检测实验

[0112] 提前24小时用内皮细胞完全培养基ECM重悬靶细胞(HUVEC细胞),调整细胞浓度为 2×10^5 个/mL,在平底透明的96孔板中,每孔中加入50 μ L细胞混悬液。用含有2%FBS和5%补体的DMEM/F12培养基稀释抗体(起始浓度40 μ g/mL,以1/5倍稀释倍数依次稀释,每个浓度设3个复孔,共设立8个梯度)。用移液枪将上述步骤中的培养基吸干,然后加入上一步骤中的稀释好的靶细胞,每孔50 μ L,按照试验设计,加入到96孔板中,然后放入37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱继续培养至少4个小时。

[0113] 每个浓度梯度的抗体都以50 μ L/孔加入到96孔板中,样品的终浓度为10、2、0.4、0.08、0.016、0.0032、0.00064、0 μ g/mL,然后在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂的培养箱中培养30min。设立靶细胞最大LDH释放、靶细胞自发LDH释放孔、体积校正对照孔及培养基背景孔(最大LDH释放

孔和体积校正对照孔在检测前45分钟加入10 μ L裂解液),各3个复孔。置于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱孵育至少4h。4h后将96孔板离心,250g离心4分钟,用移液器小心吸取上清至另一块96孔板中,每孔加入50 μ L LDH检测试剂,室温避光孵育20-30分钟,然后每孔加入50 μ L终止液。

[0114] 以490nm为检测波长,在酶标仪测量其吸收值。试验结果的计算:将所有实验孔、靶细胞自发LDH释放孔的吸收值减去培养基背景吸收值的均值,将靶细胞最大LDH释放对照的吸收值减去体积校正对照吸收值的均值。然后将上述经过校正的值带入下面公式,计算每个效靶比所产生的细胞毒性百分比。

[0115] $\% \text{细胞毒性} = (\text{实验} - \text{靶细胞自发}) / (\text{靶细胞最大} - \text{靶细胞自发}) \times 100\%$

[0116] 由以上结果可知,Bevacizumab样品、BAT5906样品在相同的试验条件下在补体的作用下对靶细胞的毒性作用没有明显区别,且对靶细胞的相对毒性作用约为0%,表明BAT5906抗体无CDC效应。以上结果表明,本发明抗体在细胞内不会引起补体依赖的细胞毒性(见表2)。

[0117] 2. ADCC效应检测实验

[0118] 提前24小时用1640培养基重悬靶细胞(HUVEC细胞),调整细胞浓度为 2×10^5 个/mL,在平底透明的96孔板中,每孔中加入50 μ L细胞混悬液。

[0119] 用含有2%FBS的DMEM/F12培养基稀释抗体(起始浓度40 μ g/mL,以1/5倍稀释倍数依次稀释,每个浓度设3个复孔,共设立8个浓度梯度)。

[0120] 每个浓度梯度的抗体都以50 μ L/孔加入到样品孔中,样品的终浓度为10、2、0.4、0.08、0.016、0.0032、0.00064、0 μ g/mL,然后在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂的培养箱中培养30min。

[0121] 取对数生长期的效应细胞PBMC,800转离心5分钟弃上清。加入含有2%FBS的DMEM/F12培养基,800转离心5分钟弃上清2遍,计数,将效应细胞密度调整 2×10^5 个/mL。

[0122] 用移液枪往样品孔中加入上一步骤中的稀释好的效应细胞,每孔50 μ L,然后放入37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱继续培养至少4个小时。

[0123] 设立靶细胞最大LDH释放、靶细胞自发LDH释放孔、体积校正对照孔及培养基背景孔(最大LDH释放孔和体积校正对照孔在检测前45分钟加入10 μ L检测试剂盒中的裂解液),各3个复孔。置于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱孵育至少4h。

[0124] 培养4h后将96孔板离心,250g离心4分钟,用移液器小心吸取上清至另一块96孔板中,每孔加入50 μ L LDH检测试剂,室温避光孵育20-30分钟,然后每孔加入50 μ L终止液。以490nm为检测波长,在酶标仪测量其吸收值。

[0125] 由以上试验结果可知,本发明抗体BAT5906和Bevacizumab在相同的试验条件下在抗体的作用下对靶细胞的毒性作用没有明显区别,且对靶细胞的相对毒性作用约为0%,表明BAT5906抗体无ADCC效应(见表2)。

