



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108779173 A

(43)申请公布日 2018.11.09

(21)申请号 201780010323.0

(72)发明人 蒂内·范贝尔根 帕特·乔恩克斯
琼·费恩

(22)申请日 2017.03.10

(74)专利代理机构 北京派特恩知识产权代理有
限公司 11270

(30)优先权数据

16159687.9 2016.03.10 EP

代理人 王子晔 姚开丽

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.08.07

(51)Int.Cl.

C07K 16/22(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2017/055652 2017.03.10

C07K 16/28(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/153567 EN 2017.09.14

A61P 27/02(2006.01)

(83)生物保藏信息

BCCM LMBP 6399CB 2005.03.29

(71)申请人 思罗姆博基因股份有限公司

地址 比利时勒芬

权利要求书2页 说明书27页

序列表8页

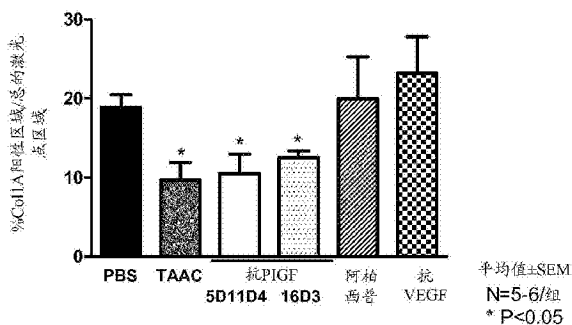
PCT/R0/134表1页 附图6页

(54)发明名称

通过拮抗胎盘生长因子抑制眼后部纤维化

(57)摘要

本发明涉及眼治疗领域。具体地，其涉及用于干扰眼后部纤维化的胎盘生长因子的拮抗剂。



1. 一种单特异性胎盘生长因子(P1GF)拮抗剂用于在受试者中治疗、预防或延迟眼后部纤维化的进展。

2. 一种单特异性胎盘生长因子(P1GF)拮抗剂用于在受试者中治疗、预防或延迟眼后部纤维化的进展且不会诱导眼后部神经退行性变。

3. 根据权利要求1至2所述的用于所述用途的单特异性胎盘生长因子(P1GF)拮抗剂进一步治疗、预防或延迟眼后部炎症和/或眼后部新血管生成和/或血管渗漏的进展。

4. 根据权利要求1至3所述的用于所述用途的单特异性胎盘生长因子(P1GF)拮抗剂进一步维持或改善具有视网膜受损的眼睛的受试者的视敏度。

5. 根据权利要求1至4所述的用于所述用途的单特异性胎盘生长因子(P1GF)拮抗剂,其特征进一步在于所述单特异性胎盘生长因子(P1GF)拮抗剂单独给药于眼睛。

6. 根据权利要求1至4所述的用于所述用途的单特异性胎盘生长因子(P1GF)拮抗剂,其特征进一步在于在洗去先前给药于眼睛的血管内皮生长因子(VEGF)拮抗剂或VEGF-受体(VEGFR)拮抗剂后,所述单特异性胎盘生长因子(P1GF)拮抗剂给药于同一只眼睛。

7. 根据权利要求1至4所述的用于所述用途的单特异性胎盘生长因子(P1GF)拮抗剂,其特征进一步在于在洗去先前给药于眼睛的所述单特异性胎盘生长因子(P1GF)拮抗剂后,血管内皮生长因子(VEGF)拮抗剂或VEGF-受体(VEGFR)拮抗剂给药于同一只眼睛。

8. 根据权利要求1至4所述的用于所述用途的单特异性胎盘生长因子(P1GF)拮抗剂,其特征进一步在于所述单特异性胎盘生长因子(P1GF)拮抗剂与第二活性化合物联合给药于眼睛,其中,所述第二活性化合物不同于血管内皮生长因子(VEGF)拮抗剂且不同于VEGF-受体(VEGFR)拮抗剂。

9. 根据权利要求1至4所述的用于所述用途的单特异性胎盘生长因子(P1GF)拮抗剂,其特征进一步在于所述单特异性胎盘生长因子(P1GF)拮抗剂与第二活性化合物联合给药于眼睛,其中,所述第二活性化合物不同于血管内皮生长因子(VEGF)拮抗剂且不同于VEGF-受体(VEGFR)拮抗剂;且其中,所述给药在洗去先前给药于同一只眼睛的血管内皮生长因子(VEGF)拮抗剂或VEGF-受体(VEGFR)拮抗剂之后。

10. 根据权利要求1至4所述的用于所述用途的单特异性胎盘生长因子(P1GF)拮抗剂,其特征进一步在于在洗去先前与第二活性化合物联合给药于眼睛的所述单特异性胎盘生长因子(P1GF)拮抗剂化合物后,血管内皮生长因子(VEGF)拮抗剂或VEGF-受体(VEGFR)拮抗剂给药于同一只眼睛,其中,所述第二活性化合物不同于血管内皮生长因子(VEGF)拮抗剂且不同于VEGF-受体(VEGFR)拮抗剂。

11. 根据权利要求8至10所述的用于所述用途的单特异性胎盘生长因子(P1GF)拮抗剂,其特征进一步在于所述单特异性胎盘生长因子(P1GF)拮抗剂与所述第二活性化合物各自以单独的组合物给药于眼睛。

12. 根据权利要求8至10所述的用于所述用途的单特异性胎盘生长因子(P1GF)拮抗剂,其特征进一步在于所述单特异性胎盘生长因子(P1GF)拮抗剂与所述第二活性化合物以单一组合物给药于眼睛。

13. 根据权利要求8至10所述的用于所述用途的单特异性胎盘生长因子(P1GF)拮抗剂,其特征进一步在于所述第二活性化合物是抗炎化合物、抗血管生成化合物、抗纤维化合物、AGE抑制化合物、ALE抑制化合物、AGE阻断化合物、碳酸酐酶抑制剂、NMDA受体拮抗剂、红藻

氨酸受体拮抗剂、AMPA受体拮抗剂、神经保护剂、控制眼内压的药剂、抗凋亡剂、抗病毒化合物、抗生素化合物、抗真菌化合物、抗组胺药、抗凝血剂、溶栓化合物、抗有丝分裂剂、麻醉剂和诱导瞳孔散大的药剂、诱发睫状肌麻痹的药剂、诱导玻璃体后脱离(完全的或不完全的)的药剂、诱导玻璃体液化的药剂、整合素抑制剂、抗水肿剂。

14. 根据权利要求1至13所述的用于所述用途的单特异性胎盘生长因子(P1GF)拮抗剂与光动力疗法、激光光凝术、放射疗法或玻璃体手术联用。

15. 根据权利要求1至14所述的用于所述用途的单特异性胎盘生长因子(P1GF)拮抗剂,其特征进一步在于所述眼后部纤维化与视网膜损伤同时发生或在视网膜损伤之后发生。

16. 根据权利要求1至15所述的用于所述用途的单特异性胎盘生长因子(P1GF)拮抗剂,其特征进一步在于所述眼后部纤维化发生在年龄相关性黄斑水肿、糖尿病性视网膜病变、(糖尿病性)黄斑水肿、任何类型的视网膜病变、新生血管性青光眼、视网膜脱离或视网膜出血中。

17. 根据权利要求1至16所述的用于所述用途的单特异性胎盘生长因子(P1GF)拮抗剂,其特征进一步在于所述单特异性胎盘生长因子(P1GF)拮抗剂是P1GF中和抗体或抗体的P1GF中和片段、反义RNA、小干扰RNA、适配体或核酶。

18. 根据权利要求1至16所述的用于所述用途的单特异性胎盘生长因子(P1GF)拮抗剂,其特征进一步在于单特异性胎盘生长因子拮抗剂是含SEQ ID NO:7中定义的重链中包含的3个重链CDR和SEQ ID NO:8中定义的轻链中包含的3个轻链CDR的P1GF中和抗体或P1GF中和抗体片段。

19. 分离的P1GF中和抗体或其P1GF中和抗体片段,含有SEQ ID NO:12中定义的重链中包含的3个重链CDR和SEQ ID NO:13中定义的轻链中包含的3个轻链CDR。

通过拮抗胎盘生长因子抑制眼后部纤维化

技术领域

[0001] 本发明涉及眼治疗领域。具体地,其涉及用于干扰眼后部纤维化的胎盘生长因子的拮抗剂。

背景技术

[0002] 眼睛的视网膜(眼睛的大部分后段;眼睛后部)是中枢神经系统(CNS)的一部分。照此,视网膜的伤口愈合反应类似于大脑的伤口愈合反应,Friedlander称之为神经胶质增生(神经胶质细胞介导的纤维化)。这与一般的非CNS组织或器官和眼前段(眼前部),例如角膜和小梁网中的伤口愈合反应相反,具体地,其被称为纤维化(成纤维细胞介导的纤维化)(Friedlander 2007,J Clin Invest,117:576-586)。

[0003] 由炎症和/或新血管生成引起或伴随炎症和/或新血管生成的任何类型的视网膜疾病或病症导致神经胶质增生和纤维性瘢痕形成。这种神经胶质增生或眼后部纤维化最终导致严重的视力丧失和失明。尽管许多药物可用于抑制新生血管形成(例如哌加他尼钠和雷珠单抗;以及,未临床认可的,贝伐单抗;全都靶向血管内皮生长因子,VEGF),但这些都不能使神经胶质增生/眼后部纤维化减到最小(Friedlander,J Clin Invest) 2007,117:576-586)。据描述,长期使用抗VEGF治疗甚至可导致眼后部纤维化增加。例如,从CATT试验中可知,24.7%的年龄相关性黄斑水肿(AMD)患者在抗VEGF治疗2年后会出现后纤维化瘢痕(贝伐单抗或雷珠单抗)(Daniel et al.,Ophthalmology 2014,121:656-666)。

[0004] 最近, Van Bergen等(Invest Ophthalmol Vis Sci 2015,56:5280-5289)使用激光诱导的脉络膜新生血管(CNV)的实验小鼠模型来证明通过靶向LOX(赖氨酰氧化酶)或LOXL2(类赖氨酰氧化酶2)的抗体减少后眼部纤维化。在类似的模型中,Rakic等(Invest Ophthalmol Vis Sci 2003,44:3186-3193)鉴定了胎盘生长因子(P1GF)作为促成CNV的生长因子之一,更特别地在激光损伤诱导后14天促成新血管生成和损伤的大小。Hollborn等(Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol 2006,244:732-741)确定体外生长的人视网膜色素上皮(RPE)细胞通过转化生长因子- β (TGF- β)刺激产生P1GF和VEGF量的增加,这引起以下暗示:在糖尿病性视网膜病变期间,TGF- β 引起的RPE细胞分泌P1GF可能有助于细胞迁移作为维管组织的膜形成的一部分。这些膜中肌成纤维细胞的存在能导致牵引性视网膜脱离和视网膜出血。

[0005] Cao等(Invest Ophthalmol Vis Sci 2010,51:6009-6017)研究了通过基质胶(Matrigel)视网膜下注射诱导的VEGF-Trap(与VEGF和P1GF均结合)对于CNV的效果。作者观察到CNV生长的停滞以及炎症和纤维化反应的减少。然而,基质胶含有几种生长因子,包括碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、表皮生长因子(EGF)、胰岛素样生长因子1(IGF-1)、TGF- β 、血小板源生长因子(PDGF)、神经生长因子(NGF)和结缔组织生长因子(CTGF)(Hughes et al.,Proteomics 2010,10:1886-1890)。因此,不能将该模型获得的结果与用激光诱导的CNV模型获得的结果进行比较,所述CNV模型不在眼中引入生长因子的外部混合物。

[0006] 已经描述了用于许多病症的P1GF中和抗体的有益效果,这些病症包括病理性血管

生成、病理性动脉生成、炎症、肿瘤形成、血管渗漏和肺动脉高压(WO 01/85796)、骨质疏松症(WO 2004/002524)、组织粘连(WO 03/063904)、肝硬化(WO 2007/003609)、费城染色体阳性白血病(WO 2010/037864)和小梁切除术结果(WO 2013/07971);另见Fischer等(Cell 2007 131:463-475)、Van Steenkiste等(Gastroenterology 2009,137:2112-2124)、Coenegrachts等(Cancer Research 2010,70:6537-6547)、Van de Veire等(Cell 2010, 141:178-190)、Schmidt等(Cancer Cell 2011,19:740-53)、Snuderl等(Cell 2013,152: 1065-1076)、Van Bergen等(J Cell Mol Med 2013,17:1632-1643)。

[0007] 具体而言, Van de Veire等(2010)注意到PIGF中和抗体对激光诱导的CNV之后的眼部血管生成、眼部炎症和脉络膜血管渗漏的抑制(因此部分证实和扩展了Rakic等的数据, Invest Ophthalmol Vis Sci 2003,44:3186-3193)。

[0008] PIGF中和抗体对术后组织粘连的有益效果(WO 03/063904)和小梁切除术的失败, Van Bergen等(J Cell Mol Med 2013,17:1632-1643)可以至少部分地归因于成纤维细胞介导的纤维化的明显抑制。

[0009] 瘢痕形成(纤维化)被认为促成青光眼滤过手术/小梁切除术后的滤过泡失败(Li et al.2006;Free papers Glaucoma:microbiology and bloodflow and IOP;Role of vascular endothelial growth factor and placental growth factor in glaucoma and scar formation after glaucoma filtration surgery)。在这种情况下,显示阻断VEGF-R2受体的抗体虽然比PIGF中和抗体的程度低,但在青光眼滤过手术/小梁切除术后增加了滤过泡存活(减少瘢痕形成)(WO2013/07971)。因此,阻断VEGF-R2受体的抗体和PIGF中和抗体都能够减少眼前部纤维化。Friedlander(J Clin Invest 2007,117:576-586)总结了VEGF拮抗剂对眼后部纤维化的作用缺乏。VEGF拮抗剂对眼后部和眼前部纤维化作用的差异表明眼后部纤维化和眼前部纤维化之间的过程不同。

发明内容

[0010] 本发明涉及单特异性胎盘生长因子(PIGF)拮抗剂用于在受试者中治疗、预防或延迟眼后部纤维化的进展。或者,单特异性胎盘生长因子(PIGF)拮抗剂用于在受试者中治疗、预防或延迟眼后部纤维化的进展且不会诱导眼后部神经退行性变。作为进一步的实施方案,用于上述用途的单特异性胎盘生长因子(PIGF)拮抗剂设想为进一步治疗、预防或延迟眼后部炎症和/或眼后部新血管生成和/或血管渗漏的进展和/或用于维持或改善具有视网膜受损的眼睛的受试者的视敏度。

[0011] 本发明进一步涉及单特异性胎盘生长因子(PIGF)拮抗剂,其用于维持或改善有视网膜受损的眼睛的受试者的视敏度。

[0012] 在上述任何一种中,所述单独的单特异性胎盘生长因子(PIGF)拮抗剂能给药于眼睛。

[0013] 或者,在上述用途中,在洗去先前给药于眼睛的血管内皮生长因子(VEGF)拮抗剂或VEGF-受体(VEGFR)拮抗剂后,所述单特异性胎盘生长因子(PIGF)拮抗剂给药于同一只眼睛。

[0014] 在进一步的替代方案中,在洗去先前给药于眼睛的单特异性胎盘生长因子(PIGF)拮抗剂后,将血管内皮生长因子(VEGF)拮抗剂或VEGF-受体(VEGFR)拮抗剂给药于同一只眼

睛。

[0015] 设想了其他替代方案,包括单特异性胎盘生长因子(P1GF)拮抗剂和第二活性化合物的联合给药。因此,在任何上述用途中,单特异性胎盘生长因子(P1GF)拮抗剂可以与第二活性化合物联合给药于眼睛,其中所述第二活性化合物不同于血管内皮生长因子(VEGF)拮抗剂且不同于VEGF受体(VEGFR)拮抗剂。

[0016] 或者,将单特异性胎盘生长因子(P1GF)拮抗剂与第二活性化合物联合给药于眼睛,其中所述第二活性化合物不同于血管内皮生长因子(VEGF)拮抗剂,且不同于VEGF-受体(VEGFR)拮抗剂;并且其中所述给药是在洗去先前给药于同一只眼睛的血管内皮生长因子(VEGF)拮抗剂或VEGF-受体(VEGFR)拮抗剂之后。

[0017] 在进一步的替代方案中,在洗去先前与第二活性化合物联合给药于眼睛的单特异性胎盘生长因子(P1GF)拮抗剂后,将血管内皮生长因子(VEGF)拮抗剂或VEGF-受体(VEGFR)拮抗剂给药于同一只眼睛,其中所述第二活性化合物不同于血管内皮生长因子(VEGF)拮抗剂且不同于VEGF-受体(VEGFR)拮抗剂。

[0018] 当单特异性胎盘生长因子(P1GF)拮抗剂与第二活性化合物联用时,两者都能各自以单独的组合物给药于眼睛。第二活性剂可以在单特异性胎盘生长因子(P1GF)拮抗剂给药之前、同时或之后给药。

