



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 116710135 A

(43) 申请公布日 2023. 09. 05

(21) 申请号 202180082106.9

(22) 申请日 2021.10.07

(30) 优先权数据

2020903624 2020.10.07 AU

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.06.06

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/AU2021/051173 2021.10.07

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/073072 EN 2022.04.14

(71) 申请人 6线生物技术公司

地址 美国华盛顿州

(72) 发明人 B·齐格拉 G·雷德利赫

(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314

专利代理师 程伟 韩文华

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

权利要求书7页 说明书33页 附图24页

(54) 发明名称

用于治疗眼部疾病的方法和试剂

(57) 摘要

本公开总体上涉及用于治疗眼部疾病或病症的方法和试剂。更具体地,本公开涉及CD14拮抗剂抗体用于治疗眼部疾病或病症的用途。

1. 一种用于治疗受试者的眼部疾病或病症的方法,所述方法包括向患有眼部疾病或病症的受试者施用有效量的CD14拮抗剂抗体、由或基本上由其组成。

2. 一种用于抑制患有眼部疾病或病症的受试者的眼部炎症、新生血管形成和/或纤维化的方法,所述方法包括向患有眼部疾病或病症的受试者施用有效量的CD14拮抗剂抗体、由或基本上由其组成。

3. 根据权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述眼部疾病或病症选自病理性近视、老年性黄斑变性(AMD)、糖尿病性视网膜病变、遗传性视网膜营养不良、增殖性玻璃体视网膜病变、早产儿视网膜病变、糖尿病性黄斑水肿、新生血管性青光眼、干眼症、与青光眼滤过手术(GFS)相关的纤维化、Coats氏病、非感染性葡萄膜炎(NIU)、黄斑毛细血管扩张症(MacTel)、黄斑囊样水肿、鸟枪弹样脉络膜视网膜病变、小柳原田氏病、特发性多灶性脉络膜炎、视网膜血管炎、视网膜分支静脉阻塞(BRVO)和视网膜中央静脉阻塞(CRVO)、息肉状脉络膜血管病变、家族性渗出性玻璃体视网膜病变(FEVR)、特发性视网膜炎、血管炎、动脉瘤和神经视网膜炎(IRVAN)、Doyone蜂窝状视网膜营养不良和增强型S锥综合征。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中受试者已进行过青光眼滤过手术(GFS)。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法,所述方法包括首先基于受试者有发展为眼部纤维化的风险、或患有眼部纤维化,选择用于施用CD14拮抗剂抗体的受试者。

6. 一种治疗受试者的AMD的方法,所述方法包括以下、由或基本上由以下组成:

选择有发展为眼部纤维化的风险、或患有眼部纤维化的AMD受试者;和
向所述受试者施用有效量的CD14拮抗剂抗体。

7. 一种抑制患有AMD的受试者的眼部纤维化的方法,所述方法包括以下、由或基本上由以下组成:

选择有发展为眼部纤维化的风险、或患有眼部纤维化的AMD受试者;和
向所述受试者施用有效量的CD14拮抗剂抗体。

8. 根据权利要求3、6和7中任一项所述的方法,其中所述AMD为湿性AMD或干性AMD。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的方法,其中所述受试者已经接受抗VEGF试剂至少3、6、9、12、14、16或18个月。

10. 根据权利要求1至8中任一项所述的方法,其中所述受试者是对抗VEGF试剂的无反应者。

11. 根据权利要求10所述的方法,其中所述抗VEGF试剂为抗VEGF抗体、抗VEGF抗体模拟物、VEGF Trap分子、可溶性fms样酪氨酸激酶-1或酪氨酸激酶抑制剂。

12. 根据权利要求11所述的方法,其中所述抗VEGF抗体为布罗利珠单抗、雷珠单抗或法瑞西单抗。

13. 根据权利要求11所述的方法,其中所述VEGF Trap分子是阿柏西普或康柏西普。

14. 根据权利要求11所述的方法,其中所述VEGF抗体模拟物是abicipar pegol。

15. 根据权利要求1至14中任一项所述的方法,其中通过光学相干断层扫描术(OCT)检测超反射材料(HRM)的存在来确定所述受试者患有眼部纤维化。

16. 根据权利要求1至15中任一项所述的方法,其中,通过使用荧光素血管造影、彩色眼底摄影(CFP)或眼底自发荧光(FAF)进行可视化确认纤维化病变的存在,从而确定所述受试者患有眼部纤维化。

17. 根据权利要求5至16之一所述的方法, 其中所述眼部纤维化包括或为视网膜、视网膜下或视网膜前纤维化。

18. 根据权利要求1至17中任一项所述的方法, 其中所述CD14拮抗剂抗体通过局部眼部施用、全身施用或局部施用进行施用。

19. 根据权利要求18所述的方法, 其中所述CD14拮抗剂抗体通过眼部植入施用。

20. 根据权利要求1至19中任一项所述的方法, 其中所述CD14拮抗剂抗体选自:

(i) 抗体, 其包含: a) 包含L-CDR1、L-CDR2和L-CDR3的抗体VL结构域或其抗原结合片段, 其中: L-CDR1包含序列RASESVDSFGNSFMH[SEQ ID NO:7] (3C10 L-CDR1); L-CDR2包含序列RAANLES[SEQ ID NO:8] (3C10 L-CDR2); 以及L-CDR3包含序列QQSYEDPWT[SEQ ID NO:9] (3C10 L-CDR3); 以及b) 包含H-CDR1、H-CDR2和H-CDR3的抗体VH结构域或其抗原结合片段, 其中: H-CDR1包含序列SYAMS[SEQ ID NO:10] (3C10 H-CDR1); H-CDR2包含序列SISSGGTTYYPDNVKG[SEQ ID NO:11] (3C10 H-CDR2); 以及H-CDR3包含序列GYDYHY[SEQ ID NO:12] (3C10 H-CDR3);

(ii) 抗体, 其包含: a) 包含L-CDR1、L-CDR2和L-CDR3的抗体VL结构域或其抗原结合片段, 其中: L-CDR1包含序列RASESVDSYVNSFLH[SEQ ID NO:13] (28C5 L-CDR1); L-CDR2包含序列RASNLQS[SEQ ID NO:14] (28C5L-CDR2); 以及L-CDR3包含序列QQSNEDPTT[SEQ ID NO:15] (28C5L-CDR3); 以及b) 包含H-CDR1、H-CDR2和H-CDR3的抗体VH结构域或其抗原结合片段, 其中: H-CDR1包含序列SDSAWN[SEQ ID NO:16] (28C5H-CDR1); H-CDR2包含序列YISYSGSTSYNPSLKS[SEQ ID NO:17] (28C5H-CDR2); 以及H-CDR3包含序列GLRFAY[SEQ ID NO:18] (28C5 H-CDR3);

(iii) 抗体, 其包含: a) 包含L-CDR1、L-CDR2和L-CDR3的抗体VL结构域或其抗原结合片段, 其中: L-CDR1包含序列RASESVDSYVNSFLH[SEQ ID NO:13] (IC14 L-CDR1); L-CDR2包含序列RASNLQS[SEQ ID NO:14] (IC14L-CDR2); 以及L-CDR3包含序列QQSNEDPYT[SEQ ID NO:27] (IC14 L-CDR3); 以及b) 包含H-CDR1、H-CDR2和H-CDR3的抗体VH结构域或其抗原结合片段, 其中: H-CDR1包含序列SDSAWN[SEQ ID NO:16] (IC14 H-CDR1); H-CDR2包含序列YISYSGSTSYNPSLKS[SEQ ID NO:17] (IC14 H-CDR2); 以及H-CDR3包含序列GLRFAY[SEQ ID NO:18] (IC14 H-CDR3); 以及

(iv) 抗体, 其包含: a) 包含L-CDR1、L-CDR2和L-CDR3的抗体VL结构域或其抗原结合片段, 其中: L-CDR1包含序列RASQDIKNYLN[SEQ ID NO:19] (18E12 L-CDR1); L-CDR2包含序列YTSRLHS[SEQ ID NO:20] (18E12L-CDR2); 以及L-CDR3包含序列QRGDTLPWT[SEQ ID NO:21] (18E12L-CDR3); 以及b) 包含H-CDR1、H-CDR2和H-CDR3的抗体VH结构域或其抗原结合片段, 其中: H-CDR1包含序列NYDIS[SEQ ID NO:22] (18E12H-CDR1); H-CDR2包含序列VIWTSGGTNYNSAFMS[SEQ ID NO:23] (18E12H-CDR2); 以及H-CDR3包含序列GDGNFYLYNFDY[SEQ ID NO:24] (18E12H-CDR3)。

21. 根据权利要求1至20中任一项所述的方法, 其中所述CD14拮抗剂抗体选自:

(i) 包含以下的抗体:

VL结构域, 其包含以下序列、由或基本上由以下序列组成:

QSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSFGNSFMHWYQQKAGQPPKSSIYRAANLESIGIPARFSGSGSRD
FTLTINPVEADDVATYFCQQSYEDPWTFGGGTKLGNQ [SEQ ID NO: 1] (3C10 VL), 以及

VH结构域,其包含以下序列、由或基本上由以下序列组成:

LVKPGGSLKLSCVASGFTFSSYAMSWVRQTPEKRLEWVASISSGGTTYPDNVKGRFTISRDNARNILYL
QMSSLRSEDAMYYCARGYYDYHWGQGTTTLTVSS [SEQ ID NO: 2] (3C10 VH);

(ii) 包含以下的抗体:

VL结构域,其包含以下序列、由或基本上由以下序列组成:

QSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYVNSFLHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLQS
GIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYCCQQSNEDPTTFGGGKLEIK [SEQ ID NO: 3] (28C5

VL); 以及

VH结构域,其包含以下序列、由或基本上由以下序列组成:

LQQSGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDSAWNWIRQFPGNRLEWMGYISYSGSTSYNPSLKSRI SITRD
TSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCVRGLRFAYWGQGLTVTSA [SEQ ID NO: 4] (28C5 VH);

(iii) 包含以下的抗体:

VL结构域,其包含以下序列、由或基本上由以下序列组成:

QSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYVNSFLHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLQSGIPARFSGSGSRTDF
TLTINPVEADDVATYYCQQSNEDPYTFGGGKLEIK [SEQ ID NO: 25] (IC14 VL); 以及

VH结构域,其包含以下序列、由或基本上由以下序列组成:

LQQSGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDSAWNWIRQFPGNRLEWMGYISYSGSTSYNPSLKSRI SITRD
TSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCVRGLRFAYWGQGLTVTVSS [SEQ ID NO: 26] (IC14 VH); 以及 (iv)

包含以下的抗体:

VL结构域,其包含以下序列、由或基本上由以下序列组成:

QTPSSLSASLGDRVTISCRASQDIKNYLNWYQQPGGTVKVLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTIS
NLEQEDFATYFCQRGDTLPWTFGGGKLEIK [SEQ ID NO: 5] (18E12 VL); 以及

VH结构域,其包含以下序列、由或基本上由以下序列组成:

LESGPGLVAPSQSLSLTCTVSGFSLTNYDISWIRQPPGKGLEWLGIWTSGGTNYNSAFMSRLSITKDNS
ESQVFLKMNGLQTDGTYCYVRGDGNFYLYNFDYWGQGLTVTVSS [SEQ ID NO: 6] (18E12 VH)。

22. 根据权利要求1至21中任一项所述的方法,其中所述CD14拮抗剂抗体是人源化或嵌合的。

23. 根据权利要求1至22中任一项所述的方法,其中所述CD14拮抗剂抗体包含:

轻链,其包含氨基酸序列

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYVNSFLHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLQSGIPARFSGSG
SRTDFTLTINPVEADDVATYYCQQSNEDPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN
NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC [SEQ ID NO: 28]; 以及

重链,其包含氨基酸序列:

DVQLQQSGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYISITSDSAWNWIRQFPGNRLEWMGYISYSGSTSYNPSLSKSRIS
ITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCVRGLRFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAL
GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNTKVD
KRVESKYGPSPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK [SEQ ID NO: 29]。

24. 根据权利要求1至23中任一项所述的方法,其中所述CD14拮抗剂抗体与辅助剂联合施用。

25. 根据权利要求24所述的方法,其中所述CD14拮抗剂抗体与所述辅助剂同时施用或顺序施用。

26. 根据权利要求24或25所述的方法,其中所述辅助剂选自抗VEGF试剂和血管紧张素转换酶(ACE)抑制剂、结缔组织生长因子(CTGF)抑制剂、补体抑制剂、血管生成素2(Ang-2)抑制剂、PDGF抑制剂、他汀和类固醇。

27. 根据权利要求26所述的方法,其中所述抗VEGF试剂选自抗VEGF抗体、抗VEGF抗体模拟物、VEGF Trap分子、可溶性fms样酪氨酸激酶-1和酪氨酸激酶抑制剂。

28. 根据权利要求27所述的方法,其中所述抗VEGF抗体为布罗利珠单抗、雷珠单抗或法瑞西单抗。

29. 根据权利要求27所述的方法,其中所述VEGF Trap分子是阿柏西普或康柏西普。

30. 根据权利要求27所述的方法,其中所述VEGF抗体模拟物是abicipar pegol。

31. 根据权利要求26所述的方法,其中所述补体抑制剂选自C3、C5、C5b因子、D因子和备解素抑制剂。

32. CD14拮抗剂抗体在制备治疗受试者眼部疾病或病症的药物中的用途。

33. CD14拮抗剂抗体在制备用于抑制患有眼部疾病或病症的受试者的眼部炎症、新生血管形成和/或纤维化的药物中的用途。

34. 根据权利要求32或33所述的用途,其中所述眼部疾病或病症选自病理性近视、老年性黄斑变性(AMD)、糖尿病性视网膜病变、遗传性视网膜营养不良、增殖性玻璃体视网膜病变、早产儿视网膜病变、糖尿病性黄斑水肿、新生血管性青光眼、干眼症、与青光眼滤过手术(GFS)相关的纤维化、Coats氏病、非感染性葡萄膜炎(NIU)、黄斑毛细血管扩张症(MacTel)、黄斑囊样水肿、鸟枪弹样脉络膜视网膜病变、小柳原田氏病、特发性多灶性脉络膜炎、视网膜血管炎、视网膜分支静脉阻塞(BRVO)和视网膜中央静脉阻塞(CRVO)、息肉状脉络膜血管病变、家族性渗出性玻璃体视网膜病变(FEVR)、特发性视网膜炎、血管炎、动脉瘤和神经视网膜炎(IRVAN)、Doyone蜂窝状视网膜营养不良和增强型S锥综合征。

35. 根据权利要求33或34所述的用途,其中所述受试者已进行过GFS。

36. 根据权利要求32至35中任一项所述的用途,其中所述受试者已被识别为有发展为眼部纤维化的风险、或患有眼部纤维化。

37. CD14拮抗剂抗体在制备用于在被识别为有发展为眼部纤维化的风险、或患有眼部纤维化的受试者中治疗AMD的药物中的用途。

38. CD14拮抗剂抗体在制备用于在被识别为有发展为眼部纤维化的风险、或患有眼部纤维化的患有AMD的受试者中抑制眼部炎症的药物中的用途。

39. 根据权利要求34、37和38中任一项所述的用途,其中所述AMD为湿性AMD或干性AMD。
40. 根据权利要求32至39中任一项所述的用途,其中所述受试者已经接受抗VEGF试剂至少3、6、9、12、14、16或18个月。
41. 根据权利要求32至40中任一项所述的用途,其中所述受试者是对抗VEGF试剂的无反应者。
42. 根据权利要求40或41之一所述的用途,其中所述抗VEGF试剂为抗VEGF抗体、抗VEGF抗体模拟物、VEGF Trap分子、可溶性fms样酪氨酸激酶-1或酪氨酸激酶抑制剂。
43. 根据权利要求42所述的用途,其中所述抗VEGF抗体为布罗利珠单抗、雷珠单抗或法瑞西单抗。
44. 根据权利要求42所述的用途,其中所述VEGF Trap分子是阿柏西普或康柏西普。
45. 根据权利要求42所述的用途,其中所述VEGF抗体模拟物是abicipar pegol。
46. 根据权利要求36至45中任一项所述的用途,其中通过光学相干断层扫描术(OCT)检测超反射材料(HRM)的存在将所述受试者识别为患有眼部纤维化。
47. 根据权利要求36至45中任一项所述的用途,其中通过使用荧光素血管造影、彩色眼底摄影(CFP)或眼底自发荧光(FAF)进行可视化确认纤维化病变的存在,从而将所述受试者识别为患有眼部纤维化。
48. 根据权利要求36至47之一所述的用途,其中所述眼部纤维化包括或为视网膜、视网膜下或视网膜前纤维化。
49. 根据权利要求32至48中任一项所述的用途,其中所述药物被配制为通过局部眼部施用、全身施用或局部施用进行施用。
50. 根据权利要求49所述的用途,其中所述药物被配制用于眼部植入。
51. 根据权利要求32至50中任一项所述的用途,其中所述抗体选自:
- (i) 抗体,其包含:a) 包含L-CDR1、L-CDR2和L-CDR3的抗体VL结构域或其抗原结合片段,其中:L-CDR1包含序列RASESVDSFGNSFMH[SEQ ID NO:7] (3C10 L-CDR1);L-CDR2包含序列RAANLES[SEQ ID NO:8] (3C10 L-CDR2);以及L-CDR3包含序列QQSYEDPWT[SEQ ID NO:9] (3C10 L-CDR3);以及b) 包含H-CDR1、H-CDR2和H-CDR3的抗体VH结构域或其抗原结合片段,其中:H-CDR1包含序列SYAMS[SEQ ID NO:10] (3C10 H-CDR1);H-CDR2包含序列SISSGGTTYYPDNVKG[SEQ ID NO:11] (3C10 H-CDR2);以及H-CDR3包含序列GYDYHY[SEQ ID NO:12] (3C10 H-CDR3);
- (ii) 抗体,其包含:a) 包含L-CDR1、L-CDR2和L-CDR3的抗体VL结构域或其抗原结合片段,其中:L-CDR1包含序列RASEVDSYVNSFLH[SEQ ID NO:13] (28C5 L-CDR1);L-CDR2包含序列RASNLQS[SEQ ID NO:14] (28C5L-CDR2);以及L-CDR3包含序列QQSNEDPTT[SEQ ID NO:15] (28C5L-CDR3);以及b) 包含H-CDR1、H-CDR2和H-CDR3的抗体VH结构域或其抗原结合片段,其中:H-CDR1包含序列SDSAWN[SEQ ID NO:16] (28C5H-CDR1);H-CDR2包含序列YISYSGSTSYNPSLKS[SEQ ID NO:17] (28C5H-CDR2);以及H-CDR3包含序列GLRFAY[SEQ ID NO:18] (28C5 H-CDR3);
- (iii) 抗体,其包含:a) 包含L-CDR1、L-CDR2和L-CDR3的抗体VL结构域或其抗原结合片段,其中:L-CDR1包含序列RASEVDSYVNSFLH[SEQ ID NO:13] (IC14 L-CDR1);L-CDR2包含序列RASNLQS[SEQ ID NO:14] (IC14L-CDR2);以及L-CDR3包含序列QQSNEDPYT[SEQ ID NO:27]

(IC14 L-CDR3);以及b)包含H-CDR1、H-CDR2和H-CDR3的抗体VH结构域或其抗原结合片段,其中:H-CDR1包含序列SDSAWN[SEQ ID NO:16](IC14 H-CDR1);H-CDR2包含序列YISYSGSTSYNPSLKS[SEQ ID NO:17](IC14 H-CDR2);以及H-CDR3包含序列GLRFAY[SEQ ID NO:18](IC14 H-CDR3);以及

(iv)抗体,其包含:a)包含L-CDR1、L-CDR2和L-CDR3的抗体VL结构域或其抗原结合片段,其中:L-CDR1包含序列RASQDIKNYLN[SEQ ID NO:19](18E12 L-CDR1);L-CDR2包含序列YTSRLHS[SEQ ID NO:20](18E12L-CDR2);以及L-CDR3包含序列QRGDTLPWT[SEQ ID NO:21](18E12L-CDR3);以及b)包含H-CDR1、H-CDR2和H-CDR3的抗体VH结构域或其抗原结合片段,其中:H-CDR1包含序列NYDIS[SEQ ID NO:22](18E12H-CDR1);H-CDR2包含序列VIWTSGGTNYNSAFMS[SEQ ID NO:23](18E12H-CDR2);以及H-CDR3包含序列GDGNFYLYNFDY[SEQ ID NO:24](18E12H-CDR3)。

52.根据权利要求32至51中任一项所述的用途,其中所述CD14拮抗剂抗体选自:

(i)包含以下的抗体:

VL结构域,其包含以下序列、由或基本上由以下序列组成:

QSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSFGNSFMHWYQQKAGQPPKSSIYRAANLESGIPARFSGSGSRTD
FTLTINPVEADDVATYFCQQSYEDPWTFGGGTKLGNQ [SEQ ID NO: 1] (3C10 VL);以及

VH结构域,其包含以下序列、由或基本上由以下序列组成:

LVKPGGSLKLSVASGFTFSSYAMSWVRQTPEKRLEWVASISSGGTTYPDNVKGRFTISRDNARNILYL
QMSSLRSEDAMYYCARGYYDYHYWGQGTTLTVSS [SEQ ID NO: 2] (3C10 VH);

(ii)包含以下的抗体:

VL结构域,其包含以下序列、由或基本上由以下序列组成:

QSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYVNSFLHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLQS
GIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYCCQQSNEDPTTFGGGTKLEIK [SEQ ID NO: 3] (28C5
VL);以及

VH结构域,其包含以下序列、由或基本上由以下序列组成:

LQQSGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDSAWNWIRQFPGNRLEWMGYISYSGSTSYNPSLKSRI SITRD
TSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCVRGLRFAYWGQGLTVTSA [SEQ ID NO: 4] (28C5 VH);

(iii)包含以下的抗体:

VL结构域,其包含以下序列、由或基本上由以下序列组成:

QSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYVNSFLHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLQSGIPARFSGSGSRTDF
TLTINPVEADDVATYYCQQSNEDPYTFGGGTKLEIK [SEQ ID NO: 25] (IC14 VL);以及

VH结构域,其包含以下序列、由或基本上由以下序列组成:

LQQSGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDSAWNWIRQFPGNRLEWMGYISYSGSTSYNPSLKSRI SITRD
TSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCVRGLRFAYWGQGLTVTVSS [SEQ ID NO: 26] (IC14 VH);以及(iv)

包含以下的抗体:

VL结构域,其包含以下序列、由或基本上由以下序列组成:

QTPSSLSASLGDRVTISCRASQDIKNYLNWYQQPGGTVKVLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTIS
NLEQEDFATYFCQRGDTLPWTFGGGTKLEIK [SEQ ID NO: 5] (18E12 VL);以及

VH结构域,其包含以下序列、由或基本上由以下序列组成:

LESGPGLVAPSQSLSTCTVSGFSLTNYDISWIRQPPGKGLEWLGVITSGGTNYNSAFMSRLSITKDNS
ESQVFLKMNGLQTDDTGIYYCVRGDGNFYLYNFDYWGQGTTLTVSS [SEQ ID NO: 6] (18E12 VH)。

53. 根据权利要求32至52中任一项所述的用途,其中所述CD14拮抗剂抗体是人源化或嵌合的。

54. 根据权利要求32至53中任一项所述的用途,其中所述CD14拮抗剂抗体包含:
轻链,其包含氨基酸序列

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYVNSFLHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLQSGIPARFSGSG
SRTDFTLTINPVEADDVATYYCQSNEDPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN
NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC [SEQ ID NO: 28]; 以及

重链,其包含氨基酸序列:

DVQLQQSGPGLVKPSQSLSTCTVTGYSITSDSAWNWIRQFPGNRLEWMGYISYSGSTSYNPSLKSRI
ITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCVRGLRFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAL
GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQYTCNVDHKPSNTKVD
KRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS
CVMHEALHNHYTQKSLSLGLK [SEQ ID NO: 29]。

55. 根据权利要求32至54中任一项所述的用途,其中所述药物被配制成与辅助剂联合施用。

56. 根据权利要求55所述的用途,其中所述辅助剂选自抗VEGF试剂和血管紧张素转换酶(ACE)抑制剂、结缔组织生长因子(CTGF)抑制剂、补体抑制剂、血管生成素2(Ang-2)抑制剂、PDGF抑制剂、他汀和类固醇。

57. 根据权利要求56所述的用途,其中所述抗VEGF试剂选自抗VEGF抗体、抗VEGF抗体模拟物、VEGF Trap分子、可溶性fms样酪氨酸激酶-1和酪氨酸激酶抑制剂。

58. 根据权利要求57所述的用途,其中所述抗VEGF抗体为布罗利珠单抗、雷珠单抗或法瑞西单抗。

59. 根据权利要求57所述的用途,其中所述VEGF Trap分子是阿柏西普或康柏西普。

用于治疗眼部疾病的方法和试剂

[0001] 本申请要求2020年10月7日提交的题为“用于治疗眼部疾病的方法和试剂”的澳大利亚临时申请第2020903624号的优先权。

技术领域

[0002] 本公开总体上涉及用于治疗眼部疾病或病症的方法和试剂。更具体地,本公开涉及CD14拮抗剂抗体用于治疗眼部疾病或病症的用途。

背景技术

[0003] 眼部疾病导致全世界数百万人视力受损和失明,严重影响患者的生活质量。这些疾病很复杂,病因不同且多种多样,但是治疗和管理选择有限。

[0004] 老年性黄斑变性 (AMD) 是50岁以上患者失明的主要原因。其特征在于黄斑处的光感受器、外视网膜和视网膜色素上皮的进行性退化。有两种类型的AMD:干性和湿性AMD。大多数AMD以干性型开始,在10-20%的个体中,其会发展为湿性型。湿性AMD经常导致患者中心视力迅速且通常严重的丧失。在湿性形式的AMD中,脉络膜新生血管形成并发展成血管的网络,可以在视网膜色素上皮生长并穿过视网膜色素上皮。由于这伴随着血浆渗漏和/或出血进入视网膜下间隙,因此可以导致中心视力严重且突然的丧失。虽然湿性AMD影响患有老年性黄斑变性的个体的约10-20%,但湿性AMD占该疾病导致的所有严重视力丧失病例的约90%。AMD已被证明没有单一原因,可能是由多种因素引起的,包括但不限于年龄、遗传倾向和/或环境因素。例如,在人类中,确定的流行病学风险因素可以包括,但不限于吸烟、饮食、女性、高加索人种和AMD家族史。

[0005] 病理性近视(也称为高度近视或退行性近视)是全世界视力损害的另一个主要原因,也是亚洲国家视力损害最常见的原因。其是一种严重的进行性近视,其特征是由于后部葡萄肿和矫正视力不足导致眼底发生变化。显著导致全世界视力丧失的其他眼部疾病包括,例如,糖尿病性视网膜病变、遗传性视网膜营养不良、增殖性玻璃体视网膜病变、早产儿视网膜病变、糖尿病性黄斑水肿、新生血管性青光眼和Coats氏病。

[0006] 抗VEGF试剂(例如,抗VEGF抗体、VEGF Traps等)目前广泛用于治疗眼部疾病,如湿性AMD、糖尿病性视网膜病变、糖尿病性黄斑水肿、病理性近视(特别是表现出脉络膜新生血管形成(CNV)的那些病理性近视患者)和其他眼部疾病,具有抑制新生血管形成和血管生成的作用。在大多数患者中,其可以减少脉络膜新生血管形成的进展和由新生血管形成的下游效应导致的视力丧失,并且已经观察到某些减少动物模型中炎症的方面。例如,抗VEGF可以改变由新生血管形成引起的视网膜损伤,从而解决免疫细胞引起的后续炎症活动。然而,抗VEGF试剂不会阻止促炎细胞因子从已激活的免疫细胞中释放(参见,例如,Funk等人,2010,Retina,30(9):1412-1419)。尽管定期(例如每月)注射抗VEGF试剂,许多患有眼部疾病的患者仍会由于纤维化病变和萎缩的发展而失去他们的视力。在湿性AMD中,即使持续治疗,一些患者的视力在5年内仍会继续下降。此外,某些10-15%的患者对抗VEGF治疗无反应。其他眼部疾病,尚无批准的药物治疗可供使用。因此,仍然需要用于治疗眼部疾病的其

