



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102892432 A

(43) 申请公布日 2013. 01. 23

(21) 申请号 201180024138. X

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2011. 05. 27

A61K 39/395 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61P 27/02 (2006. 01)

61/349, 271 2010. 05. 28 US

C07K 16/28 (2006. 01)

C07K 16/22 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 11. 14

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2011/058777 2011. 05. 27

(87) PCT申请的公布数据

W02011/147984 EN 2011. 12. 01

(83) 生物保藏信息

CNCM I-3204 2004. 04. 28

(71) 申请人 国家医疗保健研究所

地址 法国巴黎

申请人 玛博生命

(72) 发明人 P·勒布泰耶 A·邦叙桑

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平

权利要求书 2 页 说明书 17 页 附图 3 页

(54) 发明名称

用于治疗基于新血管生成的眼部疾病的
抗-CD160 特异性抗体

(57) 摘要

本发明涉及至少一种抗-CD160 抗体, 优选选自 CL1-R2 单克隆抗体 (其可通过杂交瘤 CNCM I-3204 获得)、其保守片段和其保守衍生物的化合物在制备设计用以治疗新生血管性眼部疾病的药物中的用途。

1. 抗 -CD160 抗体,用于治疗和 / 或预防新生血管性眼部疾病。
2. 根据权利要求 1 的抗 -CD160 抗体,其中所述抗 -CD160 抗体诱导活性增殖内皮细胞的细胞死亡。
3. 根据权利要求 1 或 2 的抗 -CD160 抗体,其中所述抗 -CD160 抗体为选自抗 -CD160 单克隆抗体、它们的保守片段和它们的保守衍生物的化合物。
4. 根据权利要求 1-3 任一项的抗 -CD160 抗体,其中所述抗 -CD160 抗体为选自 CL1-R2 单克隆抗体、其保守片段和其保守衍生物的化合物。
5. 根据权利要求 1-4 任一项的抗 -CD160 抗体和抗 -VEGF 抗体作为联合制剂,用于同时、分别或相继治疗和 / 或预防新生血管性眼部疾病。
6. 根据权利要求 1-5 任一项的抗 -CD160 抗体,其特征在于所述新生血管性眼部疾病选自:
 - 所有形式的角膜新血管形成;
 - 所有形式的视网膜病;
 - 诺里病;
 - 所有形式的脉络膜新血管形成、视网膜 - 脉络膜息肉状血管病、与近视和 Sorsby 氏营养不良相关的反凹脉络膜新生血管;
 - 葡萄膜黑色素瘤 ;和
 - 虹膜红变和新生血管性青光眼。
7. 根据权利要求 1-6 任一项的抗 -CD160 抗体,其特征在于新生血管性眼部疾病选自:
 - 作为角膜移植和 / 或角膜感染和 / 或选自病原体感染和化学烧伤的角膜环境性损伤的并发症发生的新血管形成;
 - 糖尿病性缺血性和水肿性视网膜病、早发性糖尿病性视网膜病、视网膜病的非增殖和增殖形式、黄斑囊样水肿、所有形式的年龄相关性黄斑变性 (AMD)、包括 Best 病的所有黄斑卵黄变性 ;眼部血管瘤如 Von Hippel-Lindau 氏病 ;Eale 氏病 ;Coats 氏病 ;
 - 诺里病 ;
 - 所有形式的脉络膜新血管形成、视网膜 - 脉络膜息肉状血管病、与近视和 Sorsby 氏营养不良相关的反凹脉络膜新生血管 ;
 - 脉络膜黑色素瘤及其转移 ;和
 - 虹膜红变和新生血管性青光眼。
8. 根据权利要求 1-7 任一项的抗 -CD160 抗体,用于治疗和 / 或预防耐抗 -VEGF 疗法的受试者的新生血管性眼部疾病。
9. 根据权利要求 1-8 任一项的抗 -CD160 抗体,用于治疗年龄相关性黄斑变性 (AMD)。
10. 根据权利要求 3-9 任一项的抗 -CD160 抗体,其特征在于所述化合物为单克隆抗体 CL1-R2。
11. 根据权利要求 3-9 任一项的抗 -CD160 抗体,其特征在于所述化合物为选自 CL1-R2 的 Fab、Fab₂、F(ab')₂ 和 dAb 的 CL1-R2 保守片段。
12. 根据权利要求 3-9 任一项的抗 -CD160 抗体,其特征在于所述化合物为选自衍生自 CL1-R2 并融合至 Fc 片段的 scFv、(scFv)₂、双抗体、多聚 scFv ;连接在一起达到整合形式的完整 CL1-R2 抗体 ;以及含有至少两个首尾连接的 Fab 的抗体的 CL1-R2 的保守衍生物。

13. 根据权利要求 3-9 任一项的抗 -CD160 抗体,其特征在于所述保守衍生物为单价或多价 scFv。

用于治疗基于新血管生成的眼部疾病的抗-CD160 特异性抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及至少一种抗-CD160 抗体,优选选自 CL1-R2 单克隆抗体(其可通过杂交瘤 CNCM I-3204 获得)、其保守片段和其保守衍生物的化合物在治疗和/或预防新生血管性眼部疾病中的用途。

背景技术

[0002] 世界上视力丧失的首要原因——眼部新生血管发生于眼睛的两个主要部位:视网膜和角膜。

[0003] 在富庶国家和贫穷国家,包括异常新生血管的视网膜疾病呈现渐增的发病率。在富庶国家,由异常新生血管恶化的糖尿病性视网膜病、早产儿视网膜病和年龄相关性黄斑变性(AMD)构成了巨大的经济负担以及全球低视力和法定失明的两个主要原因。

[0004] 就治疗成本和劳动力及正常社交网络中受影响患者的适当整合而言,并发异常角膜新血管形成的角膜感染或角膜移植(在患有遗传性角膜营养不良或遭受环境性损伤的患者中进行)也构成了重要的公共健康负担。年龄相关性黄斑变性和糖尿病性视网膜病的市场规模是巨大的。虽然就竞争市场而言是重要的,随着不断发展的研究学习,病态角膜新血管形成也对应于阻碍透明角膜移植的维持或甚至阻碍进行角膜移植的可能性的疾病的关键集合。

[0005] 视网膜新血管形成的发病机理是复杂的,并且对其的理解还不完全。当前的研究集中于血管疾病例如 AMD 中的缺氧、炎症和化脓的影响。

[0006] 该疾病的特点是视力下降、图象失真、和由于盲点的无法阅读。其部分地通过不管其形式(萎缩性或湿性)而产生的新血管的形成来诊断。

[0007] 当前对 AMD 的治疗性或预防性的治疗没有针对萎缩形式的。最近几年,抗-VEGF 人化单克隆抗体疗法(贝伐单抗(Avastin®)或兰尼单抗(Lucentis®))已经被广泛用于预防或抑制 AMD 和水肿性糖尿病性视网膜病的新生血管形式。然而,功效限于湿性 AMD 且该疗法还没有被用于阻断多种病理学的角膜新血管形成。此外,由于 VEGF 不是唯一的促血管生成因子,可预期抗性。

[0008] 而且,治疗期间出现许多不良副作用,特别是使用兰尼单抗时。用兰尼单抗治疗实际上引起结膜出血、眼睛疼痛、眼内压升高、虹膜炎或葡萄膜炎、以及视力障碍。约 10% 的湿性 AMD 形式无法(或仅少许)接受 Avastin®或 Lucentis®治疗。为了在众多患有湿性 AMD 形式的患者中获得稳定结果,可能在 2 年期间里用高达 24 次 Avastin®或 Lucentis®玻璃体内注射来治疗这些患者,这增加了有害事件的风险。

[0009] 因此在新生血管性眼部疾病的治疗中需要具有较少副作用的有效治疗剂。

发明内容

[0010] 因此,本发明涉及至少一种抗-CD160 抗体,优选选自 CL1-R2 单克隆抗体(其可通

过杂交瘤 CNCM I-3204 获得)、其保守片段和其保守衍生物的化合物在制备用于治疗 and / 或预防新生血管性眼部疾病的药物中的用途。

[0011] 本发明涉及至少一种抗 -CD160 抗体, 优选至少一种诱导活性增殖内皮细胞的细胞死亡的抗 -CD160 抗体, 用于治疗 and / 或预防新生血管性眼部疾病。

[0012] 本发明也涉及选自 CL1-R2 单克隆抗体 (其可通过杂交瘤 CNCMI-3204 获得)、其保守片段和其保守衍生物的化合物, 用于治疗 and / 或预防新生血管性眼部疾病。

[0013] 优选地, 所述至少一种抗 -CD160 抗体诱导活性增殖内皮细胞的细胞死亡。

[0014] 本发明也涉及抗 -CD160 抗体和抗 -VEGF 抗体作为联合制剂用于同时、分别或相继用来治疗 and / 或预防新生血管性眼部疾病。

[0015] 由于抗 -CD160 和抗 -VEGF 抗体作用于不同的靶标和生物途径, 抗 -CD160 抗体和抗 -VEGF 抗体的联合提高了用于治疗新生血管性眼部疾病的治疗策略成功的机会。

[0016] 本发明也涉及至少一种抗 -CD160 抗体, 用于治疗 and / 或预防耐抗 -VEGF 疗法的受试者的新生血管性眼部疾病。

[0017] 本发明进一步涉及治疗受试者, 优选人类的新生血管性眼部疾病的方法, 其中向所述受试者施用治疗有效量的抗 -CD160 抗体, 优选 CL1-R2、其保守片段或其保守衍生物。

