

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 606 627**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.05.2011 PCT/EP2011/058777**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.01.2017 WO2011147984**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2011 E 11728594 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.09.2016 EP 2575881**

54 Título: **Anticuerpos específicos anti-CD160 para el tratamiento de trastornos oculares basados en la neoangiogénesis**

30 Prioridad:

28.05.2010 US 349271 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

24.03.2017

73 Titular/es:

**INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (50.0%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR y
ELSALYS BIOTECH (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LE BOUTEILLER, PHILIPPE y
BENSUSSAN, ARMAND**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 606 627 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos específicos anti-CD160 para el tratamiento de trastornos oculares basados en la neoangiogénesis.

5 La presente invención se refiere a la utilización de por lo menos un anticuerpo anti-CD160, preferentemente un compuesto seleccionado de entre los anticuerpos monoclonales CL1-R2 (que pueden obtenerse mediante el hibridoma CNCM I-3204), fragmentos conservadores de los mismos y derivados conservadores de los mismos, para el tratamiento y/o prevención de enfermedades oculares neovasculares.

10 La angiogénesis ocular, una causa principal de pérdida de visión en todo el mundo, se produce en dos compartimientos principales del ojo: la retina y la córnea.

15 Las enfermedades retinianas que implican una neovascularización anormal presentan una incidencia creciente, tanto en países ricos como pobres. En los países ricos, las retinopatías diabéticas, la retinopatía del prematuro y la degeneración macular senil (DMAE) complicadas por neovasos anormales constituyen una enorme carga económica, así como las dos causas principales de baja visión y ceguera legal en todo el mundo.

20 Las neovascularizaciones corneales anormales que complican las infecciones corneales o los injertos corneales (realizados en pacientes afectados por distrofias corneales hereditarias o por insultos ambientales) también constituyen una importante carga para la salud pública tanto en términos de costes de tratamiento como en términos de correcta integración de los pacientes afectados en la fuerza laboral y en la red social normal. El tamaño del mercado para la degeneración macular senil y la retinopatía diabética es enorme. Aunque importante en términos de mercado competitivo, con estudios de investigación en constante desarrollo, las neovascularizaciones corneales patológicas también corresponden a un conjunto crucial de enfermedades que impiden el mantenimiento de un
25 injerto corneal transparente o incluso eliminan la posibilidad de realizar un injerto corneal.

30 La patogénesis de la neovascularización retiniana es compleja y sigue sin entenderse por completo. La investigación actualmente se centra en los efectos de la hipoxia, la inflamación y la maduración en enfermedades vasculares tales como la DMAE.

Dicha enfermedad está marcada por un declive de la visión, una distorsión de la imagen y la incapacidad para leer debido a un escotoma. Se diagnostica en parte por la formación de nuevos vasos sanguíneos, que aparecen con independencia de la forma de la enfermedad (atrófica o húmeda).

35 No existe tratamiento actualmente para la DMAE, curativo o preventivo, de forma atrófica. En los últimos años se ha utilizado ampliamente la terapia de anticuerpos monoclonales humanizados anti-VEGF (bevacizumab (Avastin®) o ranibizumab (Lucentis®)) para prevenir o inhibir la forma neovascular de la DMAE y las retinopatías diabéticas edematosas. Sin embargo, la eficiencia está limitada a la DMAE húmeda y esta terapia no se ha utilizado todavía para bloquear las diversas neovascularizaciones corneales patológicas. Además, debido a que el VEGF no es el
40 único factor proangiogénico, se prevé que aparezcan resistencias.

45 Además, aparecen muchos efectos secundarios no deseables durante el tratamiento, en particular con el ranibizumab. El tratamiento con ranibizumab en efecto induce hemorragia conjuntival, dolor ocular, presión intraocular incrementada, inflamación del iris o uveítis y visión borrosa. Aproximadamente el 10% de las formas de DMAE húmeda no son receptivas (o lo son sólo débilmente) a los tratamientos de Avastin® o Lucentis®. Con el fin de obtener un resultado estable en los numerosos pacientes afectados por la forma húmeda de DMAE, estos pacientes pueden ser tratados con hasta 24 inyecciones intravítreas de Avastin® o Lucentis® durante 2 años, incrementando el riesgo de efectos perjudiciales.

50 Por lo tanto, existe una necesidad de agentes terapéuticos eficaces en el tratamiento de las enfermedades oculares neovasculares que presenten menos efectos secundarios.

55 Los documentos siguientes se refieren a la inhibición de la angiogénesis por algunos anticuerpos. P. Fons et al., Blood 108(8):2608-2615, 2006, da a conocer la inhibición de la angiogénesis *in vivo* en un modelo de neovascularización corneal en el conejo e induce apoptosis de las células endoteliales mediante la unión a CD160. El documento nº WO2006/015886A1 da a conocer que sHLA-G1 y mAb CL1-R2 se unen a CD160, inhiben la angiogénesis e inducen la apoptosis de las células endoteliales. El documento nº EP 2 186 529 A2 da a conocer la inhibición de la neovascularización corneal y retiniana mediante una combinación de bevacizumab y suramina.

60 Por lo tanto, la invención se refiere a la utilización de por lo menos un anticuerpo anti-CD160, preferentemente un compuesto seleccionado de entre el anticuerpo monoclonal CL1-R2 (que puede obtenerse con el hibridoma CNCM I-3204), sus fragmentos conservadores y sus derivados conservadores y un anticuerpo anti-VEGF, para la preparación de un fármaco destinado al tratamiento y/o prevención de enfermedades oculares neovasculares.

65 La invención se refiere a por lo menos un anticuerpo anti-CD160, preferentemente a por lo menos un anticuerpo anti-CD160 que induce la muerte celular de células endoteliales proliferantes activadas, para la utilización en el

tratamiento y/o la prevención de enfermedades oculares neovasculares.

5 La invención se refiere además a un compuesto seleccionado de entre el anticuerpo monoclonal CL1-R2 (que puede obtenerse con el hibridoma CNCM I-3204), sus fragmentos conservadores y sus derivados conservadores, para la utilización en el tratamiento y/o prevención de enfermedades oculares neovasculares.

Preferentemente, dicho anticuerpo o anticuerpos anti-CD160 induce la muerte celular de las células endoteliales proliferantes activadas.

10 Más específicamente, la invención se refiere a un anticuerpo anti-CD160 y a un anticuerpo anti-VEGF en forma de una preparación combinada para la utilización simultánea, separada o secuencial para el tratamiento y/o prevención de enfermedades oculares neovasculares.

15 La combinación de un anticuerpo anti-CD160 y un anticuerpo anti-VEGF mejora la probabilidad de éxito de una estrategia terapéutica para el tratamiento las enfermedades oculares neovasculares ya que el anticuerpo anti-CD160 y los anticuerpos anti-VEGF actúan sobre dianas y rutas biológicas diferentes.

20 Asimismo, la invención se refiere a por lo menos un anticuerpo anti-CD160 y a un anticuerpo anti-VEGF para la utilización en el tratamiento y/o prevención de enfermedades oculares neovasculares en un sujeto que no responde al tratamiento anti-VEGF.

25 La presente invención se refiere además a un método para el tratamiento de una enfermedad ocular neovascular en un sujeto, preferentemente un ser humano, en el que se administra en dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD160, preferentemente CL1-R2, un fragmento conservador del mismo o un derivado conservador del mismo y de un anticuerpo anti-VEGF en dicho sujeto.

30 La expresión "anticuerpo de CD160" o "anticuerpo anti-CD160" se refiere a cualquier anticuerpo que se une a CD160 humana. De esta manera, esta expresión se refiere a moléculas de inmunoglobulina y a partes inmunitariamente activas de moléculas de inmunoglobulina dirigidas contra CD160, es decir, moléculas, incluyendo péptidos, que contienen un sitio de unión a antígeno que se une inmuno-específicamente a CD160. De esta manera, el término anticuerpo se refiere no sólo a las moléculas de anticuerpo completas, sino también a fragmentos de anticuerpo, así como a variantes (incluyendo derivados) de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo. Para cumplir con el propósito de la invención, varios anticuerpos anti-CD160, dirigidos contra epítomos diferentes de CD160, pueden utilizarse secuencial o simultáneamente. El anticuerpo anti-CD160 según la invención puede ser un compuesto seleccionado de entre anticuerpos monoclonales anti-CD160, sus fragmentos conservadores y sus derivados conservadores.

40 En el contexto de la presente invención, dicho anticuerpo anti-CD160 induce la muerte celular de células endoteliales proliferantes activadas y no actúa directamente sobre el VEGF. Dicho anticuerpo anti-CD160 puede seleccionarse de entre CL1-R2, sus fragmentos conservadores y sus derivados conservadores.

45 El anticuerpo monoclonal CL1-R2 puede obtenerse a partir de la línea de hibridoma depositada en el National Collection of Cultures of Microorganisms CNCM Institut Pasteur de acuerdo con el Tratado de Budapest de 28 de abril de 2004 (Institute Pasteur CNCM, 25 rue du Docteur Roux F-75724 Paris Cedex 15, Francia). El hibridoma depositado presenta el número de depósito CNCM I-3204.

La CD160 pertenece a la familia de las inmunoglobulinas. El ADNc del CD160 humano corresponde a SEC ID nº 1 (1361 pb) descrito en el documento nº WO 98/21240 (Dana-Farber Cancer Institute).

50 El ARNm del CD160 humano se encuentra disponible de GenBank bajo el número de acceso AF060981; el ARNm de CD160 murino se encuentra disponible de GenBank bajo el número de acceso AF060982.

55 La secuencia de la proteína CD160 humana corresponde a SEC ID nº 2 descrita en el documento nº WO 98/21240 y se encuentra disponible bajo el número de acceso en GenBank AAC72302 (181 aminoácidos).

La CD160 es una glucoproteína de 27 kDa, que se encuentra presente particularmente en la superficie de las células endoteliales.

60 La diana de CL1-R2, es decir, el receptor de CD160, es expresado por células endoteliales proliferantes activadas, pero no por células endoteliales quiescentes. Las células endoteliales proliferantes activadas son responsables de la formación de neovasos, y particularmente de los neovasos presentes en las enfermedades oculares.

65 El CL1-R2 presenta un mecanismo de acción diferente de Avastin® o Lucentis®: induce la muerte celular de las células endoteliales proliferantes activadas únicamente y no actúa directamente sobre el VEGF. También presenta una especificidad muy elevada para los neovasos angiogénicos. De esta manera, el anticuerpo inesperadamente ofrece un buen potencial terapéutico para los pacientes que no responden al tratamiento anti-VEGF. Por lo tanto, los

inventores han satisfecho la necesidad de desarrollo de una estrategia altamente prometedora para el tratamiento de enfermedades oculares neovasculares en un sujeto que sufre de enfermedades oculares neovasculares que no pueden ser tratadas mediante el tratamiento anti-VEGF.