他试剂和方法。

发明内容

[0007] 本发明部分源于令人惊讶的确定,即靶向分化簇14 (CD14),例如通过施用抗CD14拮抗剂抗体,不仅在减少新生血管形成和病变尺寸上特别有效,而且在激光诱导的脉络膜新生血管形成(CNV)的小鼠模型的纤维化中特别有效,并且与视网膜色素上皮(RPE)中血管内皮生长因子(VEGF)的减少有关。这与金标准抗VEGF疗法(例如,阿柏西普(aflibercept),一种是许多眼部疾病(如AMD)的标准治疗方法的VEGF-Trap)相反,抗VEGF疗法在高剂量下抑制新生血管形成并减小病变尺寸但不抑制纤维化,并且实际上与VEGF同种型和其他与细胞外基质形成相关的基因在RPE中的表达增加有关。

[0008] 有趣的是,在抗CD14治疗后,在视网膜中纤维化的意外减少似乎是通过与病变尺寸无关的新机制(即,与血管生成/新生血管形成无关):在使用抗CD14抗体治疗之后对纤维化的抑制是均一且与病变尺寸的抑制无关,以及VEGF蛋白水平在RPE中减少但在视网膜中没有减少,表明这是通过RPE上表达的mCD14受体的拮抗作用,而不是抗CD14减弱浸润巨噬细胞活性。因此,在激光诱导CNV后,抗CD14抗体的意外抗纤维化活性与其抗炎症和抗血管生成(即,抗新生血管形成)活性无关。

[0009] 本发明人的惊人发现是,靶向CD14不仅可以抑制在CNV的小鼠模型中的新生血管形成(或血管生成),而且还可以抑制纤维化,这对眼部疾病的治疗具有重要意义,其中许多眼部疾病的特征在于新生血管形成和纤维化,因此将适合用CD14拮抗剂抗体进行治疗。特别值得注意的是,目前的疗法虽然能够抑制新生血管形成,但不一定也能抑制纤维化。事实上,据报道,40-50%的湿性AMD患者由于眼部纤维化而失明,即使在接受抗VEGF疗法治疗时也是如此。在老年性黄斑变性治疗试验(CATT)的比较中,观察到经过一年的抗VEGF治疗后,32%的患者在又一年后出现纤维化疤痕,再有2年和5年后,分别有42%和56%的患者出现纤维化疤痕,即使已成功治疗了新生血管形成(即,在这种疾病状态下纤维化可以独立于新生血管形成而发展)。在此纤维化发展期间,视力降低(Daniel等人,2018, Ophthalmology 125(7):1037-1046)。事实上,已经推测用抗VEGF试剂治疗实际上可以促进纤维化。因此,用本文所述的CD14拮抗剂抗体对正在接受或已经接受抗VEGF治疗的患者进行治疗,可以抑制纤维化的发展,以及眼部炎症和新生血管形成的独立过程,有助于保持患有AMD以及其他以纤维化、炎症和新生血管形成为特征的眼部疾病的患者的视力。

[0010] 因此,在一个方面,提供一种用于治疗受试者的眼部疾病或病症的方法,所述方法包括向患有眼部疾病或病症的受试者施用有效量的CD14拮抗剂抗体、由或基本上由其组成。在另一个方面,提供了一种用于抑制患有眼部疾病或病症的受试者的眼部炎症、新生血管形成和/或纤维化的方法,所述方法包括向患有眼部疾病或病症的受试者施用有效量的CD14拮抗剂抗体、由或基本上由其组成。眼部疾病可以选自,例如,病理性近视、AMD、糖尿病性视网膜病变、遗传性视网膜营养不良、增殖性玻璃体视网膜病变、早产儿视网膜病变、糖尿病性黄斑水肿、新生血管性青光眼、干眼症、与青光眼滤过手术(GFS)相关的纤维化、Coats氏病、非感染性葡萄膜炎(NIU)、黄斑毛细管扩张症(MacTel)、黄斑囊样水肿、鸟枪弹样脉络膜视网膜病变、小柳原田(Vogt-Koyanagi-Harada)氏病、特发性多灶性脉络膜炎、视网膜血管炎、视网膜分支静脉阻塞(BRVO)和视网膜中央静脉阻塞(CRVO)、息肉状脉络膜血

管病变、家族性渗出性玻璃体视网膜病变 (FEVR)、特发性视网膜炎、血管炎、动脉瘤和神经视网膜炎 (IRVAN)、Doyone 蜂窝状视网膜营养不良和增强型 S 锥综合征。在进一步的示例中,该方法包括首先基于受试者有发展为眼部纤维化的风险、或患有眼部纤维化(例如,视网膜、视网膜下或视网膜前纤维化),选择用于施用 CD14 拮抗剂抗体的受试者。在一些实施方案中,AMD 是湿性 AMD 或干性 AMD。

[0011] 在另一个方面,提供了一种用于治疗受试者的 AMD 的方法,包括以下、由或基本上由以下组成:选择患有 AMD 的受试者,其有发展为眼部纤维化的风险、或患有眼部纤维化(例如,视网膜、视网膜下或视网膜前纤维化);向所述受试者施用有效量的 CD14 拮抗剂抗体。在另一个方面,提供了一种用于抑制患有 AMD 的受试者的眼部纤维化的方法,包括以下、由或基本上由以下组成:选择患有 AMD 的受试者,其有发展为眼部纤维化的风险、或患有眼部纤维化(例如,视网膜、视网膜下或视网膜前纤维化);向所述受试者施用有效量的 CD14 拮抗剂抗体。在一些实施方案中,AMD 是湿性 AMD 或干性 AMD。

[0012] 在另一个方面,提供了 CD14 拮抗剂抗体在制备用于治疗受试者的眼部疾病或病症、或用于抑制患有眼部疾病或病症的受试者的眼部炎症、新生血管形成和/或纤维化的药物中的用途。在一些示例中,眼部疾病或病症选自病理性近视、AMD、糖尿病性视网膜病变、遗传性视网膜营养不良、增殖性玻璃体视网膜病变、早产儿视网膜病变、糖尿病性黄斑水肿、新生血管性青光眼、干眼症、与青光眼滤过手术 (GFS) 相关的纤维化、Coats 氏病、非感染性葡萄膜炎 (NIU)、黄斑毛细管扩张症 (MacTel)、黄斑囊样水肿、鸟枪弹样脉络膜视网膜病变、小柳原田 (Vogt-Koyanagi-Harada) 氏病、特发性多灶性脉络膜炎、视网膜血管炎、视网膜分支静脉阻塞 (BRVO) 和视网膜中央静脉阻塞 (CRVO)、息肉状脉络膜血管病变、家族性渗出性玻璃体视网膜病变 (FEVR)、特发性视网膜炎、血管炎、动脉瘤和神经视网膜炎 (IRVAN)、Doyone 蜂窝状视网膜营养不良和增强型 S 锥综合征。在进一步的示例中,该方法包括首先基于受试者有发展为眼部纤维化的风险、或患有眼部纤维化(例如,视网膜、视网膜下或视网膜前纤维化),选择用于施用 CD14 拮抗剂抗体的受试者。在一些实施方案中,AMD 是湿性 AMD 或干性 AMD。

[0013] 在另一个方面,提供了 CD14 拮抗剂抗体在制备用于在被识别为有发展为眼部纤维化的风险、或患有眼部纤维化的受试者中治疗 AMD 的药物中的用途。在进一步的方面,提供了 CD14 拮抗剂抗体在制备用于在被识别为有发展为眼部纤维化的风险、或患有眼部纤维化的患有 AMD 的受试者中抑制眼部炎症的药物中的用途。在一些示例中,AMD 是湿性 AMD 或干性 AMD。

[0014] 在该方法和用途的一些实施方案中,受试者已接受抗 VEGF 试剂至少 3、6、9、12、14、16 或 18 个月。在进一步的示例中,受试者是抗 VEGF 试剂的无反应者。抗 VEGF 试剂可以是,例如,抗 VEGF 抗体(例如,布罗利珠单抗 (brolicizumab)、雷珠单抗 (ranibizumab) 或法瑞西单抗 (faricimab))、抗 VEGF 抗体模拟物(例如,abicipar pegol)、VEGF Trap 分子(例如,阿柏西普 (aflibercept) 或康柏西普 (conbercept))、可溶性 fms 样酪氨酸激酶-1 或酪氨酸激酶抑制剂。

[0015] 在具体实施方案中,通过光学相干断层扫描术 (OCT) 检测超反射材料 (HRM) 的存在来确定受试者患有眼部纤维化。

[0016] 在其他实施方案中,通过使用荧光素血管造影、彩色眼底摄影 (CFP) 或眼底自发荧

光 (FAF) 进行可视化确认纤维化病变的存在, 从而确定受试者患有眼部纤维化。

[0017] CD14拮抗剂抗体可以通过局部眼部施用、全身施用或局部施用进行施用。在一些示例中, CD14拮抗剂抗体是通过眼部植入施用。

[0018] 在一个实施方案中, CD14拮抗剂抗体选自:

[0019] (i) 抗体, 其包含:a) 抗体VL结构域或其抗原结合片段, 包含L-CDR1、L-CDR2和L-CDR3, 其中:L-CDR1包含序列RASESVDSFGNSFMH[SEQ ID NO:7] (3C10 L-CDR1); L-CDR2包含序列RAANLES[SEQ ID NO:8] (3C10 L-CDR2); 以及L-CDR3包含序列QQSYEDPWT[SEQ ID NO:9] (3C10 L-CDR3); 以及b) 抗体VH结构域或其抗原结合片段, 包含H-CDR1、H-CDR2和H-CDR3, 其中:H-CDR1包含序列SYAMS[SEQ ID NO:10] (3C10 H-CDR1); H-CDR2包含序列SISSGGTTYYPDNVKG[SEQ ID NO:11] (3C10 H-CDR2); 以及H-CDR3包含序列GYDYHY[SEQ ID NO:12] (3C10 H-CDR3);

[0020] (ii) 抗体, 其包含:a) 抗体VL结构域或其抗原结合片段, 包含L-CDR1、L-CDR2和L-CDR3, 其中:L-CDR1包含序列RASESVDSYVNSFLH[SEQ ID NO:13] (28C5 L-CDR1); L-CDR2包含序列RASNLQS[SEQ ID NO:14] (28C5 L-CDR2); 以及L-CDR3包含序列QQSNEDPTT[SEQ ID NO:15] (28C5 L-CDR3); 以及b) 抗体VH结构域或其抗原结合片段, 包含H-CDR1、H-CDR2和H-CDR3, 其中:H-CDR1包含序列SDSAWN[SEQ ID NO:16] (28C5 H-CDR1); H-CDR2包含序列YISYSGSTSYNPSLKS[SEQ ID NO:17] (28C5 H-CDR2); 以及H-CDR3包含序列GLRFAY[SEQ ID NO:18] (28C5 H-CDR3);

[0021] (iii) 抗体, 其包含:a) 抗体VL结构域或其抗原结合片段, 包含L-CDR1、L-CDR2和L-CDR3, 其中:L-CDR1包含序列RASESVDSYVNSFLH[SEQ ID NO:13] (IC14 L-CDR1); L-CDR2包含序列RASNLQS[SEQ ID NO:14] (IC14 L-CDR2); 以及L-CDR3包含序列QQSNEDPYT[SEQ ID NO:27] (IC14 L-CDR3); 以及b) 抗体VH结构域或其抗原结合片段, 包含H-CDR1、H-CDR2和H-CDR3, 其中:H-CDR1包含序列SDSAWN[SEQ ID NO:16] (IC14 H-CDR1); H-CDR2包含序列YISYSGSTSYNPSLKS[SEQ ID NO:17] (IC14 H-CDR2); 以及H-CDR3包含序列GLRFAY[SEQ ID NO:18] (IC14 H-CDR3); 以及

[0022] (iv) 抗体, 其包含:a) 抗体VL结构域或其抗原结合片段, 包含L-CDR1、L-CDR2和L-CDR3, 其中:L-CDR1包含序列RASQDIKNYLN[SEQ ID NO:19] (18E12 L-CDR1); L-CDR2包含序列YTSRLHS[SEQ ID NO:20] (18E12 L-CDR2); 以及L-CDR3包含序列QRGDTLPWT[SEQ ID NO:21] (18E12 L-CDR3); 以及b) 抗体VH结构域或其抗原结合片段, 包含H-CDR1、H-CDR2和H-CDR3, 其中:H-CDR1包含序列NYDIS[SEQ ID NO:22] (18E12 H-CDR1); H-CDR2包含序列VIWTSGGTNYNSAFMS[SEQ ID NO:23] (18E12 H-CDR2); 以及H-CDR3包含序列GDGNFYLYNFDY[SEQ ID NO:24] (18E12 H-CDR3)。

[0023] 在另一个实施方案中, CD14拮抗剂抗体选自:

[0024] (i) 包含以下的抗体:

[0025] VL结构域, 其包含以下序列、由或基本上由以下序列组成:

[0026] QSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSFGNSFMHWYQQKAGQPPKSSIYRAANLESIGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYFCQQSYEDPWTFGGGTKLGNQ [SEQ ID NO: 1] (3C10 VL); 以及

[0027] VH结构域, 其包含以下序列、由或基本上由以下序列组成:

- [0028] LVKPGGSLKLSCVASGFTFSSYAMSWVRQTPEKRLEWVASISSGGTTYPDNVKGRFTISRDNARNILYLQMSS
LRSEDTAMYYCARGYYDYHYWGQGTTLTVSS [SEQ ID NO: 2] (3C10 VH);
- [0029] (ii)包含以下的抗体:
- [0030] VL结构域,其包含以下序列、由或基本上由以下序列组成:
- [0031] QSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYVNSFLHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLQS
GIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYCCQSNEDPTTFGGGKLEIK [SEQ ID NO: 3] (28C5 VL);以及
- [0032] VH结构域,其包含以下序列、由或基本上由以下序列组成:
- [0033] LQQSGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDSAWNWIRQFPGNRLEWMGYISYSGSTSYNPSLKSRIISITRDTSKN
QFFLQLNSVTTEDTATYYCVRGLRFAYWGQGLTVTVSA [SEQ ID NO: 4] (28C5 VH);
- [0034] (iii)包含以下的抗体:
- [0035] VL结构域,其包含以下序列、由或基本上由以下序列组成:
- [0036] QSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYVNSFLHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLQSGIPARFSGSGSRTDFTLTIN
PVEADDVATYCCQSNEDPYTFGGGKLEIK [SEQ ID NO: 25] (IC14 VL);以及
- [0037] VH结构域,其包含以下序列、由或基本上由以下序列组成:
- [0038] LQQSGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDSAWNWIRQFPGNRLEWMGYISYSGSTSYNPSLKSRIISITRDTSKN
QFFLQLNSVTTEDTATYYCVRGLRFAYWGQGLTVTVSS [SEQ ID NO: 26] (IC14 VH);以及
- [0041] (iv)包含以下的抗体:
- [0042] VL结构域,其包含以下序列、由或基本上由以下序列组成:
- [0043] QTPSSLSASLGDRVTISCRASQDIKNYLNWYQQPGGTVKVLIIYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQE
DFATYFCQRGDTLPWTFGGGKLEIK [SEQ ID NO: 5] (18E12 VL);以及
- [0044] VH结构域,其包含以下序列、由或基本上由以下序列组成:
- [0045] LESGPGLVAPSQSLSLTCTVSGFSLTNYDISWIRQPPGKGLEWLGVWTSGGTNYNSAFMSRLSITKDENSESQVF
LKMNGLQTDGTGIYYCVRGDGNFYLYNFDYWGQGTTLTVSS [SEQ ID NO: 6] (18E12 VH)。
- [0047] 在一些示例中,CD14拮抗剂抗体是人源化的或嵌合的。在具体示例中,CD14拮抗剂抗体包含:
- [0048] 轻链,其包含氨基酸序列:
- [0049] DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYVNSFLHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLQSGIPARFSGSGSRTDF
TLTINPVEADDVATYCCQSNEDPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ
WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC [SEQ ID
NO: 28]; 以及
- [0050] 重链,其包含氨基酸序列:
- [0051] DVQLQQSGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDSAWNWIRQFPGNRLEWMGYISYSGSTSYNPSLKSRIISITRDT
SKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCVRGLRFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPS
CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK [SEQ
ID NO: 29]。
- [0052] CD14拮抗剂抗体可以与辅助剂联合施用,或与辅助剂一起配制使用。在一些示例

中,同时或依次施用CD14拮抗剂抗体和辅助剂。在具体示例中,辅助剂选自抗VEGF试剂和血管紧张素转换酶(ACE)抑制剂、结缔组织生长因子(CTGF)抑制剂、补体抑制剂(例如,C3、C5、C5、B因子、D因子或备解素抑制剂)、血管生成素2(Ang-2)抑制剂、PDGF抑制剂、他汀和类固醇。抗VEGF试剂可以选自抗VEGF抗体(例如,布罗利珠单抗、雷珠单抗或法瑞西单抗)、抗VEGF抗体模拟物(例如,abicipar pegol)、VEGF Trap分子(例如,阿柏西普或康柏西普)、可溶性fms样酪氨酸激酶-1和酪氨酸激酶抑制剂。

附图说明

[0053] 在此仅通过非限制性示例的方式参考以下附图描述了本公开的实施方案。

[0054] 图1是激光诱导脉络膜新生血管形成7天后血管生成的图形表示。(A)用不同浓度的阿柏西普(15 μ g/ μ l、60 μ g/ μ l或80 μ g/ml)、载剂或抗VEGF164中和抗体(300ng/ μ l)治疗的眼部的平均 $\pm$ SEM病变尺寸图。(B)用阿柏西普(80 μ g/ml)、抗CD14或载剂治疗的眼部的平均 $\pm$ SEM病变尺寸图。单因素ANOVA,事后Tukey检验,** $p < 0.01$, $n \geq 8$ 。

[0055] 图2是激光诱导的脉络膜新生血管形成后7天纤维化的图形表示。在第7天评价的载剂和抗CD14处理的眼部纤维化的平均值 $\pm$ SEM比率图。单因素ANOVA,事后Tukey检验,* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, $n \geq 8$ 。

[0056] 图3是激光诱导脉络膜新生血管形成7天后,用抗CD14和载剂处理的眼部纤维化和血管生成之间相关性的图形表示。

[0057] 图4是从激光诱导CNV后7天,用PBS、抗CD14或阿柏西普(80 μ g/ μ l)处理的眼部分离的RPE中VEGF同种型表达的图形表示。(A) Vegf120基因表达(Vegf120拷贝/Hprt拷贝)。(B) Vegf120基因表达(Vegf120拷贝/Gapdh拷贝)。(C) Vegf164基因表达(Vegf164拷贝/Hprt拷贝)。(D) Vegf164基因表达(Vegf164拷贝/Gapdh拷贝)。(E) Vegf188基因表达(Vegf188拷贝/Hprt拷贝)。(F) Vegf188基因表达(Vegf188拷贝/Gapdh拷贝)。

[0058] 图5是从激光诱导CNV后7天,用PBS、抗CD14或阿柏西普(80 μ g/ μ l)处理的眼部分离的RPE中Tgfb1和Colla1表达的图形表示。(A) Tgfb1基因表达(Tgfb1拷贝/Hprt拷贝)。(B) Tgfb1基因表达(Tgfb1拷贝/Gapdh拷贝)。(C) Colla1基因表达(Colla1拷贝/Hprt拷贝)。(D) Colla1基因表达(Colla1拷贝/Gapdh拷贝)。(单因素ANOVA,事后Tukeys,* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$)。

[0059] 图6是在激光诱导CNV后第2、7和14天,用抗CD14抗体处理,在视网膜和RPE中VEGF表达的图形表示。(A)视网膜中VEGF表达的平均值 $\pm$ SEM(和个体数据)的图。(B)RPE中VEGF表达的平均值 $\pm$ SEM(和个体数据)的图。(每组 $N=6$;双因素ANOVA;事后Tukeys检验,* $p < 0.01$)。

[0060] 图7是CNV后两天,在不同处理中CD45+白细胞群和亚群(A-F)的招募的图形表示。数据代表四个独立实验。每个群都表示为各自活细胞的百分比。每组 $N=7-8$,平均值 $\pm$ SEM。单因素ANOVA,* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

[0061] 图8是CNV后7天,通过流式细胞术评估的不同处理中CD45+白细胞群和亚群(A-F)的招募的图形表示。数据代表两个独立实验。 $N=4-8$ 每组,平均值 $\pm$ SEM。单因素ANOVA,* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$ 。

[0062] 图9是在CNV后,在每次处理的7天时间过程中,CD45+白细胞群和亚群(A-F)招募的图形表示。数据代表六个独立实验。 $N=4-8$ 每组,平均值 $\pm$ SEM。双因素ANOVA,* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$ 。

0.01,****P<0.0001。

[0063] 图10是在激光诱导CNV后7天,白细胞招募以及白细胞比例的图形表示,表示为存在于RPE/脉络膜中的髓系细胞、树突状细胞、炎性单核细胞、驻留单核细胞/巨噬细胞和嗜中性粒细胞。(A)激光诱导CNV两天后,CD45+/CD34+/CCR2+/MHCII+细胞(纤维细胞)招募的变化。(B)激光诱导CNV后7天,CD45+/CD34+/CCR2+/MHCII+细胞(纤维细胞)的变化。(C)以活细胞百分比表示的CD45+/CD34+/CCR2+/MHCII+细胞的比较。数据代表六个独立实验。N=4-8每组,平均值±SEM。双因素ANOVA,*P<0.05,**P<0.01,****P<0.0001。

[0064] 图11是CNV后2天,在不同处理中,CD14+CD11b+髓系细胞群的变化和在CD11b+髓系细胞亚群中CD14表达的图形表示(A-E)。数据代表四个独立实验。N=7-8每组,平均值±SEM。单因素ANOVA,*P<0.05,**P<0.01,****P<0.0001。

[0065] 图12是在CNV(A-E)后7天,不同处理的CD11b+髓系细胞亚群(A-E)的图形表示。数据代表两个独立实验。N=4每组,平均值±SEM。单因素ANOVA,*P<0.05,**P<0.01,****P<0.001。

[0066] 图13是CNV后,每次治疗的7天时间过程中,CD14+CD11b+髓系细胞群的变化和CD11b+髓系细胞亚群中CD14表达变化的图示(A-E)。数据代表六个独立实验。N=4-8每组,平均值±SEM。双因素ANOVA,*P<0.05,**P<0.01,P<0.001。

具体实施方式

[0067] 1. 定义

[0068] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同含义。虽然,与本文描述的那些类似或等同的任何方法和材料都可以用于本发明的实践或测试中,描述了优选的方法和材料。出于本发明的目的,以下术语如下定义。

[0069] 本文使用的冠词“一种(a)”和“一种(an)”指的是该冠词的语法对象的一个或多于一个(即,指至少一个)。举例而言,“一种元素”指的是一个元素或多于一个元素。

[0070] 如本文所用,“和/或”是指并涵盖一个或多个相关列出的项目的任何和所有可能组合,以及当解释为可替代的(或)时缺少组合。

[0071] 术语“活性剂”和“治疗剂”在本文中可互换地使用,指预防、减少或改善疾病或病症的至少一种症状的试剂。

[0072] 术语“同时施用(administration concurrently)”或“同时施用的(administering concurrently)”或“共同施用(co-administering)”等是指施用含有两种或更多种试剂的单一组合物,或将每种试剂作为分开的组合物施用、和/或通过分开的途径在足够短的时间段内同期(contemporaneously)、或同时或顺序地递送,使得有效结果等同于当所有这些试剂作为单一组合物施用时获得的结果。“同时的”是指试剂基本上在同一时间施用,最佳是在同一制剂中一起施用。“同期的”是指试剂在时间上紧邻施用,例如,一种试剂在另一种试剂施用之前或之后在约一分钟内至约一天内施用。任何同期的时间都是有用的。然而,通常的情况是,当不同时施用,试剂将在约一分钟至约八小时内施用,并且合适地在小于约一小时至约四小时内施用。当同期施用,试剂适当的在受试者的相同位点施用。术语“相同位点”包括确切定位,但可以在约0.5至约15厘米内,优选地在约0.5至约5

厘米内。如本文所用,术语“分开的”是指间隔施用试剂,例如,以约一天至数周或数月的间隔施用试剂。试剂可以以任一顺序施用。如本文所用的术语“顺序地”指按顺序施用试剂,例如,以几分钟、几小时、几天或几周的时间间隔施用试剂。如果合适的话,可以以规律的重复周期施用试剂。

[0073] 术语“拮抗剂抗体”以最广义使用,包括抑制或降低与抗体结合的抗原(例如,CD14)的生物活性的抗体。例如,拮抗剂抗体可以部分或完全阻断受体(例如,CD14)和配体(例如,DAMP或PAMP)之间的相互作用,或者可以由于受体的三级结构改变或下调而实际上降低相互作用。因此,CD14拮抗剂抗体涵盖结合CD14并在任何有意义的程度上阻断、抑制、无效、拮抗、抑制、降低或减少(包括显著地)CD14激动剂活性的抗体,所述CD14激动剂活性包括活化下游通路,如,Toll样受体(TLR)信号传导通路(例如,TLR4信号传导通路)以及含有TIR结构域的适体诱导的IFN- β (TRIF)通路,或通过CD14配体(例如,DAMP或PAMP)与CD14结合引发细胞反应(例如,产生促炎介质,包括促炎细胞因子)。

[0074] 本文中的术语“抗体”以最广义使用,具体涵盖天然存在的抗体、单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)、抗体片段或任何其他抗原结合分子(只要其表现出期望的免疫相互作用)。天然存在的“抗体”在其范围内包括免疫球蛋白,其包含通过二硫键相互连接的至少两条重链(H)和两条轻链(L)。每条重链包含重链可变区(本文缩写为VH)和重链恒定区。重链恒定区包含特定的CH结构域(例如,CH1、CH2和CH3)。每条轻链包含轻链可变区(本文缩写为VL)和轻链恒定区。轻链恒定区包含一个结构域CL。VH和VL区可进一步细分为高变区(称为互补决定区(CDR)),其间散布有更保守的区(称为框架区(FR))。每个VH和VL由3个CDR和4个FR组成,按以下顺序从氨基末端至羧基末端排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)和经典补系统的第一组分(C1q)。抗体可以是任何同种型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)、子类或其修饰形式(例如,IgG1同种型,其携带L234A和L235A双突变(IgG1-LALA))。抗体可以是任何物种的、嵌合的、人源化的或人的。在其他实施方案中,抗体是同源化的重链抗体(例如,骆驼化抗体),其缺少第一恒定区结构域(CH1)但除此之外保留完整的重链,并且能够通过抗原结合结构域结合抗原。抗体-模块识别结构域(MRD)融合物中重链和轻链的可变区将包含与目标抗原相互作用的功能性结合结构域。

[0075] 如本文所用,“可变结构域”(轻链的可变结构域(VL)、重链的可变结构域(VH))表示直接参与抗体与抗原结合的轻链和重链结构域对中的每一个。可变轻链和重链结构域具有相同的一般结构,每个结构域包含由三个CDR或“高变区”连接的四个FR,其序列是广泛保守的。FR采用 β 片层构象,CDR可以形成连接 β 片层结构的环。每条链中的CDR由FR保持在其三维结构中,并与来自另一条链的CDR一起形成抗原结合位点。

[0076] 当在本文中使用时,术语“抗原结合部分”是指通常负责抗原结合的抗体的氨基酸残基,其通常包含来自CDR的氨基酸残基。因此,“CDR”或“互补决定区”(也称为“高变区”)在本文中可互换使用,指抗体的轻链和重链的氨基酸序列,其形成三维环结构,有助于抗原结合位点的形成。在重链和轻链的每个可变区中存在三个CDR,对于每个可变区,其被指定为“CDR1”、“CDR2”和“CDR3”。如本文所用,术语“CDR集”指存在于结合抗原的单一可变区中的一组三个CDR。这些CDR的确切边界已根据不同的系统进行了不同的定义。Kabat描述的系统