[0018] 术语“CD160 抗体”或“抗 -CD160 抗体”是指任何结合人 CD160 的抗体。因此, 该术语包括针对 CD160 的免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分, 即含有免疫特异性结合 CD160 的抗原结合位点的分子, 包括肽。同样地, 术语抗体不仅指完整抗体分子, 还指抗体片段以及抗体和抗体片段的变体 (包括衍生物)。为了实现本发明的目的, 可相继或同时使用针对 CD160 的不同表位的几种抗 -CD160 抗体。根据本发明的抗 -CD160 抗体可为选自抗 -CD160 单克隆抗体、它们的保守片段和它们的保守衍生物的化合物。

[0019] 在本发明的上下文中, 所述抗体确实诱导活性增殖内皮细胞的细胞死亡且不直接作用于 VEGF。

[0020] 所述抗 -CD160 抗体可选自 CL1-R2、其保守片段和其保守衍生物。

[0021] CL1-R2 单克隆抗体可由 2004 年 4 月 28 日按照布达佩斯条约保藏于法国国家微生物保藏中心巴斯德研究所 (National Collection of Cultures of Microorganisms CNCM Institut Pasteur) (Institute Pasteur CNCM, 25 rue du Docteur Roux F-75724 Paris Cedex 15, 法国) 的杂交瘤细胞系获得。所保藏的杂交瘤的保藏号为 CNCM I-3204。

[0022] CD160 属于免疫球蛋白家族。人 CD160 的 cDNA 对应于 W098/21240 中描述的 SEQ ID NO :1 (1361bp) (DANA-FARBER 癌症研究所)。

[0023] 人 CD160mRNA 可在 GenBank 中以登录号 AF060981 获得; 鼠 CD160mRNA 可在 GenBank 中以登录号 AF060982 获得。

[0024] 人 CD160 蛋白序列对应于 W098/21240 中描述的 SEQ ID NO :2, 并可在 GenBank 中以登录号 AAC72302 (181aa) 获得。

[0025] CD160 为 27kDa 的糖蛋白, 其尤其存在于内皮细胞的表面。

[0026] CL1-R2 靶标, 即 CD160 受体通过活性增殖内皮细胞而非休止内皮细胞表达。活性增殖内皮细胞是形成新生血管, 尤其是存在于眼部疾病中的新生血管的原因。

[0027] CL1-R2 具有与 Avastin® 或 Lucentis® 不同的作用机理: 其仅诱导活性增殖内皮细胞的细胞死亡, 而不直接作用于 VEGF。其还对血管生成的新生血管具有非常高的特异性。

因此,该抗体令人惊讶地向耐抗-VEGF疗法的患者提供了良好的治疗潜力。因此,发明人担此重任而开发出了一种用于治疗患有不能通过抗-VEGF疗法而治疗的新生血管性眼部疾病的受试者的新生血管性眼部疾病的非常有前途的策略。

[0028] 因此,本发明也涉及至少一种抗-CD160抗体,用于治疗 and / 或预防耐抗-VEGF疗法的受试者的新生血管性眼部疾病。

[0029] 优选地,所述抗-CD160抗体诱导活性增殖内皮细胞的细胞死亡。

[0030] 优选地,所述抗体选自 CL1-R2 单克隆抗体(其可通过杂交瘤 CNCMI-3204 获得)、其保守片段和其保守衍生物。

[0031] 如本文所使用,表达“耐抗-VEGF疗法的受试者”适用于对所述抗-VEGF抗体而言为无应答者的受试者。对于“无应答者”,其是指用抗-VEGF抗体,受试者不恢复、改善、或稳定其病症。例如,耐抗-VEGF疗法的受试者为用抗-VEGF抗体未被成功治疗的受试者或已知不能成功应答基于抗-VEGF抗体的治疗的受试者。通过提供治疗患有新生血管性眼部疾病且耐抗-VEGF疗法的受试者的新策略,本发明实现了长期探索的需求。

[0032] 该抗体也可识别表位,所述表位在许多物种,如人、兔、鼠和猕猴中是常见的;这容易地允许动物实验。

[0033] 根据本发明,CL1-R2或其保守片段或其保守衍生物可用于治疗和/或预防眼部新生血管性疾病。

[0034] 对于“眼部新生血管性疾病”或“新生血管性眼部疾病”,其是指所有新生血管性眼部疾病,包括角膜、视网膜和脉络膜的所有新生血管性疾病。

[0035] 这些疾病包括:

[0036] ●所有形式的角膜新血管形成,无论其原因可能为何,包括作为角膜移植和/或角膜感染或包括病原体感染(如疱疹)和化学烧伤的角膜环境性损伤的并发症发生的新血管形成;

[0037] ●所有形式的视网膜病,包括糖尿病性缺血性和水肿性形式、早发性糖尿病性视网膜病、非增殖和增殖形式、黄斑囊样水肿、所有形式的年龄相关性黄斑变性(AMD)、包括 Best 病的所有黄斑卵黄变性(只要其伴有视网膜和/或脉络膜新生血管)、眼部血管瘤如 Von Hippel-Lindau 氏病;Eale 氏病;Coats 氏病;

[0038] ●诺里病(先天性胸水性玻璃体视网膜病);

[0039] ●所有形式的脉络膜新血管形成、视网膜-脉络膜息肉状血管病(无论其临床表现可能为何)、与近视和 Sorsby 氏营养不良(其几乎总与异常脉络膜新生血管相关)相关的反凹(retrofoveal)脉络膜新生血管;

[0040] ●葡萄膜黑色素瘤,包括脉络膜黑色素瘤及其转移;和

[0041] ●虹膜红变和新生血管性青光眼。

[0042] 然而,CL1-R2单克隆抗体、其保守片段和其保守衍生物靶向的新生血管性眼部疾病的范围可以更为广泛。

[0043] 优选地,眼部新生血管性疾病(或新生血管性眼部疾病)选自:

[0044] ●所有形式的角膜新血管形成,包括作为角膜移植和/或角膜感染和/或选自病原体感染(如疱疹)和化学烧伤的角膜环境性损伤的并发症发生的新血管形成;

[0045] ●所有形式的视网膜病,包括糖尿病性缺血性和水肿性形式、早发性糖尿病性视

网膜病、非增殖和增殖形式、黄斑囊样水肿、所有形式的年龄相关性黄斑变性 (AMD)、包括 Best 病的所有黄斑卵黄变性、眼部血管瘤如 Von Hippel-Lindau 氏病 ;Eale 氏病 ;Coats 氏病 ;

[0046] ● 诺里病 ;

[0047] ● 所有形式的脉络膜新血管形成、视网膜 - 脉络膜息肉状血管病、与近视和 Sorsby 氏营养不良相关的反凹脉络膜新生血管 ;

[0048] ● 葡萄膜黑色素瘤,包括脉络膜黑色素瘤及其转移 ;和

[0049] ● 虹膜红变和新生血管性青光眼。

[0050] 优选地,本发明涉及至少一种抗 -CD160 抗体,优选选自 CL1-R2 单克隆抗体、其保守片段和其保守衍生物的抗体,用于治疗 / 或预防所有形式的年龄相关性黄斑变性 (AMD)。

[0051] 对于“预防疾病”,其是指预防受试者,尤其是人的疾病发作,所述受试者的疾病尚未显现。

[0052] 对于“治疗疾病”,其是指减少疾病的发展或抑制疾病,即停止其发展、症状和疾病严重性的衰退或消失、或病因的终止。

[0053] 根据本发明,单克隆抗体 CL1-R2、以及其保守衍生物和其保守片段可用于预防和 / 或治疗眼部新生血管性疾病。

[0054] 对于抗 -CD160 抗体的“保守片段”和“保守衍生物”,其分别是指保留了所述抗体,优选 CL1-R2 对于 CD160 的结合亲和力和特异性的片段和衍生物。这种保守片段和保守衍生物在功能上与所述抗体,优选 CL1-R2 相同。它们是“保守的”,因为其如所述抗体,优选 CL1-R2 与相同的表位充分结合和 / 或对于结合 CD160,其能够与所述抗体,优选 CL1-R2 竞争,并且它们保留了结合 CD160 的特异性。该结合特异性是充分的以便保守片段或保守衍生物不结合除 CD160 外的其它 HLA 受体。

[0055] 对于抗 -CD160 抗体,优选 CL1-R2 的“片段”,其是指这种抗体的一部分,如重链、轻链、VL、VH、Fab、Fab'、F(ab)2、F(ab')2、或 dAb,以及任何由模拟高变区的氨基酸残基组成的最小单元,例如 CDR(CDR1H、CDR2H、CDR3H、CDR1L、CDR2L、CDR3L)。本发明抗 -CD160 抗体,优选 CL1-R2 的片段是保守的。

[0056] 只有抗体的一部分,即可变区涉及使抗体结合其表位。抗体的恒定区激活免疫效应物、噬菌细胞或杀伤细胞、以及补体,并且这些恒定区不涉及结合抗原。具有恒定区 (Fc) 的抗体酶解以致保持铰链区被指定为片段 F(ab')2 并保留两个抗原结合位点。

[0057] 类似地,其恒定区 (包括铰链区) 已被酶解的抗体、或不含该区而产生的抗体被指定为 Fab 片段并且仅保留了两个抗原结合位点中的一个。Fab 片段由共价连接至一部分重链 (称为 Fd) 的轻链组成。

[0058] 可变区中有互补决定区 (CDR, 互补决定区),也称作高变区,其与抗原直接相互作用。因此,修改 CDR 可助于改变抗体的亲和力。可变区中有称作框架区 (FR, 框架) 的第二类区域,其保留了 CDR 的三级结构。这些框架区是相当特异性的区域,抗体在其中产生。重链和轻链的 Fd 片段中有四个框架区 (FR1-4),分别被三个 CDR (CDR1-3) 分隔。