[0126] 以上CDC、ADCC两个试验结果表明,本发明抗体在体内不会引起补体依赖的细胞毒性(CDC)和抗体依赖的细胞毒性(ADCC),在体内使用不会影响免疫系统的正常作用。本发明抗体可以在病灶处正常发挥其抗VEGF功能而不引起不良毒性反应,在人体内使用安全性较高,是一种低毒的抗VEGF单克隆抗体。

[0127] 表2 BAT5906和对照品的CDC效应、ADCC效应试验结果

[0128]

类别	CDC 效应	ADCC 效应
Buffer	—	—
BAT5906	—	—
Bevacizumab	—	—
Rituximab	—	+

[0129] *—表示无此效应,+表示有此效应

[0130] 实施例6恒河猴眼玻璃体注射单克隆抗体急性毒性试验

[0131] 本试验设2组,分别为阴性对照组、重组抗VEGF人源化单克隆抗体(BAT5906)注射液8.0mg/眼组,每组3只恒河猴,雌雄兼有。各组恒河猴按100 μ L/眼体积单次双眼玻璃体注射给予阴性对照品(0.9%氯化钠注射液)及80mg/mL的重组抗VEGF人源化单克隆抗体注射液。给药当天定义为试验第1天。

[0132] 给药后连续14天每天观察各组猴一般状况;试验第8、14天测定体重;试验第1(给药前)、2、4、8、14天进行间接检眼镜及裂隙灯检查;给药前及给药后约10~15分钟、1小时、24小时以及试验第14天测定眼压;给药前及试验第14天进行眼底彩色照相及荧光造影检查;试验第2、14天进行血液学、血生化检测;试验第15天对所有恒河猴麻醉后放血实施安乐死,进行大体解剖观察。

[0133] 试验结果显示,在本试验条件下,恒河猴双眼玻璃体单次注射8.0mg/眼剂量的重组抗VEGF人源化单克隆抗体注射液并观察14天,未见眼毒性及全身系统毒性,最大耐受剂量(MTD)为8.0mg/眼。急性毒性试验中眼底荧光造影检查见图7所示。

[0134] 实施例7恒河猴眼玻璃体注射单克隆抗体眼组织分布试验

[0135] 本试验设置玻璃体注射8.33nmol/眼(即1.25mg/眼)组,使用21只恒河猴,10雌11雄。玻璃体注射组猴按50 μ L/眼的体积于双侧眼经玻璃体单次注射给予25mg/mL的重组抗VEGF人源化单克隆抗体(BAT5906)注射液。玻璃体注射组分别于给药后4、10、24、72、168、336、672小时各取3只猴施以安乐死后(戊巴比妥钠30mg/kg麻醉,股动脉放血)解剖,取下双眼眼球及视神经,分离眼球房水、角膜、虹膜、玻璃体、晶状体、视网膜、脉络膜、视神经。玻璃体注射组给药后336、672小时解剖的6只猴于给药前及给药后30分钟、1小时、2小时、4小时、10小时、24小时、48小时、72小时、96小时、168小时、336小时、672小时采血分离血清。采用ELISA法检测各眼组织、血清中药物浓度,计算血清和眼组织中的药物代谢参数。

[0136] 主要结果如下:

[0137] 恒河猴双眼单次玻璃体注射1.25mg/眼(8.33nmol/眼)的剂量重组抗VEGF人源化单克隆抗体注射液后,药物能在各眼部组织中迅速扩散分布,从注射后4小时起眼内各组织中均可检测到药物,除角膜和视神经以外的所有眼组织药物浓度均于给药后4~24小时达峰。药物在眼内各组织中暴露水平(AUC_{last})由高至低依次为:玻璃体、视网膜、角膜、房水、脉络膜、虹膜、晶状体、视神经。在玻璃体、房水、视网膜、脉络膜、虹膜、晶状体等主要眼组织消除半衰期在73.74~143.81小时之间,在玻璃体中的半衰期为84.2小时。

[0138] 两种抗VEGF治疗药物与BAT5906的对比情况见表3,BAT5906的半衰期明显优于目前市场上的两种抗VEGF治疗药物。

[0139] 表3两种抗VEGF治疗药物与BAT5906性质比较

	类别	Ranibizumab	Aflibercept	BAT5906
	分子结构	Fab	VEGFR-Fc	IgG1
[0140]	分子量	48 kD	115 kD	149 kD
	猴玻璃体半衰期	55.7 h ^a	40-60 h ^b	84.2 h

[0141] ^a Gaudreault J, Fei D, Rusit J, et al. Preclinical pharmacokinetics of Ranibizumab (rhuFabV2) after a single intravitreal administration [J]. Investigative ophthalmology & visual science, 2005, 46 (2) : 726-733.