5 De esta manera, la invención se refiere además a por lo menos un anticuerpo anti-CD160 y a un anticuerpo anti-VEGF para la utilización en el tratamiento y/o prevención de enfermedades oculares neovasculares en un sujeto que no responde al tratamiento anti-VEGF.

10 Preferentemente, dicho anticuerpo anti-CD160 induce la muerte celular de las células endoteliales proliferantes activadas.

Preferentemente, dicho anticuerpo anti-CD160 se selecciona de entre el anticuerpo monoclonal CL1-R2 (que puede obtenerse con el hibridoma CNM I-3204), sus fragmentos conservadores y sus derivados conservadores.

15 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "sujeto que no responde al tratamiento anti-VEGF" se aplica a un sujeto que es no respondedor a dicho anticuerpo anti-VEGF. La expresión "no respondedor" se refiere a que el sujeto no recupera, mejora o estabiliza su condición con el anticuerpo anti-VEGF. Por ejemplo, un sujeto que no responde al tratamiento anti-VEGF es un sujeto que ha sido tratado sin éxito con el anticuerpo anti-VEGF o un sujeto que es conocido que no ha podido responder con éxito a un tratamiento basado en el anticuerpo anti-VEGF.
20 Mediante la provisión de una nueva estrategia de tratamiento de un sujeto que sufre de una enfermedad ocular neovascular y que es que no responde al tratamiento anti-VEGF, la invención satisface esta antigua necesidad.

Dicho anticuerpo también puede reconocer un epítipo que es común a muchas especies, tales como el ser humano, el conejo, el ratón y el mono macaco; ello permite la fácil experimentación animal.

25 Según la invención, CL1-R2 o un fragmento conservador del mismo o un derivado conservador del mismo puede utilizarse para tratar y/o prevenir enfermedades oculares neovasculares.

30 La expresión "enfermedades oculares neovasculares" o "enfermedad ocular neovascular" se refiere a todas las enfermedades oculares neovasculares, comprendiendo todas las enfermedades neovasculares de la córnea, la retina y el coroides. Entre estas enfermedades se incluyen:

- todas las formas de neovascularización corneal, con independencia de su causa, incluyendo las neovascularizaciones que se producen como complicaciones de injertos corneales y/o infecciones corneales o agresiones ambientales a la córnea, incluyendo infecciones por patógenos (tales como herpes) y quemaduras químicas,
- todas las formas de retinopatía, incluyendo las formas isquémica y edematosa diabética, la retinopatía diabética prematura, formas no proliferativas y proliferativas, edema quistoide macular, todas las formas de degeneración macular relacionada (DMAE), todas las degeneraciones viteliformes maculares, incluyendo la enfermedad de Best, en los casos en que se presentan asociadas a neovasos retinianos y/o coroides, angiomas oculares como la enfermedad de von Hippel-Lindau, la enfermedad de Eale o la enfermedad de Coats,
- la enfermedad de Norrie (vitreo-retinopatía exudativa congénita),
- todas las formas de neovascularización coroidea, vasculopatías retinocoroideas polipoideas, con independencia de su presentación clínica; neovasos coroides retrofoveolares asociados a miopía, distrofia de Sorsby que está asociada prácticamente en todos los casos a neovasos coroides anormales,
- melanomas uveales, incluyendo los melanomas coroides y sus metástasis, y
- rubeosis del iris y glaucoma neovascular.

55 Sin embargo, el alcance de las enfermedades oculares neovasculares que son la diana del anticuerpo monoclonal CL1-R2, sus fragmentos conservadores y sus derivados conservados puede ser más amplio.

Preferentemente, las enfermedades neovasculares oculares (o las enfermedades oculares neovasculares) se seleccionan de entre el grupo que consiste de:

- todas las formas de neovascularización corneal, incluyendo las neovascularizaciones que se producen como complicaciones de los injertos corneales y/o de las infecciones corneales y/o de los insultos ambientales corneales seleccionados de entre infecciones por patógenos (tales como el herpes) y quemaduras químicas,
- todas las formas de retinopatía, incluyendo las formas diabéticas isquémica y edematosa, la retinopatía diabética del prematuro, las formas no proliferativas y proliferativas, el edema macular quistoide, todas las

formas de degeneración macular senil (DMAE), todas las degeneraciones maculares viteliformes, incluyendo la enfermedad de Best, angiomas oculares tales como la enfermedad de von Hippel-Lindau, la enfermedad de Eale y la enfermedad de Coats,

- 5 - la enfermedad de Norrie,
- todas las formas de neovascularización coroidea, las vasculopatías retinocoroideas polipoideas, los neovasos coroideos retrofoveolares asociados a miopía, la distrofia de Sorsby,
- 10 - los melanomas uveales, incluyendo los melanomas coroideos y las metástasis de los mismos, y
- la rubeosis del iris y el glaucoma neovascular.

15 Preferentemente, la invención se refiere a por lo menos un anticuerpo anti-CD160, preferentemente a un anticuerpo seleccionado de entre el anticuerpo monoclonal CL1-R2, sus fragmentos conservadores y sus derivados conservadores y un anticuerpo anti-VEGF, para el tratamiento y/o la prevención de todas las formas de degeneración macular senil (DMAE).

20 La expresión "prevención de una enfermedad" se refiere a la aparición de la enfermedad en un sujeto, en particular un ser humano, en el que todavía no se ha declarado la enfermedad.

La expresión "tratamiento de una enfermedad" se refiere a la reducción del desarrollo de la enfermedad o la inhibición de la misma, es decir, la detención de su desarrollo, la regresión o desaparición de los síntomas y consecuencias de la enfermedad, o el cese de las causas de la enfermedad.

25 Según una preparación combinada de la invención, el anticuerpo monoclonal CL1-R2, aunque también sus derivados conservadores y sus fragmentos conservadores, pueden utilizarse para prevenir y/o tratar las enfermedades neovasculares oculares.

30 Las expresiones "fragmentos conservadores" y "derivados conservadores" de un anticuerpo anti-CD160, se refieren, respectivamente, a fragmentos y derivados que conservan la afinidad y especificidad de unión de dicho anticuerpo, preferentemente CL1-R2, para CD160. Dichos fragmentos conservadores y derivados conservadores son equivalentes funcionales de dicho anticuerpo, preferentemente CL1-R2. Son "conservadores" porque se unen a sustancialmente el mismo epítipo que dicho anticuerpo, preferentemente CL1-R2 y/o pueden competir con dicho anticuerpo, preferentemente CL1-R2, para la unión a CD160, y conservan la especificidad de unión a CD160. Dicha especificidad de unión resulta suficiente para que los fragmentos conservadores o los derivados conservadores no se unan a otros receptores de HLA aparte de CD160.

40 El término "fragmento" de un anticuerpo anti-CD160, preferentemente CL1-R2, se refiere a una parte de dicho anticuerpo, tal como una cadena pesada, una cadena ligera, un VL, un VH, un Fab, un Fab', un F(ab)₂, un F(ab')₂ o dAb, pero también cualquier unidad mínima que consiste de residuos aminoácidos que imitan la región hipervariable, tal como una RDC (RDC1H, RDC2H, RDC3H, RDC1L, RDC2L, RDC3L). Los fragmentos de un anticuerpo anti-CD160 de la invención, preferentemente CD1-R2, son conservadores.

45 Sólo una parte del anticuerpo, es decir, la región variable, participa en la unión del anticuerpo a su epítipo. Las regiones constantes de los anticuerpos activan los efectores inmunológicos, fagocitos o células asesinas, así como el complemento, y estas regiones constantes no participan en la unión al antígeno. Un anticuerpo en el que la región constante (Fc) ha sido cortada enzimáticamente de manera que se conserva la región bisagra se denomina fragmento F(ab)₂ y conserva los dos sitios de unión a antígeno.

50 De manera similar, un anticuerpo en el que la región constante del mismo, incluyendo la región bisagra, ha sido cortada enzimáticamente, o que ha sido producido sin dicha región, se denomina fragmento Fab y conserva únicamente uno de los dos sitios de unión a antígeno. Los fragmentos Fab consisten de una cadena ligera que se encuentra unida covalentemente a una parte de la cadena pesada denominada Fd.

55 En la región variable existen regiones determinantes de la complementariedad (RDC, región determinante de complementariedad), también conocidas como regiones hipervariables, que interactúan directamente con el antígeno. De esta manera, la modificación de las RDC puede ayudar a modificar la afinidad de un anticuerpo. En la región variable existe un segundo tipo de región denominado región marco (RM, regiones marco), que mantienen la estructura terciaria de las RDC. Estas regiones marco son bastante específicas de la especie en la que ha sido producido el anticuerpo. En el fragmento Fd de la cadena pesada y de la cadena ligera, existen cuatro regiones marco (RM1-4) separadas, respectivamente, por tres RDC (RDC 1 a 3).

65 Los fragmentos conservadores del anticuerpo anti-CD160 de la preparación combinada de la invención comprenden además dAbs. Los dAbs (anticuerpos de dominio único) son anticuerpos que comprenden únicamente una cadena proteica que deriva de uno de los dos dominios de la estructura normal de un anticuerpo. En efecto, en

determinados casos, la mitad de un anticuerpo puede unirse a su antígeno diana con una afinidad comparable a la afinidad del anticuerpo de tipo salvaje.

5 Los fragmentos conservadores de un anticuerpo anti-CD160, preferentemente CL1-R2, según la invención pueden producirse utilizando métodos bien conocidos de la técnica anterior. Dichos fragmentos pueden obtenerse mediante métodos rutinarios, tales como una digestión proteolítica (por ejemplo la digestión con pepsina para generar F(ab')₂; la digestión con papaína para generar Fab).

10 Preferentemente, los fragmentos conservadores de CL1-R2 se seleccionan de entre Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂ y dAb de CL1-R2.

15 La expresión "derivado conservador" de CL1-R2 se refiere a un fragmento de CL1-R2, que preferentemente incluye por lo menos una RDC de CL1-R2, preferentemente por lo menos una RDC3 de CL1-R2, fusionada con por lo menos una secuencia diferente de la secuencia natural (por ejemplo una secuencia de conector de otra especie ...), presentando dicho derivado una afinidad de unión para CD160 comparable a la de CL1-R2, y una especificidad de unión a CD160 similar a la de CL1-R2.

20 Los derivados conservadores pueden obtenerse según el conocimiento general que posee el experto en la materia, mediante síntesis y/o ingeniería genética.

Un derivado conservador de la invención puede ser monovalente (un único sitio de unión a CD160) o multivalente (por lo menos dos sitios de unión a CD160). Entre los derivados multivalentes conservadores preferidos se incluyen derivados conservadores tetraivalentes.

25 Entre los derivados conservadores se incluyen anticuerpos quiméricos que pueden obtenerse mediante injerto de por lo menos un fragmento F_v de CL1-R2 o un fragmento F_c derivado de otro anticuerpo. El fragmento F_c preferentemente se selecciona para que resulte lo menos inmunorreactivo posible para el sujeto en el que se administra. Por ejemplo, en el caso de que el anticuerpo esté destinado a la administración en un ser humano, dicho fragmento F_c preferentemente es un fragmento F_c humano.

