



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104288764 A

(43) 申请公布日 2015. 01. 21

(21) 申请号 201310295008. 0 *A61P 27/02* (2006. 01)

(22) 申请日 2013. 07. 15 *C12Q 1/68* (2006. 01)

G01N 33/68 (2006. 01)

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所
地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

(72) 发明人 阎锡蕴 王平 罗永挺 段红霞
冯静 杨东玲 宋丽娜

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006. 01)

A61K 48/00 (2006. 01)

A61P 9/10 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书6页

序列表1页 附图2页

(54) 发明名称

CD146 作为预防和 / 或治疗缺血性眼部疾病的药物靶点的应用

(57) 摘要

本发明公开了 CD146 的一种新用途。该新用途是 CD146 作为治疗缺血性眼部疾病的药物靶点的应用。本发明首次提出 CD146 是缺血性眼部疾病的药物靶点。实验证明, CD146 在患有缺血性眼部疾病小鼠的视网膜中过度表达; 而 CD146 被特异性敲除后能够显著抑制发病小鼠视网膜血管的迂曲、扩张和渗漏, 进而减轻疾病的严重程度。抗 CD146 的抗体 AA98 及抑制其表达的 microRNA miR-329 也能有效预防和/或治疗缺血性眼部疾病。AA98 或 miR-329 能够减轻发病鼠的视网膜血管迂曲扩张、渗漏以及血管呈簇状异常生长的严重程度, 使视网膜形态与结构正常化, 从而缓解眼底出血、视力模糊和视野缺失等临床症状, 并抑制疾病的发生发展。这些结果表明 CD146 是缺血性眼部疾病的重要治疗靶点, 对今后的该类疾病的药物开发和预防治疗具有重要意义。

1. 蛋白 CD146 作为靶点在开发或筛选或制备用于预防和 / 或治疗缺血性眼部疾病的药物中的应用。
2. 蛋白 CD146 作为靶点在制备用于预防和 / 或治疗缺血性眼部疾病的筛药模型中的应用。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的应用,其特征在於:所述缺血性眼部疾病为早产儿视网膜病变、糖尿病视网膜病变、年龄相关性黄斑病变或新生血管性青光眼。
4. 根据权利要求 1-3 任一所述的应用,其特征在於:所述缺血性眼部疾病为缺血性眼底病变。
5. 根据权利要求 1-4 任一所述的应用,其特征在於:所述缺血性眼底病变为视网膜病变或脉络膜病变。
6. 根据权利要求 1-5 任一所述的应用,其特征在於:所述视网膜病变为视网膜血管新生或视网膜血管迂曲扩张或视网膜血管渗漏或视网膜出血。
7. 根据权利要求 1-6 任一所述的应用,其特征在於:所述脉络膜病变为脉络膜血管新生或脉络膜血管迂曲扩张或脉络膜血管渗漏或脉络膜出血。

CD146 作为预防和 / 或治疗缺血性眼部疾病的药物靶点的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及 CD146 作为预防和 / 或治疗缺血性眼部疾病的药物靶点的应用。

背景技术

[0002] 缺血可引起多种代谢物质的缺乏,但最为紧急、损害最重的病变是由缺氧所致。在绝大多数情况下,缺血性病变的核心为缺氧性损害。大量研究报道,视网膜和脉络膜缺血、缺氧是缺血性眼部疾病的重要驱动因素,是导致视力下降和丧失的重要原因(1,2)。常见的该类眼部疾病包括早产儿视网膜病变(retinopathy of prematurity, ROP)、年龄相关性黄斑病变(age-related macular degeneration, AMD)、糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)、新生血管性青光眼(neovascular glaucoma, NVG)等。上述疾病在全球发病率呈上升趋势,是儿童、成年人和老年人各年龄段致盲的首要原因(3-6)。