[0019] 或者,两者都能以单一组合物的形式给药于眼睛。本文中的第二活性化合物可以是一种活性化合物或一种以上活性化合物的组合。特别地,但不限于此,这种第二活性化合物可以是抗炎化合物、抗血管生成化合物、抗纤维化合物、AGE抑制化合物、ALE抑制化合物、AGE阻断化合物、碳酸酐酶抑制剂、NMDA受体拮抗剂、红藻氨酸受体拮抗剂、AMPA受体拮抗剂、神经保护剂、控制眼内压的药剂、抗凋亡剂、抗病毒化合物、抗生素化合物、抗真菌化合物、抗组胺药、抗凝剂、溶栓化合物、抗有丝分裂剂、麻醉剂、诱导瞳孔散大的药剂、诱发睫状肌麻痹的药剂、诱导玻璃体后脱离(完全的或不完全的)的药剂、诱导玻璃体液化的药剂、整合素抑制剂、抗水肿剂。

[0020] 如上所述的单特异性胎盘生长因子(P1GF)拮抗剂的任何用途可进一步与光动力疗法、激光光凝术、放射疗法或玻璃体手术联用。

[0021] 如上所述的任何用途的单特异性胎盘生长因子(P1GF)拮抗剂的特征进一步在于眼后部纤维化与视网膜损伤同时或在视网膜损伤之后发生。这种眼后部纤维化可以例如发生在与年龄相关的黄斑水肿、糖尿病性视网膜病、(糖尿病性)黄斑水肿、任何类型的视网膜病、新生血管性青光眼,视网膜脱离或视网膜出血中。

[0022] 如上所述的任何用途的单特异性胎盘生长因子(P1GF)拮抗剂的特征进一步在于其是P1GF中和抗体或抗体的P1GF中和片段、反义RNA、小干扰RNA、适配体或核酶。本文中,P1GF中和抗体或P1GF中和抗体片段可以含有SEQ ID NO:7中定义的重链和SEQ ID NO:8中定义的轻链中的6个CDR。特别地,当将IMGT方法应用于SEQ ID NO:7和8时,这些CDR如SEQ ID NO:1至6中所定义。

[0023] 本发明还涉及分离的P1GF中和抗体或其P1GF中和抗体片段,含有SEQ ID NO:12中定义的重链中包含的3个重链CDR和SEQ ID NO:13中定义的轻链中包含的3个轻链CDR。

附图说明

[0024] 图1、激光诱导的CNV模型中的白细胞浸润

[0025] (A) 在CNV模型中,激光作用5天后,与IgG处理的小鼠相比,用抗PIGF抗体5D11D4 (1.5和3.1 μ g) 处理减少了白细胞浸润 ($P < 0.05$);阿柏西普 (2.4和20 μ g) 和高剂量的曲安奈德 (TAAC; 40 μ g) 显示出相当的效果。给药抗VEGFR2抗体DC101 (3.1 μ g) 未显示任何抗炎作用。(B) 激光作用5天后的等摩尔比较,与IgG处理的小鼠相比,用抗PIGF抗体5D11D4 (3.1 μ g) 处理减少了白细胞浸润 ($P < 0.05$);等摩尔浓度的阿柏西普 (Eylea[®]) (2.4 μ g) 显示出相似的效果。给药抗VEGFR2抗体DC101 (3.1 μ g) 和TAAC (4 μ g) 未显示任何抗炎作用。数据是平均值 \pm SEM。

[0026] 图2、激光诱导CNV模型中的眼后部胶原沉积

[0027] (A) 在CNV模型中,激光作用30天后,与PBS处理的小鼠相比,用抗PIGF抗体5D11D4 (1.5和3.1 μ g) 处理减少了胶原沉积 ($P < 0.05$);这与高摩尔浓度的曲安奈德 (TAAC; 40 μ g) 的作用类似。给药抗VEGFR2抗体DC101和阿柏西普 (Eylea[®]) (均为3.1 μ g) 未显示任何抗纤维化作用。(B) 激光作用30天后的等摩尔比较,与IgG处理的小鼠相比,用抗PIGF抗体5D11D4 (3.1 μ g) 处理减少了胶原沉积 ($P < 0.05$)。抗VEGFR2抗体DC101 (3.1 μ g)、阿柏西普 (2.4 μ g) 和TAAC给药 (4 μ g) 未显示任何抗纤维化作用。数据是平均值 \pm SEM。

[0028] 图3、视网膜神经节细胞 (RGC) 存活。

[0029] 在用对照IgG、抗PIGF抗体5D11D4和抗VEGF-R2抗体DC101 (均为25mg/kg,每周3次) 的腹膜内注射的2周 (图3A)、4周 (图3B) 和6周 (图3C) 后评估视网膜神经节细胞存活。在C57B1/6小鼠中,2周、4周和6周后3个处理组之间的RGC/视网膜面积没有显著差异 ($N = 6; P > 0.05$),而瑞士小鼠中存在显著降低 ($N = 6; P < 0.05$)。如图3D所示,TUNEL染色证实神经节细胞层中每个视网膜区域的凋亡细胞数在抗-PIGF抗体5D11D4与对照IgG处理6周后的小鼠中相当 ($N = 6; P > 0.05$)。抗VEGF-R2抗体DC101处理的C57B1/6小鼠存在凋亡细胞增加的趋势 ($n = 6; P = 0.10$),而瑞士组的增加显著 ($n = 6; P < 0.001$)。数据代表平均值 \pm SEM。

[0030] 图4、激光诱导的CNV小鼠模型中的眼后部胶原沉积

[0031] 在玻璃体内给药抗小鼠PIGF抗体5D11D4、抗人类PIGF抗体16D3、抗鼠VEGF抗体B20 (均为3.1 μ g/眼)、阿柏西普 (等摩尔量为2.4 μ g/眼) 和曲安奈德 (TAAC; 40 μ g/眼) 后与PBS处理的眼睛相比,评估眼部胶原沉积。两种抗PIGF抗体均显著降低胶原沉积 ($P < 0.05$);这与TAAC (40 μ g/眼) 的给药相似。与PBS处理的眼睛相比,给药等摩尔量的阿柏西普或抗VEGF抗体B20不会减少纤维化 ($P < 0.05$)。数据代表平均值 \pm SEM。

[0032] 图5、糖尿病小鼠眼内RGC密度 (链脲佐菌素诱发的糖尿病)

[0033] 糖尿病发病后8周,在未接受处理 (---)、接受玻璃体内注射抗PIGF抗体5D11D4 (5.4 μ g/ml),或接受PBS注射的眼睛间,RGC (视神经两侧250 μ m) 的数量无显著差异。相反,给药抗VEGFR2抗体DC101显著降低RGC密度20% ($P < 0.05$)。数据代表平均值 \pm SEM。

[0034] 图6、在激光诱导的CNV小鼠模型中视网膜血管中的周皮细胞覆盖

[0035] 如在激光作用第14天后分析,用抗PIGF抗体5D11D4 (25mg/kg) 处理增加CNV中的血管成熟。在激光后立即开始腹膜内给药抗PIGF抗体 (每周3次),直至处死。与用对照IgG抗体1C8 (“IgG”, $n = 10, P < 0.05$) 的处理相比,用抗PIGF抗体5D11D4 (25mg/kg) 处理增加了 α SMA (平滑肌细胞肌动蛋白) 阳性区域。与给药对照IgG相比,给药抗VEGF-R2抗体DC101 (25mg/

kg) 处理的效果不显著 ($n=10, P>0.05$)。数据代表平均值 \pm SEM。

具体实施方式

[0036] 在引起本发明的工作中,比较了不同血管生成抑制剂对激光诱导的脉络膜新血管生成 (CNV) 的不同方面的影响。

[0037] 所涉及的血管生成抑制剂是阻断血管内皮生长因子受体2 (VEGF-R2) (VEGF-A受体) 的抗体、一种鼠胎盘生长因子 (PlGF)-中和抗体(如WO 01/85796中所述;并参见下文)、人PlGF中和抗体(如WO 2006/099698中所述;并参见下文)、抗鼠VEGF抗体B20 (Liang et al. 2006, J Biol Chem 281:951-961) 和阿柏西普(捕获VEGF-A、VEGF-B和PlGF;商品名为 Eylea®)。所研究的CNV的方面是炎症、新血管生成、血管渗漏(包括对血管周皮细胞的影响)和眼后部纤维化。在未实验的小鼠 (naive mice) 和糖尿病小鼠模型中研究了对视网膜神经节细胞的作用。针对VEGFR-2和针对PlGF的鼠抗体以及阿柏西普都减少了新血管生成和血管渗漏。引人注目的是,只有阿柏西普和PlGF中和抗体能够减轻炎症(在相当剂量下相当的减少),而VEGF-R2受体阻断抗体不能减轻炎症。因此,阿柏西普的炎症减少效果可归因于其PlGF捕获特征。关于PlGF中和抗体,这些数据证实了早先发表的观察结果 (Van de Veire et al., Cell 2010, 141:178-190)。

[0038] 然而,与此形成鲜明对比的是,目前的工作确定PlGF抑制剂仅能够作为减少眼后部纤维化的药剂。阿柏西普没有观察到这种效果,无论用阻断VEGF的抗体还是阻断VEGF-R2受体的抗体。这是非常令人惊讶的,因为阿柏西普虽然能够中和PlGF,但并未减少眼后部纤维化。这违背了有时候的设想或明示的确信,即PlGF和VEGF仅是在VEGF-VEGFR途径中起作用的替代生长因子。此外令人惊讶的是,这些结果证实了眼后部纤维化和前眼部纤维化之间的差异,表明阻断眼后部的PlGF作用可能会阻止眼后部纤维化,这与VEGF抑制作用相反(可能增加眼后部纤维化,见背景部分)。

[0039] 在该工作中进一步观察到PlGF拮抗剂对RGC缺乏毒性,这与阻断VEGF-R2受体的抗体诱导的明显的RGC凋亡率相反。

[0040] 鉴于上述,本发明因此涉及单特异性胎盘生长因子 (PlGF) 拮抗剂用于在受试者中治疗、预防或延迟眼后部纤维化的进展。或者,单特异性胎盘生长因子 (PlGF) 拮抗剂用于在受试者中治疗,预防或延迟眼后部纤维化的进展且不会诱导眼后部神经退行性变。作为进一步实施方案,用于上述用途的单特异性胎盘生长因子 (PlGF) 拮抗剂设想进一步治疗、预防或延迟眼后部炎症和/或眼后部新血管生成和/或血管渗漏的进展。

[0041] 眼后部纤维化与任何视网膜伤口、损伤或创伤(本文统称为视网膜损伤)的愈合有关。由于在眼睛的后部(眼后部区域)发生的愈合反应/过程而发生的纤维化被Friedlander称为神经胶质增生(神经胶质细胞介导的纤维化) (J Clin Invest 2007, 117:576-586),还参见上文的背景技术部分。

[0042] 特异性拮抗剂是阻断、中和或以其他方式消除(例如抑制)拮抗剂靶标分子作用,且不影响或不显著地影响另一分子(其中具有非靶标分子)的作用的拮抗剂。因此,阻断、中和或以其他方式消除靶标分子的作用的选择性的。阻断、中和或以其他方式取消靶标分子的作用可以是部分的(例如,5%至95%残余活性之间任意值=95%至5%抑制作用之间的任意值)或接近完全(例如超过95%抑制作用)。

[0043] 在配体-受体相互作用的情况下,配体可以是(不必须是唯一的)受体的唯一配体;或多个配体可以与相同的受体结合,在这种情况下,所有配体或配体中的一些可以与受体的相同位点结合,或者所有配体或配体中的一些各自可以与受体的不同位点结合。配体的特异性拮抗作用总是可能的。在特异性受体抑制作用的情况下,这可以通过靶向单一受体的情况或靶向靶标配体的受体中的独特结合位点的情况成为可能。

[0044] 通过选择性拮抗剂阻断、中和或以其他方式消除靶标分子的作用通常意味着拮抗剂和靶标分子之间的物理相互作用。这并不排除选择性拮抗剂与非靶标分子的结合,但后者的(生物)作用不应该或不显著地被阻断、中和或以其他方式消除。或者,靶标分子的(生物)作用被抑制到更高的程度,例如,与非靶标分子的抑制相比,25倍、50倍、100倍或更多,从而产生选择性。抑制的比较可以表示为,例如就抑制分子的50% (生物)活性所需的拮抗剂浓度(IC₅₀值)。

[0045] 特别地,特异性拮抗剂是单特异性拮抗剂。这意味着拮抗剂仅靶向(在阻断、中和或以其他方式消除上述作用的意义上说)一种特定分子。这并不排除(单)特异性拮抗剂的多价性。因此,这种拮抗剂能具有多个结合位点,每个结合位点与分子的相同部分相互作用;或这些中的每一个,或这些中的一些与靶标分子的不同部分相互作用。然而,总之,拮抗剂对于同一个分子,即相同的靶标分子是特异性的或单特异性的。特异性和单特异性的概念进一步扩展到分子的多种同型。例如,贝伐单抗是抑制血管内皮生长因子A (VEGF-A)的多种同型的单克隆抗体,因此是单特异性VEGF-A拮抗剂。

[0046] 虽然单特异性的概念在抗体领域是众所周知的,其延伸到小分子(例如,与非特异性的II类视黄醇相比,I类维甲酸是仅一种视黄酸受体的单特异性(拮抗剂)激动剂-G é hin et al., Chem Biol 1999,6:519-529),还延伸至例如反义寡核苷酸、siRNA和适配体(传统上为单特异性,但已知有双特异性反义寡核苷酸、siRNA和适配体是,例如,分别 Rubenstein&Guinan, In vivo 2010,24:489-494; Anderson et al., Oligonucleotides 2003,13:303-312;和 Schrand et al., Cancer Immunol Res 2014,2:867-877)。Bai等描述了一个三价但是单特异性的核酶(AIDS Res Hum Retrovir 2001,17:385-399)。

[0047] 人胎盘生长因子hPIGF首先由Maglione等公开(Proc Natl Acad Sci USA 1991,88:9267-9271)并且涉及在GenBank登录号no.P49763多肽的4种同种型变体(isoformic variants),其中PIGF1和PIGF2(也称为PIGF-1和PIGF-2)是最熟知的。人PIGF-2的全长参考序列(即缺少18-氨基酸信号序列的成熟蛋白;hPIGF2)包含在下文中:

[0048]

LPAVPPQQWALSAGNGSSEVEVVPFQEVWGRSYCRALERLVDVVSEYPSEVEHMFSPSCVSLLRCTGCCGDENLHCVPVETANVTMQLLKIRSGDRPSYVELTFSQHVRCECRPLREKMKPERRRPKGRGKRRREKQRPTDCHLCGDAVPRR (SEQ ID NO:10)。与hPIGF2相比,hPIGF1中不存在具有序列RRPKGRGKRRREKQRPTDCHL (SEQ ID NO:11)的肝素结合结构域。现在经常使用胎盘生长因子的替代缩写“PGF”。在PIGF的单特异性拮抗剂的情况下,这种单特异性因此可以延伸至PIGF的所有同种型。因此,本文所用的“PIGF的特异性抑制剂”是抑制PIGF功能、抑制PIGF表达或抑制PIGF信号传导而不干扰或不显著干扰(选择性干扰)其他分子生理功能的分子或化合物。特别地,选择性PIGF抑制剂不会干扰VEGF的功能。因此,作为非限制性实例,特异性针对PIGF的化合物(例如抗PIGF抗体)是(单)特异性抑制剂,然而也靶向VEGF(例如基于VEGFR1的化合物和VEGF-Trap或类

VEGF-Trap化合物)或靶VEGF/PlGF共有受体(例如抗VEGFR1或sVEGFR-1的抗体)的化合物通常是非特异性抑制剂,因为其不是(单)特异性PlGF拮抗剂。因此,VEGF拮抗剂和VEGF-受体拮抗剂不是(单)特异性PlGF拮抗剂。

[0049] PlGF中和抗体已经公开于例如WO 01/85796、WO 2006/099698(也参见Nielsen& Sengelov, Expert Opin Biol Ther 2012, 12:795-804)、WO 2011/088111和例如Bais等(Cell 2010, 141:166-177-其中之一C9.V2为Snuderl等Cell 2013, 152:1065-1076所使用)。特别地,WO 2006/099698中公开的人PlGF中和抗体16D3包含具有序列GYTFTDYY (SEQ ID NO:1)的VH CDR1、具有序列IYPGSGNT (SEQ ID NO:2)的VH CDR2、具有序列VRDSPFFDY (SEQ ID NO:3)的VH CDR3、具有序列QSLNLSGMRKSF (SEQ ID NO:4)的VL CDR1、具有序列WAS (SEQ ID NO:5)的VL CDR2,和具有序列KQSYHLFT (SEQ ID NO:6)的VL CDR3。表达鼠抗体的杂交瘤由Thromb-X (Herestraat 49, B-3000Leuven)和BCCM/LMBP(比利时微生物协调保藏中心/质粒保藏分子生物学实验室),根特大学,科技园927, B-9052津维纳拉德,比利时,于2005年3月29日保藏,生物保藏登记号为LMBP 6399CB。

[0050] WO 2006/099698中举例说明的人源化VH、VL和scFv氨基酸序列是:

[0051] 人源化VH氨基酸序列:

[0052]

QVQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYINWVKLAPGGGLEWIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKATLTIDTSSS
TAYMQLSSLTSEDVAVYFCVRDSPFFDYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:7)

[0053] 人源化VL氨基酸序列:

[0054]

DIVLTQSPDSLAVSLGERVTMNCSSQSLNLSGMRKSF~~LA~~WYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDF
TLTISSVQAEDVAVYYCKQSYHLFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO:8)

[0055] 人源化scFv氨基酸序列(相比于WO 2006/099698缺失6个组氨酸标签):

[0056]

QVQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYINWVKLAPGGGLEWIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKATLTIDTSSS
TAYMQLSSLTSEDVAVYFCVRDSPFFDYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSDIVLTQSPDSLAVSLGERVTMNC
KSSQSLNLSGMRKSF~~LA~~WYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCKQSYHL
FTFGSGTKLEIKGSPYDVPDYAGS (SEQ ID NO:9)

[0057] 如WO 01/85796中所使用的鼠PlGF中和抗体5D11D4由下文给出的重链和轻链氨基酸序列而表征。

[0058] 重链5D11D4:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

[0059]

QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTNYWINWVKRPGGLEWIGNIYPSDSFTNYNQKFKDKATLTVDKSSS
TAYMHLSSPTSDDSAVYYCTRDYRYDAVYALDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO:12),其中CDR H1、CDR H2
和CDR H3分别由氨基酸序列NYWIN (SEQ ID NO:14)、NIYPSDSFTNYNQKFKD (SEQ ID NO:15)和
DYRYDAVYALDY (SEQ ID NO:16)定义。

[0060] 轻链5D11D4:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

[0061]

QIVLTQSPA~~IM~~SASPGEKVTITCSASSSVSFIHWFQQKPGTSPKLLWIYGTSNLASGVPARFSGSGSGTSSSLTISR

EAEDAATYYCQQRSRYPYTFGGGKLEIK (SEQ ID NO:13), 其中CDR L1、CDR L2和CDR L3分别由氨基酸序列SASSSVSFIH (SEQ ID NO:17)、(SEQ ID NO:18)和QQRSRYPYT (SEQ ID NO:19)定义。

[0062] 上述鼠P1GF中和抗体及其P1GF中和片段以及此类抗体或抗体片段的人源化形式,构成了本发明的进一步方面。特别地,本发明涉及分离的P1GF中和抗体,或其P1GF中和抗体片段,其含有SEQ ID NO:12中定义的重链中包含的3个重链CDR和SEQ ID NO:13中定义的轻链中的3个轻链CDR,其中CDR通过如下所述的任何公知方法描述。特别地,如SEQ ID NO:14至19中所定义的CDR,其中应用Kabat方法描述SEQ ID NO:12和13。或者,本发明涉及鼠P1GF中和抗体或鼠P1GF中和抗体片段,其与5D11D4竞争结合鼠P1GF,或结合5D11D4结合的相同的鼠P1GF表位。

[0063] 抗体序列中CDR区的确定可取决于所应用的算法/方法 (Kabat-、Chothia-、Martin (增强的Chothia)、IMGT (ImmunoGeneTics信息系统)-编号机制;参见例如<http://www.bioinf.org.uk/abs/index.html#kabatnum>和<http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/IMGTnumbering.html>),这会引入CDR序列长度和/或描述的差异。因此,WO 01/85796和WO 2006/099698中描述的抗P1GF抗体的CDR可以替代地描述为存在于给定的相应重链和轻链序列中的CDR序列,并且根据众所周知的方法确定或描述,例如根据Kabat-、Chothia-、Martin (增强的Chothia)、IMGT-编号机制。例如,根据描述的WO 2006/099698,通过IMGT方法从16D3抗-P1GF抗体描述了SEQ ID NO:1至6中定义的CDR序列。应用另一种方法可导致CDR序列(略微)不同于SEQ ID NO:1-6中定义的CDR序列。

[0064] 本文中,P1GF中和抗体或P1GF中和抗体片段可以是含6个CDR的抗人P1GF抗体16D3的抗体,即SEQ ID NO:7中定义的重链中包含的3个VH CDR和SEQ ID NO:8中定义的轻链中包含的3个VL的CDR,其中CDR通过如上所述的任何公知方法描述。特别地,当将IMGT方法应用于SEQ ID NO:7和8时,这些CDR如SEQ ID NO:1至6中所定义。在互补决定区外和侧翼,P1GF中和抗体或P1GF中和抗体片段可包含合适的框架区 (FR),例如可衍生自SEQ ID NO:7中定义的VH和SEQ ID NO:8中定义的VL的那些,或其任何人源化形式。或者,P1GF中和抗体或P1GF中和抗体片段可以是与16D3竞争结合P1GF,或与16D3结合的相同P1GF表位结合的抗体片段。抗体16D3与人P1GF结合,并且尽管具有较低的亲和力,但也与鼠P1GF结合。

[0065] 特别地,所述中和抗P1GF抗体可以是能够结合P1GF并抑制P1GF活性的任何类型的抗体或其任何片段。特别地,所述抗P1GF抗体或其片段可以中和P1GF的活性,因此可以是中和抗P1GF抗体或中和抗P1GF抗体片段。此类抗体包括本领域已知的所有类型的抗体,例如人抗体或人源化抗体、骆驼抗体 (cameloid antibodies)、鲨鱼抗体 (shark antibodies)、纳米抗体、(单)域抗体、小型化抗体 (例如小模块化免疫药物,SMIP),单抗体 (unibodies)等,以及它们的任何片段。示例性的抗体片段包括Fab、F(ab')₂、scFv、scFv-Fc、微抗体、V-NAR、VhH。(Nelson, mAbs 2010, 2:77-83; Holliger & Hudson, Nat Biotechnol 2005, 23:1126-1136)。

[0066] P1GF反义RNA是本领域已知的 (例如Yonekura et al., J Biol Chem 1999, 274:35172-35178; Levati et al., Int J Oncol 2011, 38:241-247),用于RNA干扰的P1GF siRNA (例如Li et al., Oncogene 2013, 32:2952-2962; Nourinia et al., J Ophthalmic Vis Res 2013, 8:4-8)和抗P1GF核酶 (例如Chen et al., J Cell Biochem 2008, 105:313-320)也是已知的。

[0067] 以下包括VEGF和VEGFR抑制化合物的非详尽列表。单特异性VEGF抑制剂包括抗体贝伐单抗(结合所有VEGF-A同种型)、或雷珠单抗抗体片段(结合所有VEGF-A同种型)、RNA-适配体派加他尼(仅结合一种VEGF-A同种型)和abicipar(VEGF-A特异性设计的锚蛋白重复蛋白(darpin))。阿柏西普是一种捕获VEGF-A、VEGF-B和PlGF的多特异性抑制剂。VEGFR-2(F1k-1)阻断剂包括抗体DC101(由杂交瘤细胞系ATCC HB-11534产生)。VEGFR-1(F1t-1)阻断剂包括肽(Taylor&Goldenberg 2007, Mol Cancer Ther 6:524-531; Bae et al. 2005, Clin Cancer Ther 11:2651-2661; Ponticelli et al. 2008, J Biol Chem 283:34250-34259)和抗体(例如,如WO 2006/055809中所述)。

[0068] “治疗(treatment/treating)”是指与没有得到治疗时,疾病或病症或其单一症状的进展或预期进展相比,疾病或病症或其单一症状的进展的任何减少、延迟或阻滞。更理想的是,治疗使得疾病或病症或其单一症状没有/零进展(即“抑制”),或者甚至引起已经发展的疾病或病症的任何比率的复原,或者引起已经发展的疾病或病症的单一症状的任何比率的复原。治疗(treatment/treating)还涉及实现与疾病或病症的一种或多种临床症状或其任何单一症状相关的显著转好。根据情况,可以定量或定性地对显著转好进行评分。定性标准可以例如是病人健康。在定量评估的情况下,显著转好通常是比治疗前的情况下超过10%、超过20%、超过25%、超过30%、超过40%、超过50%、超过60%、超过70%、超过75%、超过80%、超过90%、超过95%、或100%或更多的改善。评估改善的时间范围将取决于观察到的标准/疾病的类型,并且可由本领域技术人员确定。

[0069] 在一些情况下,治疗可以是预防性的,意味着其引起预防疾病或病症或其单一症状的发作。例如,在目前的情况下,眼后部纤维化的发展需要时间并且原则上可以在任何类型的视网膜损伤的同时或之后开始发生。如果足够早地识别出这种视网膜损伤,则可以在这些早期阶段给药单选择性PlGF拮抗剂,以防止眼后部纤维化的显著发展。同样地,众所周知,在一只眼睛中被诊断出患有视网膜损伤的患者(由于病理学),另一只眼睛虽然可能仍然健康,但可能会受到相同的视网膜损伤(由于病理学)(例如Stalmans, Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2016, doi 10.1007/s00417-016-3294-1)。在这些情况下,可以考虑用单选择性PlGF拮抗剂对另一只眼睛进行预防性治疗,以便一旦视网膜损伤成为事实就防止发生眼后部纤维化。换句话说,单选择性PlGF拮抗剂可用于预防眼后部纤维化。单一选择性PlGF拮抗剂可用于预防眼后部纤维化的另一种情况是与外科玻璃体切除术相结合(例如,不久之后)。由于视网膜损伤可能作为外科玻璃体切除术的副作用而发生,因此可以设想防止对这种损伤应答的眼后部纤维化发生。

[0070] 对视网膜的任何损伤都可引发慢性伤口愈合反应,包括眼后部纤维化和瘢痕形成。视网膜和脉络膜血管系统的异常都会损害视网膜,是许多威胁视力的疾病的基础,这些疾病包括年龄相关性黄斑变性、糖尿病性视网膜病变、早产儿视网膜病变、任何类型的视网膜病变、新生血管性青光眼、黄斑水肿和并发症例如玻璃体黄斑牵引或有症状的玻璃体黄斑粘连(引起视网膜上玻璃体的牵引)、视网膜和玻璃体出血、视网膜脱离、黄斑裂孔等。视网膜损伤也可能是玻璃体黄斑牵引或(有症状的)玻璃体黄斑粘连的结果,或者是神经退行性攻击的结果(见后续)。

[0071] 年龄相关性黄斑变性(AMD)分为干性AMD(非新生血管性)和湿性AMD(新生血管性)。湿性AMD的特征在于脉络膜新血管生成(CNV)。在发达国家,AMD是严重且不可逆转的中

心视力丧失,并最终导致失明的主要原因之一。CNV通常通过荧光血管造影术(由超荧光激增和/或泄漏血管证明)或通过光学相干断层扫描(OCT)来评估,但患者的视敏度确定是最相关的临床参数。CNV还可以伴有病理性近视或眼组织胞浆菌病综合征。在AMD期间发生视网膜下纤维化(Friedlander, J Clin Invest 2007, 117:576-586)。

[0072] 存在几种治疗AMD,特别是湿性AMD的方法:

[0073] -光动力疗法(PDT):使用可以全身给药(例如静脉内)的光敏药物(例如维替泊芬),然后用非热光激活以实现动脉硬化的新血管的选择性血管闭塞,即选择性破坏CNV。

[0074] -抗炎剂:类固醇、皮质类固醇或其他免疫抑制剂,例如玻璃体内,眼球下或结膜下地塞米松、曲安奈德(TAAC)或氟轻松(fluocinolone acetonide);通常这些药剂还具有抗血管生成、抗纤维化和抗渗透(抗水肿)作用。持续释放的类固醇植入物(例如Ozurdex[®], Iluvien[®])提供优于例如多次玻璃体内注射。其他抗炎剂可以靶向细胞因子,例如肿瘤坏死因子 α (TNF α),例如英夫利昔单抗(Olson et al., Arch Ophthalmol 2007, 125:1221-1224)。补体系统的抑制是获得抗炎作用的另一途径。补体系统抑制剂包括补体因子C5抑制适配体avacincaptad pegol sodium(Zimura[®]);补体因子C3的抑制剂,POT-4是环肽补体抑制素的衍生物(Querques et al., Ophthalmic Res 2015, 53:194-199)。

[0075] -抗VEGF剂:贝伐单抗(未被临床试验认可)、雷珠单抗、阿柏西普、哌加他尼钠;或其他如DARPin为基础的abicipar pegol、单链抗VEGF抗体brolucizumab、VEGF-Trap变体康伯西普(Barakat&Dugel, Retinal Physician 2015, 12:26-36; Querques et al., Ophthalmic Res 2015, 53:194-199);或者例如VEGF-Trap变体VEGF-Grab(Lee et al., Mol Cancer Ther 2015, 14:470-479)。帕唑帕尼,一种阻断VEGFR1-、VEGFR2-、VEGFR3-、PDGFR α 和PDGFR β -受体的多酪氨酸激酶抑制剂同样在评估中(Querques et al., Ophthalmic Res 2015, 53:194-199)。

[0076] -热激光烧蚀,激光光凝术

[0077] -电离辐射/放射疗法(Finger et al., Ophthalmology 1996, 103:878-889)

[0078] -抗VEGF剂以外的抗血管生成剂:例如抑制血小板衍生生长因子(PDGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、转化生长因子 β (TGF β)的药剂;或者例如角鲨胺(Barakat&Dugel, Retinal Physician 2015, 12:26-36)。临床评价的抗PDGF-B试剂包括聚乙二醇化的适配体pegpleranib sodium(Ferista[®])(Querques et al., Ophthalmic Res 2015, 53:194-199)。

[0079] -抗纤维化剂:例如抑制结缔组织生长因子(CTGF)的药剂;5-氟尿嘧啶(5-FU)

[0080] -联合疗法:PDT+抗炎剂;PDT+抗VEGF剂;PDT+抗炎剂+抗VEGF剂(Yip et al., Br J Ophthalmol 2009, 93:754-758; Shah et al., Retina 2009, 29:133-148);抗VEGF剂+抗PDGF剂(在Spaide, Retina 2009, 29:S5-S7中提到)

[0081] -玻璃体手术(通过平坦部玻璃体切除术手术切除凹下CNV;用于中心凹下CNV的凹的手术移位;然后可以用标准激光光凝术或PDT治疗所导致的近中心凹或中心凹外CNV)。

[0082] 糖尿病性视网膜病变(DR)与AMD同样分为两个阶段。早期阶段是非新生血管性的,被称为非增殖性糖尿病性视网膜病变(NPDR),其本身细分为轻度、中度和重度NPDR。晚期是新生血管性的,称为增殖性糖尿病性视网膜病变(PDR)。一旦黄斑受到影响(“糖尿病性黄斑病变”),可能会发生(晚期)DR引起的视力丧失。糖尿病性黄斑水肿(DME)可以在任何DR阶段

发生,但更频繁地与晚期DR相关并且其特征在于血管渗漏导致黄斑肿胀。糖尿病性黄斑病变的进一步分类包括其是中枢性(影响中央凹)或非中心性(不影响中央凹);局灶性或弥漫性(取决于水肿程度);缺血性或非缺血性;和牵引性或非牵引性。多因素DR的一个重要方面是神经退行性变。(Stitt et al.,Prog Retin Eye Res 2016,51:156-186)。在DR期间发生视网膜前纤维化(Friedlander,J Clin Invest 2007,117:576-586)。

[0083] 存在几种治疗DR的方法(Stitt et al.,Prog Retin Eye Res 2016,51:156-186; Park&Roh,J Diabet Res 2016,article ID 1753584):

[0084] -一般性控制糖尿病(高血糖、血脂异常、高血压、吸烟)

[0085] -发生DME时:激光光凝术(局灶性或网格激光治疗,或更新的概念,如亚阈值二极管微脉冲激光光凝(SDM)、视网膜恢复治疗(2RT)和选择性视网膜治疗(SRT))、抗VEGF药物和皮质类固醇(例如曲安奈德,地塞米松,氟轻松)或非甾体抗炎药(NSAID),或这些中任何一种的组合。有关抗VEGF和抗炎剂的更详细信息,另请参阅本文有关AMD的部分。

[0086] -当PDR发生时:泛视网膜激光光凝;玻璃体手术(玻璃体切除术);抗VEGF剂或类固醇阻止进一步进展。

[0087] 任何治疗的目的是稳定患者的视敏度(即,以防止视力进一步恶化),但理想地还为了改善患者的视力(VA),这与患者在治疗开始时的视敏度相比较。用于确定VA的不同方法通过例如引入Vanden Bosch和Wall(Eye 1997,11:411-417)和VA测试的计算机化方法讨论(例如Beck等,Am J Ophthalmol 2003,135:194-205)。

[0088] 因此,本发明还涉及单特异性胎盘生长因子(P1GF)拮抗剂,其用于维持或改善具有视网膜受损的眼睛的受试者的视敏度。

[0089] 视网膜神经节细胞(RGC)和神经胶质细胞易受代谢应激条件的影响。这些细胞的变性发生在眼病变中,例如糖尿病性视网膜病(DR)、年龄相关性黄斑变性(AMD)和青光眼。导致细胞死亡/凋亡的因素包括晚期糖基化终产物(AGEs)、晚期脂氧化终产物(ALE)、自由基物质、高眼压(IOP),缺氧(Schmidt et al.,Curr Neuropharmacol 2008,6:164-178; Barber et al.,Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 2003,27:283-290)。

[0090] 已知许多AGE抑制的化合物,包括氨基胍(及其衍生物)、吡哆胺、2,3-二氨基吩嗪(2,3DAP)、噻唑烷衍生物(例如OPB-9195)、肌肽、替尼西坦、硫胺素、苯磷硫胺、“Lalezari-Rahbar”(LR)化合物和依达拉奉的衍生物(综述于Nagai et al.,Diabetes 2012,61:549-559;参见例如该参考文献中的表1和图2)。其他AGE抑制剂包括血管紧张素转化酶(ACE)的抑制剂,例如,雷米普利、贝那普利、替莫普利、AVE8048;血管紧张素受体阻滞剂(ARB),例如洛沙坦、缬沙坦、奥美沙坦、R147176;和抗高血压药,例如胍苯哒嗪(综述于Nagai et al.,Diabetes 2012,61:549-559;参见例如该参考文献中的表1)。