[0142] ^b Biologic License Application (BLA) : 1253870 orig 1s 000 PHARMACOLOGY REVIEW (S), Company: REGENERON PHARMACEUTICALS, 11/18/2011.

[0143] 由表3可知,恒河猴经双眼玻璃体注射8.33nmol/眼的本发明单克隆抗体后,药物在猴玻璃体中主要药代参数消除半衰期($t_{1/2}$)为84.2小时。而上市阳性对照药物Ranibizumab玻璃体注射后在猴玻璃体中的半衰期为55.7小时,Aflibercept玻璃体注射后在猴玻璃体中的半衰期为40-60小时。与上述两种上市阳性对照药物相比,本发明单克隆抗体在玻璃体中的药物半衰期更长,可在眼部发挥更长时间的药效,抑制眼底血管新生的作用更佳。

[0144] 实施例8差式热量扫描仪(Differential scanning calorimetry、DSC)检测

[0145] 为了研究本发明抗体的热转化温度,我们运用毛细管差式热量扫描仪来检测BAT5906分子各个结构域的热解折叠温度。仪器型号Nano DSC,毛细管样品池和参比池的体积均为0.300mL,加热速率为1°C/min,10min预平衡时间,过滤周期10秒。从表4的实验结果中可以看出BAT5906分子有2个溶解峰,第1个峰为CH2溶解峰,T_m值为76.07°C;第2个峰为Fab/CH3溶解峰,T_m值为83.68°C。以上数据表明BAT5906分子整体结构比较稳定,各个结构域中的最低T_m值也有76.07°C,BAT5906的热解折叠温度高于Bevacizumab,较Bevacizumab更稳定。

[0146] 表4 BAT5906与对照品的热解折叠温度对比结果

[0147]

类别	T _{m1} (°C)	T _{m2} (°C)
BAT5906	76.07	83.68
Bevacizumab	73.11	82.12

[0148] 实施例9细胞生物学活性检测试验

[0149] VEGF具有促进HUVEC细胞增殖的活性,本发明单克隆抗体具有抑制VEGF的功能,故本试验检测使用HUVEC进行细胞生物学活性的比较。

[0150] 首先用含2%FBS的ECM培养基重悬HUVEC细胞(HUVEC细胞代次为第5代)至浓度为 9×10^4 cells/mL,以每孔100μL接种96孔细胞培养板,孵育(5±1)h使细胞贴壁。使用测试培养基将BAT5906单克隆抗体和Bevacizumab均预稀释至1000ng/mL,然后再1:1.5向下系列稀

释9个梯度(共10个梯度),系列稀释样品与等体积测试培养基稀释的80ng/mL VEGF-A₁₆₅混合后,37℃孵育(60±10)min。孵育结束后,将每孔100μL抗体VEGF-A₁₆₅混合物加入至HUVEC接种细胞培养板的对应孔中,置于5%CO₂培养箱中孵育(66±3)h。孵育结束后,加入CCK8每孔20μL并继续孵育(4±0.5)h显色。显色结束后细胞培养板置于室温平衡30min,在酶标仪于450nm处读取吸收值结果。实验结果见表5,BAT5906的细胞生物学活性约为Bevacizumab的3.8倍。

[0151] 表5 BAT5906与对照品的细胞生物学活性对比结果

[0152]

类别	细胞生物学活性 (EC50)
BAT5906	0.082
Bevacizumab	0.313

[0153] 实施例10抗体稀释后37℃条件下5周稳定性试验

[0154] 通过体外试验模拟人玻璃体内注射抗VEGF单克隆抗体药物后在眼球部位的稳定性变化情况。将药物按照临床使用中浓度稀释后置于37℃,对其稳定性进行研究。具体操作为:分别将本发明抗体BAT5906、雷珠单抗(Ranibizumab)、贝伐珠单抗(Bevacizumab)和阿柏西普(Aflibercept)的浓度稀释至0.3125mg/mL、0.125mg/mL、0.3125mg/mL和0.5mg/mL,放置在37℃恒温培养箱进行连续5周的稳定性试验,首次稀释后留样,后续每周定时留样备用。在第5周时将所有6个时间点的样品进行单克隆抗体的细胞生物学活性和SEC(分子排阻色谱法)主峰百分比变化的检测。