(Kabat等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) 和 (1991)) 不仅提供了适用于任何抗体的可变区的明确残基编号系统, 而且还提供了定义三个CDR的精确残基边界。这些CDR可称为“Kabat CDR”。Chothia和同事(Chothia和Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia等人, 1989, Nature 342:877-883)发现Kabat CDR中的某些子部分采用几乎相同的肽骨架构象, 尽管在氨基酸序列水平上具有很大的多样性。这些子部分被指定为“L1”、“L2”和“L3”, 或“H1”、“H2”和“H3”, 其中“L”和“H”分别指轻链和重链区域。这些区域可称为“Chothia CDR”, 其边界与Kabat CDR重叠。其他的定义与Kabat CDR重叠的CDR的边界描述见于Padlan (1995. FASEB J. 9:133-139) 和MacCallum (1996. J. Mol. Biol. 262(5):732-745)。还有其他CDR边界定义可以不严格遵循这些系统之一, 但仍然会与Kabat CDR有重叠, 虽然根据预测或实验发现其可能会缩短或延长, 特定残基或残基组、甚至整个CDR并不显著影响抗原结合。

[0077] 如本文所用, 术语“框架区”或“FR”是指可变区除去CDR的剩余序列。因此, 抗体的轻链和重链可变结构域从N末端到C末端包含结构域FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。CDR和FR通常根据Kabat, E. A. 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991) 和/或来自“超变环”的那些残基标准定义来确定。

[0078] 如本文所用, 术语“轻链可变区”(“VL”)和“重链可变区”(VH)分别指轻链和重链N末端部分的区或结构域, 其对于每个抗体具有不同的一级氨基酸序列。抗体的可变区通常由轻链和重链的氨基末端结构域组成, 因为它们折叠在一起形成针对抗原的三维结合位点。基于结构相似性, 已经定义了VH和VL的几种亚型, 例如, Kabat数据库中所列的。

[0079] 术语“嵌合抗体”是指包含来自一个物种的重链和轻链可变区序列以及来自另一物种的恒定区序列的抗体, 如, 具有与人恒定区连接的鼠重链和轻链可变区的抗体。

[0080] 非人(例如, 啮齿动物)抗体的“人源化”形式是包含源自非人免疫球蛋白的最少序列的嵌合抗体。对于大多数部分, 人源化抗体是人免疫球蛋白(接受体抗体), 其中来自受体的高变区的残基被替换为来自非人物种(供体抗体)(例如, 小鼠、大鼠、兔或非人灵长类动物)的具有所需特异性、亲和力和能力的高变区的残基。在一些情况下, 人免疫球蛋白的框架区(FR)残基被相应的非人残基替换。因此, 人源化抗体的FR和CDR不必精确地对应于亲代(即, 供体)序列, 例如, 可以通过取代、插入和/或删除至少一个氨基酸残基以使供体抗体CDR或共有框架突变, 从而使该位点的CDR或FR既不对应供体抗体也不对应共有框架。然而, 通常地, 这样的突变不是广泛的并且通常会避免涉及与抗原结合的“关键残基”。通常地, 至少80%, 优选至少85%, 更优选至少90%, 最优选至少95%的人源化抗体残基将对应于亲代FR和CDR序列的残基。如本文所用, 术语“共有框架”是指在共有免疫球蛋白序列中的框架区。如本文所用, 术语“共有免疫球蛋白序列”是指由相关免疫球蛋白序列家族中最常出现的氨基酸(或核苷酸)形成的序列(参见, 例如, Winnaker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1987))。因此, “共有免疫球蛋白序列”可以包含“共有框架区”和/或“共有CDR”。在免疫球蛋白家族中, 共有序列中的每个位置都被该家族中该位置出现频率最高的氨基酸占据。如果两个氨基酸出现的频率相同, 则任何一个都可以包含在共有序列中。通常, 人源化抗体将包含至少一个、以及通常是两个可变结构域的基本上全

部,其中全部或基本上全部的高变环对应于非人免疫球蛋白的高变环,以及全部或基本上全部的FR是人免疫球蛋白序列的FR。人源化抗体一般还任选地包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常是人免疫球蛋白的至少一部分。有关详细信息,参见Jones等人(1986.Nature 321:522-525),Riechmann等人(1988.Nature 332:323-329)和Presta(1992.Curr.Op.Struct.Biol.2:593-596)。人源化抗体可以选自免疫球蛋白的任何类别,包括IgM、IgG、IgD、IgA和IgE,以及任何同种型,包括而不限于IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。人源化抗体可以包含来自多于一种类别或同种型的序列,可以选择特定的恒定结构域以使用本领域已知的技术优化期望的效应子功能。如本文所用,术语“关键残基”是指可变区内的某些残基,其对抗体,特别是人源化抗体的结合特异性和/或亲和力具有更大影响。关键残基包括,但不限于以下一种或多种:与CDR相邻的残基、潜在的糖基化位点(可以是N-或O-糖基化位点)、稀有残基、能够与抗原相互作用的残基、能够与CDR相互作用的残基、规范(canonical)的残基、在重链可变区和轻链可变区之间的接触残基、在Vernier区内的残基以及在Chothia定义的可变重链CDR1和Kabat定义的第一重链框架之间的重叠区中的残基。

[0081] 如本文所用,“Vernier”区是指框架残基的子集,其可以调节CDR结构并微调与抗原的配合,如Foote和Winter所述(1992.J.Mol.Biol.224:487-499)。Vernier区残基形成CDR的下层,可以影响CDR的结构以及抗体的亲和力。

[0082] 如本文所用,术语“规范”残基是指CDR或框架中定义特定规范CDR结构的残基,如Chothia等人所定义(1987.J.Mol.Biol.196:901-917;1992.J.Mol.Biol.227:799-817),两者都通过引用并入本文。根据Chothia等人,许多抗体的CDR的关键部分具有几乎相同的肽骨架确认,尽管在氨基酸序列水平上存在很大差异。每个规范结构主要指为形成环的连续氨基酸残基段指定一组肽骨架扭转角。

[0083] 如本文所用,术语“供体”和“供体抗体”指为“接受体抗体”提供一个或多个CDR的抗体。在一些实施方案中,供体抗体是来自与从中获得FR或衍生FR的抗体不同物种的抗体。在人源化抗体的上下文中,术语“供体抗体”是指提供一个或多个CDR的非人抗体。

[0084] 如本文所用,术语“接受体”和“接受体抗体”指提供一个或多个FR的至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%的氨基酸序列的抗体。在一些实施方案中,术语“接受体”是指提供恒定区的抗体氨基酸序列。在其他实施方案中,术语“接受体”是指提供一个或多个FR和恒定区的抗体氨基酸序列。在具体实施方案中,术语“接受体”指提供一个或多个FR的至少80%、优选至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%的氨基酸序列的人抗体氨基酸序列。根据该实施方案,接受体可以包含不会(没有)存在于人抗体的一个或多个特异性位置的至少1、至少2、至少3、至少4、至少5、或至少10个氨基酸残基。接受体框架区和/或接受体恒定区可以是,例如源自或获自种系抗体基因、成熟抗体基因、功能性抗体(例如,本领域公知的抗体、开发中的抗体或市售抗体)。

[0085] 如本文所用,术语“人抗体”旨在包括具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。本发明的人抗体可以包括不是由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或定点诱变、或通过体内体细胞突变引入的突变),例如在CDR中以及特别是在CDR3中。然而,如本文所用,术语“人抗体”不旨在包括这样的抗体,其中衍生自另一哺乳动物物种(如小鼠)的种系的CDR序列已被移植至人框架序列。

[0086] 术语“重链可变区CDR1”和“H-CDR1”可互换地使用,如术语“重链可变区CDR2”和

“H-CDR2”、术语“重链可变区CDR3”和“H-CDR3”、术语“轻链可变区CDR1”和“L-CDR1”；术语“轻链可变区CDR2”和“L-CDR2”以及术语“轻链可变区CDR3”和“L-CDR3”抗体片段可互换地使用。在整个说明书中，互补决定区（“CDR”）根据Kabat的定义进行定义，除非另有说明。Kabat定义是对抗体中的残基进行编号的标准，其通常用于识别CDR区（Kabat等人，（1991），第5版，NIH出版第91-3242号）。

[0087] 抗原结合可以通过完整抗体的“片段”或“抗原结合片段”进行。在此，两个术语可互换使用。术语抗体的“抗体片段”中涵盖的结合片段的示例包括Fab片段，其是由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段；F(ab')₂片段，一种二价片段，其包含由铰链区的二硫桥连接的两个Fab片段；由VH和CH1结构域组成的Fd片段；由抗体单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段；由VH结构域组成的单结构域抗体（dAb）片段（Ward等人，1989.Nature 341:544-546）；以及分离的互补决定区（CDR）。在一个具体实施方案中，本公开的抗体是缺少全部或部分Fc区的抗原结合片段。

[0088] “单链可变片段（scFv）”是单一蛋白链，其中VL和VH区配对形成单价分子（称为单链Fv（scFv）；参见，例如，Bird等人，1988.Science 242:423-426；和Huston等人，1988.Proc.Natl.Acad.Sci.85:5879-5883）。尽管VL和VH这两个结构域由分开的基因编码，但可以使用重组方法通过人工肽接头将VL和VH连接起来，从而使其成为单一蛋白链。此类单链抗体包括一个或多个抗原结合部分。这些抗体片段是使用本领域技术人员已知的常规技术获得的，并且以与完整抗体相同的方式筛选片段的应用。

[0089] 如本文所用，术语“单克隆抗体”和缩略语“MAB”和“mAb”是指从实质上均质的抗体群体中获得的抗体，即，包含个体抗体的群体是相同的（除了可以少量存在的可能天然存在的突变之外）。单克隆抗体是针对单一抗原高度特异性的。此外，与通常包含针对不同决定簇（表位）的不同抗体的多克隆抗体制剂相反，每个mAb针对抗原上的单一决定簇。修饰词“单克隆的”不应解释为需要通过任何特定方法生产抗体。单克隆抗体可以由例如产生抗体的细胞的单克隆（包括杂交瘤）产生。术语“杂交瘤”通常是指培养的肿瘤淋巴细胞与引发的B或T淋巴细胞之间的细胞融合的产物，其表达亲代细胞的特异性免疫能力。

[0090] “结合”目的抗原（例如，CD14）的抗体是以足够的亲和力结合抗原的抗体，以使得该抗体作为靶向表达该抗原的细胞或组织的治疗剂，而不与其他蛋白发生显著的交叉反应。在此类实施方案中，相较于抗体、寡肽或其它有机分子与其特定靶标蛋白的结合，抗体与“非靶标”蛋白的结合程度将小于约10%，例如，通过荧光激活细胞分选（FACS）分析、酶联免疫吸附测定（ELISA）、免疫沉淀或放射免疫沉淀（RIA）所测定。因此，拮抗CD14的抗体适当地抑制或降低促炎介质，包括促炎细胞因子/趋化因子的产生。关于抗体与靶分子的结合，术语“特异性结合”、或“特异性结合至”、或“特异于”特定多肽或特定多肽靶标上的表位，指可测量的与非特异性相互作用不同的结合。可以测量特异性结合，例如，通过将分子的结合与对照分子的结合相比较以确定，所述对照分子通常是不具有结合活性的具有相似结构的分子。例如，可以通过与靶标相似的对照分子（例如，过量的未标记靶标）进行竞争以确定特异性结合。在这种情况下，如果过量的未标记的靶标竞争性地抑制了标记的靶标与探针的结合，则表明是特异性结合。结合抗体的抗原特异性区通常称为“表位”。术语“表位”广泛地包括被抗体或T细胞受体特异性识别、或以其他方式与分子相互作用的在抗原上的位点。通常，表位是分子的活性表面基团（如氨基酸、或碳水化合物或糖侧链），通常可以具有特异性

的三维结构特征以及特异性的电荷特征。正如本领域技术人员所理解的,实际上任何可以被抗体特异性结合的都可以是表位。

[0091] “抗VEGF试剂”(或VEGF抑制剂或VEGF拮抗剂)是指能够中和、阻断、抑制、废除、降低或干扰血管内皮生长因子(VEGF)活性的分子,所述血管内皮生长因子(VEGF)活性包括但不限于其与一种或多种VEGF受体结合。抗VEGF试剂包括抗VEGF抗体(包括其抗原结合片段)、特异性结合VEGF从而隔离其与一种或多种受体结合的受体分子和衍生物(例如,VEGF Trap)、抗VEGF受体的抗体和VEGF受体拮抗剂(如VEGFR酪氨酸激酶的小分子抑制剂)和融合蛋白。例如,示例性抗VEGF试剂包括抗VEGF抗体贝伐单抗(bevacizumab)和雷珠单抗、VEGF Trap阿柏西普(也称为VEGF Trap Eye)和小分子,如抑制由VEGF刺激的酪氨酸激酶的拉帕替尼(lapatinib)、舒尼替尼(sunitinib)、索拉非尼(sorafenib)、阿西替尼(axitinib)和帕唑帕尼(pazopanib)。“抗VEGF疗法”是指使用抗VEGF试剂的治疗方案。

[0092] 在该说明书中,除非上下文需要,否则词语“包括(comprise)”、“包含(comprises)”和“含有(comprising)”将被理解为指包括所陈述的步骤或元素、或者步骤或元素的组,而不排除任何其它的步骤或元素、或者步骤或元素的组。因此,术语“包含”等的使用表示所列元素是必需的或强制性的,但其他元素是任选的并且可以存在也可以不存在。“由……组成”是指包括,并限于短语“由……组成”之后的内容。因此,短语“由……组成”表示所列要素是必需的或强制性的,并且不得存在其他要素。通过“基本上由……组成”,意为包括短语后列出的任何元素,并且限于不干扰或有助于列出的元素在公开内容中指定的活性或作用的其他元素。因此,短语“基本上由……组成”表明列出的元素是必须的或强制的,而其它的元素是任选的,并且根据它们是否影响列出的元素的活性或作用而可以或不可以出现。

[0093] 在治疗疾病或病症的上下文中,“有效量”是指将一定量的试剂或组合物(以单剂或作为系列的一部分)施用至需要这种治疗或进行预防的个体,用于有效地预防出现该病症的症状、控制此类症状和/或治疗现有症状。有效量将根据待治疗个体的年龄、健康和身体状况以及疾病症状是否明显、待治疗个体的分类群、组合物的制剂、医学状况的评估以及其他相关因素而不同。可通过测量受试者体内的药物积累计算最佳给药方案。最佳剂量可以根据在个体受试者中的相对效力而变化,通常可以基于在体外和体内动物模型中发现有效的EC50值进行估计。普通技术人员可以容易地确定最佳剂量、给药方法学和重复率。预计该量将落在一个相对较宽的范围内,可以通过常规试验确定。

[0094] 与眼部炎症、新生血管形成或纤维化或视力丧失相关的术语“抑制”或“减少”等是指,对患有眼部疾病的受试者在施用抗CD14拮抗剂抗体后,与未施用该抗体相比,在受试者的眼部炎症、新生血管形成或纤维化或视力丧失中具有至少是小的但可以测量的抑制或减少。通常,抑制或降低是统计学上显著的抑制或降低。在一些实施方案中,眼部炎症、新生血管形成或纤维化或视力丧失是降低了或抑制了至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或更多。在一个示例中,视力丧失通过评估受试者的最佳矫正视力(BCVA)来评估,如本领域已知的,例如使用标准的糖尿病性视网膜病变早期治疗研究(Early Treatment of Diabetic Retinopathy Study)(ETDRS)样图表)。在其他示例中,新生血管形成和/或纤维化的程度使用标准技术,如荧光素血管造影、彩色眼底摄影、光学相干断层成像或眼底自发荧光进行评估。

[0095] 通过“分离的”，意指材料基本上或实质上不含在其天然状态中通常伴随其的组分。

[0096] 如本文所用，术语“配体”是指能够结合受体的任何分子。

[0097] 术语“局部眼部施用”是指非全身性眼内施用，包括，例如，玻璃体内、结膜下、视网膜下、眼球后和/或前房内施用。局部眼部施用可以通过不连续注射实现（如用针头或其他递送装置），或通过植入实现，如用于持续或延长活性剂的释放。

[0098] 术语“对抗VEGF试剂无反应者”是指患有眼部疾病的受试者，其没有或不会以预期的积极方式对抗VEGF试剂的治疗产生反应。因此，无反应者包括对抗VEGF试剂有或将有不完全反应、不良反应或无反应的受试者。无反应者可以根据本领域技术人员接受的标准准则和定义来识别和分类。在一些示例中，无反应者被定义为在一段时间（例如，3、6或12个月）的抗VEGF治疗后，与基线（即治疗开始时）相比，在最佳矫正视力（BCVA）上没有显示出增益（例如，没有改变或丧失（例如，超过0.2或5个字母））的受试者，和/或受试者在开始抗VEGF治疗后3个月时，通过光学相干断层扫描术（OCT）扫描检测到持续的视网膜下或视网膜内积液（参见，例如Gao等人，2020，Scientific Reports, 10:1341）。在其他示例中，生物标记物用于将受试者分类为无反应者。例如，甘油磷酸胆碱（GPC）、溶血磷脂酰胆碱（LysoPC）和/或磷脂酰丝氨酸（PS）的血清水平可以用于预测受试者是否对抗VEGF试剂无反应（Gao等人，2020，Scientific Reports, 10:1341）。在这样的示例中，受试者可能还没有开始抗VEGF疗法，但是受试者由于其生物标记物谱被预测不会对抗VEGF疗法产生反应，在此基础上被分类为无反应者。

[0099] “药学上可接受的载体”是指药物载剂，其包含不是生物学上或其他方面不可取的材料，即，该材料可以与选择的活性剂一起施用至受试者，而不会引起任何或实质性的不良反应。载体可以包括赋形剂和其他添加剂，如稀释剂、洗涤剂、着色剂、润湿剂或乳化剂、pH缓冲剂、防腐剂、转染剂等。

[0100] 类似地，本文提供的化合物的“药理学上可接受的”盐、酯、酰胺、前药或衍生物不是在生物学上或其他方面不可取的盐、酯、酰胺、前药或衍生物。

[0101] 术语“多核苷酸”、“遗传物质”、“遗传形式”、“核酸”和“核苷酸序列”包括RNA、cDNA、基因组DNA、合成形式和混合聚合物，包括有义链和反义链，并且可以是化学或生物化学修饰的或可以包含非天然或衍生的核苷酸碱基，如本领域技术人员将容易理解的那样。

[0102] 术语“促炎介质”是指有利于炎症的免疫调节剂。此类试剂包括细胞因子，如趋化因子、白介素（IL）、淋巴因子和肿瘤坏死因子（TNF）以及生长因子。在具体实施方案中，促炎介质是“促炎细胞因子”。通常，促炎细胞因子包括IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6和TNF- α ，其主要负责早期反应。其他促炎介质包括LIF、IFN- γ 、IFN- β 、IFN- α 、OSM、CNTF、TGF- β 、GM-CSF、TWEAK、IL-11、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-19、IL-20、IL-8、IL-16、IL-22、IL-23、IL-31和IL-32（Tato等人，2008，Cell 132:900；Cell 132:500，Cell 132:324）。促炎介质可以作为内源性热原（IL-1、IL-6、IL-17、TNF- α ），通过巨噬细胞和间充质细胞（包括成纤维细胞、上皮和内皮细胞）上调二级介质和促炎细胞因子的合成、刺激急性期蛋白的产生或吸引炎性细胞。在具体实施方案中，术语“促炎细胞因子”涉及TNF- α 、IL-1 α 、IL-6、IFN β 、IL-1 β 、IL-8、IL-17和IL-18。

[0103] 如本文所用，术语“眼部疾病或病症”是指影响眼部的疾病或病症，表现为眼部炎

症、新生血管形成和/或纤维化,并最终导致视力丧失。适用于根据本公开的方法和试剂治疗的示例性眼部疾病或病症包括湿性老年性黄斑变性(湿性AMD)、病理性近视、糖尿病性视网膜病变、遗传性视网膜营养不良(也称为遗传性视网膜营养不良(IRD),例如,利伯氏先天性黑朦(LCA)、斯塔加特黄斑营养不良、Best病和Bestrophinopathies、青少年型X连锁视网膜劈裂症、先天性静止性夜盲症(CSNB)、色盲和乌谢尔综合征)、干性AMD、增殖性玻璃体视网膜病变、早产儿视网膜病变、糖尿病性黄斑水肿、新生血管性青光眼、干眼症、与青光眼滤过手术(GFS)相关的纤维化、Coats氏病、非感染性葡萄膜炎(NIU)、黄斑毛细血管扩张症(MacTel)、黄斑囊样水肿、鸟枪弹样脉络膜视网膜病变、小柳原田氏病、特发性多灶性脉络膜炎、视网膜血管炎、视网膜分支静脉阻塞(BRVO)和视网膜中央静脉阻塞(CRVO)、息肉状脉络膜血管病变、家族性渗出性玻璃体视网膜病变(FEVR)、特发性视网膜炎、血管炎、动脉瘤和神经视网膜炎(IRVAN)、Doyone蜂窝状视网膜营养不良和增强型S锥综合征。

[0104] 如本文所用,术语“全身施用(systemic administration)”或“全身施用地(administered systemically)”或“全身施用的(systemically administered)”是指将试剂引入受试者,不包括中枢神经系统。因此,很明显,局部眼部施用以及眼部植入不在术语“全身施用”或“全身施用地”或“全身施用的”的范围内。本文所述的试剂(例如,抗体)或药物组合物可以以任何可接受的形式全身施用,如片剂、液体、胶囊、粉末等;通过静脉内、腹膜内、肌内、皮下或肠胃外注射;通过透皮扩散或电泳;以及通过微型泵或其他植入的延长释放装置或制剂施用。根据一些实施方案,全身施用通过选自腹膜内、静脉内、皮下和鼻内施用及其组合的途径进行。

[0105] 在本文中可互换使用的术语“受试者”、“患者”和“个体”是指任何受试者,特别是脊椎动物受试者,甚至更特别是患有MI的哺乳动物受试者(例如,人)。

[0106] 如本文所用,术语“治疗(treatment)”、“治疗的(treating)”等是指在需要治疗的受试者(即患有眼部疾病或病症的受试者)中获得期望的药理和/或生理作用。“治疗”是指改善或预防眼部疾病或病症的一种或多种症状或影响(例如,后果)。在具体示例中,治疗包括改善或预防眼部炎症、新生血管形成和/或纤维化,和/或减少视力丧失。提及“治疗(treatment)”、“处理(treat)”或“治疗的(treating)”并不一定意味着逆转或预防眼部疾病或病症的任何或所有症状或影响。例如,受试者可以最终患有一种或多种症状或受到一种或多种影响,但与治疗前相比,症状或影响的量和/或严重性减少,和/或生活质量提高。

[0107] 除非另有具体说明,否则本文描述的每个实施方案将被比照适用于每个和每一个实施方案。

[0108] 2. CD14拮抗剂抗体

[0109] 本公开提供包含CD14拮抗剂抗体的方法、用途和组合物,用于治疗受试者的眼部疾病或病症。本公开还提供包含CD14拮抗剂抗体的方法、用途和组合物,用于治疗眼部疾病或病症。

[0110] 本公开考虑任何CD14拮抗剂抗体,其结合CD14(如,人CD14(例如,人mCD14或sCD14))并阻断DAMP或PAMP与CD14结合,和/或结合CD14并抑制或降低CD14激动剂介导的导致促炎介质产生(包括促炎细胞因子产生)的反应。在一些实施方案中,本发明的CD14拮抗剂抗体抑制CD14激动剂(合适地为DAMP或PAMP)与CD14的结合,从而抑制或降低促炎细胞因子的产生。在这种类型的说明性示例中,CD14拮抗剂抗体选自3C10抗体,其结合包含在人

CD14的氨基酸7至氨基酸14的区的至少一部分中的表位(van Voohris等人, 1983.J.Exp.Med.158:126-145;Juan等人,1995.J.Biol.Chem.270(29):17237-17242); MEM-18抗体,其结合包含在CD14的氨基酸57至氨基酸64的区的至少一部分中的表位(Bazil等人,1986.Eur.J.Immunol.16(12):1583-1589;Juan等人,1995.J.Biol.Chem.270(10):5219-5224), the 4C1抗体(Adachi等人,1999.J.Endotoxin Res.5:139-146;Tasaka等人, 2003.Am.J.Respir.Cell.Mol.Biol.;2003.29(2):252-258),以及抑制LPS结合和压制促炎细胞因子产生的28C5和23G4抗体;以及部分抑制LPS结合和压制促炎细胞因子产生的18E12抗体(Leturcq等人的美国专利第5,820,858、6,444,206和7,326,569号)。在一些实施方案中,本公开的CD14拮抗剂抗体抑制CD14与TLR(如TLR4)的结合,从而阻断CD14激动剂介导的反应,其示范性示例包括国际公布W02002/42333中公开的F1024抗体。其他CD14拮抗剂抗体包括单链抗体scFv2F9和相关的人鼠嵌合抗体Hm2F9(Tang等人,2007,Immunopharmacol Immunotoxicol 29,375-386;和Shen等人,2014,DNA Cell Biol.33(9):599-604)。CD14拮抗剂抗体的其他示例包括抗人CD14 18D11 IgG1mAb、18D11 IgG1 F(ab)'2片段和嵌合的r18D11抗体(IgG2/4)(参见,例如Lau等人,2013,J Immunol 191:4769-4777)。上述与CD14拮抗剂抗体相关的每篇参考文献均通过引用整体并入本文。CD14拮抗剂抗体可以是全长免疫球蛋白抗体、或完整抗体的抗原结合片段,其代表性示例包括Fab片段、F(ab')2片段、由VH和CH1结构域组成的Fd片段、由抗体单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段,单结构域抗体(dAb)片段(Ward等人,1989.Nature 341:544-546),其由VH结构域组成;以及分离的CDR。合适地,CD14拮抗剂抗体是嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。

[0111] 在一些实施方案中,CD14拮抗剂抗体包含美国专利第5,820,858号公开的抗体的VH和VL:

[0112] (1)包含以下的抗体:

[0113] VL结构域,其包含以下序列、由或基本上由以下序列组成:

[0114] QSPASLAVSLGQRATISC RASESVDSFGNSFMH WYQQKAGQPPKSSIIY RAANLES
GIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYFC QQSYEDPWT FGGGTKLGNQ [SEQ ID NO: 1] (3C10 VL);

[0115] 以及

[0116] VH结构域,其包含以下序列、由或基本上由以下序列组成:

[0117] LVKPGGSLKLSCVASGFTFS SYAMS WVRQTPEKRLEWVA SISSGGTTYYPDNVKG
RFTISRDNARNILYLQMSSLRSEDAMYYCAR GYYDYHY WGQGTTTLTVSS [SEQ ID NO: 2] (3C10 VH);

[0118] (2)包含以下的抗体:

[0119] VL结构域,其包含以下序列、由或基本上由以下序列组成:

[0120] QSPASLAVSLGQRATISC RASESVDSYVNSFLH WYQQKPGQPPKLLIY RASNLQS
GIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYCC QQSNEDPTT FGGGTKLEIK [SEQ ID NO: 3] (28C5 VL);

[0121] 以及

[0122] VH结构域,其包含以下序列、由或基本上由以下序列组成:

[0123] LQQSGPGLVKPSQSLTCTVTGYSIT SDSAWN WIRQFPGNRLEWVG YISYSGSTSYNPSLKS
RISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCVR GLRFAY WGQGTLTVSA [SEQ ID NO: 4] (28C5 VH);

[0124] 以及

[0125] (3)包含以下的抗体:

- [0126] VL结构域,其包含以下序列、由或基本上由以下序列组成:
- [0127] QTPSSLSASLGDRVTISC RASQDIKNYLN WYQQPGGTVKVLII YTSRLHS
GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDFATYFC QRGDTLPWT FGGGTKLEIK [SEQ ID NO: 5] (18E12 VL);
- [0128] 以及
- [0129] VH结构域,其包含以下序列、由或基本上由以下序列组成:
- LESGPGLVAPSQSLSTCTVSGFSLT NYDIS WIRQPPGKGLEWLG VIWTSGGTNYNSAFMS
- [0130] RLSITKDNSESQVFLKMNGLQDDTGIYYCVR GDGNFYLYNFDY WGQGTTLTVSS [SEQ ID NO: 6] (18E12 VH);
- [0131] 还考虑了包含上述抗体和相关抗体的VL和VH CDR序列的抗体,其代表性实施方案包括:
- [0132] (1) 抗体,其包含:a) 包含L-CDR1、L-CDR2和L-CDR3的抗体VL结构域或其抗原结合片段,其中:L-CDR1包含序列RASESVDSFGNSFMH[SEQ ID NO:7] (3C10 L-CDR1);L-CDR2包含序列RAANLES[SEQ ID NO:8] (3C10 L-CDR2);以及L-CDR3包含序列QQSYEDPWT[SEQ ID NO:9] (3C10 L-CDR3);以及b) 包含H-CDR1、H-CDR2和H-CDR3的抗体VH结构域或其抗原结合片段,其中:H-CDR1包含序列SYAMS[SEQ ID NO:10] (3C10 H-CDR1);H-CDR2包含序列SISSGGTTYYPDNVKG[SEQ ID NO:11] (3C10 H-CDR2);以及H-CDR3包含序列GYDYHY[SEQ ID NO:12] (3C10 H-CDR3);
- [0133] (2) 抗体,其包含:a) 包含L-CDR1、L-CDR2和L-CDR3的抗体VL结构域或其抗原结合片段,其中:L-CDR1包含序列RASESVDSYVNSFLH[SEQ ID NO:13] (28C5 L-CDR1);L-CDR2包含序列RASNLQS[SEQ ID NO:14] (28C5L-CDR2);以及L-CDR3包含序列QQSNEDPTT[SEQ ID NO:15] (28C5L-CDR3);以及b) 包含H-CDR1、H-CDR2和H-CDR3的抗体VH结构域或其抗原结合片段,其中:H-CDR1包含序列SDSAWN[SEQ ID NO:16] (28C5H-CDR1);H-CDR2包含序列YISYSGSTSYNPSLKS[SEQ ID NO:17] (28C5H-CDR2);以及H-CDR3包含序列GLRFAY[SEQ ID NO:18] (28C5 H-CDR3);
- [0134] (3) 抗体,其包含:a) 包含L-CDR1、L-CDR2和L-CDR3的抗体VL结构域或其抗原结合片段,其中:L-CDR1包含序列RASESVDSYVNSFLH[SEQ ID NO:13] (IC14 L-CDR1);L-CDR2包含序列RASNLQS[SEQ ID NO:14] (IC14L-CDR2);以及L-CDR3包含序列QQSNEDPYT[SEQ ID NO:27] (IC14 L-CDR3);以及b) 包含H-CDR1、H-CDR2和H-CDR3的抗体VH结构域或其抗原结合片段,其中:H-CDR1包含序列SDSAWN[SEQ ID NO:16] (IC14 H-CDR1);H-CDR2包含序列YISYSGSTSYNPSLKS[SEQ ID NO:17] (IC14 H-CDR2);以及H-CDR3包含序列GLRFAY[SEQ ID NO:18] (IC14 H-CDR3);和
- [0135] (4) 抗体,其包含:a) 包含L-CDR1、L-CDR2和L-CDR3的抗体VL结构域或其抗原结合片段,其中:L-CDR1包含序列RASQDIKNYLN[SEQ ID NO:19] (18E12 L-CDR1);L-CDR2包含序列YTSRLHS[SEQ ID NO:20] (18E12L-CDR2);以及L-CDR3包含序列QRGDTLPWT[SEQ ID NO:21] (18E12L-CDR3);以及b) 包含H-CDR1、H-CDR2和H-CDR3的抗体VH结构域或其抗原结合片段,其中:H-CDR1包含序列NYDIS[SEQ ID NO:22] (18E12H-CDR1);H-CDR2包含序列VIWTSGGTNYNSAFMS[SEQ ID NO:23] (18E12H-CDR2);以及H-CDR3包含序列GDGNFYLYNFDY [SEQ ID NO:24] (18E12H-CDR3)。
- [0136] 在一些实施方案中,CD14拮抗剂抗体是人源化的。在这种类型的说明性示例中,人源化CD14拮抗剂抗体适当地包含与CD14拮抗剂抗体(例如,上述CD14拮抗剂抗体之一)对应

的供体CDR集以及人接受体框架。人接受体框架可以包含相对于人种系接受体框架在关键残基中的至少一个氨基酸取代,所述关键残基选自:与CDR相邻的残基;糖基化位点残基;稀有残基;规范残基;在重链可变区和轻链可变区之间的接触残基;在Vernier区内的残基;以及在Chothia定义的VH CDR1和Kabat定义的第一重链框架之间的重叠区中的残基。用于生产人源化的mAb的技术是本领域公知的(参见,例如,Jones等人,1986.Nature 321:522-525;Riechmann等人,1988.Nature 332:323-329;Verhoeyen等人,1988.Science 239:1534-1536;Carter等人,1992.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:4285-4289;Sandhu,JS.,1992.Crit.Rev.Biotech.12:437-462和Singer等人,1993.J.Immunol.150:2844-2857)。可以将来自小鼠免疫球蛋白的重链和轻链可变链中的小鼠CDR转移到人抗体的相应可变结构域中,以人源化嵌合或鼠单克隆抗体。嵌合单克隆抗体中的小鼠框架区(FR)也被替换为人FR序列。由于简单地将小鼠CDR转移到人FR中通常会导致抗体亲和力减少甚至丧失,因此可能需要进行额外的修饰以恢复鼠抗体的原始亲和力。这可以通过以下实现:将FR区中的一个或多个残基替换为其鼠对应物,以获得对其表位具有良好结合亲和力的抗体。参见,例如,Tempest等人(1991.Biotechnology 9:266-271)和Verhoeyen等人(1988同上)。通常,那些不同于其鼠对应物并且位于靠近或接触一个或多个CDR氨基酸残基的人FR氨基酸残基将是替换的候选物。

[0137] 在一个实施方案中,CD14拮抗剂抗体是IC14抗体(Axtelle等人,2001.J.Endotoxin Res.7:310-314;和美国专利申请第2006/0121574号,其通过引用整体并入本文)或其抗原结合片段。IC14抗体是嵌合(鼠/人)单克隆抗体,其特异性地结合人CD14。IC14衍生自上述鼠28C5(参见Leturcq等人的专利第5,820,858、6,444,206和7,326,569号,以及Leturcq等人,1996.J.Clin.Invest.98:1533-1538)。因此,在一个示例中,CD14拮抗剂抗体包含VL结构域和VH结构域,其中:

[0138] VL结构域包含氨基酸序列:

[0139] QSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYVNSFLHWYQKPGQPPKLLIYRASNLQSGIPARFSGSGSRTDFTLTIN

[0140] PVEADDVATYYCQQSNEDPYTFGGGTKLEIK [SEQ ID NO: 25];以及

[0141] VH结构域包含氨基酸序列:

[0142] LQQSGPGLVKPSQSLTCTVTGYTSDSAWNWIRQFPGNRLEWMGYISYSGSTSYNPSLKSRIISITRDTSKN

[0143] QFFLQLNSVTTEDTATYYCVRGLRFAYWGQGLTVTVSS [SEQ ID NO: 26]

[0143] 或者

[0144] VL结构域包含氨基酸序列:

[0145] DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYVNSFLHWYQKPGQPPKLLIYRASNLQSGIPARFSGSGSRTDF

[0146] TLTINPVEADDVATYYCQQSNEDPYTFGGGTKLEIK [SEQ ID NO: 30];以及

[0147] VH结构域包含氨基酸序列:

[0148] DVQLQQSGPGLVKPSQSLTCTVTGYTSDSAWNWIRQFPGNRLEWMGYISYSGSTSYNPSLKSRIISITRDT

[0148] SKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCVRGLRFAYWGQGLTVTVSS [SEQ ID NO: 31]。

[0149] 在另一个示例中,CD14拮抗剂抗体包含IC14的轻链和重链,其中:

[0150] 轻链包含氨基酸序列:

- [0151] QSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYVNSFLHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLQSGIPARFSGSGSRDTFTLTIN
PVEADDVATYYCQQSNEDPYTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVLC
NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC [SEQ ID NO:
28]; 以及
- [0152] 重链包含氨基酸序列:
LQQSGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDSAWNWIRQFPGNRLEWMGYISYSGSTSYNPSLKSRIISITRDTSKN
QFFLQLNSVTTEDTATYYCVRGLRFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVEKYGPPCPSCPA
- [0153] PEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK [SEQ
ID NO: 29];
- [0154] 或者
- [0155] 轻链包含氨基酸序列:
DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYVNSFLHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLQSGIPARFSGSGSRDTF
TLTINPVEADDVATYYCQQSNEDPYTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ
WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC [SEQ ID
NO: 32]; 以及
- [0157] 重链包含氨基酸序列:
DVQLQQSGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDSAWNWIRQFPGNRLEWMGYISYSGSTSYNPSLKSRIISITRDT
SKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCVRGLRFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVEKYGPPCPSC
- [0158] CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK [SEQ
ID NO: 33]。

[0159] 适用于本文方法的其他CD14的拮抗剂抗体可以通过本领域技术人员公知的方法识别。这些方法通常包括确定抗体是否能够直接拮抗CD14。例如,该方法可以包括确定抗体是否能够抑制或降低CD14的量或激动剂活性,其中抑制或降低CD14的量或激动剂活性的能力表明该抗体可以适用于治疗MI。在一些实施方案中,抗体与CD14、或在其表面表达CD14的细胞、或表达CD14的核酸序列接触,适当地在CD14激动剂(如DAMP或PAMP)的存在下,当与对照相比时,其中在激动剂存在下,CD14的量或激动剂活性降低表示抗体结合CD14并直接拮抗CD14。CD14激动剂活性的降低或抑制包括,例如抑制或降低下游通路(如TLR信号传导通路(例如,TLR4信号传导通路)和TRIF通路)的激活,或引起细胞反应(例如,产生促炎介质,包括促炎细胞因子)。

[0160] 这些方法可以在体内、离体或体外进行。特别地,使抗体与CD14、或使抗体与在其表面表达CD14的细胞(例如,免疫细胞)接触的步骤可以在体内、离体或体外进行。该方法可以在基于细胞的系统或无细胞的系统中进行。例如,该方法可以包括将在其表面表达CD14的细胞与抗体接触的步骤,以及确定细胞与抗体的接触是否导致CD14的量降低、或激动剂活性降低的步骤。在这种基于细胞的测定中,CD14和/或抗体可以是宿主细胞内源性的、可以被引入宿主细胞或组织中、可以通过引起或允许表达构建体或载体的表达被引入宿主细

胞或组织中、或可以通过刺激或激活细胞中内源基因的表达而被引入宿主细胞。在这种基于细胞的方法中,可以在存在或不存在抗体的情况下评估CD14的活性量,以确定该试剂是否正在改变细胞中CD14的量,如通过调节细胞中的CD14表达、或通过细胞内CD14蛋白的去稳定化、或改变细胞的CD14激动剂活性。在存在抗体的情况下,存在降低的CD14激动剂活性或细胞表面降低的CD14量,表明该抗体可以是用于根据本公开的适合的CD14的拮抗剂。

[0161] 在一些示例中,进一步确定该抗体是否缺乏与另一种细胞成分的实质性或可检测的结合,适当地是CD14的结合伴侣,如分泌的(例如,MD2)或位于细胞膜上的CD14结合伴侣(例如,TLR4),从而确定该抗体是CD14的特异性拮抗剂。在这种类型的非限制性示例中,在CD14激动剂(如DAMP或PAMP)存在的情况下,(1)抗体接触在其表面表达CD14的野生型细胞(例如,免疫细胞,如巨噬细胞);以及(2)抗体接触CD14阴性细胞(例如,与(1)相同但CD14基因功能丧失的免疫细胞)。如果该抗体抑制野生型细胞而非CD14阴性细胞的CD14激动剂活性,则表明该抗体是CD14特异性拮抗剂。这种类型的细胞可以使用常规方法或动物来构建。

[0162] 在其他示例中,潜在的CD14拮抗剂抗体在体内评估,如在动物模型中。在这样的体内模型中,可以评估抗体在循环(例如,血液)、或心脏、或在其他器官(例如眼、肺、肝、肾或脑)中的作用。在具体示例中,眼部疾病模型用于评估抗体的活性(例如,CNV激光小鼠模型)。

[0163] 相较于没有抗体的情况,示例性的CD14拮抗剂抗体使CD14活性或水平降低至少5%、至少10%、至少25%、至少50%、至少60%、至少75%或至少85%,或更多。在一些示例中,抗体可能导致CD14激动剂活性或水平降低,使得在抗体存在下不再检测到CD14的激动剂活性或水平。这种降低可以在受测试的样品中看到,或者例如,在执行该方法的动物模型中看到。

[0164] 优选地,抗体是如上所述的CD14的特异性拮抗剂。然而,这并不意味着特异性的CD14拮抗剂完全没有脱靶拮抗剂活性。在这方面,CD14的特异性拮抗剂对其他细胞成分的直接结合和影响可以忽略不计或很小,因此,相较于该试剂对CD14的活性、信号传导或表达的直接结合和影响,该试剂对非CD14细胞成分的活性、信号传导或表达的拮抗作用低于小于15%、小于10%、小于5%、小于1%或小于0.1%。

[0165] CD14的水平或量可以通过评估CD14基因的表达来测量。可以通过观察mRNA产生或水平、或蛋白产生或水平以评估基因表达。可以通过本领域已知的方法识别或定量表达产物,如mRNA和蛋白。此类方法可以利用杂交来特异性识别感兴趣的mRNA。例如,此类方法可以涉及PCR或实时PCR方法。识别或定量感兴趣的蛋白的方法可以涉及使用结合该蛋白的抗体。例如,此类方法可以涉及蛋白印迹。可以在存在和不存在抗体的情况下,比较CD14基因表达的调节。因此,与不存在抗体时所见的水平相比,可以识别出来使CD14基因表达降低的抗体。根据本公开,此类抗体可以是合适的CD14拮抗剂。

[0166] 用于识别根据本公开使用的合适的拮抗剂抗体的方法可以评估CD14的激动剂活性。例如,这种方法可以使用外周血单核细胞进行。此类细胞将产生细胞因子,如IL-1 α 、IL-6、TNF- α 、IFN- β 、IL-1 β 、IL-17和IL-8,以响应用例如LPS的刺激。因此,方法可以包括将外周血单核细胞与抗体或载剂结合并添加LPS。然后,可以将细胞孵育一定时间(例如,24小时)以允许产生促炎介质,如细胞因子。然后,可以评估细胞在该时间段内产生的细胞因子的水平,如IL-1 α 、IL-6、TNF- α 、IFN- β 、IL-1 β 、IL-17和IL-8。如果抗体具有抗CD14特性,则与载剂

处理的细胞相比,此类细胞因子的产生应该减少。

[0167] 在一些示例中,CD14拮抗剂抗体是多功能(例如,双功能)抗体。在一些示例中,双功能抗体特异于CD14和炎性分子和/或血管生成分子和/或纤维生成分子,使得双功能抗体抑制炎性分子和/或血管生成和/或纤维生成分子的活性。例如,双功能抗体可以特异于CD14和补体蛋白(例如,C3、C5、C5、B因子、D因子或备解素)、血管生成素2(Ang-2)、VEGF或血小板衍生的生长因子(PDGF)。

[0168] 3. 辅助剂和介入治疗

[0169] CD14拮抗剂抗体可以单独施用,或与其他活性剂(也称为“辅助剂”)、或其他介入治疗(如用于治疗眼部疾病或病症的试剂和介入治疗)联合施用。

[0170] 适用于本公开目的的辅助剂包括,例如,抗VEGF试剂、血管紧张素转换酶(ACE)抑制剂、结缔组织生长因子(CTGF)抑制剂、补体抑制剂(包括C3、C5、C5、B因子、D因子或备解素抑制剂)、血管生成素2(Ang-2)抑制剂、PDGF抑制剂、他汀和类固醇。

[0171] 在一个示例中,辅助剂是抗VEGF试剂(或VEGF抑制剂或拮抗剂)。VEGF是一种充分表征的刺激血管生成的信号蛋白。抗VEGF试剂已被开发用于抑制血管生成(或新生血管形成),并且已成为几种被批准用于药物治疗以新生血管形成为特征的眼部疾病(例如,CNV)的试剂之一。使用适当的制剂,或使用延长或持续释放的系统或植入物,抗VEGF试剂通常在玻璃体内施用,尽管也可以通过其他眼部途径施用,如其他局部眼部途径或甚至局部(例如,以滴眼剂的形式)。抗VEGF试剂包括,例如,抗VEGF抗体(例如,布罗利珠单抗、雷珠单抗或法瑞西单抗(结合VEGF和Ang-2的双功能抗体)、VEGF Trap分子(例如,阿柏西普和康柏西普)、其他拮抗性VEGF结合分子(如可溶性fms样酪氨酸激酶-1(sFlt-1或sVEGFR-1))和抗体模拟物(如abicipar pegol(设计的锚蛋白重复蛋白;DARPin))和酪氨酸激酶抑制剂。在一些示例中,抗VEGF试剂使用载体递送(如病毒载体),由此载体包含编码抗VEGF试剂的核酸(例如,ADVM-022,其是编码阿柏西普的腺相关病毒(AAV)载体;RGX-314,其是编码抗VEGF Fab的AAV载体;和编码sFlt-1的AAV载体rAAV.sFLT-1)。

[0172] 在另一个示例中,抗体的施用结合介入治疗,如激光光凝或光动力疗法。

[0173] 当期望联合治疗时,CD14拮抗剂抗体与一种或多种辅助剂或介入治疗分开、同时或顺序地施用。在一些实施方案中,这可以通过施用,如全身地施用包括两种类型的试剂的单一组合物或药理学制剂,或通过同时施用两种单独的组合物或制剂(其中一种组合物包含CD14拮抗剂抗体而另一种包含辅助剂)来实现。在其他实施方案中,用CD14拮抗剂抗体治疗可以在用辅助剂治疗之前或之后,以几分钟至几小时,或者甚至几天或几周的间隔进行。

[0174] 在一些情况下,抗体和辅助剂彼此在约1-12小时内,或彼此在约2-6小时内施用。在其他情况下,可以期望显著延长治疗的时间段,其中在各施用之间间隔一天或多天(例如,1、2、3、4、5、6、7或8天)或数周(例如,1、2、3、4、5、6、7或8周)。在辅助剂与CD14拮抗剂抗体分开施用的实施方案中,应当理解,可以通过与CD14拮抗剂抗体使用的施用方法相同或不同的方法施用辅助剂。

[0175] 当将两种或更多种试剂“结合”或“同时”施用至受试者时,它们可以在单一组合物中同时施用,或在分开的组合物中同时施用,或在分开的时间在分开的组合物中施用。

[0176] 4. 组合物

[0177] 如本文所述,使用CD14拮抗剂抗体,无论是单独使用还是与一种或多种辅助剂联

合使用,都可以治疗眼部疾病;和/或可以抑制患有眼部疾病的受试者的眼部炎症、新生血管形成和/或纤维化。CD14拮抗剂抗体和任选的辅助剂可以其自身施用,或与药学上可接受的载体一起施用。因此,本文还提供了包含CD14拮抗剂抗体的组合物,用于在患有眼部疾病或病症的受试者中治疗眼部疾病或病症;和/或抑制眼部炎症、新生血管形成和/或纤维化。

[0178] 可以使用一种或多种药学上可接受的载体、稳定剂或赋形剂(载剂)以常规方式配制CD14拮抗剂抗体,以形成本领域(特别是关于蛋白活性剂的领域)已知的药物组合物。在与组合物的其他成分相容并且对其接受者(例如,患者)无害的意义上,载体是“可接受的”。合适的载体通常包括生理盐水或乙醇多元醇,如甘油或丙二醇。

[0179] 抗体可以配制成中性或盐形式。药学上可接受的盐包括酸加成盐(与游离氨基形成),其与无机酸(如盐酸或磷酸)、或有机酸(如乙酸、草酸、酒石酸和马来酸)形成。与游离羧基形成的盐也可以源自无机碱,如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁,以及源自有机碱,如异丙胺、三甲胺、2-乙氨基乙醇、组氨酸和普鲁卡因。

[0180] 组合物可以适当配制用于全身施用,包括静脉内、肌内、皮下或腹膜内施用、局部眼部施用(例如,玻璃体内、结膜下、视网膜下、眼球后或前房内施用),或局部递送(例如,作为滴眼剂),并且方便地包含抗体的无菌水溶液,其优选地与接受者中的目标环境等渗。此类制剂通常通过以下制备:将固体活性成分溶解在含有生理学相容物质(如氯化钠、甘氨酸等)以及具有与生理条件相容的缓冲pH的水中,以产生水溶液,并使所述溶液无菌。这些可以在单位或多剂量容器中制备,例如,密封的安瓿或小瓶。

[0181] 该组合物可以掺入稳定剂,如,例如聚乙二醇、蛋白、糖类(例如,海藻糖)、氨基酸、无机酸及其混合物。稳定剂以适当的浓度和pH值用于水溶液中。调节水溶液的pH值在5.0-9.0范围内,优选在6-8范围内。在配制抗体时,可以使用抗吸附剂。其他合适的赋形剂通常可以包括抗氧化剂,如抗坏血酸。

[0182] 组合物可以配制为控释制剂,这可以通过使用聚合物以复合或吸附蛋白来实现。用于控释制剂的合适聚合物包括,例如聚酯、聚氨基酸、聚乙烯、吡咯酮烷、乙烯乙酸乙烯酯和甲基纤维素。另一种可能的控释方法是將抗体掺入聚合物材料的颗粒中,如聚酯、聚氨基酸、水凝胶、聚(乳酸)或乙烯乙酸乙烯酯共聚物。可选择的,不是将这些试剂掺入聚合物颗粒中,而是有可能将这些材料包入制备的微胶囊中,所述微胶囊通过以下制备,例如通过凝聚技术或通过界面聚合(例如,分别为羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)制备,或者在胶体药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米颗粒和纳米胶囊)或在粗乳液中制备。因此,在具体示例中,CD14拮抗剂抗体和任选的辅助剂被配制用于持续或延长释放,如在不可生物降解的植入物中(例如,Replenish, Inc.的Posterior Micropump™ (PMP) 药物递送系统(Humayun等人2014, Transl Vis Sci Technol.3(6):5)),以及Genentech的端口递送系统(PDS) (Campochiaro等人,2019, Ophthalmology, 126:1141-1154),可生物降解的植入物,纳米制剂(包括纳米颗粒、微粒、脂质体和树枝状聚合物)和水凝胶(参见,例如Seah等人,2020, Eye, 34:1341-1356)。在一些示例中,当组合物被配制用于对眼部局部施用(例如,作为滴眼剂)时,该组合物包含细胞穿透肽(CPP)以帮助CD14拮抗剂抗体穿过组织屏障,渗透到细胞中和细胞之间(参见,例如,Cogan等人,2017, Investigative Ophthalmology&Visual Science, 58:2578-2590)。用于将治疗性抗体递送至眼部的模式和组合物是本领域众所周知的,任何一种都可以用于根据本公开施用CD14拮

抗剂抗体(Mandel等人,2018,Adv Drug Deliv Rev.126:67-95)。

[0183] CD14拮抗剂抗体和任选的辅助剂也可以气雾剂的形式直接施用至气道。对于用作气雾剂,本发明的抑制剂溶液或悬浮液可以与合适的推进剂一起包装在加压气雾剂容器中,例如,烃类推进剂,如丙烷、丁烷或异丁烷与常规助剂。本发明的材料也可以非加压形式施用,如在喷雾器或雾化器中施用。

[0184] 本领域技术人员将认识到制剂是根据它们的预期用途,即施用途常规设计的。

[0185] 5. 治疗方法

[0186] 本公开提供了用于治疗患有眼部疾病或病症的受试者的治疗方法,如以眼部炎症、新生血管形成和/或纤维化为特征的眼部疾病或病症(即,通常在患有眼部疾病或病症的患者中观察到的眼部炎症、新生血管形成和/或纤维化)。在具体示例中,眼部疾病或病症的特征在于纤维化的存在或发展,对受试者的治疗在于预防、抑制或改善纤维化。

[0187] 示例性眼部疾病或病症包括,但不限于病理性近视、AMD(包括湿性和干性AMD)、糖尿病性视网膜病变、遗传性视网膜营养不良、增殖性玻璃体视网膜病变、早产儿视网膜病变、糖尿病性黄斑水肿、新生血管性青光眼、干眼症、与青光眼滤过手术(GFS)相关的纤维化、Coats氏病、非感染性葡萄膜炎(NIU)、黄斑毛细血管扩张症(MacTel)、黄斑囊样水肿、鸟枪弹样脉络膜视网膜病变、小柳原田(Vogt-Koyanagi-Harada)氏病、特发性多灶性脉络膜炎、视网膜血管炎、视网膜分支静脉阻塞(BRVO)和视网膜中央静脉阻塞(CRVO)、息肉状脉络膜血管病变、家族性渗出性玻璃体视网膜病变(FEVR)、特发性视网膜炎、血管炎、动脉瘤和神经视网膜炎(IRVAN)、Doyone蜂窝状视网膜营养不良和增强型S锥综合征。此类眼部疾病或病症的特征在于眼部(例如,视网膜、视网膜下、视网膜前、脉络膜、角膜、视神经、黄斑等)炎症、新生血管形成和/或纤维化。因此,CD14拮抗剂抗体(本文证明其抑制新生血管形成和纤维化,是已知的抗炎剂)的施用可以具有特定的治疗益处。通常,受试者在应用本公开的方法之前被诊断患有眼部疾病或病症,如由执业医师根据执业医师已知并在本领域广泛使用的公认标准进行诊断。

[0188] 在一个示例中,眼部疾病或病症是病理性近视(也称为高度近视或退化性近视)。病理性近视是一种严重的进行性近视,其特征是由于后部葡萄肿和矫正视力不足导致眼底发生变化,通常定义为当量球镜 $\leq -6.0D$,或眼轴长度 $\geq 26.5mm$ (Shih等人,2006年,Br J Ophthalmol 90:546-550)。临床上,与病理性近视相关的眼底镜变化包括血管变直和伸展、颞盘周围萎缩性新月体、视盘倾斜、后葡萄肿、布鲁赫(Bruch)膜上漆裂纹、视网膜下出血和CNV,这与矫正视力的显著降低有关。因此,在一些实施方案中,患有病理性近视的受试者患有CNV。病理性近视的特征还在于眼部纤维化的发展,包括用抗VEGF试剂治疗后(参见,例如,Ahn等人,2016,Retina,36(11):2140-2149;Xiao等人,2020,Br J Ophthalmol;和Zhu等人,2016.Cochrane Database of Systematic Reviews.第12卷,编号:CD011160)。

[0189] 在另一个示例中,眼部疾病是AMD,其特征是新生血管形成导致视力变形和布鲁赫膜增厚。在一个实施方案中,AMD是干性AMD。干性AMD的特征是小玻璃膜疣在视网膜色素上皮(RPE)中积聚,导致RPE丧失和黄斑区视网膜退化。在一些情况下,干性AMD是早期干性AMD。在其他情况下,干性AMD是没有地理萎缩的晚期干性AMD。在其他示例中,AMD是湿性AMD。湿性AMD通常在干性AMD之后,其特征是源自脉络膜脉管系统的新生血管膜侵入布鲁赫膜、渗漏,经常导致RPE和/或神经视网膜脱离。这些新的毛细血管具有异常的渗透性,使血

清和血液在RPE和/或感觉神经视网膜下积聚。出血的血管通常会导致黄斑疤痕。湿性AMD患者的视力丧失可能很快,导致功能性失明。在湿性AMD患者中,脉络膜新生血管和纤维组织形成的复合物可以相对快速地破坏光感受器,例如在3-24个月内。