[0003] 氧诱导的视网膜病变小鼠和大鼠模型(OIR)是经典的缺血性眼部疾病的动物模型。OIR 模型诱导过程中,鼠眼睛组织内的缺血缺氧导致眼底血管异常成簇状生长,血管迂曲、扩张和渗漏。这些缺血性眼部病变会导致眼底出血、视力模糊和视野缺失等临床症状。(2,7)

[0004] CD146 是一种细胞粘附分子,CD146 是 I 型膜蛋白,属于免疫球蛋白超家族。

[0005] 1. Dorrell M, Uusitalo-Jarvinen H, Aguilar E, Friedlander M. 2007. Ocular neovascularization: basic mechanisms and therapeutic advances. *Surv Ophthalmol* 52(Suppl 1): S3-19.

[0006] 2. Sapiha P, Joyal JS, Rivera JC, Kermorvant-Duchemin E, Sennlaub F, Hardy P, Lachapelle P, Chemtob S. 2010. Retinopathy of prematurity: understanding ischemic retinal vasculopathies at an extreme of life. *J Clin Invest* 120: 3022-3032.

[0007] 3. Gilbert C. 2008. Retinopathy of prematurity: a global perspective of the epidemics, population of babies at risk and implications for control. *Early Hum Dev* 84: 77-82.

[0008] 4. Xu J, Wei WB, Yuan MX, Yuan SY, Wan G, Zheng YY, Li YB, Wang S, Xu L, Fu HJ, Zhu LX, Pu XL, Zhang JD, Du XP, Li YL, Ji Y, Gu XN, Li Y, Pan SF, Cui XL, Bai W, Chen YJ, Wang ZM, Zhu QS, Gao Y, Liu de Y, Ji YT, Yang Z, Jonas JB. 2012. Prevalence and risk factors for diabetic retinopathy: the Beijing Communities Diabetes Study 6. *Retina* 32: 322-329.

[0009] 5. Cheung CM, Tai ES, Kawasaki R, Tay WT, Lee JL, Hamzah H, Wong TY. 2012. Prevalence of and risk factors for age-related macular degeneration in a multiethnic Asian cohort. *Arch Ophthalmol* 130: 480-486.

[0010] 6. Olmos LC, Lee RK. 2011. Medical and surgical treatment of neovascular

glaucoma. *Int Ophthalmol Clin*51:27-36.

[0011] 7. Grossniklaus HE, Kang SJ, Berglin L. 2010. Animal models of choroidal and retinal neovascularization. *Prog Retin Eye Res*29:500-519.

发明内容

[0012] 本发明的目的是提供一种 CD146 作为靶点在制备预防和 / 或治疗缺血性眼部疾病的药物中的应用。

[0013] 上述应用中,所述缺血性眼部疾病可为早产儿视网膜病变、糖尿病视网膜病变、年龄相关性黄斑病变或新生血管性青光眼。

[0014] 上述应用中,所述缺血性眼部疾病可为缺血性眼底病变。

[0015] 上述应用中,所述缺血性眼底病变可为视网膜病变或脉络膜病变。

[0016] 上述应用中,所述视网膜病变可为视网膜血管迂曲扩张或视网膜血管渗漏或视网膜出血。

[0017] 上述应用中,所述视网膜病变可为视网膜血管新生或视网膜血管从视网膜迁移到玻璃体腔。

[0018] 上述应用中,所述脉络膜病变可为脉络膜血管迂曲扩张或脉络膜血管渗漏或脉络膜出血。

[0019] 上述应用中,所述脉络膜病变可为脉络膜血管新生。

[0020] 本发明首次提出 CD146 是缺血性眼部疾病的药物靶点。实验证明, CD146 在患有缺血性眼部疾病小鼠的视网膜中过度表达;而 CD146 被特异性敲除后能够显著抑制发病小鼠视网膜血管的迂曲、扩张和渗漏,进而减轻疾病的严重程度。抗 CD146 的抗体 AA98 及抑制其表达的 microRNA miR-329 也能有效预防和治疗缺血性眼部疾病。AA98 或 miR-329 能够减轻发病鼠的视网膜血管迂曲扩张、渗漏以及血管呈簇状异常生长的严重程度,使视网膜形态与结构正常化,从而缓解眼底出血、视力模糊和视野缺失等临床症状,并抑制疾病的发生发展。这些结果表明 CD146 是缺血性眼部疾病的重要治疗靶点,对今后的该类疾病的药物开发和预防治疗具有重要意义。