[0059] 本发明的保守片段也包括 dAb。dAb (单区抗体) 为仅包含一条蛋白质链的抗体,其衍生自抗体正常结构的两个区中的一个。事实上,在某些情况下,一半抗体可以以能与野

生型抗体的亲和力相比较的亲和力结合其靶抗原。

[0060] 根据本发明的抗-CD160 抗体,优选 CL1-R2 的保守片段可使用现有技术所熟知的方法制备。这种片段可通过常规方法获得,例如蛋白水解消化(例如,胃蛋白酶消化以产生 F(ab')₂;用木瓜蛋白酶消化以产生 Fab)。

[0061] 优选地,CL1-R2 的保守片段选自 CL1-R2 的 Fab、Fab'、F(ab)₂、F(ab')₂ 和 dAb。

[0062] 对于 CL1-R2 的“保守衍生物”,其是指融合至少一种与天然序列(例如另一物种的一个接头序列……)不同的序列的 CL1-R2 片段,优选包括 CL1-R2 的至少一种 CDR,优选 CL1-R2 的至少一种 CDR3,所述衍生物具有可与 CL1-R2 相比较的 CD160 结合亲和力、和与 CL1-R2 相似的 CD160 结合特异性。

[0063] 可根据本领域技术人员的一般知识、通过合成和/或基因工程获得该保守衍生物。

[0064] 本发明保守衍生物可为单价(单个 CD160 结合位点),或多价(至少两个 CD160 结合位点)。优选的保守多价衍生物包括四价保守衍生物。

[0065] 该保守衍生物包括嵌合抗体,其可通过将 CL1-R2 的至少一种 Fv 片段接枝至衍生自另一种抗体的 Fc 片段而获得。优选地, Fc 片段选择为对施用其的受试者具有尽可能少的免疫反应性。例如,当意欲将抗体施用于人时,所述 Fc 片段优选为人 Fc 片段。

[0066] 本发明保守衍生物也包括人化抗体,其可通过将至少一种 CL1-R2 或其部分接枝在人框架片段(hFR)上而获得。再一次,目标是获得对施用其的机体具有尽可能少免疫原性的抗体。

[0067] 本发明保守衍生物也包括单链可变片段 Fv:它们被称为 scFv。单链可变片段 scFv 为融合蛋白,包含轻链 VL 和重链 VH 的可变区,通过约 25 个氨基酸的短接头连接。适当的接头为允许 VH 和 VL 区以与完整抗体 CL1-R2 的初始结构相同的方式结构一致,并因此维持结合特异性的那些。这种接头为本领域技术人员已知的,例如申请 WO 88/01649(GENEX Corp.)中。该 scFv 可为单价或多价的。

[0068] 本发明保守衍生物也包括(scFv)₂,其为 scFv 的二聚体。

[0069] 本发明保守衍生物也包括双特异性抗体。双特异性抗体包含两种不同抗原的两个结合位点。它们包含至少一种抗原的 VH 和 VL 区,和另一种抗原的 VH 和 VL 区。

[0070] 优选地,根据本发明的双特异性抗体包含一个 CD160 结合位点,和一个 VEGF 结合位点。

[0071] 本发明保守衍生物也包括双抗体。

[0072] 双抗体为一类新的小二价和双特异性抗体片段。它们包含连接至通过肽接头连接的相同多肽链(VH-VL)上的 VL 区的 VH 区,所述肽接头太短以致不允许相同链上的两个区之间配对。这迫使与另一条链的互补区配对并促进具有两个功能性抗原结合位点的二聚分子的组装。

[0073] 为了构建双特异性双抗体,抗体 A 和抗体 B 的 V-区融合以产生两条链 VHA-VLB、VHB-VLA。每条链在结合抗原方面是无活性的,但与另一条链配对后重新产生了抗体 A 和 B 的功能性抗原结合位点。

[0074] 例如,CL1-R2 的保守衍生物包含 scFv,其包含至少一种通过肽接头 L 与至少一种 CL1-R2 的 VL 区连接的 CL1-R2 的 VH 区;该 scFv 可具有特异性 VL-L-VH 或 VH-VL-L 方向。

[0075] CL1-R2 的另一种保守衍生物包含衍生自融合 Fc 片段的 CL1-R2 的 scFv 多聚体。

[0076] CL1-R2 的另一种保守衍生物通过在完整 CL1-R2 的每条重链 H 的 C 端处添加一个或多个 CL1-R2 的 Fab 衍生物而获得。

[0077] CL1-R2 的另一种保守衍生物通过将完整 CL1-R2 抗体共价连接在一起以实现整合形式而获得。

[0078] CL1-R2 的另一种保守衍生物通过首尾连接两个或多个 Fab 而获得。

[0079] 本发明多价 scFv 可通过将至少两个 scFv (例如 (scFv)₂) 连接在一起而获得。该缔合可为共价或非共价的。作为例子可提及的是 scFv 四聚体 (4-CD160 结合位点)。多价 scFv 的好处是存在若干个 CD160 结合位点, 这增加了结合抗原的能力。

[0080] 多聚 scFv 可为单一特异性的, 即其所有结合位点靶向 CD160。

[0081] 或者, 该多聚 scFv 可包含一个或多个 CD160 结合位点、和一个或多个不同于 CD160 的其它抗原的结合位点。例如, 这种抗原可为 VEGF。

[0082] 制备多聚 scFv 的方法为现有技术已知的, 例如 WO 94/13806 (陶氏化学公司) 或 WO 93/11161 (Enzon Inc.)。

[0083] 优选地, 根据本发明的 CL1-R2 的保守衍生物选自 scFv、(scFv)₂、双抗体、衍生自 CL1-R2 并融合 Fc 片段的多聚 scFv、连接在一起以实现整合形式的完整 CL1-R2 抗体、和包含至少两个首尾连接的 Fab 的抗体形式。

[0084] CL1-R2 抗体、其保守片段之一或其保守衍生物之一可存在于药物组合物或药物中。该药物组合物优选包含药学上可接受的载体。术语“药学上可接受的”是指与生物体系相容的无毒材料, 且其不会干扰组合物的其它活性成分的生物活性效力, 所述生物体系例如细胞、细胞培养物、组织或器官。载体特性取决于施用方式。

[0085] 药物组合物或药物可为可施用于患者的任何形式, 并包括溶液、悬浮液、冻干粉、胶囊和片剂。

[0086] 药物组合物或药物可以以与注射 (即局部注射)、黏膜施用、吸入、口服施用和, 更通常地, 任何适于期望目的的制剂相容的形式存在。优选地, 药物组合物或药物以与结膜下、筋膜下 (sub-tenonal)、玻璃体内、视网膜下、眼框内、静脉内、肌内、皮肤下或眼内施用相容的形式存在。

[0087] 本发明进一步涉及治疗受试者, 优选人的新生血管性眼部疾病的方法, 其中向受试者施用治疗有效量的 CL1-R2、其保守片段或其保守衍生物。该 CL1-R2 抗体、其保守片段或其保守衍生物以治疗有效量施用。治疗有效量代表足以预防和 / 或治疗所靶向的新生血管性眼部疾病的量。该量可随受试者的年龄、性别和疾病阶段而变化并将通过技术人员来确定。治疗有效量可在 0.01mg/kg 和 50mg/kg 之间, 优选 0.1mg/kg 和 20mg/kg 之间和更优选 0.1mg/kg 和 2mg/kg 之间变化, 优选每月施用一次。

[0088] 施用方式可为通过注射或逐步输液。注射优选在玻璃体内。

[0089] 玻璃体内施用制剂可包括水性或非水性无菌悬浮液或乳剂。非水性溶剂的实例为丙二醇、乙二醇、植物油例如橄榄油或可注射有机酯例如油酸乙酯。水性载体包括水、醇 / 水溶液、乳剂或悬浮液。

[0090] 本发明的 CL1-R2、其保守片段的一种或其保守衍生物之一也可包括另一种成分。例如, CL1-R2、其保守片段或其保守衍生物可为经标记的。标记物的实例包括酶、放射性同

位素、荧光化合物、胶状金属、化学发光化合物和生物发光化合物。将标记物结合至抗体的方法是本领域技术人员已知的。

[0091] 另一种标记技术在于将抗体耦合至低分子量半抗原；这些半抗原可为通过第二反应而特定修饰的。半抗原的实例为生物素（其与抗生素蛋白反应）、二硝基酚、吡哆醛、或荧光素（其可与特定抗半抗原反应）。

[0092] 在一个优选的实施方案中，本发明抗体可用可检测分子或物质来标记，例如荧光分子、放射性分子或任何其它本领域已知的标记物。标记物为本领域已知的，其通常（直接或间接地）提供用作信号。

[0093] 如本文所使用，关于抗体的术语“标记的”意指通过将可检测物质，例如放射性试剂或荧光团（例如异硫氰酸荧光素 (FITC) 或藻红蛋白 (PE) 或吖啶菁 (Cy5)) 耦合（即物理连接）至抗体而涵盖抗体的直接标记、以及通过与可检测物质反应而涵盖抗体的间接标记。

[0094] 本发明的抗体可用放射性分子、通过本领域已知的任何方法来标记。例如，放射性分子包括但不限于用于影像学研究的放射性原子，例如 I123、I124、In111、Re186、Re188。本发明的抗体也可用于核磁共振 (NMR) 成像（也称作磁共振成像, mri）的自旋标记物来标记，例如碘 -123、碘 -131、铟 -111、氟 -19、碳 -13、氮 -15、氧 -17、钆、锰或铁。