30 Entre los derivados conservadores de la invención se incluyen además anticuerpos humanizados que pueden obtenerse mediante injerto de por lo menos un CL1-R2 o una parte del mismo en un fragmento marco humano (RM_h). Nuevamente, el objetivo es obtener los anticuerpos menos inmunógenos posibles en el cuerpo en el que se administran.

35 Entre los derivados conservadores para la utilización en la invención se incluye además fragmentos variables de cadena sencilla F_v: se denominan scFv. Un fragmento variable de cadena sencilla, scFv, es una proteína de fusión que comprende las regiones variables de cadena ligera VL y de cadena pesada VH, conectadas mediante un conector corte de aproximadamente 25 aminoácidos. Los conectores apropiados son aquellos que permiten conformar estructuralmente los dominios VH y VL de la misma manera que la estructura original del anticuerpo CL1-R2 completo y mantener de esta manera la especificidad de unión. Dichos conectores son conocidos por el experto en la materia, por ejemplo a partir de la solicitud nº WO 88/01649 (Genex Corp.). El scFv puede ser monovalente o multivalente.

45 Entre los derivados conservadores de la invención se incluye además (scFv)₂, que son dímeros de scFv.

Entre los derivados conservadores de la invención se incluyen además anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos comprenden dos sitios de unión para dos antígenos diferentes. Comprenden por lo menos los dominios VH y VL para un antígeno y los dominios VH y VL para otro antígeno.

50 Preferentemente, los anticuerpos biespecíficos según la invención comprenden un sitio de unión a CD160 y un sitio de unión a VEGF.

Entre los derivados conservadores de la invención se incluyen además diacuerpos.

55 Los diacuerpos son una nueva clase de fragmentos pequeños de anticuerpo bivalente y biespecífico. Comprenden un dominio VH conectado a un dominio VL en la misma cadena polipeptídica (VH-VL) conectada mediante un conector peptídico que es excesivamente corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Esto fuerza el emparejamiento con los dominios complementarios de otra cadena y fomenta el ensamblaje de una molécula dimérica con dos sitios de unión a antígeno funcionales.

60 Para construir diacuerpos biespecíficos, los dominios VH del anticuerpo A y del anticuerpo B se fusionan para crear las dos cadenas VHA-VLB, VHB-VLA. Cada cadena es inactiva en la unión a antígeno, aunque recrea los sitios de unión a antígeno funcionales de los anticuerpos A y B con el apareamiento con la otra cadena.

65 Por ejemplo, un derivado conservador de CL1-R2 incluye un scFv que comprende por lo menos una región VH de

CL1-R2 unida a por lo menos una región VL de CL1-R2 mediante un conector peptídico L; el scFv puede presentar una orientación específica VL-L-VH o VH-VL-L.

5 Otro derivado conservador de CL1-R2 comprende un multímero de scFv derivado de CL1-R2 fusionado con un fragmento Fc.

Otro derivado conservador de CL1-R2 se obtiene mediante la adición de uno o más derivados Fab de CL1-R2 al extremo C-terminal de cada cadena pesada H de un CL1-R2 completo.

10 Otro derivado conservador de CL1-R2 se obtiene uniendo covalentemente anticuerpos CL1-R2 completos entre sí para construir una forma agregada.

Otro derivado conservador de CL1-R2 se obtiene uniendo dos o más Fab en orientación cabeza-a-cola.

15 Un scFv multivalente de la invención puede obtenerse mediante la unión de por lo menos dos scFv (por ejemplo (scFv)₂). La asociación puede ser covalente o no covalente. A título de ejemplo, pueden mencionarse los tetrámeros de scFv (4 sitios de unión a CD160). El interés de un scFv multivalente radica en la presencia de varios sitios de unión a CD160, que incrementan la capacidad de unión al antígeno.

20 El scFv multimérico puede ser monoespecífico, es decir, todos los sitios de unión del mismo presentan como diana CD160.

Alternativamente, el scFv multimérico puede comprender uno o más sitios de unión a CD160 y uno o más sitios de unión a otro antígeno de CD160. Por ejemplo, dicho antígeno puede ser VEGF.

25 Los métodos para producir scFv multimérico son conocidos en la técnica, por ejemplo del documento n° WO 94/13806 (The Dow Chemical Company) o del documento n° WO 93/11161 (Enzon Inc.).

30 Preferentemente, los derivados conservadores de CL1-R2 según la invención se seleccionan de entre scFv, (scFv)₂, los dímeros, scFv multimérico derivado de CL1-R2 y fusionado con un fragmento Fc, los anticuerpos CL1-R2 completos unidos entre sí para conseguir una forma agregada, y las formas de anticuerpo que comprenden por lo menos dos Fab unidos cabeza-a-cola.

35 El anticuerpo CL1-R2, uno de sus fragmentos conservadores o uno de sus derivados conservadores, puede encontrarse presentes en una composición farmacéutica o fármaco. Dicha composición farmacéutica comprende preferentemente un vehículo farmacéuticamente aceptable. La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a un material no tóxico que es compatible con un sistema biológico, tal como una célula, un cultivo celular, un tejido o un organismo, y que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica de otros principios activos de la composición. Las características del vehículo dependen del modo de administración.

40 La composición farmacéutica o fármaco puede encontrarse en cualquier forma administrable en el paciente e incluye soluciones, suspensiones, polvos liofilizados, cápsulas y comprimidos.

45 La composición farmacéutica o fármaco puede encontrarse en una forma consistente con una inyección, es decir, una inyección local, una administración a través de la mucosa, una inhalación, una administración oral y, más generalmente, cualquier formulación adecuada para el propósito pretendido. Preferentemente, la composición farmacéutica o fármaco se presenta en una forma consistente con una administración subconjuntival, subtenonal, intravítrea, subretiniana, intraorbital, intravenosa, intramuscular, subcutánea o intraocular.

50 Se describe además un método para tratar una enfermedad ocular neovascular en un sujeto, preferentemente un ser humano, en el que se administra en el sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de CL1-R2, un fragmento conservador del mismo o un derivado conservador del mismo. El anticuerpo CL1-R2, sus fragmentos conservadores o sus derivados conservadores, se administran en una cantidad terapéuticamente eficaz. Una cantidad terapéuticamente eficaz representa una cantidad suficiente para prevenir y/o tratar la enfermedad ocular neovascular diana. Dicha cantidad puede variar según edad, sexo del sujeto y el estadio de la enfermedad y será determinada por el experto en la materia. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede variar entre 0,01 mg/kg y 50 mg/kg, preferentemente entre 0,1 mg/kg y 20 mg/kg y más preferentemente entre 0,1 mg/kg y 2 mg/kg, preferentemente en una administración al mes.

60 El modo de administración puede ser mediante inyección o mediante infusión gradual. La inyección es preferentemente intravítrea.

65 Entre las preparaciones para la administración intravítrea pueden incluirse suspensiones o emulsiones estériles acuosas o no acuosas. Son ejemplos de solventes no acuosos, propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como el aceite de oliva o ésteres orgánicos inyectables tales como el oleato de etilo. Entre los vehículos acuosos se incluyen agua, soluciones de alcohol/agua, emulsiones o suspensiones.

El CL1-R2, uno de sus fragmentos conservadores o uno de sus derivados conservadores de la invención puede incluir además otro componente. Por ejemplo, CL1-R2, fragmentos conservadores del mismo o derivados conservadores del mismo pueden marcarse. Entre los ejemplos de marcadores se incluyen enzimas, isótopos radioactivos, compuestos fluorescentes, metales coloidales, compuestos quimioluminiscentes y compuestos bioluminiscentes. Los métodos para la unión de un marcador a un anticuerpo son bien conocidos por el experto en la materia.

Otra técnica de marcado consiste en acoplar los anticuerpos a haptenos de bajo peso molecular; estos haptenos pueden modificarse específicamente mediante una segunda reacción. Son ejemplos de haptenos, la biotina, que reacciona con la avidina, o el dinitrofenol, el piridoxal o la fluoresceína, que puede reaccionar con antihaptenos específicos.

En una forma de realización preferida, los anticuerpos de la invención pueden marcarse con una molécula o sustancia detectable, tal como una molécula fluorescente, una molécula radioactiva o cualesquiera otros marcajes conocidos de la técnica. Se conocen en la técnica marcados que proporcionan generalmente (directa o indirectamente) una señal.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "marcado" con respecto al anticuerpo pretende comprender el marcado directo del anticuerpo mediante acoplamiento (es decir, la unión física) de una sustancia detectable, tal como un agente radioactivo o un fluoróforo (por ejemplo isotiocianato de fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE) o indocianina (Cy5)) al anticuerpo, así como el marcaje indirecto del anticuerpo mediante reactividad con una sustancia detectable.

Los anticuerpos de la invención pueden marcarse con una molécula radioactiva mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, entre las moléculas radioactivas se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, un átomo radioactivo para estudios centellográficos tales como I^{123} , I^{124} , In^{111} , Re^{186} y Re^{188} . Los anticuerpos de la invención también pueden marcarse con un marcado de espín para la obtención de imágenes mediante resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como imágenes por resonancia magnética, IRM), tales como yodo-123, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: CL1-R2 inhibe la neovangiogénesis corneal en el conejo inducida por FCF2. Análisis cuantitativo de la neovascularización en córneas de control tratadas con IgG1 (control) y tratadas con CL1-R2. Los valores son de medias \pm SEM obtenidas de cuatro experimentos separados, $n=5$ conejos por grupo para cada experimento. $***P<0,0001$ (prueba de Mann-Whitney). Se evaluó la neovascularización 8 días después del injerto corneal de implantes que contenían FCF2. Se llevaron a cabo inyecciones subconjuntivales de CL1-R2 o IgG1 de control 24 y 72 h después de la implantación y se puntuó en una escala de 4 grados basada en la longitud de los vasos de nueva formación entre el limbo y los implantes que contienen FCF2.

Figuras 2A y B: CL1-R2 reduce la neovascularización retiniana en un modelo murino de retinopatía inducida por oxígeno. Evaluación cuantitativa de la vascularización retiniana (histología, recuentos en la sección retiniana) de ratones expuestos a condiciones hiperóxicas sin inyección (tratamiento simulado="mock", $n=6$) o mediante inyección intravítrea con IgG1 de control (control, 5 μ g, $n=9$) o CL1-R2 (5 μ g, $n=11$). Número medio de núcleos (A) de células endoteliales (CE) y luz del vaso (B). $**P<0,001$.

Figuras 3A y B: comparación entre la capacidad respectiva de CL1-R2 y bevacizumab/Avastin® para reducir la neovascularización retiniana en un modelo murino de retinopatía inducida por oxígeno. Evaluación cuantitativa de la vascularización retiniana. Se determinó el número medio de núcleos de células endotelial (A) y de luces de vaso (B) utilizando un modelo de regresión de Poisson para datos agrupados. Se muestran los intervalos de confianza al 95% del número medio de estimaciones como barras de error. Los valores de P se corrigieron para comparaciones post-hoc entre grupos mediante el método de Bonferroni. $*P<0,05$, $**P<0,001$.