[0091] 进一步已知的是许多AGE阻断的化合物,包括N-苯甲酰噻唑溴化物,及其衍生物,称为ALT-711或alagebrium,和吡啶类似物TRC4186和TRC4149(综述于Nagai et al.,Diabetes 2012,61:549-559;参见例如该参考文献中的表1和图3)。

[0092] 据信大多数AGE抑制剂也可能是ALE抑制剂(Baynes&Thorpe,Free Radic Biol Med 2000,28:1708-1716)。ALE抑制剂进一步包括能够中和由脂质过氧化产生的ALE前体的化合物,例如,胍和胍衍生物(例如胍苯哒嗪、二胍屈嗪、氨基胍、OPB-9195)、维生素B6和维生素B6衍生物(例如吡哆胺、吡哆醛异烟胍)。氨基酸衍生物如肌肽、组氨酰胍、N-乙酰半胱

氨酸和S-腺苷甲硫氨酸也被认为是ALE抑制剂。进一步的ALE抑制剂包括ACE抑制剂(例如,帕特罗普利、依那普利、福辛普利)、ARB抑制剂(例如洛沙坦、坎地沙坦)和抗氧化剂。Negre-Salvayre等综述了上述ALE抑制剂。(Br J Pharmacol 2008,153:6-20)。

[0093] 旨在减少细胞凋亡的化合物(抗凋亡剂)包括碳酸酐酶阻断剂(例如多佐胺(Schmidt et al.,Br J Ophthalmol 1998,82:758-762))。另一种碳酸酐酶阻断剂,即乙酰唑胺,被公开用于减轻视网膜色素变性患者以及糖尿病性黄斑水肿中的囊样黄斑水肿(Giusti et al.,Int Ophthalmol 2002,24:79-88)。

[0094] 在代谢应激期间释放的兴奋性氨基酸谷氨酸通过与N-甲基-D-天冬氨酸受体(NMDA-受体)结合而有助于RGC死亡的开始,进而导致细胞内钙的过量水平。已知NMDA受体的阻断剂保护RGCs且包括MK-801(地佐环平;5-甲基-10,11-二氢-5H-二苯并环庚-5,10-亚氨基马来酸)(例如Weber et al.,Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 1995,233:360-365)、美金刚(例如Vorwerk et al.,Invest Ophthalmol Vis Sci 1996,37:1618-1624)、右美沙芬(Yoon&Marmor,Arch Ophthalmol 1989,107:409-411)、氨基-膦酰戊酸(DeVries&Schwartz,Nature 1999,397:157-160)和氯胺酮(Sleigh et al.Trends Anaesthesia Critical Care 2014,4:76-81)。钙拮抗剂如尼莫地平也保护RGCs(例如Grosskreutz et al.,Curr Eye Res 1999,18:363-367)。

[0095] 至少有2种其他非NMDA兴奋性氨基酸受体广泛存在于视网膜中,并可能参与光感受器或双极细胞与神经节细胞之间的信号传递:红藻氨酸受体和2-氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸(AMPA)受体(DeVries&Schwartz,Nature 1999,397:157-160)。这些非NMDA兴奋性氨基酸受体的抑制剂,例如,顺式-2-3-哌啶二羧酸(顺式-PDA)发挥视网膜神经保护作用(Weber et al.,Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 1995,233:360-365)。其他红藻氨酸和AMPA受体抑制剂包括6-氰基-7-硝基喹啉啉-2,3-二酮(CNQX),且选择性AMPA受体拮抗剂的实例是2,3-苯二氮化合物GYKI52466和GYKI53655(Paternain et al.,Neuron 1995,14:185-189)。

[0096] NMDA-和非NMDA-受体拮抗剂的组合可以增加对视网膜神经退行性变的保护作用(Mosinger et al.,Exp Neurol 1991,113:10-17)。

[0097] 其他神经保护因子包括胰岛素、神经保护素D1、脑源性神经营养因子(BDNF)、胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)、睫状神经营养因子(CNTF)、神经生长因子(NGF)、肾上腺髓质素(AM)、色素上皮-衍生因子(PEDF)、生长抑素(SST)、间质视黄醇结合蛋白(IRBP)(Simo&Hernandez,Trends Endocrinol Metabol 2014,25:23-33)。

[0098] 鉴于它们的作用,任何上述示例化合物(非详尽列表)能够在一定程度上保护神经元细胞,特别是视网膜神经细胞,在一定程度上,因此在当前上下文中的整个组被定义为神经保护化合物,特别是视网膜神经保护化合物。

[0099] 如已经指出的,本发明涉及单特异性胎盘生长因子(P1GF)拮抗剂用于在受试者中治疗、预防或延迟眼后部纤维化的进展。或者,单特异性胎盘生长因子(P1GF)拮抗剂用于在受试者中治疗、预防或延迟眼后部纤维化的进展且不会诱导眼后部神经退行性变。作为进一步实施方案,用于上述用途的单特异性胎盘生长因子(P1GF)拮抗剂设想进一步治疗、预防或延迟眼后部炎症和/或眼后部新血管生成和/或血管渗漏的进展。

[0100] 本发明还涉及单特异性胎盘生长因子(P1GF)拮抗剂用于维持或改善受试者的视

网膜受损的眼睛的视敏度。

[0101] 很明显,在上文中,单独的单特异性胎盘生长因子(P1GF)拮抗剂可以给药于眼睛,即不给药不同于单特异性P1GF拮抗剂的另一种化合物。

[0102] 或者,可以在洗去先前给药于眼睛的血管内皮生长因子(VEGF)拮抗剂或VEGF-受体(VEGFR)拮抗剂后,将单特异性胎盘生长因子(P1GF)拮抗剂给药于同一只眼睛。

[0103] 在进一步替代方案中,在洗去先前给药于眼睛的单特异性胎盘生长因子(P1GF)拮抗剂后,将血管内皮生长因子(VEGF)拮抗剂或VEGF-受体(VEGFR)拮抗剂给药于同一只眼睛。

[0104] 设想了进一步替代方案,包括单特异性胎盘生长因子(P1GF)拮抗剂和第二活性化合物的联合给药。照此,在任何上述用途中,单特异性胎盘生长因子(P1GF)拮抗剂可以与第二活性化合物联合给药于眼睛,其中所述第二活性化合物不同于血管内皮生长因子(VEGF)拮抗剂且不同于VEGF受体(VEGFR)拮抗剂。

[0105] 或者,将单特异性胎盘生长因子(P1GF)拮抗剂与第二活性化合物联合给药于眼睛,其中所述第二活性化合物不同于血管内皮生长因子(VEGF)拮抗剂且不同于VEGF-受体(VEGFR)拮抗剂;并且其中所述给药是在洗去先前给药于同一只眼睛的血管内皮生长因子(VEGF)拮抗剂或VEGF-受体(VEGFR)拮抗剂之后。

[0106] 在进一步替代方案中,在洗去先前给药于眼睛的单特异性胎盘生长因子(P1GF)拮抗剂和第二种活性化合物后,将血管内皮生长因子(VEGF)拮抗剂或VEGF-受体(VEGFR)拮抗剂给药于同一只眼睛,其中所述第二种活性化合物不同于血管内皮生长因子(VEGF)拮抗剂,且不同于VEGF-受体(VEGFR)拮抗剂。

[0107] 当单特异性胎盘生长因子(P1GF)拮抗剂与第二种活性化合物联用时,两者都可以各自以单独的组合物中给药于眼睛(每种都在相同或不同的药学上可接受的制剂中)。第二活性剂可以在单特异性胎盘生长因子(P1GF)拮抗剂给药之前,同时或之后给药。或者,两者都可以以单一组合物(在相同的药学上可接受的制剂中)联合给药于眼睛。

[0108] 如上所述的P1GF拮抗剂(有或没有另外的第二活性物质)和VEGF-或VEGFR-拮抗剂的组合可以采用许多形式。例如,一方面给药P1GF拮抗剂和另一方面给药VEGF-或VEGFR-拮抗剂能够交替给药(从第一次给药任一个开始)。或者,分别首先给药P1GF-拮抗剂或VEGF-或VEGFR-拮抗剂,然后分别进行多次后续给药VEGF-或VEGFR-拮抗剂或P1GF拮抗剂。在进一步替代方案中,分别可以通过多次后续给药VEGF-或VEGFR-拮抗剂,或者P1GF拮抗剂来分离P1GF-拮抗剂,或者VEGF-或VEGFR-拮抗剂的第一次和第二次给药。

[0109] 本文中的第二活性化合物可以是一种活性化合物或一种以上活性化合物的组合。特别地,但不限于,这种第二活性化合物可以是抗炎化合物、抗血管生成化合物、抗纤维化化合物、AGE抑制化合物、ALE抑制化合物、AGE阻断化合物、碳酸酐酶抑制剂、NMDA受体拮抗剂、红藻氨酸受体拮抗剂、AMPA受体拮抗剂、神经保护剂、控制眼内压的药剂、抗凋亡剂、抗病毒化合物、抗生素化合物、抗真菌化合物、抗组胺药、抗凝血剂、溶栓化合物、抗有丝分裂剂、麻醉剂、和诱导瞳孔散大的药剂、诱发睫状肌麻痹的药剂、诱导玻璃体后脱离(完全或不完全)的药剂、诱导玻璃体液化的药剂、整合素抑制剂、抗水肿剂。

[0110] 鉴于现有技术,如上所述的单特异性胎盘生长因子(P1GF)拮抗剂的任何应用自然可以与光动力疗法、激光光凝术、放射疗法或玻璃体手术相联用。

[0111] 如上所述的单特异性胎盘生长因子(PIGF)拮抗剂的任何用途可进一步表征为受试者的视敏度稳定或改善(参见用于解释例如转好(amelioration)=改善(improvement)的“治疗(treatment/treating)”)。

[0112] 任何上述内容也可以重新起草为治疗、预防或延迟受试者眼后部纤维化进展的方法。特别地,受试者是哺乳动物,更特别是人。

[0113] “给药”是指引起药剂(例如单特异性PIGF拮抗剂)或包含药剂(例如药物)的组合物与和所述药剂或组合物相联系的目标(细胞、组织、器官、体腔)之间的任何接触模式。药剂或组合物与对象之间的相互作用可以在药剂或组合物给药时立即或几乎立即开始,可以在延长的时间内发生(给药药剂或组合物立即或几乎立即开始),或者可相对于药剂或组合物的给药时间延迟。更具体地,“接触”引起向目标递送有效量的药剂、组合物或药物。

[0114] 术语“有效量”是指药剂(例如单特异性PIGF拮抗剂)或包含药剂(例如药物)的组合物的给药方案。有效量通常取决于接触或给药的方式并且需要调整。药剂、组合物或药物,更特别是其活性成分的有效量,是获得所需临床结果或治疗或预防效果,而不会引起显著或不必要的毒性作用所需的量。为了获得或维持有效量,药剂、组合物或药物可以单剂量或多剂量给药。有效量可以进一步根据治疗病症的严重程度或需要预防或治疗的病症的预期严重程度而变化;这可能取决于患者的整体健康状况和身体状况,且通常需要主治医师或医师的评估来确定有效量。有效量可以通过不同类型的接触或给药的组合进一步获得。在本发明的上下文中,有效量可以更特别地通过局部滴眼剂的给药、通过注射到眼前房给药、通过结膜下注射给药、通过玻璃体内注射给药、全身给药、持续缓释或缓释给药(例如可再填充的眼部植入物、具有表达该试剂的重组细胞的容器、载有该试剂的易蚀凝胶植入物、基因治疗方式)中的一种或多种来获得。通过眼部注射给药单特异性PIGF拮抗剂(有或没有给药第二活性剂)通常保持最小,即重复注射的频率保持最小并且可以根据眼疾或紊乱,或其任何单一症状的进一步进程调整。

[0115] 在当前上下文中的洗出时期是给药于眼睛的药剂从眼睛中洗掉的时间,例如,由于从眼睛清除(例如进入体循环或进入泪液)或由于眼内降解或眼内中和。在实际中,洗出时期,即洗出小时数或天数,是不进行治疗的时间,或者活性物质的浓度降低到或低于有效浓度的时间。或者,洗出时期是两次递送治疗剂之间的时间段,治疗剂可以是相同的或可以是不同的。洗出时期通常取决于药剂的性质和剂量,即通过其药代动力学性质,其在潜在新药的(预)临床开发期间确定。特别是在通过注射给药眼部药物的情况下,洗出时期优选足够长以避免高频率的重复注射。

[0116] “用于控制眼内压的药剂”是稳定或降低眼内压的药剂。这样的药物包括肾上腺素能阻断剂(β 阻滞剂或交感神经阻滞药,如倍他洛尔、卡替洛尔、左布诺洛尔、美替洛尔(metipanolol)和噻吗洛尔)、肾上腺素刺激剂(拟交感神经药如安普尼定(aproclonidine)、肾上腺素、羟苯胺、去氧肾上腺素、萘甲唑啉和四氢唑啉(tetrahydrozoline))、碳酸酐酶抑制剂(如全身性乙酰唑胺和外用布林佐胺和多佐胺)、缩瞳剂(胆碱能刺激剂、拟副交感神经药如卡巴胆碱和毛果芸香碱)、渗透剂(如甘油和甘露醇)、前列腺素和前列腺素类似物(前列腺酰胺、比马前列素、乌诺前列酮异丙酯、曲伏前列素、拉坦前列素、天然前列腺素、前列腺素F₂ α 和FP前列腺素类受体激动剂)。当这些药物不是有效的(或不再有效)时候,青光眼滤过手术是一种可行的治疗方法。

[0117] “抗凝血剂”包括水蛭素、肝素、香豆素、低分子量肝素、凝血酶抑制剂、血小板抑制剂、血小板聚集抑制剂、凝血因子抑制剂、抗纤维蛋白抗体和因子VIII抑制剂(如WO 01/04269和WO 2005/016455中所描述的那些)。

[0118] “血栓溶解剂”包括尿激酶、链激酶、组织型纤溶酶原激活物(tPA)、尿激酶型纤溶酶原激活物(uPA)和葡萄球菌激酶或它们的任何变体或衍生物,例如APSAC(茴香酰化纤溶酶原链激酶激活剂复合物)、阿替普酶、瑞替普酶、替奈普酶和scuPA(单链uPA)、纤溶酶或它们的任何截短的变体,例如中型纤溶酶,迷你型纤溶酶, δ 纤溶酶和微型纤溶酶。

[0119] “抗炎剂”包括类固醇(例如泼尼松龙、甲基强的松龙、可的松、氢化可的松、泼尼松、曲安西龙、地塞米松)和非类固醇的抗炎药(NSAIDs;例如对乙酰氨基酚、布洛芬、阿司匹林),还可参见上文所述的药剂。

[0120] “抗病毒剂”包括三氟尿苷、阿糖腺苷、阿昔洛韦、伐昔洛韦、泛昔洛韦和多尿苷。

[0121] “抗细菌剂”或抗生素包括氨基青霉素、青霉素、四环素、土霉素、弗式菌丝素、加替沙星、庆大霉素、妥布霉素、杆菌肽、新霉素和多粘菌素。

[0122] “抗霉菌/抑制真菌/抗真菌剂”包括氟康唑、两性霉素、克霉唑、益康唑、伊曲康唑、咪康唑、5-氟胞嘧啶、酮康唑和游霉素。

[0123] “抗血管生成剂”包括如上描述的药剂以及小-甲氧苄基-tRNA合成酶(TrpRS)(Wakasugi et al., Proc Natl Acad Sci USA 2002, 99:173-177)、乙酸阿奈可他、考步他汀A4前药、AdPEDF(能够表达色素上皮衍生因子的腺病毒载体)、TGF- β 抑制剂、西罗莫司(雷帕霉素)、内皮抑素和可能的整联蛋白抑制剂(US 9,018,352)。

[0124] “抗有丝分裂剂”包括丝裂霉素C和5-氟尿嘧啶。

[0125] “抗组胺药”包括富马酸酮替芬和马来酸吡嗪。

[0126] “麻醉剂”包括苯佐卡因、丁巴卡因、二丁卡因、利多卡因、奥布卡因、普莫卡因、丙美卡因、丙氧间卡因、丁卡因和阿美索卡因。

[0127] 可以与单特异性PIGF拮抗剂联合使用的其他辅助剂或药物包括东莨菪碱、阿托品或托吡卡胺,以诱导瞳孔散大(瞳孔扩张)和/或睫状肌麻痹(眼睛聚焦肌肉麻痹)。

[0128] “抗水肿剂”包括血浆激肽释放酶抑制剂(例如艾卡拉肽;和KVD001,用于治疗DME处于I期,KalVista Pharmaceuticals;参见WO2014/006414)和一些抗炎剂(参见上文)。

[0129] 然而,玻璃体液化似乎是诱导玻璃体后脱离(PVD)的先决条件,液化本身不会导致PVD,其是通过玻璃体内给药透明质酸酶建立的。该蛋白酶能够诱导玻璃体液化,但不能使玻璃体后与内界膜(PVD)分离(Sebag et al., Trans Am Ophthalmol Soc 2005, 103:473-494; Williams, Ophthalmology 2008, 108:1902-1905; Lopez-Lopez et al., Curr Diabetes Rev 2009, 5:57-62)。已经证明,联合眼部注射软骨素酶ABC和MMP-3可以导致兔眼中的PVD。然而,这项研究还表明,玻璃体内注射软骨素酶ABC和MMP-3导致所有治疗的眼睛液化(100%),而只有62.5%注射眼睛显示PVD,表明37.5%的实验眼只显示玻璃体液化而没有PVD(Meng&Zeng, Zhonghua Yan Ke Za Zhi 2004, 40:625-631)。