[0155] 细胞生物学活性试验方法见实施例9。SEC检测方法为:色谱柱为TSK gel G3000SWXL(柱规格7.8×300mm,5μm),以含10%乙腈的100mM磷酸钾,125mM氯化钾缓冲液作为流动相,柱温30℃,流速为0.5mL/min;检测波长为280nm。取对照品,用水稀释成2mg/mL的上样溶液,取50μL注入液相色谱仪,记录色谱图,平行测定3次,3次结果的主峰理论塔板数都不得低于2000,拖尾因子不得大于2.0,主峰与多聚体的分离度不得小于2.0。同法测定供试品,按面积归一化法计算,以3次检测结果的平均值作为最终检测结果。试验结果如图8和图9所示。

[0156] 试验结果显示,本发明抗体在模拟人玻璃体内注射稀释浓度下置于37℃进行研究,细胞生物学活性较为稳定,SEC主峰百分比变化很小,表明本发明抗体在本试验条件下稳定性较好,是一种玻璃体内注射后可在眼底部位发挥稳定生物学功能的抗VEGF单克隆抗体。

[0157] 尽管已经联系具体实施例及其实施例描述了本发明,但明显的是,本领域技术人员能够看出许多替代方案、修改和变动。相应地,旨在涵盖落在所附权利要求的精神和宽范围内的所有这样的替代方案、修改和变动。

[0158] 本说明书中提到的所有出版物、专利和专利申请均全文经此引用并入本说明书,就像各个出版物、专利或专利申请专门且逐一被指出经此引用并入本文。

序列表

<110> 百奥泰生物科技(广州)有限公司

<120> 一种长效低毒的重组抗VEGF人源化单克隆抗体及其生产方法

<160> 2

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 453

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	1	5	10	15
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Asp	Phe	Thr	His	Tyr	20	25	30	
Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	35	40	45	
Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu	Pro	Thr	Tyr	Ala	Ala	Asp	Phe	50	55	60	
Lys	Arg	Arg	Phe	Thr	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Tyr	65	70	75	80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Lys	Tyr	Pro	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Thr	Ser	His	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	100	105	110	
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	115	120	125	
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	130	135	140	
Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	145	150	155	160
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	165	170	175	
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	180	185	190	
Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	195	200	205	
Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	210	215	220	