Figura 4: efecto sinérgico de CL1-R2 y anticuerpo anti-VEGF sobre la inhibición de la neovascularización.

Resultados obtenidos en varios grupos de conejos que se administraron con:

- IgG1 sola (inyecciones de 25 μ g),
- Avastin® sola (dos inyecciones de 25 μ g),
- CL1-R2 sola (2 inyecciones de 25, 50 o 100 μ g),
- Avastin® combinado con IgG1, y

- Avastin® combinado con CL1-R2.

El grado corresponde a la longitud de los neovasos.

5 Figura 5: efecto de CL1-R2 en forma completa y CL1-R2 en forma de Fab'2.

La figura muestra el efecto de CL1-R2 en forma completa, los efectos de CL1-R2 en forma Fab'2 sobre la neovascularización corneal y los proporcionados por una IgG1 de control.

10 El grado corresponde a la longitud de los neovasos.

Figura 6: efectos de los mAb anti-CD160 de ratón y quimérico en un modelo de ratón de DMAE (NVC inducida por láser).

15 Los resultados obtenidos en varios grupos de ratones en los que se había administrado:

- IgG1 de isotipo de control de ratón,
- Kenacort retard 40®,
- 20 - CMX46.3 (mAb de rata anti-CD160 de ratón de cBioscience),
- Fab'2 de ratón anti-CD160 humano,
- 25 - IgG1 de ratón anti-CD160 humano, y
- IgG1 quimérico anti-CD160 humano.

Se estimó la superficie neovascular media.

30

Ejemplo 1:

Materiales y métodos

35 mAb CL1-R2 anti-CD160 murino. Se desarrolló e ImAb (IgG1) CL1-R2 anti-CD160 de ratón en el laboratorio de los presentes inventores y se evaluó como mAb anti-CD160 durante el taller "7th Human Leukocyte Differentiation Antigen Workshop" (26). Los presentes inventores produjeron el mAb CL1-R2 a partir de una línea celular de hibridoma secretora específica mediante la utilización del sistema de alta densidad celular CeLLine (Valdea Biosciences). Se desarrolló el anticuerpo monoclonal de isotipo de control IgG1 de ratón He6 mediante la
40 inmunización de ratones con antígeno superficial de virus de la hepatitis B (HB). Ambos anticuerpos, CL1-R2 e IgG1 de isotipo de control, se purificaron de manera similar, mediante cromatografía de afinidad en una columna de proteína G HiTrap™ (GE Healthcare) en un sistema purificador ÄKTA™, se dializaron frente a PBS, pH 7,0, se concentraron y se filtraron a través de filtros de 0,22 µm.

45 Animales. Los presentes inventores utilizaron ratones BALB/c, C57BL/6J y NMRI-nu (nu/nu) (Janvier Laboratories). Los ratones eran de 7 a 10 semanas de edad, excepto por los utilizados para los experimentos de retinopatía isquémica, que eran de siete días de edad. Los animales se alojaron en una sala convencional de temperatura controlada (21°C), se expusieron a un periodo diario de 12 horas de luz y oscuridad y se alimentaron *ad libitum* con una dieta equilibrada determinada por el laboratorio Jackson para la cepa de ratones C57BL6/J. Los presentes
50 inventores utilizaron conejos albinos New Zealand macho del Institut National de la Recherche Agronomique (Castanet-Tolosan). Para los experimentos con retinas de ratón, los animales fueron manipulados según las directrices del comité institucional de cuidados animales, siguiendo protocolos aprobados por el Ethics Committee y la ARVO Statement for use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. Todos los demás experimentos con animales se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices de la Unión Europea, previa aprobación por el comité ético local (Midi-Pyrénées, Francia).

Ensayo de angiogénesis corneal in vivo en el conejo. El ensayo de bolsillo corneal utilizado en el presente estudio ha sido descrito con anterioridad (28). Los presentes inventores realizaron una incisión en la cara superior de la córnea, a 2 mm del limbo, en conejos anestesiados. Se insertaron en este bolsillo implantes tratados con FCF2 (500 ng, R&D Systems). Se administraron inyecciones subconjuntivales de mAb CL1-R2 o IgG1 de control (100 µg en 30 µl de PBS) en la cara superior del limbo 24 y 72 horas después de la implantación corneal. Se midió la neovascularización corneal 8 días después de la implantación y se puntuó en una escala de cuatro grados basada en la longitud de los vasos de nueva formación desde el limbo hasta el implante que contenía FCF2 (28).

65 Modelo murino de retinopatía inducida por oxígeno e inyecciones intravítreas. Se indujo neovascularización retiniana en crías de ratón C57BL/6J utilizando un modelo bien establecido y reproducible de retinopatía inducida por oxígeno

(32). Brevemente, se introdujeron ratones (7 días de edad, P7) y sus madres lactantes en un incubador hermético al aire y se expusieron a una atmósfera de $75 \pm 2\%$ de oxígeno durante 5 días. Se realizó un seguimiento continuo del nivel de oxígeno con un analizador de oxígeno PROOX (modelo 110, BioSpherix). Se sacaron los ratones en P12 y se mantuvieron bajo condiciones normóxicas (aire ambiente) hasta P17. Los ratones recibieron una inyección intravítrea bajo un microscopio de disección. Con la excepción del grupo no inyectado, cada cría recibió una inyección intravítrea en el ojo izquierdo y en el ojo derecho en P12. Brevemente, se anestesiaron las crías de ratón con una inyección intramuscular de quetamina (100 mg/kg de peso corporal) y xilazina (10 mg/kg de peso corporal). Se abrieron las fisuras palpebrales con microtijeras y se dilataron las pupilas con fenilefrina al 10% tópica y tropicamida al 0,5%. Se atravesó la esclerótica con la punta de una aguja de acero de calibre 33 de 10 mm montada en una jeringa Hamilton de 5 μ l, en posición 1 mm posterior respecto al limbo esclero-corneal, hasta el interior del cuerpo vítreo. Se inyectó aproximadamente 1 μ l de mAb CL1-R2 (5 μ g/ μ l), bevacizumab (25 μ g/ μ l, Roche) o mAb IgG1 de isotipo de control (5 μ g/ μ l) en la cavidad vítrea.

Evaluación cualitativa y cuantitativa de la neovascularización retiniana. Se sacrificaron los ratones en P17 para analizar la neovascularización mediante mediciones histológicas y cuantitativas. Algunos ratones fueron sometidos a angiografía retiniana con fluoresceína-dextrano. Para dicha evaluación cualitativa, los presentes inventores anestesiaron crías de ratón tal como se ha indicado anteriormente y se perfundió el corazón a través del ventrículo izquierdo con 1 ml de PBS que contenía 50 mg/ml de dextrano marcado con fluoresceína (peso molecular medio: 2×10^6 , Sigma) que había sido clarificada mediante centrifugación durante 5 min. a 10.000 rpm. Se enuclearon los ojos y se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 3 horas. Se extirparon la córnea y el cristalino y se diseccionó la retina del globo ocular. Se cortó la retina en cuatro cuadrantes y se montaron planas en Vectashield bajo un cubreobjetos para el examen mediante microscopía de fluorescencia. Se examinaron por lo menos 12 ojos de cada tratamiento. Para el análisis histológico, se sacrificaron las crías de ratón, se enuclearon los ojos, se fijaron en paraformaldehído al 4% durante como mínimo 16 horas a 4°C y se incluyeron en parafina. Los presentes inventores prepararon secciones sagitales de 5 μ m con el micrótomos HM355 Microm Microtec, se tiñeron las secciones con reactivo de ácido peryódico de Schiff y se contratiñeron con H-E. Los presentes inventores contaron 5 a 8 secciones en cada lado del nervio óptico. Dos investigadores capacitados contaron en ciego el número de células endoteliales neovasculares y de luces de vasos en la muestra retiniana completa en cada sección intacta a una magnificación de $\times 100$. Se determinaron los números medios de núcleos de células endoteliales y los números de vasos utilizando un modelo de regresión de Poisson para datos agrupados; los intervalos de confianza al 95% de las estimaciones de número medio se representan como barras de error. Los valores de P se corrigieron para las comparaciones post-hoc entre grupos mediante el método de Bonferroni.

Estadísticas. Para los experimentos en modelo de ratón y de conejo, se analizaron datos cuantitativos (presentados como medias \pm SEM) con los programas GraphPad Prism 4 o Prism 5. Se determinó un valor medio para cada variable vascular (microscopía intravital y análisis histológico) para cada animal y estos valores se utilizaron para calcular la media global para todos los animales en cada grupo experimental. Antes de llevar a cabo las pruebas estadísticas, los presentes inventores determinaron si los datos presentaban una distribución normal y evaluaron la varianza de los mismos. A continuación, los presentes inventores llevaron a cabo las pruebas apropiadas, tal como se indica. Para los experimentos de curso temporal in vivo, los presentes inventores utilizando el análisis de ANOVA a dos vías o pruebas t de Student. Los presentes inventores proporcionan los datos de valores de P para cada prueba. Se consideró que $P < 0,05$ era estadísticamente significativo. Para los recuentos retinianos, debido a la presencia de dos niveles anidados de dependencia entre secciones histológicas procedentes del mismo ojo y el mismo ratón, se analizaron los recuentos de núcleos celulares y luces de vaso mediante un modelo mixto lineal generalizado de Poisson (59) con el proc GLIMMIX del paquete estadístico SAS v9.1.3 (Sas Institute). Los presentes inventores consideraron los grupos experimentales de tratamiento como factores de efecto fijo y los ojos individuales como efectos aleatorios. En el límite superior, se calculó una varianza empírica robusta de las estimaciones de efectos fijos (60) mediante la definición de los ratones como grupos. Se consideró que $P < 0,05$ era estadísticamente significativo.