[0095] 附图简要说明：

[0096] 图 1 :CL1-R2 抑制 FGF2- 诱导的兔角膜新血管生成。对照 IgG1 (Ctrl)- 和 CL1-R2- 处理的角膜中新血管形成的定量分析。值为四个单独实验获得的平均值 \pm SEM, 每个实验的 $n = 5$ 只兔每组。*** $P < 0.0001$ (Mann-Whitney 测试)。含 FGF2 植入物的角膜移植 8 天后评价新血管形成。移植后 24 和 72 小时进行 CL1-R2 或 IgG1 Ctrl 的结膜下注射并基于由异色边缘向含 FGF2 植入物的新形成血管的长度计分 4- 级等级。

[0097] 图 2A 和 B :CL1-R2 减少氧诱导视网膜病的鼠科模型中视网膜新血管形成。来自小鼠的视网膜血管形成（组织学, 视网膜切片计数）的定量评价, 所述小鼠暴露于带有对照 IgG1 (Ctrl, $5 \mu\text{g}$, $n = 9$)、或 CL1-R2 ($5 \mu\text{g}$, $n = 11$) 的无注射（“模拟”, $n = 6$) 或玻璃体内注射的高含氧条件下。内皮细胞 (EC) 核 (A) 和血管内腔 (B) 的平均数。** $P < 0.001$ 。

[0098] 图 3A 和 B :CL1-R2 和贝伐单抗 /Avastin® 减少氧诱导视网膜病的鼠科模型中视网膜新血管形成的各自能力的比较。定量评价视网膜血管形成。内皮细胞核 (A) 和血管内腔 (B) 的平均数采用聚集数据的 Poisson 衰退模型来测定。平均数评估的 95% 置信区间显示为误差棒。通过 Bonferroni 法校准 P 值, 用于事后组比较。* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ 。

[0099] 图 4 :CL1R2 和抗 -VEGF 抗体在抑制新血管形成上的协同效应。

[0100] 几组兔中获得的结果, 向所述兔施用：

[0101] - 仅 IgG1 (注射 $25 \mu\text{g}$) ;

[0102] - 仅 Avastin® ($25 \mu\text{g}$ 注射 2 次) ;

[0103] - 仅 CL1-R2 (25 、 50 或 $100 \mu\text{g}$ 注射 2 次) ;

[0104] -Avastin® 与 IgG1 联合 ; 和

[0105] -Avastin® 与 CL1-R2 联合。

[0106] 级对应于新生血管的长度。

[0107] 图 5 :完整形式的 CL1-R2 以及 Fab' 2 形式的 CL1-R2 的效果。

[0108] 该图显示了完整形式的 CL1-R2、Fab' 2 形式的 CL1-R2 对角膜新血管形成的效果，以及通过对照 IgG1 提供的效果。

[0109] 级对应于新生血管的长度。

[0110] 图 6 :AMD (激光诱导 CNV) 小鼠模型中小鼠和嵌合抗 -CD160mAb 的效果

[0111] 几组小鼠中获得的结果,向所述小鼠施用:

[0112] - 小鼠 IgG1 同型对照;

[0113] -Kenacort retard 40 ®;

[0114] -CNX46.3 (来自 eBioscience 的大鼠抗小鼠 CD160mAb);

[0115] - 小鼠抗人 CD160Fab' 2;

[0116] - 小鼠抗人 CD160IgG1;和

[0117] - 合抗人 CD160IgG1。

[0118] 测量新生血管表面积的平均数。

具体实施方式

[0119] 实施例 1:

[0120] 材料和方法

[0121] 鼠科抗 -CD160 CL1-R2mAb。该小鼠抗 -CD160CL1-R2mAb(IgG1) 生长于我们的实验室并在第七届人类白细胞分化抗原研讨会 (7th Human Leukocyte Differentiation Antigen Workshop (26)) 期间作为抗 -CD160mAb 评价。我们由特定分泌杂交瘤细胞系、通过使用高细胞密度体系 CeLLine (VALDEA Biosciences) 制备 CL1-R2mAb。小鼠 IgG1 同型对照单克隆抗体 He6 通过用乙肝表面抗原 (HB) 使小鼠免疫而产生。CL1-R2 和 IgG1 同型对照都通过在 ÄKTA™ 纯化体系中 HiTrap™ 蛋白 G 柱 (GE Healthcare) 上的亲和层析类似地纯化、用 PBS pH 7.0 透析、浓缩和通过 0.22-µm 过滤器过滤。

[0122] 动物。我们使用 BALB/c、C57BL/6J 和 NMRI-nu(nu/nu) 裸鼠 (Janvier Laboratories)。除了用于缺血性视网膜病实验的那些 (其为 7 天大) 之外,小鼠为 7-10 周大。动物居住于常规温度控制室 (21°C),当通过 Jackson 实验室测定 C57BL6/J 小鼠品系时暴露于每天 12-小时周期的光暗条件并用平衡饮食随意喂食。我们使用来自 Institut National de la Recherche Agronomique (Castanet-Tolosan) 的雄性新西兰白化病兔。对于小鼠视网膜实验,根据动物保健机构委员会的指导处理动物,使用经伦理委员会 (Ethics Committee) 和眼科和视力研究中使用动物 (Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research) 的 ARVO 声明批准的方案。依照欧盟指导并经当地伦理委员会 (Midi-Pyrénées, 法国) 批准进行所有其它动物实验。

[0123] 体内兔角膜血管生成试验。本研究中使用的角膜袋试验先前已经描述 (28)。我们在角膜上部制造切口,距麻醉兔异色边缘 2mm。将 FGF2- 处理的植入物 (500ng, R&D Systems) 插入该袋中。角膜移植后 24 和 72 小时向异色边缘上部施用 CL1-R2mAb 或对照 IgG1 (100 µg 于 30 µl PBS 中) 的结膜下注射。移植 8 天后测量角膜新血管形成并基于由异色边缘向含 FGF2 植入物的新形成血管的长度在四级等级上计分 (28)。

[0124] 氧诱导视网膜病和玻璃体内注射的鼠科模型。使用氧诱导视网膜病的完善和可重复模型,在小鼠 C57BL/6J 幼崽中诱导视网膜新血管形成 (32)。简言之,将小鼠 (7 天大,P7)

和它们的哺乳期母亲置于密封孵化器中并暴露于 $75 \pm 2\%$ 氧气氛 5 天。用 PROOX 氧分析器（模型 110, BioSpherix）持续监控氧水平。P12 时移出小鼠并将其维持于含氧量正常条件（室空气）下直至 P17。在操作显微镜下玻璃体内注射小鼠。除无注射组之外, P12 时每只幼崽在其左眼和右眼接受玻璃体内注射。简言之, 用肌内注射克他命 ($100\text{mg}/\text{kg}$ 体重) 和甲苯噻嗪 ($10\text{mg}/\text{kg}$ 体重) 麻醉小鼠幼崽。用微型剪刀打开睑裂并用局部 10% 苯肾上腺素和 0.5% 托品酰胺扩大瞳孔。将安装于 $5 \mu\text{l}$ Hamilton 注射器上的 10-mm 33- 号钢针尖通过巩膜（角膜巩膜异色边缘后 1mm ）推入玻璃体。将大约 $1 \mu\text{l}$ 的 CL1-R2mAb ($5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$)、贝伐单抗 ($25 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, Roche) 或 IgG1 同型对照 mAb ($5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) 注入玻璃体腔。

[0125] 视网膜新血管形成的定性和定量评价。P17 时处死小鼠以通过组织学和定量测量分析新血管形成。某些小鼠用荧光素 - 右旋糖酐经历视网膜血管造影。对于该定性评价, 我们如前所述麻醉小鼠幼崽并使用含 $50\text{mg}/\text{ml}$ 荧光素标记的右旋糖酐 (2×10^6 平均分子量, Sigma) 的 1ml PBS (已经通过以 10000rpm 离心 5min 澄清) 通过左心室灌注心脏。摘除眼睛并在 4% 多聚甲醛中固定 3 小时。移除角膜和晶状体并从眼罩剥离出视网膜。将视网膜切成四象限并平装在盖玻片下的 Vectashield 中用于通过荧光显微镜检测。检测每种处理的至少 12 只眼睛。对于组织学分析, 处死小鼠幼崽, 摘除它们的眼睛, 4°C 下在 4% 多聚甲醛固定至少 16 小时并埋入石蜡中。我们用 HM355、MICROM MICROTREC 显微镜用薄片切片机制备了径向 $5\text{-}\mu\text{m}$ 切片, 用高碘酸 - Schiff 试剂染色该切片并用 H&E 复染色。我们在视神经的每一侧上计数 5-8 个切片。两名受训调查人在 $\times 100$ 放大倍率下盲目计数每个完整切片中跨越整个视网膜样品的新生血管内皮细胞和血管内腔数。使用用于聚集数据的 Poisson 衰退模型测定内皮细胞核和血管数量的平均数; 平均数评估的 95% 置信区间表示为误差棒。通过 Bonferroni 法校准 P 值, 用于事后组比较。

[0126] 统计学。对于小鼠和兔模型实验, 用 GraphPad Prism 4 或 Prism 5 程序分析定量数据 (表示为平均值 \pm SEM)。对每个动物测定每个可变血管平均值 (活体显微镜和组织学分析), 并使用这些值计算每个实验组中所有动物的总平均。在进行统计测试前, 我们确定数据是否是正常分布并评价它们的差异。然后, 我们如所示进行适当的测试。对于体内时间 - 过程实验, 我们使用两路 ANOVA 分析或 Student' s t- 测试。我们报告了每个测试的实际 P 值。 $P < 0.05$ 被认为是统计学显著的。对于视网膜计数, 因为在属于相同眼睛和相同小鼠的组织学切片间有 2 个嵌套的相关水平, 使用 SAS 统计包 v9. 1. 3 的 proc GLIMMIX (Sas Institute), 通过 Poisson 广义线性混合模型 (59) 分析细胞核和血管内腔计数。我们视实验处理组为固定影响因素并视单个眼睛为随机影响。在上限处, 通过定义小鼠为簇用计算机计算固定影响评估的稳健实证方差 (60)。 $P < 0.05$ 被认为是统计学显著的。