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

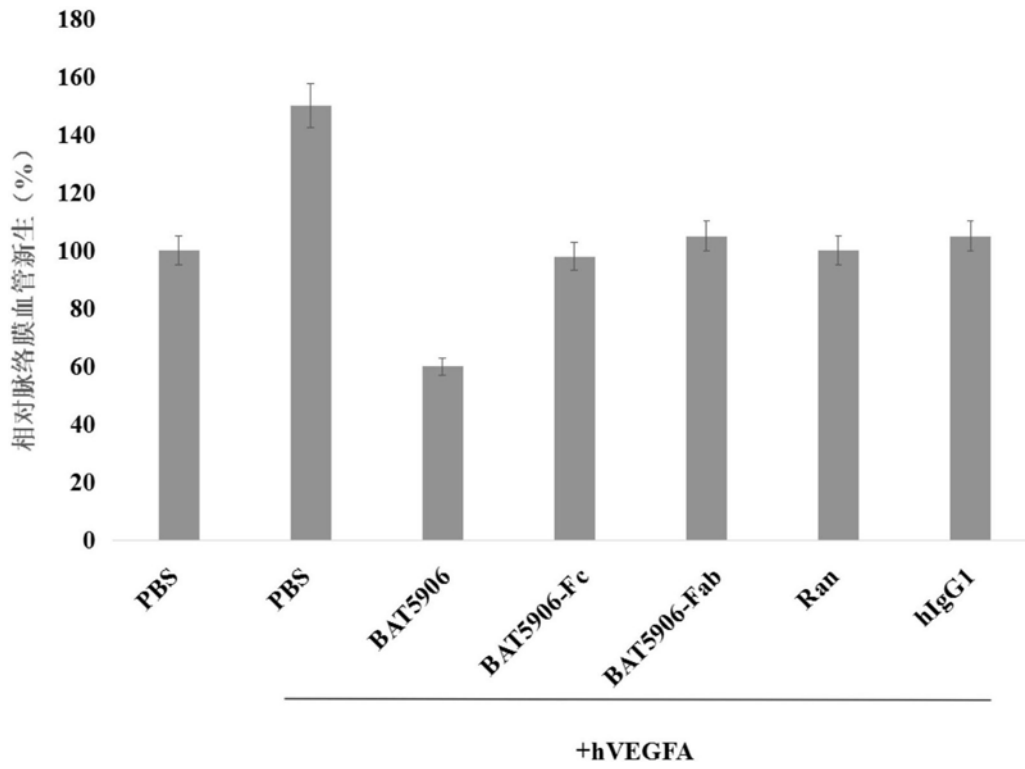


图1

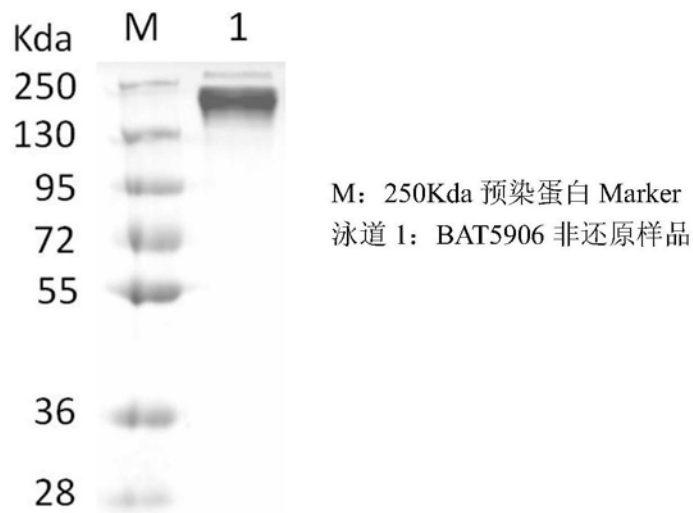


图2

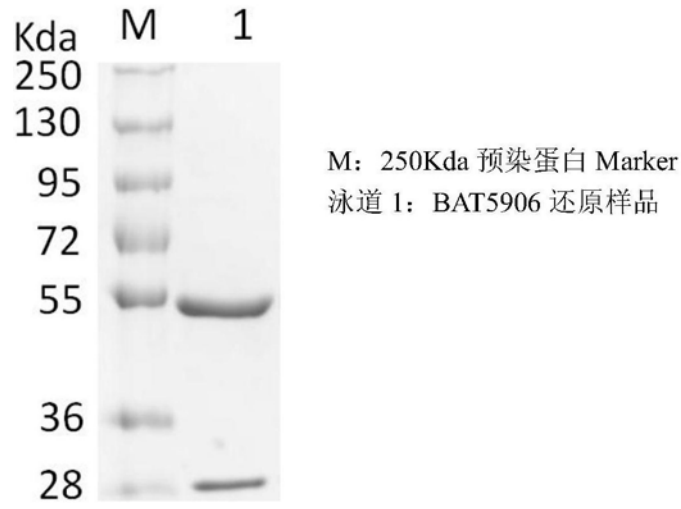


图3

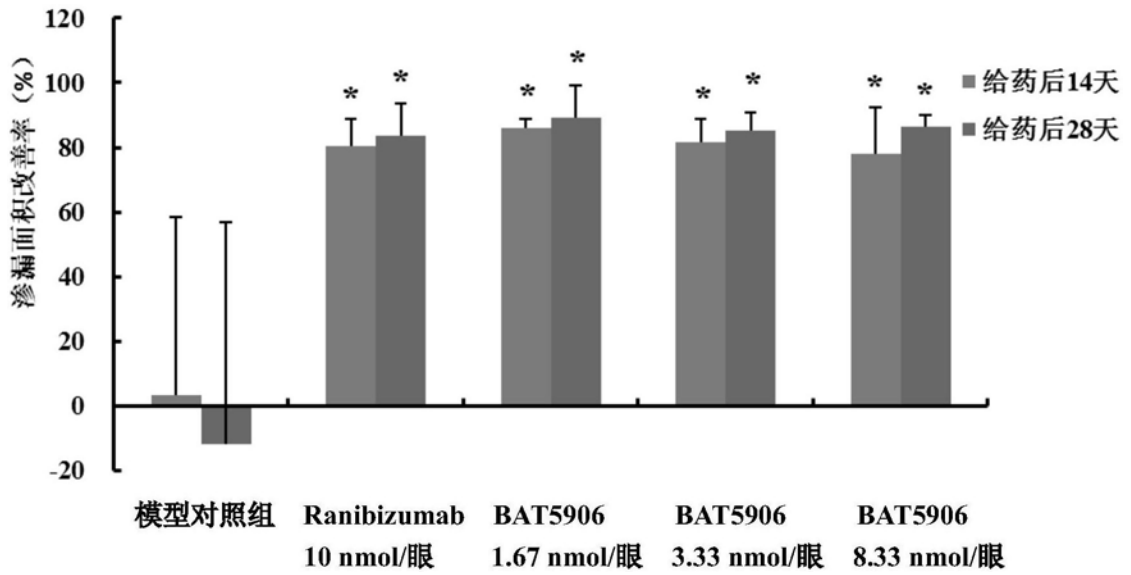


图4

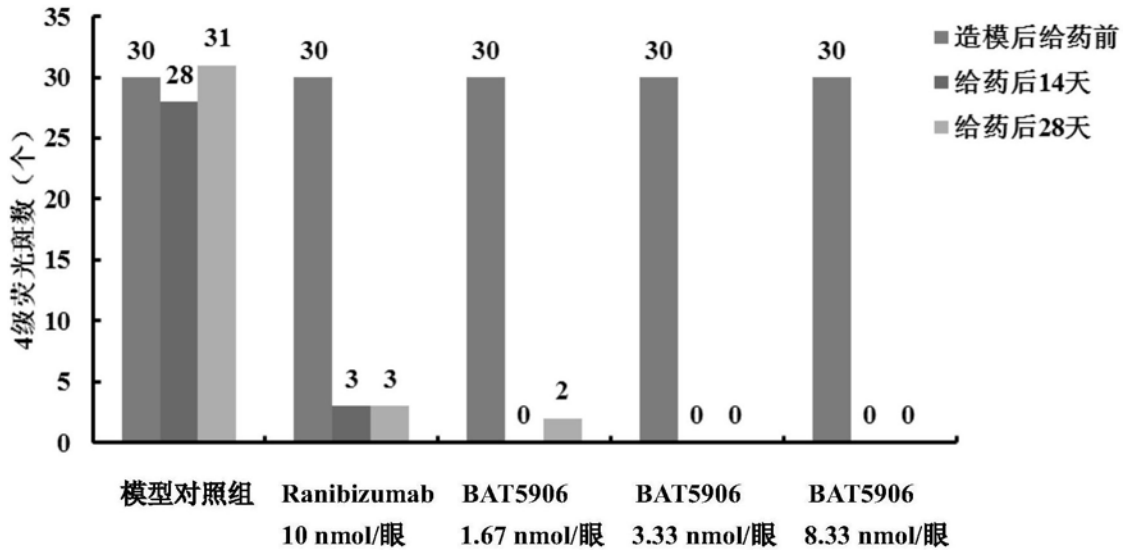