Resultados

El mAb CL1-R2 inhibe la neovascularización ocular en córnea de conejo y en la retinopatía inducida por oxígeno en un modelo de ratón. Se evaluaron las propiedades antiangiogénicas del mAb CL1-R2 in vivo mediante la utilización de dos modelos animales diferentes de neoangiogénesis ocular. El ojo de los vertebrados presenta una ventaja en estos estudios en que se considera un sitio inmunoprivilegiado (31), encontrándose de esta manera posiblemente libre de células inmunológicas que pudieran unirse a CL1-R2. En primer lugar los presentes inventores utilizando un ensayo de bolsillo corneal de conejo (28) para determinar si CL1-R2 inhibía la neovascularización corneal inducida por el factor de crecimiento fibroblástico 2 (FCF2). La córnea normalmente se encuentra libre tanto de vasos sanguíneos como de vasos linfáticos y mantiene activamente esta avascularidad (31). En este modelo, resultan atraídos neovasos del limbo. Se evaluó la neovascularización ocho días después del trasplante de implantes corneales que contenían FCF2 y dos inyecciones subconjuntivales de 100 μ g de CL1-R2 o IgG1 de control. El tratamiento con CL1-R2 redujo significativamente la neovascularización corneal en comparación con los conejos tratados con IgG1 de control (figura 1). Estos resultados indican que el tratamiento de CL1-R2 inhibe la neovascularización corneal inducida por factor de crecimiento. A continuación, se investigó el efecto de CL1-R2 en un modelo de ratón de retinopatía humana del prematuro mediante la exposición de ratones neonatos prematuros

(P7-P12) a niveles de oxígeno elevados (32, 33). En 100% de estos animales el retorno a condiciones normóxicas indujo isquemia retiniana y vascularización prerretiniana dependiente del VEGF (32). En primer lugar se llevó a cabo una evaluación cualitativa de la vasculatura retiniana en retinas completas montadas planas y perfundidas con FITC-dextrano tras inyecciones intravítreas de CL1-R2 o de IgG1 de control (datos no representados). Las retinas procedentes de animales no tratados normales mostraban una vascularización normal, es decir, capas vasculares tanto superficiales como profundas que se extendían desde el nervio óptico hasta la periferia. Los vasos formaban un patrón de ramificación radical en la capa retiniana superficial y un patrón reticular poligonal en la capa retiniana profunda. Las retinas de los animales tratados con oxígeno sin inyección intraocular ('tratados simuladamente'='Mock') o con inyección intraocular de IgG1 de control ('Ctrl') mostraban penachos neovasculares que liberaban fluoresceína y presentaban vasos radiales tortuosos y una zona avascular central, consistente con descripciones anteriores de este modelo (32, 33). Tras la inyección intraocular de CL1-R2, se redujo drásticamente el tamaño de las áreas avasculares y las retinas contenían menos penachos neovasculares y menos vasos radiales tortuosos y dilatados (datos no mostrados), sugiriendo una mejor eficiencia de perfusión en los vasos centrales. Los ojos de los diversos animales no tratados o tratados con oxígeno se analizaron adicionalmente a partir de la histología. Se tiñeron secciones en serie de tejido ocular con reactivo ácido peryódico de Schiff para visualizar los núcleos de las células endoteliales (datos no representados). Al contrario que las retinas de los ratones en un ambiente normóxico (retina normal), las retinas de los ratones simuladamente tratados contenían típicamente abundantes microvasos longitudinales y transversales aberrantes de diversos tamaños en el espacio vítreo y en la retina interna, así como en los núcleos de las células endoteliales. Las retinas de los animales tratados con IgG de control mostraron una neovascularización similar, con abundantes microvasos y núcleos de células endoteliales aberrantes. En contraste, las retinas de los ratones en los que se había inyectado CL1-R2 presentaban significativamente menos vasos aberrantes, de tamaño reducido en gran medida, especialmente en el espacio vítreo y dentro de la retina, y menos núcleos de células endoteliales. Con el fin de cuantificar la neovascularización retiniana, se contaron los núcleos de células endoteliales y las luces de neovasos en un gran número de muestras antes y después de la administración de tratamientos antiangiogénicos o de control (figura 2, A y B). Estos son parámetros cruciales para evaluar con precisión cualquier efecto antiangiogénico. La inyección intravítrea de CL1-R2 redujo significativamente el número medio de núcleos de células endoteliales en cada sección tanto de capas de células ganglionares como de capas nucleares internas en comparación con los animales inyectados con IgG1 de control ($P<0,001$, figura 2A). Además, la inyección intraocular de CL1-R2 redujo el número medio de luces de vaso por sección en ~50% y ~35% en comparación con ratones tratados simuladamente ($P<0,001$) o de control tratados con IgG1 ($P<0,001$), respectivamente (figura 2B). A continuación, se comparó el efecto del tratamiento de CL1-R2 con el del mAb ampliamente utilizado bevacizumab en el mismo modelo de ratón con independencia de la controversia con respecto a la especificidad del bevacizumab en la neutralización de la VEGF-A murina (34). En efecto varios estudios han demostrado concluyentemente que el bevacizumab, a pesar de su débil afinidad para la VEGF-A producida por ratones, ratas, cobayas y conejos, resulta eficiente en el tratamiento de la neovascularización corneal inducida experimentalmente en estos animales (35-39). Además, un estudio reciente ha demostrado inequívocamente que el bevacizumab presenta un efecto inhibitorio muy significativo sobre la angiogénesis retiniana en el modelo de ratón de retinopatía inducida por oxígeno (40). Estos últimos resultados concuerdan totalmente con los de los presentes inventores. Tras la inyección intraocular de bevacizumab, se observó una vascularización retiniana normalizada en retinas montadas planas, comparable a la obtenida tras el tratamiento de CL1-R2 (datos no representados). El análisis cuantitativo indica que el número medio de luces de vaso por sección era inferior en los ratones inyectados con bevacizumab que en ratones de control tratados con IgG1 y no se observó diferencia significativa entre ratones tratados con CL1-R2 y ratones tratados con bevacizumab (figura 3, $P=0,93$).

Globalmente estos datos demuestran que la monoterapia de mAb CL1-R2 suprime eficazmente la angiogénesis patológica en córneas de conejo y en ratones con un modelo de retinopatía del prematuro.

Ejemplo 2: efecto sinérgico de CL1R2 y de anticuerpo anti-VEGF sobre la inhibición de la neovascularización

Los inventores evaluaron las propiedades antiangiogénicas del mAb CL1-R2 in vivo en combinación con un anticuerpo anti-VEGF (Avastin®) mediante la utilización de modelos de neoangiogénesis corneal con implantes tratados con FCF2 tal como en el ejemplo 1.

Con dicho propósito compararon los resultados obtenidos en varios grupos de conejos en los que se administró:

- IgG1 solo (inyecciones de 25 µg),
- Avastin® solo (dos inyecciones de 25 µg),
- CL1-R2 solo (2 inyecciones de 25, 50 o 100 µg),
- Avastin® en combinación con IgG1, y
- Avastin® en combinación con CL1-R2.

Cada grupo comprendía 4 conejos. El grado corresponde a la longitud de los neovasos.

Se muestran los resultados en la figura 4. Los inventores pusieron de manifiesto que la utilización de CL1-R2 conjuntamente con un anticuerpo anti-VEGF proporciona mejores resultados en la inhibición de la neovascularización en un modelo de neoangiogénesis ocular.

5 Dicho resultado indica que CL1-R2 y anti-VEGF resultan muy útiles en combinación en el tratamiento de las enfermedades oculares neovasculares, ya que su combinación proporciona una inhibición sinérgica de la neovascularización.

10 **Ejemplo 3: efecto de CL1-R2 en forma completa y CL1-R2 en forma Fab'2**

Los inventores compararon los efectos de CL1-R2 en forma completa y los efectos de CL1-R2 en forma Fab'2 sobre la neovascularización corneal. Con este fin se utilizó una IgG1 de control.

15 Se dan a conocer los resultados en la figura 5. El grado corresponde a la longitud de los neovasos. Los inventores han demostrado que CL1-R2 en forma completa proporciona los mejores resultados en la inhibición de la neovascularización en comparación con el efecto proporcionado por la IgG1 de control.

20 Pusieron de manifiesto además que la forma Fab'2 está altamente adaptada para la inhibición de la neovascularización, ya que proporciona mejores resultados que CL1-R2 en forma completa y la IgG1 de control.

Ejemplo 4: efectos del mAb anti-CD160 de ratón y quimérico en un modelo de ratón de DMAE

25 El objetivo del presente estudio era evaluar la eficacia terapéutica del mAb anti-CD160 de ratón y quimérico en la inhibición de la neovascularización ocular patológica en un modelo de ratón de neovascularización coroidea (NVC), reproduciendo muchas características de la DMAE. Se indujo la neoangiogénesis coroidea mediante la administración de impactos de láser de kriptón. Se evaluó la NVC cualitativamente mediante angiografía in vivo y cuantitativamente mediante mediciones directas del área de NVC sobre coroides montadas planas.

30 **Materiales y métodos**

Animales

35 Se obtuvieron ratones C57Bl/6J macho (6 semanas de edad) de Janvier Laboratories (Lassalle, QC). Los animales se alojaron en una sala de temperatura controlada (21°C) convencional, con un periodo diario de 12 h de luz. Se alimentaron *ad libitum* con una dieta equilibrada para la cepa de ratón C57BL6/J recomendada por Jackson Laboratories. Los animales se manipularon de acuerdo con las directrices del comité institucional de cuidado animal, siguiendo protocolos aprobados por la junta de revisión institucional y de acuerdo con la ARVO Statement for use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. Se realizó un seguimiento del estado general de los ratones, incluyendo su peso corporal, ingesta de alimentos y comportamiento, durante todo el experimento in vivo.

Modelo murino de NVC inducido por láser

45 Se generó NVC mediante ruptura inducida por láser de kriptón de la membrana de Bruch, tal como se ha indicado anteriormente (Tobe et al., 1998; Edelman JI, 2000; Montezuma S.R. et al., 2009). Los ratones fueron anestesiados mediante la inyección intramuscular de una mezcla de 100 mg/kg de ketamina (Ketamine 1000®, Virbac France, Carros, Francia) y 10 mg/kg de xilazina (Rompun 2%®, Bayer Pharma, Puteaux, Francia). Se anestesiaron córneas de ratón con hidrocloreuro de oxibuprocaína al 0,4% (Cebesine®, Chauvin Laboratory, Montpellier, Francia) y se dilataron las pupilas con gotas oculares de fenilefrina al 10% (Neosynephrine Faure 10%®, Pharmaster, Erstein, Francia) y tropicamida al 0,5% (Mydriaticum®, Farmila, Thea Farmaceutici, Settimo Milanese, Italia).

50 Se indujeron tres impactos inducidos por láser en un ojo de cada ratón (habitualmente en las posiciones de las 9, las 12 y las 3 del reloj en torno al disco óptico) con un láser de kriptón calibrado cuidadosamente para provocar roturas de la membrana de Bruch y la neovascularización coroidea secundaria que brotaba a partir del *choriocapillaris* (tamaño de punto: 50 µm; potencia: 400 mW; tiempo de exposición: 100 ms, Ophthalas, Biophysics Medical, Clermont Ferrand, Francia) y una lente de contacto. En todos los ojos tratados incluidos en el estudio, se observó una burbuja traumática reactiva en la superficie retiniana tras el tratamiento láser, demostrando que el enfoque era correcto y una indicación de la ruptura de la membrana de Bruch.

60 Protocolo de inyección intravítrea

Todos los procedimientos se llevaron a cabo bajo un microscopio de disección y cada animal recibió una inyección intravítrea en el ojo un día después de la administración de láser de kriptón.

Los ratones (de 6 semanas de edad) fueron asignados a 6 grupos:

Grupo 1: ratones tratados con mAb quimérico anti-CD160 humano (CL1-R2 quim., n=15),

5 Grupo 2: ratones tratados con mAb de ratón anti-CD160 humano (CL1-R2, n=17),

Grupo 3: ratones tratados con mAb IgG1 de isotipo de control de ratón (HE6, n=15),

10 Grupo 4: ratones tratados con mAb de rata anti-CD160 de ratón (CNX46-3, n=14),

Grupo 5: fragmento Fab'2 de ratones tratados con mAb de ratón anti-CD160 humano (Fab'2, n=15),

Grupo 6: ratones tratados con Kenacort retard 40® (Kenacort, n=15).