[0190] 在另一个示例中,眼部疾病是糖尿病性视网膜病变。糖尿病性视网膜病变是糖尿病的眼部并发症,其特征是非增殖型的微动脉瘤、硬渗出物、出血和静脉异常,以及增殖型的新生血管形成、视网膜前或玻璃体出血和纤维血管增生。高血糖诱发这些视网膜微血管变化,导致视力模糊、黑斑或闪光,以及视力突然丧失。与病理性近视和AMD一样,糖尿病性视网膜病变的特征是眼部炎症、新生血管形成和纤维化(参见,例如,Roy等人,2016, *Experimental Eye Research* 142:71e75;Murakami等人,2020, *Progress in Retinal and Eye Research* 74:100778)。

[0191] 在其他示例中,眼部疾病是遗传性视网膜营养不良、增殖性玻璃体视网膜病变、早产儿视网膜病变、糖尿病性黄斑水肿、新生血管性青光眼、干眼症、与GFS相关的纤维化、Coats氏病、非感染性葡萄膜炎、黄斑毛细血管扩张症、黄斑囊样水肿、鸟枪弹样脉络膜视网膜病变、小柳原田氏病、特发性多灶性脉络膜炎、视网膜血管炎、视网膜分支静脉阻塞和视网膜中央静脉阻塞、息肉状脉络膜血管病变、FEVR、IRVAN、Doyone蜂窝状视网膜营养不良或增强型S锥综合征,其中每一个还特征在于眼部炎症、新生血管形成和/或纤维化(参见,例如,Idrees等人,2019, *Int Ophthalmol Clin*.59(1):221-240,Enrlquez等人,2020, *Asia-Pacific Journal of Ophthalmology* 9(4):358-368;Cetin等人,2018, *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*,256:1801-1806,Marano等人,2000, *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*,238:760-764;Sen等人,2019, *Indian J Ophthalmol*.67(6):763-771;Schlunck等人,2016, *Exp.Eye Res*.142,76-82;Zhavoronkov等人,2016, *Cell Cycle* 15(15):2087;Golzarri等人,2020, *Ocul Immunol Inflamm Oct* 6;1-5;Khojasteh等人,2021, *J Ophthalmol Apr* 30:6674290;Alsalamah等人,2021, *Ophthalmol Retina* 5(9):918-927;Tarib等人,2020, *J Clin Exp Ophthalmol*,11(1):1000824)。

[0192] 因此,本文考虑了在受试者中通过向受试者施用CD14拮抗剂抗体,以及任选地施用辅助剂或进行介入治疗用于治疗眼部疾病的方法,如与眼部炎症、新生血管形成和/或纤维化相关的眼部疾病或特征在于眼部炎症、新生血管形成和/或纤维化的眼部疾病(例如,病理性近视、AMD(包括湿性和干性AMD)、糖尿病性视网膜病变、遗传性视网膜营养不良、增殖性玻璃体视网膜病变、早产儿视网膜病变、糖尿病性黄斑水肿、新生血管性青光眼、干眼症、与GFS相关的纤维化、Coats氏病、非感染性葡萄膜炎、黄斑毛细血管扩张症、黄斑囊样水肿、鸟枪弹样脉络膜视网膜病变、小柳原田氏病、特发性多灶性脉络膜炎、视网膜血管炎、视网膜分支静脉阻塞和视网膜中央静脉阻塞、息肉状脉络膜血管病变、FEVR、IRVAN、Doyone蜂窝状视网膜营养不良或增强型的S锥综合征),以及通过向受试者施用CD14拮抗剂抗体,以及任选地施用辅助剂或进行介入治疗在患有眼部疾病(例如,病理性近视、AMD(包括湿性和干性AMD)、糖尿病性视网膜病变、遗传性视网膜营养不良、增殖性玻璃体视网膜病变、早产儿视网膜病变、糖尿病性黄斑水肿、新生血管性青光眼、与GFS相关的纤维化、Coats氏病、非感染性葡萄膜炎、黄斑毛细血管扩张症、黄斑囊样水肿、鸟枪弹样脉络膜视网膜病变、小柳原田氏病、特发性多灶性脉络膜炎、视网膜血管炎、视网膜分支静脉阻塞和视网膜中央静脉阻

塞、息肉状脉络膜血管病变、FEVR、IRVAN、Doyone蜂窝状视网膜营养不良或增强型的S锥综合征)的受试者中用于抑制眼部炎症、新生血管形成和/或纤维化的方法。当该方法用于治疗与GFS相关的纤维化时,受试者已进行过GFS。因此,提供了用于抑制已经进行过GFS的受试者的眼部炎症、新生血管形成和/或纤维化的方法。在一些情况下,在受试者已进行过GFS之后,向受试者施用CD14拮抗剂抗体1、2、3、4、5、6或更多小时,1、2、3、4、5、6或更多天和/或1、2、3、4、5、6或更多周。

[0193] CD14拮抗剂抗体,以及任选的辅助剂(在本文中统称为“治疗剂”)将以“有效量”施用,以实现受试者的预期目的,如减少或预防眼部疾病的一种或多种症状或后果,例如,抑制或缓解眼部炎症、新生血管形成和/或纤维化,抑制病变的发展,和/或抑制或减缓视力丧失。施用至患者的治疗剂的剂量应足以在受试者中实现有益反应。在一些示例中,与未施用抗体时相比,抗体的施用(任选地与辅助剂一起)导致眼部炎症、新生血管形成和/或纤维化的抑制或改善。在其他示例中,与未施用抗体时相比,施用抗体(任选地与辅助剂一起)导致视力丧失减少、抑制或减缓。

[0194] 在具体示例中,患有眼部疾病的受试者患有眼部纤维化、或有发展为眼部纤维化的风险(例如,视网膜、视网膜下或视网膜前纤维化,包括视网膜前膜(ERM))。因此,在一些实施方案中,识别或选择用于根据本公开的方法治疗的患有眼部纤维化、或有发展为眼部纤维化风险的受试者。

[0195] 例如,在一些实施方案中,受试者已接受抗VEGF疗法至少3、6、12、14、16或18个月。如前所述,正在接受抗VEGF治疗的患有眼部疾病(例如,AMD、病理性近视(例如,CNV)、糖尿病性视网膜病变、早产儿视网膜病变等)的患者可以发展为眼部纤维化(参见,Daniel等人,2018,Ophthalmology 125(7):1037-1046;Ahn等人,2016,Retina,36(11):2140-2149;Xiao等人,2020,Br J Ophthalmol.,Osaadon,2014,Eye (Lond),28(5):510-520;Li等人,2015,Int J Ophthalmol.8(6):1202-1206;Hu等人,2017,Journal of Ophthalmology,Article ID 5078565;Tong等人,BMC Ophthalmology,18:150),其本身可能与加速视力丧失有关。因此,在一些实施方案中,本公开提供了通过向受试者施用CD14拮抗剂抗体,以及任选施用辅助剂或进行介入治疗,以治疗受试者的眼部疾病的方法,其中,受试者已接受抗VEGF疗法至少3、6、12、14、16或18个月。本公开还提供通过向受试者施用CD14拮抗剂抗体,以及任选施用辅助剂或进行介入治疗以抑制患有眼部疾病的受试者的眼部纤维化的方法,其中,受试者已接受抗VEGF疗法至少12、14、16或18个月。在这些实施方案中,受试者可以已经接受了执业医师确定的规律的(即,以规定的或治疗前的间隔,如每月一次)抗VEGF疗法,或间歇性(例如,“根据需要”)抗VEGF治疗。

[0196] 在进一步的示例中,本公开提供了通过向受试者施用CD14拮抗剂抗体,以及任选地施用辅助剂或进行介入治疗来治疗受试者的眼部疾病的方法,其中,受试者已接受眼部新生血管形成治疗(包括CNV)至少3、6、12、14、16或18个月。除了抗VEGF试剂外,新生血管形成的治疗还可以包括酪氨酸激酶抑制剂,如Tie2抑制剂和Ang-2抑制剂。本公开还提供通过向受试者施用CD14拮抗剂抗体,以及任选施用辅助剂或进行介入治疗以抑制患有眼部疾病的受试者的眼部纤维化、新生血管形成和/或炎症的方法,其中,受试者已接受眼部新生血管形成治疗至少3、6、12、14、16或18个月。在这些实施方案中,受试者可以已经接受由执业医师确定的眼部新生血管形成的定期(即,以规定或预定的时间间隔,如每月一次)治疗,或

眼部新生血管形成的间歇性治疗(例如“按需”)。

[0197] 患有眼部疾病的受试者中的眼部纤维化的证据也可以用于识别或选择使用根据本公开的CD14拮抗剂抗体治疗的患者群体。例如,通过光学相干断层扫描术(OCT)观察到的超反射材料(HRM)被认为是纤维化的生物标记物(参见,例如,Casalino等人,Exp Rev Ophthalmology 15(2):83-91)。在其他示例中,纤维化病变(或疤痕)的存在通过,例如,荧光素血管造影、彩色眼底摄影(CFP)或眼底自发荧光(FAF)成像来检测,如本领域技术人员所知(参见,例如,Daniel等人,2014,Ophthalmology,121(3):656-666)。

[0198] 在进一步的示例中,基于患有眼部疾病的受试者是抗VEGF试剂治疗的无反应者,选择其用抗CD14拮抗剂抗体进行治疗。因此,在一些实施方案中,本公开提供了通过向受试者施用CD14拮抗剂抗体,以及任选施用辅助剂或进行介入治疗,以治疗受试者的眼部疾病的方法,其中受试者是对抗VEGF试剂的治疗的无反应者。本公开还提供通过向受试者施用CD14拮抗剂抗体,以及任选施用辅助剂或进行介入治疗以抑制患有眼部疾病的受试者的眼部炎症、新生血管形成和/或纤维化的方法,其中受试者是对抗VEGF试剂的治疗的无反应者。可以使用本领域技术人员已知的标准准则,将受试者分类为抗VEGF疗法的无反应者。例如,如果受试者在一段时间(例如,3、6或12个月)的抗VEGF疗法之后,没有表现BCVA增益(例如,没有改变或丧失(例如,超过0.2或5个字母)),则受试者被分类为无反应者。在其他示例中,生物标记物用于将受试者分类为无反应者。

[0199] 待施用的治疗剂的量或剂量频率可以取决于待治疗的受试者,包括其诊断(例如,眼部疾病的类型、或受试者呈现的症状的类型或严重性)、年龄、性别、体重和其一般健康状况。在这方面,用于施用的治疗剂的精确量将取决于执业医师的判断。通过常规实验,本领域技术人员将能够确定有效、无毒量的CD14拮抗剂抗体,以及任选的本文所述的辅助剂,用于施用至受试者。在具体示例中,施用至受试者的CD14拮抗剂抗体的量在0.1mg/kg至50mg/kg之间、在0.5mg/kg至40mg/kg之间、在2mg/kg至20mg/kg之间或在5mg/kg至10mg/kg之间。在具体示例中,施用至受试者的CD14拮抗剂抗体的量是(或是约)0.2、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50mg/kg。

[0200] CD14拮抗剂抗体可以作为单剂量或多剂量施用至受试者。在具体实施方案中,CD14拮抗剂抗体是多剂量施用。在其中CD14拮抗剂抗体作为多剂量施用的实施方案中,剂量可以作为定期或半定期剂量(例如,每月一次)或“按需”施用,如由执业医师确定。在一些示例中,CD14拮抗剂抗体是每2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12周施用,并且持续2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、24、48或更多月,或3、4、5、6、7、8、9、10或更多年。

[0201] 施用可以是任何合适的途径,包括局部眼部施用(例如,玻璃体内、结膜下、视网膜下、眼球后或前房内施用,包括离散注射或植入)、局部施用(例如,通过滴眼剂)或全身施用。

[0202] 为了使本发明易于理解和付诸实践,现通过以下非限制性实施例来描述具体优选的实施方案。

[0203] 实施例

[0204] 实施例1

[0205] 抗CD14治疗在CNV中的效果的评估

[0206] 进行了一项研究以评价抗CD14拮抗剂抗体在激光诱导的脉络膜新生血管(CNV)小鼠模型中的作用。研究中使用的活性剂是biG53 F(Ab')₂抗体,其以剂量依赖的方式在功能上抑制PAMP依赖性细胞因子的产生,类似于在抗人CD14mAb IC14中观察到的(国际专利申请第PCT/US2020/043619号)。将这种CD14拮抗剂的效果与阿柏西普(VEGF Trap-eye)进行了比较。

[0207] A. 材料和方法

[0208] 激光诱导的脉络膜新生血管形成

[0209] 激光诱导的CNV的小鼠模型是用于评价眼部疾病(如湿性AMD)的成熟模型。简而言之,通过腹膜内(IP)注射氯胺酮(60mg/kg;Provet,Heatherton,VIC,澳大利亚)和甲苯噻嗪(13mg/kg;Troy Laboratories,Glendenning,NSW,澳大利亚)的组合将小鼠深度麻醉,将其眼部用0.5%盐酸普罗帕卡因(Alcaine;Alcon Laboratories,Frenchs Forest,NSW,澳大利亚)进一步麻醉。通过局部应用1%硫酸阿托品(Alcon Laboratories)和2.5%盐酸去氧肾上腺素(Bausch&Lomb,Chatswood,NSW,澳大利亚)来散瞳。使用图像引导(Micron IV,Phoenix Research Laboratories,Pleasanton,CA,USA)氩激光(532nm二极管,350mW,70ms脉冲持续时间),对每只动物的每只眼睛进行四次激光灼伤。激光处理后立即收集眼底图像,并按以下详述进行眼部处理。

[0210] 玻璃体内注射(IV)试剂

[0211] 各种试剂的处理浓度和注射如下:

[0212] • 1μl的740μg/ml的抗CD14等分试样

[0213] • 1.5μl和2μl的阿柏西普(每只眼15μg/μl、60μg/μl、80μg/μl),通过将人阿柏西普(40mg/ml)稀释至适当的浓度制备。

[0214] • 1.5μl的抗VEGF164中和抗体(200ng/μl;AF493-NA,R&D Systems)

[0215] • 1μl PBS

[0216] 使用连接到无菌31g针头的定制Hamilton注射器,对左眼和右眼进行注射。在玻璃体内注射后,让动物恢复并在其箱中放置7天。第二组动物在激光处理7天后接受1μl的抗CD14、或PBS和2μl的阿柏西普(每只眼80μg/μl),然后在第14天进行实验。

[0217] 荧光素血管造影和组织采集

[0218] 激光处理后7天或14天,用甲苯噻嗪和氯胺酮的组合麻醉动物,使用Micron IV视网膜摄影机(Phoenix Research Laboratories,Pleasanton,CA,USA)对双眼进行眼底荧光素血管造影。在注射1%荧光素钠之后立即,以及在注射后5分钟和10分钟收集每只眼的图像。成像后,动物被颈椎脱臼处死,将其眼移除并放置在:(a)固定剂,含有60%乙醇、5%乙酸、4%多聚甲醛、3%蔗糖的蒸馏水溶液,固定过夜,或(b)将视网膜和RPE分离,置于RLT缓冲液中进行RNA分析。

[0219] 病变尺寸分析

[0220] 在荧光素血管造影之后,提取每个tiff文件,并使用ImageJ(美国国立卫生研究院和光学与计算仪器实验室(National Institutes of Health and the Laboratory for Optical and Computational Instrumentation)开发的基于Java的图像处理程序)中的半自动宏来定量每个病变的面积。该分析使用了一组标准,其中所有具有出血和融合病变的激光点都被排除在分析之外。

[0221] 病变高度和纤维化的定量

[0222] 眼杯切片后,用Masson的三色染色标记载玻片,捕获每个病变的数字图像。通过测量归一化为脉络膜厚度的病变高度以定量病变尺寸。对于每个样品,分析三个部分并取平均值以获得单个值。

[0223] 总RNA提取和定量实时PCR

[0224] 如前所述,进行血管生成和纤维化基因表达的定量(Jobling等人,2015,FASEB J 29(2):696-710)。在CNV第7天和14天后,使用商业离心柱(RNeasy® Micro Kit, Qiagen)从冷冻的RPE/脉络膜复合物中分离总RNA,并结合柱上DNase I消化以去除基因组污染。来自年龄匹配对照小鼠的未激光化的组织用作对照。根据制造商的说明,在Agilent 2200Tape Station(Agilent Technologies 5067-5583D1000,德国)上评估RNA浓度和质量。RNA完整性数(RIN)高于8的样品用于定量PCR。

[0225] 对于标准实时qPCR,使用随机六聚体引物(Omni script, Qiagen)对75ng总RNA进行逆转录反应,随后稀释至~3ng/μl。相对于持家基因、次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(Hprt)和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(Gapdh),评价了与CNV/纤维化相关的几种基因的表达。使用相同的引物对生成外部标准,这些引物对分别在每个正向和反向引物的5'端并入T7启动子和polyT15序列。扩增的标准品被转录成拷贝RNA(Megascript T7高产量转录试剂盒; Ambion Inc., Austin, TX),稀释液与酵母t-RNA(75ng; Invitrogen, Carlsbad, CA)组合以反映在逆转录反应中使用的视网膜总RNA量(75ng)。RNA标准品与视网膜RNA样品一起逆转录以使得效率标准化。

[0226] 使用掺入SYBR green(SensiFast, Bioline)的商业反应混合物在Rotorgene V3000(Corbett Research, 澳大利亚)上进行实时PCR。每次运行都包括各自的四点标准曲线,标准品和样品一式三份扩增。参考标准曲线(Rotorgene V6.1软件, 澳大利亚)计算绝对基因拷贝数以及相对于Hprt和Gapdh表达。

[0227] 为了分析基因表达的整体变化,使用Fibrosis RT² Profiler™ PCR Array(目录号:PAMM-120ZE; Qiagen, 澳大利亚)。合并来自每个实验组的RNA样品(对于每个实验组, n=9; 对于合并的样品, n=3)。根据制造商的说明(RT2 PreAMP cDNA合成手册; Qiagen),使用RT2 PreAMP cDNA合成试剂盒(Qiagen, VIC, 澳大利亚)扩增75ng的总RNA,逆转录成互补DNA(cDNA)。随后,将RT2 SYBR Green Mastermix(Qiagen)与每个cDNA样品混合,然后添加到包含4个重复的96孔测定的384孔板中,其包括84个纤维化相关基因(表1)、5个持家对照基因、1个基因组DNA对照、3个逆转录对照和3个阳性PCR对照。

[0228] 表1. PCR阵列中的纤维化相关基因

[0229]

基因类型	基因
促纤维化:	<i>Acta2</i> (α -SMA)、 <i>Agt</i> 、 <i>Ccl11</i> (嗜酸性粒细胞趋化因子)、 <i>Ccl12</i> (MCP-5, <i>Scya12</i>)、 <i>Ccl3</i> (<i>Mip-1a</i>)、 <i>Ctgf</i> 、 <i>Grem1</i> 、 <i>Il13</i> 、 <i>Il13ra2</i> 、 <i>Il4</i> 、 <i>Il5</i> 、 <i>Snai1</i> (<i>Snail</i>)。
抗纤维化:	<i>Bmp7</i> 、 <i>Hgf</i> 、 <i>Ifng</i> 、 <i>Il10</i> 、 <i>Il13ra2</i> 。
细胞外基质 (ECM) 结构组分:	<i>Col1a2</i> 、 <i>Col3a1</i> 。
细胞外基质 (ECM) 重塑酶:	<i>Lox</i> 、 <i>Mmp1a</i> 、 <i>Mmp13</i> 、 <i>Mmp14</i> 、 <i>Mmp2</i> 、 <i>Mmp3</i> 、 <i>Mmp8</i> 、 <i>Mmp9</i> 、 <i>Plat</i> (tPA)、 <i>Plau</i> (uPA)、 <i>Plg</i> 、 <i>Serpina1a</i> 、 <i>Serpine1</i> (PAI-1)、 <i>Serpinh1</i> (Hsp47)、 <i>Timp1</i> 、 <i>Timp2</i> 、 <i>Timp3</i> 、 <i>Timp4</i> 。
细胞粘附分子:	<i>Itga1</i> 、 <i>Itga2</i> 、 <i>Itga3</i> 、 <i>Itgav</i> 、 <i>Itgb1</i> 、 <i>Itgb3</i> 、 <i>Itgb5</i> 、 <i>Itgb6</i> 、 <i>Itgb8</i> 。
炎性细胞因子和趋化因子:	<i>Ccl11</i> (嗜酸性粒细胞趋化因子)、 <i>Ccl12</i> (MCP-5、 <i>Scya12</i>)、 <i>Ccl3</i> (<i>Mip-1a</i>)、 <i>Ccr2</i> 、 <i>Cxcr4</i> 、 <i>Ifng</i> 、 <i>Il10</i> 、 <i>Il13</i> 、 <i>Il13ra2</i> 、 <i>Il1a</i> 、 <i>Il1b</i> 、 <i>Il4</i> 、 <i>Il5</i> 、 <i>Ilk</i> 、 <i>Tnf</i> 。
生长因子:	<i>Agt</i> 、 <i>Ctgf</i> 、 <i>Edn1</i> 、 <i>Egf</i> 、 <i>Hgf</i> 、 <i>Pdgfa</i> 、 <i>Pdgfb</i> 、 <i>Vegfa</i> 。
TGF β 超家族成员:	<i>Bmp7</i> 、 <i>Cav1</i> 、 <i>Dcn</i> 、 <i>Eng</i> (<i>Evi-1</i>)、 <i>Grem1</i> 、 <i>Inhbe</i> 、 <i>Ltbpl</i> 、 <i>Smad2</i> (<i>Madh2</i>)、 <i>Smad3</i> (<i>Madh3</i>)、 <i>Smad4</i> (<i>Madh4</i>)、 <i>Smad6</i> 、 <i>Smad7</i> 、 <i>Tgfb1</i> 、 <i>Tgfb2</i> 、 <i>Tgfb3</i> 、 <i>Tgfb1</i> (<i>ALK5</i>)、 <i>Tgfb2</i> 、 <i>Tgif1</i> 、 <i>Thbs1</i> (TSP-1)、 <i>Thbs2</i> 。
转录因子:	<i>Cebpb</i> 、 <i>Jun</i> 、 <i>Myc</i> 、 <i>Nfkb1</i> 、 <i>Sp1</i> 、 <i>Stat1</i> 、 <i>Stat6</i> 。
上皮间充质转化因子 (EMT):	<i>Akt1</i> 、 <i>Bmp7</i> 、 <i>Col1a2</i> 、 <i>Col3a1</i> 、 <i>Itgav</i> 、 <i>Itgb1</i> 、 <i>Mmp2</i> 、 <i>Mmp3</i> 、 <i>Mmp9</i> 、 <i>Serpine1</i> (PAI-1)、 <i>Smad2</i> (<i>Madh2</i>)、 <i>Snai1</i> (<i>Snail</i>)、 <i>Tgfb1</i> 、 <i>Tgfb2</i> 、 <i>Tgfb3</i> 、 <i>Timp1</i> 。
其他纤维化基因:	<i>Bcl2</i> 、 <i>Fas1</i> (<i>Tnfsf6</i>)。

[0230] 使用Applied Biosystems ViiA 7实时PCR系统(Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA)扩增cDN,在95℃中15分钟,然后在95℃中15秒,在60℃中1分钟(40个循环)。为了获得统计上有效的数据,为每个实验组运行了三个独立的阵列。使用来自QIAGEN网站的Gene Global RT2 Profiler PCR数据分析工具分析数据。

[0231] VEGF蛋白表达的定量

[0232] 在激光处理后第2、7和14天,摘除眼,分离视网膜和RPE/脉络膜,立即在液氮中快速冷冻。为制备组织匀浆,将样品置于250ul的1X PBS中,加入1%蛋白酶抑制剂混合物(P8340, Sigma),在冰上超声处理5分钟。在进行3次冻融使细胞膜破裂后,将匀浆液置于冰上30分钟,在4℃中以14,000rpm离心10分钟,收集上清液。使用Pierce™BCA蛋白质检测试剂盒(ThermoFisher scientific, 澳大利亚)对总蛋白质浓度进行定量。根据制造商的说明,

通过市售的ELISA试剂盒 (Quantikine;R&D Systems) 分析VEGF水平。从标准曲线计算每个样品中的VEGF浓度 (pg/ml) ,并归一化为总蛋白质浓度 (pg/mg总蛋白质) 。对于每个样品,合并双眼的组织以获得足够的蛋白质。

[0233] 流式细胞术分析先天免疫细胞迁移

[0234] 在第2天和第7天,摘除激光处理的眼,从双眼收获RPE/脉络膜。将分离的RPE/脉络膜切成小块,在500μl消化混合物 (0.1mg/ml Liberase T1和0.2mg/ml DNase1) 中于37℃孵育60分钟,并在时间20、40和60分钟时使用机械分离。细胞通过40um尼龙滤网过滤,以350g离心10分钟,在含有1%BSA和0.1%叠氮化钠的FACS缓冲液中洗涤两次。将细胞与Fc-Block (553142,BD Biosciences) 孵育15分钟,洗涤两次,用滴定浓度的荧光染料偶联抗体染色30分钟。脾脏组织用作每次运行的阳性对照。表2中提供了使用的抗体。

[0235] 简而言之,根据CD45表达对细胞进行门控以识别白细胞 (CD45+/CD34-) ,然后根据CD11b、CD11c表达 (树突状细胞和其他髓系细胞) 以及Ly6C和Ly6G进行分离以识别炎性单核细胞、驻留的单核细胞/巨噬细胞和嗜中性粒细胞。不同白细胞亚群的比例在未激光 (无CNV) 、载剂、阿柏西普 (80μg/μl) 和抗CD14处理的眼部进行定量。

[0236] 表2.流式细胞术中使用的抗体。

[0237]	抗体	目标细胞类型	供应商
	ViaKrome 808	活/死细胞	Beckman Coulter
	CD45	白细胞	BD Biosciences
	CD11b	髓系细胞	BD Biosciences
	CD11c	树突状细胞	Biolegend
	Ly6C	单核细胞	Biolegend
	Ly6G	嗜中性粒细胞	Biolegend
	CD14	单核细胞/巨噬细胞	Biolegend
	MHCII	树突状细胞 循环纤维细胞	Biolegend
	CCR2	单核细胞/巨噬细胞 循环纤维细胞	Biolegend
	CD34	纤维细胞	Biolegend

[0238] B. 结果

[0239] 处理对病变尺寸的影响

[0240] 激光损伤引起的病变尺寸被认为是与脉络膜新生血管 (CNV) 相关的血管生成的替代测量。评价了不同浓度的阿柏西普或靶向VEGF的小鼠中和抗体在激光诱导CNV后7天减少病变尺寸的效果。如图1A所示,阿柏西普处理减少了激光引起的病变的尺寸,但仅在注射剂量比处理人湿性AMD时常规使用的剂量高约20倍时发生。在激光诱导CNV后7天,与PBS (载剂注射) 相比,高剂量阿柏西普 (80μg/μl) 显著减小了病变的尺寸 (单因素ANOVA,事后Tukey检验, $p<0.001$; 载剂vs阿柏西普, $p=0.0048$) 。还比较了用阿柏西普 (15μg/μl、60μg/μl) 和抗VEGF164 (300ng/u1) 处理后的荧光素血管造影的病变尺寸,未发现与载剂有任何变化 (单因

素ANOVA,事后Tukey检验)。

[0241] 为了将这一结果置于人类疾病的更大背景下——那些患有湿性AMD的患者通过将50 μ l的40mg/ml阿柏西普注射到体积为4.4ml的人玻璃体中进行处理。这相当于0.45mg/ml(或0.45 μ g/ μ l)的阿柏西普的玻璃体浓度。将15 μ g/ μ l、60 μ g/ μ l和80 μ g/ μ l注射到小鼠眼中,其玻璃体体积为8 μ l。这相当于阿柏西普的玻璃体浓度为1.875 μ g/ μ l、7.5 μ g/ μ l和10 μ g/ μ l,均远高于用于治疗人疾病的浓度。