[0130] 已经分析了几种酶,包括纤溶酶、胶原酶、透明质酸酶、分散酶、软骨素酶、尿激酶和纳豆激酶,用于诱导药理学玻璃体溶解的潜力。已经证明纤溶酶及其截短形式的微纤溶酶在动物模型以及死后人眼中具有诱导PVD的能力(US5,304,118; GB2393121; WO2004/052228; Stalmans et al., New Engl J Med 2012, 367:606-615)。Ocriplasmin (Jetrea®),

ThromboGenics NV) 确实是第一种可用于非手术治疗局灶症状性玻璃体黄斑粘连 (sVMA) 的被批准的药物。诱导PVD的其他非酶促药剂包括尿素和尿素衍生物(例如WO 00/51620) 和整合蛋白抑制剂(例如US 9,018,352)。

[0131] 玻璃体液是一种占据了晶状体和视网膜之间的空间的透明凝胶,其有助于眼睛保持圆形。玻璃体凝胶主要由水分子和仅1%的大分子组成,如胶原蛋白、透明质酸和糖蛋白。这些大分子形成网络并建立稳定的凝胶状结构。玻璃体-视网膜界面处的正常粘附是由玻璃体后皮质和视网膜的内界膜之间的相互作用介导 (Sebag et al.2005,Trans Am Ophthalmol Soc 103:473-494)。内界膜主要由胶原蛋白、纤连蛋白和层粘连蛋白组成。由于内界膜和玻璃体凝胶/玻璃体后皮质之间的异常相互作用,玻璃体视网膜疾病包括眼病,其可导致视力丧失。这种异常相互作用通常诱导视网膜损伤,进而引起眼后部纤维化反应。玻璃体-视网膜界面的异常可导致永久性视力丧失并导致症状或疾病,如部分玻璃体后脱离、视网膜撕裂、视网膜脱离、症状性玻璃体粘连/牵引、黄斑裂孔、特发性和继发性视网膜前膜、增生性玻璃体膜-视网膜病变、增生性糖尿病视网膜病变、糖尿病性黄斑水肿、黄斑囊样黄斑水肿和年龄相关性黄斑变性。视网膜上玻璃体的异常机械牵引被认为是许多眼 (eye/ocular)/视网膜疾病和黄斑病的潜在因素 (Skeie&Mahajan,PLOS One 2013,8:e82140;Shao&Wei,Chin Med J 2014,127:1566-1571)。根据视网膜上玻璃体的牵引部位,可能会出现不同的效果。拉动血管可能导致视网膜和玻璃体出血,并可能刺激视网膜新生血管形成。黄斑区域的牵引可能导致玻璃体黄斑牵引综合征、黄斑皱折、黄斑裂孔和/或糖尿病性黄斑水肿。如果牵引部位在外周,则可能发生视网膜撕裂和/或视网膜脱离。如果视盘受到玻璃体、玻璃体-乳头牵引综合征的异常牵引和视盘新血管生成加重的影响,可能导致增殖性糖尿病性玻璃体视网膜病变和/或视网膜中央静脉阻塞 (Sebag,Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol 2004,242:690-698)。

[0132] 症状性玻璃体黄斑粘连 (sVMA) 是一种眼部疾病,其中玻璃体凝胶对视网膜具有异常强的粘附力。随着时间的推移,凝胶倾向于向前拉,这可能导致视网膜扭曲,导致视觉缺陷(即,变形)。在更晚期阶段,sVMA(有时称为玻璃体黄斑牵引,VMT)甚至可引起局灶性视网膜撕裂或黄斑裂孔,这可导致失明。典型的与VMT相关的黄斑裂孔是视网膜在其全厚度上不被中断(与全厚度黄斑裂孔相反,其中所有视网膜层都被中断)。可以通过称为玻璃体切除术的外科手术来治疗玻璃体牵引。手术玻璃体切除术是sVMA的标准治疗方法,但这种缓解玻璃体牵拉的机械手术仍然很危险,并且具有损伤视网膜的高风险。由于这个原因,已经测试了几种蛋白酶作为玻璃体切除术的辅助或甚至替代玻璃体切除术和/或用于诱导药理学玻璃体溶解或药理学玻璃体后脱离(PVD)。分子疗法具有改善视觉结果和克服手术/机械玻璃体切除术相关风险的潜力。已经分析了几种酶如纤溶酶、胶原酶、透明质酸酶、分散酶、软骨素酶、尿激酶和纳豆激酶诱导药理学玻璃体溶解的潜力。如上所述,ocriplasmin(纤溶酶的截短变体)最近已被登记,并且是目前唯一能够诱导PVD并且能够促进黄斑裂孔闭合的可用产品。VMA的可能同义词是异常PVD,定义为与黄斑区域中玻璃体持续附着视网膜同时发生的部分PVD。附着物具有异常强度并且可导致视网膜变形。部分PVD更特别地发生在周围区域。当与任何症状和/或疾病相关时,VMA变为症状性VMA(sVMA)。可能分别在小于或等于1500 μ m或超过1500 μ m的距离处发生局灶或宽(s)VMA。关于定义和分类的更多细节可以在Duker等的文章中找到(Ophthalmology 2013,120:2611-2619)。用于确定(部分完全)PVD或

(s) VMA的存在的当前标准技术是光学相干断层扫描(OCT)。

[0133] 玻璃体切除术、玻璃体溶解术、玻璃体液化和/或PVD诱导对于许多眼部情况是有益的,例如玻璃体漂浮物(运动性碎片/玻璃体沉积物在通常透明的玻璃体液中可能损害视力)、视网膜脱离(致盲状态,这可能是由于例如玻璃体牵引导致的)、黄斑皱褶(黄斑上的瘢痕组织;黄斑是灵敏,中央视力所必需的;黄斑褶皱也称为视网膜前膜(epi-or preretinal membrane)、玻璃纸黄斑病变、视网膜皱纹、表面皱纹视网膜病变、黄斑前纤维化或内界膜疾病)、糖尿病性视网膜病变(增生性或非增生性),其可导致视网膜玻璃体出血和/或纤维性瘢痕组织形成(可能导致视网膜脱离)、黄斑裂孔(由玻璃体牵引,损伤或创伤事件造成的盲点的黄斑中裂孔;可以是全厚度或不是)、玻璃体出血(由糖尿病视网膜病变、损伤、视网膜脱离或视网膜撕裂、蛛网膜下腔出血(Terson综合征)或阻塞血管引起)、视网膜下出血(包裹玻璃体的玻璃体膜下出血)、黄斑水肿(眼睛黄斑或黄斑下的液体和/或蛋白质沉积)和黄斑变性(从玻璃疣的形成开始;以干湿形式出现;如果与年龄相关的年龄相关性黄斑变性相关)。

[0134] 全厚度黄斑裂孔分为小(小于或等于250 μm)、中(超过250 μm 但小于或等于400 μm)或大(超过400 μm) (Duker et al., Ophthalmology 2013,120:2611-2619)。

[0135] 年龄相关性黄斑变性(AMD)和糖尿病视网膜病变(DR)患者可能经受额外的玻璃体视网膜并发症,例如牵引型部分脱离玻璃体、视网膜前膜、牵引型视网膜脱离或黄斑裂孔,PVD或sVMA消退(resolution)或VMT消退可能对其有益的。AMD和DR都是多因素眼病,且缺血性损伤在其病理生理学中起主要作用。手术和酶促PVD(或sVMA消退或VMT消退)似乎对AMD和DR中的缺氧诱导的并发症具有保护作用,因为PVD与增加的玻璃体和视网膜氧合作用相关。此外,已经描述了异常强烈附着的玻璃体和/或玻璃体黄斑牵引与进展为渗出性AMD和增殖性DR的风险增加相关(Williams et al., Ophthalmology 2001,108:1902-1905; Haller et al., Ophthalmology 2010,117:1087-1093; Roller et al., Ophthalmology 2010,117:1381-1386)。此外,玻璃体视网膜牵拉是DR视力缺陷的主要病理原因,因为其可以诱导糖尿病性黄斑水肿。确实已经观察到通过PVD释放在视网膜上机械牵引可以导致糖尿病性黄斑水肿的减少(Williams et al., Ophthalmology 2001,108:1902-1905; Haller et al., Ophthalmology 2010,117:1087-1093)。

[0136] 科学文献表明,外科玻璃体切除术在治疗过多的眼部疾病和病症方面是成功的。以下包括示例性参考文献以支持玻璃体切除术的广泛治疗适用性,包括药理学玻璃体切除术。Öndes等(Jpn J Ophthalmol 2000,44:91-93)讨论了年龄相关性黄斑变性(AMD)的眼睛中PVD的频率比正常眼睛中低,并且提出了玻璃体视网膜粘附(即没有PVD)的对AMD产生负面影响的机制。Stefansson等(Invest Ophthalmol Vis Sci 1990,31:284-289)公开了通过玻璃体切除术阻止糖尿病性视网膜新血管生成的可能机制,即预防缺氧。缺氧是已知的诱导代偿性新血管生成作为静脉阻塞(视网膜或其他)并发症的因素。Stefansson等1990年实验性诱导视网膜静脉阻塞,并注意到视网膜氧缺乏在玻璃体切除的眼中不太严重。预防视网膜静脉阻塞的新血管生成并发症清楚地是一种治疗方法。此外,新形成的视网膜血管通常是脆性的,因此易于闭塞或破裂。由例如Snip等公开通过玻璃体切除术联合抗生素成功治疗眼内炎(Am J Ophthalmol 1976,82:699-704)。Tachi等(Semin Ophthalmol 1998,13:20-30)观察到自发性玻璃体脱离后或玻璃体切除术后糖尿病性黄斑水肿的改善。

据报道,控制对激光治疗无反应的糖尿病性黄斑水肿也可从玻璃体溶解中受益 (Lövestam-Adrian&Larsson, *Int Ophthalmol* 2005,26:21-26)。在玻璃体切除术后获得了黄斑囊样水肿的消退以及视敏度的改善由Federman等报道 (*Ophthalmology* 1980,87:622-628)。Vallat (*Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1986,224:238-239) 描述了通过玻璃体切除术成功地手术治疗从玻璃体牵引引起的黄斑裂孔的视网膜脱离。玻璃体切除术对增生性糖尿病性视网膜病变的影响在例如Federman等 (*Ophthalmology* 1979,86:276-282) 中讨论,这种影响使得在玻璃体切除术后随时间观察到疾病的连续消退。Li等对药理学玻璃体溶解作出了类似的结论 (*Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013,54:4964-4970)。Hong等 (*Am J Ophthalmol* 2001,131:133-134) 公开了玻璃体切除术在治疗视觉上显著的玻璃体混浊中的有用性,所述玻璃体混浊可能是视网膜色素变性的并发症。

[0137] 提倡单独药理学玻璃体溶解或作为外科玻璃体切除术的辅助,来解决异常PVD,玻璃体牵引或VMT的不良影响,甚至在眼疾的早期,例如预防眼病的进展 (Sebag, *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 2004,242:690-698)。

[0138] 在本发明的上下文中,“药学上可接受的制剂”更具体地是“眼科学上可接受的制剂”。制剂通常是包含与待配制的一种或多种活性成分相容的载体,稀释剂或辅助剂的组合物,整个制剂与预期组织或器官等中的预期用途相容。药学上可接受的制剂的实例以及制备其的方法可以在例如Remington's *Pharmaceutical Sciences* (例如20th Edition; Lippincott, Williams&Wilkins, 2000) 或任何Pharmacopeia手册 (例如美国药典、欧洲药典或国际药典) 中找到。

[0139] “润滑剂”包括丙烯甘油、甘油、羧甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、大豆卵磷脂、聚乙烯醇、白凡士林、矿物油、聚维酮、羧乙烯聚合物980、聚山梨醇酯80、葡聚糖70。

[0140] 实施例

[0141] 1、引言

[0142] 本研究调查了通过抗PIGF抗体 (小鼠PLGF抑制性抗体5D11D4或人PIGF抑制性抗体16D3, ThromboGenics, Leuven, 比利时) 对小鼠CNV模型中一种或多种新血管生成、炎症和胶原沉积的PIGF抑制的剂量-效应效力;并将其与等摩尔浓度的抗VEGF-R2抗体 (DC101, 由杂交瘤细胞系ATCC HB-11534产生)、阿柏西普 (Eylea[®], Bayer)、曲安奈德 (TAAC; 康宁克通 (Kenacort)[®], Bristol-Myers Squibb) 的效果和抗鼠VEGF抗体B20 (Liang et al. 2006, *J Biol Chem* 281:951-961) 进行比较。TAAC用作炎症和纤维化的参考。基于Takata等 (Takata et al., *Sci Rep* 2015, 5:9898) 描述的小鼠CNV模型中的活性,选择单次注射1 μ L TAAC的治疗方案。在未实验的小鼠和糖尿病小鼠中研究了抗PIGF抗体5D11D4和抗VEGF-R2抗体DC101对视网膜神经节细胞存活的影响。

[0143] 当在下文中提到例如或与抗PIGF (或5D11D4或16D3) 或与抗VEGFR2 (或DC101) 注射,这应理解为与上述抗PIGF抗体5D11D4或抗PIGF抗体16D3, 或与上述抗VEGF-R2抗体DC101注射。同样,例如用抗-P1GF、5D11D4或16D3抗体治疗应理解为用上述抗-P1GF抗体5D11D4或用上述抗-P1GF抗体16D3治疗。

[0144] 2、材料和方法

[0145] 根据2010/63/EU指令,所有实验动物程序均由KU Leuven的机构动物护理和研究

咨询委员会批准。所有动物程序均根据ARVO眼科和视力研究中的动物使用声明进行。

[0146] 2.1、小鼠CNV模型

[0147] 通过腹膜内注射 (135 μ L) 盐酸氯胺酮 (Anesketin; 115mg/L) 和美托咪定 (Domitor; 1mg/mL) 的混合物麻醉小鼠 (C57BL/6J, 雄性, 8-10周龄) 以及用一滴眼药水 (50 μ L) 托吡卡胺 (Tropicol TM; 5mg/mL; Thea, Research Papers Clermont-Ferrand, France) 扩张其瞳孔。使用具有Gentleal GelTM润湿的手持盖玻片作为隐形眼镜的裂隙灯输送系统 (诺华, Vilvoorde, 比利时), 在一只眼睛中用绿色激光围绕光盘的9、12、3点钟位置提供三处激光烧伤。每个斑点的光斑尺寸为100 μ m, 激光持续时间为50毫秒, 功率为320mW。仅包括显示出泡沫产生的斑点, 其是布鲁赫膜破裂的迹象, 并且已知是引发新血管生成、炎症和纤维化所必需的斑点。最后, 腹腔注射300 μ L阿替美唑 (Antisedan; 5mg/mL) 以逆转美托咪定的作用以减少镇静时间。

[0148] 2.2、玻璃体内给药

[0149] 在激光作用后的不同时间点, 化合物通过玻璃体内给药 (IVT)。用盐酸氯胺酮/美托咪定的混合物麻醉动物, 并用一滴0.4%的奥布卡因 (Unicaïne; ThéaPharma) 处理眼睛。根据表1至3, 使用分析科学注射器 (SGE Analytic Science) 和末端直径为50-70 μ m的玻璃毛细管, 对一只眼进行玻璃体内注射 (1 μ L) 并通过UMP3I微量调节注射器和Micro4控制器 (均来自World Precision Instruments Inc., Hertfordshire, UK) 控制。最后, 腹膜内注射阿替美唑 (Antisedan) 以逆转美托咪定的作用以减少镇静时间。

[0150] 2.3、处理和组织学

[0151] 在处死当天, 通过颈脱位法处死小鼠, 将激光处理的眼睛去核并在1% (w/v) 多聚甲醛中固定过夜。为了分析不同化合物的体内功效, 从解剖的后段中除去视网膜。将包括视网膜色素上皮细胞 (RPE)、脉络膜和巩膜的这些后眼杯状体 (posterior eye cups) 储存在磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中。

[0152] 2.3.1、炎症的定量

[0153] 在激光作用后第5天, 使用用Tris缓冲盐水 (TBS) -Triton 0.3% (v/v) 稀释的大鼠抗小鼠CD45和F4/80抗体 (1/100; Pharmingen, Erembodegem, 比利时), 分别过夜染色的所有白细胞和巨噬细胞。第二天, 将组织与用TBS-Triton 0.3%稀释的兔抗大鼠生物素标记的抗体 (1/300; DakoCytomation A/S, Copenhagen, Denmark) 一起孵育2小时。通过使用在TBS-Triton 0.3%中的链霉抗生物素蛋白-Alexa-568 (1/200; Molecular Probes, Life Technologies, Eugene, OR, USA) 荧光染色2小时观察抗体结合。用Prolong Gold和4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI, Molecular Probes) 准备后眼杯状体的铺片 (flatmounts)。使用具有数码相机的显微镜获得图像。

[0154] 表1、研究设计

[0155]