15 Los ratones fueron anestesiados mediante la inyección intramuscular de una mezcla de quetamina (100 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg). Se dilataron las pupilas con fenilefrina al 10% y tropicamida al 0,5% tópicos. Se atravesó la esclerótica con la punta de una aguja de acero de calibre 33 de 10 mm montada en una jeringa Hamilton de 5 µl, hasta una posición 1 mm posterior respecto al limbo esclero-corneal, en el cuerpo vítreo. Se inyectó 1 µl de cada producto en la cavidad vítrea:

20 - mAb quimérico anti-CD160 humano (10 µg/µl, lote nº 29120-00, MAT Biopharma),

- mAb de ratón anti-CD160 humano (10 µg/µl, lote nº 280910-00, MAT Biopharma),

25 - mAb IgG1 de isotipo de control de ratón (10 µg/µl, lote nº 191110-00, MAT Biopharma),

- mAb de rata anti-CD160 de ratón (10 µg/µl, eBioscience),

30 - Fragmento Fab'2 de mAb de ratón anti-CD160 humano (10 µg/µl, lote nº 191110-00, MAT Biopharma),

- Kenacort retard 40® (40 mg/ml, Bristol Myers Squibb, Francia).

Evaluación cualitativa y cuantitativa de la NVC

35 Catorce y veintiún días después de la administración de láser de kriptón, los ratones fueron sometidos a angiografía con fluoresceína para la evaluación cualitativa de la neovascularización coroidea. Los ratones fueron sacrificados 21 días después de la administración del láser de kriptón para el análisis cuantitativo de las muestras coroides montadas planas.

40 Angiografía *in vivo*. Se llevó a cabo una angiografía con fluoresceína catorce y veintiún días después de la inducción de impactos inducidos por láser. Los ratones fueron anestesiados tal como se ha indicado anteriormente y se realizaron fotografías en serie del fondo (Canon CF-60UVi, Haag-Streit, Chambéry, Francia) tras la inyección intraperitoneal de 0,5 ml de fluoresceína sódica al 10% (10% Faure®, Novartis Pharma, Rueil-Malmaison, Francia). La fuga de fluoresceína a partir de los vasos anormalmente permeables de nueva formación condujo al desarrollo de puntos hiperfluorescentes en los sitios de las lesiones inducidas por impacto de láser de kriptón, distinguiéndose claramente de las vasculaturas retiniana y coroidea normales.

45 Preparaciones montadas planas de coroides. Veintiún días después del tratamiento con láser, se llevó a cabo la perfusión cardiaca a través del ventrículo izquierdo con 300 µl de una solución 50 mg/ml de dextrano marcado con fluoresceína en PBS (isotiocianato de fluoresceína-dextrano, peso molecular medio: 2×10^6 , Sigma, Francia) clasificada mediante centrifugación durante 5 minutos a 10.000 rpm (1.110xg). Los ojos tratados con láser se enuclearon y se fijaron inmediatamente mediante incubación en paraformaldehído al 4% durante como mínimo 16 horas a 4°C. Se extirparon la córnea y el cristalino y la retina completa se diseccionó cuidadosamente del globo ocular. Se diseccionaron los globos de epitelio pigmentario retiniano-coroideas-esclerótica mediante cuatro a cinco incisiones radiales, se montaron planos sobre un portaobjetos en Vectashield y se cubrieron con un cubreobjetos para microscopía de fluorescencia con un objetivo x10 (Axioplan 2, Zeiss, Le Pecq, Francia). También se obtuvo una imagen calibrada. El área afectada por la neovascularización coroidea (en μm^2) se midió con el software Image J. Se calculó el promedio de las mediciones del área neovascular obtenido para múltiples lesiones de ojos individuales y en animales individuales.

60 Análisis estadístico

Se presentan los datos como medias \pm errores estándar. Se llevó a cabo el análisis estadístico utilizando pruebas paramétricas (análisis de la varianza ANOVA y prueba de PLSD de Fisher - software Statview, versión 5) para la detección de diferencias significativas entre grupos. Los valores de $P < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Resultados

5 Las tasas de mortalidad eran similares en los grupos durante el experimento: 3/17 (5,8%) en el grupo 2, 2/15 (13%) en el grupo 3, 1/14 (7,1%) en el grupo 4, 2/15 (13,3%) en el grupo 5 y ninguna muerte en los grupos 1 y 6. Las muertes se produjeron durante la anestesia o después de la misma para fotocoagulación láser o angiografía in vivo.

10 Posteriormente no se observó ninguna diferencia significativa de ganancia de peso corporal entre los ratones de los 6 grupos.

Se cuantificó la eficiencia del tratamiento mediante la medición directa del área que mostraba neovascularización coroidea en coroides montadas planas, tal como se ha indicado anteriormente (Edelman y Castro, 2000).

15 Se llevó a cabo el análisis de la superficie que mostraba NVC utilizando pruebas paramétricas (análisis de la varianza ANOVA y prueba de PLSD de Fisher). Se muestran los resultados en la figura 6. Las áreas de NVC eran significativamente menores en los ratones tratados con CL1-R2 (grupo 2, $P < 0,0001$) y los tratados con Fab'2 (grupo 5, $P = 0,0001$) que en ratones tratados con IgG1 de ratón de isotipo de control (grupo 3). Los tratamientos de Kenacort® (grupo 6, $P < 0,0001$), utilizado como control positivo y de CNX46-3 (grupo 4, $P < 0,0001$) mostraron efectos similares en comparación con el grupo de control de isotipo. El tratamiento con anticuerpo quimérico CL1-R2 redujo significativamente las áreas con NVC en comparación con las medidas en ratones tratados con anticuerpo de ratón de isotipo IgG1 ($P < 0,0001$). Cabe indicar que se observó un efecto similar en los tratamientos de CL1-R2 y CL1-R2 quimérico ($P = 0,9888$) y entre los tratamientos de Fab'2 y CL1-R2 o CL1-R2 quimérico ($P = 0,0951$ y $P = 0,0925$, respectivamente).

25 Las evaluaciones cuantitativas de la neovascularización sugirieron que los tratamientos de CL1-R2, CL1-R2 quimérico, Fab'2 y CNX46-3, i) reducen la superficie afectada por NVC en comparación con el tratamiento con anticuerpo de ratón de isotipo IgG1 de control, e ii) evitan la neovascularización coroidea en un modelo de ratón bien establecido de NVC inducida por láser de kriptón, así como en el control positivo (Kenacort®).

30 **Referencias**

En la presente solicitud, las referencias citadas son:

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

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

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

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

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

6. Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov*. 2007; 6(4):273-286.

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

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

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

55 10. Rosenfeld PJ, et al. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med*. 2006; 355(14):1419-1431.

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

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

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

14. Dastjerdi MH, et al. Topical bevacizumab in the treatment of corneal neovascularization: results of a prospective, open-label, noncomparative study. *Arch Ophthalmol.* 2009; 127(4):381-389.
- 5 15. Jacobs DS, Lim M, Carrasquillo KG, Rosenthal P. Bevacizumab for corneal neovascularization. *Ophthalmology.* 2009; 116(3):592-593; author reply 593-594.
16. Oh JY, Kim MK, Shin MS, Lee HJ, Lee JH, Wee WR. The anti-inflammatory effect of subconjunctival bevacizumab on chemically burned rat corneas. *Curr Eye Res.* 2009; 34(2):85-91.
- 10 17. Ueno S, et al. Prolonged blockade of VEGF family members does not cause identifiable damage to retinal neurons or vessels. *J Cell Physiol.* 2008; 217(1):13-22.
18. Salgaller ML. Technology evaluation: bevacizumab, Genentech/Roche. *Curr Opin Mol Ther.* 2003; 5(6):657-667.
- 15 19. Reichert JM, Valge-Archer VE. Development trends for monoclonal antibody cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2007; 6(5):349-356.
- 20 20. Gerber HP, Ferrara N. Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies. *Cancer Res.* 2005; 65(3):671-680.
21. Ellis LM, Hicklin DJ. VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat Rev Cancer.* 2008; 8(8):579-591.
- 25 22. Bergers G, Hanahan D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer.* 2008; 8(8):592-603.
23. Dorrell MI, Aguilar E, Schepke L, Barnett FH, Friedlander M. Combination angiostatic therapy completely inhibits ocular and tumor angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104(3):967-972.
- 30 24. Ratner M. Genentech discloses safety concerns over Avastin. *Nat Biotechnol.* 2004; 22(10):1198.
25. Chen HX, Cleck JN. Adverse effects of anticancer agents that target the VEGF pathway. *Nat Rev Clin Oncol.* 2009; 6(8):465-477.
- 35 26. Bensussan A. BY55 (CD160). *Protein Rev. Web.* 2000; 1(72-73).
27. Anumantha A, et al. Cloning of BY55, a novel Ig superfamily member expressed on NK cells, CTL, and intestinal intraepithelial lymphocytes. *J. Immunol.* 1998; 161(6):2780-2790.
- 40 28. Fons P, et al. Soluble HLA-G1 inhibits angiogenesis through an apoptotic pathway and by direct binding to CD160 receptor expressed by endothelial cells. *Blood.* 2006; 108(8):2608-2615.
29. Maeda M, et al. Murine CD160, Ig-like receptor on NK cells and NKT cells, recognizes classical and non classical MHC class I and regulates NK cell activation. *J. Immunol.* 2005; 175(4426-4432).
- 45 30. Giuriato S, et al. Development of a conditional bioluminescent transplant model for TPM3-ALK induced tumorigenesis as a tool to validate ALK-dependent cancer targeted therapy. *Cancer Biol Ther.* 2007; 6(8):1318-1323.
- 50 31. Cursiefen C. Immune privilege and angiogenic privilege of the cornea. *Chem Immunol Allergy.* 2007; 92(50-57).
32. Smith LE, et al. Oxygen-induced retinopathy in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1994; 35(1):101-111.
- 55 33. Economopoulou M, et al. Inhibition of pathologic retinal neovascularization by alpha-defensins. *Blood.* 2005; 106(12):3831-3838.
34. Yu L, et al. Interaction between bevacizumab and murine VEGF-A: a reassessment. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008; 49(2):522-527.
- 60 35. Bock F, et al. Bevacizumab as a potent inhibitor of inflammatory corneal angiogenesis and lymphangiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007; 48(6):2545-2552.
36. Habet-Wilner Z, Barequet IS, Ivanir Y, Moisseiev J, Rosner M. The inhibitory effect of different concentrations of topical bevacizumab on corneal neovascularization. *Acta Ophthalmol.* 2009.
- 65