附图说明

[0021] 图 1 为正常小鼠和 OIR 模型小鼠的视网膜表型,显示 OIR 小鼠模型构建成功。

[0022] 图 2 为在 OIR 小鼠的视网膜中,CD146 的 mRNA 表达显著上调。

[0023] 图 3 为在 OIR 小鼠的视网膜中,CD146 的蛋白表达显著上调。

[0024] 图 4 为 CD146 基因特异性敲除后能够明显减轻 OIR 小鼠的发病程度。

[0025] 图 5 为 miR-329 基因治疗显著抑制 OIR 小鼠视网膜血管的迂曲、扩张和出血。

[0026] 图 6 为 miR-329 基因治疗能够抑制 OIR 小鼠视网膜中 CD146 的过度表达。

[0027] 图 7 为抗 CD146 抗体 AA98 能够预防 OIR 小鼠疾病的发生发展。

[0028] 图 8 为抗 CD146 抗体 AA98 治疗能够显著减轻 OIR 小鼠的发病程度。

[0029] 图 9 为抗 CD146 抗体 AA98 能够特异性识别 CD146。

具体实施方式

- [0030] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。
- [0031] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。
- [0032] 下述实施例中进行视网膜荧光铺片实验均按照如下步骤进行:1、将小鼠麻醉,左心室心脏灌注 600 μ 150mg/ml 的 FITC 荧光标记的 dextran,此时小鼠的全身血管都灌注有荧光分子。2、将小鼠的眼睛剥离,4% 多聚甲醛固定 1 小时。3、剥离视网膜,并用剪刀剪成四叶草状。用体式荧光显微镜观察并拍照。
- [0033] 实施例 1、CD146 在患有缺血性眼部疾病的小鼠视网膜上过度表达
- [0034] 一、构建 OIR 小鼠模型
- [0035] 我们以氧诱导的视网膜病变小鼠(OIR 小鼠)为缺血性眼部疾病的动物模型。将出生后第 7 天的 C57BL/6J 乳鼠(P7)和母鼠放入含 75% 氧气的高氧培养箱中 5 天,在第 12 天(P12)将其从氧箱中取出,放在正常氧气(21% 氧气)中饲养,造成相对低氧的环境。在第 17 天(P17)的乳鼠即为模型鼠。
- [0036] 将正常鼠(未经任何诱导的 C57BL/6J 小鼠)和模型鼠进行视网膜荧光铺片实验。结果如图 1 所示。结果显示,与正常鼠相比,模型鼠(OIR)的视网膜血管呈现明显的迂曲、扩张和渗漏,并成血管簇状异常生长。视网膜血管的荧光渗漏点表示视网膜出血严重。以上视网膜形态结构的异常表示模型构建成功。
- [0037] 二、CD146 的实时荧光定量 PCR
- [0038] 将出生后第 17 天(P17)的模型鼠和正常鼠的视网膜剥离,利用实时荧光定量 PCR 对 CD146 进行定量分析。
- [0039] (一)取 P17 的模型鼠的两个视网膜为一个样品,每个样品加入 1ml Trizol,用匀浆器将视网膜打碎,室温放置 5 分钟。同样取正常鼠的两个视网膜为一个样品进行上述处理。
- [0040] (二)将两个样品分别移入 EP 管,每管加入 200 μ 1 三氯甲烷,用手上下颠倒 EP 管使管中的液体乳化。
- [0041] (三)将 EP 管 4 $^{\circ}$ C,12000rpm 离心 15 分钟。
- [0042] (四)分别将上层透明液体转移至新管,加入一倍体积的预冷异丙醇混匀,-20 $^{\circ}$ C 静置 2 小时。
- [0043] (五)4 $^{\circ}$ C,12000rpm 离心 15 分钟,弃上清。
- [0044] (六)将沉淀分别用 70% 乙醇洗一次并再次离心,得到两种沉淀,即 P17 的模型鼠和正常鼠的视网膜 RNA。将两种沉淀晾干。
- [0045] (七)分别加入适量无 RNA 酶的水溶解 RNA。
- [0046] (八)分别取 2 μ g P17 的模型鼠和正常鼠的 RNA 反转录为 cDNA。
- [0047] (九)利用两种 cDNA 进行实时荧光定量 PCR (方法按照 SYBR green PCR master mix 试剂盒的说明书),GAPDH 作为表达内参。