处理			D5-炎症终点		D7-新血管生成 和渗漏终点		D30-纤维化终点	
组别	处理	剂量 /1 μ L	IVT 注射时间点	出 读	IVT 注射时间点	出 读	IVT 注射时间点	出 读
1	5D11 D4	3.1 μ g	D0	CD45 和 F4/80	D0	FIT C + FA	D0、D4、 D10 和 D20	Colla
2	5D11 D4	1.5 μ g	D0	CD45 和 F4/80	D0	FIT C +FA	D0、D4、 D10 和 D20	Colla
3	5D11 D4	0.77 μ g	D0	CD45 和 F4/80	D0	FIT C +FA	D0、D4、 D10 和 D20	Colla
4	IgG (1C8)	3.1 μ g	D0	CD45 和 F4/80	D0	FIT C +FA	D0、D4、 D10 和 D20	Colla
5	DC10 1	3.1 μ g	D0	CD45 和 F4/80	D0	FIT C +FA	D0、D4、 D10 和 D20	Colla
6	阿 柏 西 普	2.4 μ g	D0	CD45 和 F4/80	D0	FIT C +FA	D0、D4、 D10 和 D20	Colla
7	阿 柏	20 或	D0	CD45	D0	FIT	D0、D4、	Colla

[0156]

	西普	40 μg		和 F4/80		C +FA	D10 和 D20	
8	TAAC	40μg	D0	CD45 和 F4/80	/	/	D0、D4、 D10 和 D20	Colla
9	TAAC	4μg	D0	CD45 和 F4/80	/	/	D0、D4、 D10 和 D20	Colla
10	PBS	NA	D0	CD45 和 F4/80	/	/	D0、D4、 D10 和 D20	Colla
11	阿柏 西普 缓冲 液	NA	D0	CD45 和 F4/80	/	/	D0、D4、 D10 和 D20	Colla
12	TAAC 缓冲 液	NA	D0	CD45 和 F4/80	/	/	D0、D4、 D10 和 D20	Colla

[0157] IgG: 无关IgG抗体1C8; DC101: 鼠抗鼠VEGFR-2抗体; TAAC (康宁克通®): 曲安奈德; 5D11D4: 鼠抗鼠PIGF抗体; PBS: 磷酸盐缓冲盐水; IVT: 玻璃体内; Colla: 胶原蛋白1a; 阿柏西普: Eylea®; D0、D4、D5、D7、D10、D20、D30: 分别为第0天、第4天、第5天、第7天、第10天、第20天、第30天; FITC: 异硫氰酸荧光素共轭葡聚糖; FA: 荧光血管造影。

[0158] (AxioCam MrC5; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany), 放大倍数为20X。使用商业软件 (Axiovision; Zeiss, Oberkochen, Germany) 进行形态测定分析。通过计算CD45阳性面积作为总损伤的比例来确定炎症密度。

[0159] 2.3.2、新血管生成的定量

[0160] 在激光作用后第7天, 使用200μL结合有异硫氰酸荧光素 (FITC) 的葡聚糖 (50mg/mL, Mr 2×10⁶Da; Sigma-Aldrich, Diegem, 比利时) 进行球后灌注2分钟, 研究血管生成。用Prolong Gold和4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI, Molecular Probes) 准备后眼杯状体的铺片。使用具有数码相机的显微镜 (AxioCam MrC5; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) 以20的放大倍数获得图像。使用商业软件 (Axiovision; Zeiss, Oberkochen, Germany) 进行形态测定分析。通过计算FITC-葡聚糖阳性面积作为样品中总CNV损伤面积的比例来量化血管密度。在激光后第6天进行荧光素血管造影 (FA) 以研究血管渗漏。

[0161] 2.3.3、胶原沉积的定量

[0162] 为了对激光后第30天存在激光斑点中1型胶原蛋白 (Colla) 蛋白进行染色, 使用Tris缓冲盐水 (TBS)-Triton 0.5% (v/v) 稀释的兔抗胶原抗体 (Abcam, 1/270) 在4℃下过夜。第二天, 将组织与用TBS-Triton 0.3% (v/v) 1/100稀释的山羊抗兔IgG Alexa Fluor

555 (Life Technologies; A-21428) 一起在4°C下孵育2小时。用Prolong Gold和4',6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI, Molecular Probes) 准备后眼杯状体的铺片。使用具有数码相机的显微镜 (AxioCam MrC5; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) 以20的放大倍数获得图像。使用商业软件 (Axiovision; Zeiss, Oberkochen, Germany) 进行形态测定分析。通过计算Colla阳性面积作为总损伤的比例来确定胶原沉积的密度。

[0163] 2.4、神经视网膜安全性

[0164] 为了研究抗PlGF和抗VEGF-R2对视网膜神经节细胞层的安全性,给未实验的小鼠 (C75B1/6或瑞士小鼠) 注射25mg/kg抗PlGF,抗VEGF-R2或对照IgG,每周3次,共6周。然后处死小鼠并进行神经元标记物NeuN的免疫组织化学。将样品与1/500的小鼠抗NeuN (Chemicon MAB377) 一抗一起孵育过夜。至于二抗,加入1/400的兔抗小鼠生物素标记 (Dako E0646) 45分钟。随后,将切片与1/100的链霉抗生物素蛋白-HRP在TNB中孵育30分钟,然后用1/50的生物素 (试剂盒NEL700) 在扩增缓冲液中扩增8分钟,并再次与1/100的链霉抗生物素蛋白-HRP一起孵育30分钟 (均来自Perkin Elmer, 生命科学)。此后,通过向组织中加入过氧化物进行3,3'-二氨基联苯胺 (DAB) 染色 (Fluka-Sigma Aldrich),并用Harris苏木精 (Merck) 进行复染。在相同的连续切片的视神经两侧的视网膜 (250 μ m) 的确定长度上,对活的RGC进行2次定量。

[0165] 进行TUNEL (末端脱氧核苷酸转移酶介导的生物素化UTP缺口末端标记) 染色以研究凋亡信号。将连续切片脱蜡、洗涤并用蛋白酶K (1/500; Qiagen, Venlo, 荷兰) 处理15分钟。接下来,将切片与TUNEL反应混合物 (原位细胞死亡检测试剂盒, POD; Roche, Mannheim, Germany) 在37°C下孵育1小时。然后,用含有DAPI (Molecular Probes) 的Prolong Gold固定载玻片。为了用荧光细胞指示细胞凋亡,从颞部至鼻锯齿缘系统地扫描每个切片。计数INL中的阳性标记细胞。

[0166] 2.5、链脲佐菌素 (STZ) 诱导的糖尿病小鼠模型

[0167] 连续5天以50mg/kg腹膜内注射链脲佐菌素 (STZ; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) 致使C57BL/6J小鼠 (雄性, 3-5周龄, Charles River) 患糖尿病。将STZ新鲜溶解 (使用前15-20分钟) 于6.6mL柠檬酸钠 (CAM) 缓冲液中, 产生pH4.7的7.5mg/mL的浓度。对照的未患糖尿病小鼠仅接受连续五次注射CAM缓冲液。通过血糖水平高于300mg/dL来定义糖尿病的发展, 并且在第一次注射STZ或CAM后用葡萄糖仪和试纸 (Glucomen, Menarini) 进行每周监测。在该研究中仅使用具有持续升高的葡萄糖水平3周的动物。在糖尿病发作后7周, 将不同糖尿病组的小鼠随机分配到各种处理组。腹腔注射10倍稀释的 (60mg/kg最终剂量) 戊巴比妥钠 (耐波他, 60mg/mL; CEVA, Sante Animale, 布鲁塞尔, 比利时) 用于诱导全身麻醉, 并用一滴0.4% unicain (法国Th é aPharma) 处理眼睛。在一只眼睛中玻璃体内注射给药5D11D4 (5.4 μ g, 抗-PlGF抗体)、DC101 (6.2 μ g, 抗VEGFR-2抗体) 或PBS (参见表2)。糖尿病发作后8周 (开始IVT治疗后1周), 处死小鼠以研究视网膜神经节细胞 (RGC) 密度。在处死当天, 通过颈脱位处死小鼠并将眼摘出并在1% (w/v) 多聚甲醛中固定过夜。

[0168] 表2、小鼠STZ模型实验设计

[0169]	处理	W8-RGC 密度终点
--------	----	-------------

组别	IVT 注射	剂量	IVT 注射 时间点	出 录
1	无	NA	NA	Brn3a 染色
2	PBS	NA	糖尿病发作 7 周后 (每两天)	Brn3a 染色
3	5D11 D4	5.4 $\mu\text{g}/\text{眼}$	糖尿病发作 7 周后 (每两天)	Brn3a 染色
4	DC10 1	6.2 $\mu\text{g}/\text{眼}$	糖尿病发作 7 周后	Brn3a 染色

[0170] [0171] DC101:鼠抗鼠VEGFR-2抗体;5D11D4:鼠抗鼠PlGF抗体;PBS:磷酸盐缓冲盐水;IVT:玻璃体内;Brn3a:见2.5.1;RGC:视网膜神经节细胞;W8:第8周。

[0172] 2.5.1、小鼠STZ模型中RGC密度的定量

[0173] 在小鼠STZ模型中,在糖尿病发作后8周(开始IVT注射后1周)通过Brn3a免疫染色显现活的RGC。将眼去核并置于1% (w/v) 甲醛中。注射的眼睛的视网膜切片(7 μm)用Brn3a小鼠单克隆抗体(稀释度1/100, MAB1585-Millipore)染色以显现活的RGC。为Brn3a免疫反应性,视网膜横切面用Vector[®]M.O.M.[™]免疫检测试剂盒(BMK-2202)处理。BRN3A(POU4F1)是含有IV类POU结构域的转录因子,其在发育中的感觉神经系统和B-和T-淋巴细胞谱系的细胞中高度表达(Gerrero et al.1993,Proc Natl Acad Sci USA 90:10841-10845)并且是视网膜神经节细胞的可靠标记物(Nadal-Nicolas et al.2009,Invest Ophthalmol Vis Sci 50:3860-3868)。Metamorph软件(Leica,Wetzlar,Germany)用于计数存活的RGC。基于该模型中血管渗漏的定位,在视神经的前侧和后侧的两个位置处通过中央视网膜中的掩蔽读取器(masked reader)测量RGC密度。使用包含视神经乳头的3个不同连续切片的图像(总共6次测量)。为了量化RGC密度,在视网膜的限定长度(视神经头两侧250 μm)上从视神经乳头计数250 μm 的神经节细胞核。

[0174] 2.6、小鼠CNV模型中周皮细胞覆盖和后部纤维化

[0175] 使用如实施例2.1中所述的小鼠CNV模型。在激光作用后的不同时间点,将化合物通过腹膜内(IP)或玻璃体内(IVT)给药,如表3所示。

[0176] 表3、小鼠CNV模型的实验设计

[0177]

处理			D14-周皮细胞 覆盖终点		D30 - 纤维化终点	
组别	处理	剂量	IP 注射 时间点	出 读	IVT 注射 时间点	出 读
1	IgG	25 mg/kg	3x/周	SMA 染 色	/	/
2	DC101	25 mg/kg	3x/周	SMA 染 色	/	/
3	5D11D4	25 mg/kg	3x/周	SMA 染 色	/	/
4	PBS	NA	/	/	D0、D4、D10 和 D20	Colla 染色
5	TAAC	40 µg/ 眼	/	/	D0、D4、D10 和 D20	Colla 染色
6	5D11D4	3.1 µg/ 眼	/	/	D0、D4、D10 和 D20	Colla 染色
7	16D3	3.1 µg/ 眼	/	/	D0、D4、D10 和 D20	Colla 染色
8	B20	3.1 µg/ 眼	/	/	D0、D4、D10 和 D20	Colla 染色
9	阿柏西	2.4 µg/ 眼	/	/	D0、D4、D10 和 D20	Colla 染色

[0178]

	普	眼			和 D20	
--	---	---	--	--	-------	--

[0179] IgG: 无关IgG抗体1C8; DC101: 鼠抗鼠VEGFR-2抗体; TAAC: 曲安奈德; 5D11D4: 鼠抗鼠PIGF抗体; 16D3: 鼠抗人PIGF抗体; B20: 鼠抗鼠VEGF抗体; PBS: 磷酸盐缓冲盐水; IP: 腹腔内; IVT: 玻璃体内; SMA: 平滑肌细胞肌动蛋白; Colla: 胶原蛋白1a; D0, D4, D10, D14, D20, D30: 分别为第0天, 第4天, 第10天, 第14天, 第20天, 第30天。

[0180] 2.6.1、小鼠CNV中周皮细胞覆盖的定量

[0181] 为了研究作为血管成熟的标志物的周皮细胞覆盖,在连续的7mm石蜡切片上检查平滑肌细胞肌动蛋白(SMA)。免疫组织化学用三氯化钠封闭试剂(TNB) 1/500稀释的大鼠抗 α SMA抗体(Sigma Aldrich)作为一抗和具有免疫前小鼠血清10% (v/v)的TNB中1/100的兔抗小鼠-HRP(辣根过氧化物酶)标记为二抗45分钟(Dako)。通过使用商业软件(Axiovision; Zeiss, Oberkochen, 德国)测定病变中存在的SMA细胞的量。

[0182] 2.7、在小鼠CNV模型中交替使用抗P1GF和抗VEGF

[0183] 在类似于表1和表3中所示的研究设计中,并且为了确定对胶原沉积/眼后部纤维化的影响的目的,比较了抗P1GF抗体5D11D4和抗VEGF抗体B20的不同给药方案。表4中给出了一种这样的研究设计。预期该研究的第1组产生与用阿柏西普获得的结果类似的结果。该研究部分(组2)开始确定清洗期(来自鼠眼),以及如本文上述的交换的抗-P1GF/抗-VEGF组合的探索的开始。

[0184] 表4、小鼠CNV模型实验设计

组别	处理	剂量/ 眼	时间点				动物数
			D0	D4	D10	D20	
[0185] 1	5D11D4 + B20	3.1 μ g +3.1 μ g	5D11D 4+ B20	5D11D 4+ B20	5D11D 4+ B20	5D11D 4+ B20	6
2	5D11D4	3.1 μ g	5D11D 4	B20	5D11D 4	B20	6
	或 B20	或 3.1 μ g					
[0186] 3	5D11D4 或 B20	3.1 μ g 或 3.1 μ g	B20	5D11D 4	5D11D 4	5D11D 4	6

[0187] 2.8、统计分析

[0188] 使用未配对的'学生t检验进行两个实验组之间的比较。为了比较多于两组的情况,使用具有Bonferroni事后分析测试的Graph Pad Prism 5进行具有处理变量的单因素ANOVA分析。

[0189] 使用“鲁汶生物统计学和统计生物信息学中心”(L-BioStat)的数据集来确定统计学效力。给出了具有0.05的 α 的独立双侧t检验的检验效力,以检测两组之间平均值的差异,假设方差相等且组大小相等。除非另有说明,否则数据表示为平均值 \pm 平均值的标准误差(SEM)。

[0190] 3、结果

[0191] 为了确定在CNV小鼠模型中P1GF抑制的治疗性抗血管生成、抗渗漏抗炎和抗纤维

化潜力,用IVT或IP注射5D11D4、16D3、DC101、B20、IgG、阿柏西普、TAAC及其各自的缓冲液处理小鼠(表1)。每隔一天对所有动物进行临床检查,并研究在激光后第5天后炎症,在激光后第7天或第14天新血管生成/渗漏(包括周皮细胞覆盖),并在激光后第30天研究纤维化。在第10、20和30天未检测到处理前和处理后与处理相关的体重差异(数据未显示)。

[0192] 3.1、炎症(实验设计:表1)

[0193] F4/80染色的分析证实了先前发表的结果(Van de Veire et al.,Cell 2010, 141:178-190),即抗PIGF能够显著降低巨噬细胞浸润的48%,而DC101没有效果。与IgG相比,阿柏西普的给药也减少了52%的巨噬细胞浸润($P<0.05$)。

[0194] 这是第一次研究白细胞的作用。激光作用后5天,CD45-免疫组织化学染色显示用抗PIGF抗体处理的组的眼中白细胞浸润的剂量依赖性显著降低。实际上,分别用1.5 μ g和3.1 μ g5D11D4显著降低炎症的36%和46%($n=10-25$;与IgG相比 $P<0.05$)。这与2.4 μ g和20 μ g阿柏西普相当,其分别诱导约50%的类似减少($P<0.05$)。只有最高浓度的TAAC(40 μ g)才能降低白细胞浸润($P<0.05$),而较低浓度则没有效果。重要的是,单次给药DC101对白细胞浸润没有影响(图1A)。在比较等摩尔浓度的不同化合物的作用后,可以得出结论,5D11D4和阿柏西普均使50%的白细胞浸润减少,而DC101和TAAC没有效果(图1B)。值得注意的是,当以40 μ g的最高剂量给药时,TAAC仅具有抗炎作用。所有各自的缓冲液、PBS、阿柏西普-和TAAC-缓冲液与IgG没有差异($P>0.05$;数据未显示)。

[0195] 3.2、新血管生成和渗漏(实验设计:表1)

[0196] 先前发表的结果证实,与DC101相比,PIGF的抑制同样减少了小鼠CNV模型中的新血管生成和渗漏(Van de Veire et al.,Cell 2010,141:178-190)。这些效果也与阿柏西普相当。

[0197] 3.3、胶原沉积(实验设计:表1和3)