37. Hashemian MN, Moghimi S, Kiumehr S, Riazi M, Amoli FA. Prevention and Treatment of Corneal Neovascularization: Comparison of Different Doses of Subconjunctival Bevacizumab with Corticosteroid in Experimental Rats. *Ophthalmic Res.* 2009; 42(2):90-95.
- 5 38. Hurmeric V, Mumcuoglu T, Erdurman C, Kurt B, Dagli O, Durukan AH. Effect of subconjunctival bevacizumab (Avastin) on experimental corneal neovascularization in guinea pigs. *Cornea.* 2008; 27(3):357-362.
39. Manzano RP, et al. Inhibition of experimental corneal neovascularisation by bevacizumab (Avastin). *Br J Ophthalmol.* 2007; 91(6):804-807.
- 10 40. Zhang Q, et al. Suppression of retinal neovascularization by the iNOS inhibitor aminoguanidine in mice of oxygen-induced retinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2009; 247(7):919-927.
- 15 41. Passaniti A, et al. A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor. *Lab Invest.* 1992; 67(4):519-528.
42. Asselin-Paturel C, et al. Transfer of the murine interleukin-12 gene in vivo by a Semliki Forest virus vector induces B16 tumor regression through inhibition of tumor blood vessel formation monitored by Doppler ultrasonography. *Gene Ther.* 1999; 6(4):606-615.
- 20 43. Hamano Y, et al. Thrombospondin-1 associated with tumor microenvironment contributes to low-dose cyclophosphamide-mediated endothelial cell apoptosis and tumor growth suppression. *Cancer Res.* 2004; 64(5):1570-1574.
- 25 44. Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science.* 2005; 307(5706):58-62.
45. Jain RK, Munn LL, Fukumura D. Dissecting tumour pathophysiology using intravital microscopy. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2(4):266-276.
- 30 46. Koehl GE, Gaumann A, Geissler EK. Intravital microscopy of tumor angiogenesis and regression in the dorsal skin fold chamber: mechanistic insights and preclinical testing of therapeutic strategies. *Clin Exp Metastasis.* 2009; 26(4):329-344.
- 35 47. Heymans O, Fissette J, Vico P, Blacher S, Masset D, Brouers F. Is fractal geometry useful in medicine and biomedical sciences? *Med Hypotheses.* 2000; 54(3):360-366.
48. Hamzah J, et al. Vascular normalization in Rgs5-deficient tumours promotes immune destruction. *Nature.* 2008; 453(7193):410-414.
- 40 49. Man S, et al. Antitumor effects in mice of low-dose (metronomic) cyclophosphamide administered continuously through the drinking water. *Cancer Res.* 2002; 62(10):2731-2735.
- 45 50. Greenberg JI, et al. A role for VEGF as a negative regulator of pericyte function and vessel maturation. *Nature.* 2008; 456(7223):809-813.
51. Padera TP, Stoll BR, Tooredman JB, Capen D, di Tomaso E, Jain RK. Pathology: cancer cells compress intratumour vessels. *Nature.* 2004; 427(6976):695.
- 50 52. Lin MI, Sessa WC. Antiangiogenic therapy: creating a unique "window" of opportunity. *Cancer Cell.* 2004; 6(6):529-531.
53. Barakonyi A, et al. Cutting edge: engagement of CD160 by its HLA-C physiological ligand triggers a unique cytokine profile secretion in the cytotoxic peripheral blood NK cell subset. *J Immunol.* 2004; 173(9):5349-5354.
- 55 54. Le Bouteiller P, et al. Engagement of CD160 receptor by HLA-C is a triggering mechanism used by circulating natural killer (NK) cells to mediate cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99(16963-16968).
55. Ambati BK, et al. Corneal avascularity is due to soluble VEGF receptor-1. *Nature.* 2006; 443(7114):993-997.
- 60 56. Cao Y, Langer R. Optimizing the delivery of cancer drugs that block angiogenesis. *Sci Transl Med.* 2010; 2(15):15ps13.
57. Makale M. Intravital imaging and cell invasion. *Methods Enzymol.* 2007; 426(375-401).
- 65 58. Elie N, Kaliski A, Peronneau P, Opolon P, Roche A, Lassau N. Methodology for quantifying interactions between

perfusion evaluated by DCE-US and hypoxia throughout tumor growth. *Ultrasound Med Biol.* 2007; 33(4):549-560.

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

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

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo anti-CD160 y anticuerpo anti-VEGF como una preparación combinada para la utilización simultánea, separada o secuencial para tratar y/o prevenir las enfermedades oculares neovasculares.
2. Preparación combinada para la utilización según la reivindicación 1, en la que dicho anticuerpo anti-CD160 induce la muerte celular de las células endoteliales proliferantes activadas.
3. Preparación combinada para la utilización según la reivindicación 1 o 2, en la que dicho anticuerpo anti-CD160 es un compuesto seleccionado de entre anticuerpos monoclonales anti-CD160, fragmentos conservadores seleccionados de entre un Fab, un Fab', un F(ab)₂, F(ab')₂ y dAb de CL1-R2 y derivados conservadores de CL1-R2 seleccionados de entre el scFv, el (scFv)₂, los diacuerpos, el scFv multimérico derivado de CL1-R2 y fusionado con un fragmento Fc y los anticuerpos que contienen por lo menos dos Fab unidos cabeza con cola, en la que CL1-R2 es un anticuerpo que puede obtenerse a partir del híbridoma depositado como CNCM I-3204.
4. Preparación combinada para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicho anticuerpo anti-CD160 es un compuesto seleccionado de entre el anticuerpo monoclonal CL1-R2, sus fragmentos conservadores seleccionados de entre un Fab, un Fab', un F(ab)₂, un F(ab')₂ y dAb de CL1-R2 y sus derivados conservadores seleccionados de entre el scFv, el (scFv)₂, los diacuerpos, el scFv multimérico derivado de CL1-R2 y fusionado con un fragmento Fc, y los anticuerpos que contienen por lo menos dos Fab unidos cabeza-con-cola, en la que CL1-R2 es un anticuerpo que puede obtenerse a partir del híbridoma depositado como CNCM I-3204.
5. Preparación combinada para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada por que la enfermedad ocular neovascular se selecciona de entre:
- todas las formas de neovascularizaciones corneales;
 - todas las formas de retinopatías;
 - la enfermedad de Norrie;
 - todas las formas de neovascularizaciones coroideas, las vasculopatías polipoideas retinocoroideas, los neovasos coroideos retrofoveolares asociados a miopía y la distrofia de Sorsby;
 - los melanomas uveales; y
 - la rubeosis del iris y el glaucoma neovascular.
6. Preparación combinada para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada por que la enfermedad ocular neovascular se selecciona de entre:
- las neovascularizaciones que se producen como complicaciones de injertos corneales y/o infecciones corneales y/o agresiones ambientales corneales seleccionadas de entre infecciones por patógenos y quemaduras químicas;
 - las retinopatías diabéticas isquémicas y edematosas, la retinopatía diabética del prematuro, las formas no proliferativas y proliferativas de las retinopatías, el edema quistoide macular, todas las formas de degeneración macular senil (AMD), todas las degeneraciones viteliformes maculares incluyendo la enfermedad de Best; los angiomas oculares como la enfermedad de Von Hippel-Lindau; la enfermedad de Eale; la enfermedad de Coats;
 - la enfermedad de Norrie;
 - todas las formas de neovascularizaciones coroideas, vasculopatías polipoideas retinocoroideas, neovasos coroideos retrofoveolares asociados a miopía y la distrofia de Sorsby;
 - los melanomas coroideos y sus metástasis; y
 - la rubeosis del iris y el glaucoma neovascular.
7. Preparación combinada para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para la utilización para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades oculares neovasculares en un sujeto que no responde al tratamiento anti-VEGF.
8. Preparación combinada para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para la utilización para el tratamiento de la degeneración macular senil (AMD).

9. Preparación combinada para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8, caracterizada por que el compuesto es el anticuerpo monoclonal CL1-R2, en la que CL1-R2 es un anticuerpo que puede obtenerse a partir del hibridoma depositado como CNCM I-3204.

5

10. Preparación combinada para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8, caracterizada por que el derivado conservador es un scFv monovalente o multivalente.

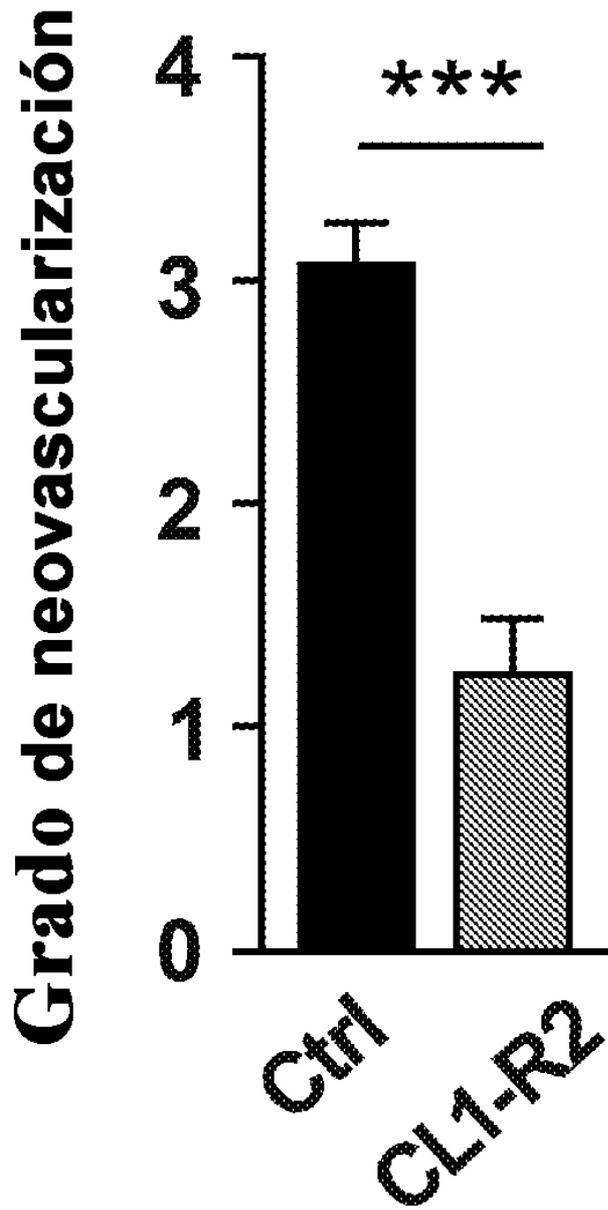
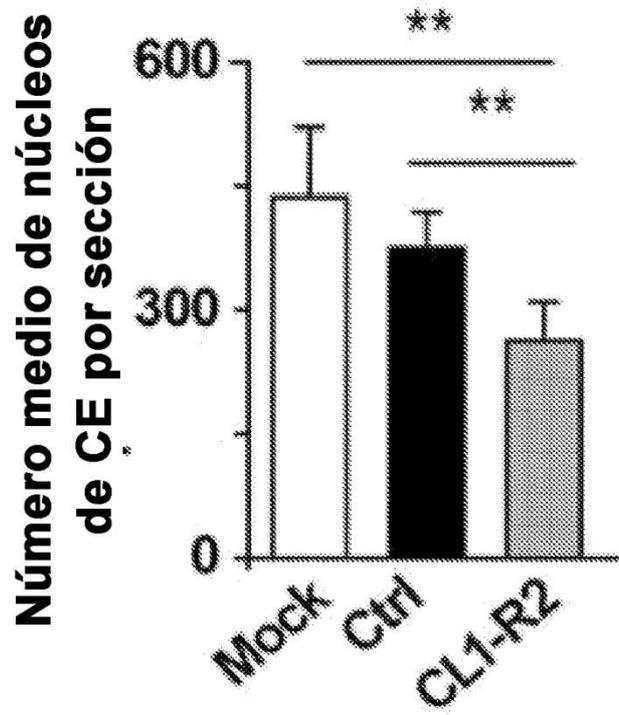