[0127] 结果

[0128] CL1-R2mAb 抑制兔角膜和小鼠模型中氧诱导视网膜病中眼部新血管形成。通过使用两个不同的眼部新血管生成动物模型体内评价 CL1-R2mAb 的抗血管生成性质。对于这些研究, 脊椎动物眼睛具有优势, 其被认为是免疫豁免位点 (31), 因此可能缺乏可结合 CL1-R2 的免疫细胞。我们首先使用兔角膜袋试验 (28) 以确定 CL1-R2 是否抑制成纤维细胞生长因子 2 (FGF2) 诱导的角膜新血管形成。角膜通常缺乏血液和淋巴血管并积极维持该无血管性 (31)。在该模型中, 新生血管由异色边缘引起。含 FGF2 的角膜植入物的移植和两次 $100 \mu\text{g}$ CL1-R2 或对照 IgG1 结膜下注射 8 天后评价新血管形成。当与对照 IgG1- 处

理兔相比,用 CL1-R2 处理显著地减少了角膜新血管形成(图 1)。这些发现表明 CL1-R2 处理抑制生长因子诱导的角膜新血管形成。接着,通过将早产新生小鼠(P7-P12)暴露于高氧水平,在人早产儿视网膜病的小鼠模型中研究 CL1-R2 的效果(32,33)。在 100% 这些动物中,向含氧量正常条件的恢复诱导了视网膜缺血和 VEGF 相关的视网膜前血管形成(32)。首先在 CL1-R2 或对照 IgG1 的玻璃体内注射之后,在平装 FITC-右旋糖酐-灌注完整视网膜上进行视网膜脉管系统的定性评价(数据未显示)。来自正常未处理动物的视网膜显示正常的血管形成,即由视神经向外围延伸的表面和深血管层。血管在表面视网膜层中形成径向分枝图案和在深视网膜层中形成多边形网状图案。未经眼内注射(‘模拟’)或对照 IgG1(‘Ctrl’)的眼内注射的氧处理动物的视网膜显示了新生血管簇,其释放荧光素并具有曲折放射状血管和中央无血管区,与该模型的之前描述一致(32,33)。眼内注射 CL1-R2 之后,无血管区域的尺寸显著减少,并且视网膜包含更少的新生血管簇和更少的曲折及扩大的放射状血管(数据未显示),表明中央血管中更好的灌注效率。通过组织学进一步分析来自多种未处理或氧处理动物的眼睛。用高碘酸-Schiff 试剂染色一系列眼部组织切片以显现内皮细胞核(数据未显示)。与来含氧量正常环境中小鼠的视网膜(正常视网膜)不同,模拟处理小鼠的视网膜典型地在玻璃体空间和视网膜内层中包含多种尺寸的、丰富的纵向和横向的异常微血管、以及内皮细胞核。来自对照 IgG-处理动物的视网膜显示了相似的新血管形成,其具有丰富的异常微血管和内皮细胞核。相反,来自注射了 CL1-R2 的小鼠的视网膜具有明显较少的异常血管,其尺寸大幅减少,尤其是在玻璃体空间中和视网膜内,并具有更少的内皮细胞核。为了量化视网膜的新血管形成,在施用抗血管生成或对照处理之前和之后,在大量样品中计数新生血管的内皮细胞核和内腔(图 2, A 和 B)。这些是精确评价任何视网膜抗血管生成效果的关键参数。与注射了对照 IgG1 的动物($P < 0.001$;图 2A)相比,CL1-R2 的玻璃体内注射显著地减少了神经节细胞和内核层中每切片的内皮细胞核的平均数。此外,当分别与模拟-处理($P < 0.001$)或 IgG1-处理的对照小鼠($P < 0.001$)相比时,CL1-R2 的眼内注射减少了每切片的血管内腔平均数~50%和~35%(图 2B)。随后在无争议(关于贝伐单抗中和鼠科 VEGF-A 的特异性)的相同小鼠模型中将 CL1-R2 处理效果与广泛使用的 mAb 贝伐单抗的效果相比较(34)。多篇报道确实已经最终证实了贝伐单抗在处理这些动物的实验诱导的角膜新血管形成中是有效的,尽管其对于通过小鼠、大鼠、豚鼠和兔产生的 VEGF-A 的亲和力较弱(35-39)。此外,最近的研究明确显示贝伐单抗在氧诱导的视网膜病小鼠模型中的视网膜血管生成上具有非常明显的抑制效果(40)。这些最近结果与我们的结果完全相符。眼内注射贝伐单抗之后,在平装视网膜上观察到了正常的视网膜血管形成,其与 CL1-R2 处理后所得的相当(数据未显示)。定量分析显示注射贝伐单抗的小鼠中每切片的血管内腔的平均数低于 IgG1-处理的对照小鼠中的平均数,并且在 CL1-R2-处理和贝伐单抗-处理的小鼠之间没有显著差异(图 3, $P = 0.93$)。

[0129] 综上,这些数据表明 CL1-R2mAb 单一疗法有效地抑制了兔角膜和具有早产视网膜病的小鼠模型中的病态血管生成。

[0130] 实施例 2:CL1R2 和抗-VEGF 抗体在抑制新血管形成上的协同效应

[0131] 通过使用如实施例 1 的带有 FGF2-处理的植入物的角膜血管生成模型,发明人评价了 CL1-R2mAb 联合抗-VEGF 抗体(Avastin®)的体内抗血管生成性质。

[0132] 为此目的,他们比较了获自几组兔的结果,向所述兔施用:

[0133] - 仅 IgG1 (注射 25 μ g) ;

[0134] - 仅 Avastin® (25 μ g 注射 2 次) ;

[0135] - 仅 CL1-R2 (25、50 或 100 μ g 注射 2 次) ;

[0136] -Avastin®与 IgG1 联合 ;和

[0137] -Avastin®与 CL1-R2 联合。

[0138] 每组包括 4 只兔。级对应于新生血管的长度。

[0139] 结果示于图 4。发明人证明了在眼部新生血管生成模型中抑制新生血管形成中一起使用 CL1-R2 和抗 -VEGF 抗体提供了更好的结果。

[0140] 该结果表明 CL1-R2 和抗 VEGF 在联合治疗新生血管性眼部疾病中非常有用,因为它们的联合提供了新血管形成的协同抑制。

[0141] 实施例 3 :完整形式的 CL1-R2 以及 Fab' 2 形式的 CL1-R2 的效果

[0142] 发明人比较了完整形式的 CL1-R2 和 Fab' 2 形式的 CL1-R2 在角膜新生血管形成上的效果。为此目的,他们使用对照 IgG1。

[0143] 结果披露于图 5。级对应于新生血管的长度。发明人已经表明,与对照 IgG1 提供的效果相比,完整形式的 CL1-R2 在抑制新生血管形成上提供了更好的结果。

[0144] 他们进一步证明了 Fab' 2 形式非常适于抑制新生血管形成,因为其与完整形式 CL1-R2 和对照 IgG1 相比提供了更好的结果。

[0145] 实施例 4 :AMD 小鼠模型中小鼠和嵌合抗 -CD160mAb 的效果

[0146] 本研究的目的是评价在再现 AMD 的许多特征的脉络膜新生血管形成 (CNV) 的小鼠模型中,小鼠和嵌合抗 -CD160mAb 对抑制病态眼部新生血管形成的治疗效果。通过氩激光影响施用诱导脉络膜血管生成。通过体内血管造影术定性评价 CNV,和通过直接测量平装脉络膜上的 CNV 面积定量评价 CNV。

[0147] 材料和方法

[0148] 动物

[0149] 由 Janvier Laboratories (Lassalle, QC) 获得雄性 C57Bl/6J 小鼠 (6 周大)。动物居住于常规温度控制室 (21°C),具有每天 12h 日光周期。对于由 Jackson 实验室推荐的 C57BL6/J 小鼠品系随意喂食平衡饮食。根据动物保健机构委员会的指导处理动物,使用经机构审查委员会 (institutional review board) 批准的方案,并依照眼科和视力研究中使用动物的 ARVO 声明。在整个体内实验监控小鼠的一般状态,包括它们的体重、食物摄入和行为。

[0150] 激光诱导 CNV 的鼠科模型

[0151] 如前所述,通过 Bruch' s 膜的氩激光诱导的破裂产生 CNV (Tobe 等,1998,Edelman JI 2000 ;Montezuma SR 等,2009)。通过肌肉注射 100mg/kg 克他命 (克他命 1000®,Virbac France, Carros, 法国) 和 10mg/kg 甲苯噻嗪 (Rompun 2%®, Bayer Pharma, Puteaux, 法国) 的混合物麻醉小鼠。用 0.4% 奥布卡因盐酸盐 (Cebesine®, Chauvin Laboratory, Montpellier, 法国) 麻醉小鼠角膜并用 10% 苯肾上腺素 (Neosynephrine Faure 10%®, Pharmaster. Erstein. 法国) 和 0.5% 托品酰胺 (Mydriaticum®, Farmila, Thea Farmaceutici, Settimo Milanese, 意大利) 眼滴剂扩大瞳孔。