[0242] 然后,比较了CD14与载剂和高剂量阿柏西普(80 μ g/ μ l)处理的疗效。如图1B所示,抗CD14在减少激光诱导的病变尺寸方面与高剂量的阿柏西普一样有效。值得注意的是,抗CD14减少了病变尺寸($\sim$ 34%+4%),这与高剂量阿柏西普($\sim$ 32%+8%)诱导的效果相似。

[0243] 处理对纤维化的影响

[0244] 为了评价激光诱导CNV后纤维化的发展,使用Masson三色染色作为标记胶原蛋白的手段,然后定量激光诱导病变相对于脉络膜相邻区域的高度。比较激光诱导CNV后7天,抗CD14、载剂、三种浓度的阿柏西普和抗VEGF164对纤维化的影响。如图2所示,与载剂处理和高剂量阿柏西普相比,抗CD14显著减少纤维化(单因素ANOVA,事后Tukey检验;抗CD14 vs载剂, $p=0.015$;抗CD14 vs阿柏西普, $p=0.0034$;阿柏西普vs载剂, $p=0.86$)。然后评价了每种处理后激光诱导的病变尺寸与纤维化发展之间的相关性(图3)。正如预期的那样,在用载剂处理的眼部,在病变尺寸增加和纤维化增加之间存在正相关(PBS;Pearson相关性)。相比之下,用抗CD14处理显示没有相关性,其中无论病变尺寸(即,血管生成)如何,纤维化的发展都是一致的。

[0245] 激光处理后7天,眼部基因表达的定量

[0246] 为了进一步检查处理对血管生成和/或纤维化发展的影响,在激光处理后7天,对从用载剂、抗CD14或高剂量阿柏西普处理的眼部分离的RPE进行定量PCR。检查的基因包括VEGF120、Vegf164、Vegf188、tgfb1和Col1a1。

[0247] 激光诱导的脉络膜新生血管不会改变持家基因Hprt和Gapdh的表达(数据未显示)。与Hprt和Gapdh相比的基因表达定量揭示,对于任何检测的基因,当抗CD14与载剂进行比较时,在表达中没有变化(图4和图5)。如图5所示,高剂量阿柏西普诱导VEGF同种型和Col1a1表达增加。Tgfb1表达不受任何所检查的處理的影响。

[0248] 使用定义的PCR阵列进行的分析,用于定量已知参与纤维化的84个基因的表达变化。据观察,阿柏西普和抗CD14对RPE基因表达有不同的影响。例如,阿柏西普处理增加了五个对细胞外基质形成很重要的基因的表达:Col1a2、I14、Itga2、Mmp2和Mmp3,这些在施用抗CD14抗体时,有些是看不到的。

[0249] 在RPE中VEGF表达的处理效果

[0250] 鉴于荧光素病变尺寸的变化,接下来检查与载剂和阿柏西普相比,抗CD14是否减少了RPE中VEGF的表达。如图6所示,RPE中的VEGF蛋白表达远高于在视网膜中。在RPE中激光诱导CNV后2天和7天,与载剂对照相比,抗CD14降低了VEGF表达(双因素ANOVA,天-ns;处理-ns;相互作用 $p=0.014$;事后Tukeys检验 $p=0.02$)。这些结果与上图1中所示的激光诱导的病变尺寸减小一致,表明抗CD14对VEGF表达有影响。

[0251] 处理对先天免疫细胞群招募的影响

[0252] 提出促进纤维化发展的一个重要机制是通过先天免疫细胞流入视网膜下空间对

RPE的影响。对分离的RPE/脉络膜复合体的流式细胞术用于确定,抗CD14和/或阿柏西普是否影响先天免疫细胞群向后眼的招募。

[0253] 图7显示,在激光诱导CNV后2天,在RPE/脉络膜中各自活细胞的百分比,即存在于RPE/脉络膜中的白细胞(CD45⁺)、髓系细胞、树突状细胞、炎性单核细胞、驻留单核细胞/巨噬细胞和嗜中性粒细胞。总体而言,所有六种细胞类型的向后眼招募均有所增加,使用阿柏西普或抗CD14处理并未改变这种招募。还证实了构成广泛的白细胞组的不同的细胞比例是否显示出任何变化,即,CD45⁺白细胞,即骨髓细胞、树突细胞、炎性单核细胞、单核细胞/巨噬细胞或嗜中性粒细胞的比例是否发生任何变化。在所有细胞类型中,虽然CD45⁺白细胞构成的群中比例有所增加,但这不受阿柏西普或抗CD14处理的影响(数据未显示)。

[0254] 图8显示激光诱导CNV后7天,存在于RPE/脉络膜中的白细胞招募以及白细胞(其表示为髓系细胞、树突状细胞、炎性单核细胞、驻留单核细胞/巨噬细胞和嗜中性粒细胞)的比例。在这个时间点观察到的最显著趋势是,在用抗CD14处理的眼部中,CD45⁺/CD11b⁺/Ly6G⁺嗜中性粒细胞减少。

[0255] 图9显示在2天和7天之间的白细胞和髓系细胞招募的比较。重要的是,在激光诱导CNV后2天与7天相比,白细胞和CD11b⁺/CD11c⁻髓系细胞表现出更多的招募。此外,在激光诱导CNV后7天,与载剂对照相比,抗CD14处理减少了嗜中性粒细胞的数量。这些发现表明,一系列白细胞和细胞会响应激光立即涌入,尽管抗CD14可能会在7天后具有减少嗜中性粒细胞数量的作用。

[0256] 通过对CCR2和MHCII (CCR2⁻/MHCII⁻) 设门控,检查阿柏西普和抗CD14处理在改变循环的纤维细胞(CD45⁺/CD34⁺) 招募到后眼中的潜在作用。激光诱导CNV两天后,CD45⁺/CD34⁺纤维细胞的招募增加(图10)。然而,此时阿柏西普和抗CD14都不影响纤维细胞的招募。然而,7天后,阿柏西普显示出招募增加,这在用抗CD14处理的眼中没有观察到。

[0257] 接下来进行的分析是评估CD14在髓系细胞表面的表达。如图11所示,发现激光诱导的CNV两天后使CD14⁺髓系细胞的招募增加,还与炎性单核细胞、驻留单核细胞/巨噬细胞和树突状细胞中CD14的表面表达增加有关。用抗CD14处理消除了激光诱导的树突状细胞中CD14表达的变化。

[0258] 激光处理后7天,激光诱导对CD14⁺招募和表达的影响如图12所示。7天后,CD14⁺髓系细胞的招募增加。在激光诱导CNV后,CD14表达仅在嗜中性粒细胞中增加。用阿柏西普或抗CD14处理对这些CD14招募和表达的变化没有影响。

[0259] 图13显示,在2天和7天时,激光对CD14招募和表达的诱导作用。值得注意的是,2天后,炎性单核细胞上的CD14表达增加,7天后恢复到基线。然而,用阿柏西普或抗CD14处理对影响CD14招募或表达没有作用。

[0260] C. 讨论

[0261] 该研究清楚地表明,在激光诱导CNV后,施用抗CD14拮抗剂抗体在7天时减少了激光诱导的病变尺寸和纤维化,在2至7天之间显著减少RPE中的VEGF蛋白表达水平(与载剂处理的CNV相比)。相比之下,在7天时,阿柏西普减少了激光诱导的病变尺寸但没有减少纤维化,这与在7天时RPE中所有VEGF同种型和Col1a1的基因表达增加有关(尽管VEGF基因表达的这种增加可以是高剂量(80μg/μl)使用阿柏西普的补偿机制)。

[0262] 为了比较抗CD14与标准处理的效果,检查了三种剂量的阿柏西普以及小鼠抗

VEGF164中和抗体对荧光素渗漏和纤维化的影响。与临床实践中用于处理湿性AMD的阿柏西普剂量(眼部剂量 $\sim 0.45\text{mg/ml}$ 或 $0.45\mu\text{g}/\mu\text{l}$)相反,发现仅高20倍的剂量在小鼠的诱导的CNV模型中有效($80\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 注射导致玻璃体浓度为 $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$)。这可能是因为与人VEGF相比,阿柏西普对小鼠VEGF的特异性不同。

[0263] 据观察,高剂量阿柏西普减少了激光处理后的病变尺寸,但没有减少纤维化。这与使用阿柏西普进行长期治疗的临床结果一致,纤维化会在约50%的湿性AMD患者中减少视力。研究表明,在载剂处理(和未处理)的眼部,荧光素病变尺寸与纤维化之间存在相关性。当病变无法愈合(即更大)时,纤维化水平更高。在此基础上,在该小鼠模型中减少病变尺寸的处理(例如,阿柏西普)可能有望减少纤维化,可以预期,任何处理的比较(如在阿柏西普和抗CD14之间)仅在不同程度上减少了病变尺寸和纤维化。然而,任何浓度的阿柏西普都不是这种情况—阿柏西普和抗VEGF164没有在任何程度上减少纤维化。相比之下,抗CD14处理确实减少了纤维化,而且重要的是,是以与病变尺寸无关的方式。

[0264] 为了进一步研究抗CD14抗体是否对减弱白细胞,尤其是髓系细胞向后眼的招募,评估了在非激光对照、PBS处理的CNV中以及抗CD14和阿柏西普处理的眼部,在RPE/脉络膜中不同类型的白细胞和髓系细胞的招募。尽管在激光诱导CNV的2天内,发现白细胞和各种髓系细胞的招募增加,但抗CD14抗体和阿柏西普都对减少细胞招募没有实质性作用。激光诱导的CNV诱导髓系细胞招募的结果与之前的研究一致(Tsutsumi等人,2003, *J Leukoc Biol* 74(1):25-32; Droho等人,2019, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 60(15):5059-5069)。阿柏西普和抗CD14抗体似乎都没有改变髓系细胞的广泛招募,这一观察结果很可能通过评价的细胞类别的异质性来解释。阿柏西普或抗CD14抗体可能靶向高度特异性的细胞类型,该细胞类型仅代表所检查细胞类别的一小部分。

[0265] 为了解决阿柏西普或抗CD14抗体靶向单一同种型的髓系细胞的可能性,研究了对CD34+CCR2+MHCII+纤维细胞招募的影响。据观察,与其他髓系细胞一样,激光损伤后两天招募增强。与阿柏西普处理的眼部相比,7天后,抗CD14抗体处理的后眼中该细胞群有减少的趋势。

[0266] 抗CD14处理后,在RPE中而非视网膜中的VEGF蛋白水平减少以及没有基因表达增加,是特别令人感兴趣的。在RPE中而非视网膜中,VEGF的局部减少表明其可能不是来自浸润性炎性细胞(例如,由于抗CD14减弱巨噬细胞活性导致VEGF产生减少),因为这些炎性细胞会存在于视网膜中而不是RPE中。相反,非常出乎意料的是,RPE中VEGF的减少似乎是RPE上表达的mCD14受体的拮抗作用的结果。这进一步表明,在激光诱导CNV后,抗CD14抗体的意外抗纤维化活性不依赖于,且不同于其抗炎症和抗血管生成(即,抗新生血管形成)活性。

[0267] 总之,很明显,抗CD14抗体的施用减少了由激光诱导的CNV引起的病变尺寸和纤维化,而且以没有任何明显眼部毒性的方式进行。有趣的是,在视网膜中纤维化的减少似乎是通过与病变尺寸无关的新机制(即,新生血管形成的程度):在使用抗CD14处理之后,对纤维化的抑制是均一且与病变尺寸的抑制无关,以及VEGF蛋白水平在RPE中减少,但在视网膜中没有减少,表明这是通过RPE上表达的mCD14受体的拮抗作用,而不是浸润巨噬细胞活性的抗CD14减弱。因此,很明显,抗CD14抗体以不同于阿柏西普的方式作用于后眼,并且与阿柏西普相比是有益的,发现阿柏西普不会减少纤维化,而且确实观察到阿柏西普会增加对细胞外基质形成很重要的基因的表达。

[0268] 本文引用的每篇参考文献、专利、专利申请和出版物的公开内容均通过引用其整体并入本文。

[0269] 本文对任何参考文献的引用不应被解释为承认此类参考文献可作为本申请的“现有技术”。

[0270] 在整个说明书中,目的是描述本发明的优选实施方案,而不将本发明限制于任何一个实施方案或特异性的特征集合。因此,本领域的技术人员将理解,根据本发明的公开,在不脱离本发明的范围的情况下,可以对所示例的具体实施方案进行各种修改和变化。所有此类修改和变化旨在包含在所附权利要求的范围内。

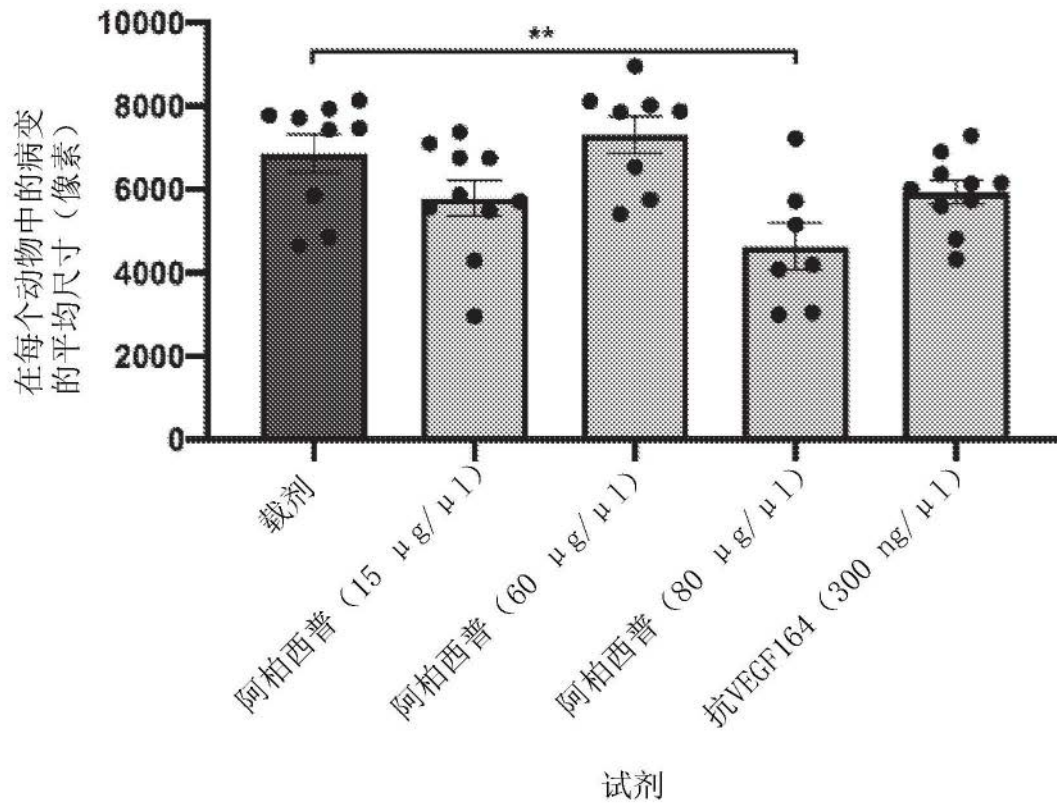
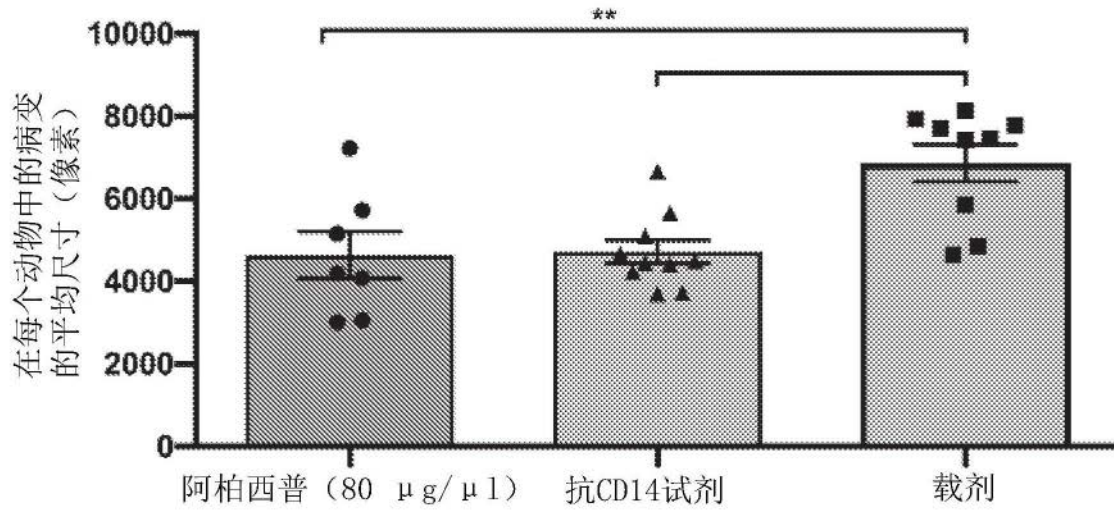
A.**B.**

图1

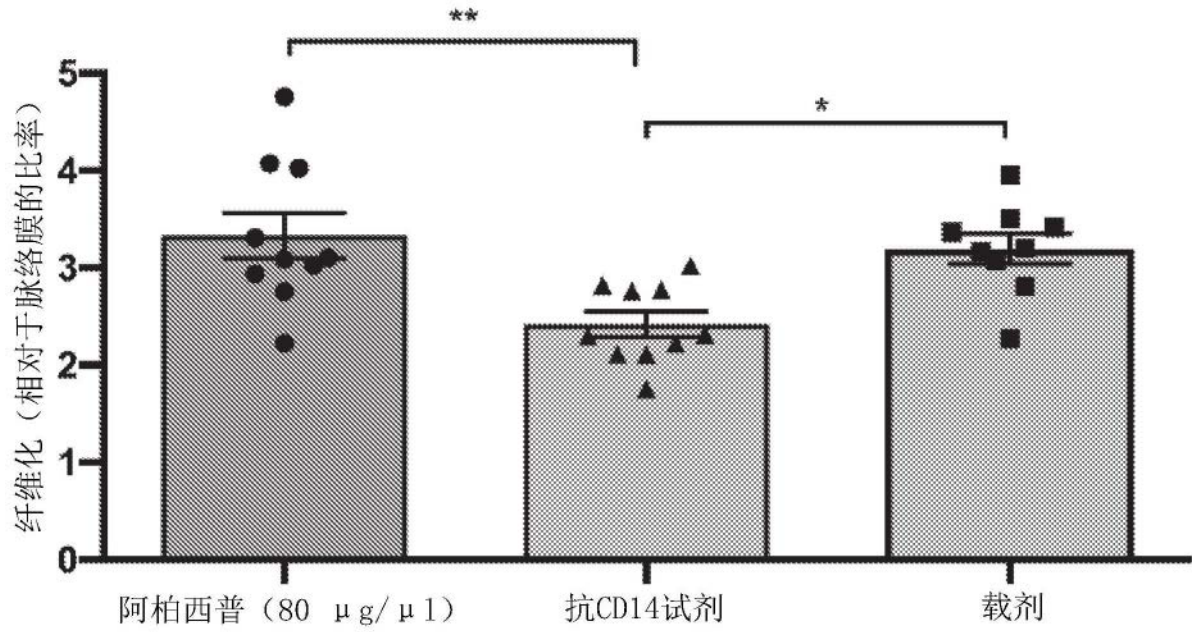


图2

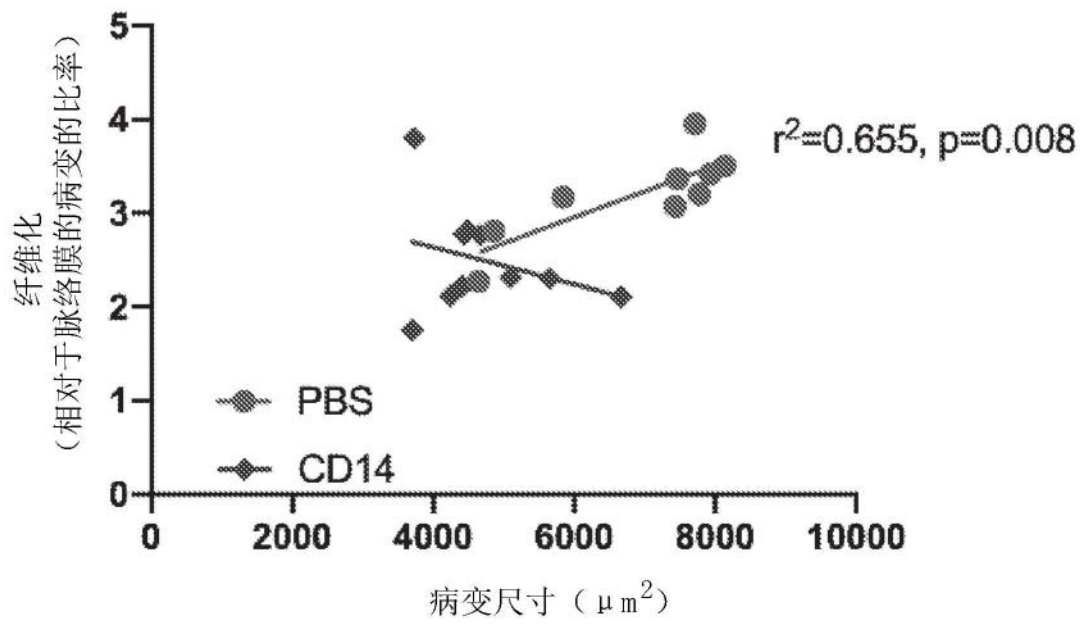


图3

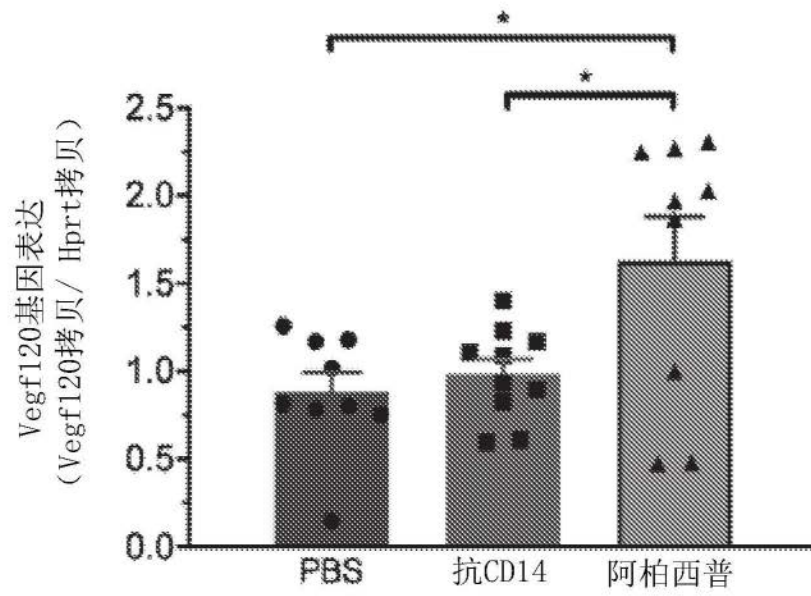
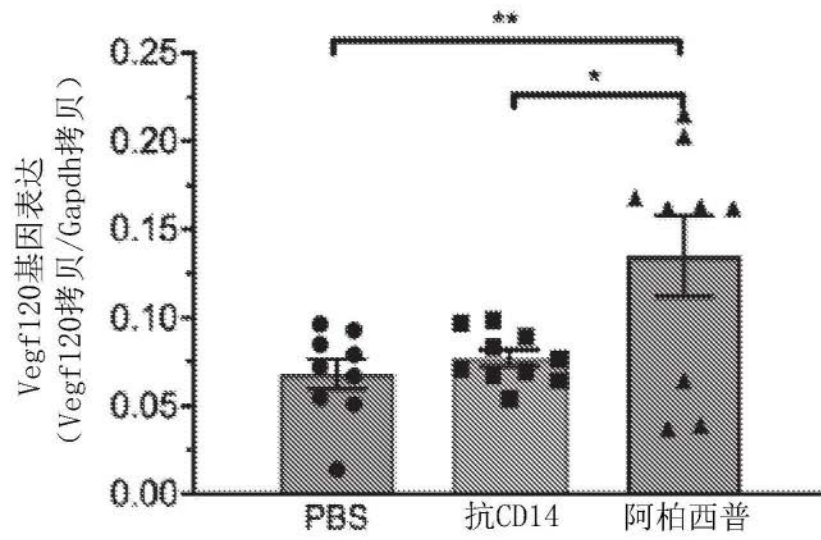
A.**B.**

图4

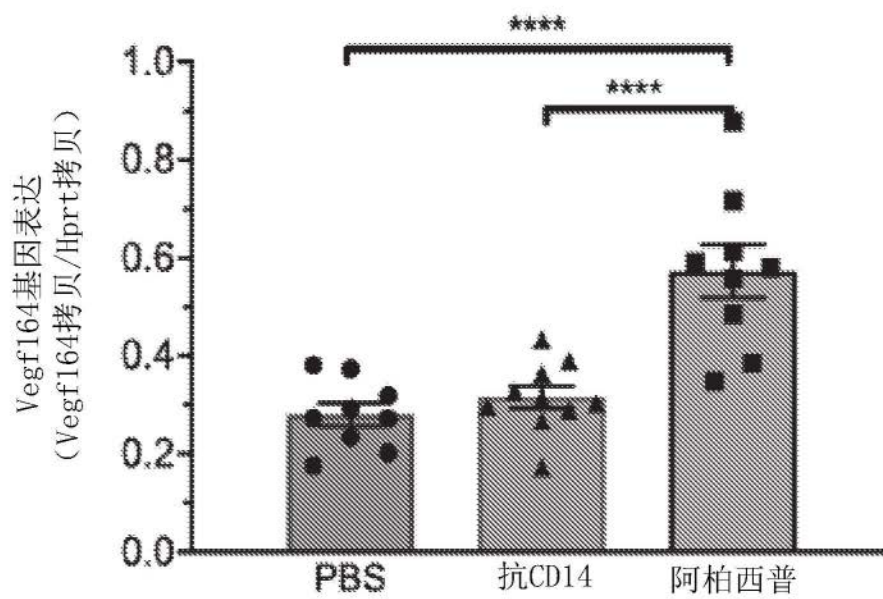
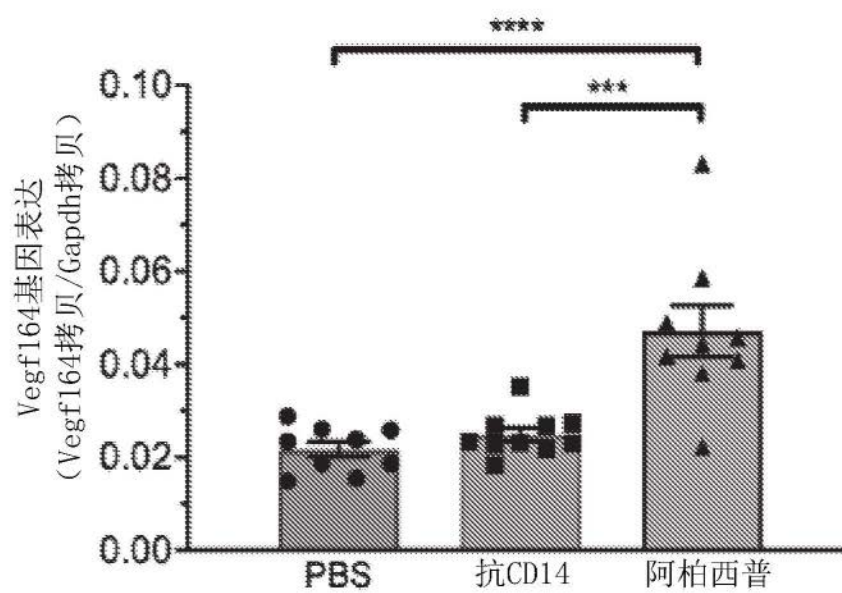
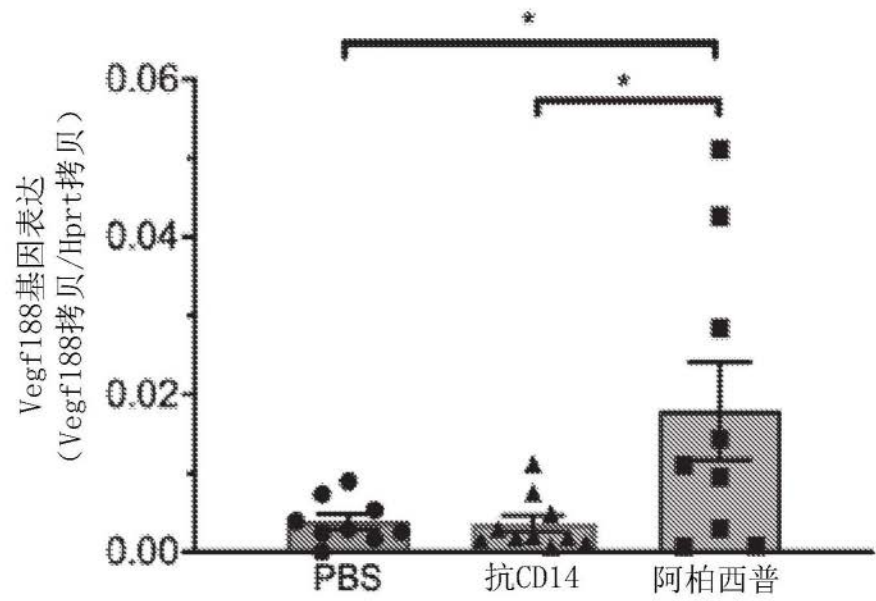
C.**D.**

图4(续)

E.