[0048]

mCD146	Sense	TCAATGGTTCGGCAACTGAATGGA
	Antisense	GGGAGTTGGAGGCTGTACACTCTGCACC
mGAPDH	Sense	CTCACTCAAGATTGTCAGCA
	Antisense	GTCTTCTgGGTGGCAGTGAT

[0049] PCR 扩增条件:95 $^{\circ}$ C,5 分钟;95 $^{\circ}$ C 30s,55 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 20s,40 个循环。

[0050] (十)用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行定量分析。

[0051] 结果如图 2 所示。结果表明,与正常鼠相比,P17 模型鼠的视网膜中 CD146 的 mRNA 的表达明显上调。

[0052] 三、Western-blot 检测 CD146 蛋白表达量。

[0053] 结果如图 3 所示,显示 p17 模型鼠的视网膜中 CD146 的蛋白的表达明显上调。GADPH 为表达内参。

[0054] 实施例 2、CD146 基因特异性敲除抑制缺血性眼部疾病的发生发展

[0055] CD146 内皮特异性敲除小鼠(CD146^{EC-KO})是将正常 C57BL/6J 小鼠中的 CD146 编码基因敲除得到的小鼠,该小鼠在“Duan H, Xing S, Luo Y, Feng L, Gramaglia I, Zhang Y, Lu D, Zeng Q, Fan K, Feng J, Yang D, Qin Z, Couraud PO, Romero IA, Weksler B, Yan X. 2013. Targeting endothelial CD146 attenuates neuroinflammation by limiting lymphocyte extravasation to the CNS. *Sci Rep*3:1687.”中公开过。

[0056] 本实施例中的非敲除小鼠(WT)为野生型的 C57BL/6J 小鼠,记作正常鼠。

[0057] 一、将 CD146 特异性敲除小鼠(CD146^{EC-KO})和非敲除小鼠(WT)均构建 OIR 模型。

[0058] 方法如实施例 1 的步骤一。

[0059] 二、视网膜荧光铺片实验。

[0060] 图 4 所示为正常 CD146^{EC-KO}、正常 WT, OIR-CD146^{EC-KO} 和 OIR-WT 的视网膜表型。

[0061] 结果表明,与 WT 小鼠相比, OIR-WT 小鼠的视网膜血管呈现明显的迂曲、扩张和渗漏并成血管簇状异常生长,视网膜出血严重。与 OIR-WT 小鼠相比, OIR-CD146^{EC-KO} 小鼠视网膜血管迂曲、扩张、渗漏和异常成簇状生长的严重程度明显减轻,视网膜出血症状也减轻,呈现较好的视网膜形态。

[0062] 上述实验表明, CD146 被敲除后能够有效减缓 OIR 小鼠疾病的严重程度,揭示 CD146 在缺血性眼部疾病视网膜中的过度表达能够促进疾病的发展。