[0152] 使用小心校准的氩激光在每只小鼠的一只眼睛中诱导 3 种激光诱导影响 (通常在

视盘周围 9、12 和 3 点钟位置),以引起 Bruch's 膜分裂和萌发自镑伊施氏膜(光点直径 50 μm ;功率 400mW,曝光时间 100ms,Ophthalmas,Biophysics Medical,Clermont Ferrand,法国)和隐形眼镜的二级脉络膜新血管形成。在本研究所包括的所有处理的眼睛中,激光处理后在视网膜表面观察到了活性创伤性泡,这提供了适当对焦的证据并作为 Bruch's 膜破裂的迹象。

[0153] 玻璃体内注射方案

[0154] 在操作显微镜下进行所有程序和,每个动物在氩激光施用之后 1 天接受玻璃体内注射入眼。

[0155] 将小鼠(6 周大)分配为 6 组:

[0156] 组 1:嵌合抗人-CD160mAb-处理的小鼠(CL1-R2chim.,n=15);

[0157] 组 2:小鼠抗人-CD160mAb-处理的小鼠(CL1-R2,n=17);

[0158] 组 3:小鼠 IgG1 同型对照 mAb-处理的小鼠(HE6,n=15);

[0159] 组 4:大鼠抗小鼠 CD160mAb-处理的小鼠(CNX46-3,n=14);

[0160] 组 5:小鼠抗人-CD160mAb Fab' 2 片段-处理的小鼠(Fab' 2,n=15);

[0161] 组 6:Kenacort retard 40 $\text{\textcircled{R}}$ -处理的小鼠(Kenacort,n=15)。

[0162] 通过肌肉注射克他命(100mg/k)和甲苯噻嗪(10mg/kg)的混合物来麻醉小鼠。用局部 10%苯肾上腺素和 0.5%托品酰胺放大瞳孔。将安装于 5 μl Hamilton 注射器的 10mm 33 号钢针的尖通过巩膜推入玻璃体中在角膜巩膜异色边缘之后 1mm 的位置。对于每个产品,将 1 μl 注射入玻璃体腔:

[0163] * 嵌合抗人-CD160mAb(10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$,批次 29120-00, MAT 生物制药),

[0164] * 小鼠抗人-CD160mAb(10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$,批次 280910-00, MAT 生物制药),

[0165] * 小鼠 IgG1 同型对照 mAb(10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$,批次 191110-00, MAT 生物制药),

[0166] * 大鼠抗小鼠 CD160mAb(10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, eBioscience),

[0167] * 小鼠抗人-CD160mAb Fab' 2 片段(10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$,批次 191110-00, MAT 生物制药)

[0168] *Kenacort retard 40 $\text{\textcircled{R}}$ (40mg/ml, Bristol Myers Squibb, 法国)。

[0169] CNV 的定性和定量评价

[0170] 氩激光施用后 14 天和 21 天,小鼠经历荧光素血管造影以定性评价脉络膜的新血管形成。氩激光施用 21 天后处死小鼠,以定量分析脉络膜平装。

[0171] 体内血管造影-激光诱导影响诱导之后 14 天和 21 天进行荧光素血管造影。如前所述麻醉小鼠并在腹膜内注射 0.5ml 10%荧光素钠(10% Faure $\text{\textcircled{R}}$, Novartis Pharma, Rueil-Malmaison, 法国)之后拍摄一系列眼底照片(Canon CF-60UVi, Haag-Streit, Chambery, 法国)。来自新形成的异常渗透血管的荧光素渗漏导致在氩激光影响诱导的病变位点处超荧光点的显影,明显地区别于正常视网膜和脉络膜脉管系统。

[0172] 脉络膜平装-激光处理后 21 天,用通过 10000rpm(1110xg)下离心 5 分钟澄清的 300 μl 50mg/ml 荧光素-标记的右旋糖酐的 PBS 溶液(异硫氰酸荧光素-右旋糖酐, 2×10^6 平均分子量, Sigma, 法国)通过左心室进行心脏灌注。将激光-处理的眼睛摘除并立即通过 4 $^{\circ}\text{C}$ 下培养在 4%多聚甲醛中固定至少 16 小时。移除角膜和晶状体并从眼罩小心剥离出整个视网膜。通过 4 至 5 个放射状切口剥离出视网膜色素上皮-脉络膜-巩膜眼罩,平装于 Vectashield 中的载玻片,并用盖玻片覆盖以用于具有 x10 物镜的荧光显微镜(Axioplan

2, Zeiss, Le Pecq, 法国) 检查。也获得了校准图像。用 Image J 软件测量受脉络膜新血管形成影响的面积 (以 μm^2 表示)。对单个眼睛和单个动物计算多种病变获得的新生血管面积的测量平均值。

[0173] 统计分析

[0174] 数据以平均值 \pm 标准误差表示。对于组间重大差异的检测, 使用参数测试进行统计分析 (差异 ANOVA、和 PLSD Fisher 测试的分析 - Statview 软件, 第 5 版)。P < 0.05 的值被认为是统计学显著的。

[0175] 结果

[0176] 实验期间各组的死亡率相似: 组 2 为 3/17 (5.8%)、组 3 为 2/15 (13%)、组 4 为 1/14 (7.1%)、组 5 为 2/15 (13.3%)、和组 1 和组 6 中无死亡。用于激光光凝或体内血管造影的麻醉期间或之后发生死亡。

[0177] 随后未在 6 组小鼠间观察到体重增加的明显差异。

[0178] 如前所述, 通过直接测量在平装脉络膜上显示脉络膜新血管形成的面积来量化处理效果 (Edelman and Castro, 2000)。

[0179] 使用参数测试进行显示 CNV 的面积分析 (差异 ANOVA 和 PLSD Fisher 测试的分析)。结果示于图 6。CL1-R2 (组 2, P < 0.0001) 和 Fab'2- 处理的小鼠 (组 5, P = 0.0001) 中 CNV 面积明显小于小鼠 IgG1 同型对照 - 处理的小鼠 (组 3) 中的面积。用作阳性对照的 Kenacort® (组 6, P < 0.0001) 处理、和 CNX46-3 (组 4, P < 0.0001) 显示了与同型对照组相比类似的效果。与在小鼠 IgG1 同型 - 处理的小鼠 (P < 0.0001) 中测量的面积相比, 使用 CL1-R2 嵌合抗体的处理显著地减少了 CNV 面积。值得注意的是, 在 CL1-R2 与 CL1-R2 嵌合处理 (P = 0.9888) 之间和 Fab'2 与 CL1-R2 或 CL1-R2 嵌合处理 (分别为 P = 0.0951 和 P = 0.0925) 之间观察到了类似的效果。

[0180] 新血管形成的定量评价表明 CL1-R2、嵌合 CL1-R2、Fab'2 处理和 CNX46-3i) 与小鼠 IgG1 同型对照处理相比, 减少了受 CNV 影响的面积和 ii) 在氩激光诱导 CNV 以及阳性对照 (Kenacort®) 的完善小鼠模型中预防脉络膜的新生血管形成。

[0181] 参考文献

[0182] 本申请中引用的参考文献为:

[0183] 1. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. Nature. 2005; 438(7070):932-936.

[0184] 2. Sherris D. Ocular drug development-future directions. Angiogenesis. 2007;10(2):71-76.

[0185] 3. Buckanovich RJ, 等. Endothelin B receptor mediates the endothelial barrier to T cell homing to tumors and disables immune therapy. Nat Med. 2008; 14(1):28-36.

[0186] 4. Shojaei F, Ferrara N. Antiangiogenesis to treat cancer and intraocular neovascular disorders. Lab Invest. 2007;87(3):227-230.

[0187] 5. Cao Y. Tumor angiogenesis and molecular targets for therapy. Front Biosci. 2009;14(3962-3973).

[0188] 6. Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery?

Nat Rev Drug Discov. 2007 ;6 (4) :273-286.

[0189] 7. Paez-Ribes M, 等. Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell*. 2009 ; 15(3) :220-231.

[0190] 8. Takeda A, 等. CCR3 is a target for age-related macular degeneration diagnosis and therapy. *Nature*. 2009 ;460 (7252) :225-230.

[0191] 9. Ma WW, Adjei AA. Novel agents on the horizon for cancer therapy. *CA Cancer J Clin*. 2009 ;59 (2) :111-137.

[0192] 10. Rosenfeld PJ, 等. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med*. 2006 ;355(14) :1419-1431.

[0193] 11. Fletcher EC, Chong NV. Looking beyond Lucentis on the management of macular degeneration. *Eye*. 2008 ;22 (6) :742-750.

[0194] 12. Duch S, Buchacra O, Milla E, Andreu D, Tellez J. Intracameral bevacizumab (Avastin) for neovascular glaucoma: a pilot study in 6 patients. *J Glaucoma*. 2009 ;18 (2) :140-143.

[0195] 13. Moraczewski AL, Lee RK, Palmberg PF, Rosenfeld PJ, Feuer WJ. Outcomes of treatment of neovascular glaucoma with intravitreal bevacizumab. *Br J Ophthalmol*. 2009 ;93 (5) :589-593.

[0196] 14. Dastjerdi MH, 等. Topical bevacizumab in the treatment of corneal neovascularization: results of a prospective, open-label, noncomparative study. *Arch Ophthalmol*. 2009 ;127 (4) :381-389.

[0197] 15. Jacobs DS, Lim M, Carrasquillo KG, Rosenthal P. Bevacizumab for corneal neovascularization. *Ophthalmology*. 2009 ;116 (3) :592-593; author reply 593-594.

[0198] 16. Oh JY, Kim MK, Shin MS, Lee HJ, Lee JH, Wee WR. The anti-inflammatory effect of

[0199] subconjunctival bevacizumab on chemically burned rat corneas. *Curr Eye Res*. 2009 ;34 (2) :85-91.