Figura 1

A



B

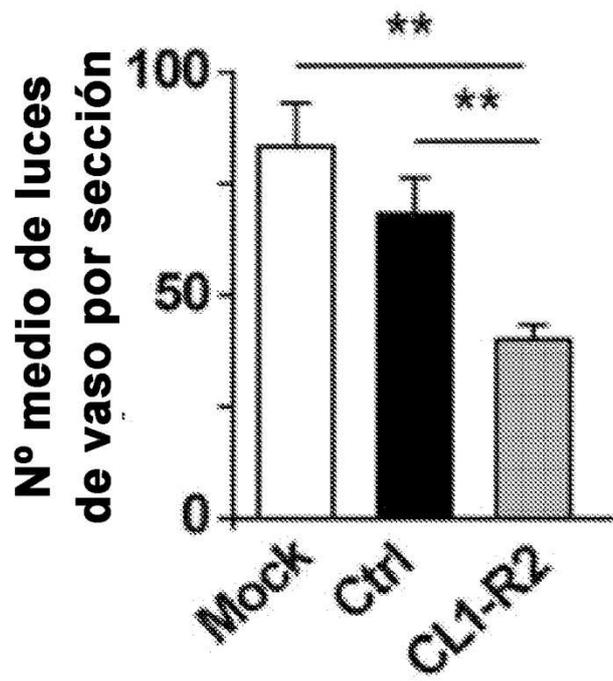


FIGURA 2

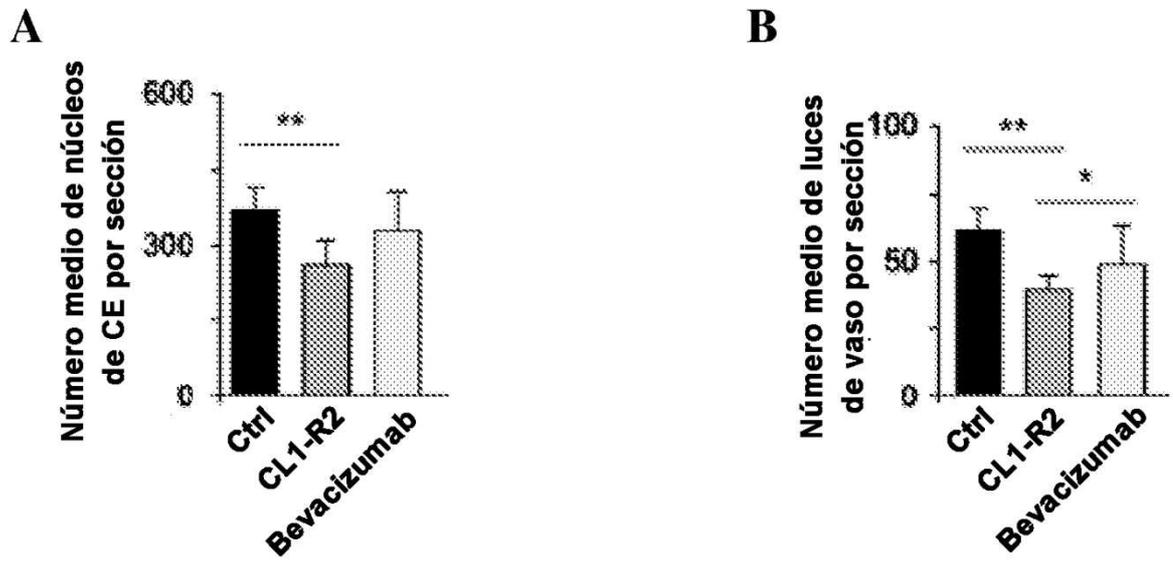


Figura 3

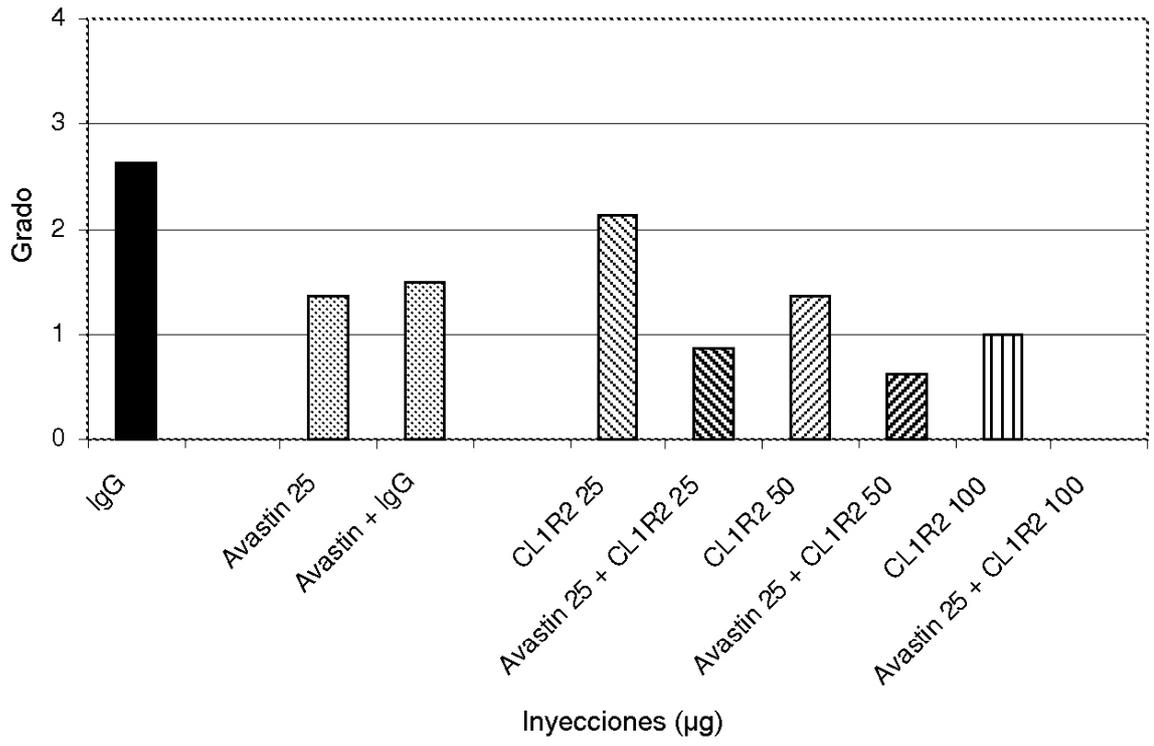
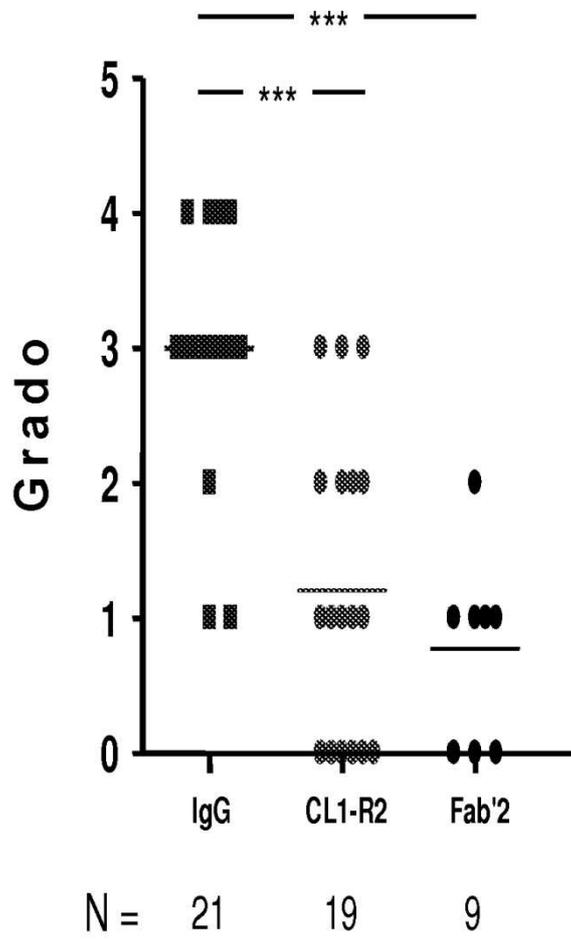


Figura 4



*** P < 0,001

Figura 5

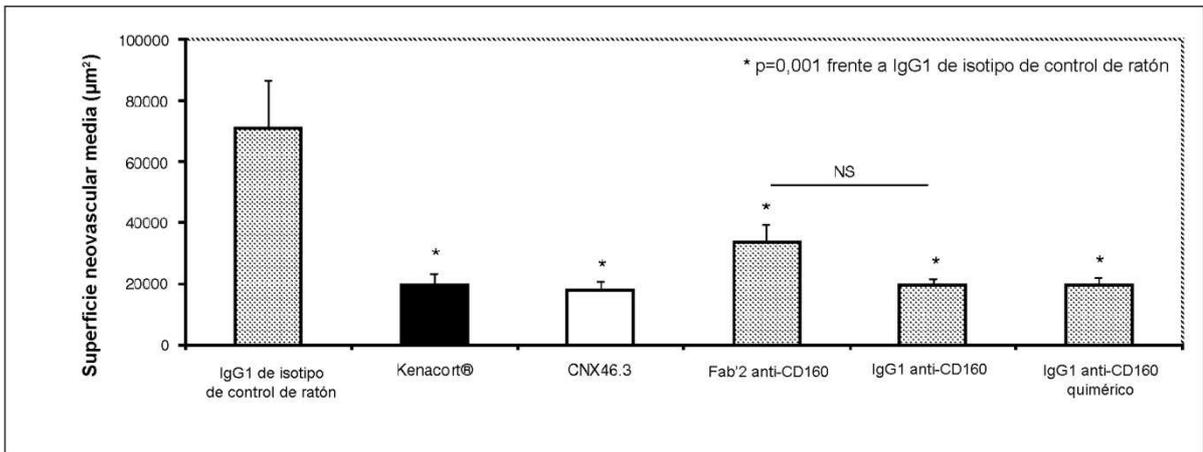


Figura 6