[0063] 实施例 3、miR-329 能够有效治疗缺血性眼部疾病

[0064] 一、构建 OIR 小鼠疾病模型:与实施例 1 中步骤一相同。

[0065] 二、miR-329 注射后显著减轻了 OIR 小鼠疾病的严重程度

[0066] 在乳鼠出生后第 12 天,将修饰过的鼠 miR-329(5 μg/μl, 1 μl)、对照 miRNA(5 μg/μl, 1 μl) 或溶剂对照 0.9%NaCl (1 μl) 的水溶液注射到乳鼠眼睛玻璃体腔内。在第 17 天,对乳鼠视网膜进行荧光铺片分析。

[0067] 小鼠 miR-329 序列:5' -AACACACCCAGCUAACCUUUUU-3' (SEQ ID No. 1);

[0068] 对照 miRNA 为线虫 miR-239b,与人、小鼠、大鼠的 miRNA 具有最小同源性。

[0069] 对照 miRNA 序列:5' -UUUGUACUACACAAAAGUACUG-3' (SEQ ID No. 2);

[0070] 以下实验均使用双链的小鼠 miR-329 和对照 miRNA,并分别对其序列进行如下修饰:2' - 甲氧基修饰,硫代硫酸骨架修饰和序列 5' 端连接胆固醇。

[0071] 上述修饰过的小鼠 miR-329 序列和修饰过的对照 miRNA 序列均购自广州锐博生物公司。

[0072] 视网膜荧光铺片结果如图 5 所示,结果显示,与对照 miRNA 或溶剂对照 0.9%NaCl 相比, miR-329 注射组小鼠的视网膜呈现较好的结构,表现为显著减少的视网膜血管的迂曲、扩张及视网膜出血点的面积。这种视网膜形态的正常化,可以缓解眼底出血、视力模糊和视野缺失等临床症状,减轻疾病的发病程度。

[0073] 三、miR-329 注射后抑制体内 CD146 的过度表达

[0074] 检测视网膜组织中 CD146 蛋白的相对表达量。结果如图 6 所示,表明 miR-329 可以显著抑制 OIR 小鼠视网膜中 CD146 的过度表达。

[0075] 综合以上结果,抑制 CD146 表达的 miR-329 基因治疗可以显著减轻缺血性眼部疾病的严重程度,揭示 CD146 是该疾病的重要靶点。

[0076] 实施例 4、抗 CD146 抗体预防和治疗缺血性眼部疾病

[0077] 本实施例中使用的抗体 AA98 见专利“CN1124284C”。抗体重链和轻链可变区的序列分别见专利第 2 页和第 3 页。

[0078] 一、抗 CD146 抗体 AA98 预防 OIR 大鼠疾病的发生发展

[0079] (一) 构建 OIR 大鼠疾病模型

[0080] 将出生后第 7 天的 SD 大鼠乳鼠(P7)和母鼠放入含 75% 氧气的高氧培养箱中 5 天,在第 12 天(P12)将其从氧箱中取出,放在正常氧气(21%)中饲养,造成相对低氧的环境,继续饲养。在第 18 天(P18)的乳鼠即为模型鼠。

[0081] (二) 玻璃体腔注射

[0082] 在乳鼠出生后第 7 天,将 AA98 ($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}, 1 \mu\text{l}$),对照 mIgG ($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}, 1 \mu\text{l}$) 分别注射到乳鼠的左、右眼睛的玻璃体腔内,再按照构建 OIR 大鼠模型的构建方法进行饲养,即为 AA98 组实验鼠和 mIgG 组实验鼠。不注射的乳鼠按照 OIR 大鼠模型的构建方法进行饲养,即为模型鼠。