[0200] 17. Ueno S, 等. Prolonged blockade of VEGF family members does not cause identifiable damage to retinal neurons or vessels. *J Cell Physiol*. 2008 ;217 (1) : 13-22.

[0201] 18. Salgaller ML. Technology evaluation: bevacizumab, Genentech/Roche. *Curr Opin Mol Ther*. 2003 ;5 (6) :657-667.

[0202] 19. Reichert JM, Valge-Archer VE. Development trends for monoclonal antibody cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 2007 ;6 (5) :349-356.

[0203] 20. Gerber HP, Ferrara N. Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies. *Cancer Res*. 2005 ;65 (3) :671-680.

[0204] 21. Ellis LM, Hicklin DJ. VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat Rev Cancer*. 2008 ;8 (8) :579-591.

- [0205] 22. Bergers G, Hanahan D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer*. 2008 ;8(8) :592-603.
- [0206] 23. Dorrell MI, Aguilar E, Scheppke L, Barnett FH, Friedlander M. Combination angiostatic therapy completely inhibits ocular and tumor angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007 ;104(3) :967-972.
- [0208] 24. Ratner M. Genentech discloses safety concerns over Avastin. *Nat Biotechnol*. 2004 ;22(10) :1198.
- [0209] 25. Chen HX, Cleck JN. Adverse effects of anticancer agents that target the VEGF pathway. *Nat Rev Clin Oncol*. 2009 ;6(8) :465-477.
- [0210] 26. Bensussan A. BY55 (CD 160). *Protein Rev. Web*. 2000 ;1(72-73).
- [0211] 27. Anumantha A, 等. Cloning of BY55, a novel Ig superfamily member expressed on NK cells, CTL, and intestinal intraepithelial lymphocytes. *J. Immunol*. 1998 ;161(6) :2780-2790.
- [0212] 28. Fons P, 等. Soluble HLA-G inhibits angiogenesis through an apoptotic pathway and by direct binding to CD160 receptor expressed by endothelial cells. *Blood*. 2006 ;108(8) :2608-2615.
- [0213] 29. Maeda M, 等. Murine CD 160, Ig-like receptor on NK cells and NKT cells, recognizes classical and non classical MHC class I and regulates NK cell activation. *J. Immunol*. 2005 ;175(4426-4432).
- [0214] 30. Giuriato S, 等. Development of a conditional bioluminescent transplant model for TPM3-ALK induced tumorigenesis as a tool to validate ALK-dependent cancer targeted therapy. *Cancer Biol Ther*. 2007 ;6(8) :1318-1323.
- [0215] 31. Cursiefen C. Immune privilege and angiogenic privilege of the cornea. *Chem Immunol Allergy*. 2007 ;92(50-57).
- [0216] 32. Smith LE, 等. Oxygen-induced retinopathy in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1994 ;35(1) :101-111.
- [0217] 33. Economopoulou M, 等. Inhibition of pathologic retinal neovascularization by alpha-defensins. *Blood*. 2005 ;106(12) :3831-3838.
- [0218] 34. Yu L, 等. Interaction between bevacizumab and murine VEGF-A: a reassessment. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008 ;49(2) :522-527.
- [0219] 35. Bock F, 等. Bevacizumab as a potent inhibitor of inflammatory corneal angiogenesis and lymphangiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007 ;48(6) :2545-2552.
- [0220] 36. Habet-Wilner Z, Barequet IS, Ivanir Y, Moisseiev J, Rosner M. The inhibitory effect of different concentrations of topical bevacizumab on corneal neovascularization. *Acta Ophthalmol*. 2009.
- [0221] 37. Hashemian MN, Moghimi S, Kiumehr S, Riazi M, Amoli FA. Prevention and Treatment of Corneal Neovascularization; Comparison of Different Doses

of Subconjunctival Bevacizumab with Corticosteroid in Experimental Rats. *Ophthalmic Res.* 2009 ;42(2) :90-95.

[0222] 38. Hurmeric V, Mumcuoglu T, Erdurman C, Kurt B, Dagli O, Durukan AH. Effect of subconjunctival bevacizumab (Avastin) on experimental corneal neovascularization in guinea pigs. *Cornea.* 2008 ;27(3) :357-362.

[0223] 39. Manzano RP, 等. Inhibition of experimental corneal neovascularisation by bevacizumab (Avastin). *Br J Ophthalmol.* 2007 ;91(6) :804-807.

[0224] 40. Zhang Q, 等. Suppression of retinal neovascularization by the iNOS inhibitor aminoguanidine in mice of oxygen-induced retinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2009 ;247(7) :919-927.

[0225] 41. Passaniti A, 等. A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor. *Lab Invest.* 1992 ;67(4) :519-528.

[0226] 42. Asselin-Paturel C, 等. Transfer of the murine interleukin-12 gene in vivo by a Semliki Forest virus vector induces B16 tumor regression through inhibition of tumor blood vessel formation monitored by Doppler ultrasonography. *Gene Ther.* 1999 ;6(4) :606-615.

[0227] 43. Hamano Y, 等. Thrombospondin-1 associated with tumor microenvironment contributes to low-dose cyclophosphamide-mediated endothelial cell apoptosis and tumor growth suppression. *Cancer Res.* 2004 ;64(5) :1570-1574.

[0228] 44. Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science.* 2005 ;307(5706) :58-62.

[0229] 45. Jain RK, Munn LL, Fukumura D. Dissecting tumour pathophysiology using intravital microscopy. *Nat Rev Cancer.* 2002 ;2(4) :266-276.

[0230] 46. Koehl GE, Gaumann A, Geissler EK. Intravital microscopy of tumor angiogenesis and regression in the dorsal skin fold chamber: mechanistic insights and preclinical testing of therapeutic strategies. *Clin Exp Metastasis.* 2009 ;26(4) :329-344.

[0231] 47. Heymans O, Fissette J, Vico P, Blacher S, Masset D, Brouers F. Is fractal geometry useful in medicine and biomedical sciences? *Med Hypotheses.* 2000 ;54(3) :360-366.

[0232] 48. Hamzah J, 等. Vascular normalization in Rgs5-deficient tumours promotes immune destruction. *Nature.* 2008 ;453(7193) :410-414.

[0233] 49. Man S, 等. Antitumor effects in mice of low-dose (metronomic) cyclophosphamide administered continuously through the drinking water. *Cancer Res.* 2002 ;62(10) :2731-2735.

[0234] 50. Greenberg JI, 等. A role for VEGF as a negative regulator of pericyte function and vessel maturation. *Nature.* 2008 ;456(7223) :809-813.

[0235] 51. Padera TP, Stoll BR, Tooredman JB, Capen D, di Tomaso E, Jain

RK. Pathology :cancer cells compress intratumour vessels. Nature. 2004 ;427(6976) : 695.

[0236] 52. Lin MI, Sessa WC. Antiangiogenic therapy :creating a unique " window" of opportunity. Cancer Cell. 2004 ;6(6) :529-531.

[0237] 53. Barakonyi A, 等 .Cutting edge :engagement of CD160 by its HLA-C physiological ligand triggers a unique cytokine profile secretion in the cytotoxic peripheral blood NK cell subset. J Immunol. 2004 ;173(9) :5349-5354.

[0238] 54. Le Bouteiller P, 等 .Engagement of CD160 receptor by HLA-C is a triggering mechanism used by circulating natural killer(NK)cells to mediate cytotoxicity. Proc Natl Acad Sci USA. 2002 ;99(16963-16968).

[0239] 55. Ambati BK, 等 .Corneal avascularity is due to soluble VEGF receptor-1. Nature. 2006 ;443(7114) :993-997.

[0240] 56. Cao Y, Langer R. Optimizing the delivery of cancer drugs that block angiogenesis. Sci Transl Med. 2010 ;2(15) :15ps13.

[0241] 57. Makale M. Intravital imaging and cell invasion. Methods Enzymol. 2007 ; 426(375-401).

[0242] 58. Elie N, Kaliski A, Peronneau P, Opolon P, Roche A, Lassau N. Methodology for quantifying interactions between perfusion evaluated by DCE-US and hypoxia throughout tumor growth. Ultrasound Med Biol. 2007 ;33(4) :549-560.

[0243] 59. Wolfinger R, O ' Connell M. Generalized linear mixed models :a pseudo-likelihood approach. J. Statist. Computation Stimul. 1993 ;4(233-243).

[0244] 60. Liang KY, Zeger SL. Longitudinal Data Analysis Using Generalized Linear Models. Biometrika. 1986 ;73(13-22).