F.

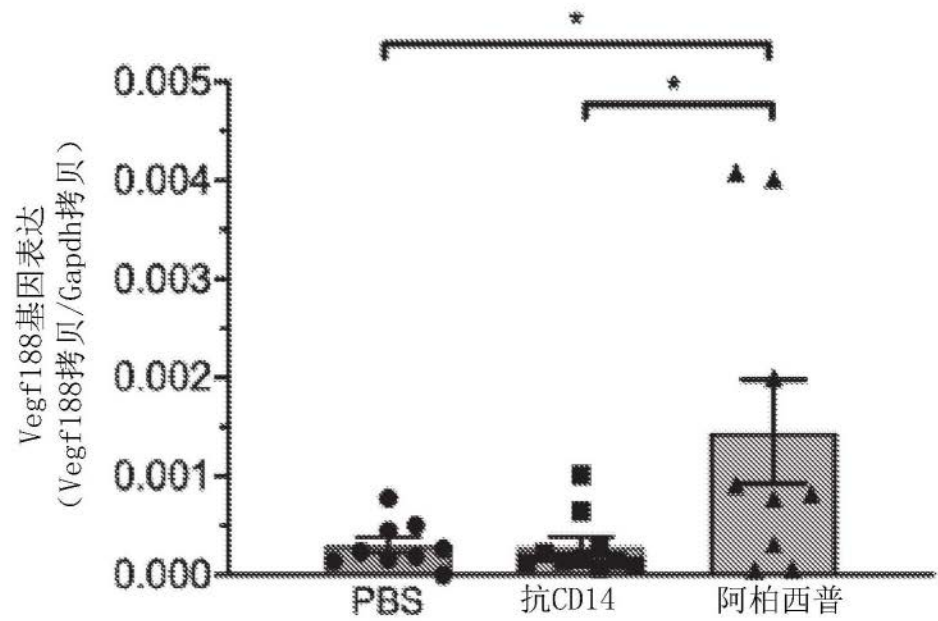


图4(续)

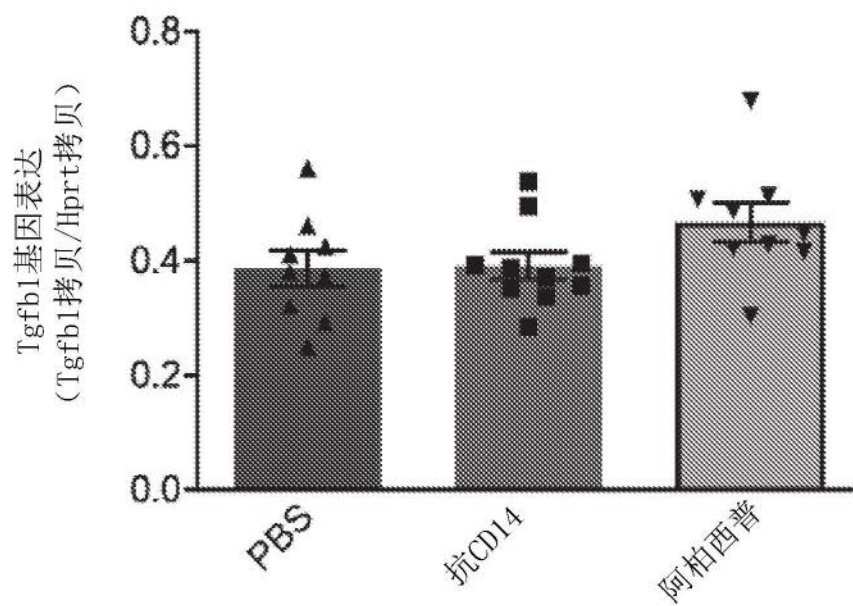
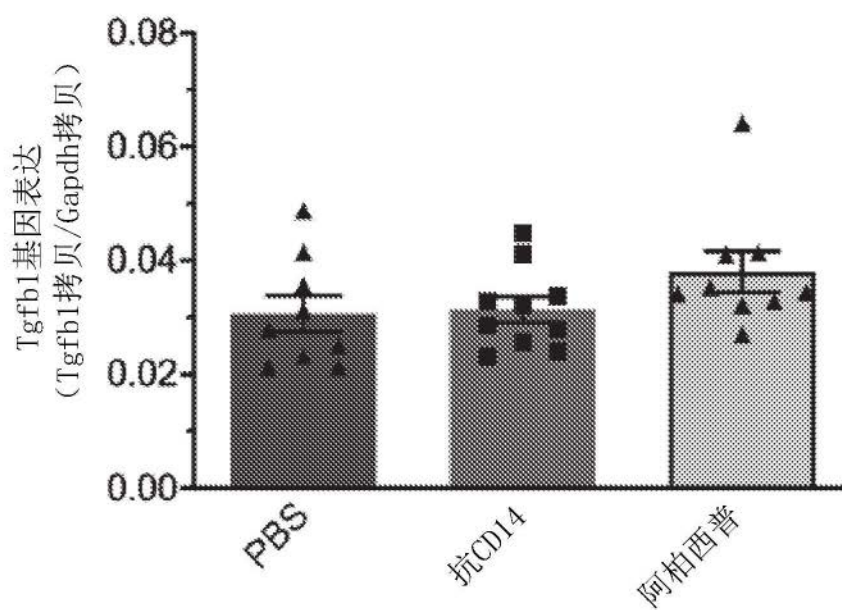
A.**B.**

图5

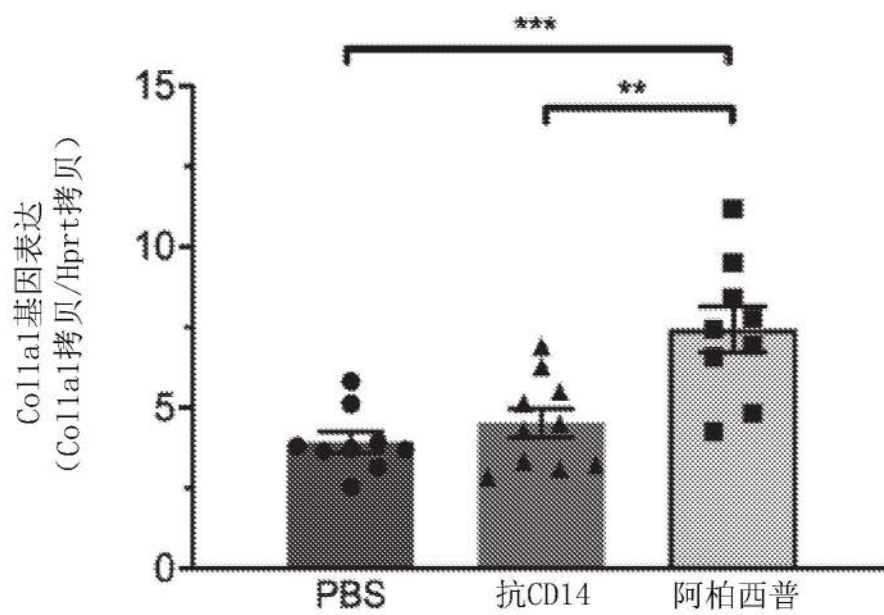
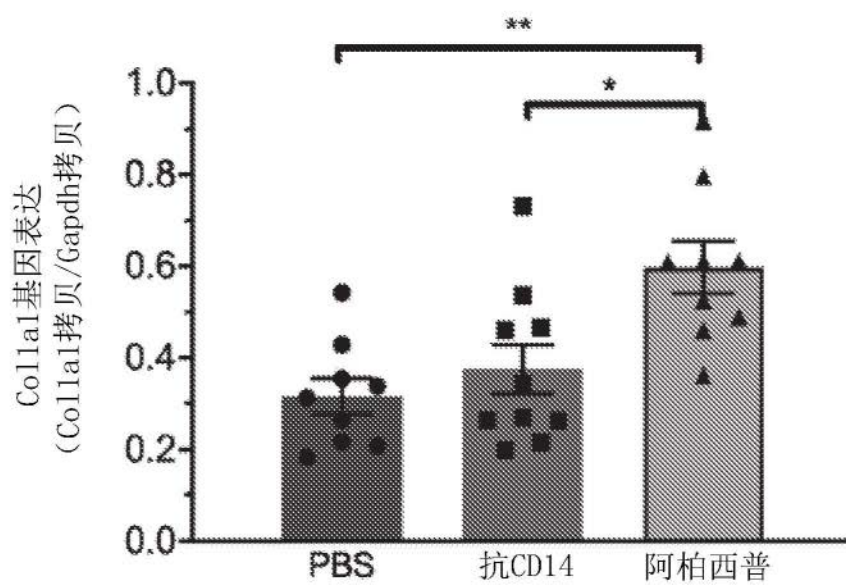
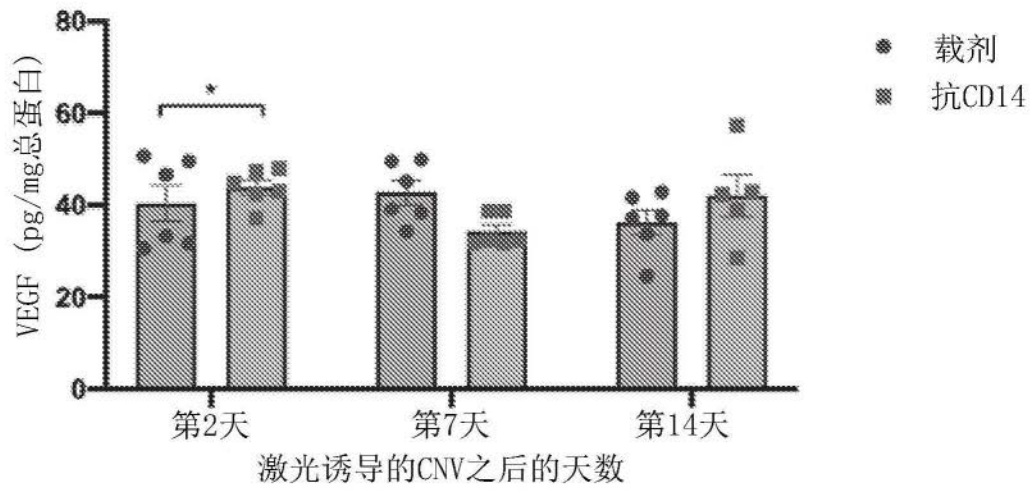
C.**D.**

图5(续)

A.

在视网膜中的VEGF表达

**B.**

在RPE中的VEGF表达

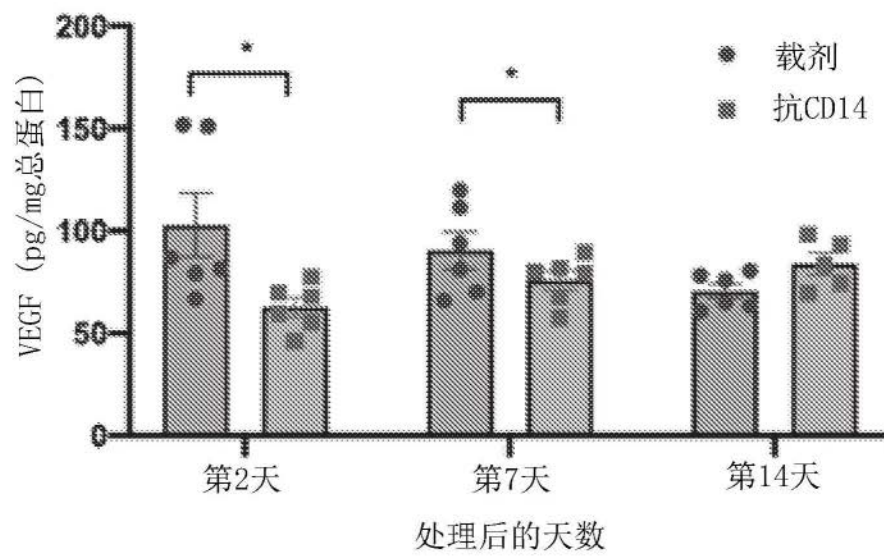


图6

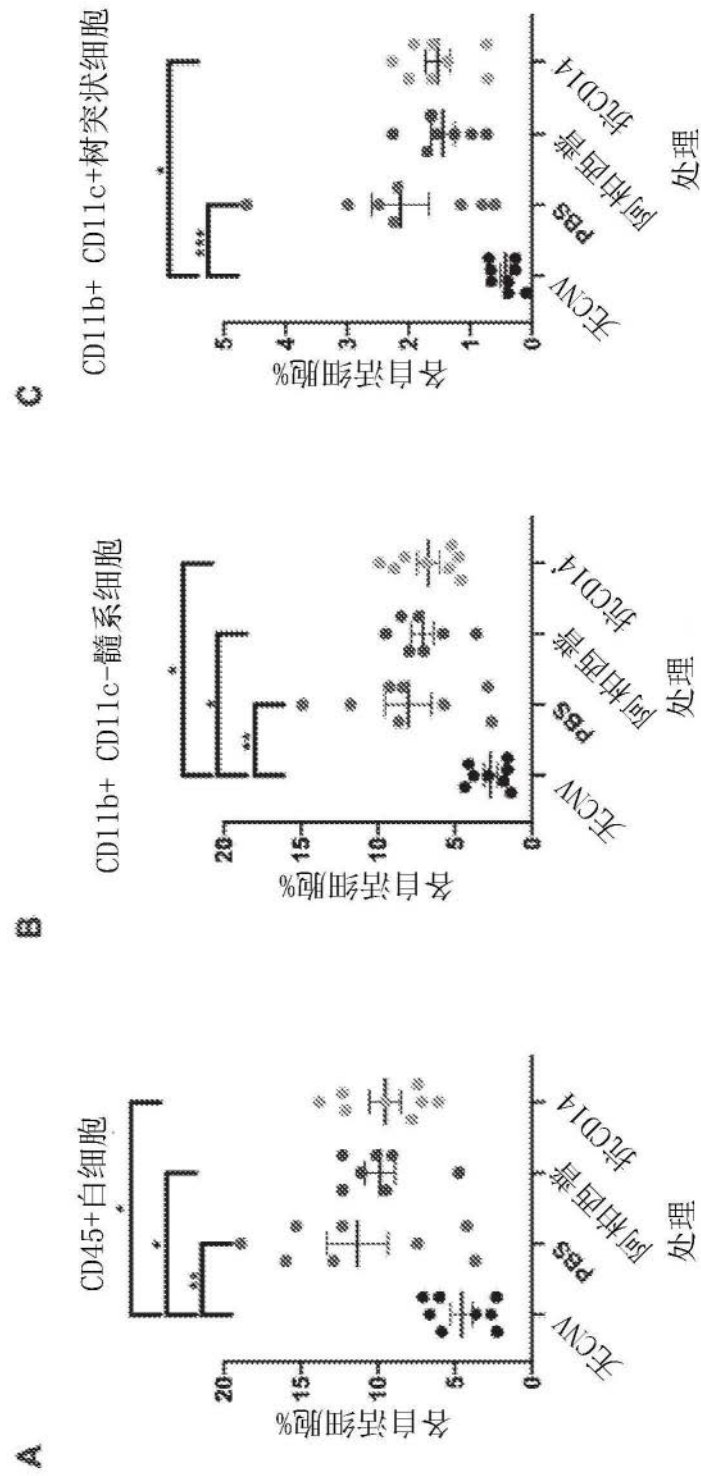


图7

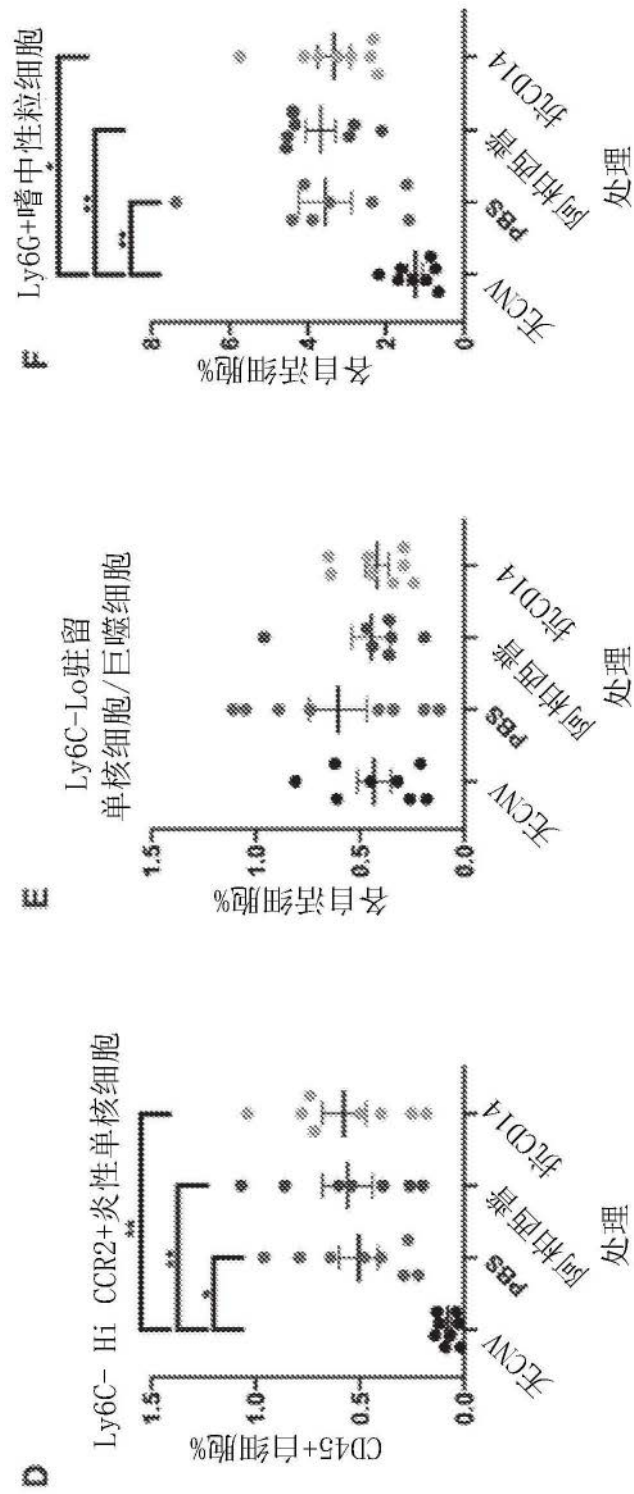


图2(续)

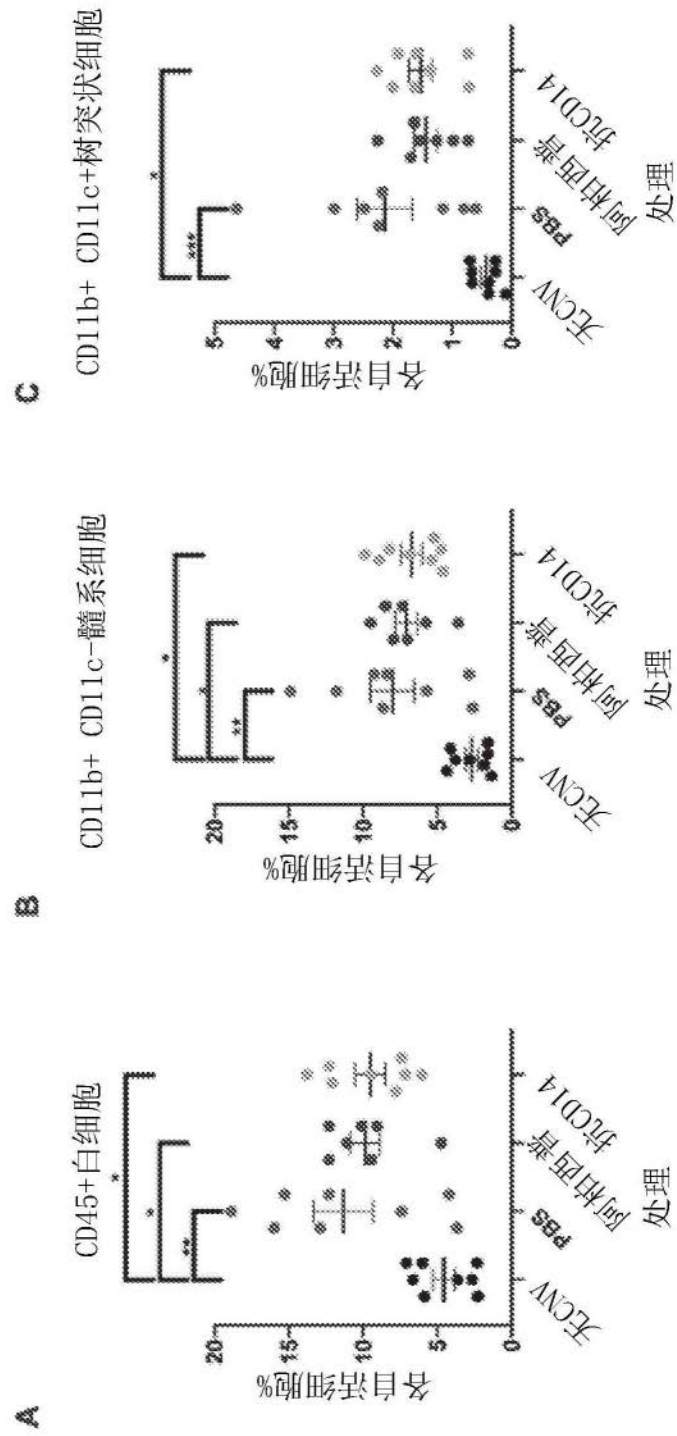


图8

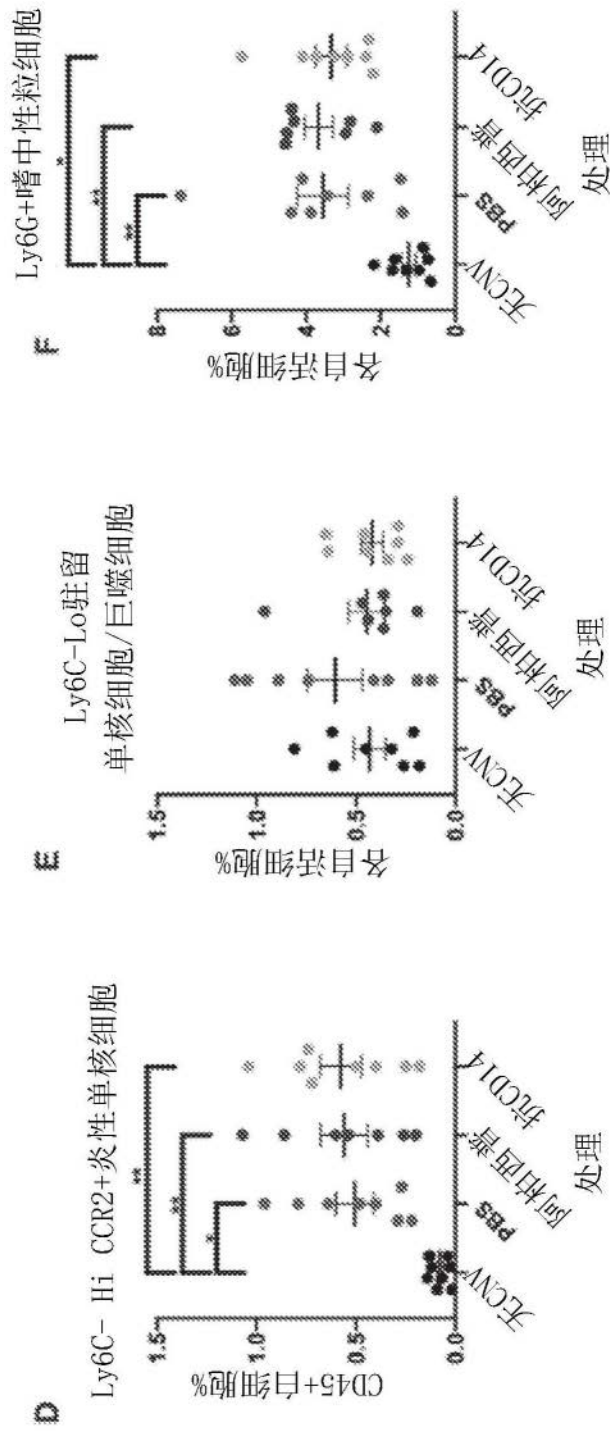


图8(续)