图5

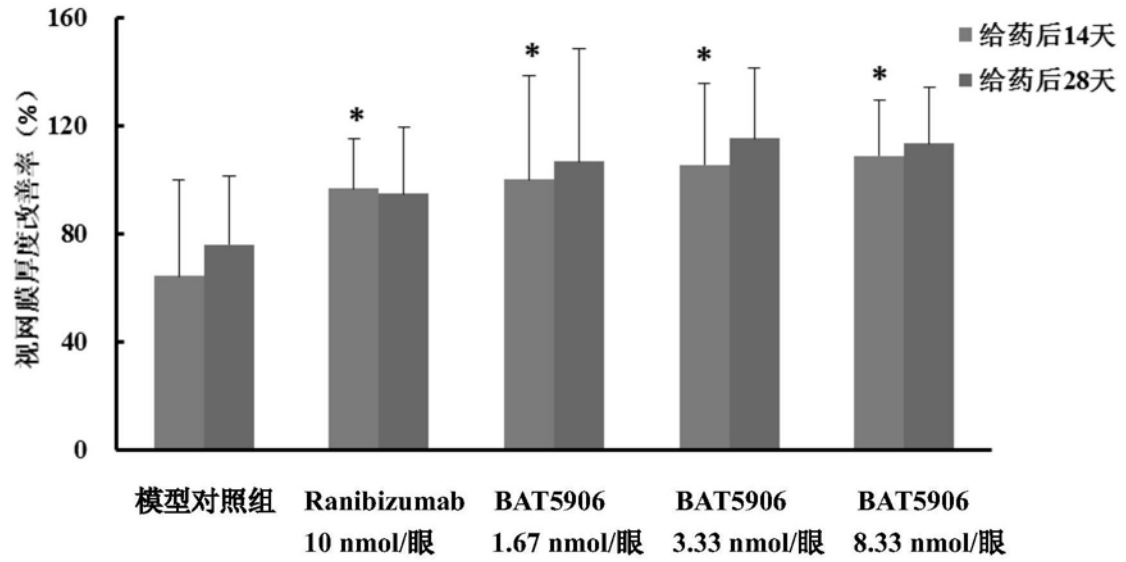


图6

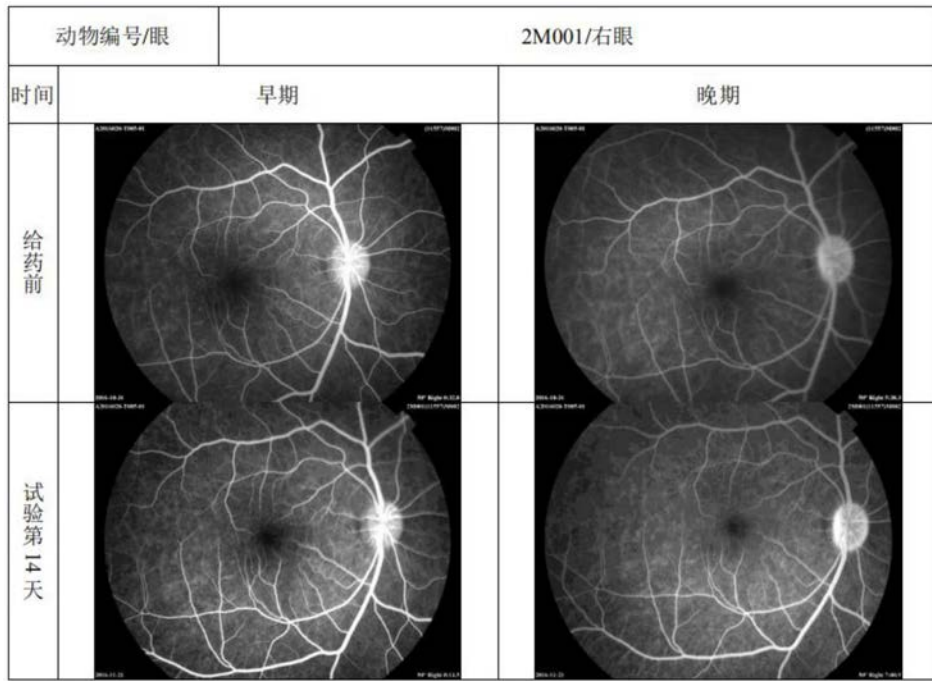


图7

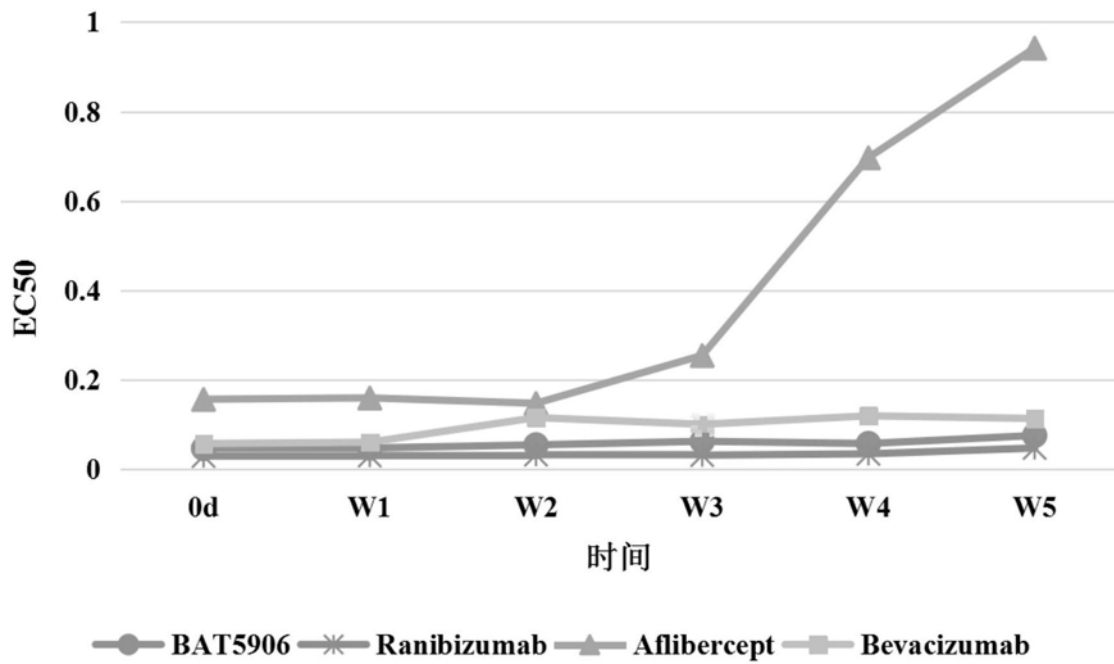


图8

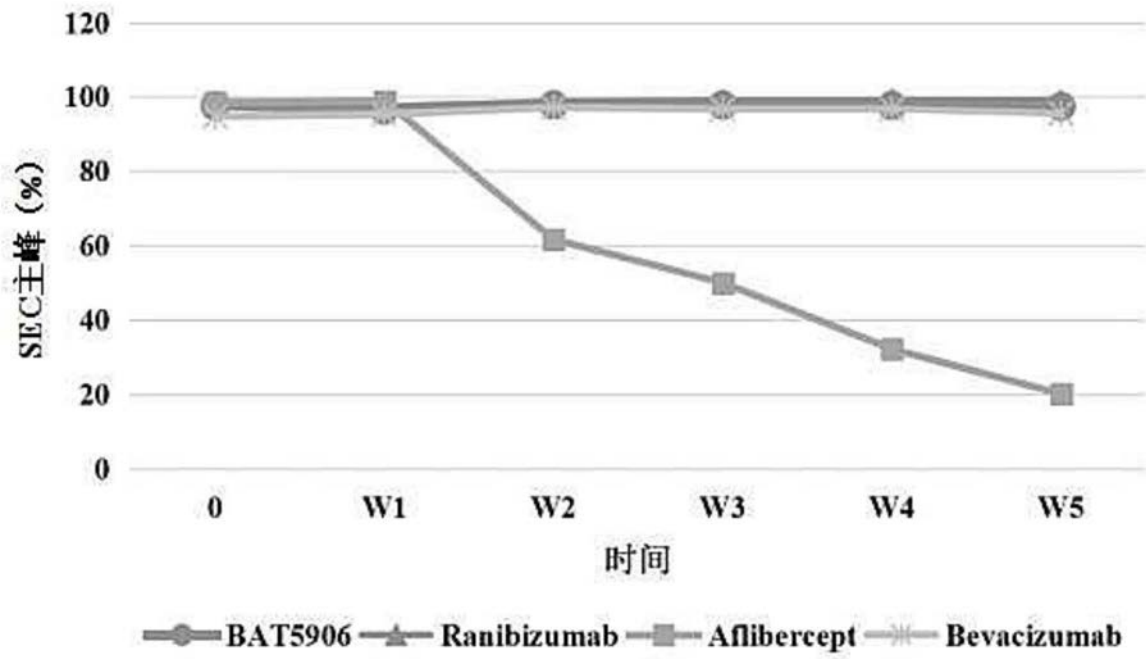


图9

专利名称(译)	一种长效低毒的重组抗VEGF人源化单克隆抗体及其生产方法		
公开(公告)号	CN110003328A	公开(公告)日	2019-07-12
申请号	CN201810011151.5	申请日	2018-01-05
[标]发明人	吴晓云 徐臣超 王志刚 李胜峰		
发明人	吴晓云 徐臣超 王志刚 李胜峰		
IPC分类号	C07K16/22 C12N15/13 A61K39/395 A61P27/02 G01N33/53 G01N33/68		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P9/10 A61P27/02 C07K16/22 C07K2317/24 C07K2317/51 C07K2317/515 C07K2317/76 C07K2317/92 A61K39/395 C07K16/24 G01N33/53 G01N33/68		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)
 本发明涉及一种可特异性结合VEGF的全长人源化单克隆抗体。所述的抗体可抑制VEGF与VEGFR-1和VEGFR-2的结合，从而抑制VEGF的信号传导。所述的抗体对VEGF具有很强的亲和力且半衰期较长，玻璃体注射后安全性较高。本发明的抗体可以有效治疗与VEGF过表达相关的疾病，尤其是VEGF过表达导致的血管生成异常相关的疾病。