[0198] 激光作用后30天,通过免疫组织化学染色确定胶原蛋白显示用抗PIGF抗体处理的组的眼中的剂量依赖性和纤维化显著降低。实际上,1.5 μ g和3.1 μ g5D11D4分别显著降低了胶原沉积的43%和44%($n=5-18$;与IgG相比 $P<0.05$)。这与最高浓度的TAAC(40 μ g)相当,而较低浓度则没有效果。相反,重复给药DC101(3.1 μ g)和阿柏西普(2.4 μ g和20 μ g)对胶原沉积没有影响(图2A)。在比较等摩尔浓度的不同化合物的效果后,可以得出结论,只有5D11D4延迟了伤口愈合的过程,而阿柏西普、DC101和TAAC没有效果(图2B)。值得注意的是,当以40 μ g的最高剂量给药时,TAAC仅具有抗纤维化作用。所有各自的缓冲液、PBS、阿柏西普-和TAAC-缓冲液与IgG没有差异($P>0.05$;数据未显示)。

[0199] 在重复实验中,进一步包括抗PIGF抗体,16D3(抗人PIGF)和抗VEGF-A抗体(B20)。激光作用30天后,通过免疫组织化学染色确定胶原蛋白显示用两种抗PIGF抗体处理的组的眼中的纤维化显著减少。实际上,3.1 μ g/眼5D11D4或16D3分别显著降低44%和34%的胶原沉积($n=5-6$;与PBS相比 $P<0.05$)。该效果与类固醇TAAC(40 μ g/眼)的给药相当,显示胶原沉积显著降低49%($P<0.05$,图4)。与PBS相比,给药等摩尔量的阿柏西普(2.4 μ g/眼)和抗VEGF抗体B20(3.1 μ g/眼)不会减少纤维化($P<0.05$;图4)。

[0200] 3.4、神经视网膜安全性/未实验的小鼠

[0201] 为了研究PIGF和VEGF-R2抑制对视网膜神经节细胞(RGC)的影响,用5D11D4、DC101或同种型匹配的无关对照IgG注射C57B1/6小鼠2、4和6周(所有三种抗体腹膜内每周注射3

次)并计数NeuN染色的RGC数。在所描述的三个时间点,3个处理组之间的神经节细胞密度(RGC/视网膜面积)没有显著差异:对照IgG为5100,5D11D4为4600,以及DC101为5500($n=6$; $P=NS$)。TUNEL染色证实,在6周后aP1GF与对照IgG处理的小鼠中神经节细胞层中每个视网膜区域的凋亡细胞数相当:对照IgG为 16 ± 2 ,而5D11D4为 20 ± 4 。DC101处理的小鼠存在凋亡细胞增加的趋势:每个视网膜区域 35 ± 4 个凋亡细胞($n=6$; $P=0.10$)。随后,在携带视网膜变性基因突变(Rd基因)并在P19-24岁时发展光感受器退化的瑞士小鼠中重复这些实验(Caravaggio和Bonting, *Exp Eye Res* 1963,2:12-19)。实际上,用DC101处理的瑞士小鼠在TUNEL染色时表现出神经节细胞层中凋亡细胞数量增加33% ($p<0.001$),4周后RGC密度降低32% ($n=6$, $p=0.05$)。相反,抗-P1GF不诱导RGC密度或凋亡率的任何改变(图3A-D)。

[0202] 3.5、小鼠STZ模型中的RGC密度(实验设计:表2)

[0203] 为了使化合物给药后的RGC密度可视化,在糖尿病发作后8周,用Brn3a小鼠单克隆抗体对视网膜切片进行染色。注射STZ(无IVT)的糖尿病小鼠视网膜中央视网膜RGC数量(视神经两侧视神经头 $250\mu\text{m}$)明显低于非糖尿病小鼠($12.8 \pm 1.0/250\mu\text{m}$ 视网膜长度对比 $15.7 \pm 0.8/250\mu\text{m}$ 视网膜长度, $P=0.05$;图5)。给药5D11D4后的RGC密度与注射PBS的小鼠没有显著差异,而与缓冲液相比,DC101注射显著降低RGC密度20% ($P<0.05$,图5)。

[0204] 3.6、小鼠CNV模型中的周皮细胞覆盖(实验设计:表3)

[0205] 在小鼠CNV模型中激光后14天研究周细胞覆盖。分析显示,病灶内 αSMA 阳性血管面积在IgG处理小鼠和注射抗VEGF-R2抗体(25mg/kg)的小鼠之间具有可比性($n=10$, $p>0.05$),而在存在于抗P1GF处理组中周细胞覆盖的血管增加35%。这意味着抗P1GF处理(25mg/kg)改善了脉络膜血管的成熟($n=10$, $p<0.05$;图6)。

[0206] 4、结论

[0207] 可以得出结论,P1GF抑制抗体或P1GF中和抗体能够减少纤维化,以及减少新血管生成、渗漏和炎症,所有这些都不会影响RGC存活。

[0208] 其中,对于纤维化的作用是单特异性P1GF拮抗剂所独有的,不与VEGF-抑制剂(VEGF-和VEGFR2-抑制剂)和双重VEGF-/P1GF-抑制剂共享。重要的是,在激光作用后第30天,即在胶原沉积似乎减慢的时间点研究纤维化(Van Bergen et al., *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015,56:5280-5289)。

[0209] 单特异性P1GF拮抗剂的神经退行性变特性的缺乏是进一步显著的,也不与VEGF抑制剂共享。单特异性P1GF拮抗剂对RGC的作用迄今未知。Izawa等(*Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015,56:6914-6924)先前报道了在类干性年龄相关性黄斑变性(干性AMD)的实验模型中抗P1GF抗体对光诱导的光感受器退化的保护作用。抗P1GF抗体的这种性质与抗VEGF抗体共有(Cachafeiro et al., *Cell Death Dis* 2013,4:e781)。与目前的结果相反,Inoue等(*J Neurosci Res* 2014,92:329-337)报道了P1GF本身发挥的神经保护作用,其似乎被抗-P1GF否定。对此的可能解释是Inoue等使用的体外培养的细胞,这与目前在体内进行的研究不同。还报道了双特异性VEGF/P1GF抑制剂阿柏西普增加视网膜色素上皮细胞(RPE)细胞死亡(Julien et al., *Br J Ophthalmol* 2014,98:813-825)。

[0210] 鉴于上述情况,单特异性P1GF拮抗剂将自身与目前是临床实践中的金标准疗法的VEGF抑制剂区分开。

SEQUENCE LISTING

<110> 思罗姆博基因股份有限公司

<120> 通过拮抗胎盘生长因子抑制眼后部纤维化

<130> TG-057 PCT

<150> EP16159687.9

<151> 2016-03-10

<160> 19

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 1

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr

1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 2

Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr

1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 3

Val Arg Asp Ser Pro Phe Phe Asp Tyr

1 5

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 4

Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Met Arg Lys Ser Phe

1 5 10

<210> 5

<211> 3

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 5

Trp Ala Ser

1

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 6

Lys Gln Ser Tyr His Leu Phe Thr

1

5

<210> 7

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化中和抗-PlGF抗体的重链氨基酸序列

<400> 7

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1

5

10

15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20

25

30

Tyr Ile Asn Trp Val Lys Leu Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

50

55

60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ile Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys

85

90

95

Val Arg Asp Ser Pro Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Leu

100

105

110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 8

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化中和抗-P1GF抗体的轻链氨基酸序列

<400> 8

```

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1           5           10           15
Glu Arg Val Thr Met Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
           20           25           30
Gly Met Arg Lys Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
           35           40           45
Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
           50           55           60
Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65           70           75           80
Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
           85           90           95
Ser Tyr His Leu Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
           100          105          110

```

<210> 9

<211> 256

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化中和抗-P1GF抗体的scFv氨基酸序列

<400> 9

```

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1           5           10           15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
           20           25           30
Tyr Ile Asn Trp Val Lys Leu Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
           35           40           45
Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
           50           55           60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ile Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65           70           75           80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
           85           90           95
Val Arg Asp Ser Pro Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Leu
           100          105          110
Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

```

115	120	125
Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val		
130	135	140
Ser Leu Gly Glu Arg Val Thr Met Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu		
145	150	155
Leu Asn Ser Gly Met Arg Lys Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys		
165	170	175
Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu		
180	185	190
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe		
195	200	205
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr		
210	215	220
Cys Lys Gln Ser Tyr His Leu Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu		
225	230	235
Glu Ile Lys Gly Ser Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly Ser		
245	250	255
<210> 10		
<211> 152		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 10		
Leu Pro Ala Val Pro Pro Gln Gln Trp Ala Leu Ser Ala Gly Asn Gly		
1	5	10
Ser Ser Glu Val Glu Val Val Pro Phe Gln Glu Val Trp Gly Arg Ser		
20	25	30
Tyr Cys Arg Ala Leu Glu Arg Leu Val Asp Val Val Ser Glu Tyr Pro		
35	40	45
Ser Glu Val Glu His Met Phe Ser Pro Ser Cys Val Ser Leu Leu Arg		
50	55	60
Cys Thr Gly Cys Cys Gly Asp Glu Asn Leu His Cys Val Pro Val Glu		
65	70	75
Thr Ala Asn Val Thr Met Gln Leu Leu Lys Ile Arg Ser Gly Asp Arg		
85	90	95
Pro Ser Tyr Val Glu Leu Thr Phe Ser Gln His Val Arg Cys Glu Cys		
100	105	110
Arg Pro Leu Arg Glu Lys Met Lys Pro Glu Arg Arg Arg Pro Lys Gly		
115	120	125
Arg Gly Lys Arg Arg Arg Glu Lys Gln Arg Pro Thr Asp Cys His Leu		

130	135	140
Cys Gly Asp Ala Val Pro Arg Arg		
145	150	
<210> 11		
<211> 21		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 11		
Arg Arg Pro Lys Gly Arg Gly Lys Arg Arg Arg Glu Lys Gln Arg Pro		
1	5	10
Thr Asp Cys His Leu		
	20	
<210> 12		
<211> 121		
<212> PRT		
<213> 小鼠		
<220>		
<221> MISC_FEATURE		
<223> VH 5D11D4		
<400> 12		
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala		
1	5	10
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr		
	20	25
Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile		
	35	40
Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Phe Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe		
	50	55
Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr		
65	70	75
Met His Leu Ser Ser Pro Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys		
	85	90
Thr Arg Asp Tyr Arg Tyr Asp Ala Val Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly		
	100	105
Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser		
	115	120
<210> 13		
<211> 106		
<212> PRT		

<213> 小鼠

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> VL 5D11D4

<400> 13

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Phe Ile
 20 25 30
 His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Ser Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Arg Tyr Pro Tyr Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 14

<211> 5

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> VH CDR1 5D11D4

<400> 14

Asn Tyr Trp Ile Asn
 1 5

<210> 15

<211> 17

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> VH CDR2 5D11D4

<400> 15

Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Phe Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Asp

<210> 16

<211> 12

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> VH CDR3 5D11D4

<400> 16

Asp Tyr Arg Tyr Asp Ala Val Tyr Ala Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> VL CDR1 5D11D4

<400> 17

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Phe Ile His

1 5 10

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> VL CDR2 5D11D4

<400> 18

Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> VL CDR3 5D11D4

<400> 19

Gln Gln Arg Ser Arg Tyr Pro Tyr Thr
1 5

[0001]

关于微生物保藏的说明

申请人或代理人档案号	国际申请号 PCT/EP2017/055652
------------	-------------------------

关于微生物保藏的说明

(专利合作条约实施细则 13 之 2)

微生物保藏的说明	
A. 对说明书第 11 页, 第 12 行 所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明	
B. 保藏事项	更多的保藏在附加页说明 <input type="checkbox"/>
保藏单位名称BCCM-比利时微生物协调保藏中心	
保藏单位地址 (包括邮政编码和国名) 比利时	
保藏日期 2005-03-29	保藏号 BCCM LMBP 6399CB
C. 补充说明 (必要时)	更多信息在附加页中 <input type="checkbox"/>
无	
D. 本说明是为下列指定国作的 (如果说明不是为所有指定国而作的)	
无	
E. 补充说明 (必要时)	
下列说明将随后向国际局提供 (写出说明的类别, 例如: “保藏的编号”)	
无	

由受理局填写
<input type="checkbox"/> 本页已经和国际申请一起收到
授权官员

由国际局填写
<input type="checkbox"/> 国际局收到本页日期
授权官员

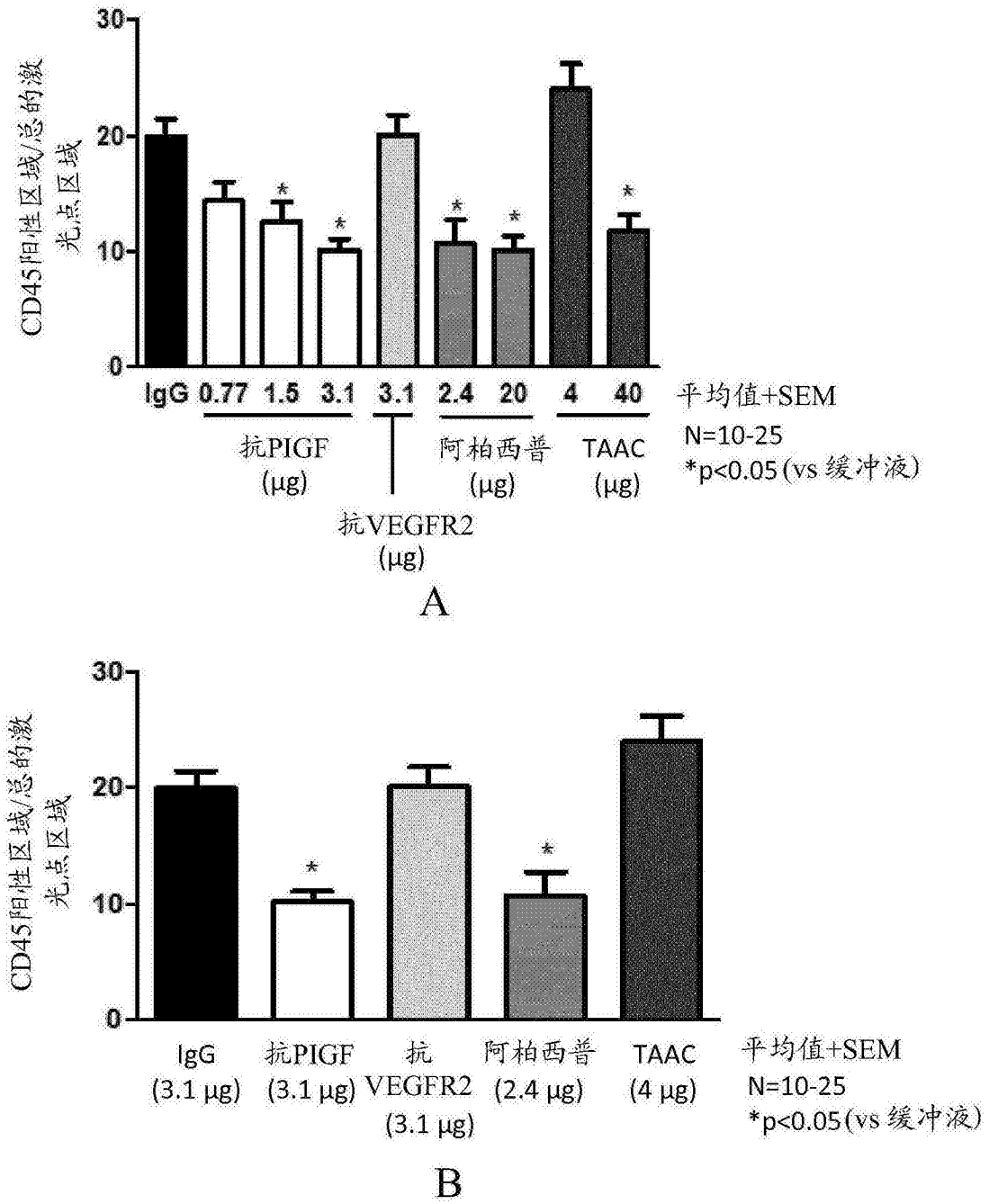
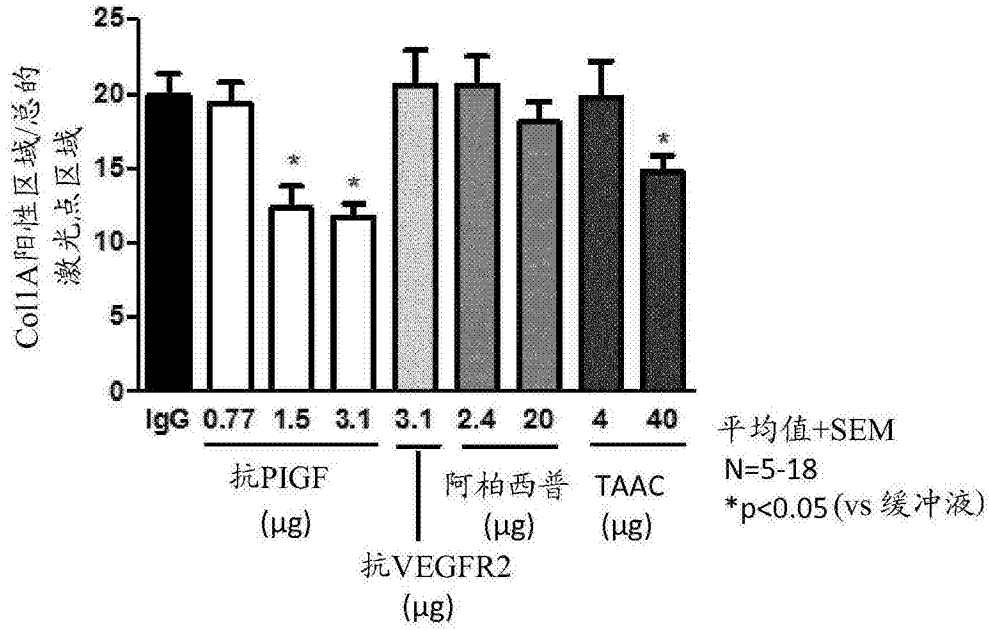
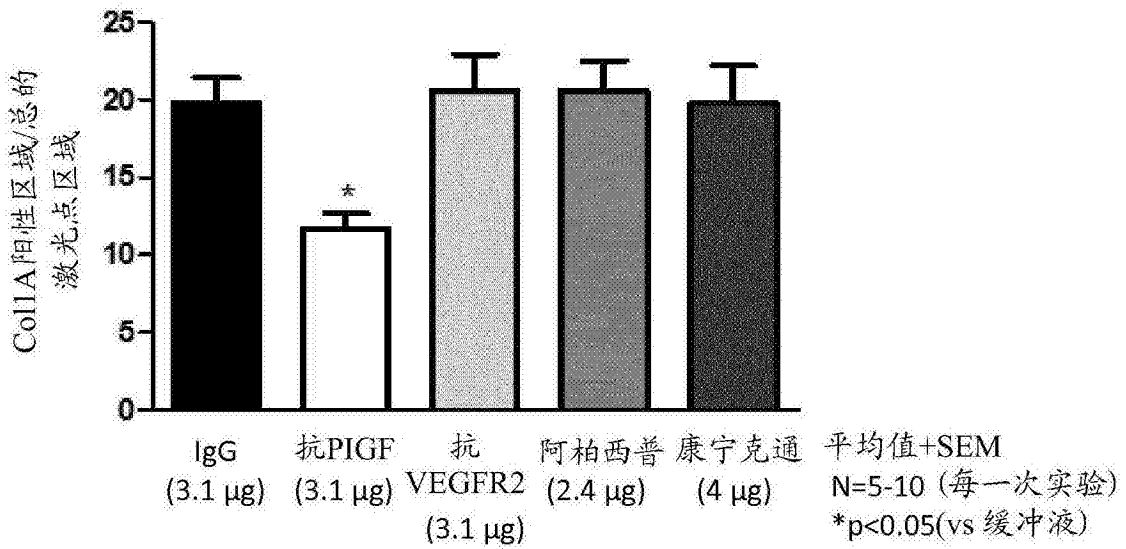