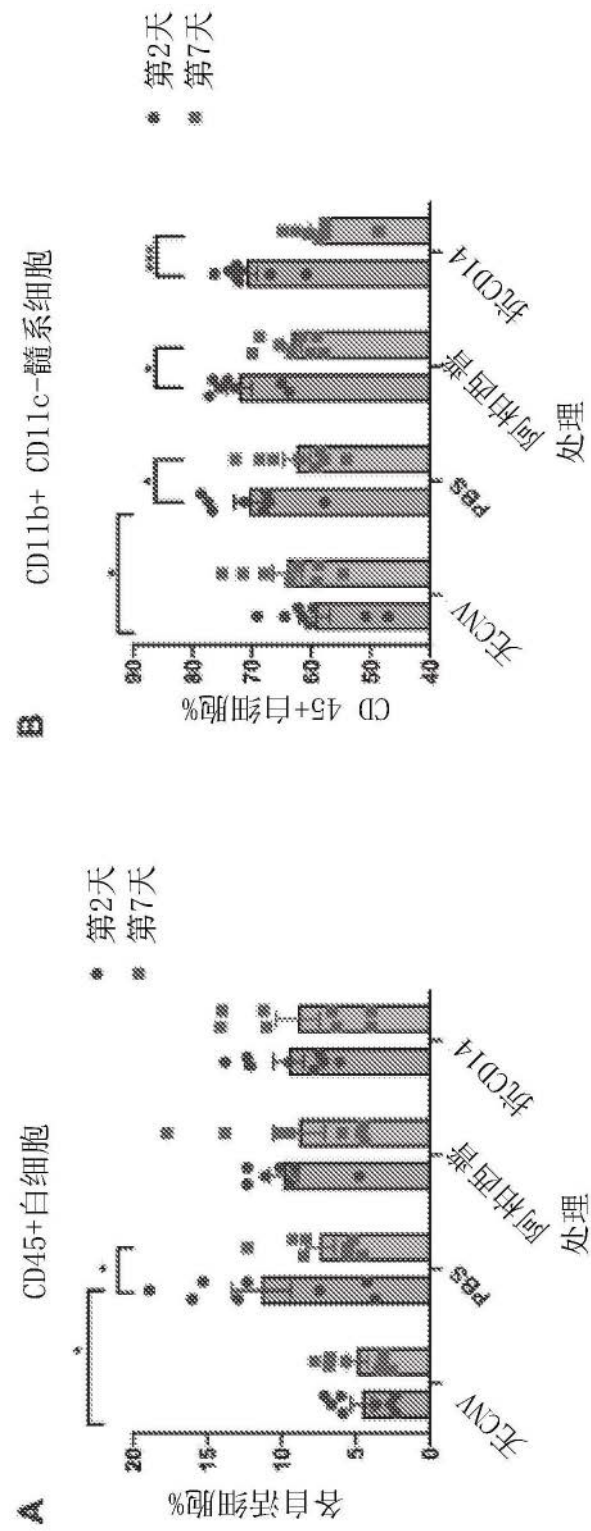


图9

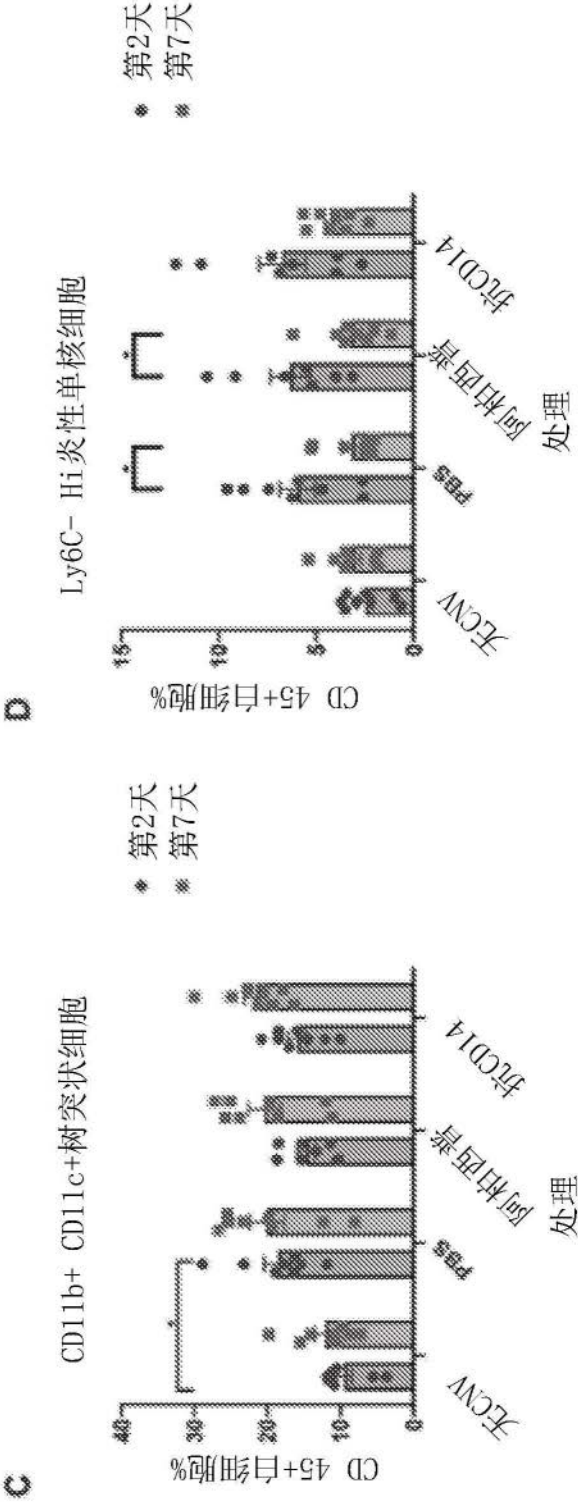


图6(续)

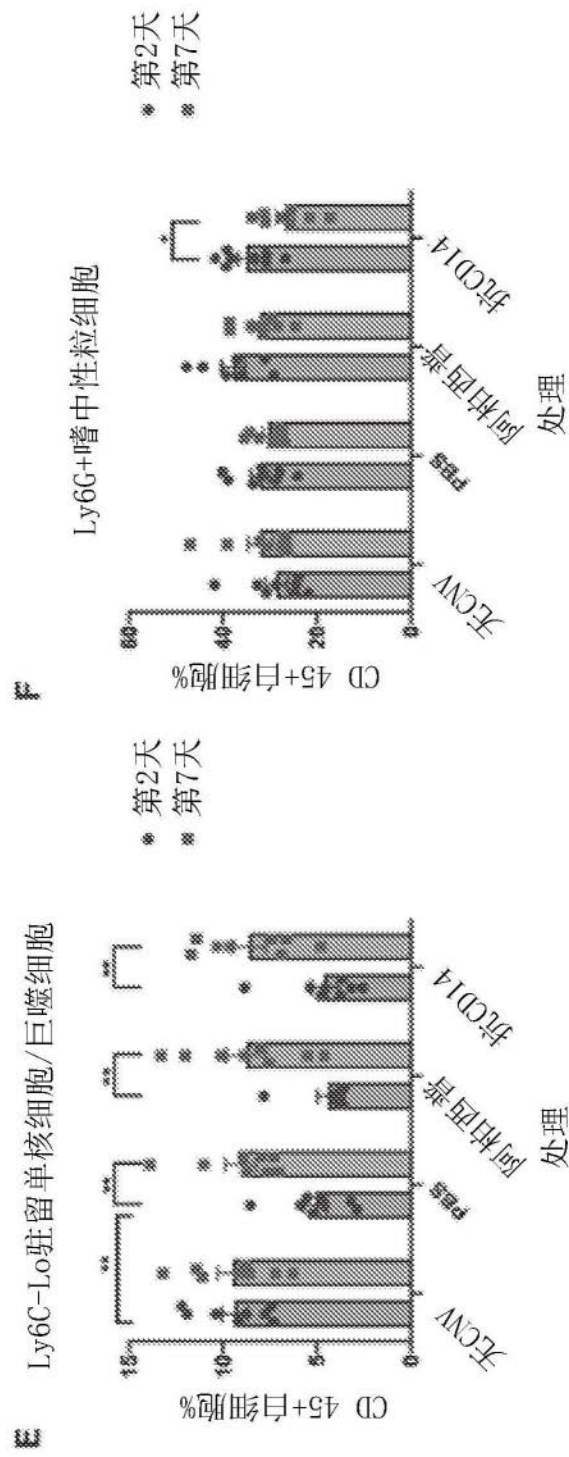
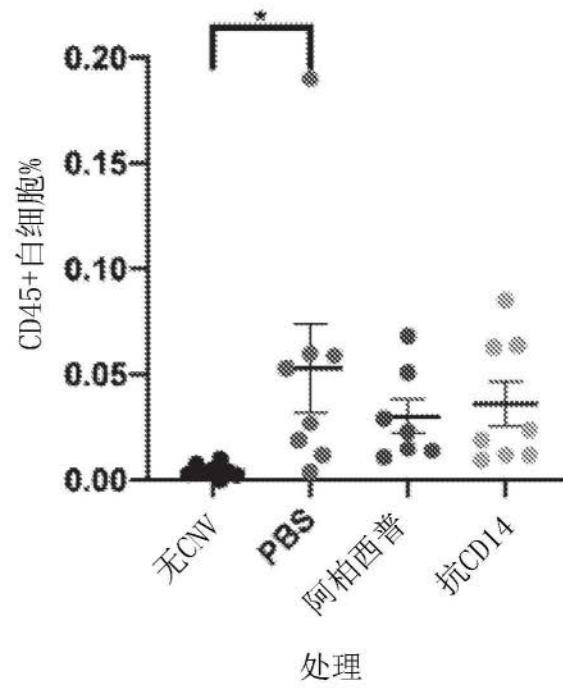


图9(续)

A.**B.**

在高Ly6C的炎性
单核细胞中CD14的表达

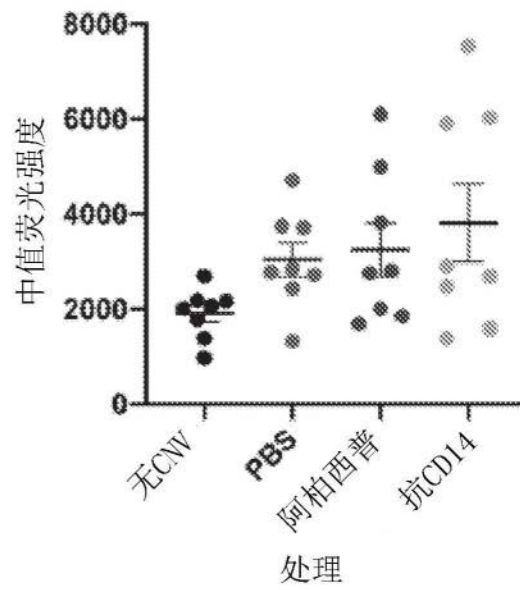


图10

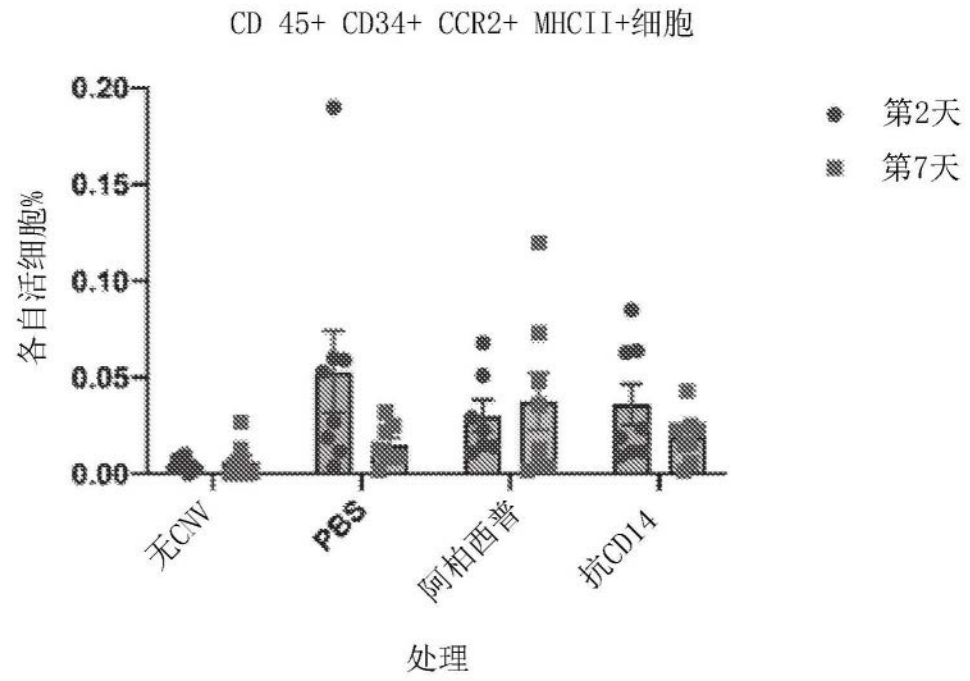
C.

图10(续)

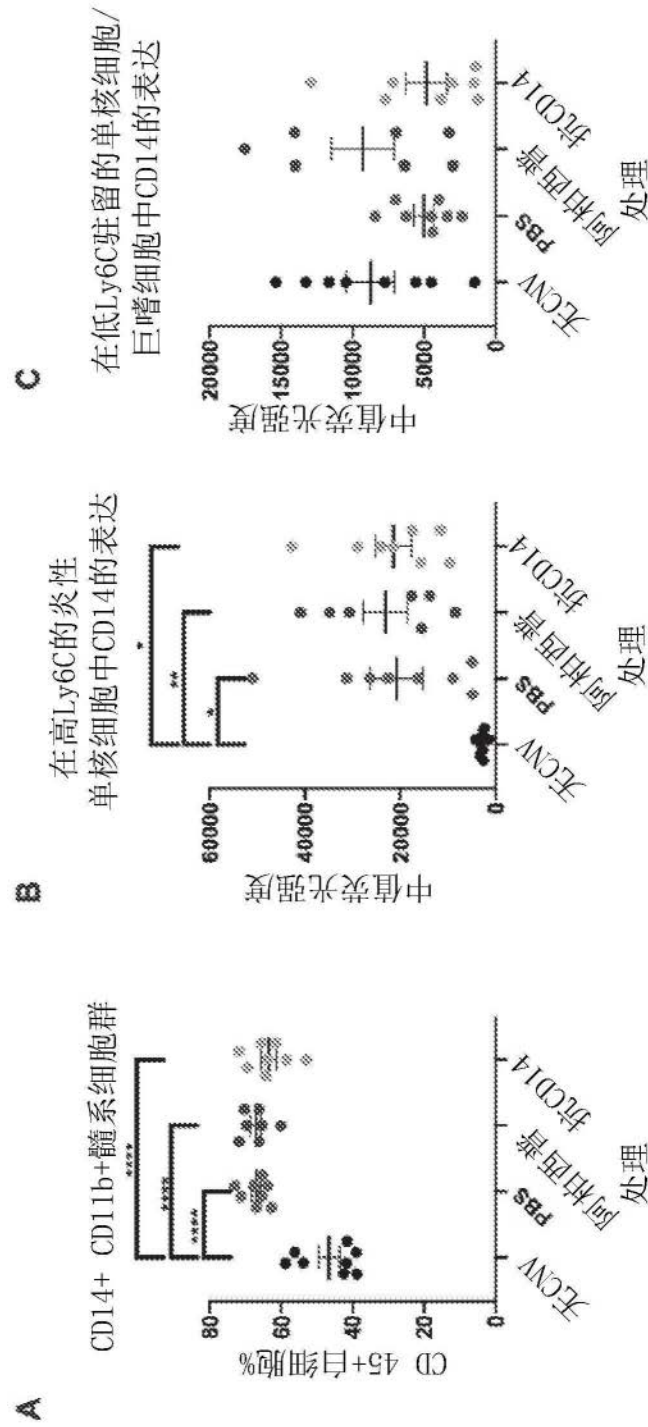


图11

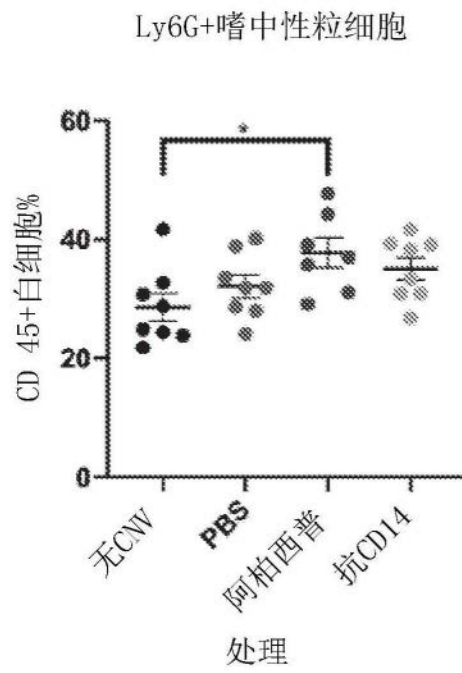
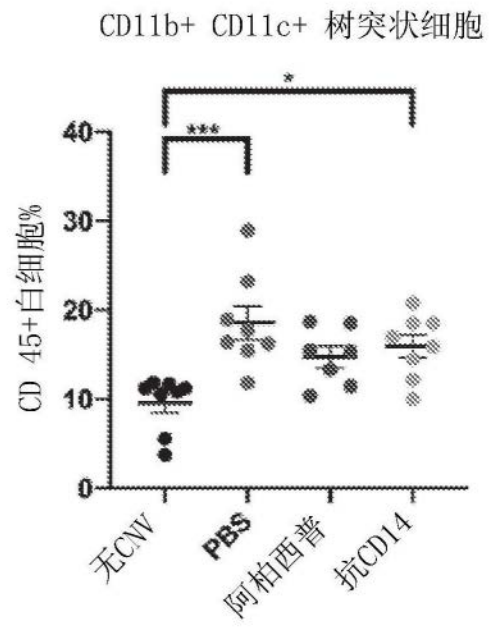
D**E**

图11(续)

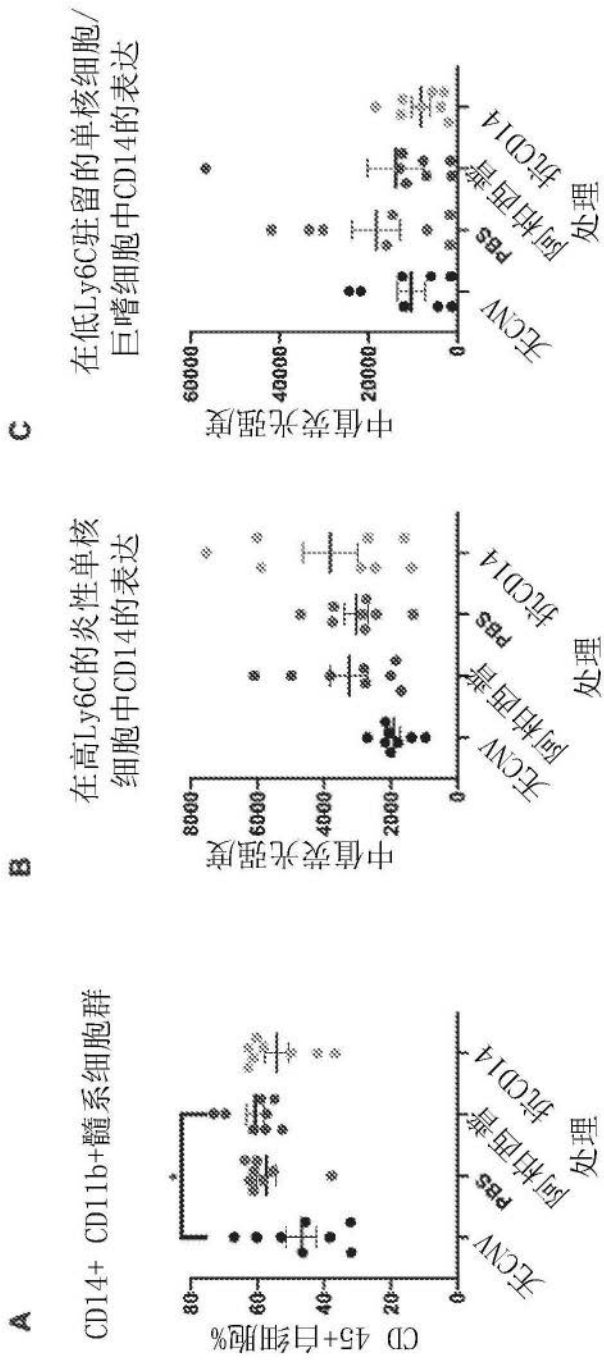


图12

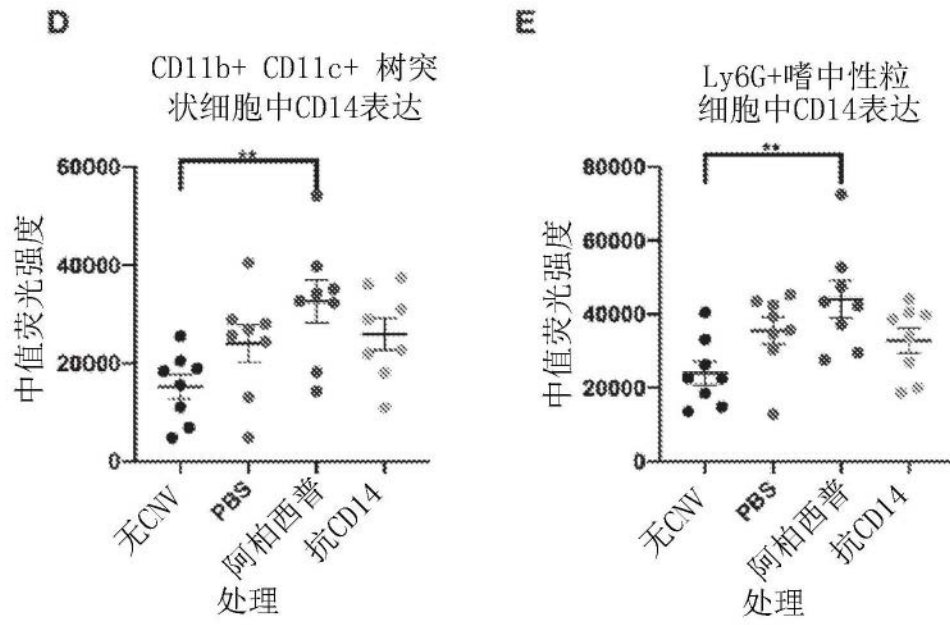


图12(续)

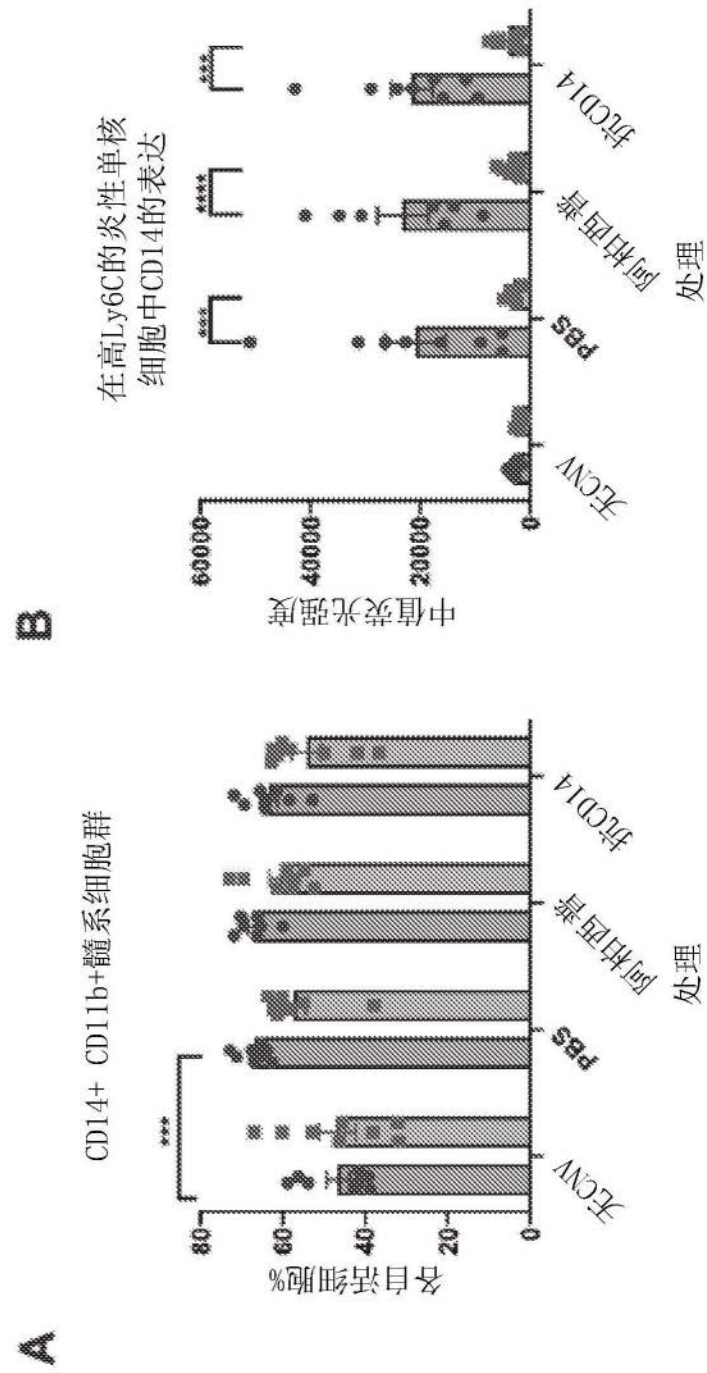


图13

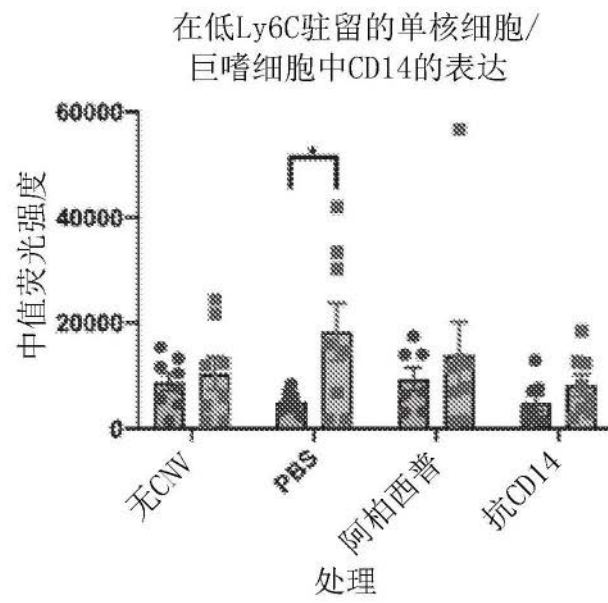
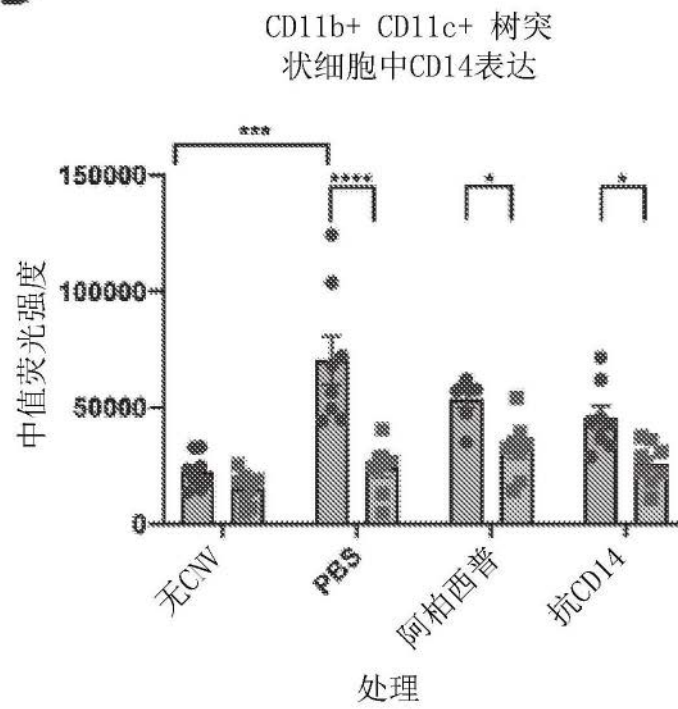
C**D**

图13(续)

E

Ly6G+嗜中性粒细胞中CD14表达

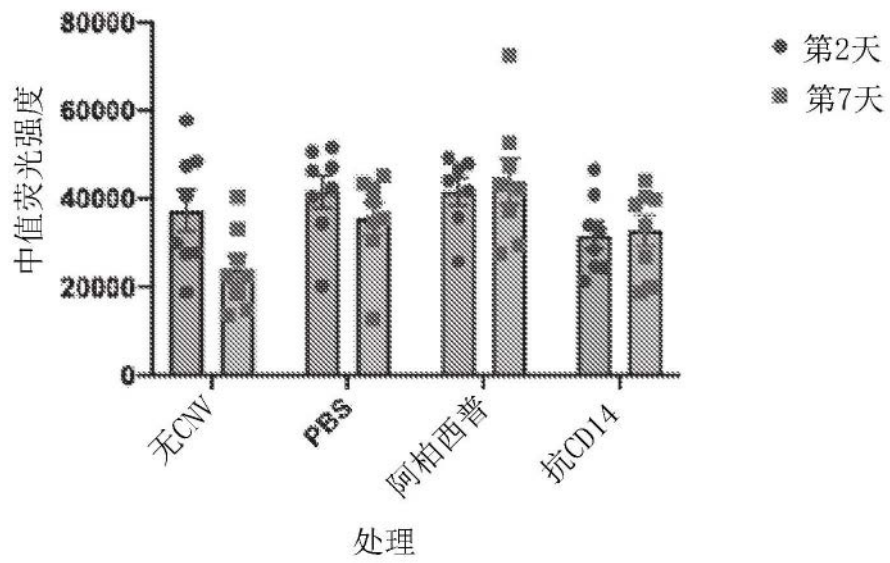


图13(续)