[0083] 在第 18 天将 AA98 组、mIgG 组、模型鼠和正常鼠,分别剥离眼球进行实验。

[0084] (三) 视网膜荧光铺片实验

[0085] 实验结果如图 7 所示。结果表明,与正常鼠相比,模型鼠(OIR)的视网膜血管呈现明显的迂曲、扩张和渗漏。视网膜血管的荧光渗漏点表示视网膜出血严重。以上视网膜形态结构的异常表示模型构建成功。

[0086] 与 mIgG 组和模型组相比,AA98 注射组显著减轻了视网膜血管的迂曲、扩张和渗漏,显著减轻了视网膜出血,使其形态结构正常化。图 7 中 i、ii、iii、iv 展示了不同拍照视野下小鼠视网膜的表型。

[0087] 这些结果表明 AA98 可以有效预防缺血性眼部疾病的发生发展。

[0088] 二、抗 CD146 抗体 AA98 治疗能够有效减轻 OIR 大鼠疾病的严重程度。

[0089] (一) 构建 OIR 大鼠模型:与实验一中相同。

[0090] (二) 玻璃体腔注射

[0091] 在乳鼠出生后第 15 天,将 $1 \mu\text{l} 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的 AA98,对照 mIgG ($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}, 1 \mu\text{l}$) 分别注射到乳鼠的左、右眼睛的玻璃体腔内,再将注射后的鼠按照 OIR 大鼠模型的构建方法进行饲养即为 AA98 组实验鼠和 mIgG 组实验鼠。不注射的乳鼠按照 OIR 大鼠模型的构建方法进行饲养即为模型鼠。

[0092] 在第 20 天将 AA98 组、mIgG 组、模型鼠和正常鼠,分别剥离眼球进行实验。

[0093] (三) 视网膜荧光铺片实验

[0094] 方法如实施例 2 的步骤三。实验结果如图 8 所示。

[0095] 结果表明,与模型组和 mIgG 组相比,AA98 注射后显著减轻了视网膜血管的迂曲和扩张,并且减轻了视网膜出血。这种视网膜形态结构的正常化,可以缓解眼底出血、视力模

糊和视野缺失等临床症状,减轻疾病的严重程度。图 8 中 i、ii 展示了不同拍照视野下小鼠视网膜的表型。

[0096] 这些结果表明 AA98 可以有效治疗缺血性眼部疾病。

[0097] 三、抗 CD146 抗体 AA98 特异性识别 CD146

[0098] 用免疫印迹方法检测抗体 AA98 对鼠内皮瘤细胞系 SEND 中 CD146 的识别。结果如图 9 所示,显示抗体 AA98 仅能识别 CD146,说明抗体 AA98 是特异作用于 CD146 的。图中,抗 CD146 的抗体 AA7 为正对照;二抗交叉为不加一抗,只加二抗的负对照,排除了 AA98 对 CD146 识别的非特异性。

[0099] 综合以上结果,进一步确定了以 CD146 作为靶点可以有效预防和治疗缺血性眼部疾病,CD146 是缺血性眼部疾病的一个重要靶点。

[0001]