图1

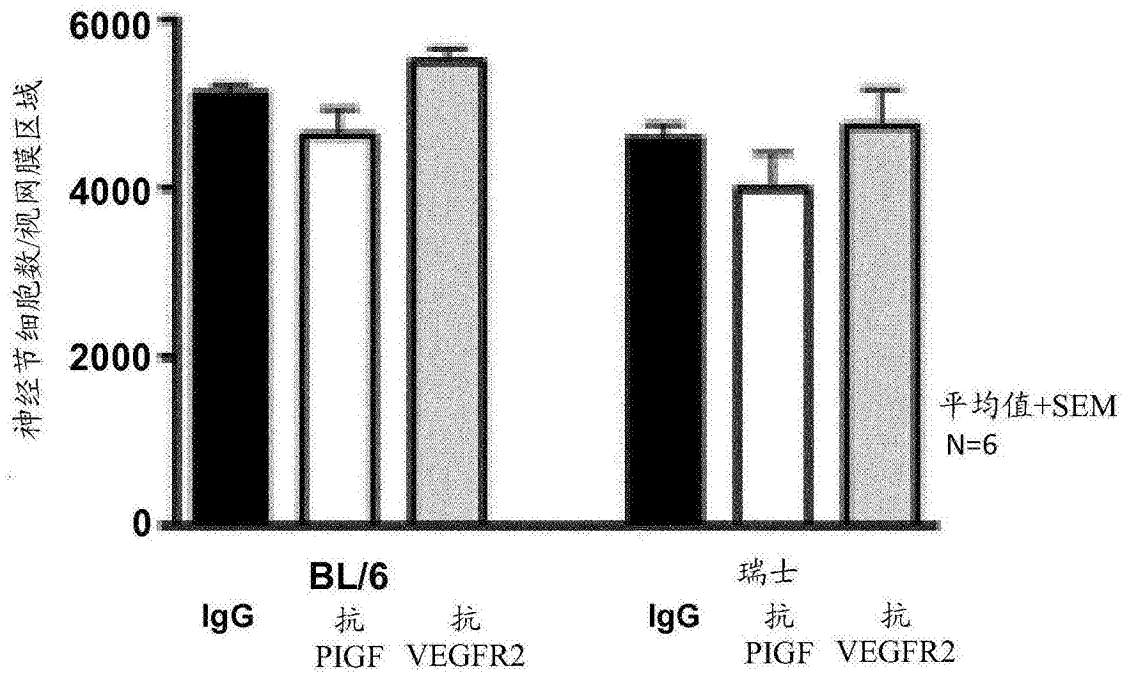


A

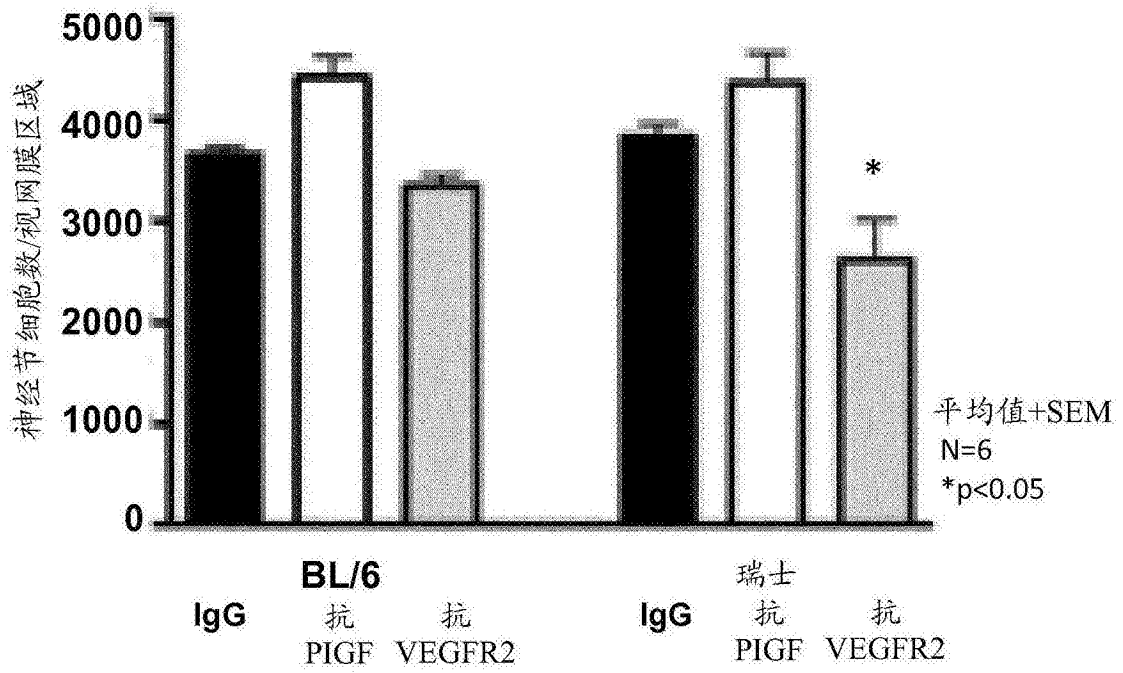


B

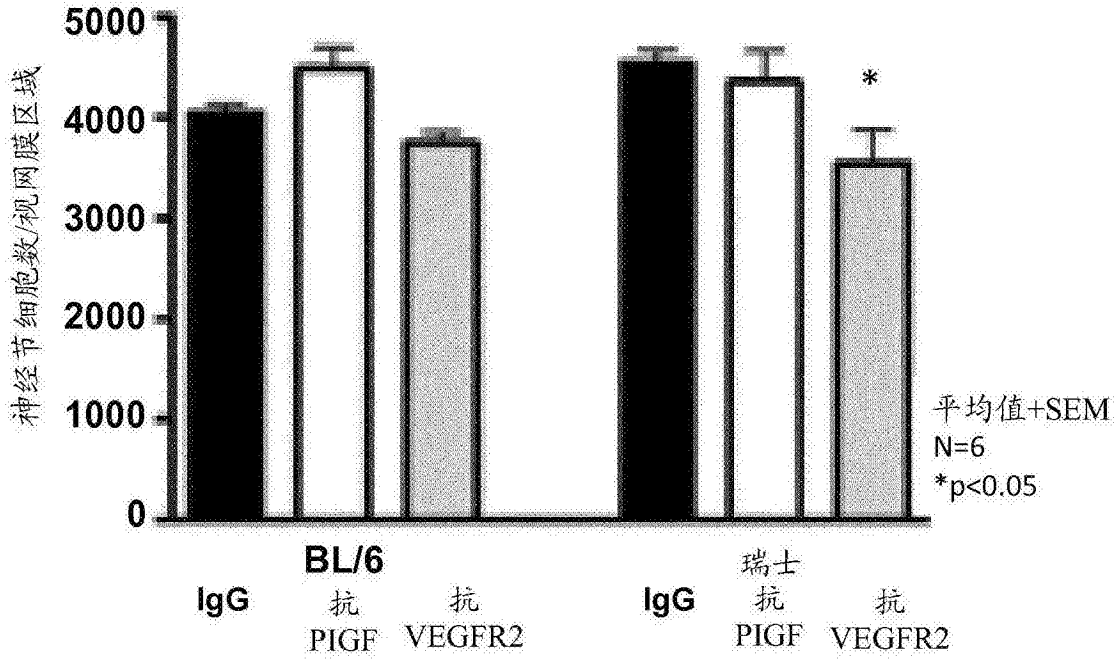
图2



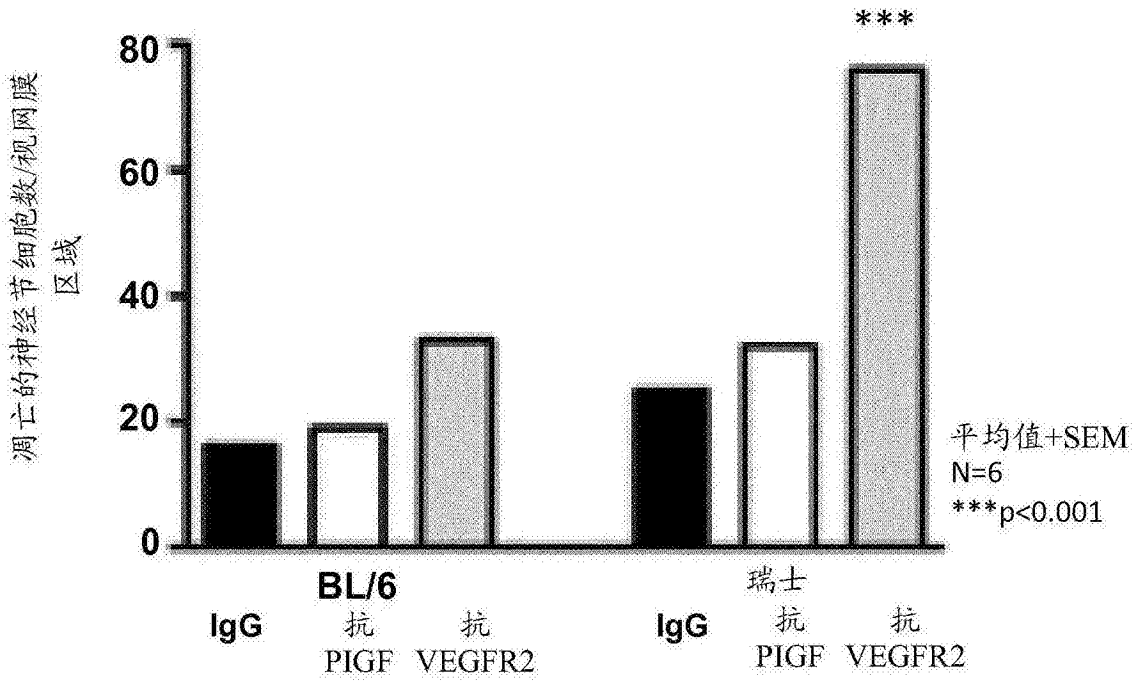
A



B



C



D

图3

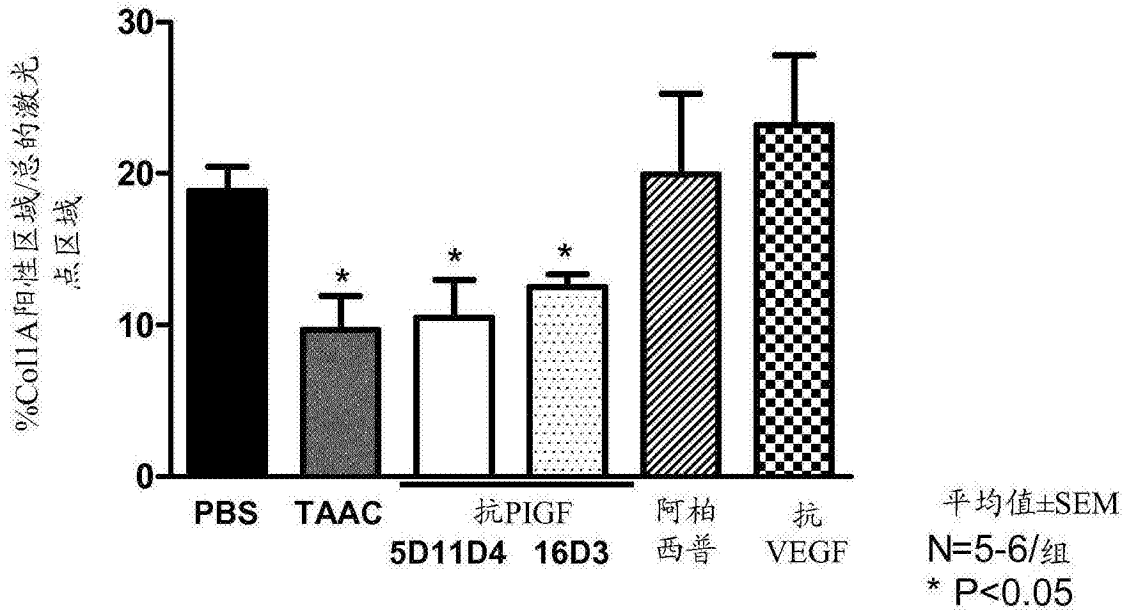


图4

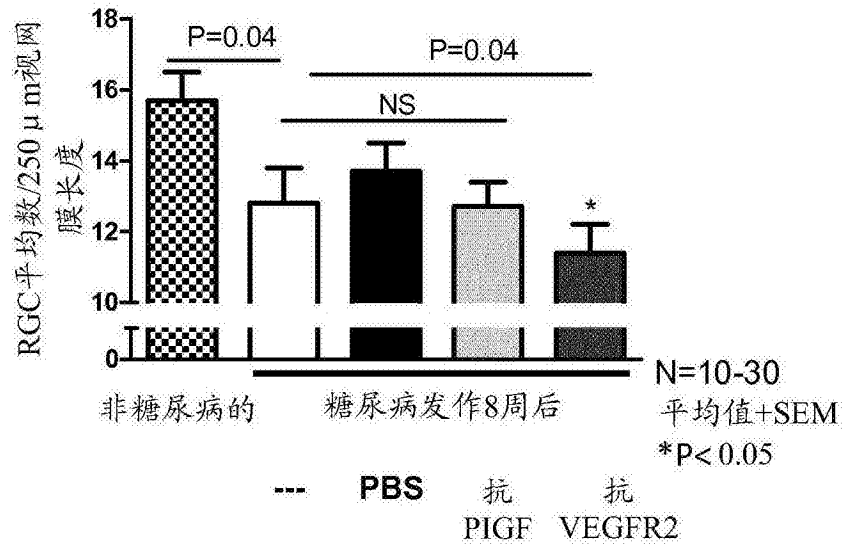


图5

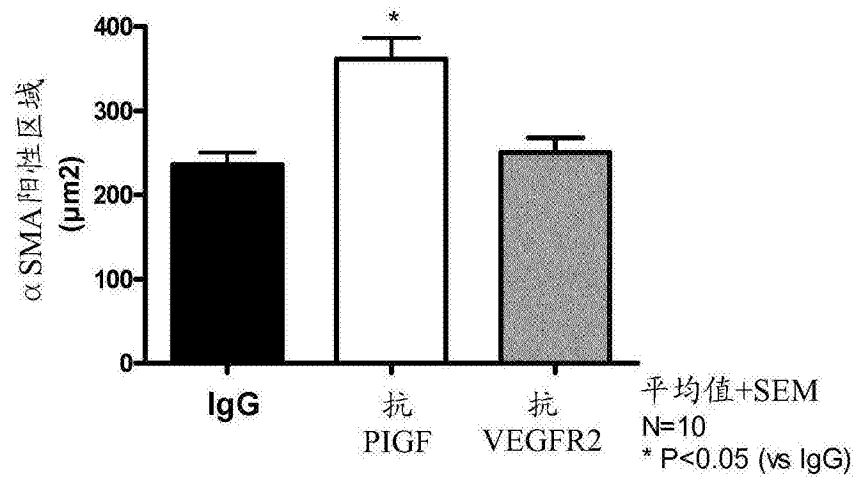


图6