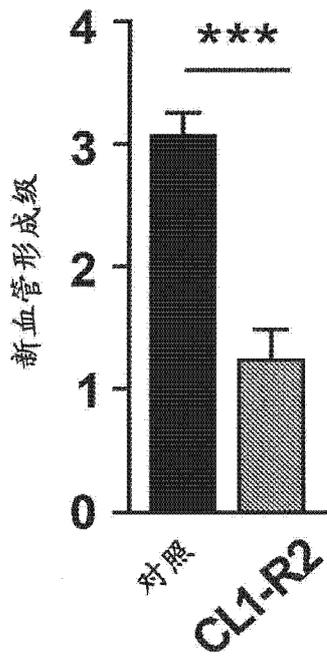


图 1

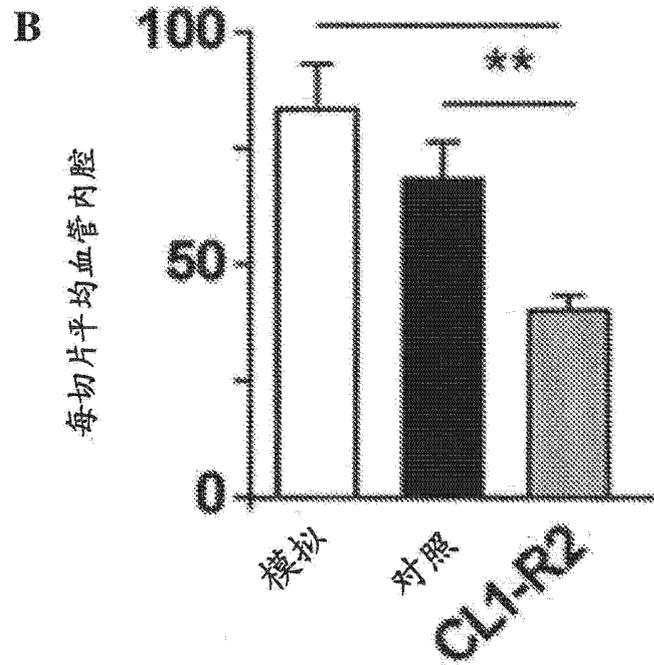
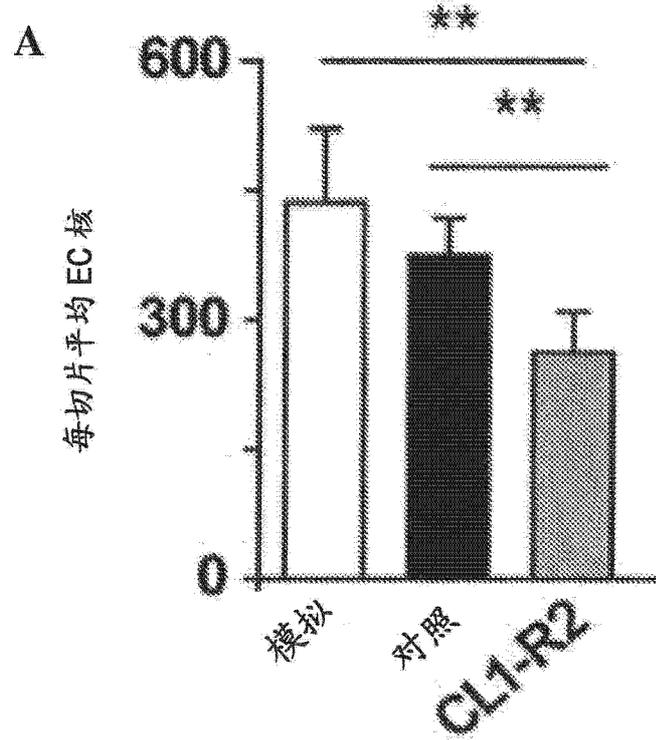


图 2

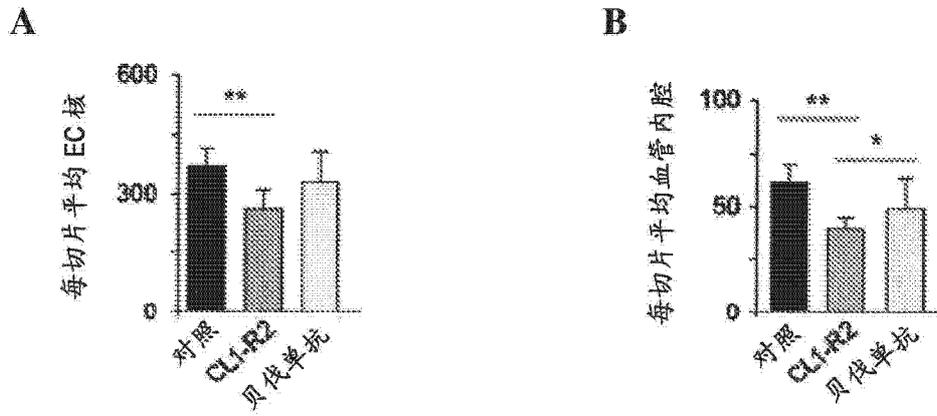


图 3

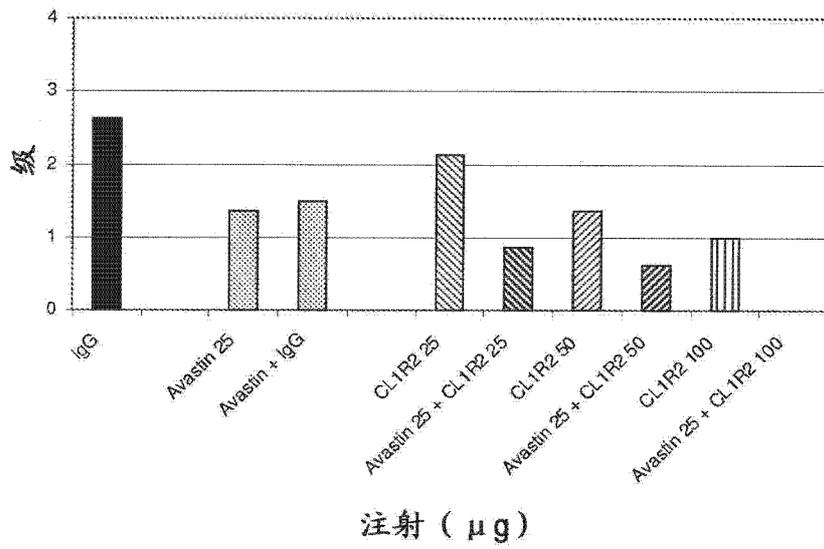


图 4

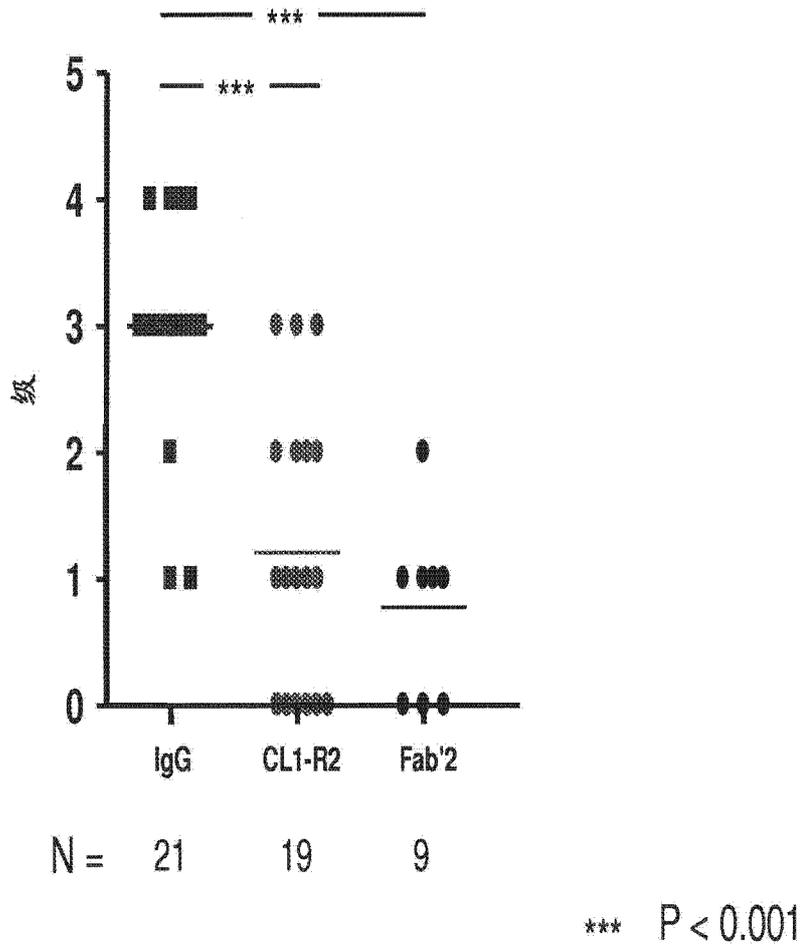


图 5

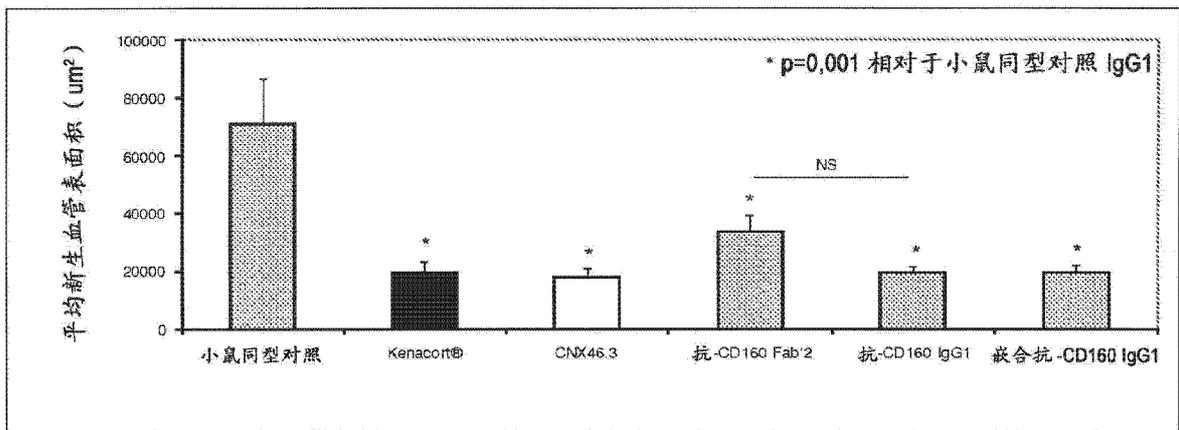


图 6