序列表

<110>中国科学院生物物理研究所

<120> CD146 作为预防和/或治疗缺血性眼部疾病的药物靶点的应用

<160>2

<210>1

<211>22

<212> RNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>1

aacacaccca gcuaaccuuu uu

22

<210>2

<211>22

<212> RNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>2

uuuguacuaac acaaaaguac ug

22

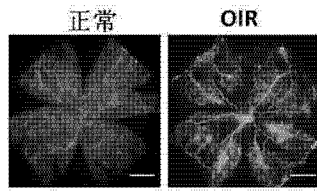


图 1

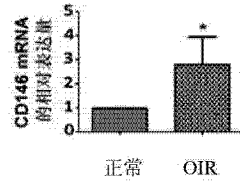


图 2

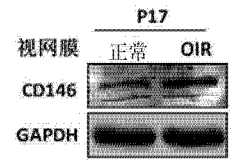


图 3

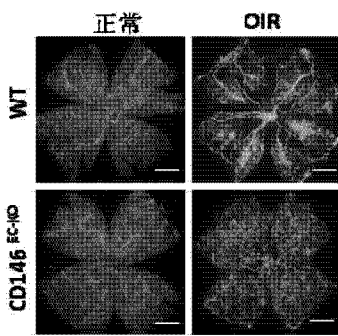


图 4

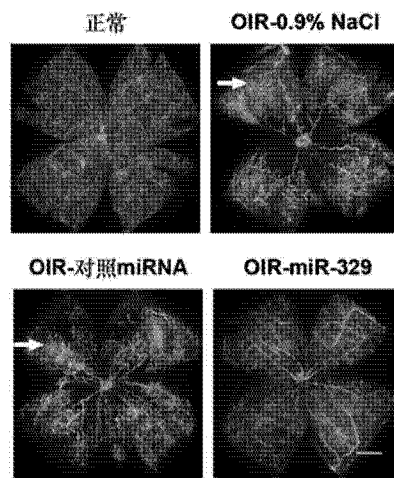


图 5

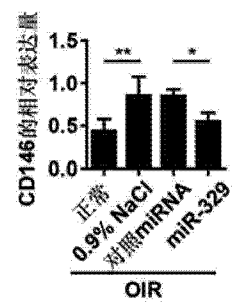


图 6

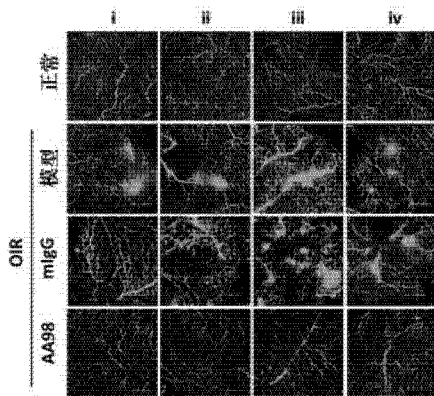


图 7

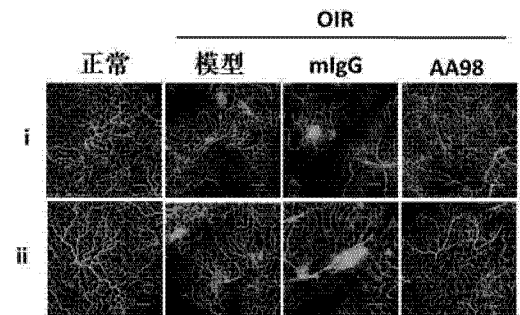


图 8

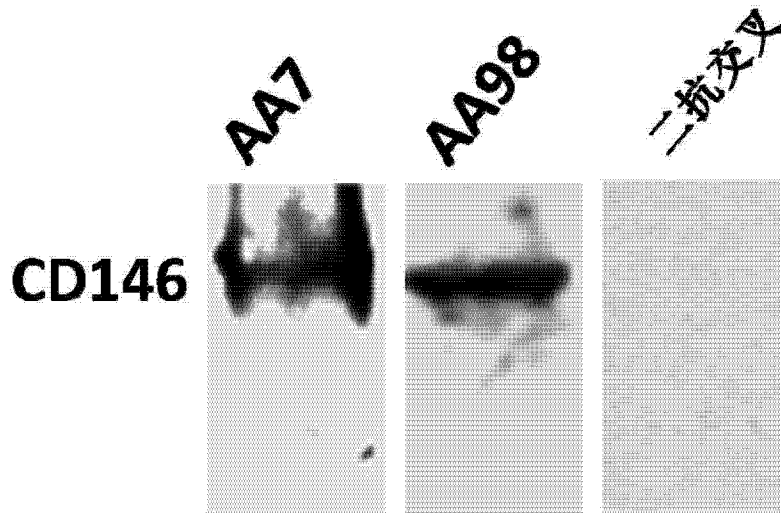


图 9